

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovateli povinen řádně ocitovat.

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Jana Váňová

Usměrněná evoluce myšního polyomaviru

Directed evolution of mouse polyomavirus

Diplomová práce

Školitelka: RNDr. Hana Španielová, Ph.D.

Praha, 2016

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, 15. 8. 2016

.....
Jana Váňová

Poděkování

Na prvním místě bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Haně Španielové, Ph.D. za vedení diplomové práce jak po stránce experimentální, tak po stránce literární, velmi si cením jejího nadhledu, inspirace, rad, povzbuzení a především času, který mé práci věnovala. Dále bych ráda poděkovala doc. RNDr. Jitce Forstové, CSc. za přijetí do laboratoře a Mgr. Jiřině Žáčkové Suchanové za nekonečnou trpělivost a ochotu při uvádění do chodu laboratoře a experimentální práce včetně konzultace experimentů, provedení konfokální a elektronové mikroskopie a poskytnutí viru podobných částic pro značení. Děkuji také Bc. Alžbětě Sekavové za pomoc se statistickými metodami, a Mgr. Michalu Sýkorovi za kontrolu práce a neutuchající nadšení pro vědu. Všem kolegům z laboratoře virologie děkuji za vytvoření přátelského pracovního prostředí a ochotu poradit, neméně děkuji také Vlastě Sakařové a Ivaně Polívkové za všechnu jejich práci pro zajištění hladkého chodu laboratoře.

Především však děkuji své rodině a přátelům za podporu, trpělivost a pochopení během celé doby studia.

Tato práce vznikla v letech 2013 – 2016 za finanční podpory Grantové agentury Univerzity Karlovy (GAUK/913613).

ABSTRAKT

Metoda usměrněné evoluce je novým přístupem pro přípravu proteinů s novými či pozměněnými vlastnostmi. Principem usměrněné evoluce je náhodná mutagenese kódující sekvence pro protein našeho zájmu následovaná selekcí vytvořených mutantů na požadovanou vlastnost. Cílem této pilotní studie bylo prozkoumat možnost využití usměrněné evoluce pro změnu původního tropismu myšího polyomaviru a jeho přeměrování na buňky modelové linie nádoru prostaty. Pro přípravu náhodně mutovaného genu kódujícího hlavní kapsidový protein myšího polyomaviru, jenž je zodpovědný za interakci viru s buněčným receptorem pro vstup viru do buňky, byly využity metody „error-prone PCR“ a „DNA-shuffling“. Produkce virů nesoucích mutovaný hlavní kapsidový protein byla zajištěna místně-specifickou rekombinací Cre/loxP. Práce se zabývala i návrhem a charakterizací systému selekce virových mutantů. Bylo zjištěno, že prostatické nádorové linie se významně liší ve schopnosti vázat a internalizovat částice odvozené od myšího polyomaviru. Tohoto poznatku může být v budoucnu využito pro přípravu viru podobných částic určených pro diagnostiku nádoru prostaty. Práce prokázala, že metodu usměrněné evoluce lze použít pro přípravu mutantních polyomavirů a identifikovala několik problematických částí postupu.

Klíčová slova: usměrněná evoluce, myší polyomavirus, mutanty, „error-prone PCR“, „DNA shuffling“, Cre/loxP systém

ABSTRACT

The method of directed evolution represents a new approach to generate proteins with new or altered properties. The principle of directed evolution is random mutagenesis of the coding sequence for a protein of our interest followed by selection of generated mutants for the desired property. The aim of this pilot study was to investigate the possibility of utilization of directed evolution for alteration of mouse polyomavirus original tropism and virus retargeting to a model prostate cancer cell line. To generate randomly mutated gene encoding the major capsid protein of mouse polyomavirus, which is responsible for the interaction of the virus with cellular receptor for viral cell entry, error-prone PCR and DNA shuffling methods were used. Production of viruses composed of mutant major capsid protein was ensured by Cre/loxP site-specific recombination. The thesis also dealt with the design and characterization of the system for viral mutant selection. It was found that the prostate cancer cell lines markedly vary in their ability to bind and internalize particles derived from mouse polyomavirus. This knowledge can be used for the preparation of virus-like particles for prostate cancer diagnostics in the future. The study demonstrated that the method of directed evolution can be used for production of mutant polyomaviruses and identified several problematic parts of the procedure.

Keywords: directed evolution, mouse polyomavirus, mutants, error-prone PCR, DNA shuffling, Cre/loxP system

OBSAH

1	ÚVOD.....	11
2	PŘEHLED LITERATURY.....	12
2.1	Polyomaviry	12
2.1.1	Virový genom	12
2.1.2	Stavba virionu.....	14
2.1.3	Kapsidový protein VP1	14
2.1.4	Životní cyklus polyomaviru	15
2.1.5	Vstup polyomavirů do buňky	16
2.2	Viru podobné částice.....	20
2.3	Směrování virů a viru podobných částic.....	21
2.3.1	Usměrněná evoluce	23
2.4	Teranostika	25
2.5	Rakovina prostaty.....	26
2.5.1	PSMA a jeho cílení	28
3	CÍLE PRÁCE	31
4	MATERIÁL A METODY.....	32
4.1	Materiál.....	32
4.1.1	Markery molekulových vah.....	32
4.1.2	Kultivační média.....	33
4.1.3	Antibiotika	33
4.1.4	Enzymy	34
4.1.5	Často užívané roztoky	34
4.1.6	Komerční soupravy.....	34
4.1.7	Primery pro PCR	35
4.1.8	Vektory	37
4.1.9	Bakteriální kmeny	39
4.1.10	Savčí buněčné linie.....	40
4.1.11	Viry	40
4.1.12	Protilátky a fluorescenční barviva	40
4.2	Metody.....	42
4.2.1	Sterilizace.....	42
4.2.2	Práce s bakteriálními kulturami	42
4.2.2.1	Kultivace bakterií	42
4.2.2.2	Příprava kompetentních bakterií pro transformaci elektroporací.....	42
4.2.2.3	Transformace bakterií elektroporací	43

4.2.2.4	Transformace bakterií teplotním šokem	43
4.2.2.5	Příprava bakteriálních konzerv	43
4.2.3	Práce s tkáňovými kulturami	44
4.2.3.1	Pasážování savčích buněk NIH-3T3, NIH-3T6, T2, LNCaP, PC3 a DU-145.....	44
4.2.3.2	Transfekce savčích buněk metodou Nukleofekce®	44
4.2.3.3	Transfekce savčích buněk s využitím kationických polymerů „TurboFect Transfection Reagents“	45
4.2.3.4	Testování rezistence buněk vůči selekčnímu antibiotiku	45
4.2.3.5	Ustavení buněčné linie se stabilní expresí transgenu	46
4.2.3.6	Fixace buněk a detekce proteinu metodou nepřímé imunofluorescence	46
4.2.3.7	Příprava buněčných lyzátů	47
4.2.3.8	Infekce savčích buněk virem	47
4.2.4	Práce s DNA.....	48
4.2.4.1	Agarózová elektroforéza	48
4.2.4.2	Izolace DNA z agarózového gelu.....	49
4.2.4.3	Polymerázová řetězová reakce	49
4.2.4.4	Mutagenní PCR.....	51
4.2.4.5	Restrikční štěpení DNA	54
4.2.4.6	„DNA shuffling“	54
4.2.4.7	Optimalizace štěpení DNázou I.....	56
4.2.4.8	Přečištění PCR směsi a izolace DNA z gelu pomocí komerční soupravy	57
4.2.4.9	Přečištění DNA metodou fenol-chloroformové extrakce	58
4.2.4.10	Srážení DNA součinností soli a alkoholu	58
4.2.4.11	Klonování pomocí In-Fusion® reakce	58
4.2.4.12	Izolace plasmidové DNA pomocí komerční soupravy	59
4.2.4.13	Minipreparace plasmidové DNA alkalickou metodou	60
4.2.4.14	Měření koncentrace DNA	60
4.2.4.15	Sekvence DNA.....	60
4.2.5	Práce s proteiny	61
4.2.5.1	Dělení proteinů pomocí denaturační elektroforézy SDS-PAAGE.....	61
4.2.5.2	Detekce fluorescence proteinů na polyakrylamidovém gelu	62
4.2.5.3	Barvení polyakrylamidového gelu po proteinové elektroforéze.....	62
4.2.5.4	Stanovení koncentrace proteinů na základě densitometrie polyakrylamidového gelu	62
4.2.5.5	Dot Blot.....	63
4.2.5.6	„Western blot“.....	63
4.2.5.7	Imunologická detekce proteinů na nitrocelulóзовé membráně vizualizovaná chemiluminiscencí.....	64

4.2.5.8	Měření koncentrace proteinů pomocí přístroje Qubit	64
4.2.6	Práce s virem a viru podobnými částicemi	65
4.2.6.1	Izolace viru	65
4.2.6.2	Centrifugace přes sacharózový polštář	65
4.2.6.3	Isopyktnická centrifugace v gradientu chloridu cesného	66
4.2.6.4	Dialýza viru po centrifugaci v gradientu chloridu cesného	66
4.2.6.5	Elektronová mikroskopie a negativní barvení	66
4.2.6.6	Hemaglutinační test	67
4.2.6.7	Značení viru podobných částic a viru fluorescenční barvou	68
4.2.6.8	Zkoumání interakce fluorescenčně značených VLPs či viru s buňkami pomocí průtokové cytometrie	69
4.2.7	Statistické vyhodnocení náhodnosti vzniku sekvencí během mutagenní PCR	70
5	VÝSLEDKY	71
5.1	Schéma projektu	71
5.2	Zavedení efektivního systému pro generování variant myšího polyomaviru s náhodnými mutacemi v hlavním kapsidovém proteinu	75
5.2.1	Náhodná mutagenese genu MPyV VP1 a BCsub MPyV VP1 pomocí „error-prone PCR“	75
5.2.1.1	Náhodná mutagenese pomocí analogů dNTP	75
5.2.1.2	Náhodná mutagenese pomocí soupravy GeneMorph® II Random Mutagenesis Kit	79
5.2.2	„DNA shuffling“	80
5.2.2.1	Příprava VP1 genů vybraných polyomavirů	80
5.2.2.2	Náhodná fragmentace vstupních genů	83
5.2.2.3	„Self-priming PCR“ a závěrečná amplifikace chimerních genů	86
5.2.3	Příprava vektoru odvozeného od plasmidu pBS-PyI	88
5.2.4	Příprava rekombinantních plasmidů	89
5.2.5	Izolace rekombinantních plasmidů a jejich analýza	91
5.2.6	Produkce a předběžná analýza vybraných virových mutant	95
5.2.7	Produkce mutovaných virů pro účely selekce	98
5.3	Charakterizace systému pro selekci mutantních virionů	99
5.3.1	Testování infekivity pro navržený selekční systém	99
5.3.2	Příprava 3T3-PSMA linie	101
5.3.3	Zjišťování schopnosti MPyV VLPs interagovat s vybranými buněčnými liniemi	104
5.3.3.1	Testování optimálního způsobu převedení adherentních buněk do suspenze	104
5.3.3.2	Příprava a charakterizace fluorescenčně značených MPyV VLPs	106
5.3.3.3	Izolace myšího polyomaviru a jeho fluorescenční značení	110
5.3.3.4	Značení izolovaného myšího polyomaviru pomocí fluorescenční barvy	113
5.3.3.5	Srovnání vazby a vstupu značených VLPs a viru do různých buněčných linií	117

