

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Molekulární a buněčná biologie, genetik a virologie



**Lenka Horníková**

**HLAVNÍ STRUKTURNÍ PROTEIN MYŠÍHO POLYOMAVIRU:  
INTERAKCE S BUNĚČNÝMI STRUKTURAMI**

MAJOR CAPSID PROTEIN OF MOUSE POLYOMAVIRUS: INTERACTION WITH  
CELLULAR STRUCTURES

Dizertační práce

Školitel: Doc. RNDr. Jitka Forstová, CSc.

Praha, 2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 30. 4. 2012

.....  
Lenka Horníková

Tato práce vznikla v letech 2005 - 2012 za finanční podpory grantů Ministerstva školství mládeže a tělovýchovy České republiky: Centrum „Funkční organizace buňky“ (LC545) a výzkumný záměr č. MSM0021620858.

Na tomto místě bych ráda poděkovala Doc. RNDr. Jitce Forstové, CSc. za neocenitelnou pomoc, rady a připomínky, které mi poskytovala během vypracování této dizertační práce.

Děkuji RNDr. Petru Manovi, Ph.D. za analýzu vzorků metodou hmotnostní spektrometrie.

Děkuji všem kolegům z laboratoře za veškerou pomoc a za vytvoření příjemného a přátelského pracovního prostředí.

Děkuji všem svým nejbližším za neustálou podporu.

Myší polyomavirus (MPyV) je malý neobalený DNA virus. I když je tento virus zkoumán již více než 50 let, stále zůstává nezodpovězená otázka, jak virus dopraví svou genetickou informaci do jádra nebo jakým mechanismem jsou sestavovány viriony v infikovaných buňkách. V první části práce jsme se zaměřili na charakterizaci endocytické dráhy, kterou využívá myší polyomavirus k dopravě genetické informace do blízkosti jádra. Pomocí dominantně negativní mutanty kaveolinu 1 jsme ukázali, že internalizace a efektivní infekce MPyV není závislá na kaveolinu 1. MPyV při vstupu do buňky využívá časné endozomy. Pro produktivní infekci je nezbytné kyselé pH endozomů. Zabránění vstupu viru do časného endozomu (dominantně negativní mutanta GTPázy Rab 5) nebo zvýšení pH endozomů (chloridem amonným nebo bafilomycinem A1) vedla k drastickému snížení infektivit MPyV. Alkalizace endozomů měla za následek zadržování virionů v časných endozomech, což naznačuje, že virus je dále transportován do pozdního endozomu. Pomocí metody FRET jsme potvrdili, že MPyV je v perinukleárním prostoru lokalizován v recyklujících endozomech.

Dalším, dosud málo charakterizovaným dějem životního cyklu MPyV je morfogeneze virionu. Jaderné a celobuněčné lyzáty infikovaných buněk nebo buněk transientně produkujících hlavní kapsidový protein MPyV, VP1, byly separovány modrou nativní elektroforézou (BN-PAGE) pro charakterizaci buněčných proteinů přítomných v prekurzorech virionů. Pomocí BN-PAGE jsme našli několik proteinových komplexů obsahujících protein VP1. Některé tyto proteinové komplexy obsahovaly buněčný protein Hsp 70. I když interakce mezi proteinem VP1 a Hsp 70 byla popsána již dříve, toto je poprvé, kdy bylo detekováno několik odlišných forem VP1-Hsp 70 komplexu. Žádný z komplexů obsahující protein VP1 nebyl zastoupen natolik, aby mohl být analyzován hmotnostní spektrometrií. Proto byly připraveny plazmidy umožňující expresi proteinu VP1 fúzovaného na N- nebo C- konci s kotvou BioEase Tag (Invitrogen), která umožňuje *in vivo* biotinylation fúzního proteinu a jeho následnou izolaci afinitní chromatografií. Fúzní proteiny s navázanými interagujícími proteiny byly izolovány afinitní chromatografií a jednotlivé složky izolovaných komplexů byly analyzovány hmotnostní spektrometrií. Identifikovali jsme buněčné proteiny Hsp 90 $\alpha$ , GAPDH a cytoskeletární keratin typ I. Ověření interakcí těchto buněčných proteinů s proteinem VP1 jakožto i jejich případné zapojení v morfogenezi virionu a životním cyklu viru bude předmětem dalšího zkoumání.

**Klíčová slova:** myší polyomavirus, časný endozom, protein VP1, modrá nativní elektroforéza, Hsp 70, protein-proteinové interakce

Mouse polyomavirus (MPyV) is small non-enveloped DNA virus. Although this virus has been studied for almost 60 years, it still remains unclear, how can virus transport its genetic information to the cell nucleus. Also, the mechanism of virion morphogenesis is not well understood. First part of this work is focused on endocytic pathway which is used by MPyV for trafficking toward the cell nucleus. Using dominant negative mutant of caveolin-1 we showed that caveolin-1-dependent endocytic pathway, described for SV40, is not used by MPyV for productive infection. MPyV is transported to early endosomes. Acidic milieu of endosomes is indispensable for productive infection. Preventing virus localisation into early endosomes (dominant negative mutant of Rab 5 GTPase) or endosomes alkalisation (by ammonium chloride or bafilomycin A1) led to dramatic decrease of virus infectivity. Alkalisation of endosomes entailed retention of MPyV in early endosomes. It indicates that virus is further transported to late endosomes. Finally, we confirmed by FRET that MPyV is in perinuclear space localized into recycling endosomes.

Another poor characterized process is virion morphogenesis. To characterize the participation of cellular proteins in virion precursor complexes, nuclear as well as whole-cell lysates of infected cells or cells transiently expressing VP1 were separated by blue native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE). Several VP1 positive protein complexes were identified. Some of these complexes contained proteins from the heat shock protein 70 family. Although the interaction between VP1 and heat shock proteins has been described previously, this is the first time that BN-PAGE has been shown to detect several different forms of VP1-Hsp 70 complexes. None of the VP1-positive bands was abundant enough to be analysed by mass spectrometry. Therefore, we created plasmids which allow expression of VP1 fused with BioEase Tag (Invitrogen) at its N or C terminus. This tag ensures *in vivo* biotinylation and purification by affinity chromatography of fusion protein. Complexes of fusion proteins and cellular proteins were isolated by affinity chromatography and composition of the complexes were analysed by mass spectrometry. Cellular proteins Hsp 90 $\alpha$ , GAPDH and keratin type I were identified. Confirmation of interaction between VP1 and these cellular proteins as well as their roles in virion assembly and virus life cycle remains to be elucidated.

**Key words:** mouse polyomavirus, early endosome, VP1 protein, blue native polyacrylamide gel electrophoresis, Hsp 70, protein-protein interactions

## **OBSAH:**

<b>1.</b>	<b>ÚVOD</b>	<b>10</b>
<b>2.</b>	<b>LITERÁRNÍ PŘEHLED</b>	<b>12</b>
2.1.	Klasifikace Polyomavirů	13
2.2.	Organizace genomu MPyV	13
2.3.	Životní cyklus myšího polyomaviru	15
2.4.	Strukturní proteiny	15
2.4.1.	Hlavní kapsidový protein VP1	15
2.4.2.	Minoritní strukturní proteiny, VP2 a VP3	17
2.5.	Struktura virionu	19
2.6.	Arteficiální virové struktury	20
2.7.	Vazba strukturních proteinů k DNA	21
2.8.	Lokalizace strukturních proteinů v buňce	22
2.9.	Morfogeneze virionu	23
2.9.1.	Buněčné proteiny interagující s hlavním kapsidovým proteinem VP1 během pozdní fáze infekce	24
2.9.1.1.	Buněčné chaperony – Hsc 70 rodina	24
2.9.1.2.	Buněčný transkripční faktor YY1	26
2.9.1.3.	Buněčné karyoferiny	27
2.9.1.4.	Poly(ADP-ribose)polymeráza 1 (PARP-1)	28
2.10.	Vstup polyomavirů do buňky	28
<b>3.</b>	<b>CÍLE PRÁCE</b>	<b>33</b>
<b>4.</b>	<b>MATERIÁL A METODY</b>	<b>35</b>
4.1.	Použité buněčné linie a viry	36
4.2.	Použité plazmidy	36
4.3.	Použité primery	38
4.4.	Seznam protilátek	38
4.5.	Kultivace buněk	39
4.6.	Izolace viru a infekce buněk	39
4.7.	Transfekce buněk	39
4.8.	Nepřímé imunofluorescenční značení buněk	40
4.9.	Testování internalizace transferinu buněčnými liniemi NMuMG- Eps15-DIII-GFP a NMuMG- Eps15-EΔ95/295-GFP.	40
4.10.	Význam kaveolinu 1 pro vstup myšího polyomaviru do buněk	40
4.11.	Role časných endozomů v MPyV infekci	41
4.12.	Role endozomálního pH v MPyV infekci	41
4.13.	Plazmid pVP1	41
4.14.	Plazmidy pcDNA3.2/VP1-BE-NT a pcDNA3.2/VP1-BE-CT	41
4.15.	Plazmidy pVP1-BE-NT a pVP1-BE-CT	42
4.16.	Izolace jader z buněk	42
4.17.	Závislost rozpustnosti proteinu VP1 na koncentraci kyseliny 6-aminokapronové (AcA)	43
4.18.	Závislost rozpustnosti proteinu VP1 na přítomnosti detergentů	43
4.19.	SDS proteinová elektroforéza (SDS-PAGE)	43
4.20.	Barvení gelů po SDS-PAGE	44
4.21.	Přenos proteinů na nitrocelulóзовou membránu – Western blot	44
4.22.	Imunodetekce proteinů na membráně	44

4.23.	Příprava jaderného lyzátu pro separaci pomocí modré nativní elektroforézy	44
4.24.	Příprava celobuněčného lyzátu pro separaci pomocí modré nativní elektroforézy	44
4.25.	Modrá nativní elektroforéza (BN-PAGE)	45
4.25.1.	Separace proteinů pomocí 4-16% gelu	45
4.25.2.	Separace proteinů pomocí 3-12% gelu	45
4.26.	Analýza vlivu přítomnosti virové DNA v jaderných lyzátech na efektivitu separace proteinových komplexů BN-PAGE	46
4.26.1	Analýza proteinových komplexů	46
4.26.2.	Analýza DNA obsažené v jaderných lyzátech	47
4.26.2.1.	Agarózová elektroforéza	47
4.26.2.2.	Southern blot	47
4.26.2.3.	Hybridizace	47
4.27.	Test rozpustnosti proteinů VP1-BE-NT a VP1-BE-CT	48
4.28.	Test tvorby komplexů proteinu VP1-BE-NT a VP1-BE-CT	48
4.29.	Izolace komplexů proteinů VP1-BE-NT nebo VP1-BE-CT s buněčnými proteiny z buněk 293T	49
4.30.	Hmotnostní spektrometrie	49
<b>5.</b>	<b>VÝSLEDKY</b>	<b>50</b>
5.1.	Studium časně fáze infekce myšního polyomaviru	51
5.1.1.	Je MPyV internalizován do buněk drahou klatrinem zprostředkované endocytózy?	51
5.1.2.	Je kaveolin 1 nezbytný pro internalizaci myšního polyomaviru?	52
5.1.3.	MPyV vstupuje do časných endozomů	54
5.1.4.	MPyV používá při pohybu buňkou endocytickou dráhu závislou na GTPáze Rab 5	54
5.1.5.	Infekce myším polyomavirem je závislá na pH endozomů	57
5.1.6.	V buňkách ošetřených chloridem amonným nebo bafilomycinem A1 je MPyV zadržován v časných endozomech	58
5.1.7.	MPyV je transportován do recyklujících endozomů	59
5.2.	Studium interakcí strukturního proteinu VP1 MPyV v pozdních fázích infekce	61
5.2.1.	Studium interakcí proteinu VP1 s využitím separace komplexů pomocí modré nativní elektroforézy	61
5.2.1.1.	Rozpustnost proteinu VP1 není závislá na koncentraci kyseliny 6-aminokapronové	61
5.2.1.2.	Stabilita proteinových komplexů není ovlivněna solubilizací jader v modifikovaném RIPA pufru	62
5.2.1.3.	Protein VP1 vstupuje do separačního gelu, pouze pokud byly komplexy ošetřeny DNázou I	64
5.2.1.4.	Virová DNA zůstává v jaderném lyzátu i po ošetření DNázou I	66
5.2.1.5.	BN-PAGE může být použita pro studium proteinových komplexů infikovaných buněk	67
5.2.1.6.	BN-PAGE může být použita pro studium komplexů proteinu VP1 a buněčných proteinů vznikajících v buňkách, které transientně produkují VP1	68
5.2.2.	Studium interakcí hlavního kapsidového proteinu VP1 pomocí systému „Native pure affinity purification system“	71
5.2.2.1.	Příprava vektorů pro expresi fúzních proteinů VP1-BE-NT a VP1-BE-CT a charakterizace těchto proteinů	71
5.2.2.2.	Izolace a charakterizace komplexů proteinu VP1-BE-NT nebo VP1-BE-CT s buněčnými proteiny	76

<b>6.</b>	<b>DISKUZE</b>	<b>80</b>
6.1.	Studium časné fáze infekce myšního polyomaviru	81
6.2.	Studium interakcí strukturního proteinu VP1 MPyV v pozdních fázích infekce	86
<b>7.</b>	<b>ZÁVĚRY</b>	<b>93</b>
<b>8.</b>	<b>POUŽITÁ LITERATURA</b>	<b>95</b>
<b>9.</b>	<b>PŘÍLOHY</b>	<b>103</b>



**Seznam zkratk:**

AcA		kyselina 6-aminokapronová
BE		capTEV kotva, která umožňuje biotinylation proteinu <i>in vivo</i>
BFA		bafilomycin A1
bicin		N,N-Bis(2-hydroxyetyl)glycin
BN-PAGE	blue native polyacrylamide gel electrophoresis	modrá nativní elektroforéza
Bis-Tris	2,2-Bis(hydroxymetyl)-2,2',2''-nitrilotrietanol	2-Bis(2-hydroxyetyl)amino-2-(hydroxymetyl)-1,3-propandiol Bis(2-hydroxyetyl)amino-tris(hydroxymetyl)metan
CBB G-250		Coomassie brilliant blue G-250
CMV		cytomegalovirus
DAPI		4',6'-diamidino-2-fenylindol
DMEM		„Dulbecco's modified Eagle's medium“
EDTA		kyselina etylendiaminotetraoctová
EEA1	early endosomes antigen 1	antigen časného endozomu 1
EF1a		konstitutivní promotor elongačního proteinu 1 $\alpha$
Eps15	epidermal growth factor receptor substrate klon 15	substrát receptoru epidermálního růstového faktoru klon 15
ER	endoplasmic reticulum	endoplazmatické retikulum
ERAD dráha	ER associated protein degradation pathway	s ER spojená degradační dráha proteinů
FRET	fluorescence resonance energy transfer	fluorescenční rezonanční přenos energie
GAPDH		glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenáza
GFP	green fluorescent protein	zelený fluorescenční protein
hpi	hours post infection	hodin po infekci
Hsc 70		heat cognate protein 70
Hsp 70	heat shock protein 70	protein teplotního šoku 70
Hsp 90 $\alpha$	heat shock protein 90 $\alpha$	protein teplotního šoku 90 $\alpha$
LT	large tumor antigen	velký tumorogenní antigen
MHC I	major histocompatibility komplex II	hlavní histokompatibilní komplex I
MOI	multiplicity of infection	multiplacita infekce
MPyV	mouse polyomavirus	myší polyomavirus
MT	midlle tumor antigen	střední tumorogenní antigen
Mw	molecular weight	molekulová hmotnost

Ori	origin of replication	počátek repikace
PARP-1	poly(ADP-ribose) polymerase 1	poly(ADP-ribose)polymeráza1
PBS	phosphate buffered saline	fosfátový pufr
PBS-TK		fosfátový pufr pro tkáňové kultury
pfu		„plaque forming unit“
SDS		dodecylsulfát sodný
ses sekvence	SV40 encapsidation sequence	enkapsidační sekvence viru SV40
ST	small tumor antigen	malý tumorogenní antigen
SV40	Simian virus 40	opičí virus 40
Tricin		N-[Tris(hydroxymetyl)metyl]glycin
Tris		tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
VLPs	virus like particles	viru podobné částice
VP1	viral protein 1	hlavní kapsidový protein 1
VP1-BE-CT		protein VP1 fúzovaný na svém C konci s BE kotvou
VP1-BE-NT		protein VP1 fúzovaný na svém N konci s BE kotvou
VP2	viral protein 2	minoritní strukturní protein 2
VP3	viral protein 3	minoritní strukturní protein 3
VP1 <sub>5</sub> -VP3		pentamery proteinu VP1 s navázaným proteinem VP3
WPRE	woodchuck posttranscriptional regulatory element	posttranskripční regulační element viru hepatitidy psouna

## **1. ÚVOD**

Myší polyomavirus a virus SV40 sloužily jako důležité modelové systémy pro pochopení různých aspektů buněčné organizace a funkce již od svého objevení v padesátých letech dvacátého století. Mezi poznatky plynoucí ze studia těchto virů patří objasnění struktury nadšroubovice DNA, role enhancerů v genové expresi, mechanismus sestřihu RNA, složení komplexů replikujících DNA a mnoha dalších. Toto je částečně důsledkem povahy a malé velikosti genomové DNA této virové čeledi. Replikace genomu polyomavirů je závislá na buněčném replikačním aparátu a probíhá podobnými mechanismy jako replikace buněčné DNA. K intenzivnímu studiu polyomavirů přispěl také fakt, že tyto viry jsou schopny indukovat nádorovou transformaci.

V posledních letech se polyomaviry znovu dostávají do popředí zájmu vědců, ne jako modelové organismy buněčných dějů, ale jako nebezpečné virové patogeny. Mezi nejvíce studované lidské polyomaviry patří BK virus a JC virus, které způsobují závažná onemocnění u imunosuprimovaných jedinců. V posledních několika letech je intenzivně zkoumán i polyomavirus karcinomu Merkelových buněk (MCPyV), jehož integrovaný genom byl nalezen v nádorech pacientů s nejagresivnější formou rakoviny kůže. Pro úspěšnou léčbu těchto nebezpečných lidských patogenů je důležité poznat životní cykly těchto virů, jejich receptory, interakce virů s hostitelskými buňkami stejně jako morfogenezi virionů. Detailnímu poznání těchto procesů brání nedostatečné „vědecké zázemí“ pro jejich studium (protilátky, virové mutanty, aj.) stejně jako jejich složitě (v případě MCPyV nemožné) pomnožení v tkáňových kulturách. Jako modelové organismy těchto dějů proto můžeme s výhodou využít více prozkoumané příslušníky této čeledi, myší polyomavirus a virus SV40.

## **2. LITERÁRNÍ PŘEHLED**

## 2.1. Klasifikace Polyomavirů

Myší polyomavirus (MPyV) patří do čeledi *Polyomaviridae*. Viry patřící do této čeledi jsou malé, neobalené viry, jejichž genomem je dvouřetězcová, kruhová DNA. Příslušníci této čeledi infikují mnoho druhů savců, včetně člověka, ostatních primátů, hlodavce, králíky a také ptáky. Většina těchto virů má úzký hostitelský okruh a nemá schopnost produktivně infikovat ostatní druhy. Taxonomie této čeledi prošla v roce 2011 revizí (Johns et al., 2011). Jediný rod této čeledi byl rozdělen na tři: *Orthopolyomavirus* a *Wukipolyomavirus* zahrnující polyomaviry napadající savce a *Avipolyomavirus*, který zahrnuje polyomaviry napadající ptáky. Čeleď *Polyomaviridae* zahrnuje 22 savčích virů (z toho 9 lidských) a 5 ptačích. Z molekulárně biologického hlediska jsou nejvíce prostudovány myší polyomavirus a virus Simian virus 40 (SV40), dále jsou intenzivně studovány všechny lidské polyomaviry (shrnutí v tabulce 1).

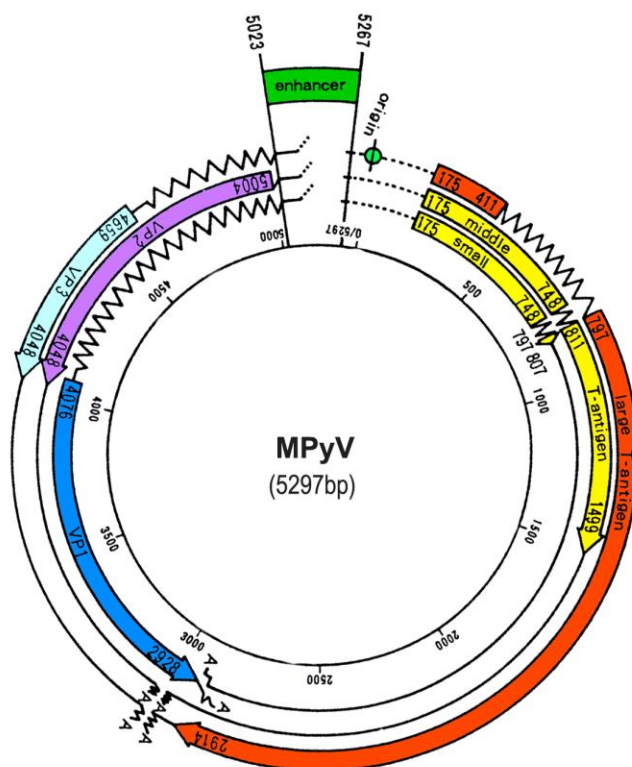
název viru	hostitel	původní izolace
Myší polyomavirus	myš	Gross 1953
Simian virus 40	opice	Sweet a Hilleman, 1960
BK virus	člověk	Gardner et al., 1971
JC virus		Padgett et al., 1971
KI polyomavirus		Allander et al., 2007
WU polyomavirus		Gaynor et al., 2007
Merkel cell polyomavirus		Feng et al., 2008
Lidský polyomavirus 6		Schowalter et al., 2010
Lidský polyomavirus 7		
Trichodysplazia spinulosa – associated virus		van der Meijden et al., 2010
Lidský polyomavirus 9		Scuda et al., 2011

Tabulka 1. Viry z čeledi Polyomaviridae. Zvýrazněny jsou v současnosti nejvíce studované polyomaviry.

## 2.2. Organizace genomu MPyV

Genom polyomavirů, jehož velikost je necelých 5300 bp, může být rozdělena na časnou oblast (obr. 1), pozdní oblast a nekódující regulační oblast. Časná oblast genomu je transkribována a exprimována časně po vstupu viru do buňky a exprese pokračuje i v pozdních stádiích infekce. Pozdní oblast genomu je exprimována až po zahájení replikace virového genomu. Genom polyomavirů obsahuje jediný počátek DNA replikace – Ori. Promotory a

enhancery transkripce jsou lokalizovány blízko počátku replikace a dohromady s ním tvoří regulační oblast. Transkripce běží dvousměrně, přičemž časné a pozdní mRNA jsou transkribovány z opačných řetězců. Časná oblast genomu kóduje virové regulační proteiny, tumorové neboli T antigeny. MPyV kóduje tři T antigeny – velký (LT), střední (MT) a malý (ST) T antigen. Všechny T antigeny mají společnou N-koncovou sekvenci a odlišnou C-koncovou oblast, mRNA, které je kódují, vznikají alternativním sestřihem ze společné pre-mRNA. Časné antigeny stimulují buňku ke vstupu do S fáze buněčného cyklu, stimulují produkci replikačních enzymů a podílejí se na transkripci a replikaci virové DNA. Pozdní oblast genomu kóduje tři kapsidové proteiny – VP1, VP2 a VP3. Stejně jako u časných mRNA i pozdní mRNA vznikají alternativním sestřihem ze společné pre-mRNA. Molekuly pre-mRNA jsou extrémně dlouhé, jsou to několikanásobné kopie celého genomu (Acheson 1978). Alternativním sestřihem vznikají tři typy monocistronních mRNA: 16S mRNA kódující protein VP1, 18S mRNA kódující protein VP3 a 19S mRNA kódující protein VP2. Kódující oblast proteinů VP2 a VP3 se překrývá, celá sekvence proteinu VP3 je obsažena v C-koncové sekvenci proteinu VP2 a oba geny jsou čteny ve stejném čtecím rámci. Oblast kódující N-koncovou část proteinu VP1 se překrývá s C-koncovou sekvencí proteinu VP2 a VP3, ale protein VP1 je translatován z jiného čtecího rámce než proteiny VP2 a VP3.



**Obr.1. Genom myšího polyomaviru** lze rozdělit na časnou a pozdní oblast. Ty jsou od sebe odděleny regulační oblastí, která obsahuje replikační počátek (origin), promotory a enhancer. Na obrázku jsou znázorněny pozice genů, ze kterých jsou kódovány jednotlivé virové produkty, počáteční a koncové nukleotidy jednotlivých mRNA a nukleotidové pozice intronů. (upraveno podle Cole a Conzen 2001).

### **2.3. Životní cyklus myšího polyomaviru**

Produktivní infekce MPyV může být rozdělena na několik částí:

- 1) adsorpce virionu na buněčný povrch a internalizace viru buňkou
- 2) pohyb buňkou směrem k jádru a vstup viru do buněčného jádra
- 3) transkripce časných genů
- 4) replikace virové DNA
- 5) transkripce pozdních genů a morfogeneze virionů
- 6) lyze buňky a uvolnění virového potomstva

První tři fáze životního cyklu bývají označovány jako časná fáze virové infekce, transkripce pozdních genů, morfogeneze a lyze buňky jako pozdní fáze virové infekce. Proces adsorpce a internalizace viru je velmi rychlý, již 30 min po infekci se nachází většina viru v buňce (Richterová et al., 2001). Dále je internalizovaný virus dopraven endocytickými drahami k jádru. Jakmile vstoupí virová DNA do jádra, může začít transkripce časných oblastí genomu. Vzhledem k malé kódující kapacitě polyomavirového genomu probíhá transkripce hostitelskou RNA polymerázou II. Mediátorová RNA velkého T antigenu byla amplifikována reverzní transkripcí a detekována metodou Southern blot již 6 h po infekci, zatímco mRNA pro MT a ST byly takto detekovatelné až od 12 hpi. Protein LT byl detekován metodou Western blot 8 hpi, proteiny MT a ST byly detekovány se 6 hodinovým zpožděním oproti proteinu LT. Po translaci dostatečného množství časných antigenů a navození S fáze buněčného cyklu může začít replikace virového genomu. Pro iniciaci replikace je nezbytný LT antigen. Ve formě hexameru se váže do oblasti Ori na virové DNA a interaguje s buněčnými proteiny zajišťujícími replikaci DNA. Replikace virové DNA začíná 16 – 18 hpi. Transkripce pozdní oblasti genomu začíná 18 – 20 hpi, přičemž protein VP1 je detekovatelný již 22 hpi (metodou Western blot). V této době mohou být v buňkách detekovány nově vzniklé viriony. Cytopatický efekt virové infekce na hostitelské buňky byl pozorován 48 hpi. (Chen a Fluck, 2001).

### **2.4. Strukturní proteiny**

#### **2.4.1. Hlavní kapsidový protein VP1**

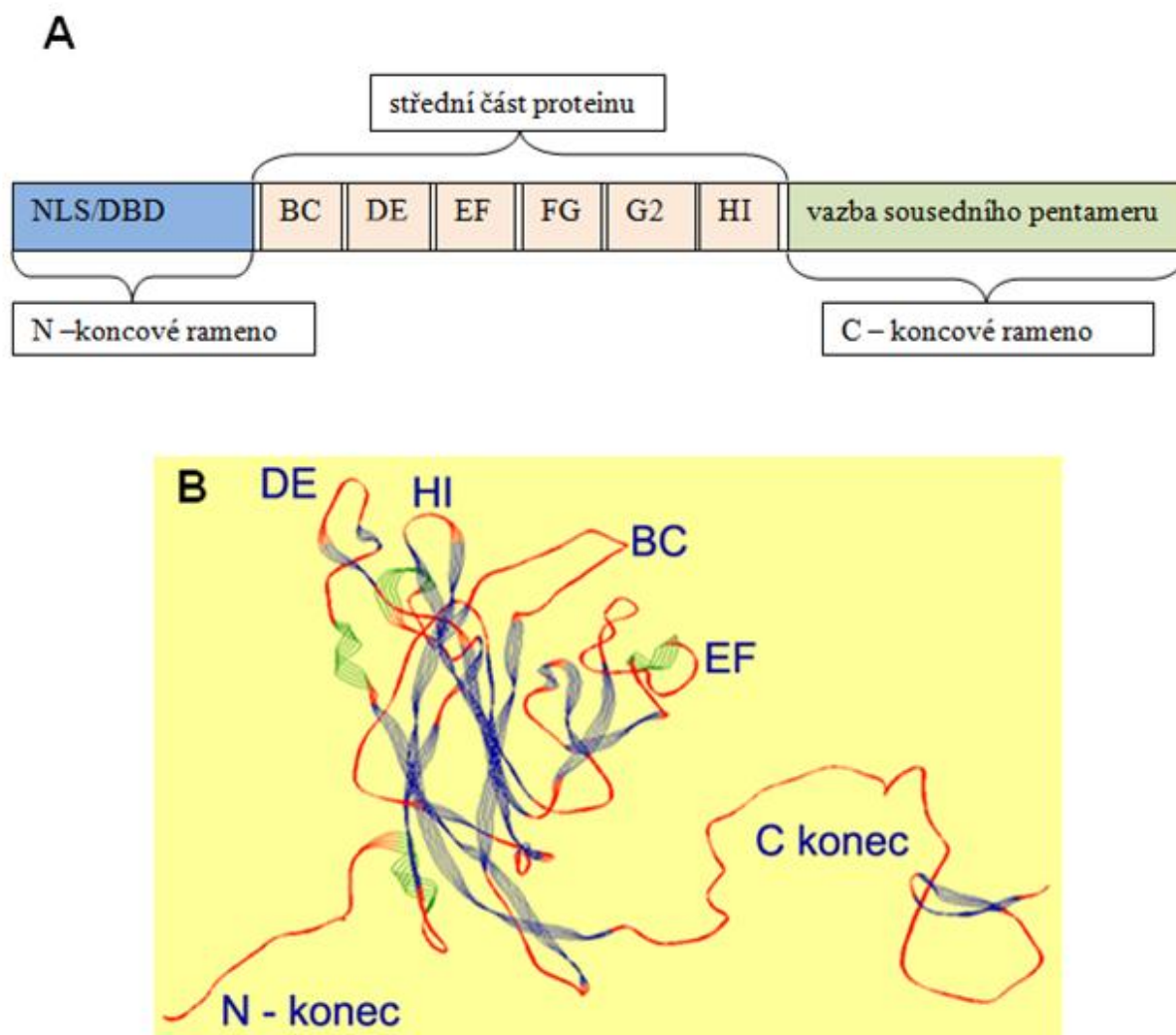
Kapsidový protein VP1 (MW = 45 kDa) je základním stavebním kamenem virové kapsidy. Základní stavební jednotkou kapsidy je kapsomera, která má formu pentameru tvořeného 5 molekulami proteinu VP1. Kromě strukturální funkce má protein VP1 také další funkce v životním cyklu viru. Zprostředkovává přichycení viru na buněčný povrch a tím jeho internalizaci buňkou, může se účastnit kontroly virového růstu a také umožňuje přichycení



virového genomu k jaderné matrix a tak přispívá k zahájení časné transkripce (Carbone et al., 2004).

Terciární struktura proteinu VP1, struktury pentameru a kapsidy viru byly detailně popsány pomocí krystalografických studií kapsidy viru SV40 (Liddington et al., 1991). Podle terciární struktury může být polypeptidový řetězec proteinu VP1 rozdělen na tři části: i) N-koncové rameno, ii) střední část a iii) dlouhé C-koncové rameno (obr. 2). Prvních 15 aminokyselin N-koncového ramena je orientováno do dutiny pentameru, kde interaguje s minichromozomem. N-koncové rameno obsahuje jaderný lokalizační signál a DNA vazebnou doménu. Střední část proteinu VP1 je tvořena  $\beta$  listy a  $\alpha$  helixy, které jsou navzájem spojeny šesti smyčkami – BC, DE, HI, EF, FG a G2. Smyčky BC, DE a HI jsou exponovány na povrchu virionu. Smyčka EF je součástí vazebného místa pro  $\text{Ca}^{2+}$ . Dlouhý flexibilní C-konec se skládá z  $\alpha$  helixu, C-insertu a C-smyčky a účastní se vazby mezi jednotlivými pentamery (Stehle et al., 1996). C-koncové rameno se také účastní tvorby vazebného místa pro kation vápníku (Liddington et al., 1991).

Protein VP1 je bohatě posttranslačně modifikován fosforylací, sulfonylací, acetylací, hydroxylací a metylací (BOLEN *et al.*, 1981). Velmi důležitou posttranslační modifikací tohoto proteinu je fosforylace. Protein VP1 je fosforylován na serinových a threoninových zbytcích. Místa fosforylace threoninů byla lokalizována na Thr-63 a Thr-156. Tyto aminokyselinové zbytky se nacházejí na povrchu virionu (BC a DE smyčka) a jejich fosforylace je pravděpodobně důležitá pro vazbu na buněčný receptor a pro morfogenezi virionu. Pro fosforylaci threoninových zbytků je nezbytná přítomnost středního T antigenu, který je zřejmě aktivátorem buněčných kináz. (Garcea et al., 1985, Li a Garcea, 1994). Přesná místa fosforylace serinů nejsou zcela charakterizována, neboť viry mutované v serinech nejsou životaschopné. Nejlépe je charakterizovaná fosforylace Ser-66, která je zprostředkována kasein kinázou II a ovlivňuje nejspíš interakce mezi kapsomerami (Li et al., 1995b). Pro správnou fosforylaci proteinu VP1 je nezbytná i přítomnost minoritních proteinů. Protein VP1 produkováný samostatně v bakulovirovém expresním systému nebo exprimovaný společně s proteinem VP3 byl fosforylován na serinových zbytcích, které nejsou modifikovány v infikovaných buňkách. Tato nefyziologická fosforylace byla snížena, pokud byl protein VP1 exprimován společně s proteinem VP2. (Forstová et al., 1993, Li et al., 1995a). Zdá se, že protein VP2 hraje určitou roli v posttranslačních modifikacích proteinu VP1. Je možné, že vazba VP2 k VP1 mění konformaci VP1 a tedy i přístupnost jednotlivých aminokyselinových zbytků pro kinázy.



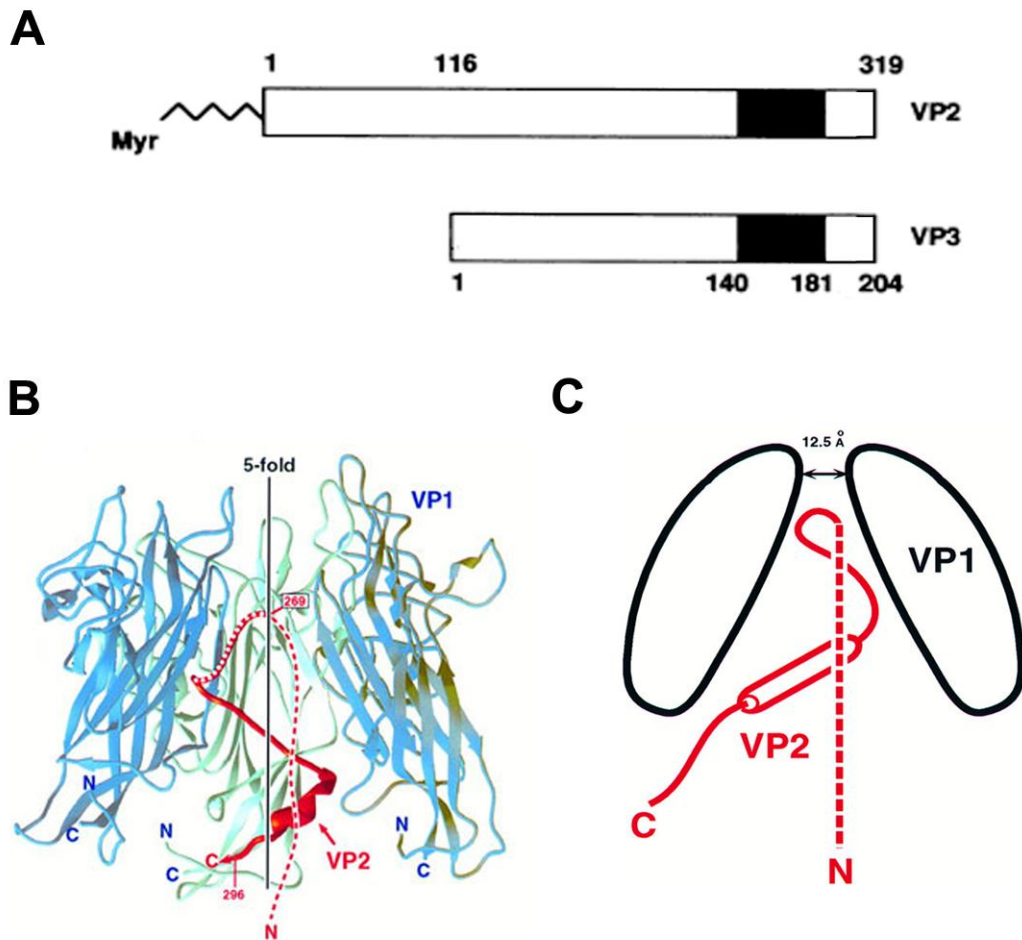
**Obr. 2. Terciární struktura proteinu VP1.** **A** – schematické znázornění domén proteinu VP1. **B** – terciární struktura proteinu VP1 (upraveno podle Liddington et al., 1991). Vyznačen je jaderný lokalizační signál (NLS), DNA vazebná doména (DBD) a jednotlivé smyčky.

