

ABSTRAKT

Myší polyomavirus (MPyV) je neobalený tumorogenní DNA virus, replikující se v jádře hostitelské buňky. Do buněk vstupuje endocytózou zprostředkovanou receptorem a jeho následný transport k jádru je závislý na kyselém prostředí endozomů a vlákních mikrotubulů, potřebných pro dopravení virionů do endoplazmatického retikula (ER). V ER dochází k disociaci virové kapsidy a rozbalení genomu viru. Mechanismus, kterým je virový genom následně dopraven do nukleoplazmy není doposud objasněn, ale předpokládá se, že se ho kromě buněčných faktorů účastní také virové minoritní kapsidové proteiny VP2 a VP3. Po dopravení genomu do jádra dochází k produkci časných virových antigenů, které navozují vhodné prostředí pro replikaci viru. Po replikaci virové DNA a morfogenezi virionů, virové potomstvo opouští buňku během její lyze. Výzkum této disertační práce se ve své první části zaměřil na vnitrobuněčný transport MPyV a zapojení cytoskeletárních sítí během dopravy viru do ER. Zejména byl zacílen na stále nejasnou roli mikrotubulů během transportu viru v endozómech a na roli asociovaných mikrotubulárních motorů, která v případě MPyV nebyla doposud testována. Náš výzkum ukázal, že transport MPyV vedoucí k produktivní infekci nevyžaduje funkci kinesinu-1 či kinesinu-2, ale je závislý na transportu zprostředkovaném mikrotubulární motorem dyneinem. Funkce dyneinu se ukázala potřebná pro efektivní translokaci virionů z periferie buněk, často z kompartmentů připomínajících multikaveolární komplexy, do časných a pozdních endozomů a dále pro dopravení virionů do ER. I přesto, že na mikrotubulech závisel i transport viru do recyklujících endozomů, tyto kompartmenty se neukázaly jako potřebné pro produktivní infekci. Ve své druhé části se výzkum zaměřil na studium vlastností minoritních kapsidových proteinů VP2 a VP3. Minoritní kapsidové proteiny jsou nepostradatelné pro dopravení virového genomu do jádra. U obou minoritních proteinů byla demonstrována afinita k arteficiálním membránám, a u proteinu VP2 schopnost tyto membrány perforovat. Tyto výzkumy tak naznačují, že interní minoritní strukturní proteiny, exponované po disociaci kapsidy v ER, mohou přispívat k translokaci virového genomu z ER do nukleoplazmy. My jsme připravili fúzní varianty minoritních kapsidových proteinů s fluorescenčním proteinem EGFP, pro jejich individuální expresi v savčích buňkách bez přítomnosti ostatních genových produktů MPyV. Biochemické analýzy ukázaly, že minoritní proteiny MPyV jsou cytotoxické a že jsou silnými induktory apoptotických procesů. Konfokální a immuno-elektronová mikroskopie ukázala schopnost obou minoritních proteinů interagovat s vnitrobuněčnými membránami a poškozovat je, což naznačuje mechanismus zodpovědný za jejich cytotoxicitu. Nicméně, analýza apoptotických markerů a kinetiky smrti buněk transfekovaných genomem MPyV divokého typu či genomem mutovaným v iniciačních kodónech pro translaci VP2 a VP3 ukázala, že minoritní proteiny významně nepřispívají k indukci apoptotických procesů během infekce, a že jsou zcela postradatelné pro destrukci buňky na konci replikačního cyklu viru. Tyto výsledky tak indikují preferenční roli minoritních kapsidových proteinů během vstupu viru do buněk a dopravení virového genomu do jádra.