5.3.4	Návrh nového systému pro selekci mutantních virionů	120
6	DISKUZE	123
7	SOUHRN	131
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	133
9	PŘÍLOHY PRÁCE.....	I

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

5-HT _{2A}	5-hydroxytryptaminový receptor 2A
8-oxo-dGTP	8-oxo-deoxyguanosin trifosfát
Ax488	Alexa Fluor 488
Ax488-NHS	Alexa Fluor 488 Succinimidyl Ester
BCsub MPyV	myší polyomaviru se substitucí v povrchové BC smyčce
BKV	BK virus
bp	páry bází
CT	počítačová tomografie
DAPI	4',6-diamidino-2-fenylindol
DARPin	molekula odvozená od proteinů s opakujícím se ankyrinovým motivem (z angl. designed ankyrin repeat protein)
dH ₂ O	destilovaná voda
ddH ₂ O	destilovaná a demineralizovaná voda
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
dNTP	deoxynukleosid trifosfát
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline
dPTP	deoxy-P-nukleosid trifosfát
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-karbodiimid
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
GCPII	glutamátkarboxypeptidáza II
GFP	zelený fluorescenční protein
HAU	hemaglutinační jednotka
HER2	receptor pro lidský epidermální růstový faktor 2
JCV	JC virus
kbp	tisíc párů bází
LB	Luria-Bertani
loxP-Ax488	myší polyomavirus s loxP místem v intronu velkého T antigenu označený fluorescenční reaktivní barvou Alexa Fluor 488-NHS
loxP-wt MPyV	myší polyomavirus s loxP místem v intronu velkého T antigenu
LSTc	tetrasacharid laktosérie c
LT	velký T antigen
MCPyV	polyomavirus karcinomu Merkelových buněk
MPyV	myší polyomavirus
MRI	zobrazování magnetickou rezonancí
MT	střední T antigen

NAALADáza	N-acetylovaná alfa-vázaná kyselá dipeptidáza
NAAG	N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamát
NeuNAc	kyselina N-acetylneuraminová
NHS	N-hydroxysukcinimid
OD	optická densita
ORF	otevřený čtecí rámec
PBS	fosfátový pufr
PCR	polymerázová řetězová reakce
PEI	polyethylenimin
PEG	polyethylenglykol
PET	pozitronová emisní tomografie
PMØ10 cm	Petriho miska o průměru 10 cm
PSA	prostatický specifický antigen
PSMA	prostatický specifický membránový antigen
rpm	otáčky za minutu
RT	pokožová teplota
RTG	rentgenový
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti dodecylsíránu sodného
SPECT	jednofotonová emisní výpočetní tomografie
ST	malý T antigen
SV40	virus SV40 z angl. Simian vacuolating virus 40
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamin
U	jednotka z angl. unit
VLPs	viru podobné částice
VLP-Ax488	viru podobné částice odvozené od myšího polyomaviru označené fluorescenční reaktivní barvou Alexa Fluor 488-NHS
VP1	virový protein 1
VP2	virový protein 2
VP3	virový protein 3
VP4	virový protein 4
wt	divoký typ

1 ÚVOD

V současnosti používané způsoby farmakologické léčby nádorů se potýkají s problémem nízké specificity pro nádorovou tkáň a tím s sebou přinášejí množství vedlejších účinků. Snahou vědců je proto najít způsob, jak terapeutické či diagnostické látky doručit pouze do nádorových buněk a vyhnout se zdravé tkáni. Jedním z atraktivních nástrojů pro cílení nádorových buněk je doprava látek pomocí nanočástic. Aktivní látka zabalená uvnitř nanočástice je stabilní v krevním řečišti a pokud nanočástice vystavuje na svém povrchu molekuly, které interagují s molekulami charakteristickými pro nádorovou tkáň, doručí aktivní látku přímo do cílové nádorové tkáně.

Nanočástice mohou být uměle připraveny z velké škály materiálů, některé však našly inspiraci v již existujících systémech spadajících do nanoměřítko – ve virech.

Tato diplomová práce zkoumá potenciál metody usměrněné evoluce pro přesměrování myšího polyomaviru (MPyV) na nádorové buňky prostaty. Usměrněná evoluce na rozdíl od racionálního designu modifikace virů spoléhá na vytvoření směřujících mutací během procesu náhodné mutagenese a selekce ve vhodně nastavených selekčních podmínkách.

Naší snahou je zavést a optimalizovat systém pro náhodnou mutagenezi hlavního kapsidového proteinu MPyV a následnou selekci virionů obsahujících mutovaný kapsidový protein. Pro generování variability v kapsidovém proteinu byly využity metody „error-prone PCR“ a „DNA shuffling“. „Error-prone PCR“ je polymerázová řetězová reakce provedená v mutagenních podmínkách s DNA polymerázou bez 3' → 5' exonukleázové opravné aktivity, kdy při syntéze nových řetězců DNA může ve zvýšené míře docházet k záměnám bází. Při metodě „DNA shuffling“ dochází pomocí štěpení a následné polymerázové řetězové reakce k promíchání sekvencí genů kódujících hlavní kapsidový protein 5 různých polyomavirů a také polyomaviru se substitucí v povrchové smyčce hlavního kapsidového proteinu, kam byl vložen peptid vázající prostatický specifický membránový antigen (PSMA) nalézající se na povrchu nádorových buněk prostaty, nabízející se pro směrování (Suchanová, 2012).

Pro přípravu virů s takto mutovaným hlavním kapsidovým proteinem byl využit systém Cre/loxP vyvinutý v naší laboratoři (Hron *et al.*, 2013). Na závěr bylo zapotřebí dobře definovat selekční systém pro výběr mutant, čemuž napomohla analýza vstupu virových částic do různých buněčných linií a testování infekivity viru za různých podmínek.

2 PŘEHLED LITERATURY

2.1 Polyomaviry

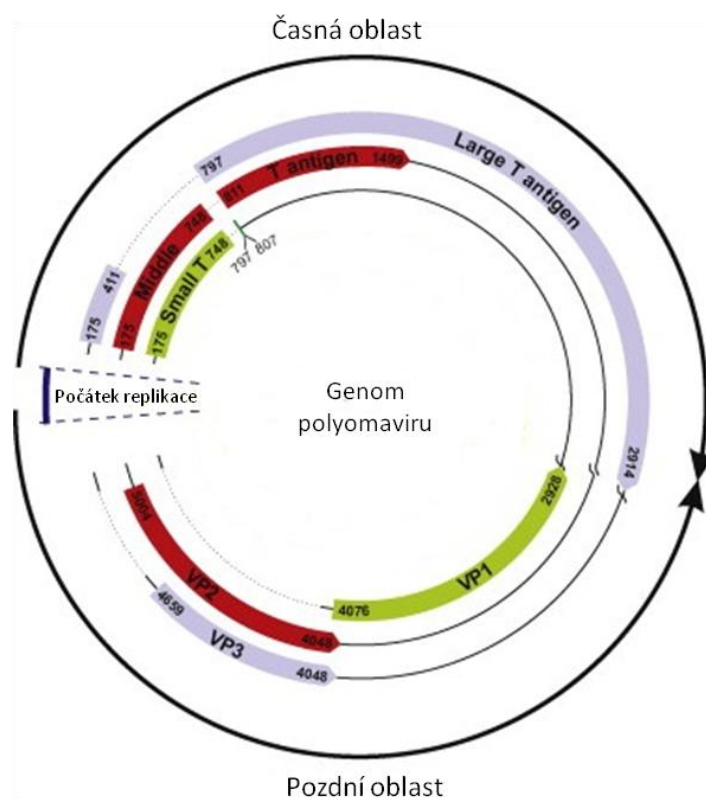
Polyomaviry, řadící se do čeledi *Polyomaviridae*, jsou malé neobalené viry (průměr kapsidy okolo 45 – 50 nm), které dokáží infikovat savce a ptáky, nově byly nalezeny také u členovců a ryb (Buck *et al.*, 2016; Polyomaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses *et al.*, 2016). U zástupců této čeledi byla prokázána schopnost podílet se na vzniku nádorů, odtud také název polyomaviry z řeckého „poly“ (mnoho) a „oma“ (nádor). Mezi polyomaviry najdeme i lidské patogeny jako například virus JC, zkráceně JCV (Padgett *et al.*, 1971), BK, zkráceně BKV (Gardner *et al.*, 1971) či virus karcinomu Merkelových buněk, zkráceně MCPyV (Feng *et al.*, 2008). V lidské populaci mají zmíněné polyomaviry vysokou prevalenci – okolo 40 – 85 % (Kean *et al.*, 2009; Pastrana *et al.*, 2009; Faust *et al.*, 2011), v ČR přibližně 60 % (Šroller *et al.*, 2013). Infekce těmito viry bývá zpravidla asymptomatická, potíže však činí u jedinců s oslabenou imunitou, u nichž může dojít k pomnožení viru a následnému projevu onemocnění [nefropatie vedoucí u pacientů po transplantaci ledvin až k selhání transplantovaného orgánu u viru BK (Gardner *et al.*, 1971; Hirsch *et al.*, 2002), progresivní multifokální leukoencefalopatie (PML) u JCPyV (Padgett *et al.*, 1971) a karcinom Merkelových buněk u MCPyV (Feng *et al.*, 2008)]. Jako modelové polyomaviry bývají nejčastěji používány opičí virus SV40 (z anglického simian vacuolating virus 40) nalezený jako kontaminace poliovirové vakcíny (Sweet a Hilleman, 1960) infikující nejen primátů, ale také lidské buňky, a dále myší polyomavirus (MPyV; Gross, 1953). Mnoho významných objevů na poli molekulární biologie bylo učiněno právě na polyomavirech.

2.1.1 Virový genom

Polyomavirový genom (obr. 1) má podobu cirkulární dvouvláknové molekuly DNA o velikosti přibližně 5300 bp (párů bází) a je uložen ve virionu v komplexu s buněčnými histony H2A, H2B, H3 a H4. Celý genom je rozdělen na časnou, pozdní a regulační oblast podle toho, zda oblast obsahuje regulační elementy, případně zda jsou geny dané oblasti exprimovány časně v životním cyklu polyomaviru - tedy ještě před replikací virového genomu, anebo v pozdní fázi životního cyklu - tedy až poté, co je zahájena replikace virového genomu v jádře. Doba jejich exprese v rámci životního cyklu také napovídá o funkci příslušných proteinů.