#### 2.4.2. Minoritní strukturní proteiny, VP2 a VP3

Minoritní strukturní proteiny jsou translatovány ze stejného čtecího rámce. Kratší z nich, protein VP3 (23 kDa) je identický s C-koncovou částí proteinu VP2 (35 kDa) (obr. 3). Minoritní kapsidové proteiny fyzicky interagují s hlavním kapsidovým proteinem, čímž ovlivňují jeho posttranslační modifikace a subcelulární lokalizaci (viz dále). Proteiny VP2 a VP3 nejsou exponovány na povrchu kapsidy, ale interagují s centrální dutinou pentameru VP1, přičemž s jedním pentamerem je asociován vždy jeden minoritní strukturní protein (Rayment et al., 1982). Na základě biochemických studií a krystalografických analýz byl navržen model

interakce minoritních kapsidových proteinů s pentamery proteinu VP1 (obr. 3). Předpokládá se, že N-konec molekuly minoritního strukturního proteinu směřuje směrem k nukleocore a C-koncová část proteinu vede do centrální dutiny pentameru VP1, kde tvoří smyčku a směřuje zpět dovnitř virionu. Za vazbu mezi VP1 pentamerem a proteiny VP2 a VP3 jsou zodpovědné hydrofobní interakce. Vnitřní centrální dutina pentameru VP1 má hydrofobní charakter stejně jako oblast mezi 154. – 180. aminokyselinou VP3. (Barouch a Harrison, 1994, Chen et al., 1998).

Protein VP2 je na svém N-konci myristylován (Streuli a Griffin 1987), posttranslační úpravy proteinu VP3 nejsou známy. Myristylace proteinu VP2 je patrně důležitá pro správnou konformaci virionu, která je nezbytná pro efektivní uvolnění virionů z buňky a reinfekci (Mannová et al., 2002). Funkce obou minoritních kapsidových proteinů není příliš objasněna. Mutantní viriony postrádající protein VP2 nebo VP3 jsou neinfekční a jejich defekt se projeví již v časně fázi infekce (Mannová *et al.*, 2002). Stejný efekt byl ukázán i pro viriony viru SV40, které, pokud postrádaly jeden z minoritních strukturních proteinů, byly prakticky neinfekční následkem defektu v dopravě virového minichromozomu do buněčného jádra (Nakanishi et al., 2006, Nakanishi et al., 2007). Zároveň mohou minoritní kapsidové proteiny hrát roli i ve vazbě virionu na buněčný povrch. U virionů viru SV40, které neobsahovaly protein VP2, bylo pozorováno významné snížení vazby viru na buněčný povrch (Daniels et al., 2006). U minoritních proteinů byly identifikovány dvě společné hydrofobní transmembránové domény, třetí byla specifická pro protein VP2 (vyskytuje se v unikátní části proteinu VP2) (Rainey-Barger et al., 2007). Tyto hydrofobní domény mohou hrát roli při doručení genomu do jádra a při uvolnění virového potomstva z infikované buňky. Pokud jsou minoritní proteiny exprimovány v buňkách bez přítomnosti jiných virových proteinů navozují rychlou buněčnou smrt aktivací apoptotické dráhy (Huerfano et al., 2010).



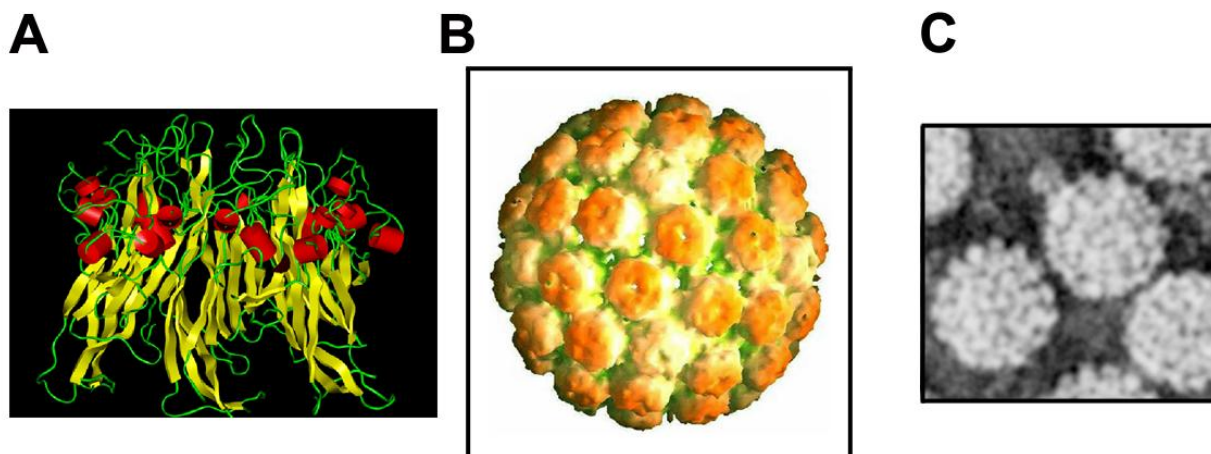
**Obr. 3. Minoritní strukturní proteiny myšího polyomaviru. A** – Schematické znázornění proteinů VP2 a VP3. Černě je vyznačena oblast interagující s dutinou VP1 pentameru. (upraveno podle Barouch a Harrison, 1994). **B a C** – Umístění minoritních kapsidových proteinů v dutině pentameru. Příčný průřez pentamerem VP1 proteinu. V dutině pentameru může být uložena buď jedna molekula VP2 (na obrázku) nebo VP3 proteinu. Přerušovaně je vyznačena unikátní N-koncová část VP2 proteinu. N- a C- konec proteinu směřuje dovnitř virionu. **B** – model terciární struktury komplexu VP1 s minoritním strukturním proteinem, **C** – schematické znázornění interakce proteinu VP1 a minoritních strukturních proteinů (Upraveno podle Chen et al., 1998).

## 2.5. Struktura virionu

Kapsida myšího polyomaviru (45 nm) je tvořena třemi virovými strukturními proteiny – VP1, VP2 a VP3, které obklopují molekulu virové DNA, která je v komplexu s buněčnými histony H2A, H2B, H3 a H4 a má formu chromatinu. Tento komplex histonů a virové DNA se nazývá virový minichromozom. Kondenzovaný minichromozom ve virionu je nazýván virové nucleocore. Strukturní proteiny tvoří kapsidu s ikosahedrální symetrií a triangulačním číslem  $T = 7$  (obr. 4). Tato kapsida obsahuje 360 molekul hlavního kapsidového proteinu VP1, uspořádaného do 72 pentamer. S každým pentamerem je asociována jedna molekula proteinu

VP2 nebo VP3. Pět proteinových řetězců proteinu VP1 spolu úzce interaguje a tvoří pentamer (obr. 4.), dokonce již sekundární struktury proteinu do sebe zapadají. Pentamer je zhruba cylindrického tvaru, v průměru má 8 nm a 7 nm na výšku. Středem pentameru prochází dutina, která je při základně široká 5 nm a u vrcholu 1,2 nm. Krystalografickými studiemi při vysokém rozlišení (Liddington *et al.* 1991, Stehle *et al.* 1996) bylo prokázáno, že C-koncové rameno VP1 molekuly není součástí struktury příslušného pentameru, ale směřuje k sousedním pentamerům. Tato C-koncová ramena tvoří nejdůležitější kontakty mezi pentamery.

Pro stabilitu virionu jsou důležité vápenaté ionty (BRADY *et al.* 1977). Vápenaté ionty spíše stabilizují strukturu již složené částice, než že by přímo řídily skládání virionu. Navázaný vápenatý kation formuje můstek mezi C-koncovým ramenem jednoho pentameru a EF smyčkou sousedního pentameru. Pro navázání vápenatého kationu jsou nezbytné dva glutamátové zbytky (pozice 157 a 160) v EF smyčce a aspartátový zbytek v C-koncovém ramenu (Liddington *et al.*, 1991). Tyto kyselé aminokyseliny jsou konzervovány napříč čeledí *Polyomaviridae*. Iontový můstek stabilizuje vazbu mezi pentamery tím, že zajišťuje další připojení C-koncového ramena k cílovému pentameru.



**Obr. 4. Struktura virionu.** **A** – model pentameru tvořeného 5 molekulami proteinu VP1, pohled z boku. **B** - Model kapsidy MPyV vytvořený na základě rentgenové analýzy krystalu virionu. (převzato z Liddington *et al.*, 1991). **C** – Viriony myšního polyomaviru. Negativní barvení (fotografováno při zvětšení 100000×), obrázek pořídil M. Fraiberk.

## 2.6. Arteficiální virové struktury

Při izolaci viru z buněk můžeme nalézt tři druhy virových částic. Jednak infekční virové částice obsahující virový minichromozom. Dále virová preparace obsahuje také prázdné kapsidy

a pseudoviriony, což jsou kapsidy obsahující „nahou“ buněčnou DNA. Infekce buněk polyomaviry s vysokou multiplicitou vede k tvorbě defektních virových genomů, obsahujících delece, duplikace a přestavby – často se jedná o duplikace virového replikačního počátku. Pokud mají tyto defektní genomy vhodnou velikost, mohou být zabaleny do kapsidy.

Protein VP1 je sám o sobě schopen vytvářet VLPs (viru podobné částice – virus like particles). K uspořádání těchto struktur nejsou zapotřebí posttranslační modifikace proteinu VP1 ani minoritní kapsidové proteiny (Salunke et al., 1986), ale důležitá je přítomnost  $\text{Ca}^{2+}$  iontů. Rekombinantní protein VP1 izolovaný z *Escherichia coli* vytváří pentamery, které jsou schopny se *in vitro* uspořádat do kapsidových částic stabilizovaných přítomností vápenatých kationů. V závislosti na podmínkách *in vitro* reakce (pH, iontová síla, koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$ ) mohou vznikat polymorfní agregáty, které se svou stavbou liší od virionů. Vznikají částice o velikosti 32 nm (složené z 24 pentamerů proteinu VP1), 26 nm (složené z 12 pentamerů proteinu VP1) a tubulární struktury s helikálním uspořádáním pentamerů. (Salunke et al., 1989).

Tvorba VLPs byla prokázána *in vivo* v jádrech hmyzích buněk linie Sf9 po infekci rekombinantním bakulovirem exprimujícím protein VP1 (Montros et al., 1991). Tyto VLPs jsou schopny enkapsidovat fragmenty buněčné DNA a histony (Forstová et al., 1995, Gillock et al., 1997). Minoritní proteiny (nejsou schopny samy o sobě tvořit VLPs), pokud jsou exprimovány společně s proteinem VP1, jsou efektivně zabudovávány do částic. Zastoupení jednotlivých proteinů v částicích tvořených všemi třemi strukturálními proteiny je srovnatelné s poměrem proteinů ve virionech (Forstová et al., 1993). Protein VP1 vytváří VLPs také při expresi v kvasinkových buňkách *Saccharomyces cerevisiae* (Palková et al., 2000a).

## 2.7. Vazba strukturálních proteinů k DNA

Protein VP1 má DNA vazebnou aktivitu, zatímco minoritní strukturální proteiny myšího polyomaviru DNA neváží. Tím se tyto proteiny zásadně liší od minoritních strukturálních proteinů viru SV40, které mají DNA vazebnou afinitu. Clever et al. (1993) ukázali, že posledních třináct C-koncových aminokyselin proteinu VP2 a VP3 je zodpovědných za vazbu DNA. Minoritní strukturální proteiny myšího polyomaviru postrádají 28 posledních C-koncových aminokyselin, které se vyskytují u minoritních kapsidových proteinů primátích polyomavirů. DNA vazebná doména proteinu VP1 je tvořena prvními pěti aminokyselinami polypeptidového řetězce, přičemž zcela zásadní je lyzin v pozici 5. Bodová mutace tohoto lyzinu drasticky redukuje DNA vazebnou afinitu proteinu. Protein VP1 nevykazuje sekvenční specifitu, váže DNA nespecificky. (Chang et al., 1993).

Rovněž VP1 pentamer váže DNA (Štokrová et al., 1999), DNA vazebná doména v něm není blokována, zatímco ve virionu je lokalizovaná do vnitřku virionu a předpokládá se, že interaguje s virovým minichromozomem. Virový minichromozom postrádá histon H1, i když uvnitř buňky, před utvořením virionu je histon H1 v minichromozomu přítomen (Varhavsky et al. 1976). Tento histon je během morfogeneze virionu patrně vytěsněn proteinem VP1 (Winston et al. 1980). Ve zralém virionu interaguje protein VP1 s virovým genomem po celé jeho délce, je tedy přítomen i v nucleocore (Carbone et al., 2004). Tato vazba naznačuje, že protein VP1 hraje strukturální roli v ochraně enkapsidované DNA. Tuto teorii potvrzuje zjištění, že pokud je mutována DNA vazebná doména proteinu VP1 viru SV40, dochází ke změnám ve formování virionů a v jejich infektivitě (Li et al., 2001). I když vazba proteinu VP1 není sekvenčně specifická, VP1 se preferenčně váže do regulační oblasti virové DNA (Carbone et al., 2004), která není obsazena nukleozomy. Vazba proteinu VP1 k DNA má tak spíše strukturální, než sekvenční specifitu.

*In vivo* jsou VLPs schopny enkapsidovat buněčnou DNA a histony, enkapsidované fragmenty mají přibližně stejnou velikost jako polyomavirový genom (Gillock et al., 1997, Palková et al., 2000a). „Prázdné“ VLPs (neobsahují enkapsidovanou DNA) jsou schopny *in vitro* vázat „holou“ heterologní DNA. VLPs váží jak cirkulární tak i lineární formy DNA molekul, přičemž jsou schopny obě dvě formy DNA enkapsidovat (Štokrová et al., 1999).

## 2.8. Lokalizace strukturálních proteinů v buňce

V infikovaných buňkách se strukturální proteiny nalézají v jádře, každý obsahuje vlastní jaderný lokalizační signál.

Jaderný lokalizační signál proteinu VP1 je tvořen prvními 5 N-koncovými aminokyselinami (Moreland a Garcia, 1991). Důležitý pro jadernou lokalizaci proteinu je lyzin v pozici 3 a arginin v pozici 4. Substituce lyzinu-3 za threonin (Chang et al., 1992a) nebo argininu-4 za serin (Moreland a Garcia, 1991) zabránila jaderné lokalizaci proteinu. Jaderný lokalizační signál minoritních strukturálních proteinů byl identifikován v C-koncové oblasti polypeptidového řetězce, mezi aminokyselinami 307 – 318 (číslování polypeptidového řetězce proteinu VP2) (Chang et al., 1992b).

Pokud jsou strukturální proteiny VP1, VP2 nebo VP3 exprimovány samostatně za použití rekombinantního viru vakcínie, dochází k akumulaci proteinu VP1 v jádře, ale pouze 20% z celkového množství proteinu VP2 se nalézá v jádře a protein VP3 se v jaderné frakci nevyskytuje vůbec. Při infekci buněk rekombinantními viry produkujícími protein VP1 a jeden minoritní strukturální protein došlo k relokaci proteinu VP3 do jaderné frakce a ke zvýšenému

výskytu proteinu VP2 v jaderné frakci. (Stamatos et al., 1987). Kotransfekce buněk linie COS-7 plazmidy produkujícími protein VP2 a deleční mutantu proteinu VP1 (delece prvních 11 N – koncových aminokyselin, protein postrádá jaderný lokalizační signál) ukázala, že jaderný lokalizační signál proteinu VP2 je dostačující pro transport obou proteinů do buněčného jádra (Cai et al., 1994). V hmyzích buňkách linie Sf9 je do jádra efektivně transportován pouze protein VP1. Protein VP2 je lokalizován na membránách a protein VP3 v cytoplazmě. Jadernou lokalizaci vykazují minoritní strukturní proteiny pouze, pokud jsou exprimovány společně s proteinem VP1. (Forstová et al., 1993, Delos et al., 1993).

Podobných výsledků bylo dosaženo i při zkoumání lokalizace strukturních proteinů u dalších příslušníků této čeledi. Deleční mutanta proteinu VP1 viru SV40 (delece jaderného lokalizačního signálu) je efektivně transportována do buněčného jádra pouze, pokud je exprimována společně s nemutovanými minoritními strukturními proteiny. A obdobně, minoritní kapsidové proteiny s mutovaným jaderným lokalizačním signálem jsou transportovány do jádra pouze, pokud jsou exprimovány společně s nemutovaným proteinem VP1. (Ishii et al., 1994). Vliv na lokalizaci proteinu VP1 viru SV40 může mít také agnoprotein (pozdní nestrukturní protein, který je exprimován u primátích polyomavirů) tohoto viru (Carswell a Alwine, 1986). Hlavní strukturní protein viru JC obsahuje rovněž slabý jaderný lokalizační signál. Je transportován do jádra pouze v komplexu s minoritním strukturním proteinem, minoritní strukturní proteiny, pokud jsou exprimovány samostatně, jsou lokalizovány v cytoplazmě. Agnoprotein má na lokalizaci proteinů pouze nepatrný vliv. (Shishido-Hara et al., 2004).

Tyto poznatky naznačují, že jaderné lokalizační signály strukturních proteinů jsou schopny komplementovat své funkce. Komplexy proteinu VP1 s minoritními kapsidovými proteiny jsou formovány již v cytoplazmě, odkud jsou pak transportovány do jádra, kde dochází ke skládání virové kapsidy. Tento mechanismus patrně zajišťuje dopravení kapsidových proteinů ve správném stechiometrickém uspořádání, to jest jedna molekula minoritního strukturního proteinu na jeden pentamer proteinu VP1.

## **2.9. Morfogeneze virionu**

O vlastním procesu morfogeneze virionu myšího polyomaviru není mnoho známo. Starší práce studovaly proteinové a nukleoproteinové komplexy vznikající během morfogeneze virionu z hlediska obsahu virových proteinů, případně buněčných histonů. Garcea a Benjamin (1983) publikovali metodu izolace nukleoproteinových komplexů polyomaviru založenou na homogenizaci buněk za přítomnosti hypotonického pufru a následné inkubaci s neuraminidázou, která měla umožnit uvolnění komplexů obsahujících protein VP1 z vazby na sialylovaný



receptor. Izolace komplexů proběhla v pozdní fázi infekce (40 hod), DNA byla značena radioaktivně a nukleoproteinové komplexy byly separovány centrifugací v sacharózovém gradientu. Takto byla identifikována replikující se forma polyomavirové DNA (sedimentační koeficient 95S), vzniklý polyomavirový minichromozom (75S) a maturované viriony (240S). Mezi komplexy 95S a 240S bylo nalezeno velké množství meziproductů obsahujících značenou virovou DNA. Majoritní kapsidový protein VP1 byl detekován ve všech získaných frakcích, LT antigen byl detekován v komplexech 75S a 95S, ve zralých virionech nebyl nalezen. Yuen a Consigli (1985) izolovali buněčná jádra působením 0,1% NP 40 (slabý detergent), která po promytí rozrušili homogenizací. Získané nukleoproteinové komplexy separovali centrifugací v sacharózovém gradientu. Pomocí radioaktivně značené DNA bylo detekováno několik komplexů – 90S komplex; komplex 240S představující zralé viriony a 200S komplex představující patrně nezralé viriony. Tyto komplexy byly také analyzovány elektronmikroskopicky. Ve frakcích obsahujících 240S a 200S komplexy byly nalezeny typické virové částice, ve 200S frakci byla u některých virionů nalezena i ne zcela enkapsidovaná DNA. Komplexy 90S představovaly virový minichromozom v kondenzované nebo relaxované formě, relaxovaná forma obsahovala 20-24 nukleozomů. Všechny izolované komplexy obsahovaly protein VP1 i oba minoritní kapsidové proteiny, ale měnilo se jejich procentuální zastoupení. Se vzrůstajícím sedimentačním koeficientem komplexu vzrostlo také množství proteinu VP1, zatímco obsah minoritních strukturních proteinů zůstal nezměněn. Získané komplexy byly také studovány z hlediska přítomnosti buněčných histonů. Histon H1 byl detekován pouze v 90S komplexu, zbylé čtyři buněčné histony se nacházely ve všech komplexech.

Na základě těchto prací je představa o morfogenezi virionu založena na postupném vzniku virionu. Virový minichromozom je uspořádán do nucleocore, které je pak obaleno kapsomerami. V závěru procesu morfogeneze se předpokládá nějaká konformační změna, která učiní z nezralého virionu virion stabilní. Stále nezodpovězená zůstává, mimo jiné, otázka, jak je při morfogenezi virionu zajištěno zabalení specifické polyomavirové DNA a zdali a jaké buněčné proteiny se morfogenezi virionu účastní.

## **2.9.1. Buněčné proteiny interagující s hlavním kapsidovým proteinem VP1 během pozdní fáze infekce**

### **2.9.1.1. Buněčné chaperony – Hsp 70 rodina**

Buněčné chaperony z rodiny Hsp 70 se vážou na nově vznikající proteiny a chrání je, dokud není dokončena syntéza a dokud nezaujmou správnou konformaci (shrnuto v Hartl a Hayer-Hartl, 2002). Protein Hsc 70 asociuje s proteinem VP1 okamžitě po jeho syntéze a je

společně v komplexu s proteinem VP1 transportován do jádra. Pro asociaci proteinu VP1 a Hsc 70 nejsou zapotřebí jiné virové proteiny, k interakci obou proteinů dochází i při expresi rekombinantních proteinů v hmyzích buňkách, popřípadě v bakteriích (zde protein VP1 asociuje s proteinem DnaK, což je homolog proteinu Hsc 70). K interakci obou proteinů dochází i *in vitro*. (Cripe et al., 1995). Předpokládá se, že protein Hsc 70 kontroluje správný „folding“ proteinu VP1 a že to může být regulační faktor, který kontroluje spolehlivost a lokalizaci skládání virionu *in vivo*.

Pro správné prostorové uspořádání proteinu VP1 mohou být důležité i časné proteiny polyomavirů – LT a ST antigen. Na N-konci všech známých polyomavirových T antigenů se nachází J doména, která je homologní s J doménou chaperonu DnaJ *Escherichia coli*. J doména obsahuje tripeptid HDP, díky němuž interaguje s proteinem Hsc 70. (Pipas, 1992, Saway a Butel, 1989, Saway et al., 1994). Funkcí chaperonů obsahujících J doménu je interakce se členy rodiny DnaK chaperonů a modulace jejich aktivity. Savičím homologem bakteriálních DnaK proteinu je právě protein Hsc 70. DnaJ chaperony stimulují ATPázovou aktivitu svých DnaK partnerů a tím i uvolnění neuspořádaných proteinů z tohoto chaperonu. Polyomaviry si tak kódují vlastní chaperony, T antigeny, které se podílejí na deregulaci buňky během virové infekce. Fungují jako jakési lešení, které zprostředkuje interakci mezi proteinem Hsc 70 a komplexem buněčných proteinů. Energie, vzniklá hydrolyzou ATP na proteinu Hsc70, je využita ke konformační změně proteinu nebo proteinů, které jsou součástí tohoto komplexu.

Role buněčných chaperonů v morfogenezi virionu byla zkoumána v *in vitro* podmínkách. Chromy et al. (2003) použili chaperonový systém bakterie *E. coli*. Za přítomnosti ATP a bez přítomnosti vápenatých kationtů nechali reagovat pentamery tvořené proteinem VP1 a minoritním strukturním proteinem VP3 (VP1<sub>5</sub>-VP3) s bakteriálními homology eukaryotických chaperonů DnaK (Hsc 70), DnaJ (Hsc 40) a GRpE (nukleotide exchange factor), což mělo za následek vznik kapsid uniformní velikosti a morfologicky velice podobných kapsidám infekčních virionů. Tyto autory dále zajímalo, jestli může být stejného efektu dosaženo i při použití eukaryotních chaperonů. Pokud nechali *in vitro* za stejných podmínek reagovat komplex proteinů VP1<sub>5</sub>-VP3 odvozených od viru SV40 s proteinem Hsc 70 a LT antigenem viru SV40, došlo také k tvorbě kapsid uniformní velikosti.

Pokud se chaperony podílejí na skládání kapsidy, mohou se také podílet na ději opačném, tedy rozvolnění kapsidy? Protein VP1 interaguje s proteinem Hsc 70 v časných fázích infekce (3 hpi), tedy ještě v podobě virionu a dokonce v *in vitro* reakci, prokaryotické i eukaryotické chaperony Hsp 70 efektivně rozvolňovaly za přítomnosti ATP polyomavirové částice (Chromy et al., 2006).

Výše zmíněné pokusy ukazují, že se buněčné chaperony podílejí jak na správném „foldingu“ proteinu VP1 a jeho pentameru, tak i na formování virové kapsidy. Těchto dějů se také účastní virové regulační proteiny – T antigeny. Zároveň se buněčné chaperony mohou podílet i na rozvolňování kapsidy.

### 2.9.1.2. Buněčný transkripční faktor YY1

Protein YY1 je multifunkční buněčný transkripční regulační faktor, který se vyskytuje u všech obratlovců ve všech tkáních. Účastní se regulace mnoha buněčných i virových genů. Tento protein může v závislosti na kontextu působit jako aktivátor nebo represor transkripce, povaha reakce závisí na proteinech, s kterými interaguje. Bylo identifikováno mnoho proteinů, které s proteinem YY1 interagují a tím regulují jeho aktivitu.

Mezi tyto proteiny patří transkripční faktor Sp1, transferasa acetylující lysiny v histonech - p300 a transferazy deacetylující lysiny v histonech - HDAC1, HDAC2 a HDAC3. Na C-konci proteinu YY1 se nachází DNA-vazebná doména. Ta se skládá ze čtyř zinkových prstů typu Cys2-His2 a rozeznává konsensus sekvenci CCATNTT. N-koncová oblast (aminokyseliny 1-69) spolu s krátkým úsekem na C-konci proteinu tvoří aktivační domény proteinu YY1. Hlavní represorové domény byly nalezeny v C-koncové oblasti proteinu a v oblasti bohaté na glycin (aminokyseliny 170 – 200). (Přehledně shrnuto v Shi et al., 1997; Thomas a Seto 1999). Protein YY1 je také součástí jaderné matrix (Guo *et al.*, 1995), může zprostředkovávat asociaci specifických DNA sekvencí buněčných a virových genů k jaderné matrix.

V genomu myšího polyomaviru byla nalezena čtyři vazebná místa pro protein YY1, z toho tři vysokoafinitní. Dvě z nich se nacházejí ve virové regulační oblasti, v oblasti pozdního promotoru, za místem iniciace transkripce (Martelli et al., 1996), třetí v kódující sekvenci hlavního kapsidového proteinu VP1 (Gendron et al., 1996).

Protein YY1 také prostřednictvím své aktivační domény přímo interaguje s DE smyčkou proteinu VP1 (Palková et al., 2000b). Díky svým pluripotentním vlastnostem by mohl protein YY1 vykonávat několik funkcí v procesu morfogeneze virionu - i) rozpoznávání DNA, která má být zabalena do virionu, ii) vazba nukleoproteinových komplexů k jaderné matrix, iii) účast při kondenzaci virového minichromozomu.

Stále nezodpovězená zůstává otázka, jak je při morfogenezi virionu zajištěno zabalení specifické polyomavirové DNA. U viru SV40 byla v regulační oblasti virového genomu nalezena tzv. *ses* sekvence (SV40 encapsidation sequence), která slouží jako signál pro zabalení virové DNA do virionu (Oppenheim et al., 1992). Tato sekvence je specificky rozpoznávána buněčným transkripčním faktorem Sp1. Autoři předpokládají, že tento buněčný protein

zprostředkovává vazbu pentameru proteinu VP1 s navázaným minoritním kapsidovým proteinem k *ses* sekvenci, kde se tak vytvoří enkapsidační centrum pro formování virionu. Tento mechanismus zajistí, že je morfogeneze virionu zahájena pouze z jednoho určitého místa virového minichromozomu. (Gordon-Shaag et al., 1998, 2002). Specifita vazby k DNA komplexu pentameru proteinu VP1 s minoritním strukturním proteinem VP3 a proteinem Sp1 byla zkoumána *in vitro*. Tyto proteinové komplexy se vážaly náhodně, po celé délce virového genomu (Roitman-Shemer et al., 2007). Nicméně nelze vyloučit, že v *in vivo* podmínkách tento komplex interaguje s dalšími buněčnými proteiny, které mu udílí vazebnou specifitu. U myšího polyomaviru by podobnou funkci mohl vykonávat právě protein YY1, ale sekvence analogická k *ses* sekvenci viru SV40 ve virovém genomu MpyV doposud identifikována nebyla.

Význam vazby genomu k jaderné matrix byl ukázán při studiu virů mutovaných v DE smyčce proteinu VP1. U mutovaných virů byla oslabena vazba k jaderné matrix, což mělo za následek snížení replikace a enkapsidace virové DNA (Garcia et al., 2000). Dále by protein YY1 mohl zprostředkovávat interakci mezi virovou DNA a proteiny z Polycomb rodiny, které se podílejí na kondenzaci DNA do podoby heterochromatinu (Atchison et al., 2003).

### 2.9.1.3. Buněčné karyoferiny

V cytoplazmě vážou karyoferiny proteiny, které obsahují jaderný lokalizační signál a zprostředkovávají jejich transport do jádra. Karyoferin  $\alpha$  váže jaderný lokalizační signál proteinu svou C-koncovou doménou a svou N-koncovou doménou váže karyoferin  $\beta$  (Cook et al., 2007). Karyoferin  $\beta$  navádí celý komplex k jadernému póru (Imamoto et al., 1995). Po translokaci do jádra se z komplexu uvolní karyoferin  $\beta$ , karyoferin  $\alpha$  zůstává navázaný na proteinu a dochází k akumulaci tohoto komplexu v jádře (Gorlich et al., 1995). Uvolnění karyoferinu  $\alpha$  z komplexu je zprostředkováno dalšími proteiny (Kutay et al., 1997) nebo se uvolní samovolně (Hodel et al., 2001).

VP1 pentamery vážou *in vitro* heterodimer karyoferinů  $\alpha 2\beta 1$ . VP1 pentamery jsou schopny současně vázat karyoferin  $\alpha 2$  a DNA, přičemž DNA kompetuje s karyoferiny o VP1 pentamer. Pentamery proteinu VP1 s navázanými karyoferiny nejsou schopny *in vitro* tvořit částice, takže se předpokládá, že karyoferiny mohou sloužit jako chaperony a *in vivo* regulovat skládání virionu. (Bird et al., 2008).

#### **2.9.1.4. Poly(ADP-ribose) polymeráza 1 (PARP-1)**

Proteiny z rodiny poly(ADP-ribose) polymeráz modifikují cílové proteiny tím, že přidávají polymery ADP-ribosy různé délky. Modifikují chromatinové proteiny a také sami sebe (D'Amours et al., 1999). Podílejí se na remodelování chromatinu modifikací histonů a transkripčních faktorů.

Protein VP1 *in vitro* stimuluje enzymatickou aktivitu PARP-1, nekovalentně váže poly(ADP-ribosu) jak volnou tak navázanou na PARP-1. Chromatinová imunoprecipitace ukázala, že polyADP-ribosylace PARP-1 napomáhá uvolnění proteinu VP1 z DNA infikujícího virionu. Protein VP1 neinteraguje s PARP-1 přímo, ale přes navázanou polyADPribosu. PARP-1 se účastní zahájení časné virové transkripce tím, že podporuje kompletní uvolnění VP1 z virové DNA a tím tak zahájení transkripce. (Carbone et al., 2006). Otázkou zůstává, jestli by se protein PARP-1 mohl také účastnit děje zcela opačného, tedy zabalení DNA do virionu.

#### **2.10. Vstup polyomavirů do buňky**

Viry získaly v průběhu evoluce schopnost využít buněčných struktur a jejich přirozených mechanismů k překonání bariéry buněčné membrány a k zajištění dopravy své genetické informace na místo, kde se může realizovat. Většina neobalených DNA virů využívá k překonání buněčné membrány receptorem zprostředkovanou endocytózu a místem jejich destinace je buněčné jádro.

U členů čeledi *Polyomaviridae* byla nejvíce studována endocytická dráha viru SV40 a myšího polyomaviru, částečně též lidských polyomavirů BK a JC. Publikované výsledky naznačily, že jednotlivé viry z této čeledi nevyužívají stejné endocytické dráhy. Nicméně jejich společným krokem je průchod viru endoplazmatickým retikulem (ER). Virus SV40 se akumuluje v ER, kam je dopraven váčky obsahujícími protein  $\beta$ -COP (tento protein je součástí COPI váček, které jsou součástí dráhy retrográdního transportu mezi Golgiho aparátem a ER) a infekce viru SV40 je výrazně snížena blokováním dráhy retrográdního transportu brefeldinem A (Norkin et al., 2002). Také u myšího polyomaviru byla pozorována akumulace v ER, ale jeho infektivita nebyla snížena brefeldinem A, byla jím pouze zpomalena. K transportu do endoplazmatického retikula tedy patrně nejsou využívány COP I obalené váčky. (Mannová a Forstová, 2003). Myší polyomavirus ani virus SV40 nebyl v buňkách nalezen v Golgiho aparátu (Mannová a Forstová 2003, Pelkmans et al., 2001, Norkin et al., 2002).

Předpokládá se, že v ER dochází k rozvolnění virionu a následně k transportu do jádra. Manguson et al. (2005) ukázali, že v ER dochází ke změně konformace proteinu VP1, k odštěpení C-konce a tím k destabilizaci virionu. Pro tuto konformační změnu jsou klíčové

proteiny z rodiny disulfid izomeráz. *In vitro*, protein ERp57 izomerizuje disulfidické vazby ve virionu, zatímco proteiny PDI a ERp72 působí jako reduktázy (Walczak a Tsai 2011). Za expozici C-koncového ramena proteinu VP1 z virionu je zodpovědný protein ERp29 (Magnuson et al., 2005). Pro vazbu VP1 na ERp29 je nezbytná C-terminální doména proteinu ERp29, která působí jako substrátová (Rainey-Barger et al., 2009). Důležitost těchto proteinů v infekci MPyV dokládá i fakt, že jejich „downregulace“ (siRNA nebo dominantně negativní mutanty) vede k výraznému snížení infekтивности MPyV (Magnuson et al., Gilbert et al., 2006, Walczak a Tsai 2011). Podobných výsledků bylo dosaženo při studiu viru SV40. Snížená exprese proteinů ERp57 a PDI významně redukovala infektivitu viru, zatímco snížená exprese proteinu ERp29 na infektivitu viru vliv neměla (Schelhaas et al., 2007). Virus SV40 tedy využívá k rozvolnění virionu pravděpodobně podobného mechanismu, i když používá jiné proteiny endoplazmatického retikula.

Otázkou stále zůstává, jak je genetická informace z ER dopravena do jádra. Rozvolnění virionu a expozice C-koncového ramena proteinu VP1 má za následek to, že se virus stane hydrofobním, váže se na lipidovou dvouvrstvu, ale není schopen ji penetrovat (Magnuson et al., 2005). Pro tuto asociaci virionu s membránou jsou nezbytné minoritní strukturní proteiny, VLPs složené pouze z proteinu VP1 afinitu k membránám nevykazují (Magnuson et al., 2005). Toto zjištění, spolu s faktem, že viriony postrádající v kapsidě minoritní strukturní proteiny jsou zcela neinfekční, naznačuje, že minoritní strukturní proteiny se patrně uplatňují v uvolnění rozvolněného virionu (nebo minichromozomu) z ER. Byly navrženy dva modely translokace virové DNA z ER.

První je založen na studiu vlastností minoritních kapsidových proteinů viru SV40 (Daniels et al., 2006). Minoritní proteiny mají vysokou afinitu k membráně endoplazmatického retikula a zároveň mohou *in vitro* tvořit oligomery, které by v membráně mohly být schopny vytvořit pór. Tyto jejich specifické membránové vlastnosti jsou inhibovány vazbou na protein VP1. Navržený model předpokládá, že vlivem retikulárních chaperonů dojde k rozvolnění kapsidy a tím k jejímu následnému rozpadu na jednotlivé pentamery a minichromozom. Pentamery dále disociují, čímž dojde k uvolnění minoritních proteinů, k jejich oligomerizaci, zanoření do membrány ER (tím k vytvoření póru) a transportu genomu ven z ER. Minoritní proteiny mohou vytvořit pór, kterým je genom transportován přímo do jádra (interakcí s vnitřní jadernou membránou), nebo do cytosolu. Z cytosolu může být pak minichromozom transportován skrze jaderný pór do jádra, a to díky interakci jaderného lokalizačního signálu minoritního strukturního proteinu navázaného na virový genom s hostitelskými karyoferiny (Nakanishi et al., 2002). Tuto možnost podporuje i pozorování Kuksina a Norkina (2012), že

k částečnému rozvolnění kapsidy dochází již v ER. Zde byli schopni detekovat minoritní kapsidové proteiny, virovou DNA detekovali až v cytoplazmě, zde tedy předpokládají dodatečné rozvolnění kapsidy.

Druhý model byl navržen na základě studia MPyV. Tento model předpokládá účast proteinů ERAD dráhy (s ER spojená degradační dráha proteinů) na translokaci virového genomu do jádra. Dominantně negativní mutanta proteinu derlin 2 (faktor účastnící se odstraňování špatně složených proteinů z ER) snižovala infektivitu MPyV o 70%, přičemž autoři ukázali, že virus zůstává akumulován v ER (Lilley et al., 2006). Autoři navrhli model, podle kterého chaperony endoplazmatického retikula rozvolní kapsidu. Odhalí tak minoritní strukturní proteiny, které jsou rozpoznány derlinem 2 a spolu s virovou DNA translokovány do cytosolu. Mechanismus transportu MPyV genomu z cytosolu do jádra není zatím objasněn, interakce s karyoferiny nebyla u tohoto viru pozorována. ERAD dráha se účastní i translokace genomu viru SV40, snížení hladiny proteinu derlinu1 a Sell L proteinu (proteiny účastnící se ERAD dráhy) v buňkách redukovala infektivitu zhruba o 50% (Schelhaas et al., 2007).