V regulační oblasti můžeme nalézt počátek replikace a dále promotory a enhancery genů časně i pozdní oblasti. Z časně oblasti genomu vznikají transkripty pro proteiny zvané T antigeny: velký (LT antigen) a malý (ST antigen), u myšího polyomaviru také střední (MT antigen). T antigeny plní zásadní funkce při replikaci virového genomu, regulaci transkripce virových i buněčných proteinů, a také při deregulaci buněčných procesů, které směřují buňku do S fáze buněčného cyklu (Knipe a Howley, 2007). A konečně pozdní oblast genomu obsahuje geny pro strukturální proteiny: majoritní kapsidový virový protein 1 (VP1) a minoritní virové proteiny 2 a 3 (VP2 a VP3), někdy také virový protein 4 (VP4). U některých polyomavirů tato oblast navíc kóduje agnoprotein.

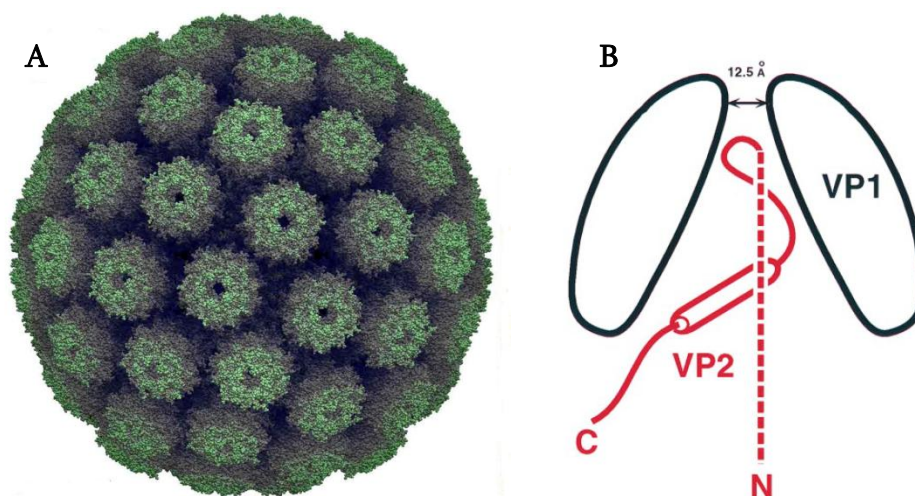
Transkripce genů časně a pozdní oblasti je iniciována z opačných vláken DNA a každá z kódujících oblastí je přepisována do primárního transkriptu, který dále podléhá sestřihu a dává tak vzniknout jednotlivým molekulám mRNA (Knipe a Howley, 2007).



Obr. 1: Mapa genomu polyomaviru. Černé šipky vyznačují směr transkripce genů časně oblasti (velký, střední a malý T antigen) a genů pozdní oblasti (kapsidový protein VP1, VP2 a VP3). Mezi těmito oblastmi se nachází regulační oblast zahrnující také počátek replikace. Upraveno podle Atkin *et al.* (2009).

2.1.2 Stavba virionu

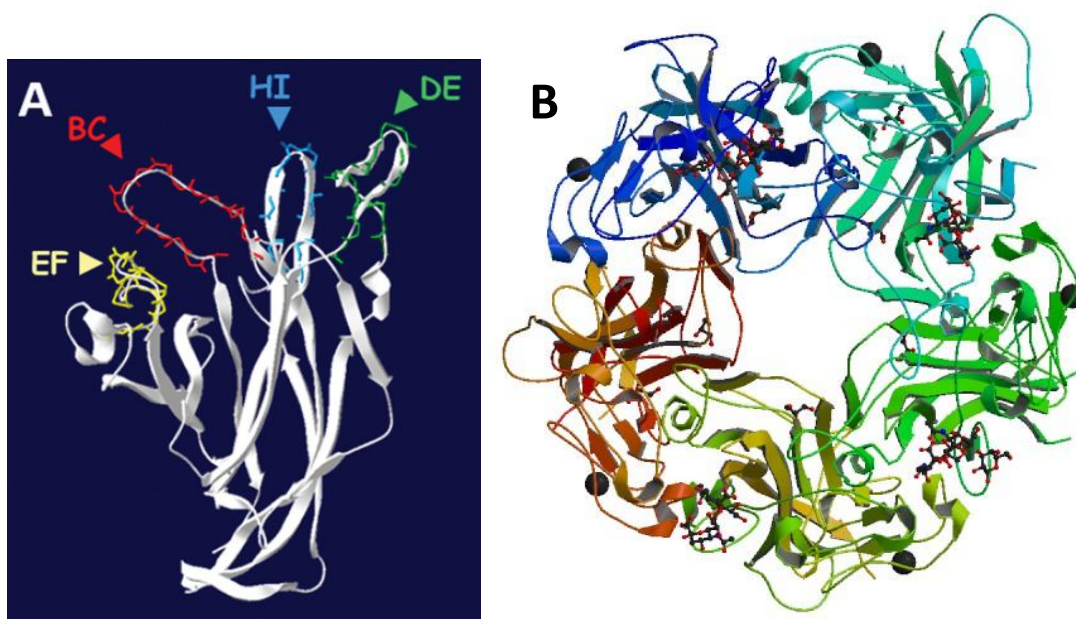
Viriony polyomavirů (obr. 2A) sestávají z ikosahedrální kapsidy a genomu navinutém na buněčných histonech. Kapsida je složena z 360 molekul proteinu VP1 uspořádaných do 72 pentamer (Liddington *et al.*, 1991) – obr. 3B, kdy v centru každé pentamery je zanořen buď protein VP2 nebo VP3 (Griffith *et al.*, 1992) – viz obr. 2B. Tyto minoritní proteiny jsou tedy lokalizovány uvnitř zralého virionu a na povrch se dostávají teprve po částečném rozvolnění virionu v endosomálním systému buňky a endoplasmatickém retikulu.



Obr. 2: Virion a průřez pentamerou. (A) Model virionu myššího polyomaviru. Znázorněny jsou jednotlivé pentamery proteinu VP1. Převzato a upraveno dle Stehle a Harrison (1996) (B) Schematické znázornění umístění VP2 proteinu (červeně) uvnitř VP1 pentamery (černě). Převzato z Chen *et al.* (1998).

2.1.3 Kapsidový protein VP1

Hlavní kapsidový protein VP1 je zodpovědný nejen za strukturu celé kapsidy, ale také za interakci s buněčným receptorem zajišťujícím vstup viru do buňky. VP1 protein má velikost 45 kDa a lze jej rozdělit do 3 oblastí důležitých z hlediska funkce: N-koncová doména je schopná nespecificky vázat DNA (Moreland *et al.*, 1991) a obsahuje jaderný lokalizační signál (Chang *et al.*, 1992). Střední část je tvořena převážně β -listy propojenými smyčkami, přičemž smyčky pojmenované BC, DE a HI (viz obr. 3A) jsou vystaveny na povrchu pentamery a jsou zodpovědné za interakci s receptorem na povrchu buňky. Flexibilní C-koncová část propojuje jednotlivé pentamery VP1 proteinu mezi sebou, čímž stabilizuje kapsidu (Stehle a Harrison, 1996).



Obr. 3: Kapsidový protein VP1. (A) Model VP1 proteinu MCPyV znázorňující povrchové smyčky BC, DE, HI a EF. Převzato z PDB ID: 4FMG dle Fleury *et al.* (2015). (B) Pentamera proteinu VP1 BK polyomaviru interagující s gangliosidem GD3 (zobrazen jako tmavošedý kruh). Převzato z PDB ID: 4MJ0 (Neu *et al.*, 2013).

2.1.4 Životní cyklus polyomaviru

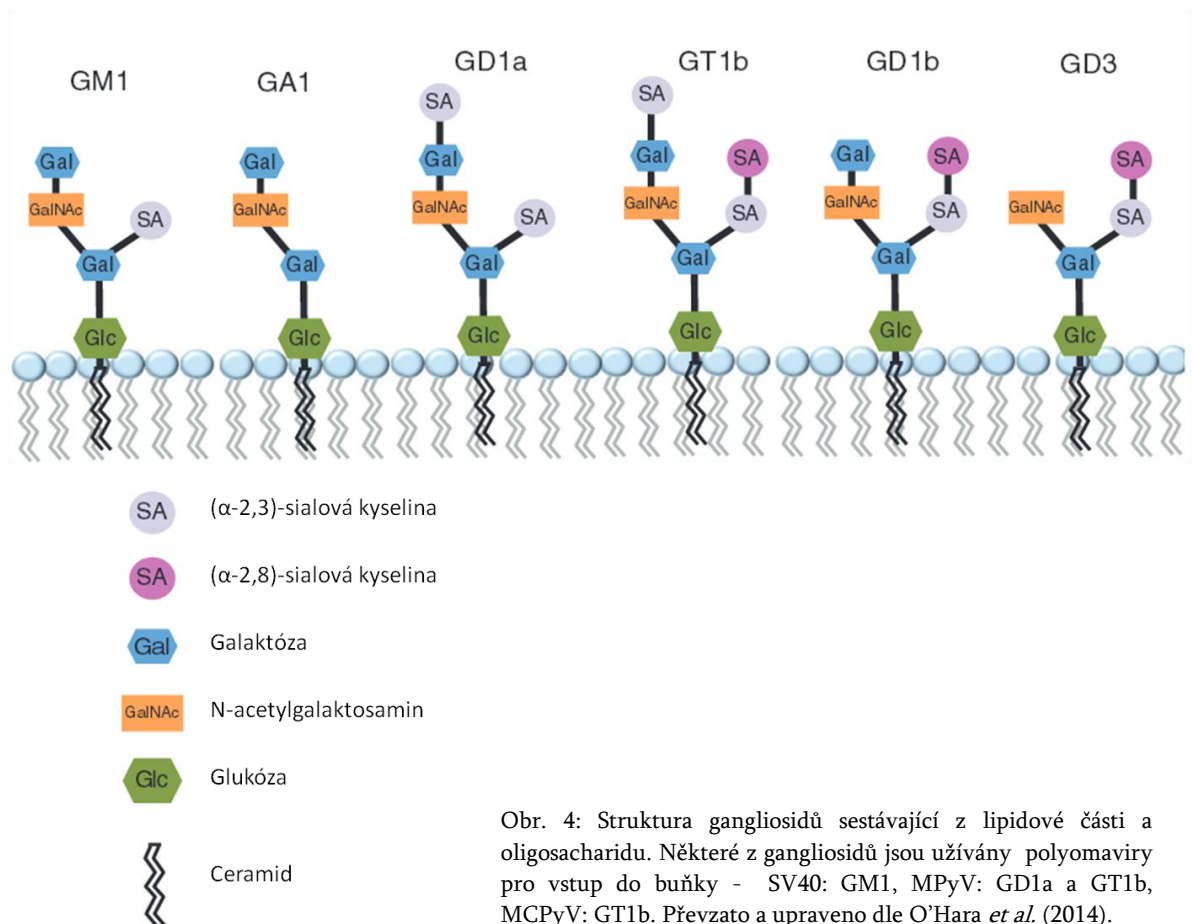
Polyomavirová infekce začíná přichycením viru na buněčný receptor, odkud je virus internalizován do časného endosomu (Liebl *et al.*, 2006), endolysosomálních váčků (Qian *et al.*, 2009) a dále do endoplasmatického retikula (ER; Pelkmans *et al.*, 2001). Během internalizace dochází ke konformační změně kapsidy, která vede k obnažení minoritních proteinů, jež možná napomáhají úniku z ER či vstupu do jádra [pravděpodobně díky viroporinové aktivitě minoritních proteinů, tedy schopnosti vytvářet póry v buněčné membráně (Rainey-Barger *et al.*, 2007)]. Virus se poté dostává do jádra, kde dochází k expresi časných genů, jež poté umožní replikaci virového genomu. Následuje exprese virových genů pozdní fáze infekce, která dává vzniknout kapsidovým proteinům. Kapsidové proteiny se po syntéze v cytoplasmě dostávají do jádra pomocí jaderného lokalizačního signálu. V jádře dochází k formaci virionů, které jsou do okolí uvolněny pomocí lyze buňky (Knipe a Howley, 2007). Mezi virovým potomstvem můžeme rozlišit plné infekční viriony, pseudoviriony a prázdné částice. Prázdné částice často tvoří agregáty a do okolních buněk zřejmě vstupují odlišnou cestou od virionů a pseudovirionů (shrnutí Neu *et al.*, 2009). Navíc pouze malé procento virionů je po internalizaci do dalších buněk schopno proniknout až do jádra, většina virionů je svedena na neproduktivní cestu, jež vede k degradaci (Mannová a Forstová, 2003).