Dráha, kterou se virus dostane do endoplazmatického retikula, není dodnes detailně objasněna. Viry z čeledi *Polyomaviridae* používají ke vstupu dráhu receptorem zprostředkované endocytózy. Breau et al. (1992) popsali, že virus SV40 se váže na molekuly MHC I na plasmatické membráně buňky, ale také na doposud neidentifikované molekuly (Atwood a Norkin 1989). Protilátky proti molekulám MHC I mírně redukovaly infekci virem SV40 (Atwood a Norkin 1989; Stang et al., 1997), ale molekuly MHC I nebyly endocytovány společně s virem (Anderson et al., 1998). Později byl jako receptor, na který se váže virus SV40, popsán gangliosid GM1 (Tsai et al., 2003). Podle publikovaných studií vstupuje virus SV40 do buněk prostřednictvím kaveol (Anderson et al., 1996; Pelkmans et al., 2001), dále pokračuje do kaveozómu. Kaveozóm je organela s neutrálním pH a bohatá na kaveolin 1, ale nekolokalizující s proteiny typickými pro časně endozomy, lyzozomy, Golgiho aparát a ER. Po několika hodinách viriony SV40 opouštějí kaveozómy v tubulárních veziklech, které již neobsahují kaveolin 1, a pohybují se podél mikrotubulů do perinukleární organely, identifikované jako hladké ER. (Pelkmans et al., 2001). Efektivita infekce viru SV40 není závislá na pH endozomů (Ashok a Atwood 2003).

První studia endocytické dráhy zneužívané myším polyomavirem naznačovaly, že se výrazně liší od dráhy popsané pro virus SV40. Že hlavní strukturní protein myšího polyomaviru je schopen vázat na povrchu buněk kyselinu sialovou (a na rozdíl od viru SV40 aglutinovat morčecí červené krvinky), přičemž tato kyselina je základní komponentou MPyV receptoru bylo známo již od počátku 80tých let (Fried et al., 1981; Cahan et al., 1983). Jako funkční receptory

pro vstup MPyV do buňky byly později překvapivě identifikovány také gangliosidy - GD1a a GT1b (Tsai et al., 2003). Důležité je připojení kyseliny sialové ke galaktóze v poloze kyselina sialová- $\alpha$ 2,3-Gal (Stehle et al., 1994; Tsai et al., 2003). Tento strukturní motiv je přítomen také u glykoproteinů a MPyV je tak schopen vázat se i na tyto molekuly. U krysích buněk C6, postrádajících receptory GD1a a GT1b, nevedla vazba MPyV na glykoproteiny k produktivní infekci (Tsai et al., 2003). Nicméně, glykoproteiny mohou hrát též roli pro infekci MpyV, neboť integrin  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 je pokládán za koreceptor pro vstup MPyV do buňky (Caruso et al., 2003).

Elektronovou mikroskopií bylo pozorováno, že MPyV vstupuje do buňky, podobně jako virus SV40, v hladkých monopinocytických váčcích. Endocytická dráha myšího polyomaviru byla popsána v několika studiích. Podle Gilbertové a Benjamin (2000) není putování MPyV k jádru a jeho efektivita infekce ovlivněná změnou endozomálního pH. Tito autoři studovali vstup MPyV do myších fibroblastů NIH 3T3 a buněk BMK (baby mouse kidney cells) a nepozorovali žádnou kolokalizaci s kaveolinem 1 během vstupu viru do buňky a inhibice tvorby kaveol neměla žádný vliv na infekci (Gilbert a Benjamin 2000; Gilbert et al., 2003). Na základě těchto pozorování vyslovili hypotézu, že MPyV využívá v pohybu buňkou doposud nepopsanou endocytickou dráhu, která není závislá ani na kaveolinu 1 ani na klatrinu. Naše předchozí studie (Richterová et al., 2001) ukázaly, že v myších fibroblastech NIH 3T6 a epiteliálních buňkách NMuMG je MPyV infekce silně inhibována methyl- $\beta$ -cyklodextrinem (vyvazuje cholesterol z membrán), což naznačuje, že váčky internalizující MPyV by mohly být odvozené z membránových raftů. Navíc, některé váčky internalizující MPyV obsahovaly kaveolin 1, což naznačovalo, že MPyV by mohl využívat k dopravě genomu do jádra stejnou dráhu, jakou využívá virus SV40 (Richterová et al., 2001). Další naše předchozí studie ukázala, že MPyV je zhruba 3 hpi pozorován v recyklujících endozomech a ER. Transport MPyV do recyklujícího endozomu poukazuje na to, že by MPyV mohl využívat část dráhy klatrinem zprostředkované endocytózy, avšak kolokalizace virionů MPyV s markerem časných endozomů byla neprůkazná (Mannová a Forstová, 2003). Později, Gilbertová a Benjamin (2004) v práci, ve které obohacovali cytoplazmatickou membránu krysích buněk C6 gangliosidem GD1a, pozorovali, že MPyV vstupuje do těchto buněk ve váčcích obsahujících kaveolin 1 a ztotožnili dráhu MPyV s dráhou popsanou Pelkmansem et al. (2001) pro virus SV40. Na základě všech těchto studií můžeme říci, že MPyV je do buněk internalizován ve váčcích obsahujících i neobsahujících kaveolin 1 a zhruba 3 hodiny po infekci je možno jej detekovat v ER, a recyklujících endozomech. Role recyklujících endozomů v dopravě genomu MPyV do jádra zůstává nejasná.

Jako receptory pro vstup BK viru do buněk byly identifikovány rovněž gangliosidy GT1b a GD1a (Low et al., 2006), takže se dá předpokládat, že BK virus využívá stejnou endocytickou



dráhu jako MPyV. Bylo publikováno, že BK virus ke vstupu do buňky využívá kaveoly, deplece membránového cholesterolu methyl- $\beta$ -cyklodextrinem inhibuje infekci, stejně jako deplece kaveolinu-1 (dominantně negativní mutanta nebo siRNA) (Eash et al., 2004, Moriyama et al., 2007). BK virus při putování k jádru využívá kyselých buněčných kompartmentů, neboť efektivita infekce je závislá na kyselém pH endozomů (Eash et al., 2004, Moriyama et al., 2007). BK virus je také transportován do ER (Moriyama a Sorokin 2008), kam vstupuje podobně jako virus SV40 za pomoci váčků pro retrográdní transport, infektivita viru je snížena brefeldinem A (Moriyama et al., 2007). Předpokládá se, že v ER prochází virion BK viru podobnými konformačními změnami jako MPyV nebo SV40. Předpokládané translokace virového genomu z ER do cytosolu se účastní proteiny ERAD dráhy, protein derlin 1. Dominantně negativní mutanta tohoto proteinu snižuje efektivitu infekce (Jiang et al., 2009).

O dalším členu polyomavirové čeledi, JC viru, bylo překvapivě publikováno, že ke svému vstupu do buňky využívá dráhu klatrinem zprostředkované endocytózy (Pho et al., 2000). Pro funkčnost této dráhy je důležité relativně kyselé pH časných endozomů, které zapříčiní konformační změny virových proteinů a napomůže rozvolnění virionů, případně jejich uvolnění do cytosolu. Produktivní infekce buněk JC virem byla citlivá ke zvyšujícímu se pH endozomů (Ashok a Atwood 2003).

### **3. CÍLE PRÁCE**

V naší laboratoři se zabýváme studiem základních životních dějů myšího polyomaviru. MPyV vstupuje do buněk doposud málo charakterizovanou endocytickou drahou. Pomocí metod konfokální a elektronové mikroskopie byly identifikovány některé buněčné kompartmenty, ve kterých se virus v buňce během pohybu k jádru nachází. Virus byl pozorován v hladkých váčcích, které využívá pro svou internalizaci a v blízkosti jádra v recyklujících endozomech a endoplazmatickém retikulu. Nicméně, to jak je virus transportován od cytoplazmatické membrány do ER, je stále neobjasněné.

**Prvním cílem této práce tedy bylo blíže charakterizovat endocytickou dráhu, kterou MPyV využívá k dopravě genomu do ER a to zejména:**

- **určit, zda jsou funkční kaveoly nezbytné pro infekci myšího polyomaviru**
- **popsat roli časných endozomů v dopravě virového genomu k jádru**

Dalším, doposud málo charakterizovaným dějem je morfogeneze virionu. Zatím bylo identifikováno pouze několik málo proteinů interagujících s proteinem VP1, ale jejich role v morfogenezi virionu zůstává stále neobjasněna.

**Druhým cílem této práce bylo pokusit se charakterizovat komplexy hlavního kapsidového proteinu VP1 s buněčnými proteiny a nalézt nové potencionálně interagující buněčné proteiny.**

- **Optimalizovat metodu modré nativní elektroforézy pro separaci jaderných a celobuněčných lyzátů infikovaných buněk a buněk transientně produkujících protein VP1.**
- **Pomocí této metody charakterizovat interakce vybraných buněčných proteinů s proteinem VP1.**
- **Zavést metodu „Native pure affinity system“ pro vyhledání interakcí proteinu VP1 s buněčnými proteiny.**

## **4. MATERIÁL A METODY**

#### 4.1. Použité buněčné linie a viry

- Buňky linie 3T6 – myší embryonální fibroblasty (ATCC; CCL- 96)
- Buňky linie NIH 3T3 – myší embryonální fibroblasty (ATCC; CRL-1658)
- Buněčná linie NMuMG – myší buňky epitelu prsní žlázy (ATCC; CRL-1636)
- Buněčná linie WOP – myší embryonální fibroblasty transformované genomem myšího polyomaviru
- Buněčná linie 293T – linie lidských embryonálních ledvinných buněk imortalizovaných adenovirem a dále obsahující integrovaný genom viru SV40. Díky upřednostňovanému alternativnímu sestřihu produkují tyto buňky velké množství malého T antigenu a poměrně malé množství velkého T antigenu. Tato linie vykazuje vysokou transfekční účinnost. Linie získána od RNDr. Michala Šmahela Ph.D, Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha.
- Buněčná linie NMuMG-Eps15-DIII-GFP – linie buněk NMuMG stabilně produkující dominantně negativní mutantu Eps15-DIII fúзованou s GFP. Tento protein kompetuje s endogenním Eps 15 o vazbu adaptorového proteinu klatrinu AP-2 a tím inhibuje dráhu klatrinem zprostředkované endocytozy. Připravil David Liebl, Ph.D.
- Buněčná linie NMuMG-Eps15-E $\Delta$ 95/295-GFP - linie buněk NMuMG stabilně produkující dominantně negativní mutantu Eps15-E $\Delta$ 95/295 fúзованou s GFP. Tento protein kompetuje s endogenním Eps 15 o vazbu adaptorového proteinu klatrinu AP-2 a tím inhibuje dráhu klatrinem zprostředkované endocytozy. Připravil David Liebl, Ph.D.
- Buněčná linie NMuMG-Eps15-DIII $\Delta$ 2-GFP - linie buněk NMuMG stabilně produkující mutantu Eps15-DIII $\Delta$ 2 fúзованou s GFP. Tento protein nekompetuje s endogenním Eps 15 o vazbu adaptorového proteinu klatrinu AP-2 a tím neinhubuje dráhu klatrinem zprostředkované endocytozy. Připravil David Liebl, Ph.D.
- Buněčná linie NMuMG-GFP - linie buněk NMuMG stabilně produkující protein GFP. Připravil David Liebl, Ph.D.
- Myší polyomavirus kmen BG

#### 4.2. Použité plazmidy

- pCINeo/IRES-GFP/cav-1 DN – bicistronní expresní vektor pro expresi dominantně negativní mutanty kaveolinu 1 (poskytl Jan Eggermont, Katholieke Universiteit, Leuven, Belgium)

- pRab 5 wt-GFP – vektor pro expresi Rab 5 GTPázy fúzované s GFP (poskytl P. D. Stahl, Washington University School of Medicine)
- pRab5 S34N-GFP – vektor pro expresi dominantně negativní mutanty Rab 5 GTPázy (poskytl P. D. Stahl, Washington University School of Medicine)
- pMJG – plazmid obsahující celý MPyV genom (Kraucewitz et al., 1990)
- pwP - vektor pro expresi proteinu VP1. gen pro protein VP1 je vložen pod silný eukaryotický promotor E1a a dále obsahuje sekvence stabilizující RNA. Kodony genu pro protein VP1 byly modifikovány pro expresi proteinu v savčích buňkách. Dále plazmid obsahuje sekvenci proteinu GFP pod kontrolou časného promotoru viru SV40. (Tolstov et al., 2009, Addgene plasmid 22519)
- pENTR/D-TOPO – donorový vektor pro klonování pomocí LR rekombinace. Obsahuje attL1 a attL2 místa, která umožňují klonování genu našeho zájmu do cílového vektoru pomocí rekombinace. Gen našeho zájmu je do plazmidu vložen přímým klonováním za pomoci topoizomerázy. (Invitrogen)
- pcDNA3.2/capTEV-NT/V5-DEST – cílový vektor pro klonování pomocí LR rekombinace. Obsahuje attR1 a attR2 místa, která umožňují vložení genu našeho zájmu z donorového vektoru pomocí rekombinace. Vloženým genu do tohoto plazmidu dochází k N – koncové fúzi tohoto genu s capTEV kotvou (dále označenou jako BE), která umožňuje *in vivo* biotinylnaci a afinitní purifikaci rekombinantního proteinu a asociovaných komplexů. (Invitrogen)
- pcDNA3.2/capTEV-CT/V5-DEST - cílový vektor pro klonování pomocí LR rekombinace. Obsahuje attR1 a attR2 místa, která umožňují vložení genu našeho zájmu z donorového vektoru pomocí rekombinace. Vloženým genu do tohoto plazmidu dochází k C – koncové fúzi tohoto genu s capTEV kotvou (dále označenou jako BE), která umožňuje *in vivo* biotinylnaci a afinitní purifikaci rekombinantního proteinu a asociovaných komplexů. (Invitrogen)
- pGwf – cílový vektor pro klonování pomocí LR rekombinace. Obsahuje attR1 a attR2 místa, která umožňují vložení genu našeho zájmu z donorového vektoru pomocí rekombinace. Vložený gen je pod kontrolou silného eukaryotického promotoru E1a. Dále plazmid obsahuje sekvence stabilizující RNA a sekvenci proteinu GFP pod kontrolou časného promotoru viru SV40. (Buck et al., 2006, Addgene plasmid 22517).

### 4.3. Použité primery

- mutace ATG proteinu GFP v plazmidu pWP:

**pWP GFP $\Delta$ ATG-F:** 5'-GGATCCACCGGTTCGCACGCGTCGCGAGCAAGGGCGAGG-3'

**pWP GFP $\Delta$ ATG-R:** 5'-CCTCGCCCTTGCTCGCGACGCGTTCGCGACCGGTGGATCC-3'

- amplifikace genomu MPyV z pMJG:

**MPyVVG-F:** 5'-GGACGCGTCGACGAGAATTCGGGCCTGAACTTC-3'

**MPyVVG-R:** 5'-GGTCTGGAATTCAAATGCCTGGTCCATTATG-3'

- vložení sekvence proteinu VP1 do plazmidu pENTR/D-TOPO:

**MPyV VP1-F:** 5'-CACCATGGCCCCCAAAGAAAAAG-3'

**MPyV VP1-R:** 5'-TTAATTTCCAGGAAATACAGTC-3'

**MPyV VP1 $\Delta$ STOP-R:** 5'-ATTTCCAGGAAATACAGTCTTTG-3'

- vložení sekvence proteinu VP1-BE-NT a VP1-BE-CT do plazmidu pENTR/D-TOPO:

**MPyV VP1-BE-NT-F:** 5'-CACCATGGGCGCCGGCACCCCGGTGACC-3'

**MPyV VP1-BE-CT-R:** 5'-CTATCATTACTAGGATCCAGAGC-3'

### 4.4. Seznam protilátek

- Krysí monoklonální protilátka proti společné oblasti (common region) časných antigenů myšního polyomaviru, klony C1 a C4 použity v poměru 1:1 (S. Dilworth, Imperial College School of Medicine, London)
- Myší monoklonální protilátka proti proteinu VP1 (Forstová et al., 1993)
- Králičí polyklonální protilátka proti kaveolinu 1 (Santa Cruz Biotechnology)
- Kozí protilátka proti proteinu EEA1 (Santa Cruz Biotechnology)
- Kozí protilátka proti proteinu Sp 100 (Santa Cruz Biotechnology)
- Myší monoklonální protilátka proti proteinu Hsp 70 (rozeznává proteiny Hsc 70 a Hsp 70) (Santa Cruz Biotechnology)
- Králičí polyklonální protilátka proti biotinu (Bethyl Laboratories)
- Kuřecí imunoglobuliny namířené proti králičím imunoglobulinům Alexa Fluor 488 (Molecular Probes)
- Kozí imunoglobuliny namířené proti králičím imunoglobulinům Alexa Fluor 546 (Molecular Probes)

- Oslí imunoglobuliny namířené proti krysím imunoglobulinům Alexa Fluor 488 (Molecular Probes)
- Kozí imunoglobuliny namířené proti myším imunoglobulinům Alexa Fluor 546 (Molecular Probes)
- Oslí imunoglobuliny namířené proti kozím imunoglobulinům Alexa Fluor 546 (Molecular Probes)
- Kozí imunoglobuliny namířené proti myším imunoglobulinům konjugované s peroxidázou (BioRad)
- Kozí imunoglobuliny namířené proti králičím imunoglobulinům konjugované s peroxidázou (BioRad)
- Oslí imunoglobuliny namířené proti kozím imunoglobulinům konjugované s peroxidázou (Santa Cruz Biotechnology)
- Ověč protilátka proti digoxigeninu konjugovaná s alkalickou fosfatázou (Roche)
- Transferin konjugovaný s Alexa Fluor 594 (Molecular Probes)

#### **4.5. Kultivace buněk**

Buňky byly kultivovány v kompletním Dulbecco's modified Eagle's mediu (DMEM; Sigma) (DMEM obohacené o 2 mM glutamax (Invitrogen) a 10% bovinní sérum (Gibco)) při 37°C a 5% CO<sub>2</sub>.

#### **4.6. Izolace viru a infekce buněk**

Myší polyomavirus (kmen BG) byl pomnožen a izolován podle Türlér a Beard (1985). Buňky byly opláchnuty bezsérovým médiem (DMEM s 2 mM glutamaxem) a inkubovány 1 h při 37°C s virovým inokulem. Po uplynutí této doby bylo k buňkám přidáno kompletní médium. Doba infekce byla počítána od okamžiku přidání viru. Multiplicita infekce (MOI) je uvedena u každého experimentu.

#### **4.7. Transfekce buněk**

Transfekce buněk 3T3 a WOP probíhala elektroporací za použití systému firmy Lonza dle protokolu výrobce. Plazmidy použité k elektroporaci byly izolovány pomocí „EndoFree Plasmid Maxi kitu“ (Qiagen). Exponenciálně rostoucí buněčná kultura (1 den po pasáži) byla trypsinizována a homogenní buněčná suspenze ( $4 \times 10^6$  buněk) byla peletována. Buněčný pelet byl resuspendován v 100 µl „Nucleofector solution V“ (Lonza) s 6 µg plazmidové DNA. Směs



byla vystavena elektrickému pulzu (program U-030), inkubována v 0,5 ml RPMI média (37°C) a vyseta na misku s čerstvým kompletním DMEM médiem.

Transfekce buněk 293T probíhala za použití roztoku Turbofect (Fermentas). Plazmidy použité k elektroporaci byly izolovány pomocí „EndoFree Plasmid Maxi“ kitu (Qiagen). Na Petriho misku o průměru 6 cm bylo vyseto  $3 \times 10^6$  buněk. Druhý den byly buňky transfekovány připravenou transfekční směsí. Šest mikrogramů plazmidové DNA bylo naředěno do bezsérového média do výsledného objemu 600  $\mu$ l. K naředěné DNA bylo přidáno 12  $\mu$ l transfekčního roztoku, transfekční směs byla inkubována 20 min při pokojové teplotě a po uplynutí této doby nakapána na buňky.

#### **4.8. Nepřímé imunofluorescenční značení buněk**

Buňky narostlé na krycích sklíčkách byly opláchnuty roztokem PBS pro tkáňové kultury (PBS-TK; Lonza), fixovány 3% roztokem paraformaldehydu v PBS-TK (30 min) a permeabilizovány 0,5% roztokem Tritonu X-100 v PBS-TK (5 min). Buňky byly opláchnuty PBS-TK a inkubovány s roztokem 0,25% želatiny, 0,25% bovinní sérový albumin v PBS-TK (30 min). Imunoznačení primární protilátkou probíhalo 1h a sekundární protilátkou 30 min s extenzivním promytím PBS-TK ( $3 \times 10$  min) po každé inkubaci. Na závěr byly buňky opláchnuty demi H<sub>2</sub>O a montovány do kapky 50% glycerolu s DAPI (4', 6'-diamidino-2-phenylindol; obarvení DNA). Preparáty byly prohlíženy fluorescenčním mikroskopem BX-60 (Olympus) nebo konfokálním mikroskopem Leica TCS SP2 AOBS.

#### **4.9. Testování internalizace transferinu buněčnými liniemi NMuMG- Eps15-DIII-GFP a NMuMG- Eps15-E $\Delta$ 95/295-GFP.**

Buněčné linie NMuMG-Eps15-DIII-GFP, NMuMG-Eps15-E $\Delta$ 95/295-GFP, NMuMG-Eps15-DIII $\Delta$ 2 a NMuMG-GFP byly inkubovány 30 min na ledu s transferinem konjugovaným s Alexa Fluor 594 v koncentraci 10  $\mu$ g/ml. Poté byl roztok transferinu odstraněn a buňky byly inkubovány 20 min při 37°C. Neinternalizovaný transferin byl odmyt PBS-TK, buňky byly fixovány 5 min 2% roztokem paraformaldehydu v PBS-TK, opláchnuty PBS-TK a montovány do kapky 50% glycerolu. Preparáty byly prohlíženy konfokálním mikroskopem Leica TCS SP2 AOBS.

#### **4.10. Význam kaveolinu1 pro vstup myšího polyomaviru do buněk**

Plazmid, obsahující sekvenci pro dominantně negativní mutantu kaveolinu 1 byl vpraven do buněk NMuMG elektroporací. Buňky byly vysety na misku a inkubovány v kompletním

DMEM médiu. Pátý den po transfekci byly pozitivní kolonie (obsahující GFP protein) přeneseny na kultivační misky. Po 5 dnech byl klon s nejsilnějším GFP signálem pasážován na krycí skříčka v 24 jamkové kultivační destičce. Buňky byly infikovány MPyV (MOI = 1 pfu/buňku), 24 hpi. fixovány a LT antigen byl označen příslušnými protilátkami.

#### **4.11. Role časných endozomů v MPyV infekci**

Plazmid, obsahující sekvenci pro dominantně negativní mutantu Rab 5 (Rab 5S34N) nebo gen pro fúzní protein Rab 5 – GFP byl vnesen do buněk WOP elektroporací. Buňky byly vysety na krycí skříčka v 24 jamkové kultivační destičce a 24 h po transfekci byly infikovány MPyV (MOI = 1pfu/buňku). Třicet šest hodin po infekci byly buňky fixovány a VP1 protein byl označen příslušnými protilátkami.

#### **4.12. Role endozomálního pH v MPyV infekci**

Buněčný cyklus buněk linie 3T6 nebo NMuMG byl synchronizován vyhladověním (inkubace 24 h v médiu bez séra). Poté byly buňky ošetřeny bafilomycinem A (BFA; 0,5  $\mu$ M) nebo chloridem amonným (1 mM nebo 5 mM) v celkovém intervalu 4h. Začátek intervalu byl 2 h před přidáním viru, neprodleně po adsorpci viru, 2 h po adsorpci a 4 h po adsorpci viru. Adsorpce viru na buněčný povrch probíhala 30 min na ledu (MOI = 1 pfu/buňku). Neadsorbovaný virus byl odmyt, k buňkám bylo přidáno kompletní DMEM médium (s drogou nebo bez) a buňky byly inkubovány při 37° C. V případě intervalu -2 až +2 hpi probíhala adsorpce viru za přítomnosti BFA-1 nebo NH<sub>4</sub>Cl, ale čas adsorpce nebyl započítán do 4 h intervalu. Po inkubaci s drogou byly buňky opláchnuty, inkubovány 24 h v kompletním DMEM médiu, fixovány a LT antigen byl označen příslušnými protilátkami.

#### **4.13. Plazmid pVP1**

Plazmid pVP1 byl připraven z plazmidu pwP (Tolstov et al., 2009) odstraněním iniciačního kodonu pro protein GFP cílenou mutagenézí za použití „QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene). Iniciační kodon pro GFP v plazmidu pwP byl mutován pomocí primerů pwP GFP $\Delta$ ATG-F a pwP GFP $\Delta$ ATG-R.

#### **4.14. Plazmidy pcDNA3.2/VP1-BE-NT a pcDNA3.2/VP1-BE-CT**

Plazmidy pcDNA3.2/VP1-BE-NT a pcDNA3.2/VP1-BE-CT byly připraveny LR rekombinací donorového vektoru obsahujícího sekvenci proteinu VP1 a cílových plazmidů pro

C-koncovou fúzi (pcDNA3.2/capTEV-CT/V5-DEST) a N-koncovou fúzi (pcDNA3.2/capTEV-NT/V5-DEST) dle instrukcí výrobce (Invitrogen).

Příprava donorového vektoru: Sekvence genu proteinu VP1 byla amplifikována PCR za použití primeru MPyV VP1-F a MPyV VP1-R (nebo MPyV VP1 $\Delta$ STOP) a templátového plazmidu pMJG. Získané fragmenty byly vloženy pomocí topoizomerázové reakce do plazmidu pENTR/D-TOPO (Invitrogen, postupováno dle instrukcí výrobce). Vytvořené plazmidy (pENTR-VP1 a pENTR-VP1 $\Delta$ STOP) byly použity jako donorové vektory v LR rekombinaci s cílovými vektory pcDNA3.2/capTEV-CT/V5-DEST (rekombinace s pENTR-VP1 $\Delta$ STOP) a pcDNA3.2/capTEV-NT/V5-DEST (rekombinace s pENTR-VP1).

#### **4.15. Plazmidy pVP1-BE-NT a pVP1-BE-CT**

Plazmidy pVP1-BE-NT a pVP1-BE-CT byly připraveny LR rekombinací donorového vektoru obsahujícího sekvenci fúzního proteinu VP1-BE-NT a VP1-BE-CT s cílovým plazmidem pGwf $\Delta$ ATG-GFP dle instrukcí výrobce LR rekombinázy (Invitrogen).

Příprava donorového vektoru: sekvence genů fúzních proteinů VP1-BE-NT a VP1-BE-CT byla amplifikována PCR za použití primeru MPyV VP1-BE-NT-F a MPyV VP1-R (VP1-BE-NT), nebo MPyV VP1-F a MPyV VP1-BE-CT-R (VP1-BE-CT), a templátového plazmidu pcDNA3.2/VP1-BE-NT, nebo pcDNA3.2/VP1-BE-CT. Získané fragmenty byly vloženy pomocí topoizomerázové reakce do plazmidu pENTR/D-TOPO (Invitrogen, postupováno dle instrukcí výrobce). Vytvořené plazmidy (pENTR-VP1-BE-NT a pENTR-VP1-BE-CT) byly použity jako donorové vektory v LR rekombinaci s cílovým vektorem pGwf $\Delta$ ATG-GFP.

Příprava cílového vektoru: plazmid pGwf $\Delta$ ATG-GFP byl připraven z plazmidu pGwf (Buck et al., 2006) odstraněním iniciačního kodonu pro protein GFP cílenou mutagenezí za použití „QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene). Iniciační kodon pro GFP v plazmidu pwP byl mutován pomocí primerů pwP GFP $\Delta$ ATG-F a pwP GFP $\Delta$ ATG-R.

#### **4.16. Izolace jader z buněk.**

(podle Nováková et al., 2006)

Buňky linie 3T6 nebo 3T3 byly seškrabány z povrchu misky silikonovým škrabátkem a třikrát promyty ledovým PBS-TK. Buňky byly resuspendovány ve 20 objemech lyzačního pufru (100 mM sacharóza, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,01 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,4% NP 40) a lyzovány 5 min na ledu. Izolovaná jádra byla peletována centrifugací (1000 g, 10 min, 4°C) a promyta 10 ml pufru 1 (100 mM sacharóza, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM KCl,

1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,01 mM CaCl<sub>2</sub>) a poté 10 ml pufru 2 (210 mM sacharóza, 45 mM Bis-Tris-HCl, pH 7,0, 0,01 mM CaCl<sub>2</sub>). Izolovaná jádra byla peletována centrifugací (400 g, 5 min, 4°C) a ihned použita k následujícím experimentům.

#### **4.17. Závislost rozpustnosti proteinu VP1 na koncentraci kyseliny 6-aminokapronové (AcA).**

Buňky linie 3T6 byly infikovány MPyV (MOI=10pfu/b) a 40 hpi byla izolována jádra. Jádra izolovaná z  $2 \times 10^7$  infikovaných buněk byla rozdělena na čtyři stejné díly a lyzována 20 min na ledu v jednom objemu pufru 3 (50 mM Bis-Tris-HCl, pH 7,0, 0,01 mM CaCl<sub>2</sub>, koktejl inhibitorů proteáz (Roche)) se vzrůstající koncentrací kyseliny 6-aminokapronové (0,5, 1, 1,5 a 2M). Jaderný lyzát byl centrifugován (20 000 g, 30 min, 4°C), supernatant uschován (rozpuštěná frakce) a k peletu bylo přidáno PBS-TK (stejně množství jako supernatantu, nerozpuštěná frakce). Proteiny přítomné v rozpustné a nerozpuštěné frakci byly separovány SDS elektroforézou, přeneseny na nitrocelulóзовou membránu metodou Western blot a protein VP1 byl v jednotlivých frakcích detekován specifickou protilátkou.

#### **4.18. Závislost rozpustnosti proteinu VP1 na přítomnosti detergentů.**

Buňky linie 3T6 byly infikovány MPyV (MOI=10pfu/b) a 40 hpi byla izolována jádra. Jádra izolovaná z  $1 \times 10^7$  infikovaných buněk byla rozdělena na dva stejné díly. První aliquot byl inkubován 20 min na ledu v jednom objemu pufru 3 s 1M AcA a druhý 20 min na ledu v jednom objemu modifikovaného RIPA pufru (50 mM Bis-Tris-HCl, pH 7,0; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,05% NP 40; 1% deoxycholát sodný; 1% Triton X-100; 0,01 mM CaCl<sub>2</sub>; 1 M AcA, směs inhibitorů proteáz (Roche)). Jaderné lyzáty byly centrifugovány (20 000 g, 30 min, 4°C), supernatanty uschovány (rozpuštěná frakce) a k peletům bylo přidáno PBS-TK (stejně množství jako supernatantu, nerozpuštěná frakce). Proteiny přítomné v rozpustných a nerozpuštěných frakcích byly separovány SDS elektroforézou, přeneseny na nitrocelulóзовou membránu metodou Western blot a protein VP1 byl v jednotlivých frakcích detekován specifickou protilátkou.

#### **4.19. SDS proteinová elektroforéza (SDS-PAGE)**

(Sambrook et al., 1989)

Vzorky byly smíchány v poměru 4:1 s 5×koncentrovaným Laemliho puforem (výsledná koncentrace ve vzorku: 1% SDS, 10 mM Tris-HCl, pH = 6,8, 5% β-merkaptoethanol, 10%

glycerol, 0,001% bromfenolová modř) a 5 min inkubovány při 100°C. Vzorčky byly nanášeny na 10% akrylamidový gel a separovány v elektroforetickém pufru (25 mM Tris, 192 mM glycin, 0,1% SDS, pH = 8,3) 30 min při 8V/cm a poté při 14V/cm. Molekulová váha proteinů byla stanovena podle standardů „Prestained molecular weight marker“ (SDS7B2, Sigma)

#### **4.20. Barvení gelů po SDS-PAGE**

Po rozdělení proteinů byl gel 30 min fixován ve fixačním roztoku (40% metanol, 10% kyselina octová) a barven v barvicím roztoku (0,5% Coomassie brilliant blue G250, 3,5% HClO<sub>4</sub>) přes noc. Gel byl odbarvován několik hodin v demi vodě.

#### **4.21. Přenos proteinů na nitrocelulóзовou membránu – Western Blot**

(Sambrook et al., 1989)

Elektroforeticky separované proteiny byly přeneseny z gelu na nitrocelulóзовou membránu (Serva) v přístroji pro „wet blot“ (Hoefler). Přenos probíhal 1,5 h při stabilizovaném proudu 2,5mA/cm<sup>2</sup> v chlazeném pufru (25mM Tris, 195 mM glycin, 20% metanol).

#### **4.22. Imunodetekce proteinů na membráně**

Membrána s přenesenými proteiny byla opláchnuta roztokem PBS (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) a vysycena 30 min roztokem 5% odtučněného mléka v PBS. Imunozačení s primární protilátkou probíhalo 1h a sekundární protilátkou 30 min s intenzivním promytím PBS (3× 10 min) po každé inkubaci. Membrány byly vyvolány pomocí „SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate“ kitu (Thermo Scientific) a exponovány na radiografický film (Foma).

#### **4.23. Příprava jaderného lyzátu pro separaci pomocí modré nativní elektroforézy**

Izolovaná jádra (viz výše) byla inkubována 20 min na ledu v jednom objemu modifikovaného RIPA pufru (50 mM Bis-Tris-HCl, pH 7,0; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,05% NP 40; 1% deoxycholát sodný; 1% Triton X-100; 0,01 mM CaCl<sub>2</sub>; 1 M AcA, směs inhibitorů proteáz (Roche)). Jaderný lyzát byl přečištěn centrifugací (20 000 g, 30 min, 4°C) a množství proteinů v lyzátu bylo měřeno dle Bradfordové (1976).

#### **4.24. Příprava celo-buněčného lyzátu pro separaci pomocí modré nativní elektroforézy**

Buňky linie 3T6 nebo 3T3 byly seškrabány z povrchu misky silikonovým škrabátkem a třikrát promyty ledovým PBS-TK. Buňky byly resuspendovány v jednom objemu

modifikovaného RIPA pufru (50 mM Bis-Tris-HCl, pH 7,0; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,05% NP 40; 1% deoxycholát sodný; 1% Triton X-100; 0,01 mM CaCl<sub>2</sub>; 1 M AcA, směs inhibitorů proteáz (Roche)) a inkubovány na ledu 20 min. Buněčný lyzát byl přečištěn centrifugací (20 000 g, 30 min, 4°C) a množství proteinů v lyzátu bylo měřeno dle Bradfordové (1976).

#### **4.25. Modrá nativní elektroforéza (BN-PAGE)**

##### **4.25.1. Separace proteinů pomocí 4-16% gelu**

BN-PAGE byla provedena podle Nováková et al., (2006).

Příprava vzorku: K jadernému lyzátu byla přidána Coomassie brilliant blue G-250 (CBB G-250) v 0,5 M AcA do finální koncentrace 0,5% , vzorky byly inkubovány 5 min na ledu a poté naneseny na gel.

Separace proteinů: Proteiny byly separovány na 4-16 % gradientovém akrylamidovém gelu (100× 105× 1 mm; 125mM AcA, 50 mM Bis-Tris-HCl, pH = 7,0) při napětí 50V, 30 min a poté při konstantním proudu 5 mA až do konce separace. Elektroforéza probíhala v anodovém pufru (50 mM Bis-Tris-HCl, pH = 7,0) a modrém katodovém pufru (50mM Tricin, 15mM Bis-Tris-HCl, pH = 7,0, 0,02% CBB G-250) při 4°C. Poté co čelo tvořené CBB G-250 dosáhlo 2/3 délky gelu, byla elektroforéza přerušena a modrý katodový pufr byl vyměněn za katodový pufr (50mM Tricin, 15mM Bis-Tris-HCl, pH = 7,0). Elektroforéza byla ukončena, když čelo tvořené CBB G-250 opustilo separační gel. Separované proteiny byly dále přeneseny na nitrocelulózovou membránu (podle kap. 4.21.) a detekovány specifickými protilátkami (podle kap. 4.22.) nebo vizualizovány barvením. Molekulová váha proteinů byla stanovena podle standardů „HMW calibration kit for native electrophoresis“ (GE Healthcare).

Barvení gelu po BN-PAGE: Po rozdělení proteinů byl gel 30 min fixován ve fixačním roztoku (40% metanol, 10% kyselina octová) a barven v Bio-Safe Coomassie Blue (Bio-Rad) přes noc. Gel byl odbarvován několik hodin v demi vodě.

##### **4.25.2. Separace proteinů pomocí 3-12% gelu**

Pro separaci proteinů byly použity gely a roztoky od firmy Invitrogen dle instrukcí výrobce.

Příprava vzorku: K jadernému nebo celo-buněčnému lyzátu byl přidán „NativePage Sample Buffer“ (50 mM Bis-Tris-HCl, 50 mM NaCl, 10% glycerol, 0,001% Ponceau S, pH=7,2) v poměru 4:1 (z výsledného objemu vzorku) a „NativePAGE 5% G-250 Sample Additive“ (5%

CBB G-250 v H<sub>2</sub>O) v poměru 9:1 (z výsledného objemu vzorku). Vzorky byly inkubovány 5 min na ledu a poté nanášeny na gel.

**Separace proteinů:** Proteiny byly separovány za použití „NativePAGE™ Novex® Bis-Tris 3-12% Gels (1.0 mm)“ při konstantním napětí 150V, 60 min, poté při konstantním napětí 250 V až do konce separace. Elektroforéza probíhala v anodovém pufru (50 mM Bis-Tris, 50 mM Tricin, pH = 6,8) a tmavě modrém katodovém pufru (50 mM Bis-Tris, 50 mM Tricin, 0,02% CBB G-250, pH = 6,8) při 4°C. Poté co čelo tvořené CBB G-250 dosáhlo 1/3 délky gelu, byla elektroforéza přerušena a tmavě modrý katodový pufr byl vyměněn za světle modrý katodový pufr (50 mM Bis-Tris, 50 mM Tricin, 0,002% CBB G-250, pH = 6,8). Elektroforéza byla ukončena, když čelo tvořené CBB G-250 opustilo separační gel. Separované proteiny byly dále detekovány specifickými protilátkami nebo vizualizovány barvením. Molekulová váha proteinů byla stanovena podle standardů „NativeMark™ Unstained Protein Standard“ (Invitrogen).

**Barvení gelu po BN-PAGE:** Po rozdělení proteinů byl gel 2× promyt v demi vodě a barven v „SimplyBlue™ SafeStain“ (Invitrogen) dle instrukcí výrobce.

**Přenos proteinů na membránu:** Proteiny byly přeneseny na PVDF membránu Hybond-P (GE Healthcare). Přenos probíhal 1,5 h při stabilizovaném proudu 2,5mA/cm<sup>2</sup> v chlazeném pufru (25 mM bicin, 25 mM Bis-Tris, 1 mM EDTA, pH = 7,2). Po ukončení přenosu byla membrána opláchnuta demi vodou, 15 min inkubována v 8% kyselině octové, opláchnuta demi vodou a usušena na vzduchu. Následně byly zbytky navázané CBB G-250 odmyty metanolem (30 s), membrána byla inkubována 5 min v demi vodě, 10 min v PBS a poté byly proteiny detekovány dle kap. 4.22.

## **4.26. Analýza vlivu přítomnosti virové DNA v jaderných lyzátech na efektivitu separace proteinových komplexů BN-PAGE**

### **4.26.1. Analýza proteinových komplexů**

Izolovaná jádra z infikovaných (MOI=10 pfu/b) a neinfikovaných buněk byly připraveny dle kap. 4.16. Jádra byla rozdělena na dva aliquoty. K jednomu byl přidán modifikovaný RIPA pufr s přísadkou MgCl<sub>2</sub> do výsledné koncentrace 5 mM a DNázy I v koncentraci 200U/ml, druhý byl lyzován v modifikovaném RIPA pufru. Jádra byly lyzována 20 min na ledu a centrifugována 20 min, 20000g, 4°C. Jaderný lyzát obsahující DNázu I byl inkubován 15 min při 37°C, lyzát bez DNázy I byl ponechán na ledu. Potom byly vzorky separovány na 4-16% akrylamidovém gelu, protein VP1 byl detekován imunologicky a proteinové komplexy byly vizualizovány barvením (kap. 4.25.1.)

## **4.26.2. Analýza DNA obsažené v jaderných lyzátech**

### **4.26.2.1. Agarózová elektroforéza**

Jaderné lyzáty z infikovaných nebo neinfikovaných buněk, připraveny podle kap. 4.26.1. (15 µg nebo 30 µg celkového množství proteinu) byly rozděleny na 1% agarózové elektroforéze (Sambrook et al., 1989). DNA byla vizualizovaná barvou Gel Red (Biotium).

### **4.26.2.2. Southern blot**

Agarózový gel se separovanou DNA byl 15 min inkubován v depurinačním roztoku (250 mM HCl), opláchnut v demi vodě, inkubován 2×15 min v denaturačním roztoku (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl), poté znovu opláchnut v demi vodě a inkubován 2×15 min v neutralizačním roztoku (0,5 M Tris-HCl, pH=7,5, 1,5 M NaCl). Gel byl ekvilibrován 10 min v roztoku 20×SSC (3 M NaCl, 0,3 M citrát sodný, pH=7,0) a DNA byla z agarózového gelu přenesena na nylonovou membránu (Roche) kapilárním přenosem přes noc v 20×SSC pufru. DNA na membráně byla fixována v přístroji UV Stratalinker 1800, program auto cross-link (Stratagene), membrána byla opláchnuta demi vodou, usušena při laboratorní teplotě a dále použita pro hybridizaci se značenou sondou.

### **4.26.2.3. Hybridizace**

Příprava sondy, hybridizace a detekce probíhaly za použití systému pro neradioaktivní značení a detekci DNA – „DIG High Prime DNA Labelling and Detection Starter Kit II“ (Roche) dle instrukcí výrobce.

Příprava sondy: Sonda byla připravena syntézou DNA Klenowovým fragmentem z náhodných primerů za inkorporace digoxigenin-11-dUTP. Jako templátová DNA byl použit linearizovaný MPyV genom, připravený pomocí PCR (templát pro PCR byl plazmid pMJG obsahující celý MPyV genom). Reakce probíhala 20 h, 37°C. Množství značené DNA bylo určeno porovnáním intenzit signálu značené DNA a standardů (poskytnuto výrobcem). Před použitím byla sonda naředěna na koncentraci 25 ng/ml a denaturována 5 min při 100°C.

Hybridizace a detekce signálu: Prehybridizace probíhala 30 min při 42°C v roztoku DIG Easy Hyb (1 ml/10 cm<sup>2</sup>) a hybridizace probíhala přes noc při 42°C v roztoku DIG Easy Hyb (0,35 ml/10cm<sup>2</sup>) obsahujícím značenou sondou (25 ng/1 ml DIG Easy Hyb). Po ukončení hybridizace byla membrána promyta 2×5 min v roztoku 2×SSC, 0,1% SDS při pokojové teplotě a 2×15 min



v roztoku 0,5% SSC, 0,1% SDS při teplotě 65°C. Poté byla membrána opláchnuta WB pufrem (0,1M kyselina maleinová, 0,15 M NaCl, pH=7,5, 0,3% Tween 20) a inkubována 30 min v Blocking Solution a 30 min s protilátkou proti digoxigeninu. Membrána byla promyta 2×15 min v WB pufru, ekvilibrována 5 min v roztoku 0,1 M Tris-HCl, 0,1M NaCl, pH=9,5, vyvolána pomocí „CSPD ready-to-use“ (Roche) a exponována na radiografický film (Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film, Roche).

#### **4.27. Test rozpustnosti proteinů VP1-BE-NT a VP1-BE-CT**

Buňky linie 293T ( $3 \times 10^6$ ) byly transfekovány plazmidy pVP1-BE-NT nebo pVP1-BE-CT a 30 h po transfekci byla testována rozpustnost proteinů. Buňky byly dvakrát opláchnuty roztokem PBS-TK a resuspendovány ve 450  $\mu$ l (množství na 1 misku) lyzačního roztoku (100 mM Tris-HCl, pH=8,0, 100 mM KCl, 200  $\mu$ M EDTA, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, směs inhibitorů proteáz (Roche), 700 ng/ml pepstatin (Sigma)) nebo ve 450  $\mu$ l lyzačního roztoku s Tritonem (100 mM Tris-HCl, pH=8,0, 100 mM KCl, 200  $\mu$ M EDTA, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton X 100, směs inhibitorů proteáz (Roche), 700 ng/ml pepstatin (Sigma)). Buněčná suspenze byla 3× zmražena a rozmražena a centrifugována (20000×g, 20 min, 4°C). Supernatanty byly uschovány (rozpuštěná frakce) a k peletům bylo přidáno 450  $\mu$ l PBS-TK (nerozpuštěná frakce). Proteiny přítomné v rozpustných a nerozpustných frakcích byly separovány SDS elektroforézou, přeneseny na nitrocelulózovou membránu metodou Western blot a proteiny VP1-BE-NT a VP1-NT-CT byly v jednotlivých frakcích detekovány specifickou protilátkou proti proteinu VP1 nebo biotinu.

#### **4.28. Test tvorby komplexů proteinů VP1-BE-NT a VP1-BE-CT**

Buňky linie 293T ( $3 \times 10^6$ ) byly transfekovány plazmidy pVP1-BE-NT nebo pVP1-BE-CT a 30 h po transfekci byl připraven lyzát. Buňky byly dvakrát opláchnuty roztokem PBS-TK a resuspendovány ve 450  $\mu$ l lyzačního pufru s Tritonem. Buněčná suspenze byla 3× zmražena a rozmražena, centrifugována (20000×g, 20 min, 4°C), supernatant byl inkubován 30 min za pokojové teploty s benzoázou (2U/ $\mu$ l) (Sigma) a znovu centrifugován (20000×g, 20 min, 4°C). Supernatant (15  $\mu$ l) byl separován BN-PAGE (3-12% gel), separované komplexy byly přeneseny na membránu a proteiny VP1-BE-NT a VP1-NT-CT byly detekovány specifickou protilátkou proti biotinu.

#### **4.29. Izolace komplexů proteinu VP1-BE-NT nebo VP1-BE-CT s buněčnými proteiny z buněk 293T**

Buňky linie 293T ( $2 \times 10^7$ ) byly transfekovány plazmidy pVP1-BE-NT nebo pVP1-BE-CT a 30 h po transfekci byl připraven lyzát. Buňky byly dvakrát opláchnuty roztokem PBS-TK a resuspendovány ve 450  $\mu$ l (množství na 1 misku) lyzačního pufru s Tritonem. Buněčná suspenze byla 3 $\times$  zmrazena a rozmrazena, centrifugována ( $20000 \times g$ , 20 min, 4°C) a supernatant byl použit k afinitní purifikaci.

Buněčný lyzát (20 – 30 mg v 8 ml) byl nanesen na kolonu obsahující 0,5 ml Streptavidin agarózy (Invitrogen) a směs byla inkubována za mírného kývání 3 h při 4°C. Nenavázaný materiál byl odmyt 8 ml vazebného pufru (100 mM Tris-HCl, pH=8,0, 100 mM KCl, 200  $\mu$ M EDTA, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% NP 40, směs inhibitorů proteáz (Roche), 700 ng/ml pepstatin (Sigma)) a 3 $\times$  8 ml pufru pro štěpení TEV proteázou (10 mM Tris-HCl, pH=8,0, 150 mM NaCl, 500  $\mu$ M EDTA, 0,1% NP 40). Streptavidin agaróza s navázanými proteiny byla resuspendována v 1 ml pufru pro štěpení TEV proteázou, k suspenzi byl přidán DTT (výsledná koncentrace 1 mM) a 400 U TEV proteázy (Invitrogen). Štěpení proteinů probíhalo 22 h při 4°C za mírného kývání. Odštěpené proteinové komplexy byly z kolony vymyty 3 $\times$  1 ml elučního pufru (10 mM Tris-HCl, pH=8,0, 150 mM NaCl, 500  $\mu$ M EDTA), získané frakce byly spojeny a zahuštěny ultrafiltrací ( $1600 \times g$ , 25 min, 4°C) na 100  $\mu$ l a uskladněny při -80°C.

#### **4.30. Hmotnostní spektrometrie**

Identifikace proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie byla provedena RNDr. Petrem Manem, Ph.D z Laboratoře Charakterizace molekulové struktury, Mikrobiologický ústav, Akademie věd České republiky.

## **5. VÝSLEDKY**

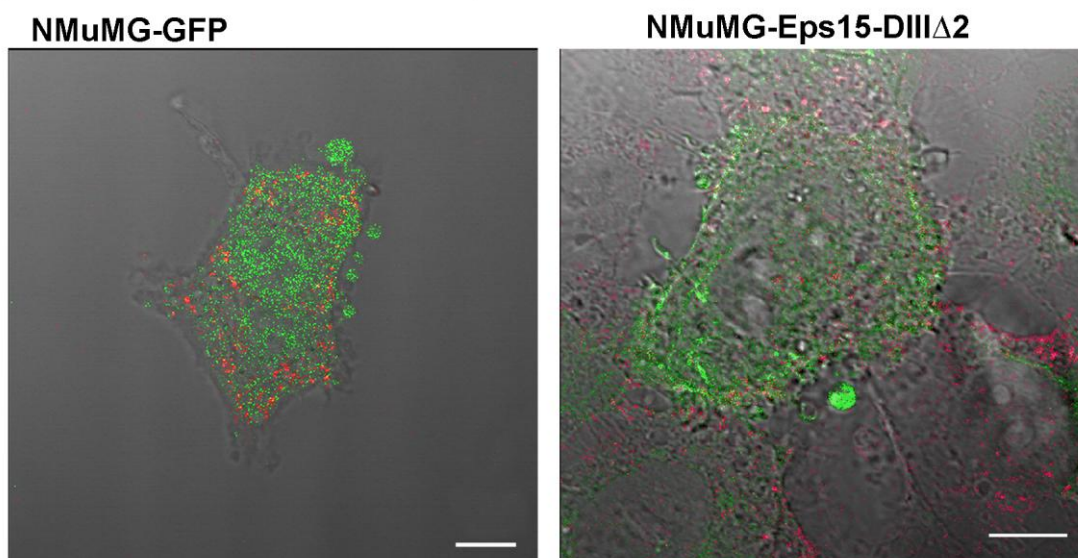
## **5.1. Studium časné fáze infekce myšího polyomaviru**

Výsledky uváděné v této kapitole jsou součástí práce Liebl et al., 2006 (příloha 1). Detailně jsou popsány experimenty, na kterých jsem se podílela. Tato publikace navazuje na předchozí studie naší laboratoře, které se zabývaly dopravou genomu MPyV do jádra hostitelské buňky. Produktivní infekce MPyV je závislá na lipidových raftech a část virionů je endocytována ve váčcích bohatých na kaveolin 1 (Richterová et al., 2001). Na rozdíl od viru SV40 však MPyV nebyl pozorován v kaveozómu, ale v recyklujícím endozomu. Kolokalizační studie proteinu VP1 a markeru časných endozomů GTPázy Rab 5 neposkytla jasný výsledek, role časných endozomů v infekci MPyV je stále nejasná. (Mannová a Forstová, 2003). Presentovaná publikace se zaměřuje na bližší charakterizaci pohybu virionů MPyV od cytoplazmatické membrány do perinukleárního prostoru.

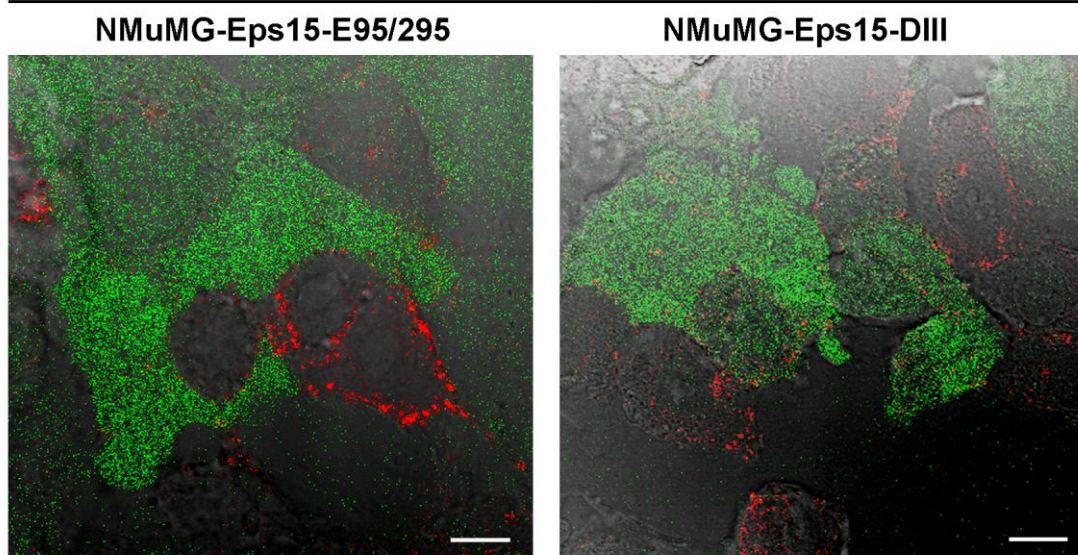
### **5.1.1. Je MPyV internalizován do buněk drahou klatrinem zprostředkované endocytózy?**

Jako první jsme chtěli potvrdit hypotézu, že MPyV na rozdíl od JC viru ke vstupu do buněk nevyužívá dráhu klatrinem zprostředkované endocytózy. Kolokalizační studie prokázaly, že MPyV nekolokalizuje s Con-1, markerem váčků obalených klatrinem. Dále jsme testovali efekt mutantů dráhy substrátu receptoru epidermálního růstového faktoru klonu 15 (Eps15), které inhibují endocytickou dráhu zprostředkovanou klatrinem. Připravili jsme buněčné linie exprimující Eps15 dominantně negativní mutantu DIII nebo E $\Delta$ 95/295 fúzovanou s GFP (Benmerah et al., 1999, Benmerah et al., 1998), které kompetují s endogenním Eps 15 o vazbu adaptorového proteinu klatrinu AP-2. Inhibice endocytické dráhy zprostředkované klatrinem u buněčných linií exprimujících GFP fúzované dominantně negativní mutanty proteinu Eps15 byly ověřeny analýzou internalizace transferinu, o němž je známo, že využívá klatrinem obalené váčky při vstupu do buněk. Zatímco u kontrolních buněčných linií byl transferin transportován do buněk, u buněk exprimujících Eps15 mutanty transferin do buněk transportován nebyl, zůstával na povrchu, z kterého mohl být snadno odmyt (obr. 5). Expres GFP fúzovaných dominantně negativních mutant Eps15-DIII nebo Eps15-E $\Delta$ 95/295 neredukovala infekci těchto buněčných linií, stejně jako kontrolních buněčných linií exprimující samotný protein GFP nebo GFP fúzovanou mutantu Eps 15-DIII $\Delta$ 2 (neváže AP-2 adaptorový protein a tak neovlivňuje efektivitu endocytózy zprostředkované klatrinem). Tyto výsledky potvrzují elektronmikroskopická pozorování, že MPyV ke své internalizaci nevyužívá dráhu klatrinem zprostředkované endocytózy.

### kontrolní buňky - neinterferují s CME



### dominantně negativní mutanty - interferují s CME

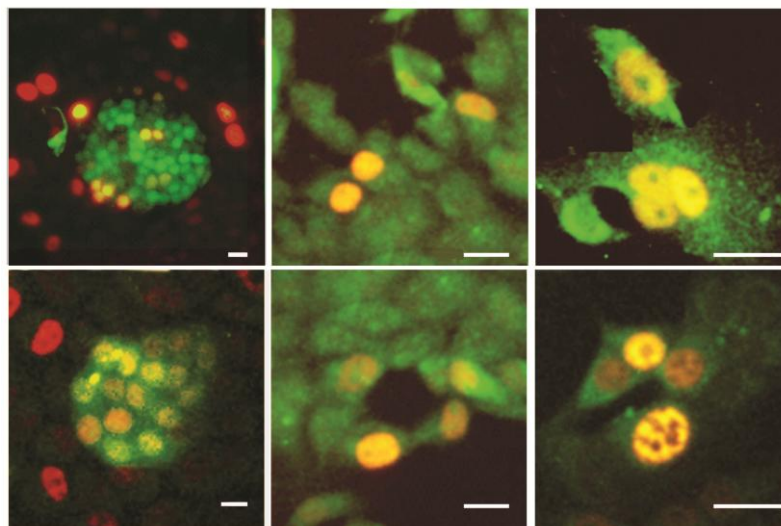


**Obr. 5. Transferin není internalizován buněčnými liniemi exprimující dominantně negativní mutantu Eps15-DIII nebo Eps15-E $\Delta$ 95/295.** K buněčným liniím exprimujícím dominantně negativní mutanty Eps 15 nebo kontrolní mutanty proteinu Eps15 byl přidán transferin konjugovaný s Alexa Fluor 594. Po 20 minutách byly buňky fixovány a pozorovány konfokálním mikroskopem. Buňky produkující mutanty fúzované s GFP jsou označeny zeleně, transferin je označen červeně. Hranice buněk ukazuje Nomarského kontrast. Prezentována je jedna sekce z konfokálního mikroskopu. Úsečka – 8  $\mu$ m. CME – endocytóza zprostředkovaná klatrinem.

#### 5.1.2. Je kaveolin 1 nezbytný pro internalizaci myšího polyomaviru?

Role kaveolinu 1 a dráhy kaveolinem zprostředkované endocytózy v internalizaci a dopravě MPyV do jádra je doposud nejasná. Zatímco Gilbertová a Benjamin (2000) ukázali nezávislost internalizace MPyV na kaveolami zprostředkované endocytóze, Richterová et al., (2001) pozorovali vstupující virus ve váčcích, z nichž některé byly bohaté na kaveolin 1. K popsání role kaveolinu 1 v internalizaci MPyV hostitelskými buňkami jsme využili různé

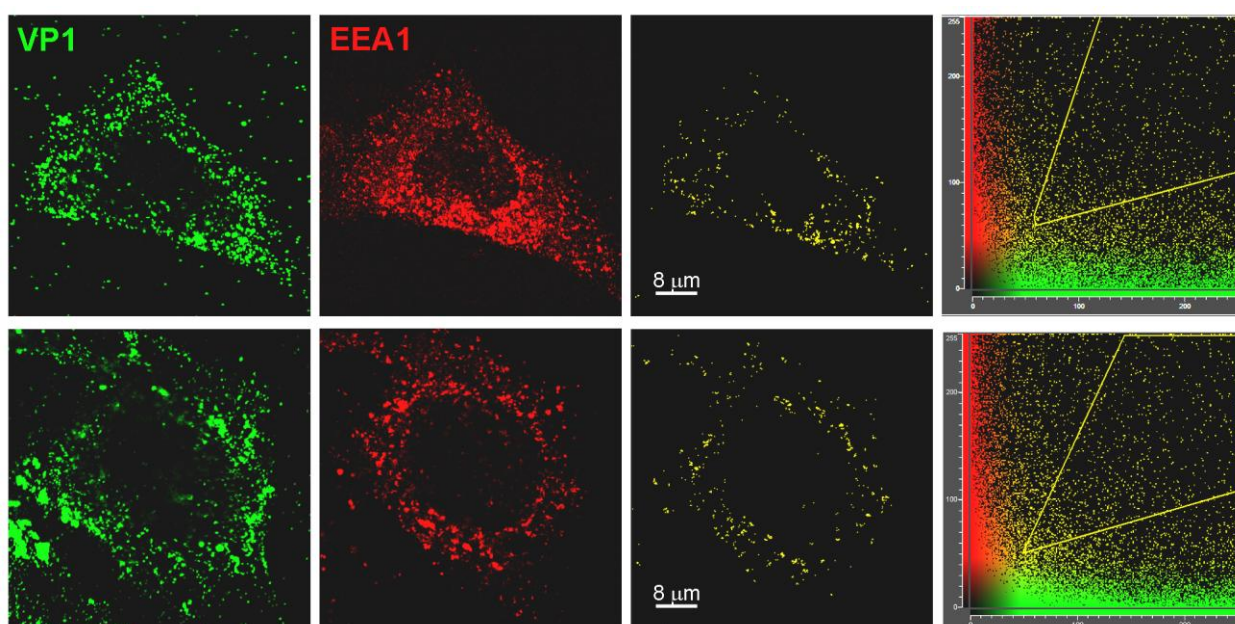
přístupy. Pozorování pohybu fluorescenčně barveného MPyV v buňkách exprimujících kaveolin 1 fúzaný s GFP odhalilo, že viriony obcházejí domény plazmatické membrány obsahující kaveolin 1. Avšak část virionů byla internalizována doménami bohatými na kaveolin 1. Tato pozorování ukazují, že MPyV je internalizován, jak pomocí membrán bohatých na kaveolin 1 tak i nezávisle na kaveolinu 1. Pro objasnění otázky jestli je kaveolin1 nezbytný pro internalizaci a dopravu genomu MPyV do jádra jsme monitorovali pohyb MPyV v Jurkat buňkách. Tyto buňky neexprimují kaveolin 1 a postrádají tak funkční kaveoly. Viriony MPyV efektivně vstupovaly do Jurkat buněk, signál proteinu VP1 byl detekován v cytoplazmě a v časných endozomech. Význam kaveolinu 1 a funkčních kaveol v produktivní infekci MPyV byl studován monitorováním efektivity infekce u buněk exprimujících dominantně negativní mutantu kaveolinu 1 (tyto buňky mají snížený počet funkčních kaveol). Transientní exprese dominantně negativní mutanty kaveolinu 1 nezamezila infekci buněk MPyV (obr. 6). Počet infikovaných buněk exprimujících dominantně negativní mutantu nebyl významně nižší než počet infikovaných buněk u kontrol neexprimujících dominantně negativní mutantu kaveolinu 1. Tyto výsledky ukazují, že MPyV může být internalizován a jeho genom může být dopraven do jádra i v buňkách postrádající kaveolin 1 pomocí alternativní endocytické dráhy, která je nezávislá na klatrinu i na kaveolinu 1.



**Obr. 6. Expresa dominantně negativní mutanty kaveolinu 1 nezabrání produktivní infekci MPyV.** NMuMG buňky byly transfekovány plasmidem pCINeo/IRES-GFP/cav-1 DN (bicistronní expresní vektor pro dominantně negativní mutantu kaveolinu 1) a o 10 dní později byly buňky infikovány MPyV (MOI=1pfu/b). Buňky byly fixovány 24 hpi a LT antigen byl označen specifickou protilátkou. Buňky produkující dominantně negativní mutantu jsou označeny zeleně (GFP protein) a buňky obsahující LT antigen červeně. Úsečka – 20  $\mu$ m.

### 5.1.3. MPyV vstupuje do časných endozomů

Dále nás zajímalo, jestli virus při putování k jádru využívá časné endozomy. V předchozích studiích se nám nepodařilo přesvědčivě určit, jestli MPyV při putování buňkou využívá časné endozomy. Kolokalizační pokusy s markerem časných endozomů, GTPázou Rab 5 neposkytly jasný výsledek (Mannová a Forstová, 2003). Pro naše experimenty jsme se rozhodli použít jako marker časných endozomů protein EEA1 (early endosome antigen 1, periferní protein membrány časného endozomu). V čase 30 min po infekci jsme pozorovali kolokalizaci proteinu VP1 a EEA1 (obr. 7), což ukazuje, že MPyV při transportu k jádru prochází časnými endozomy.



**Obr. 7. MPyV vstupuje do časných endozomů.** Buňky linie 3T6 byly infikovány MPyV (MOI=100 pfu/b) a fixovány 30 min po infekci. Viriony byly označeny protilátkou proti proteinu VP1 (zeleně) a časné endozomy protilátkou proti proteinu EEA1 (červeně). Třetí sloupec ukazuje kolokalizující signály (žlutě), které odpovídají těm, které byly vybrány z grafu rozložení intenzit signálu (čtvrtý sloupec). Prezentovány jsou vybrané sekce z konfokálního mikroskopu dvou infikovaných 3T6 buněk.

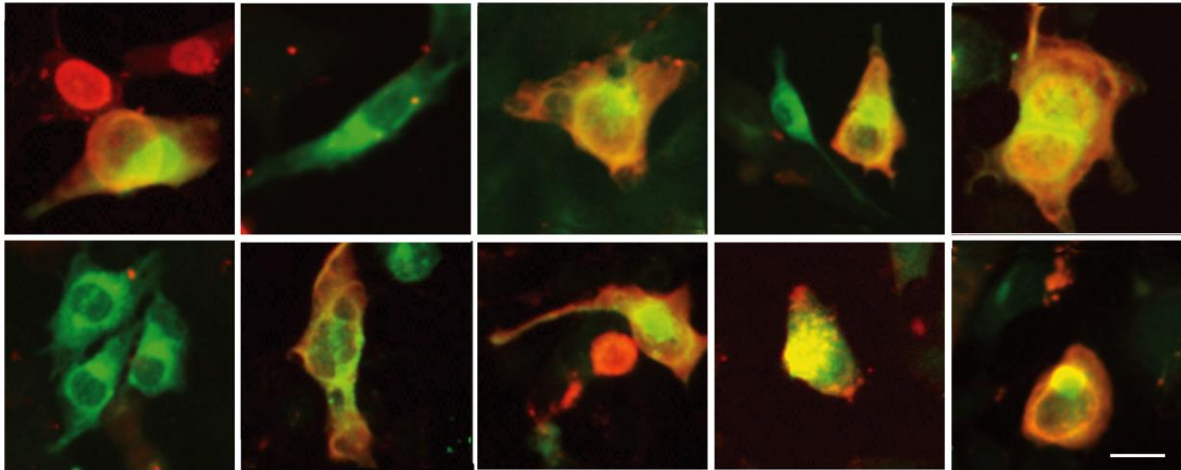
### 5.1.4. MPyV používá při pohybu buňkou endocytickou dráhu závislou na GTPáze Rab 5

Viriony MPyV se ve stejném čase (30 min po infekci) nachází ve váčcích pozitivních na marker časných endozomů EEA1 (viz výše) a také ve váčcích obsahující kaveolin 1 (Richterová et al., 2001). Zajímalo nás tedy, jestli transport viru přes časné endozomy je součástí produktivní cesty infekce. Buňky linie WOP byly transfekovány plazmidy pRab 5 wt-GFP (divoký typ GTPázy) nebo pRab 5 S34N-GFP (dominantně negativní mutanta GTPázy), infikovány a

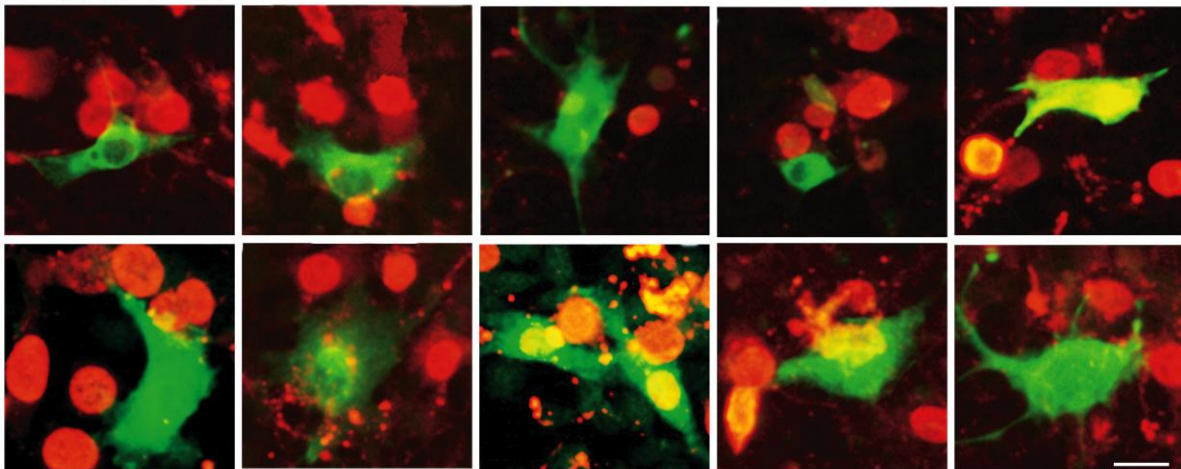
infikované buňky byly označeny protilátkou proti proteinu VP1. Zatímco divoký typ GTPázy Rab 5 zvyšoval (zhruba o 30%) efektivitu infekce MPyV (obr. 8 A a C), její dominantně negativní mutanta silně inhibovala (zhruba o 80%) efektivitu infekce MPyV (obr. 8 B a C). Tento pokus ukazuje závislost endocytózy MPyV na GTPáze Rab 5 a naznačuje možné propojení endocytické dráhy závislé na kaveolinu 1 a endocytické dráhy zprostředkované klatrinem u infikovaných buněk. Tato teorie je podpořena pozorováním, že marker časných endozomů EEA1 a kaveolin 1 se v čase 30 min po infekci nacházejí jako součást stejného kompartmentu (obr. 9 A). Dále nás zajímalo, jestli je propojení těchto drah iniciováno endocytózou viru. Proto jsme sledovali těsnou kolokalizaci proteinu EEA1 a kaveolinu 1 v neinfikovaných buňkách. Pozorovali jsme malé endozomy stejně jako velké kompartmenty pozitivní na kaveolin 1 se zřetelnými oblastmi EEA1 pozitivních domén (obr. 9 B).



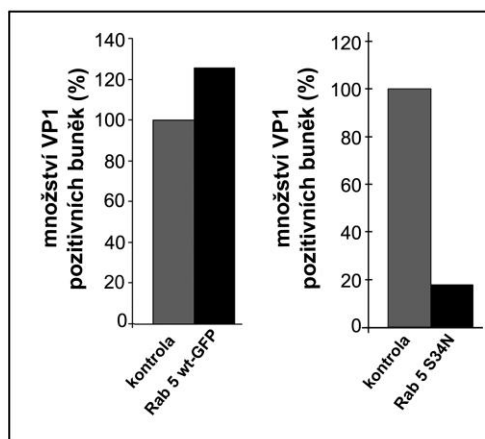
### A - Rab 5 wt



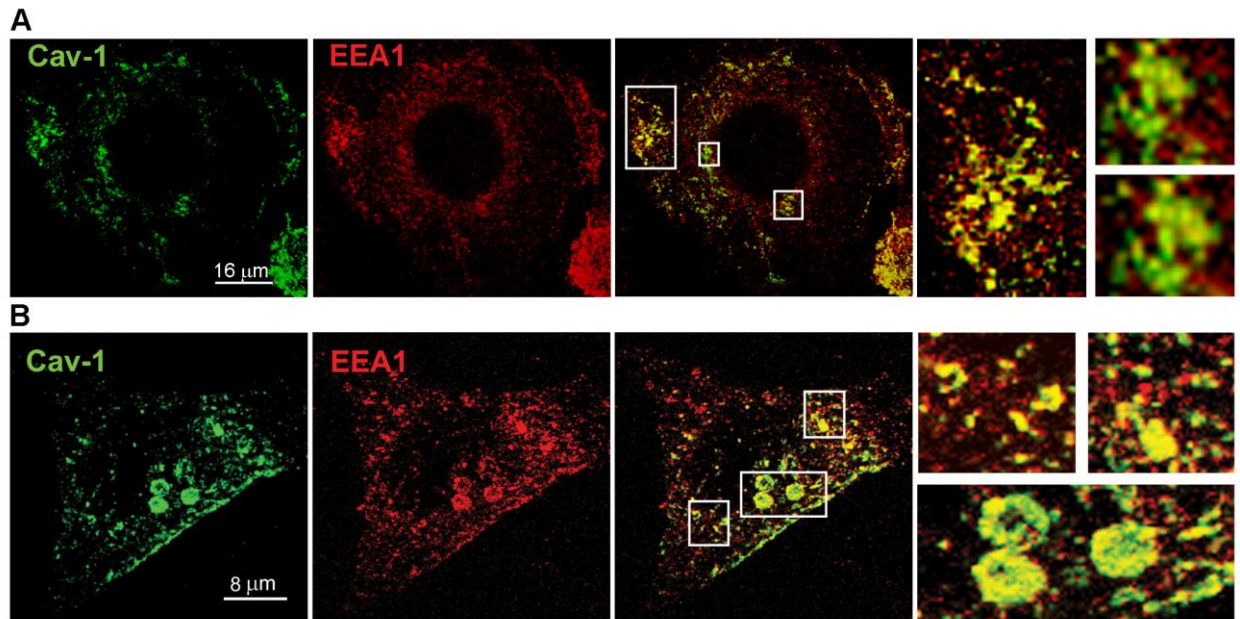
### B - Rab 5 S34N



### C



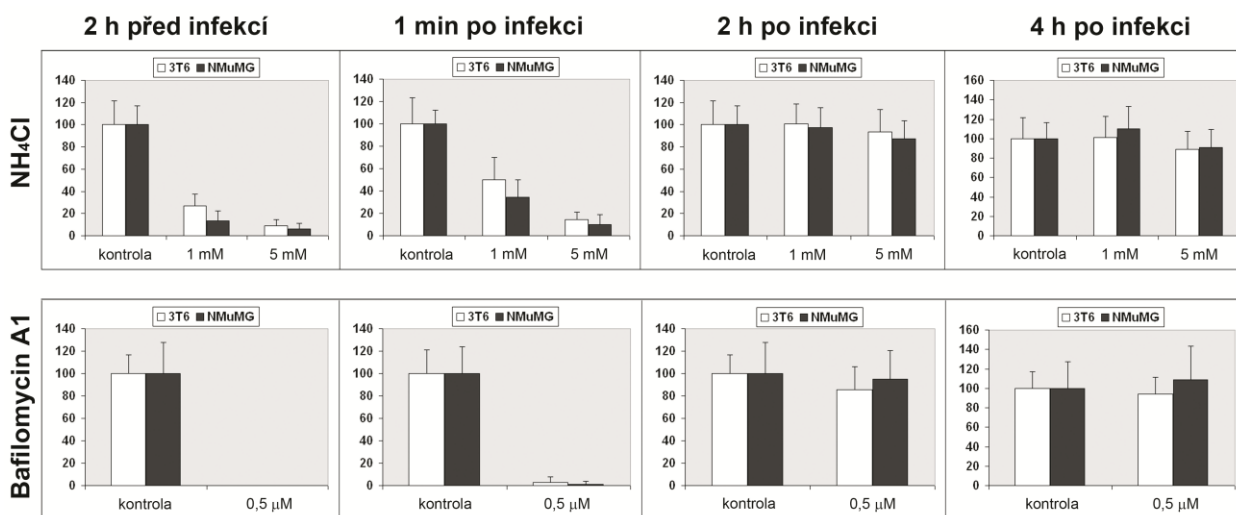
**Obr. 8. Efektivita infekce MPyV je závislá na funkční GTPáze Rab 5.** Plazmid kódující gen pro divoký typ GTPázy Rab 5 nebo dominantně negativní mutantu GTPázy Rab 5 byl transfekován do buněk linie WOP a po 24 h byly buňky infikovány MPyV (MOI=1přu/b). Po 36 hpi byly buňky fixovány a byl detekován protein VP1 pomocí specifické protilátky. Buňky produkující divoký typ Rab 5 nebo dominantně negativní mutantu jsou označeny zeleně (GFP protein) a buňky pozitivní na VP1 červeně (**A**, **B**). **C** - Pozitivní buňky byly spočítány. Hodnoty v grafu představují procento infikovaných buněk exprimujících Rab 5 nebo dominantně negativní mutantu vzhledem ke kontrole (infikované buňky neexprimující Rab 5 nebo dominantně negativní mutantu) a reprezentují 1500 buněk ze dvou nezávislých experimentů. Úsečka – 20  $\mu$ m.