Na rozdíl od permisivních buněk, které umožní pomnožení viru následované lyzí buňky, nepermisivní buňky replikaci viru neumožní a dochází zde pouze k expresi časných genů. Proteiny kódované těmito geny mají transformační potenciál, neboť vyvazují zásadní regulátory buněčného cyklu (p53 a pRb) a aktivují dráhy signální transdukce (skrze vyvázání protein fosfatázy pp2a, která defosforyluje proteiny fosforylované kinázami signálních drah a působí tedy proti jejich účinku). Takové buňky se tedy působením viru mohou změnit v nádorové (Imperiale, 2001).

2.1.5 Vstup polyomavirů do buňky

Co se týče průniku viru do buňky, používají polyomaviry netradiční přístup. Pro svůj vstup totiž nevyužívají proteinové či glykoproteinové receptory, jako je tomu u většiny virů, ale namísto nich váží glykosylované lipidy - gangliosidy. Gangliosidy patří mezi glykosfingolipidy a sestávají z ceramidu zanořeného do membrány, na něž je vázán oligosacharid obsahující kyselinu sialovou (obr. 4). Kyselina sialová (neboli kyselina N-acetylneuraminová, NeuNAc) může být na sacharid připojena vazbou (α -2,3), (α -2,6) nebo (α -2,8). Název gangliosidu je tvořen písmenem G (gangliosid), podle počtu molekul kyseliny sialové se označují GM (mono), GD (di), GT (tri) atd., následované číslicí odvozenou od způsobu dělení při chromatografii na tenké vrstvě. Vazba kyseliny sialové virionem následně vyvolá konformační změnu nejen hlavního, ale i minoritních kapsidových proteinů VP2 a VP3 a umožní tak další kroky životního cyklu viru (Cavaldesi *et al.*, 2004).

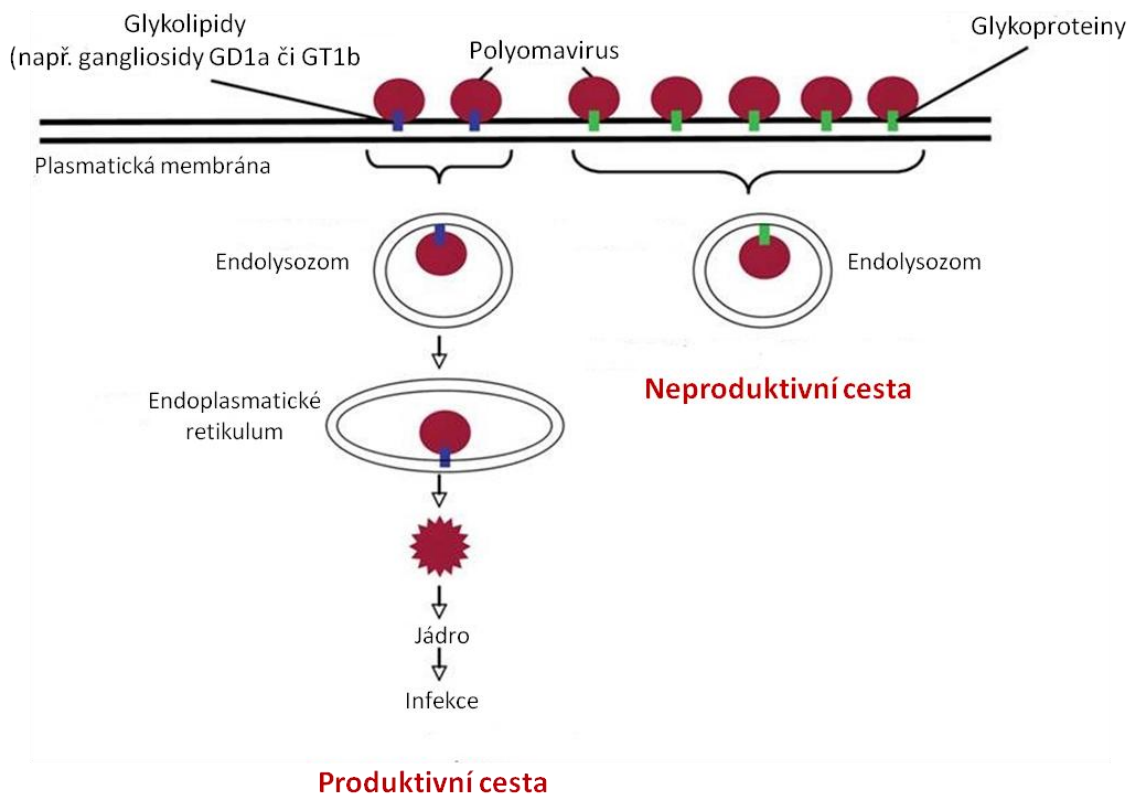
Jednotliví zástupci polyomavirů vyžadují pro svůj vstup interakci s různými gangliosidy. Viru SV40 slouží ke vstupu gangliosid GM1 (Tsai *et al.*, 2003), gangliosidy GD1b a GT1b zprostředkovávají vstup BK viru (Low *et al.*, 2006), skrze GT1b vstupuje také virus karcinomu Merkelových buněk (Erickson *et al.*, 2009). U JC viru je situace odlišná, zde zřejmě funguje nejprve pentamerní oligosacharid obsahující (α -2,6)-vázanou kyselinu sialovou – tetrasacharid laktosérie c (LSTc), odkud je virus nasměrován na serotoninový receptor 5-HT_{2A} (Assetta *et al.*, 2013). Volba těchto receptorů viru umožňuje infikovat oligodendrocyty a astrocyty v centrální nervové soustavě, kam se dostává skrze infekci B lymfocytů v krevním řečišti (Elphick *et al.*, 2004).



Obr. 4: Struktura gangliosidů sestávající z lipidové části a oligosacharidu. Některé z gangliosidů jsou užívány polyomaviry pro vstup do buňky - SV40: GM1, MPyV: GD1a a GT1b, MCPyV: GT1b. Převzato a upraveno dle O'Hara *et al.* (2014).

Vstup myšího polyomaviru do buňky je zprostředkován gangliosidy GD1a a GT1b (Tsai *et al.*, 2003), nově byl také nalezen gangliosid GT1a (Buch *et al.*, 2015). Přidání gangliosidu GD1a k buňkám, které gangliosidy postrádají, vede k vazbě a vstupu polyomaviru následovaném infekcí buňky (Gilbert a Benjamin, 2004; Gilbert *et al.*, 2005; Tsai *et al.*, 2003), což bylo potvrzeno dokonce i *in vivo*, kdy buňky vyjmuté z myši s přerušenu dráhou syntézy gangliosidů GD1a a GT1b, jež nebyly infikovatelné, po inkubaci s gangliosidy infekci umožnily (You *et al.*, 2015). Starší literatura uvádí, že gangliosidy slouží pro prvotní vazbu viru na povrch buňky, odkud je virus následně přesměrován na koreceptor pro vstup – $\alpha\beta 1$ integrin (Caruso *et al.*, 2003). Qian a Tsai (2010) se obecnou rolí glykoproteinů při infekci myším polyomavirem zabývali detailněji a zjistili, že myší polyomavirus váže kyselinu sialovou jak na povrchu lipidů, tak na povrchu proteinů, po vazbě sialyzovaného glykoproteinu je však sveden na endocytickou dráhu končící degradací v lysozomu či exocytózou viru a k infekci zpravidla nedojde, zatímco po vazbě na gangliosid je virus v komplexu s tímto gangliosidem internalizován do endoplasmatického

retikula a buňku infikuje (viz obr. 5). Nadměrná exprese modelových glykoproteinů infekci snížila díky kompetici s gangliosidy o vazbu viru, naopak odstranění glykoproteinů z plasmatické membrány zvýšilo transport viru do ER i infekci (autorům se však nepodařilo odstranit integriny, takže jejich vliv na infekci zůstává stále sporný). Udává se, že průchod viru endoplasmatickým retikulem je nezbytným krokem produktivní infekce (Magnuson *et al.*, 2005; Gilbert *et al.*, 2006; Lilley *et al.*, 2006). Zajímavé je, že maturované gangliosidy se běžně do endoplasmatického retikula nedostávají (Schwarzmann, 2001), tato transportní dráha je spouštěna právě po interakci s polyomavirem nebo také choleroým toxinem (Lencer a Tsai, 2003; Qian a Tsai, 2010). Qian *et al.* (2009) navíc zjistili, že nanočástice pokryté anti-GD1a protilátkou po interakci s GD1a na povrchu buňky byly společně s tímto gangliosidem internalizovány do ER.



Obr. 5: Osud polyomaviru po vstupu do buňky skrze glykolipidy či glykoproteiny. Po interakci s glykolipidem je polyomavirus navázaný na glykolipid internalizován do endolysozomu a dále do endoplasmatického retikula, odkud se dostává do jádra a může se zde pomnožit. Pokud však polyomavirus do buňky vstoupí prostřednictvím vazby glykoproteinu, je internalizován do endolysozomu, odkud je zaveden na degrační cestu a k infekci nedojde. Převzato a upraveno dle Qian a Tsai (2010).

Při charakterizaci gangliosidů jako receptorů polyomaviru byl také využit inhibitor tyrosinových kináz imatinib mesylát známý pod obchodním názvem Gleevec, užívaný například pro léčbu chronické myeloidní leukemie s nálezem Filadelfského chromozomu. Tyrosinové kinázy rodiny Abl jsou totiž zodpovědné za regulaci množství funkčních gangliosidů na povrchu buňky a to skrze inhibici membránové sialidázy Neu3, která z gangliosidů na povrchu plasmatické membrány odštěpuje kyselinu sialovou (Miyagi *et al.*, 2008). Aplikací Gleevecu na buňky tak dojde k inhibici kináz, které nemohou inhibovat sialidázy a sialidázy proto odštěpí kyselinu sialovou z gangliosidů, čímž znemožní vazbu polyomavirů (Swimm *et al.*, 2010). U myší linie NIH-3T3 permissivní pro MPyV, která exprimuje relativně velmi málo gangliosidu GD1a a žádný GT1b, docházelo po inkubaci s Gleevecem k poklesu detekovatelného gangliosidu GD1a na membráně a zároveň k poklesu vazby viru na buňky, a následně i k poklesu infekivity viru. Přidání GD1a k buňkám inkubovaným s Gleevecem z větší míry infektivitu obnovilo, což je opět důkazem, že gangliosidy jsou nezbytné pro úspěšnou infekci MPyV (Swimm *et al.*, 2010). Novější práce však jednoznačně prokázaly, že jejich role není spojena s vlastní vazbou viru na povrch buňky, protože gangliosidy nejsou nutné pro navázání viru na buňku (Buch *et al.*, 2015) ani pro jeho internalizaci (You *et al.*, 2015).

To je v příkrém rozporu s dříve všeobecně přijímaným názorem, že přichycení viru na buňku dokáže rozhodnout o průběhu celé infekce a zásadně určit tropismus viru. Starší strukturně-funkční studie z doby, kdy ještě nebyly specifické receptory polymavirů charakterizovány, předpokládaly, že záměna jediné aminokyseliny proteinu VP1 v místě zodpovědném za interakci s receptorem obsahujícím sialooligosacharid mění povahu interakce viru s povrchem buňky a ovlivňuje patogenitu viru (Freund *et al.*, 1991; Mezes a Amati, 1994; Bauer *et al.*, 1995). Novější studie s využitím cílené mutagenese dnes však jednoznačně prokazují, že bez ohledu na změnu afinity k povrchu buňky, infektivitu si polyomaviry zachovávají pouze v případě, že mutace VP1 proteinu změní specifitu pro konkrétní gangliosid ve prospěch jiného gangliosidu (Magaldi *et al.*, 2012; Neu *et al.*, 2013; Buch *et al.*, 2015).

Zajímavostí, danou nezvyklým výběrem lipidového receptoru, je objev Ewerse *et al.* (2010), kteří zjistili, že přichycení viru SV40 na gangliosid GM1 může samo o sobě vyvolat tvorbu membránových invaginací okolo místa interakce a to díky struktuře gangliosidů navázaných na virové částici, které zakříví membránu. Výběr gangliosidů jako vstupních receptorů má tedy skutečně významný dopad na životní cyklus polyomavirů.

2.2 Viru podobné částice

Některé viry, mezi něž polyomaviry beze sporu patří, z hlediska medicíny nepředstavují pouze protivníka, před kterým je třeba se bránit. Kapsidové proteiny polyomavirů a také některých dalších virů totiž dokáží samovolně zaujmout podobu virové kapsidy a vytvořit viru podobné částice nazývané VLPs (z anglického virus-like particles), které je možné využít k terapeutickým účelům. MPyV VLPs neobsahují virový genom a nejsou tedy infekční, mohou však obsahovat části DNA buněk, v nichž jsou produkovány a jsou také schopny do sebe cizorodou DNA zabalit (Štokrová *et al.*, 1999). Pro tvorbu VLPs nejsou třeba žádné posttranslační modifikace VP1 proteinu (Salunke *et al.*, 1986) a není nutná ani účast minoritních kapsidových proteinů (Montross *et al.*, 1991). Pro svůj vstup do buňky využívají stejnou cestu jako viriony (Richterová *et al.*, 2001) a jsou zřejmě schopny interagovat i s gangliosidy GD1a, GT1b (Smith *et al.*, 2003) a pravděpodobně také GT1a (Buch *et al.*, 2015).

Viru podobné částice mají nanometrové rozměry a mnoho unikátních vlastností. Díky schopnosti účinného vstupu do buněk, vysoké stabilitě, možnosti genetických či chemických manipulací, vnitřnímu prostoru pro zabalení látek a relativně levné a jednoduché produkci je možné využít je jako nanočástic pro biomedicínské aplikace. Lze je využít pro dopravu látek do buněk (může se jednat o léčiva, kontrastní látky pro diagnostiku či terapeutickou DNA). Proti myšímu polyomaviru nejsou v lidské populaci přítomny protilátky, proto lze uvažovat o VLPs odvozených od MPyV i pro klinické použití.

Na druhou stranu, pravidelná struktura VLPs složená ze 72 opakování pentamery působí jako imunologické adjuvans, svou velikostí je dokonce preferována pro pohlcení dendritickými buňkami (Fifis *et al.*, 2004; Grgacic a Anderson, 2006), proto VLPs mohou být využívány pro přípravu vakcín. Pro vakcinaci nemusí být využity pouze VLPs odvozené od viru, proti němuž chceme očkovat (např. JCV či BKV), ale můžeme připravit rekombinantní VLPs, které na svém povrchu vystavují imunodominantní epitopy jiných virů, případně markerů nádorových buněk, proti nimž si imunita, aktivovaná adjuvantním účinkem pravidelné struktury VLPs, vytvoří obranu. Dnes jsou již běžně používány VLPs vakcíny odvozené od papilomavirů pro vakcinaci proti rakovině děložního čípku a VLPs odvozené od viru hepatitidy B při očkování proti žloutence typu B.

Pro využití VLPs k terapii a diagnostice onemocnění je třeba zajistit, aby virové částice vstupovaly pouze do zvolených buněk. Často se ale typ tkáně, na kterou chceme viru podobné částice cílit, neshoduje s tkání, kam částice přirozeně vstupují, a je proto třeba viru podobné částice modifikovat a přesměrovat je na požadovaný typ buněk.

2.3 Směrování virů a viru podobných částic

Přesměrování virů zpravidla probíhá skrze interakci s povrchovou molekulou zvoleného buněčného typu, která viru slouží jako receptor pro vstup do buňky. Taková molekula musí tedy být charakteristická pro daný buněčný typ a musí po vazbě nanočástice umožnit internalizaci nanočástice. Při cílení na rakovinné buňky se například často využívá nadměrné exprese některých proteinů těmito buňkami, jež jsou ve zdravé tkáni exprimovány v nižším množství nebo vůbec, například receptor pro lidský epidermální růstový faktor 2 (HER2), jenž je nadměrně exprimován v mnoha typech nádorů (Yarden, 2001), annexin1 vyskytující se na povrchu endoteliálních buněk v nádorové tkáni (Oh *et al.*, 2004), folátový receptor, který se ve zvýšené míře vyskytuje nejen na povrchu buněk nádoru prsu (Coney *et al.*, 1991) či membránový antigen specifický pro nádor prostaty (PSMA; Israeli *et al.*, 1993).

Metod, jak přesměrovat viry na tyto cílové molekuly, byla již vyvinuta celá řada. Kapsida či obal viru jsou při nich modifikovány tak, aby se specificky vázaly pouze na tyto molekuly. Způsoby modifikace viru se dají rozdělit na chemické a genetické.

Při genetických modifikacích je do sekvence kapsidového či obalového virového proteinu umístěna sekvence směřující molekuly a to buď insercí či substitucí oblastí zodpovědných za interakci s receptorem. Může jít o ligand cílového receptoru, fragment protilátky proti dané molekule či pouze krátký peptid, o kterém je známo, že se na cílovou molekulu s dostatečnou afinitou váže. Takový peptid lze získat například metodou zvanou fágová „display“, v níž je knihovna náhodných peptidů fúzována s kapsidovými proteiny bakteriofága, který tak na svém povrchu tento peptid vystaví (proto display). Molekula, k níž hledáme interagující peptid je navázána na matici a je inkubována s fágovou knihovnou. Z fágů, které se navážou na cílovou molekulu je poté sekvencí jejich genomu zjištěna sekvence peptidu zodpovědného za interakci (Smith, 1985). Je však třeba myslet na to, že umístěním takového peptidu do kontextu virové částice může dojít k pozměnění jeho vazebné schopnosti a stejně tak i cílová molekula v kontextu

celé buňky již s nalezeným peptidem interagovat nemusí. Do genetických metod také řadíme metody založené na náhodné mutagenезi a selekci, kterým bude věnována samostatná kapitola.

Při chemických modifikacích je ke kapsidě či obalovému proteinu viru chemicky připojena směřující molekula, která je schopná vázat svého interakčního partnera na povrchu cílové buňky. Připojení molekuly může být realizováno biokonjugací přes zbytky aminokyselin s reaktivními skupinami: aspartát, glutamát, cystein a lysin. Příkladem může být aktivace karboxylové skupiny zbytku aspartátu či glutamátu jedné molekuly pomocí N-hydroxysukcinimidu (NHS) a 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-karbodiimidu (EDC) následovanou vytvořením amidové vazby s aminem lysinových zbytků druhé molekuly (Steinmetz, 2010). Hojně je v současné době pro připojení molekul využíváno principu tzv. „klik chemie“ tedy reakci azidu na jedné a alkynu na druhé molekule katalyzovanou měďným kationtem, kdy azidové a alkynové skupiny mohou být do molekul zavedeny pomocí zmíněné NHS modifikace lysinových zbytků (Cho *et al.*, 2014). Připojení může být také realizováno skrze silné nekovalentní interakce, např. interakce avidin-biotin (Chen *et al.*, 2013). Chemické modifikace tak nabízejí širší spektrum způsobů přesměrování, není zde totiž tak přísné omezení velikosti připojované molekuly, jako je tomu u genetických modifikací a nemusíme se tolik obávat o zachování stability částic přímým zásahem do jejich struktury. K virům a virovým částicím tak můžeme připojit protilátky nebo jejich části, celé proteiny (například ligandy či inhibitory cílových molekul), případně syntetické vysokoafinitní molekuly jako aptamery [jednovláknové oligonukleotidy zaujímající definovanou 3D strukturu (Cerchia *et al.*, 2002)], affibody či DARPiny [malé proteiny napodobující protilátky s vysokou antigenní specifitou (Skerra, 2007)].

Při směrování viru je zpravidla také zároveň třeba zamezit využívání přirozeného receptoru viru. Pokud zrušení původního tropismu nebylo způsobeno samotným směrováním, lze jej dosáhnout mutací oblasti zodpovědné za vazbu receptoru. Při chemické konjugaci větších molekul často tyto molekuly zakrývají místa zodpovědná za interakci s původním receptorem a ta již nejsou interakci přístupná a není tedy třeba se původním tropismem zabývat. Hojně užívaným přístupem je také obalení částic polyethylenglykolem (PEG), který snižuje veškeré interakce částice s jinými molekulami, navíc také prodlužuje čas setrvání částice v krevním řečišti, zvyšuje celkovou stabilitu částic a také snižuje imunogenicitu částic, což je pro terapeutické látky výhodné (Gref *et al.*, 1997; Lewis *et al.*, 2006).