**Obr. 9. Kaveolin 1 a EEA1 se nacházejí ve stejném endocytickém kompartmentu v infikovaných (A) i neinfikovaných (B) buňkách linie 3T6.** Ukázán je konfokální řez infikovanou buňkou (MOI=100pfu/buňku, fixováno 30 min po infekci) (A) a neinfikovanou buňkou (B). Buňky byly obarveny protilátkou proti kaveolinu 1 (zelená) a markeru časných endozomů EEA1 (červená). Zvětšené oblasti z třetího sloupce (překryv signálů) jsou ukázány ve čtvrtém sloupci.

### 5.1.5. Infekce myším polyomavirem je závislá na pH endozomů

Předchozí experimenty naznačují, že MPyV při putování k jádru využívá časné endozomy. Abychom zjistili, jestli MPyV potřebuje kyselé prostředí časných endozomů pro produktivní infekci, zkoumali jsme vliv chloridu amonného a bafilomycinu A1 na efektivitu infekce MPyV. Bafilomycin A1 je inhibitor vakuolární  $H^+$  ATPázy a zabraňuje tedy okyselení endozomu, zatím co chlorid amonný penetruje endozomy a tak zvyšuje jejich pH. Bafilomycin A1 zcela potlačil MPyV infekci u buněk linie 3T6 a NMuMG pokud byl aplikován 2 h před infekcí a byl ponechán v médiu další 2 h po přidání viru (obr. 10). Přidání chloridu amonného (koncentrace 1 mM) inhibovalo infekci buněk linie 3T6 o 85% a buněk linie NMuMG o 65% vzhledem k neošetřeným kontrolám. Se zvyšující se koncentrací chloridu amonného jeho inhibiční účinky rostly (obr. 10). Inhibiční efekt vysokého endozomálních pH byl také patrný, pokud byl chlorid amonný nebo bafilomycin A1 přidán okamžitě po adsorpci viru na buněčný povrch. Přidání látek 2 h po adsorpci viru a později nemělo žádný efekt na efektivitu infekce MPyV (obr. 10).

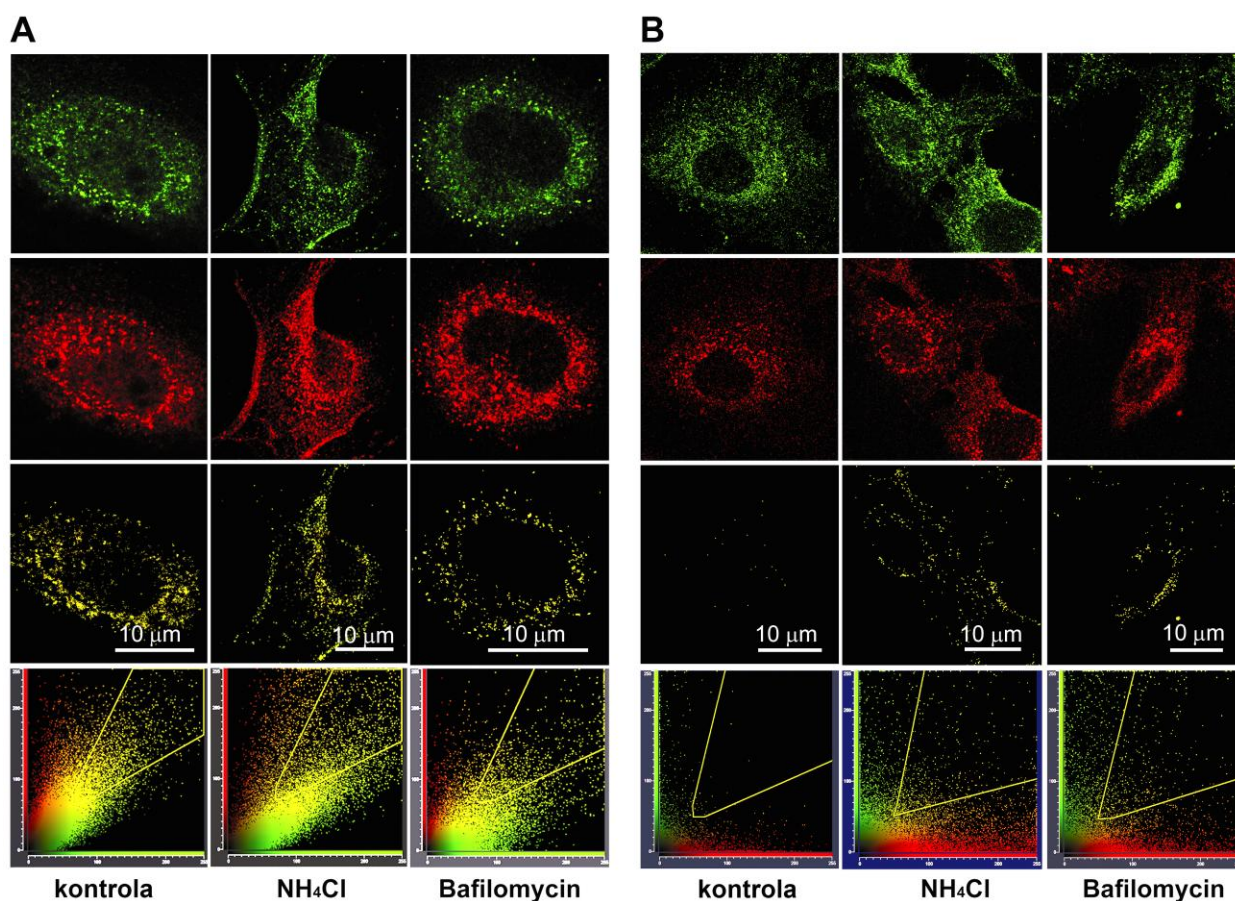


**Obr. 10. Inkubace buněk s chloridem amonným a bafilomycinem A1 ovlivňuje MPyV infekci.** Buňky linie 3T6 nebo NMuMG byly inkubovány s chloridem amonným nebo bafilomycinem A1 v různých časech po infekci MPyV (2 h před infekcí, okamžitě (1 min) po infekci, 2 h a 4 h po infekci) po celkovou dobu 4 h. buňky byly fixovány 24 hpi a byl obarven LT antigen. Pozitivní buňky byly spočítány pomocí fluorescenční mikroskopie. Kontrolní buňky byly infikovány MPyV za absence látek (kontrola). Hodnoty v grafu představují procento infikovaných buněk vzhledem ke kontrole a reprezentují průměrnou hodnotu z 30 optických polí (cca 1400 buněk) ze dvou (NMuMG) nebo tří (3T6) nezávislých experimentů.

### 5.1.6. V buňkách ošetřených chloridem amonným nebo bafilomycinem A1 je MPyV zadržován v časných endozomech

Dále nás zajímal konkrétní krok, ve kterém je pohyb viru ovlivněn, pokud je zablokováno okyselení endozomů. Částečná kolokalizace viru a proteinu EEA1 (marker časných endozomů) byla pozorována v kontrolních buňkách i buňkách vystavených účinkům látek alkalizujících endozomy 20 min po infekci (obr. 11 A), zatímco 4 h po infekci u kontrolních buněk virus opustil časný endozom, ale u buněk s alkalizovanými endozomy byla stále pozorována částečná kolokalizace proteinu VP1 a EEA1 (obr. 11 B).

Tyto výsledky naznačují, že kyselé endozomální kompartmenty hrají v efektivní infekci MPyV zásadní roli. Vstup viru do časných endozomů je pro produktivní infekci zcela nezbytný, pokud je tomuto vstupu zabráněno (dominantně negativní mutanta GTPázy Rab 5) dojde k výraznému poklesu efektivity infekce. Stejně důležité je i kyselé prostředí endozomů. Pokud je pH zvýšeno (nebo je zabráněno okyselení) je virus stále schopný vstoupit do časného endozomu, ale opuštění tohoto kompartmentu a jeho další transport buňkou je narušen.



**Obr. 11. Vstupující MPyV je zadržován v časných endozomech, pokud je jejich okyselení blokováno NH<sub>4</sub>Cl nebo bafilomycinem A1.** A – v časných časech po infekci (30 min) je pozorována silná kolokalizace proteinu VP1 (zeleně) a markeru časných endozomů EEA1 (červeně) jak v buňkách ošetřených látkami zabraňujícími okyselení endozomů tak i v neošetřené kontrole. B – v pozdějším čase po infekci (4 h) je detekovaná residuální, ale přesto významná kolokalizace proteinů VP1 a EEA1 pouze v ošetřených buňkách. Buňky byly infikovány MPyV (MOI=100pfu/buňku) a fixovány 30min po infekci nebo 4 h po infekci. Viriony jsou označeny specifickou protilátkou proti proteinu VP1 (zeleně) a časné endozomy jsou označeny protilátkou proti proteinu EEA1 (červeně). Obrázky v třetí řadě představují kolokalizující signály (žlutě) odpovídající těm, které byly vybrány z grafu rozložení intenzit signálu ve čtvrtém řádku.

### 5.1.7. MPyV je transportován do recyklujících endozomů

Naše předchozí studie ukázaly, že VP1 protein MPyV kolokalizuje s transferinem i GTPázou Rab11 (marker recyklujících endozomů) mezi 1 a 3 hpi (Mannová a Forstová, 2003), což naznačuje, že je MPyV transportován do recyklujících endozomů. V blízkosti organizačního centra mikrotubulů dochází k akumulaci různých endozomálních kompartmentů včetně recyklujících endozomů a dříve popsaných velkých váčků obsahujících kaveolin 1, kaveozómů (Mundy et al., 2002, Pasqualato et al., 2004). Rozlišovací schopnost konfokálního mikroskopu ( $\geq 200$  nm) není dostatečná pro odlišení, jestli je MPyV lokalizován v recyklujícím endozomu nebo podobně jako virus SV40 v kaveozómu. Pro lepší charakterizaci kompartmentu, ve kterém se MPyV v perinukleárním prostoru vyskytuje, jsme použili metodu fluorescenčního

resonančního přenosu energie („fluorescence resonance energy transfer,“ FRET). Tato metoda má rozlišovací schopnost 2-10 nm. Touto metodou jsme testovali, jestli se transferin (který je endocytována dráhou závislou na klatrinu a je kumulován v recyklujícím endozomu) a MPyV vyskytují ve stejném kompartmentu (měření FRET mezi VP1 a transferinem) a jestli jsou tyto kompartmenty recyklující endozomy (měření FRET mezi VP1 a Rab 11). V obou experimentech jsme získali podobné výsledky, průměrné hodnoty efektivity FRET byly vyšší než průměrné hodnoty efektivity FRET naměřené u buněčného pozadí (měření a interpretaci výsledků provedl F. Difato). Tato měření ukazují, že MPyV se vyskytuje v těsné blízkosti transferinu a že obě tyto molekuly jsou lokalizovány v recyklujícím endozomu, na rozdíl od viru SV40, o kterém bylo publikováno, že je v perinukleární oblasti lokalizován v kaveozómu.

## **5.2. Studium interakcí strukturního proteinu VP1 MPyV v pozdních fázích infekce**

Výsledky uváděné v této kapitole jsou součástí práce Horníková et al., 2011 (příloha 2), tato kapitola také obsahuje dosud nepublikované výsledky týkající se vyhledávání nových interakčních partnerů proteinu VP1.

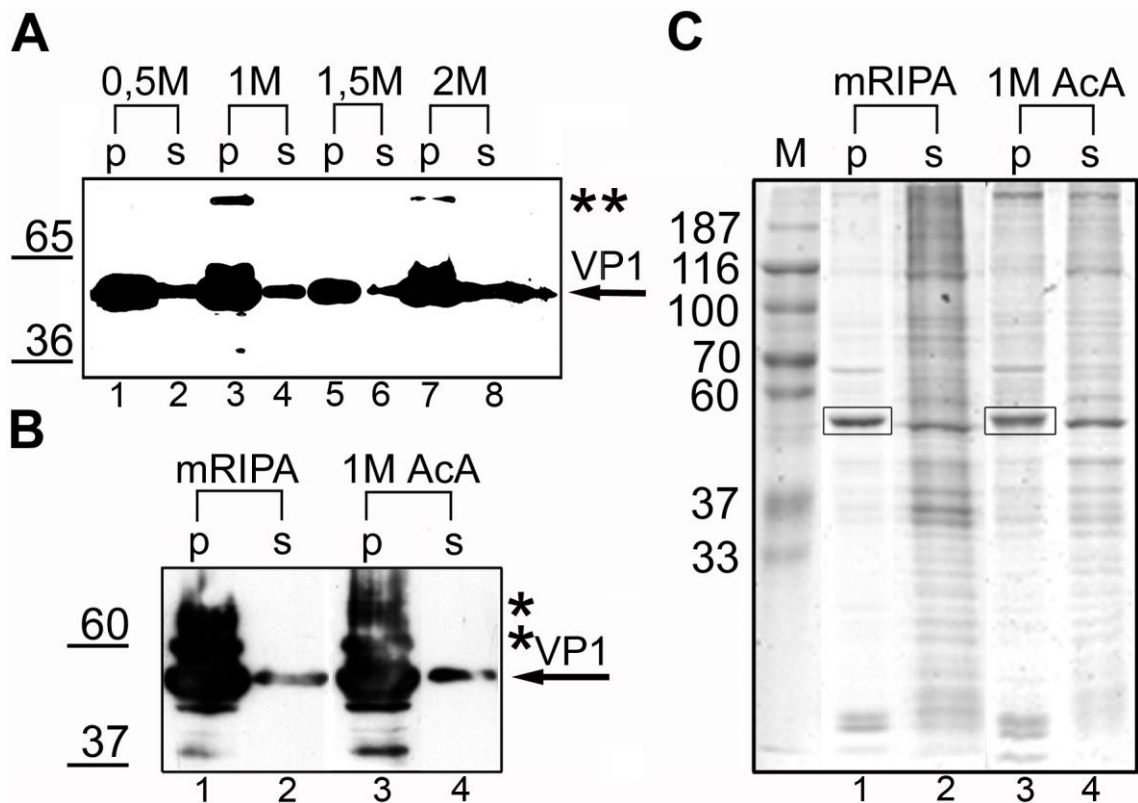
### **5.2.1. Studium interakcí proteinu VP1 s využitím separace komplexů pomocí modré nativní elektroforézy**

#### **5.2.1.1. Rozpustnost proteinu VP1 není závislá na koncentraci kyseliny 6-aminokapronové**

U separace pomocí BN-PAGE je důležité zachování nativního stavu proteinů při vysoké rozpustnosti. Pro efektivní solubilizaci proteinů se používá chlorid sodný. Bohužel, chloridové anionty mají vysokou mobilitu v elektrickém poli, což vede k agregaci proteinů. V systému pufrů BN-PAGE je NaCl nahrazen kyselinou 6-aminokapronovou (AcA), která nedisociuje v elektroforetických pufrech (pH = 7,0) a proto se nepohybuje v elektrickém poli. Bylo ukázáno, že 750 mM AcA může plně nahradit 500 mM NaCl při solubilizaci mitochondriálních komplexů (Schagger a von Jagow, 1991).

Morfogeneze virionu MPyV probíhá v jádře, proto jsme postupovali podle protokolu Novákové et al. (2006). V této práci autoři ukázali, že rozpustnost jaderných proteinů může být ovlivněna různými koncentracemi kyseliny 6-aminokapronové, proto jsme nejprve testovali rozpustnost proteinu VP1. Jádra izolovaná z infikovaných buněk linie 3T6 byla lyzována v pufru se vzrůstající koncentrací kyseliny 6-aminokapronové (0,5 – 2 M) a bylo porovnáno množství proteinu VP1 v rozpustné (supernatant, s) a nerozpustné (pelet, p) frakci (obr. 12 A, dráhy 1-8). Většina proteinu VP1 byla detekována v peletu (obr. 12 A) ve všech použitých koncentracích kyseliny 6-aminokapronové. Tyto výsledky ukazují nezávislost rozpustnosti proteinu VP1 na koncentraci kyseliny 6-aminokapronové.

Kromě koncentrace soli může být rozpustnost proteinů ovlivněna také přítomností dalších látek (například detergentů), proto jsme dále testovali vliv detergentů na rozpustnost proteinu VP1. Jádra izolovaná z infikovaných buněk linie 3T6 byla lyzována pufrům s 1 M kyselinou 6-aminokapronovou nebo modifikovaným RIPA pufrům (obsahuje směs detergentů, viz kap. 4. 18.) a porovnali jsme množství proteinu VP1 v peletu a supernatantu. Většina proteinu VP1 stále zůstala nerozpustná v obou typech lyzačních pufrů (obr. 12 B), ale poměr celkové koncentrace proteinů v rozpustné frakci vůči celkové koncentraci proteinů v nerozpustné frakci byl vyšší, pokud byla jádra lyzována modifikovaným RIPA pufrům (měřením intenzity signálu z obr. 12 C, data neukázána).



**Obr. 12. Rozpustnost proteinu VP1 není ovlivněna vzrůstající koncentrací kyseliny 6-aminokapronové. (A)** Jádra izolovaná z  $5 \times 10^6$  buněk byla lyzována v pufru se vzrůstající koncentrací kyseliny 6-aminokapronové (AcA) (0,5 – 2M) pro porovnání rozložení proteinu VP1 v rozpustné (s) a nerozpustné (p) frakci. Jaderné lyzáty byly separovány SDS-PAGE (10% gel), přeneseny na membránu a protein VP1 byl detekován protilátkou specifickou proti proteinu VP1. **(B a C)** Jádra izolovaná z  $5 \times 10^6$  buněk byla lyzována v modifikovaném RIPA pufru (mRIPA) (dráhy 1 a 2) nebo v pufru s 1 M AcA (dráhy 3 a 4) pro porovnání rozložení proteinu VP1 v rozpustné (s) a nerozpustné (p) frakci. Lyzáty byly rozděleny pomocí SDS-PAGE (10% gel), obarveny Coomassie Blue **(C)** nebo přeneseny na membránu a protein VP1 byl detekován specifickou protilátkou **(B)**. M – marker molekulových vah (v kilo Daltonech). Liché dráhy reprezentují nerozpustné frakce (p) a sudé dráhy rozpustné frakce (s). Protein VP1 je označen šipkou (A a B) nebo ohraničen obdélníkem (C). Hvězdička (\*) označuje posttranslačně modifikované formy proteinu VP1, dvojitá hvězdička (\*\*) označuje kovalentně vázaný dimer proteinu VP1, který se často vyskytuje v pozdní fázi virové infekce.

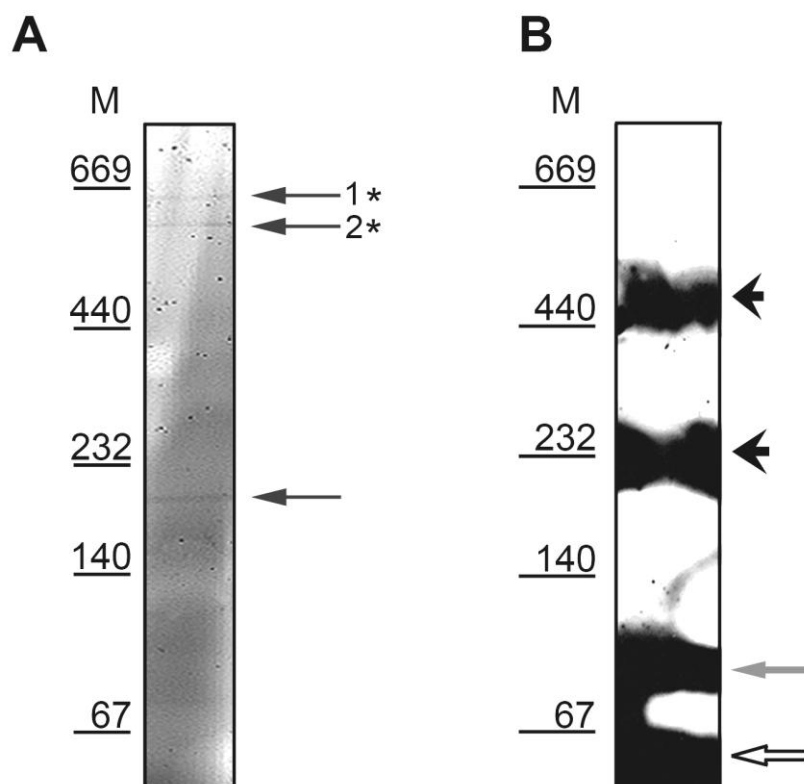
### 5.2.1.2. Stabilita proteinových komplexů není ovlivněna solubilizací jader v modifikovaném RIPA pufru.

Složení solubilizačního pufru neovlivňuje pouze rozpustnost proteinů, ale také stabilitu proteinových komplexů, proto jsme dále testovali samotné dělení a možnosti detekce proteinů pomocí BN-PAGE. Jaderný lyzáat z neinfikovaných buněk (60  $\mu$ g) byl separován BN-PAGE (4 - 16% gel) a proteinové komplexy byly vizualizovány „Bio-Safe Coomassie Blue“. Bylo detekováno několik ostrých proužků (obr. 13 A, označeny šipkou). Složení proteinových komplexů reprezentujících dva proužky (obr. 13 A, označeny hvězdičkou) bylo analyzováno

pomocí hmotnostní spektrometrie. Proužek 1\* představuje proteinový komplex obsahující cytochrom c1 a cytochrom b-c1. Tento proužek patrně představuje mitochondriální kontaminaci izolovaných jader. V proužku 2\* byla nalezena ATPáza (90 kDa) a tento komplex pravděpodobně představuje hexamer tohoto proteinu (540 kDa).

Dále nás zajímalo, jestli komplexy, které nebyly vizualizovány jako zřetelné pruhy na gelech obarvených Coomassie Blue mohou být detekovány jako pruhy po imunologickém značení Western blotů. Proteinové komplexy z paralelního gelu byly přeneseny na membránu a byl detekován jaderný protein Sp 100 specifickou protilátkou. Jaderný protein Sp 100 (53 kDa) je součástí jaderných struktur známých jako ND-10 a interaguje s proteiny z rodiny heterochromatinu 1, což jsou chromozomální proteiny nepatřící do rodiny histonů (Seeler et al., 1998; Szosteki et al., 1987; Weis et al., 1994). Kromě proužků odpovídajících monomeru a pravděpodobně dimeru proteinu Sp 100 (obr. 13 B) detekovala specifická protilátka dva pruhy s mobilitou odpovídající molekulové váze přibližně 230 a 450 kDa (obr. 13 B), pravděpodobně představující proteinový komplex proteinu Sp 100 s jinými jadernými proteiny. Tyto výsledky ukazují, že proteinové komplexy mohou být identifikovány specifickými protilátkami, i když nejsou detekovatelné barvením Coomassie Blue. Také ukazují, že modifikovaný RIPA pufr nedestabilizuje proteinové komplexy a může být použit pro detekci proteinových komplexů imunodetekcí nebo barvením gelu.





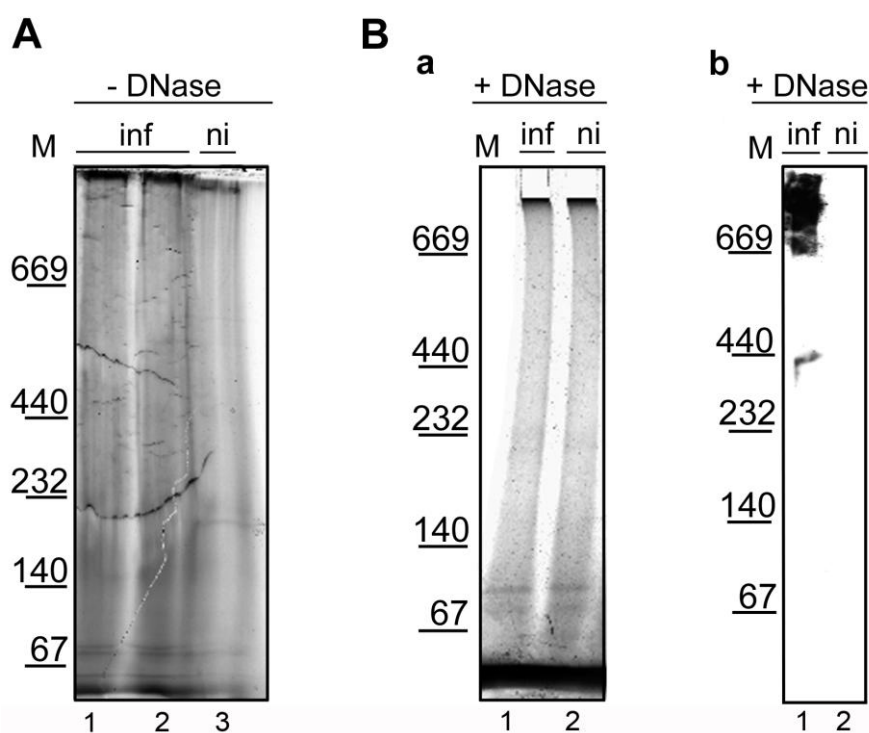
**Obr. 13. Stabilita proteinových komplexů není ovlivněna solubilizací jader v modifikovaném RIPA pufru.** Po solubilizaci v modifikovaném RIPA pufru byl jaderný lyzát (60  $\mu$ g celkového množství proteinů) rozdělen na 4-16 % nativním gradientovém gelu, obarven Bio-Safe Coomassie blue (**A**) nebo přenesen na membránu a analyzován specifickou protilátkou proti proteinu Sp 100 (**B**). M – marker molekulových vah (v kilo Daltonech). Černé dlouhé šipky ukazují proteinové komplexy detekované jako ostré proužky po barvení Coomassie blue, bílá šipka označuje Sp 100 monomer, šedá šipka Sp 100 dimer a krátké černé šipky označují proteinové komplexy proteinu Sp 100 s jinými jadernými proteiny. Hvězdičky označují proteinové komplexy analyzované hmotnostní spektrometrií.

### 5.2.1.3. Protein VP1 vstupuje to separačního gelu, pouze pokud byly komplexy ošetřeny DNázou I.

Na základě předchozích experimentů byla provedena separace jaderných lyzátů připravených z infikovaných buněk. Jaderný lyzát (60  $\mu$ g) byl separován na 4-16% gelu. Po obarvení gelu Coomassie blue nebyly pozorovány žádné proužky specifické pro infikované buňky (obr. 14 A.). I přes centrifugaci jaderného lyzátu (20000g, 30 min, 4°C) před nanesením na gel se po ukončení separace vyskytoval na startu elektroforézy nerozpustný materiál, který arteficiálně migroval a často způsoboval defekty v separačním gelu (obr. 14 A). Ani po přenosu separovaných proteinů na membránu nebyl protein VP1 detekovatelný specifickou protilátkou. Důvodem pro tento jev může být, že nativní protein VP1, váže nespecificky DNA (Chang et al.,

1993), vytvořil komplexy s virovou a pravděpodobně i buněčnou DNA, které byly příliš velké a nemohly efektivně vstupovat do separačního gelu.

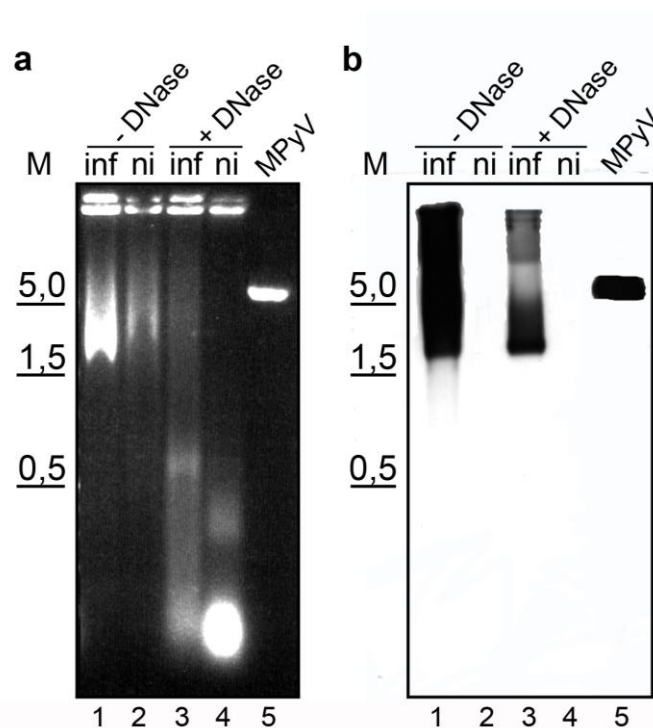
Pro rozbití těchto komplexů bylo do přípravy vzorku zahrnuto působení DNázy I. Jádra byly lyzována v modifikovaném RIPA pufru s přidáním DNázy I (200u/ml), lyzát byl centrifugován a inkubován 15 min při 37°C. Proteinové komplexy (60 µg) byly rozděleny v 4-16% gelu. Po obarvení gelu Coomassie blue byly patrné intenzivní pruhy ve spodní části gelu a také bylo detekováno velké množství materiálu na počátku separačního gelu (obr. 14 Ba). Separované proteiny z paralelního gelu byly přeneseny na membránu a protein VP1 byl detekován specifickou protilátkou. Protein VP1 byl nalezen jako součást komplexu s přibližnou molekulovou vahou 440 kDa, ale většina proteinu VP1 byla detekována na startovní pozici separačního gelu (obr. 14 Bb).



**Obr. 14. Protein VP1 vstupuje do separačního gelu, pouze pokud byly komplexy ošetřeny DNázou I. (A)** Po solubilizaci v modifikovaném RIPA pufru byly jaderné lyzáty infikovaných (inf) a neinfikovaných (ni) buněk (60 µg) separovány na 4-16% gradientovém gelu. Separované proteinové komplexy byly obarveny Bio-Safe Coomassie blue. Dráhy 1 a 2 – jaderný lyzát infikovaných buněk, dráha 3 – jaderný lyzát neinfikovaných buněk. **(B)** jádra izolovaná z infikovaných a neinfikovaných buněk byla solubilizována v modifikovaném RIPA pufru s DNázou I (200u/ml) a jaderné lyzáty (60 µg) byly inkubovány 15 min při 37°C. Lyzáty byly separovány na 4-16% gelu, obarveny Bio-Safe Coomassie blue **(a)** nebo přeneseny na membránu a protein VP1 byl detekován specifickou protilátkou **(b)**. Dráha 1 - jaderný lyzát infikovaných buněk ošetřený DNázou I, dráha 2 – jaderný lyzát neinfikovaných buněk ošetřený DNázou I. M – marker molekulových vah (v kilo Daltech).

#### 5.2.1.4. Virová DNA zůstává v jaderném lyzátu i po ošetření DNázou I.

Dále byla testována efektivita degradace DNA DNázou I pomocí agarózové elektroforézy a Southern blotu. Jaderné lyzáty z infikovaných a neinfikovaných buněk, inkubovaných s DNázou I (200u/ml, 15 min, 37°C) nebo kontrolních (15 nebo 30 µg), byly rozděleny na 1% agarózovém gelu a DNA byla vizualizovaná fluorescenční barvou „Gel Red“. Poté byla DNA přenesena na nylonovou membránu a virová DNA byla detekována specifickou sondou. Z obr. 15 je patrné, že ve všech vzorcích se vyskytuje velké množství DNA na startu separačního gelu. Velké množství DNA (s molekulovou vahou přibližně 3 kbp) přítomné v lyzátu infikovaných buněk neošetřených DNázou I, zjevně odpovídající virové DNA, bylo výrazně redukováno působením DNázy I. Reziduální DNA přítomná ve vzorcích inkubovaných s DNázou I (obr. 15, dráhy 3 a 4) nejspíš představují DNA chráněnou navázanými proteiny proti působení DNázy I. Velikost těchto komplexů jim zabraňuje v efektivním vstupu do separačního 4-16% gelu.

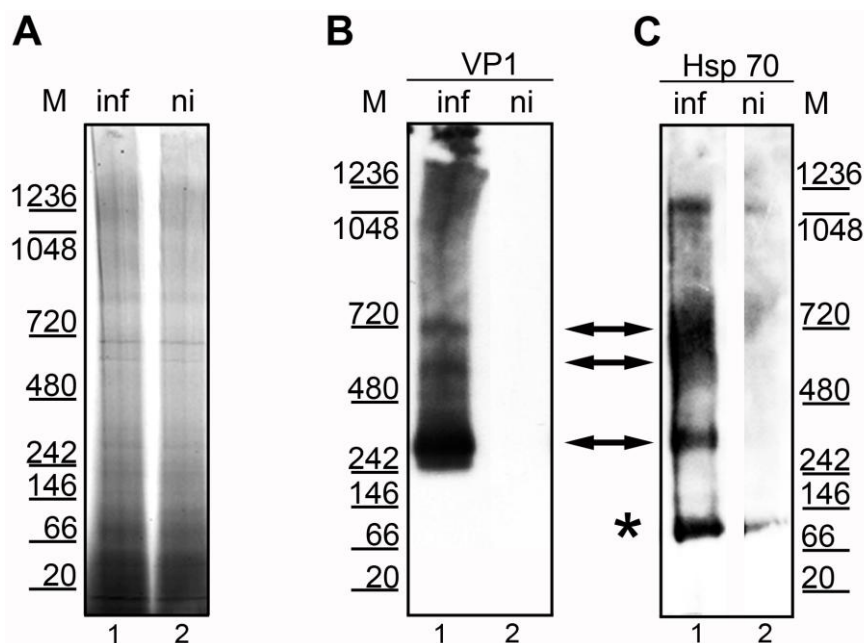


**Obr. 15. Virová DNA zůstává v jaderném lyzátu i po inkubaci s DNázou I.** Jaderné lyzáty infikovaných (inf) a neinfikovaných (ni) buněk, ošetřených nebo neošetřených DNázou I (200u/ml), byly rozděleny na 1% agarózovém gelu (30 µg (a) nebo 15 µg (b)). DNA byla obarvena barvou Gel Red (a) nebo přenesena na nylonovou membránu a virová DNA byla identifikována specifickou DNA próbou (b). Dráhy 1 a 3 – jaderný lyzáat infikovaných buněk ošetřených (3) nebo neošetřených (1) DNázou I, dráhy 2 a 4 – jaderný lyzáat neinfikovaných buněk ošetřených (4) nebo neošetřených (2) DNázou I. Dráha 5 – linearizovaný genom MPyV. M – marker molekulových vah (v kilo párech bází).

Experimenty popsané výše naznačují, že inkubace jaderného lyzátu s DNázou I má pozitivní vliv na schopnost proteinu VP1 migrovat v separačním gelu. Bohužel, pruhy odpovídající molekulovým vahám větším než 250 kDa (viz obr. 14 A) zmizely (obr. 14 Ba). Toto může být způsobeno disociací proteinových komplexů zprostředkovaných interakcí s DNA nebo (i přes přítomnost inhibitorů proteáz) jako důsledek degradace proteinových komplexů buněčnými proteázami při inkubaci v 37°C. Kratší působení DNázy I (méně než 15 min) nebo nižší teploty, při kterých byl jaderný lyzát inkubován s DNázou I, nepomohly komplexům obsahující protein VP1 efektivně vstupovat do separačního gelu. Všechny tyto experimenty ukazují, že BN-PAGE nemůže být efektivně použita pro separaci jaderných komplexů vznikajících během morfogeneze virionu myšího polyomaviru.

#### **5.2.1.5. BN-PAGE může být použita pro studium proteinových komplexů infikovaných buněk.**

Separaci proteinů pomocí BN-PAGE je možno využít nejen pro analýzu proteinových komplexů tvořených virovými proteiny, ale také pro charakterizaci proteinových komplexů tvořených výhradně buněčnými proteiny, které se tvoří během virové infekce. Celobuněčný lyzát infikovaných a neinfikovaných buněk byl separován pomocí BN-PAGE za použití 3 – 12% gelu. Po obarvení gelu Coomassie blue nebyly detekovány žádné proužky specifické pro infikované buňky (obr. 16 A). Separované proteinové komplexy z paralelního gelu byly přeneseny na membránu a proteiny VP1 a Hsp 70 byly detekovány specifickými protilátkami. Protein VP1 byl nalezen jako součást proteinových komplexů s mobilitou odpovídající přibližně 300, 600 a 720 kDa (obr. 16 B). Protein Hsp 70 byl detekován jako monomer v infikovaných i neinfikovaných lyzátech (obr. 16 C, označen hvězdičkou) a jako součást komplexu s molekulovou hmotností vyšší než 1 MDa (obr. 16 C). Dále byly protilátkou proti Hsp 70 v lyzátu infikovaných buněk detekovány pruhy s mobilitou odpovídající komplexům, které se značily také protilátkou proti proteinu VP1 (obr. 16 C, označeny dvojitou šipkou). Tyto komplexy s vysokou molekulovou hmotností byly specifické pro infikované buňky.