2.3.1 Usměrněná evoluce

Co se genetického přesměrování týče, dosud uváděné způsoby byly příkladem tzv. racionálního designu, kdy na základě znalosti podstaty interakce viru s cílovou buňkou cíleně zaměníme klíčové aminokyselinové zbytky vedoucí k požadovanému přesměrování, tedy například vložíme do struktury viru peptid, o kterém je známo, že se na konkrétní receptor váže. Pokud však takový peptid znám není, případně není známa žádná molekula typická pro cílové buňky, existuje také druhý způsob, jakým lze změny vazebných vlastností dosáhnout. Tento způsob spoléhá na náhodu a je nazýván usměrněná evoluce, neboť napodobuje proces přirozené evoluce tím, že gen kódující protein našeho zájmu je nejprve náhodně mutován, čímž je vytvořena rozsáhlá knihovna mutantů, z níž je poté mutant s požadovanou vlastností vybrána selekcí či testováním vlastností.

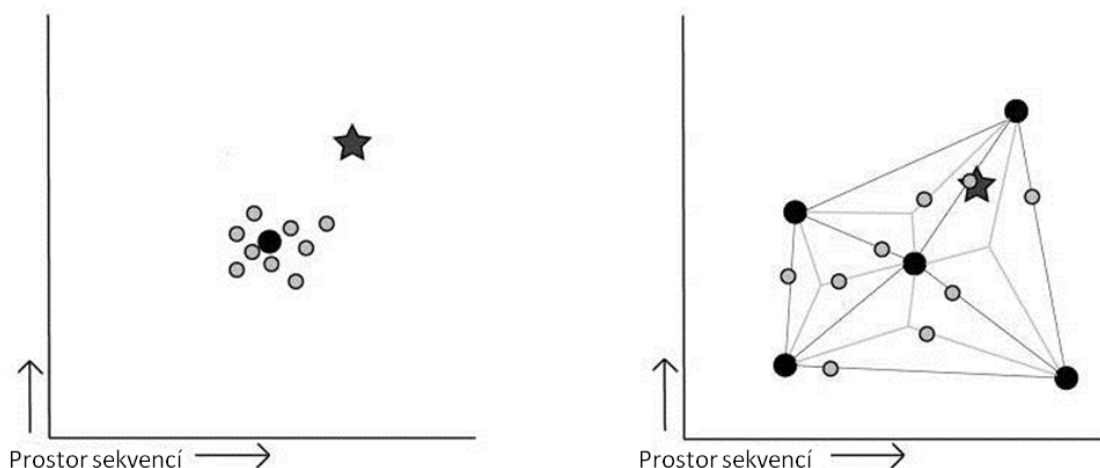
Nejběžnější metodou, jak lze gen náhodně mutovat, je polymerázová řetězová reakce provedená v mutagenních podmínkách, tzv. „error-prone PCR”. Těmi může být v nejjednodušším provedení použití DNA polymerázy bez 3' → 5' opravné exonukleázové aktivity. Sklon zanášet do amplifikované sekvence chybné báze lze podpořit například zvýšením množství Mg²⁺ iontů či přidáním Mn²⁺ iontů, do reakční směsi (Wilson a Keefe, 2001). Existují také komerční enzymy připravené speciálně pro tyto účely (například Mutazyme® II DNA polymeráza, Stratagene). Případně lze do reakce vedle deoxyribonukleosidtrifosfátů přidat navíc analogy nukleotidů, jejichž zabudování vede v dalším kole amplifikace k zařazení chybné báze do komplementárního vlákna DNA.

Dalším způsobem jak vytvořit knihovnu mutovaných sekvencí může být metoda zvaná „DNA shuffling”, česky lze přeložit jako míchání DNA. Jde o náhodnou rekombinaci mezi několika příbuznými geny. Homologní geny jsou v prvním kroku náhodně štěpeny DNázou I a v následujícím kroce dojde během polymerázové řetězové reakce (PCR) ke spojení jednotlivých fragmentů tak, že vytvoří gen poskládaný z různých částí různých vstupních genů. Do této PCR reakce se nepřidávají primery, neboť roli primerů zastanou naštěpené fragmenty, které se různou měrou překrývají s ostatními a mohou tedy na sebe vzájemně nasedat. Od toho také anglický název „self-priming PCR”. V posledním kroce se výsledný produkt namnoží v klasické PCR reakci s využitím primerů komplementárních k začátku a konci genu (Stemmer, 1994a, 1994b). Metoda „DNA shuffling“ byla poprvé použita ke zvýšení účinnosti enzymu TEM-1 β-laktamázy při štěpení antibiotika cefotaximu pro zvýšení rezistence bakterií vůči tomuto antibiotiku. Po několika kolech

procesu „DNA shuffling“ a selekce nejschopnějších mutant dosáhl Stemmer (1994b) 32 000x vyšší rezistence bakterií vůči antibiotiku. Použití metody „DNA shuffling“ má díky pouhému promíchání kódujících sekvencí větší naději přiblížit se požadované funkci než náhodné mutování (viz obr. 6; Meyer *et al.*, 2014) a ze stejného důvodu při použití této metody oproti náhodné mutagenезi nedochází v takové míře ke vzniku stop kodonů (Joern, 2003).

Metoda usměrněné evoluce tedy přináší výhodu oproti racionálnímu designu – není třeba znát strukturu ani mechanismus funkce proteinu našeho zájmu, abychom jeho vlastnosti změnili. Usměrněná evoluce byla již mnohokrát využita ke změně funkce cílového proteinu ve smyslu zvýšení termostability, zesílení vazebné afinity či k získání enzymatické aktivity na nových neobvyklých substrátech (Kumar a Singh, 2013). Stejně tak byla již tato metoda mnohokrát aplikována ve snaze přesměrovat viry na cílové buňky. Zde může velmi napomoci „DNA shuffling“, neboť vložením několika sekvencí kódujících kapsidové proteiny příbuzných virů do reakce, kdy každý z těchto virů má jiné spektrum hostitelů a využívá jiný receptor, zvýší pravděpodobnost přesměrování viru na podobný receptor i změny tropismu (Jang *et al.*, 2007).

Některé analýzy říkají, že samotnou náhodnou mutagenезí a selekcí lze jen těžko docílit zisku nové funkce, jakou potřebujeme. Ze srovnání využití racionálního designu versus usměrněné evoluce pro přípravu katalyzátorů jednoduchých chemických reakcí vyplývá, že pro zvýšení pravděpodobnosti nalezení proteinů s požadovanými vlastnostmi je vhodnější nespoléhat jen na náhodné mutace, ale zvýšit pravděpodobnost tím, že sekvenci kódující protein nejprve genetickou modifikací upravíme na základě dat z počítačových modelů, a teprve potom se ji náhodnými mutacemi snažíme lépe přizpůsobit kýžené funkci (Kipnis a Baker, 2012). Případně aplikujeme náhodnou mutagenезi pouze na okolí předpokládaných aktivních míst (Giger *et al.*, 2013).



Obr. 6: Obrazné vyjádření šance nalezení cílové sekvence pomocí metod „error-prone PCR“ a „DNA shuffling“. Body představují jednotlivé sekvence, osy představují vzdálenosti sekvencí. Čím blíže jsou si body, tím jsou si sekvence podobnější. Vlevo: „Error-prone PCR“ – černý bod vyjadřuje výchozí sekvenci, šedé body jsou sekvence vzniklé náhodnou mutagenezí, které leží blízko původní sekvence a mají nízkou šanci vytvořit zcela novou funkci (hvězdička). Vpravo: „DNA shuffling“ – černé body znamenají několik výchozích sekvencí, šedé body vznikají promícháním těchto sekvencí. Tyto funkční a v prostoru sekvencí vzdálené sekvence mají vyšší pravděpodobnost dát vzniknout nové funkci. Upraveno dle Meyer *et al.* (2014).

2.4 Teranostika

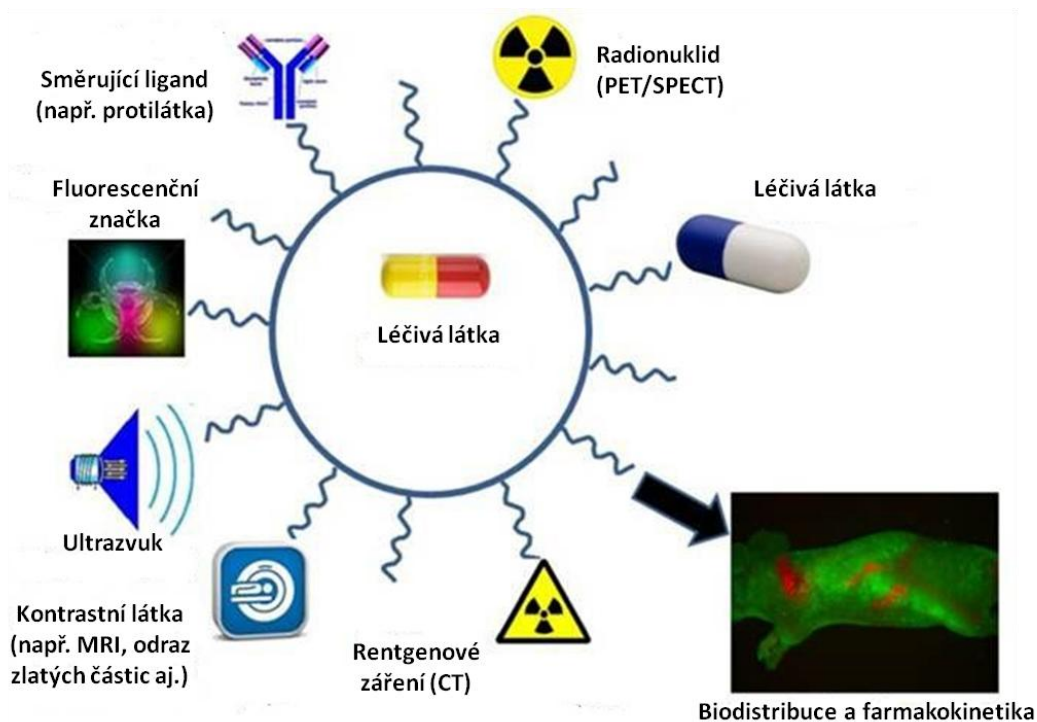
Pokrokovou myšlenkou dnešní medicíny je zavedení konceptu teranostiky. Jedná se o představu spojení diagnostiky a terapie do jediného kroku, využitelnou zejména při léčbě a diagnostice rakoviny, kde je takové řešení nejvíce potřebné.

Teranostika je založena na použití látek, které mají schopnost specificky označit postiženou tkáň pro její vizualizaci a zároveň do postižené tkáně doručit léčivo. Vizualizovatelné značení teranostické látky umožní zobrazit všechna ložiska postižených buněk a získat informaci o biodistribuci, způsobu dopravy do buňky, farmakokinetice a terapeutickém účinku dopravovaného léčiva. Je to krok k personalizované medicíně schopné určit, zda u daného pacienta léčba účinkuje nebo je nutné zvolit jiný léčebný přístup.