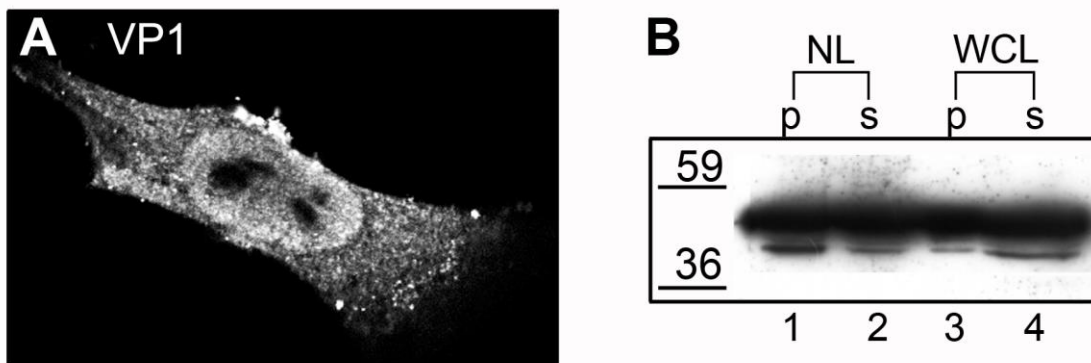


**Obr. 16. Proteinové komplexy specifické pro infikované buňky byly separovány BN-PAGE.** Celobuněčný lyzát infikovaných (inf) a neinfikovaných (ni) byl separován na 3 – 12% nativním gradientovém gelu. (A) proteinový lyzát byl separován (15  $\mu$ g) a proteinové komplexy byly vizualizovány "SimplyBlue SafeStain". (B) 5 $\mu$ g proteinů v lyzátu bylo separováno, přeneseno na membránu a protein VP1 byl detekován specifickou protilátkou. (C) 120  $\mu$ g proteinů v lyzátu bylo separováno, přeneseno na membránu a protein Hsp 70 byl detekován specifickou protilátkou. M – marker molekulových vah (v kilo Daltonech). Dráha 1 – lyzát infikovaných buněk, dráha 2 – lyzát neinfikovaných buněk. Monomer proteinu Hsp 70 je označen hvězdičkou (\*) a komplexy obsahující protein VP1 a zároveň protein Hsp 70 jsou označeny dvojitou šipkou.

#### 5.2.1.6. BN-PAGE může být použita pro studium komplexů proteinu VP1 a buněčných proteinů vznikajících v buňkách, které transientně produkují VP1

Dále bylo testováno, jestli metoda separace pomocí BN-PAGE může být využita pro studium interakcí hlavního kapsidového proteinu VP1 s buněčnými proteiny v buňkách transientně produkujících VP1.

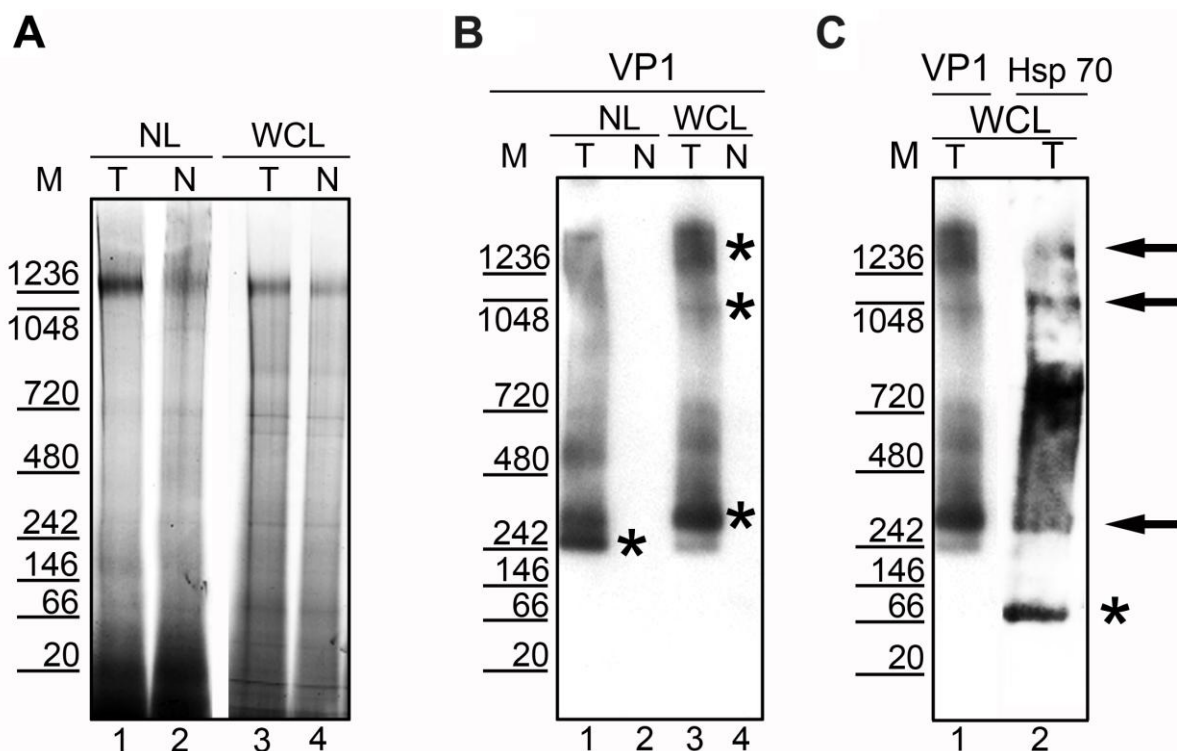
Jako první jsme testovali subcelulární lokalizaci proteinu VP1 v transfekovaných buňkách metodou konfokální mikroskopie a také rozpustnost proteinu VP1. Po transfekci byla většina proteinu VP1 lokalizována v cytoplasmě a pouze část tohoto proteinu byla lokalizována v buněčném jádře (obr. 17 A). Proto byl pomocí modifikovaného RIPA pufru připraven lyzát jak z izolovaných jader tak celobuněčný lyzát. Množství rozpustného proteinu VP1 v jaderném lyzátu transfekovaných buněk (obr. 17 B, dráhy 1 a 2) bylo výrazně vyšší než množství rozpustného proteinu v jaderném lyzátu infikovaných buněk (obr. 17 B, dráhy 1 a 2 versus obr. 12 B, dráhy 1 a 2). Přibližně 50% proteinu VP1 bylo nalezeno v rozpustné frakci, jak u jaderného, tak i u celobuněčného lyzátu (obr. 17 B.).



**Obr. 17. Množství rozpustného proteinu VP1 je v lyzátech transfekovaných buněk vyšší než u buněk infikovaných.** Buňky linie NIH 3T3 byly transfekovány plasmidem pVP1 a inkubovány 18 h. (A) Buňky byly fixovány a obarveny specifickou protilátkou proti proteinu VP1. Ukázán je jeden konfokální řez. (B) Jaderný lyzát (NL) (připravený z  $8 \times 10^6$  buněk) a celobuněčný lyzát (WCL) (připravený z  $4 \times 10^6$  buněk) byly připraveny pomocí RIPA pufru pro porovnání množství proteinu v rozpustné (s) a nerozpustné (p) frakci. Lyzáty byly rozděleny na SDS-PAGE, přeneseny na membránu a protein VP1 byl detekován specifickou protilátkou. Hodnoty markeru molekulových vah jsou uvedeny v kilo Daltonech. Dráhy 1 a 2 – jaderný lyzát, dráhy 3 a 4 – celobuněčný lyzát. Liché dráhy reprezentují nerozpustné frakce (p) a sudé dráhy rozpustné frakce (s) proteinu VP1.

Jaderný i celobuněčný lyzát byl rozdělen na 3 – 12 % gradientovém gelu. Po obarvení separovaných komplexů Coomassie blue bylo detekováno mnoho proužků po celé délce separačního gelu u celobuněčného lyzátu, zatímco u jaderného lyzátu bylo detekováno pouze pár velmi slabých pruhů (obr. 18 A). Nicméně, po přenesení separovaných lyzátů na membránu bylo specifickou protilátkou proti proteinu VP1 detekováno několik proužků pozitivních na VP1 v jaderném lyzátu a navíc bylo nalezeno také několik komplexů pozitivních na VP1 vyskytujících se pouze v cytoplasmě. V jaderném lyzátu se protein VP1 nacházel především v komplexu svou molekulovou vahou odpovídajícímu VP1 pentameru (přibližně 240 kDa) (obr. 18 B, dráha 1, označen hvězdičkou) a v komplexech s vyšší molekulovou vahou (300, 600 a 720 kDa) (obr. 18 B, dráha 1). V celobuněčném lyzátu byl VP1 pozitivní proužek o molekulové váze přibližně 240 kDa, patrně představující VP1 pentamer, mnohem slabší než v jaderném lyzátu. Naopak, VP1 komplex o molekulové váze 300 kDa byl zastoupen daleko více v celobuněčném lyzátu než v jaderném. Také v porovnání s jaderným lyzátem, proporcionální zastoupení VP1 komplexu s molekulovou vahou 1000 kDa a větší bylo vyšší (obr. 18 B, dráha 3, pruhy označeny hvězdičkou). Protein Hsp 70 byl detekován v komplexech VP1 proteinu, které vykazovaly vyšší proporcionální zastoupením v celobuněčném lyzátu oproti jadernému lyzátu (obr. 18 C, dráha 2, komplexy jsou označeny šipkou, monomer proteinu Hsp 70 hvězdičkou). Z těchto dat vyplývá, že protein VP1 transientně exprimovaný v buňkách tvoří podobné komplexy s proteiny z rodiny

heat shock proteinu 70 jako v buňkách infikovaných. I když interakce mezi proteinem VP1 a rodinou proteinu Hsp 70 byly popsány již dříve, pomocí separace proteinových komplexů metodou BN-PAGE jsme ukázali přítomnost několika odlišných forem VP1–Hsp 70 komplexů v infikovaných buňkách a v buňkách transientně exprimujících protein VP1.



**Obr. 18. V buňkách transientně produkující protein VP1 se vyskytují stejné proteinové komplexy jako v buňkách infikovaných.** Buňky linie NIH 3T3 byly transfekovány plazmidem pVP1 a inkubovány 18 h. (A) Proteinové lyzáty transfekovaných (T) a netransferovaných (N) buněk byly separovány (15  $\mu$ g) 3 – 12 % gradientovým gelem a proteinové komplexy byly vizualizovány "SimplyBlue SafeStain". (B) proteinové lyzáty (5  $\mu$ g) byly separovány, rozdělené proteiny byly přeneseny na membránu a protein VP1 byl detekován specifickou protilátkou. Převládající proužky jsou označeny hvězdičkou (\*). Dráha 1 – jaderný lyzát transfekovaných buněk, dráha 2 - jaderný lyzát netransfekovaných buněk, dráha 3 – celobuněčný lyzát transfekovaných buněk, dráha 4 – celo-buněčný lyzát netransfekovaných buněk. (C) Celobuněčný lyzát (5  $\mu$ g – dráha 1, 60  $\mu$ g – dráha 2) byl separován, rozdělené proteiny byly přeneseny na membránu a protein VP1 (dráha 1) nebo Hsp 70 (dráha 2) byl detekována specifickou protilátkou proti proteinu VP1 nebo Hsp 70. Hvězdička označuje monomer proteinu Hsp 70 a šipky označují komplexy obsahující VP1 a Hsp 70. M – marker molekulových vah (v kilo Daltonech).

Žádný z komplexů obsahující protein VP1 nebyl zastoupen natolik, aby mohl být analyzován hmotnostní spektrometrií. Po obarvení separovaných komplexů infikovaných i transfekovaných buněk Coomassie blue bylo patrné pouze několik málo velmi slabých pruhů na silném pozadí. Je patrné, že celobuněčné lyzáty jsou natolik komplexní směsí, že jejich analýza

pomocí BN-PAGE je prakticky nemožná. Pro charakterizaci námi pozorovaných komplexů je nutné je před separací pomocí BN-PAGE zkoncentrovat.

Proto jsme se rozhodli protein VP1 fúzovat s kotvou pro afinitní chromatografii a komplexy proteinu VP1 a buněčných proteinů před samotnou separací pomocí BN-PAGE izolovat metodou afinitní chromatografie.

### **5.2.2. Studium interakcí hlavního kapsidového proteinu VP1 pomocí systému „Native pure affinity purification system“**

Jako kotvu jsme zvolili capTEV (dále v textu kotva uváděna jako BE kotva), která je součástí „Native pure affinity purification system“ od firmy Invitrogen. Tento systém je založený na metodě tandemové afinitní purifikace používané k izolaci nativních proteinových komplexů. Principem tohoto systému je vytvoření fúzního proteinu (C-koncová i N-koncová fúze) obsahujícího specifickou kotvu. Tato kotva se skládá z „BioEase Tag“, dvou TEV míst, HIS tag a V5 epitopu. BioEase Tag je peptid (72 ak) odvozený z C- konce  $\alpha$ -podjednotky oxalacetát dehydrogenázy bakterie *Klebsiella pneumoniae* a obsahuje jedno místo, které je v buňkách biotinylované. Tato doména je po fúzi s heterologním proteinem dostačující pro *in vivo* biotinylation rekombinantního proteinu a izolaci proteinových komplexů pomocí afinitní chromatografie (interakce avidin – biotin). TEV místa jsou rozeznávána a štěpena TEV (Tobacco Etch Virus) proteázou, která umožňuje uvolnění navázaného materiálu na afinitní matrix. HIS tag kotva slouží pro potencionální odstranění rekombinantního proteinu za denaturujících podmínek po izolaci komplexů afinitní chromatografií. V5 epitop je odvozen od V a P proteinu Paramyxoviru SV5. Fúzní protein může být v případě potřeby identifikován protilátkou proti tomuto epitopu. Výhodou celého systému je, že komplexy vznikají *in vivo*, tyto komplexy lze, po odštěpení TEV proteázou z chromatografické matrix, dále studovat jako celek (nativní elektroforéza) nebo jejich jednotlivé komponenty (SDS-PAGE).

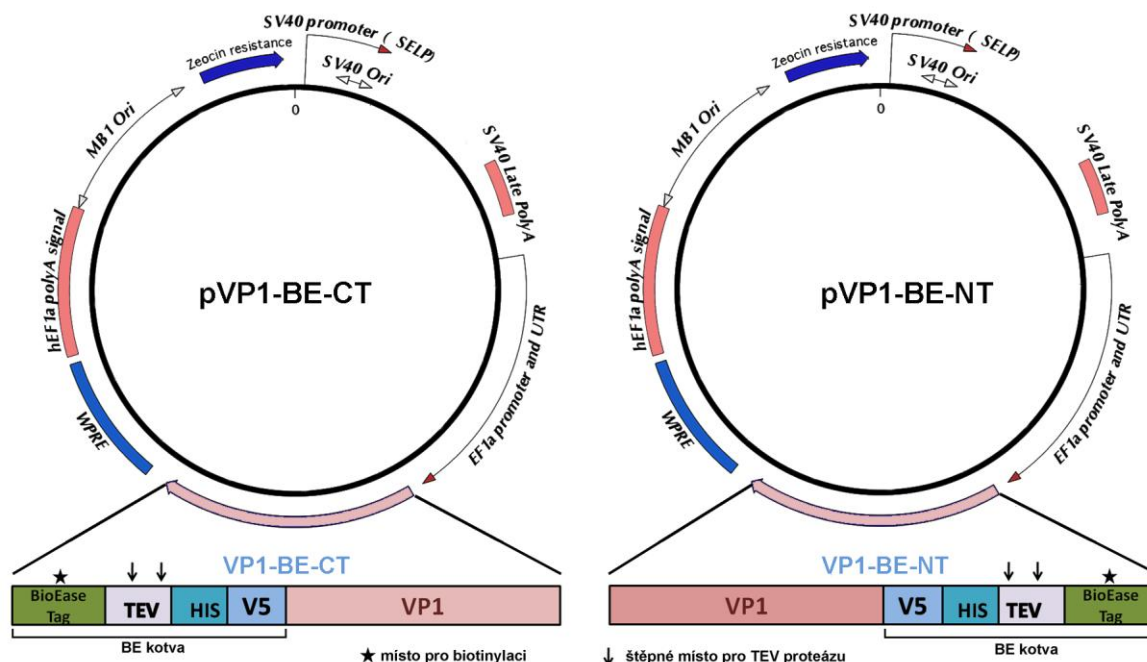
#### **5.2.2.1. Příprava vektorů pro expresi fúzních proteinů VP1-BE-NT a VP1-BE-CT a charakterizace těchto proteinů**

Sekvence proteinu VP1 byla vložena pomocí topoizomerázové reakce do plazmidu pENTR/D-TOPO. Z tohoto donorového plazmidu byl gen kódující protein VP1 přenesen pomocí LR rekombinace do plazmidu pcDNA3.2/capTEV-NT/V5-DEST nebo pcDNA3.2/capTEV-CT/VE-DEST (kap. 4.14.). Vzniklé plazmidy obsahují gen pro protein VP1 fúzovaný na svém N-konci (pcDNA3.2/VP1-BE-NT) nebo C-konci (pcDNA3.2/VP1-BE-CT) s BE kotvou a jsou pod kontrolou silného virového promotoru CMV. Plazmid pcDNA3.2/VP1-BE-NT nebo



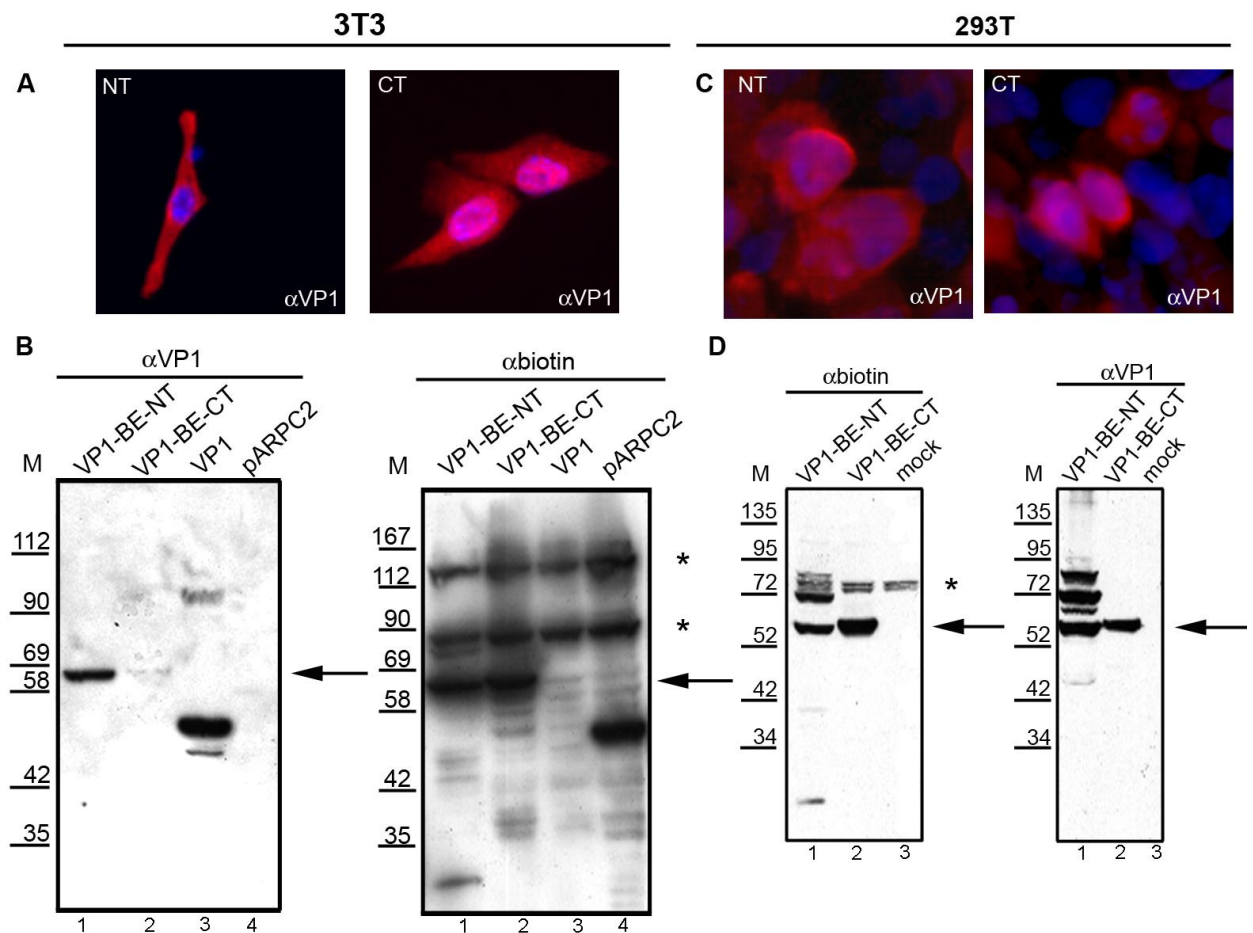
pcDNA3.2/VP1-BE-CT byl transfekován do buněk 3T3 a míra exprese fúzních proteinů byla ověřena pomocí imunofluorescence. Ukázalo se, že protein VP1-BE-NT je exprimován velmi málo (v méně než 1% buněk) a protein VP1-BE-CT nebyl vůbec detekován (neukázáno). Podobných výsledků exprese fúzních proteinů bylo dosaženo i při použití buněk linie 293T (neukázáno).

Vzhledem k tomu, že fúzní proteiny nebyly exprimovány, i když jejich geny byly pod kontrolou silného virového promotoru CMV, rozhodli jsme se sekvence kódující tyto proteiny překlónovat do plazmidu pGwf $\Delta$ ATG GFP (obr. 19). Tento expresní vektor obsahuje sekвени WPRE („woodchuck posttranscriptional regulatory element“) odvozenou od viru hepatitidy psouna (virus příbuzný viru hepatitidy B), která zajišťuje stabilizaci mRNA a pomáhá jejímu transportu ven z jádra. Vkládaný gen je v tomto plazmidu pod kontrolou silného eukaryotického promotoru proteinu EF1a (konstitutivní promotor elongačního proteinu 1 $\alpha$ ). Sekvence fúzních proteinů VP1-BE-CT a VP1-BE-NT byly vloženy pomocí topoizomerázové reakce do plazmidu pENTR/D-TOPO. Z tohoto donorového plazmidu byly geny kódující fúzní proteiny přeneseny pomocí LR rekombinace do plazmidu pGwf $\Delta$ ATG GFP (kap. 4.15.). Vzniklé plazmidy pVP1-BE-NT a pVP1-BE-CT byly transfekovány do buněk, exprese proteinu byla ověřena SDS-PAGE a lokalizace fúzního proteinu byla ověřena imunofluorescencí (obr. 20).



**Obr. 19. Schematické znázornění plazmidů pVP1-BE-NT a pVP1-BE-CT kódujících fúzní proteiny VP1-BE-NT a VP1-BE-CT.** Plazmidy obsahují expresní kazetu, která se skládá z eukaryotického promotoru proteinu EF1 $\alpha$ , vloženého genu, sekvence stabilizující mRNA a polyadenylačního signálu odvozeného od mRNA proteinu EF1 $\alpha$ . Dále plazmid obsahuje počátek replikace rozeznávaný v bakteriích (MB1 ori), sekvence zajišťující rezistenci k antibiotiku zeocin a sekvence odvozené od viru SV40 – počátek replikace (SV40 ori), promotor (SV40 promotor) a polyA sekvenci (SV40 Late PolyA). Fúzní proteiny VP1 obsahují místo pro biotinylnaci proteinu přímo v buňce (BioEase Tag), dvě cílová místa pro TEV proteázu (TEV), His tag kotvu (HIS), dovolující dodatečnou purifikaci proteinu, a V5 epitop pro snadnou detekci proteinu.

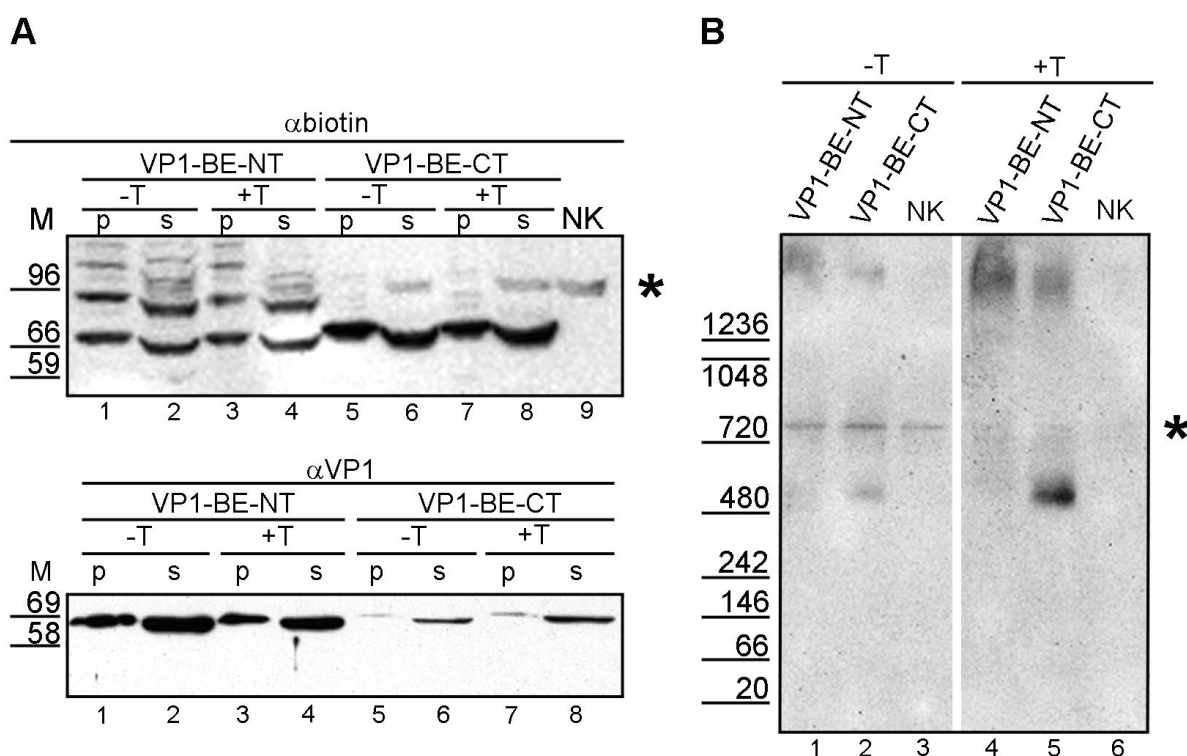
Fúzní proteiny byly exprimovány v buňkách linie 3T3 (myší fibroblasty) nebo 293T (lidské embryonální ledvinné buňky). Předpokládaná molekulová váha proteinu VP1-BE-NT je 57 kDa a proteinu VP1-BE-CT je 60 kDa. V buněčné linii 3T3 byly exprimovány oba fúzní proteiny (obr. 20 A a B), i když protein VP1-BE-CT byl exprimován ve velmi malém množství (obr. 20 B, dráha 1 versus dráha 2, značení protilátkou proti proteinu VP1), byl ale ve větší míře biotinylovaný (obr. 20 B, značení fúzních proteinů protilátkou proti proteinu VP1 versus protilátkou proti biotinu). V buněčné linii 293T byly exprimovány oba fúzní proteiny ve větším množství než v buněčné linii 3T3 (obr. 20 D versus B, detekce specifickou protilátkou proti proteinu VP1). Míra biotinylace byla stejná jako u buněčné linie 3T3, protein VP1-BE-CT byl biotinylován více (obr. 20 B a D). Fúzní proteiny vykazovaly v obou testovaných buněčných liniích stejnou subcelulární lokalizaci, vyskytovaly se jak v jádře i cytoplasmě (obr. 20 A a C). Protože míra exprese fúzních proteinů byla v buňkách linie 293T vyšší a jejich lokalizace a míra biotinylace se nelišily od stavu v buňkách linie 3T3, byly pro všechny další experimenty použity buňky linie 293T.



**Obr. 20. Charakterizace proteinů VP1-BE-NT a VP1-BE-CT.** Plazmid pVP1-BE-NT nebo pVP1-BE-CT byly transfekovány do buněk linie 3T3 (A a B) nebo 293T (C a D), fixovány po 30 h a protein VP1-BE-NT nebo VP1-BE-CT byl označen protilátkou proti proteinu VP1 (červeně) a DNA byla označena DAPI (modře) (A a C). B a D - Transfekované buňky byly lyzovány 30 h po transfekci a lyzát byl rozdělen na SDS-PAGE (10% gel), separované proteiny byly přeneseny na nitrocelulóзовou membránu a proteiny VP1-BE-NT a VP1-BE-CT byly označeny specifickou protilátkou proti VP1 nebo biotinu. B – Dráha 1 – lyzát buněk produkujících protein VP1-BE-NT, dráha 2 – lyzát buněk produkujících protein VP1-BE-CT, dráha 3 – lyzát buněk produkujících protein VP1, dráha 4 – lyzát buněk produkujících protein ARPC2 (obsahuje BE kotvu). D – dráha 1 - lyzát buněk produkujících protein VP1-BE-NT, dráha 2 – lyzát buněk produkujících protein VP1-BE-CT, dráha 3 – lyzát netransferovaných buněk. M – marker molekulových hmotností (v kilo Daltonech). Šipka označuje fúzní proteiny, hvězdička (\*) označuje buněčné proteiny, které jsou v buňkách přirozeně biotinylované.

Dále jsme testovali rozpustnost fúzních proteinů. Množství rozpustného fúzního proteinu VP1-BE-NT nebo VP1-BE-CT v lyzátu transfekovaných buněk (obr. 21 A) bylo podobné jako u buněk exprimujících protein VP1 (obr. 17 B, dráhy 3 a 4). Většina fúzního proteinu se nalézala v rozpustné frakci jak u buněk exprimujících protein VP1-BE-NT tak u buněk exprimujících protein VP1-BE-CT. Přítomnost detergentu v lyzačním pufru neměla zásadní vliv na rozpustnost fúzních proteinů (obr. 21 A). Nakonec jsme testovali schopnost fúzních proteinů tvořit komplexy. Lyzát transfekovaných buněk byl separován pomocí BN-PAGE na 3-12% gelu,

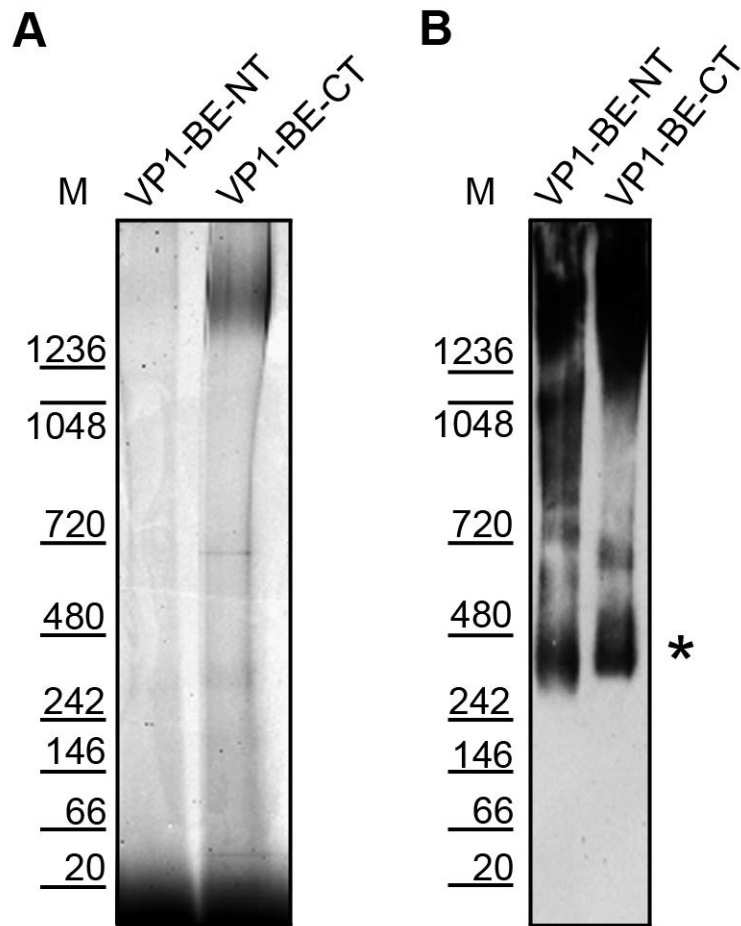
separované proteiny byly přeneseny na membránu a fúzní proteiny byly detekovány specifickou protilátkou proti biotinu (obr. 21 B). Oba dva fúzní proteiny jsme detekovali v komplexech o velikosti větší než 1 MDa a v komplexech o přibližné velikosti 500 kDa (obr. 21 B), tedy větších než je předpokládaná velikost pentameru. Předpokládaná velikost pentameru tvořeného fúzním proteinem VP1-BE-NT je 285 kDa a proteinem VP1-BE-CT je 300 kDa. V lyzátech připravených pomocí lyzačního pufru s detergentem (1% Triton X-100) se vyskytovalo větší množství fúzního proteinu (obr. 21 B), proto jsme dále lyzovali buňky pouze tímto lyzačním puforem.



**Obr. 21. Proteiny VP1-BE-NT i VP1-BE-CT tvoří v buňkách 293T komplexy.** Buňky linie 293T byly transfekovány plazmidy pVP1-BE-NT nebo pVP1-BE-CT a lyzovány 30h po transfekci. **A** – Transfekované buňky byly lyzovány v lyzačním pufru bez Tritonu X-100 (-T) nebo s Tritonem X-100 (+T) pro porovnání množství proteinu v rozpustné (s) a nerozpustné (p) frakci. Lyzáty byly rozděleny na SDS-PAGE, přeneseny na membránu a fúzní proteiny byly detekovány specifickou protilátkou proti proteinu VP1 nebo biotinu. Dráhy 1 – 4 – buňky transfekované plazmidem pVP1-BE-NT, dráhy 5 - 8 – buňky transfekované plazmidem pVP1-BE-CT. Dráha 9 – netransferované buňky. Liché dráhy reprezentují nerozpustné frakce (p) a sudé dráhy rozpustné frakce (s) fúzních proteinů. **B** - Transfekované buňky byly lyzovány v lyzačním pufru bez Tritonu X-100 (-T) nebo s Tritonem X-100 (+T) a separovány pomocí BN-PAGE (3-12% gel). Separované komplexy byly přeneseny na membránu a proteinové komplexy byly označeny specifickou protilátkou proti biotinu. Dráhy 1 a 4 - buňky transfekované plazmidem pVP1-BE-NT, dráhy 2 a 5 - buňky transfekované plazmidem pVP1-BE-CT, dráhy 3 a 6 - netransferované buňky. Hodnoty markeru molekulových vah jsou uvedeny v kilo Daltonech. Hvězdička (\*) označuje buněčné proteiny, které jsou v buňkách přirozeně biotinylované.

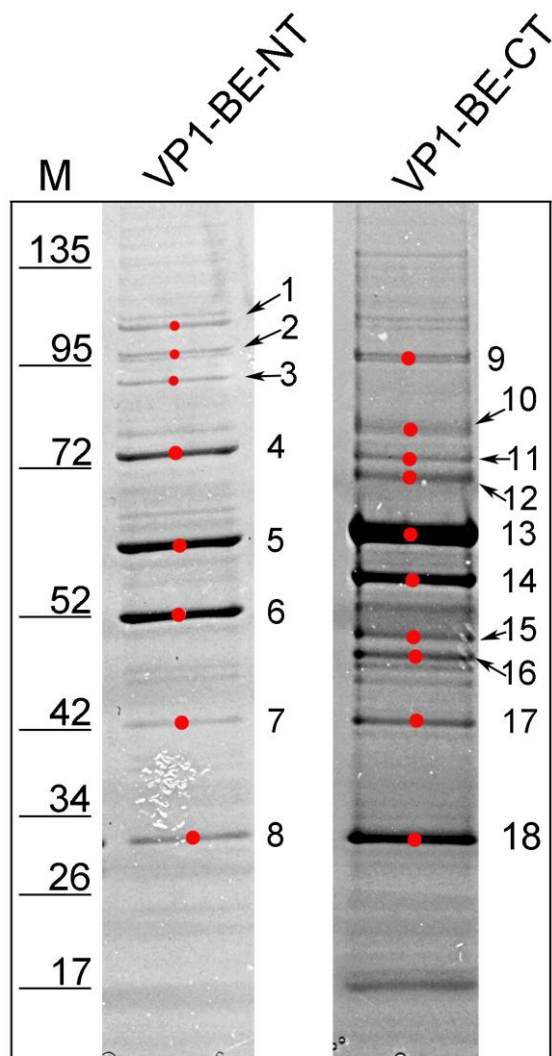
### **5.2.2.2. Izolace a charakterizace komplexů proteinů VP1-BE-NT nebo VP1-BE-CT s buněčnými proteiny.**

Proteinové komplexy byly z buněk izolovány afinitní chromatografií, z pevné matrix byly odštěpeny TEV proteázou a zahuštěny ultrafiltrací. Jedna pětina výsledného vzorku byla separována metodou BN-PAGE. Po obarvení separovaných komplexů Coomassie blue nebyly detekovány žádné proužky v dráze komplexů proteinu VP1-BE-NT a v dráze komplexů proteinu VP1-BE-CT pouze pár velmi slabých pruhů (obr. 22 A). Nicméně, po přenesení separovaných komplexů na membránu bylo specifickou protilátkou proti proteinu VP1 detekováno několik VP1 pozitivních proužků v dráze komplexů proteinu VP1-BE-NT i VP1-BE-CT (obr. 22 B). V obou drahách byly detekovány komplexy, které svou velikostí odpovídaly pentamerům daných fúzních proteinů (obr. 22 B, označeny hvězdičkou) a komplexy s vyšší molekulovou vahou. V dráze komplexů VP1-BE-NT byl detekován komplex s molekulovou vahou 720 kDa a dva difuzní pruhy, jeden o molekulové váze 800-1000 kDa a druhý s molekulovou vahou nad 1 MDa. V dráze komplexů proteinu VP1-BE-CT byl také detekován difuzní pruh s molekulovou vahou nad 1 MDa a také pruh o přibližné velikosti 700 kDa. Proužek o této velikosti byl detekován také barvením gelu Coomassie blue. Tento pruh byl analyzován hmotnostní spektrometrií, ale množství proteinu obsažené v tomto proužku bylo pod detekčním limitem této metody. Proto jsme se rozhodli složení komplexů analyzovat pomocí SDS-PAGE.



**Obr. 22. Komplexy proteinu VP1-BE-NT nebo VP1-BE-CT s buněčnými proteiny izolované z buněk 293T.** Proteinové komplexy byly izolovány afinitní chromatografií, štěpeny TEV proteázou a zahuštěny ultrafiltrací. Jedna pětina získaného vzorku byla separována metodou BN-PAGE (3-12% gel), separované proteiny byly vizualizovány „SimplyBlue SafeStain“ (A) nebo přeneseny na membránu a fúzní proteiny byly označeny specifickou protilátkou proti proteinu VP1 (B). M – marker molekulových vah (v kilo Daltonech), pentamery fúzních proteinů jsou označeny hvězdičkou (\*).

Zbytek vzorku byl zahuštěn ultrafiltrací na 20  $\mu$ l a separován SDS-PAGE 4-16% gradientovým gelem a separované proteiny byly obarveny Coomassie blue (obr. 23). Pruhy, které byly analyzovány hmotnostní spektrometrií, jsou označeny v obr. 23 a výsledek analýzy je shrnut v tabulce 2.



**Obr. 23. Proteiny obsažené v komplexech proteinu VP1-BE-NT nebo VP1-BE-CT s buněčnými proteiny izolované z buněk 293T.** Proteinové komplexy byly izolovány afinitní chromatografií, štěpeny TEV proteázou a zahuštěny ultrafiltrací. Čtyři pětiny získaného vzorku byly separovány SDS-PAGE (4-16% gel), separované proteiny byly vizualizovány „SimplyBlue SafeStain“. Proteiny označené červenou tečkou byly identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie. M – marker molekulových vah (v kilo Daltonech).

Ve vzorcích jsme našli hlavně proteiny VP1-BE-NT nebo VP1-BE-CT a TEV proteázu. Ukázalo se, že protein VP1-BE-CT je v buňkách ubiquitinylován, což s velkou pravděpodobností vede k jeho proteazomální degradaci. Dále jsme identifikovali buněčné proteiny Hsp 90 $\alpha$ , GAPDH a cytoskeletární keratin typ I. Ověření interakcí těchto buněčných proteinů s proteiny VP1-BE-CT a VP1-BE-NT jakožto i jejich případné zapojení v morfogenezi virionu a životním cyklu viru vyžaduje další zkoumání.

	proužek číslo	identifikace
<b>VP1-BE-NT</b>	1	VP1-BE-NT
	2	Hsp90A
	3	VP1-BE-NT
	4	VP1-BE-NT
	5	VP1-BE-NT, keratin, typ I cytoskeletal 9
	6	VP1-BE-NT, keratin, typ I cytoskeletal 9
	7	VP1-BE-NT, GAPDH
	8	TEV
<b>VP1-BE-CT</b>	9	Hsp90A, VP1-BE-CT-ubiquitin
	10	VP1-BE-CT-ubiquitin
	11	-
	12	VP1-BE-CT-ubiquitin
	13	VP1-BE-CT
	14	VP1-BE-CT
	15	VP1-BE-CT
	16	VP1-BE-CT
	17	VP1-BE-CT
	18	TEV

**Tabulka. 2. Proteiny identifikované pomocí hmotnostní spektrometrie obsažené v komplexech proteinu VP1-BE-NT nebo VP1-BE-CT s buněčnými proteiny.**



## **6. Diskuze**

## 6.1. Studium časné fáze infekce myšího polyomaviru

Endocytické dráhy využívané různými členy čeledi *Polyomaviridae* k jejich cestě do buněčného jádra byly a jsou velmi intenzivně studovány. Přesto je stále v pochopení mechanismů jejich pohybu řada mezer a výzkum byl provázen i řadou omylů. Problém je, že pouze malá frakce polyomavirů internalizovaných buňkou uspěje a dopraví svůj genom do buněčného jádra. Buňka svádí většinu virových částic na neproduktivní dráhy, které končí jejich likvidací. Metodami konfokální mikroskopie je tedy obtížné, často nemožné, produktivní dráhu vystopovat. Navíc, u některých virů (Sieczkarski a Whittaker, 2002, Leopold a Crystal, 2002) bylo zjištěno, že inhibuje-li se jejich produktivní dráha, viry zneužijí pro infekci nějakou alternativní možnost. V neposlední řadě, některé endocytické dráhy, jejich kompartmenty a možná propojení nebyly a dodnes nejsou dobře charakterizovány. Právě studium pohybu virů a např. bakteriálních toxinů pomáhá mezery ve znalostech endocytických mechanismů doplnit.

Tato práce navázala na naše předchozí studie pohybu myšího polyomaviru od buněčné membrány k jádru (viz kap. 2.10. Richterová et al., 2001, Mannová a Forstová, 2003). Pokusili jsme se dořešit otázku váčků, kterými vstupují viriony MPyV do buněk. Pomocí dominantně negativních mutant Eps15 jsme potvrdili, že MPyV pro svou internalizaci klatrinem obalené váčky nevyužívá, na rozdíl od JC viru (Pho et al., 2000) a v souladu s SV40 (Damm et al., 2005). Dále nás zajímala role kaveolinu 1 v internalizaci MPyV. Pozorování živých buněk ukazovalo na to, že MPyV je internalizován jak ve váčcích obsahujících kaveolin 1 tak i ve váčcích tento protein neobsahujících. To, že MPyV efektivně vstupuje do buněk nezávisle na kaveolinu 1 jsme demonstrovali při infekci Jurkat buněk (neexprimují kaveolin 1, takže postrádají funkční kaveoly). MPyV byl těmito buňkami efektivně internalizován. Tato data naznačují, že internalizace MPyV není závislá na kaveolinu 1. Překvapující bylo, že neméně efektivně byl internalizován i virus SV40, který jsme do pokusu přibrali pro srovnání. Je však kaveolin 1 nezbytný pro produktivní infekci? Na to odpověděl pokus s genem pro dominantně negativní mutantu kaveolinu 1. Jeho exprese nezabránila produktivní infekci buněk MPyV. Podobných výsledků bylo současně dosaženo při studiu endocytózy viru SV40. Myší fibroblasty odvozené od myši neexprimující kaveolin 1 (kaveolin 1 „knokout“) byly tímto virem infikovány se stejnou efektivitou jako buňky kontrolní (Damm et al., 2005). Tato data naznačují, že buď kaveolinem 1 zprostředkovaná endocytóza může být součástí neproduktivní dráhy infekce nebo že váčky odvozené od kaveol jsou zastupitelné s váčky odvozenými od jiných membránových mikrodomén.

Dalším přínosem této práce je důkaz, že MPyV je transportován do časných endozomů, že tento transport je závislý na dráze závislé na GTPáze Rab 5 a že průchod časnými endozomy

je důležitý pro produktivní infekci. Efektivita infekce byla značně snížena u buněk produkujících dominantně negativní mutantu GTPázy Rab 5. Zajímavým momentem těchto výsledků je, že naznačují propojení této cesty s endocytickou drahou vycházející z klatrinových váčků, která jde přes časné endozomy do pozdních a recyklujících endozomů. Tyto výsledky nebyly v souladu ani s pracemi o pohybu viru SV40 (Pelkmans et al., 2001), ani s pracemi o pohybu MPyV (Gilbert a Benjamin, 2000). V pozdější práci, Pelkmans et al. (2004) uváděli, že kavikly (váčky odvozené z kaveol bohaté na kaveolin 1) nesoucí viriony SV40 mohou fúzovat s časnými endozomy. Ukázali, že tento proces je závislý na GTPáze Rab5. Jakmile dojde k fúzi membrány kaviklu s membránou časného endozomu, vytvoří se subdomény bohaté na kaveolin 1, které se nemísí s okolní membránou. Po nějakém čase dojde k opětovnému spojení subdomén bohatých na kaveolin 1 a jejich oddělení v podobě váčku, který putuje dále buňkou. Zároveň ale tyto autoři deklarovali, že viriony, které jsou translokovány do časných endozomů, jsou ty, které nekončí produktivní infekcí. My jsme také pozorovali, že jak v buňkách infikovaných, tak i neinfikovaných, lze markery časných endozomů a kaveolin 1 detekovat jako subdomény jednotlivých endozomálních váčků. Tato pozorování tedy ukazují, že od kaveol odvozené váčky mohou fúzovat s časnými endozomy a tak může dojít i k transportu polyomavirů z váčků bohatých na kaveolin 1 do časných endozomů. O tom, jestli virus, který byl internalizován endocytickou drahou závislou na kaveolinu 1, bude dále transportován produktivní dráhou, mohou rozhodovat právě tyto translokace. Stejně tak ke stejnému propojení obou drah pravděpodobně dochází i u váčků, které kaveolin 1 neobsahují.

Pro správné fungování endozomů je důležité jejich pH. Proto nás zajímalo, jestli je kyselé pH endozomů důležité pro produktivní infekci. K alkalizaci endozomů jsme použili dvě látky – chlorid amonný a bafilomycin A1. Virus v podstatě ztratil infektivitu, pokud byly látky způsobující alkalizaci endozomů přítomny v médiu v čase vstupu viru do buňky a při časně fázi pohybu viru k jádru (2 h před infekcí a po adsorpci viru na povrch buněk). Pokud byly látky přidány v pozdějších časech po infekci (2 h a 4 h po infekci) k ovlivnění účinnosti infekce prakticky nedošlo. Z těchto výsledků plyne, že produktivní infekce myším polyomavirem u buněk linie 3T6 a NMuMG je závislá na pH endozomů. Toto naše zjištění bylo opět v přímém rozporu s prací Gilbertové a Benjamina (2000). Gilbertovou a Benjamina zajímalo, jestli MPyV při pohybu k jádru využívá buněčné kompartmenty s kyselým pH. Buňky linie NIH 3T3 a BMK (baby mouse kidney cells) inkubovali s chloridem amonným v koncentracích 1 mM, 5 mM, 10 mM a 25 mM. O těchto koncentracích je známo, že inhibují infektivitu virů, jejichž efektivita infekce je ovlivněna změnou pH endozomů (Marsh a Helenius 1989). U takto ošetřených buněk nemělo zvýšení pH endozomů vliv na míru infekce. Podle těchto autorů je tedy infekce nezávislá

na pH endozomů a myší polyomavirus k produktivní infekci nepotřebuje kyselé buněčné kompartmenty (Gilbert a Benjamin, 2000). Tento rozpor může být vysvětlen rozdílnou metodologií a vysokou multiplicitou infekce, která mohla učinit MPyV rezistentní k pH endozomů. Nicméně, naše výsledky byly později potvrzeny, mimo jiné prací autorů Qian et al. (2009). Dnes není pochyb o tom, že polyomaviry potřebují pro svou produktivní infekci kyselé pH endozomů.

Otázkou ale stále zůstává, k čemu přesně polyomaviry nízké pH endozomů potřebují. Kyselé prostředí endozomů může mít vliv na samotný virion. Může způsobit konformační změnu virové částice, která je nezbytná pro úspěšné infikování hostitelské buňky. Viry, které vstupují do buněk dráhou klatrinem zprostředkované endocytózy, využívají kyselé pH endozomů k uvolnění virionu z endozomu. Jedním z těchto virů je virus chřipky. Kyselé prostředí endozomů aktivuje  $M_2$  iontový kanál nacházející se v lipidovém obalu viru (Holsinger et al., 1994). Tato aktivace zapříčiní tok iontů dovnitř virionu, způsobí okyselení vnitřku virionu a naruší proteinové interakce mezi matrixovým proteinem  $M_1$  a ribonukleoproteiny (Hay 1992), mezi hemaglutininem a matrixovým proteinem  $M_1$  a způsobí konformační změnu hemaglutininu (Bron et al., 1993). Díky těmto změnám dojde k fúzi virového lipidického obalu s membránou endozomu a uvolnění ribonukleoproteinů do cytosolu. U papillomavirů bylo také pozorováno, že pro únik z časného endozomu je nepostradatelná konformační změna kapsidy, která je závislá na kyselém pH endozomů (Smith et al., 2008, Dabydeen a Meneses 2009). Kyselé pH endozomu má zřejmě vliv i na viriony myšího polyomaviru. Nízké pH v endozomu indukuje konformační změny proteinu VP1, vedoucí k destabilizaci kapsidy, která usnadňuje rozvolnění virionu v ER (Qian et al., 2009). Nedá se také vyloučit, že by se MPyV mohl uvolňovat z endozomů do cytoplazmy. Předpokládá se, že myristylovaný N-konec proteinu VP2 by mohl být schopen penetrovat membrány a mohl by se podílet na vstupu viru do buňky. Protein VP2 není lokalizován na povrchu virionu, proto aby mohl s membránou interagovat, musí se na povrch virionu dostat alespoň N-konec tohoto proteinu. Chen et al., (1998) navrhli na základě krystalografických dat, že by teoreticky bylo možné, aby se N-konec proteinu VP2 uvolnil z vnitřku virionu, aniž by došlo k úplné disociaci virionu. Protein VP2 je v dutině pentameru ukotven C-koncem pomocí hydrofobních interakcí. N-koncová část je flexibilní a proto by mohla být „vysunuta“ z pentameru ven, pokud dojde ke konformační změně proteinu VP1 tak, aby se vytvořil otvor ve VP1 pentameru. *In vitro* studie minoritních strukturních proteinů ukázaly, že posledních 35 C-koncových aminokyselin minoritních strukturních proteinů je schopno interagovat, narušovat a fúzovat membrány (nepublikované výsledky). Kyselé prostředí endozomů by mohlo způsobit konformační změny v uspořádání pentameru, mohlo by dojít

k jeho rozvolnění a uvolnění minoritních strukturních proteinů. Ty (ať už C-konec proteinů VP2 nebo VP3 nebo myristylovaný N-konec proteinu VP2) by pak mohly rozrušit membránu endozomu a tak by mohlo dojít k uvolnění virionu (nebo nucleocore) do cytoplazmy. Qian et al., (2009) sice nepřímou ukázali, že ke změně konformace v důsledku kyselého pH pravděpodobně dochází, ale lokalizaci proteinu VP2 v kapsidě nezkoumali, proto možnost uvolnění minoritních strukturních proteinů z kapsidy bude nutné dále studovat.

Narušení endozomálního pH může ovlivňovat transport endozomy, popřípadě třídění nákladu endozomu do specifických kompartmentů. Hypotézu o takovém třídění přináší práce Pelkmans et al. (2004). Cholera toxin a virus SV40 rozeznávají stejný receptor – gangliosid GM1, přesto jejich setkání s časným endozomem probíhá odlišně. Oba navázané na receptor putují v kaviklu a fúzí s časným endozomem. Po fúzi nedojde k samovolné difuzi proteinů vázaných v membráně váčků, proteiny jsou drženy v subdoménách tvořených kaveolinem 1. Kyselé pH v endozomu zapříčiní konformační změnu komplexu cholera toxin-GM1 (McCann et al., 1997) a tato změna může být dostačující pro difuzi receptoru z kaveolárních domén do membránových domén časných endozomů. Na rozdíl od toxinu cholery, kyselé pH endozomu nemá vliv na vazbu virus SV40-GM1, virus SV40 zůstává po oddělení váčků lokalizován v kaviklu a pokračuje dále do kaveozomu. Pokud dojde k alkalizaci endozomu, nedojde k uvolnění komplexu cholera toxin-GM1 z kaveolární subdomény. Autoři se domnívají, že podobnou cestou mohou být tříděny různé proteiny navázané na gangliosidy.

Kyselé prostředí může být důležité pro samotnou funkci endozomu. Pokud dojde ke zvýšení pH, časný endozom není schopen dopravit svůj náklad do dalších kompartmentů. Po aplikaci látek alkalizujících endozomy jsme pozorovali zadržení MPyV v časných endozomech. Zvýšení endozomálního pH u buněčné linie 3T6 mohlo ovlivnit maturaci časného endozomu, což mělo za následek hromadění MPyV v těchto kompartmentech a zastavení transportu. Z časných endozomů je náklad často transportován do ještě kyslejších kompartmentů, tzv. pozdních endozomů. Ve fixovaných buňkách nebyla pozorována lokalizace MPyV v pozdních endozomech (Mannová a Forstová, 2003). Nedávno však bylo pozorováno, při sledování pohybu MPyV v živých buňkách, že viriony pozdním endozomem procházejí. Toto pozorování bylo potvrzeno zjištěním, že dominantně negativní mutanta GTPázy Rab 7 (zabraňuje fúzi pozdního endozomu s ostatními váčky) výrazně redukovala infekci. Ošetření buněk bafilomycinem A1 však překvapivě transport virionů do pozdních endozomů neovlivnilo (Qian et al., 2009). V buňce existují dvě populace časných endozomů (Lakadamyali et al., 2006). Některé molekuly jsou transportovány do váčků nazývaných statické časné endosomy, zatímco jiné molekuly jsou transportovány do dynamických časných endozomů (Lakadamyali et al., 2006). Třídění MPyV

do dynamických endozomů může představovat cestu produktivní infekce, zatímco MPyV zadržený v statickém časném endozomu může být sveden na neproduktivní dráhu infekce. Ošetření buněk bafilomycinem A1 nebo chloridem amonným může vést k narušení tohoto třídění, kdy je virus přednostně transportován do statických časných endozomů, kde může být zadržován a identifikován i v pozdních fázích infekce. Dále nemůžeme také vyloučit vliv látek alkalizujících endosomy na různé buněčné linie.

Nakonec jsme pomocí metody FRET ukázali, že je MPyV v perinukleárním prostoru lokalizován v recyklujícím endozomu. Role tohoto buněčného kompartmentu v dopravě genomu MPyV do jádra je dosud neobjasněna. Dominantně negativní mutanta GTPázy Rab11 (zabraňuje fúzi tohoto endozomu s ostatními endosomy) nemá signifikantní vliv na efektivitu infekce MPyV (V. Žíla, nepublikované výsledky). Tento endozom by se tak mohl stát součástí neproduktivní dráhy infekce, mohl by sloužit jako „sběrné místo“ pro viriony, které z jakéhokoliv důvodu nebyly úspěšně transportovány produktivní drahou. Mohl by sem být cílen virus z váčků bohatých na kaveolin, který netranslokoval do časného endozomu, popřípadě i virus z časného endozomu, který nebyl transportován do endozomu pozdního.

Na základě těchto poznatků můžeme shrnout endocytickou dráhu vstupu MPyV do buněk takto: Virus je na povrchu buněk navázán na buněčný receptor a může být endocytován do hladkých váčků, z nichž některé mohou být odvozené od kaveol. Monopinocytické váčky (obsahující, či neobsahující kaveolin 1) mohou fúzovat s časnými endozomy a MPyV je tak transportován do časných endozomů, dále do pozdního endozomu a také do recyklujících endozomů. Jak se dostane virus z pozdního endozomálního kompartmentu do ER není jasné. V ER dochází k rozvolnění virionu a rozvolněný virion nebo nucleocore je transportován dosud neznámým mechanismem přímo do jádra nebo do cytosolu a odtud jaderným pórem do jádra. Jako zcela zásadní se pro produktivní infekci jeví tři děje – nasednutí na správný receptor, transport do endozomu (časného nebo pozdního) a transport do endoplazmatického retikula.

V závislosti na těchto současných poznatcích o endocytické dráze MPyV byl zcela revidován model vstupu viru SV40 do buněk (Engel et al., 2011). Podle současného modelu vstupuje virus SV40 do buněk receptorem zprostředkovanou endocytózou ve váčcích obsahujících kaveolin 1 i ve váčcích kaveolin 1 neobsahujících. Dále je transportován do časných a pozdních endozomů, efektivita infekce je závislá na kyselém pH endozomů. Z pozdního endozomu je transportován pomocí COPI váčků do endoplazmatického retikula. Zde dojde působením retikulárních proteinů k rozvolnění virionu a translokaci minichromozomu nebo rozvolněného virionu do jádra. Dříve popsaná dráha zahrnující transport viru váčky bohatými na kaveolin 1 do kaveozómu je pokládána za neproduktivní. Je zajímavé, že

kaveozómy, původně charakterizované jako organely s neutrálním pH, jsou nyní pokládány za pozdní endozomy (tedy váčky s kyselým pH), ve kterých je degradován kaveolin 1 (Engel et al., 2011, Hayer et al., 2010).

I když endocytická dráha některých zástupců čeledi *Polyomaviridae* je již víceméně charakterizována stále zůstává k dořešení otázka, jakým přesným mechanismem a zdali je virion transportován z pozdního endozomu do ER, z ER nebo z cytoplazmy do jádra nebo detailní charakterizace alternativní endocytické dráhy.

## **6.2. Studium interakcí strukturního proteinu VP1 MPyV v pozdních fázích infekce**

Jednou z dosud neobjasněných událostí v životním cyklu myšího polyomaviru je morfogeneze virionů. Jednotlivé proteinové komplexy vznikající v pozdních fázích polyomavirové infekce byly již izolovány a charakterizovány co do obsahu virových proteinů a buněčných histonů (Yuen a Consigli 1985). Řada pokusů o uspořádání virionů z virových komponent *in vitro*, skončila neúspěšně a je velmi pravděpodobné, že v procesu morfogeneze virionu hrají roli také buněčné proteiny, případně některý z časných virových antigenů. Proto se náš zájem soustřeďuje na identifikaci buněčných proteinů asociovaných s hlavním kapsidovým proteinem VP1 v pozdních fázích infekce. Jedním z přístupů tohoto studia je separovat prekurzory virionů a pokusit se je charakterizovat co do obsahu buněčných proteinů. Pro separaci proteinových komplexů vznikajících během procesu morfogeneze virionu jsme zvolili metodu modré nativní elektroforézy. Tato metoda byla původně vyvinuta pro separaci nekovalentně vázaných membránových proteinů mitochondrií. Rozlišení mitochondriálních multiproteinových komplexů separovaných metodou BN-PAGE je daleko vyšší než centrifugace v hustotním gradientu nebo separace gelovou filtrací (Schagger a von Jagow, 1991). Později byla tato metoda adaptována pro separaci celobuněčného lyzátu (Camacho-Carvajal et al., 2004) nebo jaderného lyzátu (Nováková et al., 2006). Separace pomocí BN-PAGE je v současnosti zavedena jako senzitivní metoda s vysokým rozlišením pro analýzu molekulové hmotnosti, homogenity a oligomerů nativních proteinů (Schagger et al., 1994).

Vzhledem k tomu, že morfogeneze virionu probíhá v jádře, rozhodli jsme se nejprve zaměřit na jaderné proteinové komplexy. Pro dobrou separaci proteinů touto metodou je důležitá jejich rozpustnost. Ukázali jsme, že rozpustnost hlavního kapsidového proteinu VP1 je v jaderné frakci velmi malá, nezávisle na koncentraci kyseliny 6-aminokapronové a přítomnosti detergentů. V jaderných lyzátech buněk transientně produkujících protein VP1 je rozpustnost tohoto proteinu daleko větší, zhruba 50% proteinu se nachází v rozpustné frakci. Předpokládá se, že v infikovaných buňkách asociuje virová DNA s jadernou matrix, kde probíhá replikace virové

DNA a morfogeneze virionu. Vznikají tak velké nukleoproteinové komplexy, které mohou být vazbou na jadernou matrix zadržovány v nerozpustné frakci. U buněk transientně produkujících protein VP1 s největší pravděpodobností k asociaci s DNA nedochází, tudíž se i víc proteinu nachází v rozpustné frakci.

Předpokládali jsme, že v průběhu morfogeneze vzniká virion postupně, tedy obalováním minichromozomu proteinem VP1 za postupného vzniku kapsidy. Dle tohoto modelu můžeme tedy usuzovat, že se v buněčném jádře kromě nukleoproteinových komplexů různé velikosti vyskytují i malé proteinové komplexy, kterým jejich velikost nebrání vstupu do separačního gelu. Bohužel se ukázalo, že proteinové komplexy izolované z jader infikovaných buněk tvořené proteinem VP1 nebyly schopny vstoupit do gelu. Důvodem mohlo být to, že protein VP1, ať specificky či nespecificky, vytvořil komplexy s virovou a pravděpodobně i buněčnou DNA. Tyto komplexy byly příliš velké (větší než 1 MDa) takže nebyly schopné vstoupit do separačního gelu, přestože koncentrace akrylamidu na počátku gradientového gelu byla pouze 4%. Formování komplexů pentamerů VP1 s DNA nebo VLPs s DNA byla již dříve popsána *in vitro* (Štokrová et al., 1999) a ve frakcích lyzátů infikovaných buněk separovaných metodou gelové filtrace obsahujících protein VP1 (Horníková, nepublikované výsledky). Pro alespoň částečné odstranění nukleové kyseliny z proteinových komplexů byly lyzáty infikovaných buněk ošetřeny DNázou I. Ukázalo se, že tento krok nebyl příliš účinný. Po separaci ošetřených lyzátů jsme detekovali specifickou protilátkou proti proteinu VP1 opět proteinové komplexy obsahující protein VP1 o velikosti větší než 1 MDa, a navíc také komplex o přibližné velikosti 440 kDa (obr. 14 Bb). Tento komplex však byl natolik slabě zastoupen, že se jej nepodařilo blíže charakterizovat. Svou elektroforetickou mobilitou odpovídá velikosti dvou pentamerů tvořených proteinem VP1, ale nedá se vyloučit i interakce s buněčnými proteiny. Je zřejmé, že velká část DNA je v komplexech s VP1 a dalšími proteiny (např. buněčnými histony) chráněna před štěpením DNázou I.

Rozhodli jsme se tedy použít k separaci celobuněčné lyzáty infikovaných buněk a také buněk transientně produkujících protein VP1. Povzbuzením byla práce Liu et al. (2009). Autoři v ní použili BN-PAGE v komparativní proteomice k identifikaci komplexů přítomných v buňkách s integrovaným genomem viru hepatitidy B. Separovali buněčné lyzáty HepG2 buněk a HepG2.2.15 buněk (buněčná linie jaterních buněk konstitutivně produkujících virus hepatitidy B z integrovaného virového genomu) a pozorovali dva pruhy specifické pro buněčnou linii HepG2.2.15. Oba pruhy obsahovaly komplexy, které byly tvořeny výhradně buněčnými proteiny, zahrnujícími také chaperony. Autoři ukázali, že některé identifikované proteinové komplexy jsou důležité pro replikaci viru.



U jaderných lyzátů z buněk transientně produkujících protein VP1 jsme nepozorovali, že by proteinové komplexy tvořené proteinem VP1 nebyly schopny vstoupit do separačního gelu. Detekovali jsme několik VP1 pozitivních komplexů. Podobně v celobuněčných lyzátech jak infikovaných buněk, tak buněk produkujících pouze protein VP1 bylo možno detekovat několik typů komplexů obsahujících protein VP1. Ve všech lyzátech (i u kontrolních buněk) bylo možno detekovat pomocí Coomassie blue velmi slabé pružky různých buněčných komplexů. Nepodařilo se však najít žádný, který by nebyl vidět též u kontrolních lyzátů původních (netransfekovaných a neinfikovaných) buněk. To, že proteinové komplexy v našem provedení BN-PAGE byly separovány, dokládá skutečnost, že jsme byly schopni detekovat různé komplexy buněčného proteinu Sp100 a také pomocí hmotnostní spektrometrie detekovat v jednom z více zastoupených proužků buněčných komplexů komplex ATPázy. Pokusili jsme se tedy pomocí specifických protilátek detekovat v komplexech obsahujících protein VP1 buněčné proteiny, o kterých bylo publikováno, že s proteinem VP1 interagují (pleiotropní buněčný regulátor YY1, virový časný antigen LT a buněčný chaperon Hsp 70). Protein YY1 se nám nepodařilo identifikovat ani v podobě monomeru. Tento protein se vyskytuje v buňkách ve velmi malém množství, pravděpodobně byl pod detekčním limitem této metody. Detekce velkého T antigenu narazila na nedostatečně silnou protilátku. Protein Hsp 70 byl nalezen jako součást několika komplexů obsahujících protein VP1, jak v celobuněčném lyzátu infikovaných buněk (obr. 16) tak i v lyzátech buněk transientně exprimujících protein VP1 (obr. 18).

Nalezli jsme několik komplexů o různé velikosti obsahujících protein VP1. Problém nastal při snaze zjistit, co tyto komplexy představují. Vznikají při morfogenezi virionu stejné meziprodukty jako při vzniku VLPs? V infikovaných buňkách vznikají viriony, v menší míře pseudoviriony a VLPs neobsahující DNA. U buněk transientně produkujících protein VP1 se dá očekávat vznik VLPs neobsahujících DNA a v menší míře vznik VLPs obsahujících DNA. Prakticky ve všech lyzátech jsme identifikovali komplex o velikosti 300 kDa (obr. 16 a 18; kromě jaderného lyzátu infikovaných buněk, ale i zde můžeme jeho existenci předpokládat), který obsahoval kromě proteinu VP1 také protein Hsp 70. Bylo popsáno, že chaperony z rodiny proteinu Hsp 70 asociují s proteinem VP1 neprodleně po jeho syntéze, zůstávají v komplexu s VP1 během formování pentameru a jsou transportovány spolu s pentamerem do buněčného jádra (Cripe et al., 1995). V práci Li et al. (2009) autoři usuzují na základě mutační analýzy, že vazba chaperonu Hsp 70 je důležitá pro správnou konformaci, stabilitu a transport VP1 pentameru viru SV40 do jádra. Předpokládají, že jedna molekula tohoto chaperonu se váže na N-konec proteinu VP1, druhá molekula na C-konec proteinu VP1 a třetí molekula na „core“ pentameru. Na této stabilizaci pentameru se kromě proteinu Hsp 70 podílí i další chaperony a pravděpodobně i velký

T antigen. (Li et al., 2009). Námi identifikovaný proteinový komplex o velikosti 300 kDa je tedy s největší pravděpodobností pentamer proteinu VP1 asociovaný s buněčným chaperonem Hsp 70, jehož vazba zajišťuje stabilizaci pentameru a jeho transport do jádra. Zde pravděpodobně dochází k disociaci proteinu Hsp 70 a pentameru, což má za následek hromadění VP1 pentamer (komplexů o molekulové hmotnosti 240 kDa; obr. 18) v buněčném jádře.

V celobuněčných lyzátech buněk transientně produkujících protein VP1 jsme také pozorovali velké VP1 pozitivní komplexy o molekulové hmotnosti větší než 1 MDa a obsahující protein Hsp 70 (obr. 18). Tyto komplexy se nevyskytovaly v celobuněčných lyzátech infikovaných buněk. V buňkách transientně produkujících protein VP1 (bez proteinů VP2, VP3 i bez LT) se tento protein nachází zřejmě díky slabému jadernému lokalizačnímu signálu ve velké míře i v cytoplasmě. Li et al. (2009) usuzují, že protein VP1 může mít díky nepřítomnosti velkého T antigenu problém se zaujmutím správné terciární konformace a proto i s transportem do buněčného jádra. V cytoplasmě může být protein VP1 rozeznáván celou řadou dalších buněčných chaperonů (např. Hsp 90) a může tak dojít ke vzniku velkých proteinových komplexů. Proporcionální zastoupení proteinu VP1 a Hsp 70 stejně jako přítomnost dalších virových anebo buněčných proteinů v komplexech detekovaných v infikovaných buňkách nebo v buňkách transientně exprimujících protein VP1, stejně jako jejich význam ve formování virionu budou předmětem dalšího studia.

Kromě komplexů proteinu VP1 u nichž byl detekován protein Hsp 70 se na BN-PAGE vyskytovaly další různě veliké komplexy obsahující protein VP1 avšak nikoliv protein Hsp 70. Tyto komplexy se vyskytovaly hlavně v lyzátech buněk transientně exprimujících protein VP1 a mohou tak představovat meziprodukty vzniku VLPs.

Žádný z námi detekovaných komplexů obsahující protein VP1 nebyl zastoupen natolik, aby mohl být analyzován hmotnostní spektrometrií. Po obarvení separovaných komplexů infikovaných buněk i buněk transientně produkujících protein VP1 Coomassie blue bylo patrné pouze několik málo velmi slabých pruhů na silném pozadí. Celkově lze shrnout, že metoda BN-PAGE, která se tak dobře uplatnila pro studium komplexu izolovaných mitochondrií, není vhodnou metodou pro studium tak komplexního systému jako je buněčné jádro nebo buňka. Metodu by jistě bylo možno použít po předchozí částečné purifikaci sledovaných komplexů.

Pro izolaci a charakterizaci virových komplexů jsme tedy zvolili nový přístup - metodu afinitní chromatografie. Jako vhodnou kotevní sekvenci jsme vybrali BE kotvu, která je součástí systému nabízeného firmou Invitrogen pod názvem „Native pure affinity purification system“.

Pro zajištění individuální exprese strukturních proteinů myšího polyomaviru byly testovány různé přístupy, zahrnující výběr různých promotorů, ale všechny vedly k prakticky

stejnému konci – malá, málo efektivní produkce strukturního proteinu v buňce. Důvody pro nízkou expresi jsou neznámé, ale mohou být přisuzovány regulaci na mnoha úrovních, jako je zrání pre-mRNA, transport z jádra, stabilita mRNA nebo translace proteinu (Acheson 1981, Barrett et al., 1995). Nicméně, jako efektivní přístup pro zvýšení množství individuálně exprimovaných minoritních strukturních proteinů v buňce se ukázala fúze sekvencí kódující strukturní minoritní proteiny se sekvencemi kódující protein GFP nebo FLAG ať už na N- nebo C-konci proteinu (Huerfano et al., 2010). Podobného výsledku zvýšení exprese bylo dosaženo fúzí sekvence proteinu VP1 se sekvencí GFP (Horníková, nepublikované výsledky). Proto jsme předpokládali, že fúze (N- nebo C-koncová) genu proteinu VP1 se sekvencí BE kotvy zajistí dostatečnou produkci fúzních proteinů. Překvapivě, i když geny pro fúzní proteiny VP1 byly pod kontrolou silného časného promotoru cytomegaloviru (CMV) exprese fúzních proteinů v buňkách byla velmi nízká. Proto jsme překlonovali sekvence fúzních proteinů do plazmidu pGwf (Buck et al., 2006). Gen vkládaný do tohoto plazmidu je pod kontrolou silného konstitutivně exprimovaného buněčného promotoru a zároveň tento plazmid obsahuje regulační sekvenci WPRE, která zajišťuje stabilitu a transport mRNA vkládaného genu z buněčného jádra do cytoplazmy. Tato regulační sekvence se používá pro posílení exprese transgenů u retrovirových vektorů, kde nezávisle na použitém promotoru může posílit expresi daného genu až osmkrát (Zufferey et al., 1999). Pozitivní vliv těchto regulačních sekvencí na míru exprese byl ukázán u individuální exprese proteinu VP1, jehož gen byl vložen do tohoto plazmidu (Tolstov et al., 2009).

Nejprve jsme provedli základní charakterizaci obou fúzních proteinů VP1-BE-CT a VP1-BE-NT. Protein VP1-BE-NT byl v buňkách exprimován velmi efektivně a byl lokalizován v jádře i buněčné cytoplazmě. Protein VP1-BE-CT byl v buňkách lokalizován také v jádře i v cytoplazmě, ale jeho exprese byla v porovnání s proteinem VP1-BE-NT daleko nižší. I když se protein VP1-BE-NT exprimoval daleko více než protein VP1-BE-CT, jeho míra biotinylace byla daleko nižší, než u proteinu VP1-BE-CT. Podobný rozdíl v efektivitě exprese byl pozorován i u fúzních proteinů VP1 s GFP, kdy fúzní protein VP1-GFP (C-koncová fúze) byl exprimován s daleko nižší účinností než fúzní protein GFP-VP1 (N-koncová fúze) (Horníková, nepublikované výsledky). Na rozdíl do minoritních strukturních proteinů, kde rozdíl v expresi N- a C-koncových fúzních proteinů pozorován nebyl (Huerfano et al., 2010). Připojení BE kotvy na N- konec ani na C-konec proteinu VP1 nemělo vliv na jejich schopnost tvořit komplexy.

Fúzní proteiny VP1 byly izolovány metodou afinitní chromatografie, zahuštěny ultrafiltrací a separovány BN-PAGE. Oba fúzní proteiny VP1 jsme izolovali ve formě pentameru a také jako součást velkých komplexů. Pro identifikaci buněčných proteinů obsažených v těchto

komplexech jsme izolované proteiny separovali pomocí SDS-PAGE a jednotlivé proteiny byly identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie. V dráze fúzního proteinu VP1-BE-NT jsme identifikovali protein VP1-BE-NT, buněčný chaperon Hsp 90 $\alpha$ , protein GAPDH a keratin typ I, cytoskeletal 9. V dráze fúzního proteinu VP1-BE-CT jsme našli protein VP1-BE-CT a buněčný chaperon Hsp 90 $\alpha$ . Oba dva fúzní proteiny VP1 byly identifikovány jako proužky o větší molekulové hmotnosti, než byla jejich předpokládaná. Nižší elektroforetická mobilita v gelu může být zapříčiněna posttranslačními modifikacemi proteinu. Detailní analýza forem proteinu VP1-BE-CT s nižší elektroforetickou mobilitou odhalila, že tyto formy tohoto proteinu jsou ubiquitinylované. Tato modifikace vede pravděpodobně k degradaci tohoto proteinu v buňce, čímž lze vysvětlit jeho nižší expresi oproti proteinu VP1-BE-NT. Připojení kotvy na C-konec proteinu VP1 neovlivňuje schopnost tvořit pentamery (byly detekovány), ale s velkou pravděpodobností má za následek to, že pentamery nejsou schopny interagovat mezi sebou. Protein se tak v buňce vyskytuje pouze ve formě pentamer, ty jsou pravděpodobně rozpoznávány jako protein se špatnou konformací, jsou označeny ubiquitinylací a degradovány v proteazomu. Rozdíl v míře exprese tak mezi N- a C-koncovou fúzí (GFP nebo BE kotva) patrně není na úrovni mRNA (ať už stability nebo transportu), ale je dán stabilitou daného proteinu.