Látku využitelnou pro teranostiku (často se jedná o nanočástice) si tedy představme jako velmi multifunkční nástroj obsahující následující prvky (viz obr. 7; Kelkar a Reineke, 2011; Ding a Wu, 2012):

- Terapeutická látka: terapeutická nukleová kyselina, chemoterapeutikum či látky pro léčbu pomocí hypertermie, fotodynamiky, radiační terapie, rentgenových paprsků nebo volných radikálů

- Značící sondy: kontrastní látky pro zobrazování magnetickou rezonancí (MRI) nebo počítačovou tomografií (CT), fluorescenční značky (organické povahy či quantum dots), nukleární zobrazovací látky pro pozitronovou emisní tomografii (PET) či jednofotonovou emisní výpočetní tomografii (SPECT)
- Schránka, do níž je možné zabalit léčivou látku a jejíž povrch lze modifikovat vizualizovatelnými značkami
- Směřující molekuly na povrchu částice, jež zajistí interakci s cílovou tkání



Obr. 7. Schema nanočástice využitelné pro teranostiku. Nanočástice modifikované směrujícím ligandem lze využít pro doručení léčivé látky, zobrazení pomocí metod MRI, PET či SPECT, CT či detekci pomocí fluorescence nebo vyšetření pomocí ultrazvuku. Převzato a upraveno dle Ding a Wu (2012).

Dlouhodobým cílem naší laboratoře je použít a upravit VLPs - nanočástice odvozené od polyomavirů tak, aby se mohly stát účinným teranostickým nástrojem. Tato práce je součástí tohoto projektu.

2.5 Rakovina prostaty

Rakovina prostaty je v současné době nejrozšířenějším nádorem v mužské populaci Evropy (Ferlay *et al.*, 2013), proto je na ni zaměřena pozornost mnoha výzkumných skupin a je tedy dobře

prozkoumaným modelem rakoviny. Postihuje zejména muže ve věku starším 50 let a může tvořit metastáze v kostech a lymfatických uzlinách.

Pro diagnostiku rakoviny prostaty je podstatný výskyt tohoto onemocnění v rodině. Pročasné odhalení rakoviny prostaty se používá zejména vyšetření prostaty přes konečník (pohmatem je zkoumán povrch předstojné žlázy) a stanovení hladiny PSA v krvi. PSA neboli prostatický specifický antigen, je protein produkovaný prostatickou tkání, jehož zvýšená hladina v krvi naznačuje možný vznik rakoviny prostaty v těle pacienta a pacientovi je na základě něj provedena biopsie prostatické tkáně, která rakovinu prostaty potvrdí nebo vyloučí. Zásadním problémem však je, že ke zvýšení hladiny PSA může dojít například i při zánětu prostaty či benigní hyperplázii prostatické tkáně a navíc, hladina PSA v krvi stoupá s věkem (Lilja *et al.*, 2008). Další nevýhodou stanovení PSA je obtížné určení prahové hodnoty, od které se dá říci, že se s jistotou jedná o rakovinu prostaty. Testování hladiny PSA navíc původně nebylo zavedeno pro časnou diagnostiku rakoviny prostaty, ale pouze pro sledování stavu nádoru při odpovědi na léčbu tohoto onemocnění (Croswell *et al.*, 2011). PSA tak není spolehlivým markerem onemocnění rakovinou prostaty, mnoho pacientů je na základě jeho stanovení označeno jako pozitivních a narušení psychiky z obavy z nemoci (Fowler *et al.*, 2006) a infekce vedoucí až k septickým šokům po zbytečné biopsii prostaty (Rietbergen *et al.*, 1997) těžko vyvažují prospěch z odhalení skutečné rakoviny prostaty u malého procenta pacientů, u nichž navíc ve většině případů nikdy nedojde k ohrožení života nádorem (Welch a Black, 2010). Konkrétně na jednoho pacienta, kterému diagnostika zachránil život, připadá 48 mužů, u nichž může zbytečná léčba způsobit život ohrožující komplikace (Schröder *et al.*, 2009). Z tohoto důvodu je třeba hledat nové a spolehlivější způsoby diagnostiky.

Pro léčbu rakoviny prostaty je v praxi využíváno chirurgické odstranění předstojné žlázy (tzv. prostatektomie) nebo radioterapie [analýzy hovoří pro preferenční výběr prostatektomie z důvodu vyšší mortality pacientů podstupivších radioterapii (Jaunarena *et al.*, 2016; Wallis *et al.*, 2016)]. Případně, pokud se jedná o časná stádia rakoviny prostaty, lze se přiklonit pouze k pravidelnému sledování pacienta. V případě nálezu metastáz se nasazuje hormonální léčba, která má zabránit tvorbě testosteronu (provádí se farmakologickou či chirurgickou kastrací), čímž omezí růst nádoru. Někdy však aplikací hormonální léčby dojde k vytvoření tzv. kastrálně rezistentní formy nádoru. Potom musí na řadu přijít chemoterapie a nové hormonální preparáty jako abirateron (Zytiga®) či enzalutamid (Xtandi®), nebo je podán alfa zářič radium-223

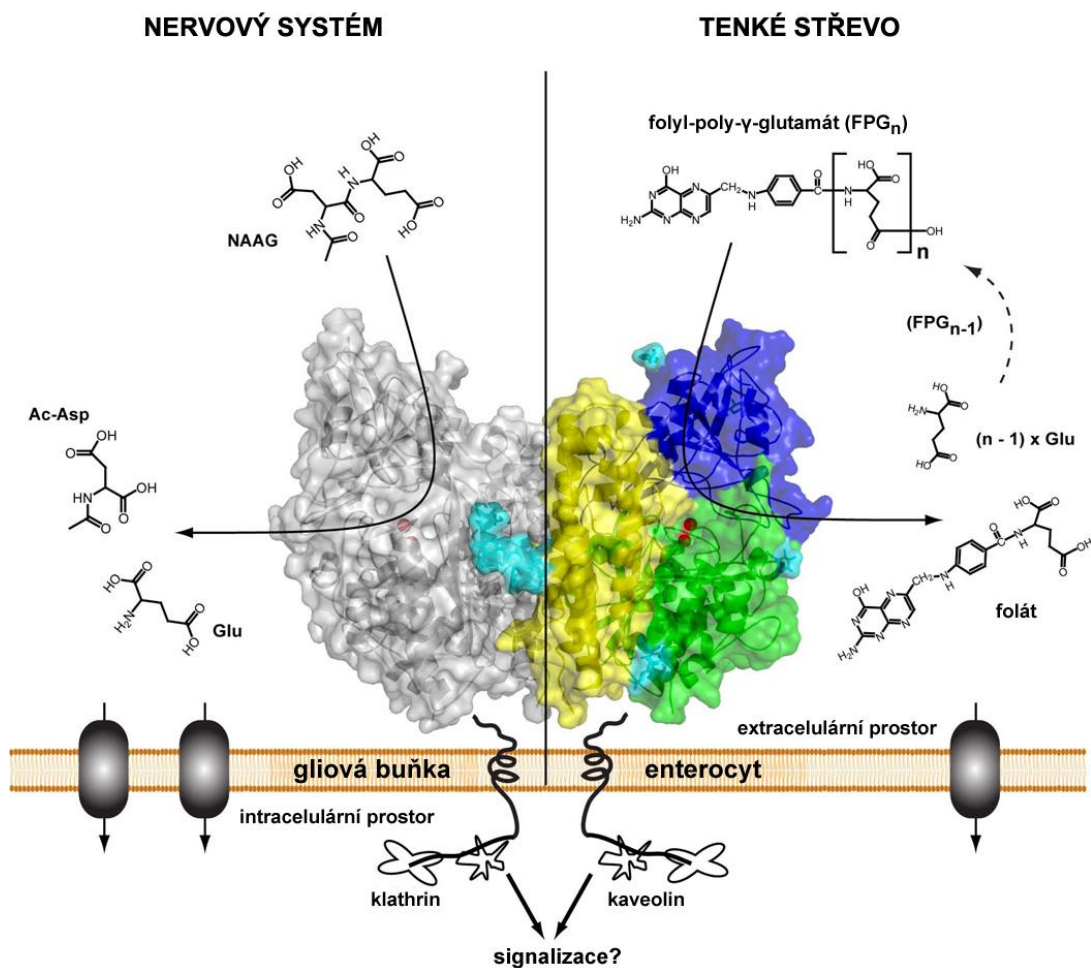
(Xofigo®) (Gillessen *et al.*, 2015). Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) schválenou metodou pro personalizovanou léčbu rakoviny prostaty je vakcína stimulující imunitní systém k boji proti rakovinným buňkám zvaná sipuleucel-T (Provenge®; Anassi a Ndefo, 2011). Zejména kvůli vážným vedlejším účinkům běžných technik se v současnosti pracuje na vývoji přesnějších diagnostických i terapeutických technik, které by dokázaly mimo jiné rozlišit běžnou formu rakoviny od agresivní.

Při snaze specificky cílit nádorové buňky prostaty pro nalezení více specifického způsobu diagnostiky a léčby bylo nalezeno několik charakteristických membránových markerů někdy nejen prostatických nádorových buněk:

- Receptor pro natriuretický peptid A (Wang *et al.*, 2011)
- Receptor pro peptid uvolňující gastrin (Bartholdi *et al.*, 1998)
- Manóza-6-fosfátový receptor (Vaillant *et al.*, 2015)
- Prostatický specifický membránový antigen (Israeli *et al.*, 1993)
- Sigma-1 a sigma-2 receptor (Vilner *et al.*, 1995)

2.5.1 PSMA a jeho cílení

PSMA je označení pro membránový antigen specifický pro nádor prostaty. Jedná se o transmembránový protein (o velikosti přibližně 100 kDa; obr. 8), který je v nadměrném množství vystavován na povrchu velké většiny nádorových buněk prostaty a také v systému cévního zásobení mnohých dalších solidních nádorů (Chang *et al.*, 1999). Vyskytuje se však i na povrchu některých zdravých tkání (proximálních renálních tubulů, nadvarlat, vaječníků, tenkého střeva a astrocytů centrální nervové soustavy) a v malé míře i ve zdravé prostatické tkáni (Mhawech-Fauceglia *et al.*, 2007; Silver *et al.*, 1997). PSMA vykazuje metaloproteázovou enzymatickou aktivitu v závislosti na tkáňové lokalizaci a je též označován jako glutamátcarboxypeptidáza II (GCPII) či NAALADáza z angl. N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase. Ve střevní sliznici plní funkci folát hydrolázy zprostředkováním kyseliny listové z poly- γ -glutamylovaného folátu střevním buňkám, jež možná pohání metabolismus folátu také v nádorové tkáni a tím zvyšuje její proliferaci (Yao *et al.*, 2010). V nervové soustavě a ledvinách potom odštěpuje glutamát z N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamátu a hraje tak roli při přenosu signálu, neboť obě látky zastávají funkci neurotransmiteru (Robinson *et al.*, 1987).