U proteinu VP1-BE-NT ubiquitinylace nalezena nebyla, formy proteinu VP1-BE-NT s nižší elektroforetickou mobilitou pravděpodobně představují protein s posttranslačními modifikacemi. Protein VP1 je v buňkách hojně posttranslačně modifikovaný a v lyzátech infikovaných buněk připravených v pozdních fázích infekce bývají často detekovány formy proteinu VP1 o nižší elektroforetické mobilitě než je předpokládaná mobilita proteinu VP1 (Forstová et al., 1993). Tímto se fúzní protein VP1-BE-NT podobá proteinu VP1. Otázkou zůstává, v jaké formě je tento protein v buňkách přítomen. N-koncová fúze nezabraňuje tvorbě pentamer ani vzájemné interakci mezi pentamery. Teoreticky by tento protein mohl tvořit VLPs, ale daleko pravděpodobnější je, že tvoří útvary anebo agregáty, které připomínají rozvolněné VLPs. BE kotva je tak pravděpodobně orientována dovnitř tohoto útvaru, analogicky jako je N-konec proteinu VP1 orientován dovnitř virionu, a nemůže tak být efektivně biotinylovaná.

V drahách obou fúzních proteinů jsme detekovali buněčný chaperon Hsp 90 $\alpha$ . Tento protein je konstitutivně exprimovaný v eukaryotických buňkách a představuje 1% veškerého cytosolického proteinu (Welch a Feramisco 1982). Působí jako chaperon, rozeznává proteiny se špatnou konformací a zabraňuje nevratné agregaci proteinu během zaujmutí nativní konformace (Wiech et al., 1992, Freeman a Morimoto, 1996). Interaguje s celou řadou dalších chaperonů (Li et al., 2012); tyto chaperonové komplexy pomáhají svým cílovým proteinům zaujmout správnou konformaci nebo je cílí k degradaci (Theodoraki a Caplan, 2012). Oba dva fúzní proteiny VP1

jsou pravděpodobně rozpoznávány tímto chaperonem, ale jejich osud je zdá se odlišný. Zatímco VP1-BE-CT je rozpoznán jako protein se špatnou konformací a je určen k degradaci, role chaperonu Hsp 90 u proteinu VP1-BE-NT je pravděpodobně jiná. Mohl by zde zabraňovat agregaci proteinu a podporovat jeho správnou konformaci. Přítomnost tohoto chaperonu, jeho role v tvorbě VLPs a virionů stejně jako jeho účast v životním cyklu MPyV si vyžaduje další zkoumání. V analýze komplexů touto metodou se pokračuje i nadále.

## **7. Závěry**

Výsledky prezentované v této dizertační práci lze shrnout do následujících bodů.

**Prvním cílem této práce bylo blíže charakterizovat endocytickou dráhu, kterou MPyV využívá k dopravě genomu do ER.**

- Ukázali jsme, že funkční kaveoly nejsou nezbytné pro internalizaci ani pro efektivní infekci MPyV.
- MPyV při vstupu do buňky využívá časné endozomy. Pro produktivní infekci je nepostradatelné kyselé pH endozomů. Zabránění vstupu viru do časného endozomu (dominantně negativní mutanta GTPázy Rab 5) nebo alkalizace endozomů (chloridem amonným nebo bafilomycinem A1) vede k drastickému snížení infekтивности MPyV.
- Alkalizace endozomů vede k zadržování virionů v časných endozomech, což naznačuje, že virus je dále transportován do pozdního endozomu.
- MPyV je v perinukleárním prostoru lokalizován v recyklujícím endozomu, tento endozom je však pravděpodobně součástí neproduktivní dráhy infekce.

**Druhým cílem této práce bylo vyzkoušet a optimalizovat metody pro charakterizaci komplexů hlavního kapsidového proteinu VP1 s buněčnými proteiny a pokusit se nalézt nové potencionálně s VP1 interagující buněčné proteiny.**

- Optimalizovali jsme metodu modré nativní elektroforézy pro separaci jaderných a celobuněčných lyzátů infikovaných buněk i buněk transientně produkujících protein VP1.
- Pomocí BN-PAGE jsme našli několik proteinových komplexů obsahujících protein VP1. Některé tyto proteinové komplexy obsahovaly buněčný protein Hsp 70. I když interakce mezi proteinem VP1 a Hsp 70 byla popsána již dříve, toto je poprvé, kdy bylo detekováno několik odlišných forem VP1-Hsp 70 komplexu.
- Byly připraveny plazmidy umožňující expresi proteinu VP1 fúzaného na N- nebo C-konci s kotvou BioEase Tag (Invitrogen), která umožňuje biotinylation fúzního proteinu a jeho následnou izolaci afinitní chromatografií
- Fúzní proteiny VP1-BE-NT a VP1-BE-CT byly izolovány afinitní chromatografií. Izolované komplexy byly analyzovány BN-PAGE, dále byly separovány SDS-PAGE a jednotlivé proteiny v komplexech byly identifikovány hmotnostní spektrometrií.
- Interakce identifikovaných buněčných proteinů (Hsp 90 $\alpha$ , GAPDH, keratin typI, cytoskeletal 9) a analýza dalších, které bude nutno pro jejich identifikaci izolovat ve větších množstvích, je v současné době předmětem výzkumu.

## **8. Použitá literatura**



- Acheson, N. H.** (1978): Polyoma gigant RNAs contain tandem repeats of the nucleotide sequence of the entire viral genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:4754-4758
- Acheson, N. H.** (1981): Efficiency of processing of viral RNA during the early and late phases of productive infection by polyoma virus. *J. Virol.* 37:628–635.
- Allander, T., Andreasson, K., Gupta, S., Bjerkner, A., Bogdanovic, G., Persson, M. A., Dalianis, T., Ramqvist, T., Andersson, B.** (2007): Identification of a third human polyomavirus. *J. Virol.* 81:4130-6
- Anderson, H. A., Chen, Y., Norkin, L. C.** (1996): Bound simian virus 40 translocates to caveolin-enriched membrane domains, and its entry is inhibited by drugs that selectively disrupt caveolae. *Mol. Biol. Cell* 7:1825-1834
- Anderson, H. A., Chen, Y., Norkin, L. C.** (1998): MHC class I molecules are enriched in caveolae but do not enter with simian virus 40. *J. Gen. Virol* 79:1469-1477
- Ashok, A., Atwood, W. J.** (2003): Contrasting roles of endosomal pH and the cytoskeleton in infection of human Glial cells by JC virus and Simian virus 40. *J. Virol* 77:1347-1356
- Atchison, L., Ghias, A., Wilkinson, F., Bonini, N., Atchison, M. L.** (2003): Transcription factor YY1 functions as a PcG protein *in vivo*. *EMBO Journal* 22: 1347-1358
- Atwood, W. J., Norkin, L. C.** (1989): Class I major histocompatibility proteins as cell surface receptors for simian virus 40. *J. Virol.* 63:4474-4477
- Barouch, D. H., Harrison, S. C.** (1994): Interactions among the major and minor coat proteins of polyomavirus. *J. Virol* 68:3982 – 3989
- Barrett, N. L., Li, X., Carmichael, G. G.** (1995): The sequence and context of the 5' splice site govern the nuclear stability of polyomavirus late RNAs. *Nucleic. Acids. Res.* 23: 4812–4817
- Benmerah, A., Bayrou, M., Cerf-Bensussan, N., Dautry-Varsat, A.** (1999): Inhibition of clathrin-coated pit assembly by an Eps15 mutant. *J. Cell Sci.* 112:1303–1311.
- Benmarah, A., Lamaze, C., Begue, B., Schmid, S. L., Dautry-Varsat, A., Cerf-Bensussan, N.** (1998): AP-2/Eps15 interaction is required for receptor-mediated endocytosis. *J. Cell Biol.* 140:1055–1062.
- Bird, G., O'Donnell, M., Moroianu, J., Garcea, R. L.** (2008): Possible role for cellular karyopherins in regulating polyomavirus and papillomavirus capsid assembly. *J. Virol.* 82:9848-9857
- Bolen, J.D., Anders, D.G., Trampy, J., Consigli, R.A.** (1981): Differences in the subpopulations of the structural proteins of polyoma virions and capsids: biological functions of the VP1 species. *J. Virol* 37:80-91
- Bradford, M. M.** (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Brady, J. N., Wihnstun, V. D., Consigli, R. A.** (1977): Dissociation of polyoma virus by chelation of calcium ions found associated with purified virions. *J. Virol* 23:717 – 724
- Breau, W. C., Atwood, W. J., Norkin, L. C.** (1992): Class I major histocompatibility proteins are essential component of the simian virus 40 receptor. *J. Virol* 66:2037-2045
- Bron, R., Kendal, A. P., Klenk, H-D., Wilshut, J.** (1993): Role of M2 protein in influenza virus membrane fusion: Effects of amantadine and monensin on fusion kinetics. *Virology* 195:808-811
- Buck, C. B., Day, P. M., Thompson, C. D., Lubkowski, J., Lu, W., Lowy, D. R., Schiller, J. T.** (2006): Human alpha-defensins block papillomavirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 103:1516-21
- Cahan, L. D., Singh, R., Paulson, J. C.** (1983): Sialyloligosaccharide receptors of binding variants of polyoma virus. *Virology* 130:281-289
- Cai, X., Chang, D., Rottinghaus, S., Consigli, R. A.** (1994): Expression and purification of recombinant polyomavirus VP2 protein and its interactions with polyomavirus proteins. *J. Virol.* 68:7609-13.
- Camacho-Carvajal, M. M., Wollscheid, B., Aebersold, R., Steimle, V., Schamel, W. W. A.** (2004): Two-dimensional blue native/SDS gel electrophoresis of multi-protein complexes from whole cellular lysates. *Mol. Cell. Proteomics* 3:176–182
- Carbone, M., Ascione, G., Chichiarelli, S., Garcia, M., Eufemi, M., Amati, P.** (2004): Chromosome-protein interactions in polyomavirus virions. *J. Virol* 78:513 – 519
- Carbone, M., Reale, A., Di Sauro, A., Sthandier, O., Garcia, M.I., Maione, R., Caiafa, P., Amati, P.** (2006): PARP-1 interaction with VP1 capsid protein regulates polyomavirus early gene expression. *J. Mol. Biol.* 363:773-785
- Carswell, S., Alwine, J. C.** (1986): Simian virus 40 agnoprotein facilitates perinuclear-nuclear localization of VP1, the major capsid protein. *J. Virol.* 60: 1055-1061

- Caruso, M., Belloni, L., Sthandier, O., Amati, P., Garcia, M.I.** (2003):  $\alpha 4\beta 1$  integrin acts as a cell receptor for murine polyomavirus at the postattachment level. *J. Virol* 77:3913-3921
- Clever, J., Dean, D., Kasamatsu, H.** (1993): Identification of a DNA binding domain in simian virus 40 capsid proteins Vp2 and Vp3. *J Biol Chem.* 268: 20877-83.
- Cole, C. N., Conzen, S. N.** (2001): Polyomaviridae: The Viruses and Their Replication. In: Knipe, D. M., Howley, P. M. (eds.): *Fields Virology 2*. Fourth edition, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia
- Cook, A., Bono, F., Jinek, M., Conti, E.** (2007): Structural biology of nucleocytoplasmic transport. *Annu. Rev. Biochem.* 76:647-671
- Cripe, T. P., Delos, S. E., Estes, P. A., Garcea, R. L.** (1995): In vivo and in vitro association of hsc70 with polyomavirus capsid proteins. *J Virol.* 69(12):7807-7813
- D'Amours, D., Desnoyers, S., D'Silva, I., Poitier, G. G.** (1999): Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem. J.* 342:249-268
- Dabydeen, S. A., Meneses, P. I.** (2009): The role of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  and cysteine proteases in Human Papillomavirus type 16 infection. *Virology* 393:109-119.
- Damm, E. M., Pelkmans, L., Kartenbeck, J., Mezzacasa, A., Kurzchalia, T., Helenius, A.** (2005): Clathrin- and caveolin-1-independent endocytosis: entry of simian virus 40 into cells devoid of caveolae. *J. Cell. Biol.* 168:477-88
- Daniels, R., Rusan, N. M., Wadsworth, P., Hebert, D. N.** (2006): SV40 VP2 and VP3 insertion into ER membranes is controlled by the capsid protein VP1: implications for DNA translocation out of the ER. *Mol. Cell* 24:955-966.
- Delos, S. E., Montross, L., Moreland, R. B., Garcea, R. L.** (1993): Expression of the polyomavirus VP2 and VP3 proteins in insect cells: coexpression with the major capsid protein VP1 alters VP2/VP3 subcellular localization. *Virology* 194:393-8
- Eash, S., Querbes, W., Atwood, W. J.** (2004): Infection of Vero cells by BK virus is dependent on caveolae. *J. Virol* 78(21):11583-11590
- Feng, H., Shuda, M., Chang, Y., Moore, P. S.** (2008): Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science* 319:1096-1100
- Forstová, J., Krauzewicz, N., Sandig, V., Elliott, J., Palková, Z., Strauss, M., Griffin, B. E.** (1995): Polyoma virus pseudocapsids as efficient carriers of heterologous DNA into mammalian cells. *Hum. Gene Ther.* 6:297-306
- Forstova, J., Krauzewicz, N., Wallace, S., Street, A.J., Dilworth, S.M., Beard, S., Griffin, B.E.** (1993): Cooperation of structural proteins during late events in the life cycle of polyomavirus. *J. Virol.* 67, 1405–1413.
- Freeman, B. C., Morimoto, R. I.** (1996): The human cytosolic molecular chaperones hsp90, hsp70 (hsc70) and hdj-1 have distinct roles in recognition of a non-native protein and protein refolding. *EMBO J.* 15:2969-79
- Fried, H., Cahan, L. D., Paulson, J. C** (1981): Polyoma virus recognizes specific sialyloligosaccharide receptors on host cells. *Virology* 109:188-192
- Garcea, R. L., Ballmer – Hofer, K. Benjamin, T. L.** (1985): Virion assembly defect of polyomavirus hr-t mutants: underphosphorylation of major capsid protein VP1 before viral encapsidation. *J. Virol.* 54: 311 - 316
- Garcea, R. L., Benjamin, T. L.** (1983): Isolation and characterization of polyoma nucleoprotein complexes. *Virology* 130:65-75
- Garcia, M.-I., Perez, M., Caruso, M., Sthandier, O., Ferreira, R., Cermola, M., Macchia, C., Amati, P.** (2000): A mutation in the DE loop of the VP1 protein that prevents polyomavirus transcription and replication. *Virology* 272:293-301
- Gardner, S. D., Field, A. M., Coleman, D. V., Hulme, B.** (1971): New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet* 1:1253-1257
- Gaynor, A. M., Nissen, M. D., Whiley, D. M., Mackay, I. M., Lambert, S. B., Wu, G., Brennan, D. C., Storch, G. A., Sloots, T. P., Wang, D.** (2007): Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. *PLoS Pathog.* 4:e64.
- Gendron, D., Delbecchi, L., Bourgaux-Ramoisy, D., Bourgaux, P.** (1996): An enhancer of recombination in polyomavirus DNA. *J. Virol* 70(7):4748-4760
- Gilbert, J. M., Benjamin, T. L.** (2000): Early steps of polyomavirus entry into cells. *J. Virol* 74(18):8528-8588

- Gilbert, J. M., Benjamin, T. L.** (2004): Uptake pathway of polyomavirus via ganglioside GD1a. *J. Virol* 78(22):12259-12267
- Gilbert, J. M., Goldberg, I. G., Benjamin, T. L.** (2003): Cell penetration and trafficking of polyomavirus. *J. Virol* 77(4):2615-2622
- Gilbert, J., Ou, W., Silver, J., Benjamin, T.** (2006): Downregulation of protein disulfide isomerase inhibits infection by the mouse polyomavirus. *J. Virol.* 80:10868-10870.
- Gillock, E. T., Rottinghaus, S., Chány, D., Cai, X., Smiley, S. A., An, K., Consigli, R. A.** (1997): Polyomavirus major capsid protein VP1 is capable of packaging cellular DNA when expressed in the baculovirus system. *J. Virol* 71:2857-2865
- Gordon-Shaag, A., Ben-Nun-Shaul, O., Kasamatsu, H., Oppenheim, A. B., Oppenheim, A.** (1998): The SV40 capsid protein VP3 cooperates with the cellular transcription factor Sp1 in DNA-binding and in regulating viral promoter activity. *J Mol Biol.* 275(2):187-195
- Gordon-Shaag, A., Ben-Nun-Shaul, O., Roitman, V., Yosef, Y., Oppenheim, A.** (2002): Cellular transcription factor Sp1 recruits simian virus 40 capsid proteins to the viral packaging signal, *in vivo*. *J Virol* 76(12):5915-5924
- Gorlich, D., Vogel, F., Mills, A. D., Hartmann, E., Laskey, R. A.** (1995): Distinct functions for the two importin subunits in nuclear protein import. *Nature* 377:246-248
- Gross, L.** (1953): A filterable agent, recovered from Ak leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 83:414-21
- Guo, B., Odgren, P. R., van Wijnen, A. J., Last, T. J., Nickerson, J., Pentan, S., Lian, J. B., Stein, J. L., Stein, G. S.** (1995): The nuclear matrix protein NMP-1 is the transcription factor YY1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:10526-10530
- Hartl, F. U., Hayer-Hartl, M.** (2002): Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295(5561):1852-1858
- Hay, A. J.** (1992): The action of adamantanamines against influenza A viruses: Inhibition of the M<sub>2</sub> ion channel protein. *Semin Virol* 3:21-30
- Hayer, A., Stoeber, M., Ritz, D., Engel, S., Meyer, H. H., Helenius, A.** (2010): Caveolin-1 is ubiquitinated and targeted to intraluminal vesicles in endolysosomes for degradation. *J. Cell. Biol.* 191:615-29
- Hodel, M. R., Corbett, A. H., Hodel, A. E.** (2001): Dissection of a nuclear localization signal. *J. Biol. Chem.* 276:1317-1325
- Holsinger, L. J., Nichani, D., Pinto, L. H., Lamb, R. A.** (1994): Influenza A virus M<sub>2</sub> ion channel protein: A structure - function analysis. *J. Virol* 68:1551-1563
- Huerfano, S., Žíla, V., Bouřa, E., Španielová, H., Štokrová, J., Forstová, J.** (2010): Minor capsid proteins of mouse polyomavirus are inducers of apoptosis when produced individually but are only moderate contributors to cell death during the late phase of viral infection. *FEBS J.* 277:1270-83
- Chang, D., Cai, X., Consigli, R. A.** (1993): Characterization of the DNA binding properties of polyomavirus capsid proteins. *J. Virol.* 67, 6327–6331.
- Chang, D., Haynes, J. I., Brady, J. N., Consigli, R. A.** (1992a): The use of additive and subtractive approaches to examine the nuclear localization sequence of the polyomavirus major capsid protein VP1. *Virology* 189:821-7
- Chang, D., Haynes, J. I., Brady, J. N., Consigli, R. A.** (1992b): Identification of a nuclear localization sequence in the polyomavirus capsid protein VP2. *Virology.* 191:978-83.
- Chen, L., Fluck, M.** (2001): Kinetic analysis of the steps of the polyomavirus lytic cycle. *J. Virol* 75(18):8368-8379
- Chen, X. S., Stehle, T., Harrison, S. C.** (1998): Interaction of polyomavirus internal protein VP2 with the major capsid protein VP1 and implications for participation of VP2 in viral entry. *EMBO* 17(22):3233-3240
- Chromy, L. R., Oltman, A., Estes, P. A., Garcea, R. L.** (2006): Chaperone-mediated in vitro disassembly of Polyoma- and Papillomaviruses. *J. Virol.* 80:5086-5091
- Chromy, L. R., Pipas, J. M., Garcea, R. L.** (2003): Chaperone-mediated in vitro assembly of Polyomavirus capsids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10477-10482.
- Imamoto, N., Shimamoto, T., Kose, S., Takao, T., Tachibana, T., Matsuabe, M., Sekimoto, T., Shimonishi, Y., Yoneda, Z.** (1995): The nuclear pore-targeting complex binds to nuclear pores after association with a karyophile. *FEBS Lett.* 386:415-419

- Ishii, N., Nakanishi, A., Yamada, M., Macalalad, M. H., Kasamatsu, H.** (1994): Functional complementation of nuclear targeting-defective mutants of simian virus 40 structural proteins. *J. Virol.* 68: 8209-8216
- Jiang, M., Abend, J. R., Tsai, B., Imperiale, M. J.** (2009): Early events during BK virus entry and disassembly. *Virol.* 83:1350-1358
- Krauzewicz N, Streuli CH, Stuart-Smith N, Jones MD, Wallace S, Griffin BE.** (1990): Myristylated polyomavirus VP2: role in the life cycle of the virus. *J. Virol.* 64, 4414-20
- Kuksin, D., Norkin, L. C.** (2012): Disassembly of simian virus 40 during passage through the endoplasmic reticulum and in the cytoplasm. *J. Virol.* 86:1555-1562.
- Kutay, U., Bischoff, F. R., Kostka, S., Kraft, R., Gorlich, D.** (1997): Export of importin alpha from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor. *Cell* 90:1061-1071
- Lakadamyali, M., Rust, M. J., Zhuang, X.** (2006): Ligands for clathrin-mediated endocytosis are differentially sorted into distinct population of early endosomes. *Cell* 124:997-1009.
- Leopold, P. L., Crystal, R. G.** (2002): Intracellular trafficking of adenovirus: many means to many ends. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 59:810-21
- Li, J., Soroka, J., Buchner, J.** (2012): The Hsp90 chaperone machinery: Conformational dynamics and regulation by co-chaperones. *Biochim. Biophys. Acta* 1823:624-35
- Li, M., Delos, S.E., Montross, L., Garcea, R. L.** (1995a): Polyomavirus VP1 phosphorylation: coexpression with the VP2 capsid protein modulates VP1 phosphorylation in Sf9 insect cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 5992 – 5996
- Li, M., Garcea, R.L.** (1994): Identification of the threonine phosphorylation sites on the polyomavirus major capsid protein VP1: relationship to the activity of middle T antigen. *J. Virol.* 68: 320 – 327
- Li, M., Lyon, M. K., Garcea, R. L.** (1995b): *In vitro* phosphorylation of the polyomavirus major capsid protein VP1 on serine 66 by casein kinase II. *J. Biol. Chem.* 270: 26006 – 26011.
- Li, P. P., Itoh, N., Watanabe, M., Shi, Y., Liu, P., Yang, H.-J., Kasamatsu, H.** (2009): Association of Simian virus 40 VP1 with 70-kilodalton heat shock proteins and viral tumor antigens. *J. Virol.* 83:37-46
- Li, P. P., Nakanishi, A., Shum, D., Sun, P. C.-K., Salazar, A. M., Fernandez, C. F., Chan, S.-W., Kasamatsu, H.** (2001): Simian virus 40 Vp1 DNA-binding domain is functionally separable from the overlapping nuclear localization signal and is required for effective virion formation and full viability. *J. Virol.* 75:7321- 9
- Liddington, R.C., Yan, Y., Moulain, J., Sahli, R., Benjamin, T.L., Harrison, S.C.** (1991): Structure of simian virus 40 at 3.8-Å resolution. *Nature* 354:278 – 294.
- Lilley, B. N., Gilbert, J. M., Ploegh, H. L., Benjamin, B. L.** (2006): Murine polyomavirus requires the endoplasmic reticulum protein derlin-2 to initiate infection. *J. Virol.* 80:8739-8744.
- Liu, K., Qian, L., Wang, J., Li, W., Deng, X., Chen, X., Sun, W., Wei, H., Qian, X., Jiang, Y., He, F.** (2009): Two-dimensional blue native/SDS-PAGE analysis reveals heat shock protein chaperone machinery involved in hepatitis B virus production in HepG2.2.15 cells. *Mol. Cell. Proteomics* 8, 495–505.
- Low, J. A., Magnuson, B., Tsai, B., Imperiale, M. J.** (2006): Identification of gangliosides GD1b and GT1b as receptors for BK virus. *J. Virol.* 80:1361-1366
- McCann, J. A., Mertz, J. A., Czworkowski, J., Picking, W. D.** (1997): Conformational changes in cholera toxin B subunit-ganglioside GM1 complexes are elicited by environmental pH and evoke changes in membrane structure. *Biochemistry* 36:9169-78
- Manguson, B., Rayney, E. K., Benjamin, T., Baryshev, M., Mkrtchian, S., Tsai, B.** (2005): ERp29 triggers a conformational chase in polyomaviruses to stimulate membrane binding. *Mol. Cell* 20:289-300
- Mannová, P., Forstová, J.** (2003): Mouse polyomavirus utilizes recycling endosomes for traffic pathway independent of COPI vesicle transport. *J. Virol* 77(3):1672-1681
- Mannová, P., Liebl, D., Krauzewicz, N., Fejtová, A., Štokrová, J., Palková, Z., Griffin, B.E., Forstová, J.** (2002): Analysis of mouse polyomavirus mutants with lesions in the minor capsid proteins. *J. Gen. Virol* 83:2309-2319
- Marsh, M., Helenius, A.** (1989): Virus entry into animal cells. *Adv. Virus Res.* 36:107-151
- Martelli, F., Iacobini, C., Causo, M., Felsani, A.** (1996): Characterization of two novel YY1 binding sites in the polyomavirus late promoter. *J. Virol* 70(3):1433-1438

- van der Meijden, E., Janssens, R. W., Lauber, C., Bouwes Bavinck, J. N., Gorbalenya, A. E., Feltkamp, M. C.** (2010): Discovery of a new human polyomavirus associated with trichodysplasia spinulosa in an immunocompromized patient. *PLoS Pathog* 6:e1001024.
- Montross, L., Watkins, S., Moreland, R. B., Mamon, H., Caspar, D. L. D., Garcea, R. L.** (1991): Nuclear assembly of polyomavirus capsids in insect cells expressing the major capsid protein VP1. *J. Virol* 65:4991-4998
- Moreland, R. B., Garcea, R. L.** (1991): Characterization of a nuclear localization sequence in the polyomavirus capsid protein VP1. *Virology* 185:513-8
- Moriyama, T., Marquez, J. P., Wakatsuki, T., Sorokin, A.** (2007): Caveolar endocytosis is critical for BK virus infection of human renal proximal tubular epithelial cells. *J. Virol.* 81:8552- 8562
- Moriyama, T., Sorokin, A.** (2008): Intracellular trafficking pathway of BK virus in human renal proximal tubular epithelial cells. *Virol.* 371: 336- 349
- Mundy, D. I., Machleidt, T., Ying, Y. S., Anderson, R. G., Bloom, G. S.** (2002): Dual control of caveolar membrane traffic by microtubules and the actin cytoskeleton. *J. Cell Sci.* 115:4327–4339.
- Nakanishi, A., Itoh, N., Li, P. P., Handa, H., Liddington, R. C., Kasamatsu, H.** (2007): Minor capsid protein of simian virus 40 are dispensable for nucleocapsid assembly and cell entry but are required for nuclear entry of the viral genome. *J. Virol.* 8:3778–3785
- Nakanishi A, Nakamura A, Liddington R., Kasamatsu, H.** (2006): Identification of amino acid residues within simian virus 40 capsid proteins VP1, VP2 and VP3 that are required for their interaction and for viral infection. *J. Virol.* 80: 8891–8898.
- Nakanishi, A., Shum, D., Morioka, H., Otsuka, E., Kasamatsu, H.** (2002): Interaction of the VP3 nuclear localization signal with the importin alpha2/beta heterodimer directs nuclear entry of infecting simian virus 40. *J. Virol.* 76:9368-9377.
- Norkin, L.C., Anderson, H. A., Wolfrom, S. A., Oppenheim, A.** (2002): Caveolar endocytosis of simian virus 40 is followed by brefeldin A-sensitive transport to the endoplasmic reticulum, where the virus disassembles. *J. Virol* 76:5156-5166
- Nováková, Z., Man, P., Novák, P., Hozák, P., Hodný, Z.** (2006): Separation of nuclear protein complexes by blue native polyacrilamide gel electrophoresis. *Electrophoresis* 27, 1277–1287.
- Oppenheim, A., Sandalon, Z., Peleg, A., Shaul, O., Nicolis, S., Ottolenghi, S.** (1992): A cis-acting DNA signal for encapsidation of simian virus 40. *J Virol* 66(9):5320-5328
- Padgett, B. L., Walker, D. L., ZuRhein, G. M., Eckroade, R. J., Dessel, B. H.** (1971): Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *Lancet* 1:1257-60.
- Palková, Z., Adamec, T., Liebl, D., Štokrová, J., Forstová, J.** (2000a): Production of polyomavirus structural protein VP1 in yeast cells and its interaction with cell structures. *FEBS Letters* 478:281-289
- Palková, Z., Španielová, H., Gottifredi, V., Hollanderová, D., Forstová, J., Amati, A.** (2000b): The polyomavirus major capsid protein VP1 interacts with the nuclear matrix regulatory protein YY1. *FEBS letters* 467:359-364
- Pasqualato, S., Senic-Matuglia, F., Renault, L., Goud, B., Salamero, J., Cherfils, J.** (2004): The structural GDP/GTP cycle of Rab11 reveals a novel interface involved in the dynamics of recycling endosomes. *J. Biol. Chem.* 279:11480–11488
- Pelkmans, L., Burli, T., Zerial, M., Helenius, A.** (2004): Caveolin-stabilized membrane domains as multifunctional transport and sorting devices in endocytic membrane traffic. *Cell* 118:767–780.
- Pelkmans, L., Kartenbeck, J., Helenius, A.** (2001): Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular transport pathway to the ER. *Nat. Cell Biol.* 3:473-483
- Pho, M. T., Ashok, A., Atwood, W. J.** (2000): JC virus enters human glial cells by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. *J. Virol* 74(5):2288-2292
- Pipas, J. M.** (1992): Common and unique features of T antigens encoded by the polyomavirus group. *J. Virol.* 66: 3979-3985
- Qian, M., Cai, D., Verhey, K. J., Tsai, B.** (2009): A lipid receptor sorts Polyomavirus from the endolysosome to the endoplasmic reticulum to cause infection. *PloS Pathog.* 5:e1000465.
- Rainey-Barger E. K., Magnuson, B., Tsai, B.** (2007): A chaperone-activated nonenveloped virus perforates the physiologically relevant endoplasmic reticulum membrane. *J Virol* 81, 12996–13004.
- Rainey-Barger, E. K., Mkrтчian, S., Tsai, B.** (2009): The C-terminal domain of ERp29 mediates polyomavirus binding, unfolding and infection. *J. Virol.* 83:1483-1491.

- Rayment, I., Baker, T. S., Caspar, D. L. D., Murakami, W. T.** (1982): Polyoma virus capsid structure at 22.5 Å resolution. *Nature* 295, 110–115.
- Richterová, Z., Liebl, D., Horák, M., Palková, Z., Štokrová, J., Hozák, P., Korb, J., Forstová, J.** (2001): Caveolae are involved in the trafficking of mouse polyomavirus virions and artificial VP1 pseudocapsids toward cell nuclei. *J. Virol* 75:10880-10891
- Roitman-Shemer, V., Stokrova, J., Forstova, J., Oppenheim, A.** (2007): Assemblages of simian virus 40 capsid proteins and viral DNA visualized by electron microscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 353:424-30.
- Salunke, D. M., Caspar, D. L., Garcea, R. L.** (1986): Self assembly of purified polyomavirus capsid protein VP1. *Cell* 46:895-904
- Salunke, D. M., Caspar, D. L., Garcea, R. L.** (1989): Polymorphism in the assembly of polyomavirus capsid protein, VP1. *Biophys J.* 56:887-900.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T.** (1989): *A molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Saway, E. T., Butel, J. S.** (1989): Association of a cellular heat shock protein with simian virus 40 large T antigen. *J. Virol.* 63:3961-3973
- Saway, E. T., Rasmussen, G., Butel, J. S.** (1994): Construction of SV40 deletion mutants and delimitation of the binding domain for heat shock protein to the amino terminus of large T-antigen. *Virus Res.* 31:367-378.
- Scuda, N., Hofmann, J., Calvignac-Spencer, S., Ruprecht, K., Liman, P., Kühn, J.** (2011): A novel human polyomavirus closely related to the African green monkey–derived lymphotropic polyomavirus. *J. Virol.* 85:4586–4590
- Seeler, J. S., Marchio, A., Sitterlin, D., Transy, C., Dejean, A.** (1998): Interaction of SP100 with HP1 proteins: a link between the promyelocytic leukemia-associated nuclear bodies and the chromatin compartment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 7316–73121.
- Schagger, H., Cramer, W. A., von Jagow, G.** (1994): Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal. Biochem.* 217:220–230.
- Schagger, H., von Jagow, G.,** (1991): Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* 199, 223–231.
- Schelhaas, M., Malmström, J., Pelkmans, L., Haugstetter, J., Ellgaard, L., Grünewald, K., Helenius, A.** (2007): Simian virus 40 depends on ER protein folding and quality control factors for entry into host cells. *Cell* 131:516-529.
- Shi, Y., Lee, J. S., Galvin, K. M.** (1997): Everything you have ever wanted to knot about Yin Yang 1... *Biochim. Biophys. Acta* 1332:F49-F66
- Shishido-Hara, Y., Ichinose, S., Higuchi, K., Hara, Y., Yasuj, K.** (2004): Major and minor capsid proteins of human polyomavirus JC cooperatively accumulate to nuclear domain 10 for assembly into virions. *J Virol* 78(18):9890-9903
- Schowalter, R. M., Pastrana, D. V., Pumphrey, K. A., Moyer, A. L., Buck, C. B.** (2010): Merkel cell polyomavirus and two previously unknown polyomaviruses are chronically shed from human skin. *Cell Host Microbe* 7:509-15
- Sieczkarski, S. B., Whittaker, G. R.** (2002): Influenza virus can enter and infect cells in the absence of clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol.* 76:10455-64.
- Smith, J. L., Campos, S. K., Wandinger-Ness, A., Ozbun, M. A.** (2008): Caveolin-1-dependent infectious entry of human papillomavirus type 31 in human keratinocytes proceeds to the endosomal pathway for pH-dependent uncoating. *J. Virol.* 82:9505-12
- Stamatos, N. M., Chakrabarti, S., Moss, B., Hare, J. D.** (1987): Expression of polyomavirus virion proteins by a vaccinia virus vector: association of VP1 and VP2 with the nuclear framework. *J Virol.* 61:516-25.
- Stang, E., Kartenbeck, J., Parton, R. B.** (1997): Major histocompatibility complex class I molecules mediate association of SV40 with caveolae. *Mol. Biol. Cell* 8:47-57
- Stehle, T., Gamblin, S. J., Yan, Y., Harrison, S. C.** (1996): The structure of simian virus 40 refined at 3.1 Å resolution. *Structure* 4:165-182
- Stehle, T., Yan, Y., Benjamin, T. L., Harrison, S. C.** (1994): Structure of murine polyomavirus complexed with an oligosaccharide receptor fragment. *Nature* 369:160-163

- Streuli, C. H., Griffin, B.,** (1987): Myristic acid is coupled to a structural protein of polyoma virus and SV40. *Nature* 326:619-622.
- Sweet, B. H., Hilleman, M. R.** (1960): The vacuolating virus, S.V. 40. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 105:420-7.
- Szostecki, C., Krippner, H., Penner, E., Bautz, F. A.** (1987): Autoimmune sera recognize a 100 kDa nuclear protein antigen (sp-100). *Clin. Exp. Immunol.* 68, 108–116.
- Štokrová, J., Palková, Z., Fischer, L., Richterová, Z., Korb, J., Griffin, B. E., Forstová, J.** (1999): Interactions of heterologous DNA with polyomavirus major structural protein, VP1. *FEBS Letters* 445:119-125
- Theodoraki, M. A., Caplan, A. J.** (2012): Quality control and fate determination of Hsp90 client proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1823:683-8
- Thomas, M.J., Seto, E.** (1999): Unlocking the mechanism of transcription factor YY1: are chromatin modifying enzymes the key? *Gene* 236:197-208
- Tolstov, Y. L., Pastrana, D. V., Feng, H., Becker, J. C., Jenkins, F. J., Moschos, S., Chang, Y., Buck, C. B., Moore, P. S.** (2009): Human Merkel cell polyomavirus infection II. MCV is a common human infection that can be detected by conformational capsid epitope immunoassays. *Int. J. Cancer* 125, 1250–1256.
- Tsai, B., Gilbert, J. M., Stehle, T., Lencer, W., Benjamin, T. L., Rapoport, T. A.** (2003): Gangliosides are receptors for murine polyoma virus and SV40. *EMBO J* 22:4346-4355
- Türler, H., Beard, P.** (1985): Simian virus 40 and polyoma virus: growth, titration, transformation and purification of viral components. In: Mahy B. W. J. (ed.): *Virology: a practical approach*. IRL Press, Oxford, 169-192
- Varsavsky, A. J., Bakayev, V. V., Chumackov, P. M., Georgie, G. P.** (1976): Minichromosome of simian virus 40: Presence of H1. *Nucleic Acids Res* 3:2101-2113
- Weis, K., Rambaud, S., Lavau, C., Jansen, J., Carvalho, T., Carmo-Fonseca, M., Lamond, A., Dejean, A.,** 1994. Retinoic acid regulates aberrant nuclear localization of PMLRAR alpha in acute promyelocytic leukemia cells. *Cell* 76, 345–356.
- Walczak, C. P., Tsai, B.** (2011): A PDI family network acts distinctly and coordinately with ERp29 to facilitate polyomavirus infection. *J. Virol.* 85:2386-2396.
- Welch, W. J., Feramisco, J. R.** (1982): Purification of the major mammalian heat shock proteins. *J. Biol. Chem.* 257:14949-59
- Wiech, H., Buchner, J., Zimmermann, R., Jakob, U.** (1992): Hsp90 chaperones protein folding in vitro. *Nature* 358:169-70
- Winston, V. D., Bolen, J. B., Consigli, R. A.** (1980): Isolation and characterization of polyoma uncoating intermediates from the nuclei of infected mouse cells. *J. Virol* 33:1173-1181
- Yuen, L. K. C., Consigli, R. A.** (1985): Identification and protein analysis of polyomavirus assembly intermediates from infected primary mouse embryo cells. *Virology* 144:127-138
- Zufferey, R., Donello, J. E., Trono, D., Hope, T. J.** (1999): Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J. Virol.* 72:2886-2892

## **9. Přílohy**