Obr. 8. Schema homodimeru lidského membránového antigenu specifického pro nádor prostaty (PSMA). Jeden monomer (vpravo) je zobrazen poloprůhledně s barevným označením jednotlivých domén extracelulární části proteinu. Proteázová doména je zobrazena zeleně, apikální doména je zobrazena modře, C-koncová doména je zobrazena žlutě. Druhý monomer (vlevo) je zobrazen poloprůhledně šedou barvou. N-vázané cukerné zbytky jsou zobrazeny tyrkysově, Zn²⁺ ionty aktivního místa jsou zobrazeny jako červené kruhy. **Levý panel:** V plasmatické membráně astrocytů a Schwannových buněk je PSMA zodpovědný za katabolismus N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamátu (NAAG) – nejvíce zastoupeného peptidového neurotransmiteru v savčím nervovém systému. Produkty reakce jsou N-acetylaspartát a glutamát, které jsou selektivně transportovány do gliových buněk, metabolizovány a znovu použity pro syntézu NAAG v neuronech. **Pravý panel:** V plasmatické membráně enterocytů proximálního jeuna PSMA sekvenčně hydrolyzuje C-koncový γ -glutamát z poly- γ -glutamovaného folátu (FPG_n). Finálním produktem reakce je folát, který může být transcytózou transportován do krevního řečiště. Převzato a upraveno dle Bařínka *et al.* (2012).

V současné době probíhá nepřeberné množství studií zabývajících se cílením na PSMA, ať již pomocí anorganických částic, polymerních částic či částic odvozených od virů za účelem diagnostiky, léčby i jejich kombinace (teranostiky) nádorových buněk prostaty (Shobana *et al.*, 2013; Banerjee *et al.*, 2014; Moon *et al.*, 2014; Fuchs *et al.*, 2015). Pro směřování je užívána řada způsobů – od směřování protilátkami proti PSMA, přes aptamery, specifické inhibitory PSMA či

směřující peptidy (Aggarwal *et al.*, 2006; Eder *et al.*, 2014; Tykvart *et al.*, 2014; Pfestroff *et al.*, 2015). Mnohé z nich se nacházejí nebo již prošly klinickým testováním¹.

V naší laboratoři byl využit přístup přesměrování viru podobných částic odvozených od myšího polyomaviru na molekulu PSMA pomocí interakce se směrujícím peptidem (Suchanová, 2012). Směřující peptid byl vybrán na základě fágové „display” (Lupold a Rodriguez, 2004) a kódující sekvence pro tento peptid byla substitucí vložena do sekvence kódující povrchovou smyčku BC kapsidového proteinu VP1 (BCsub MPyV VLPs). Výsledné částice byly stabilní a přestaly se vázat na kyselinu sialovou (testováno pomocí vazby na červené krvinky, na něž se divoký MPyV váže) a do přirozeně permissivních buněk 3T6 prakticky nevstupovaly. Bohužel se však ukázalo, že ačkoli se výše zmíněné částice váží na molekulu PSMA ukotvenou na povrchu matrice skrze vazbu streptavidin-biotin, molekulu PSMA v kontextu nádorových buněk prostaty LNCaP vázat nedokážou (Žáčková Suchanová, nepublikovaná data).

Dalším způsobem cílení testovaným v naší laboratoři byla chemická konjugace inhibitoru PSMA (Tykvart *et al.*, 2014) na MPyV VLPs. Ke zvýšení specifity vazby modifikovaných částic na PSMA v kontextu nádorových buněk oproti MPyV VLPs divokého typu však opět nedošlo (Žáčková Suchanová, nepublikovaná data).

¹ http://www.pcf.org/site/c.leJRIROrEpH/b.5849073/k.9B21/Clinical_Trials.htm,
<https://www.centerwatch.com/clinical-trials/listings/condition/36/prostate-cancer>

3 CÍLE PRÁCE

Tato práce si kladla za úkol prozkoumat možnosti, které nabízí metoda usměrněné evoluce pro přípravu virových částic se změněnými vazebnými schopnostmi. Konkrétně se práce zabývala manipulací myšího polyomaviru (MPyV). Po zavedení náhodných mutací do kapsidy viru a následné cílené selekci mutovaných virů by měly viry ztratit původní tropismus a specificky se vázat či vstupovat především do cílových buněk - modelových nádorových buněk prostaty. Byly tedy definovány dva hlavní cíle práce:

- 1) Zavést efektivní systém pro generování náhodných variant myšího polyomaviru s mutacemi v hlavním kapsidovém proteinu.
- 2) Ověřit funkčnost navrženého selekčního schématu a případně jej modifikovat tak, aby došlo k výběru takových variant myšího polyomaviru, které se budou vázat na nádorové buňky prostaty s vysokou afinitou.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Materiál

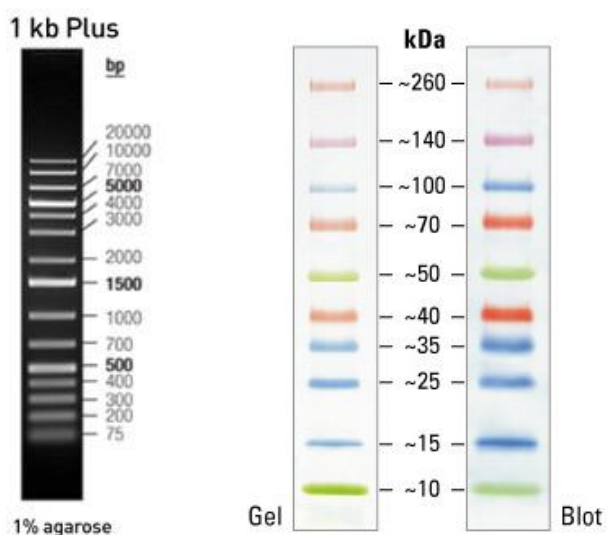
4.1.1 Markery molekulových vah

DNA marker pro DNA elektroforézu: GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific; obr. 9 vlevo)

Barevný proteinový marker pro SDS-PAAGE následovanou metodou “Western blot”: Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific; obr. 9 vpravo)

Modrý proteinový marker pro SDS-PAAGE následovanou barvením Coomassie Brilliant Blue: Prestained Molecular Weight Marker, M.W. 27,000-180,000 (Sigma-Aldrich); proteiny použité v markeru:

- α 2 – makroglobulin (173 kDa)
- β – galaktosidáza (114 kDa)
- Fruktózo-6-fosfátkináza (96 kDa)
- Pyruvátkináza (66 kDa)
- Fumaráza (59 kDa)
- Laktátdehydrogenáza (38 kDa)
- Triózofofosfátizomeráza (32 kDa)



Obr. 9. Používané markery molekulových vah. Vlevo DNA marker GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), vpravo proteinový marker Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific) www.thermofisher.com

4.1.2 Kultivační média

Kultivační média pro bakterie

SOC médium: 2% (w/v) pepton pro bakteriologii (Imuna), 0,5% (w/v) kvasničný extrakt (Imuna), 10 mM NaCl (Sigma), 2,5 mM KCl (Lachema), 20 mM glukóza (Serva), 10 mM MgCl₂ (Sigma), 10 mM MgSO₄ (Sigma). Roztoky MgCl₂ a MgSO₄ připraveny 100 mM, sterilizovány zvlášť, do média přidány těsně před použitím.

TPN médium: : 2% (w/v) pepton pro bakteriologii (Imuna), 0,5% (w/v) kvasničný extrakt (Imuna), 0,5% (w/v) NaCl (Sigma)

LB médium (Luria-Bertani médium): 1% (w/v) pepton pro bakteriologii (Imuna), 0,5% (w/v) kvasničný extrakt (Imuna), 1% (w/v) NaCl

Kultivační média pro savčí buňky

Médium DMEM se sérem: DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; Sigma), 10% (v/v) fetální sérum z telete (Sigma), 2mM L-glutamin (Gibco)

Médium DMEM bez séra (BSM DMEM): DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; Sigma), 2mM L-glutamin (Gibco)

Médium IMDM se sérem: IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium; Sigma), 10% (v/v) fetální sérum z telete (Sigma), 2mM L-glutamin (Gibco)

Médium RPMI: RPMI-1640 (Sigma)

DPBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline; Lonza)

4.1.3 Antibiotika

Antibiotika pro selekci bakteriálních buněk

Ampicilin (Biomedika), koncentrace v médiu 100 µg/ml

Antibiotika pro selekci savčích buněk či pro obranu savčích buněk před kontaminací

Směs antibiotik pro tkáňové kultury (Sigma), zásobní roztok je 100x koncentrovaný

Zeocin™ (InvivoGen), koncentrace v médiu 2 mg/ml

G-418 (Geneticin; Thermo Scientific), koncentrace v médiu 400 µg/ml

4.1.4 Enzymy

Vent[®] DNA polymeráza (NEB)

High Fidelity PCR Enzyme Mix (Thermo Scientific)

Phusion[®] High-Fidelity DNA Polymerase (NEB)

Advantage[®] HD polymerase (Clontech)

DNáza I (Roche)

Restrikční endonukleázy (Fermentas, NEB)

Neuraminidáza z *Vibria cholerae* (Sigma)

Aprotinin (Sigma)

Trypsin (Sigma)

Accutase[®] solution (v práci nazývána akutáza; Sigma)

4.1.5 Často užívané roztoky

1x PBS (fosfátový pufr): 0,137 M NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ · 12 H₂O, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,4

Versen: 0,25% EDTA v PBS (Sevac)

Trypsin: 0,25% Trypsin (Sigma) v PBS

Pufr B: 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,01 mM CaCl₂

EDTA-NaOH (pH 8,0): 0,5 M EDTA, pH upraveno pomocí NaOH na hodnotu 8,0

4.1.6 Komerční soupravy

GenElute[™] HP Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich)

- Izolace plasmidu z bakteriální kultury

JetStar[™] 2.0 Endotoxin-free Maxiprep Kit (Genomed)

- Maxipreparace plasmidu z velkého objemu bakteriální kultury

NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel)

- Přechištění PCR směsi po PCR nebo po izolaci PCR z gelu

GeneMorph II Random Mutagenesis Kit (Stratagene)

- Náhodná mutageneze pomocí enzymu “Mutazyme[®] II polymerase”

JBS dNTP-Mutagenesis Kit (Jena Bioscience)

- Náhodná mutageneze pomocí mutagenních analogů nukleotidů

JBS DNA-Shuffling Kit (Jena Bioscience)

- Náhodná rekombinace homologních genů metodou “DNA shuffling”

In-Fusion[®] HD Cloning (Clontech)

- Klonování mutovaných VP1 genů do vektoru

Cell Line Nucleofector[®] Kit (Lonza)

- Transfekce savčích buněk metodou Nukleofekce[®]

Qubit[®] dsDNA HS Assay Kit a Qubit[®] dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen)

- Stanovení koncentrace DNA ve vzorku

Qubit[®] Protein Assay Kit (Invitrogen)

- Stanovení koncentrace proteinů ve vzorku

4.1.7 Primery pro PCR

Pro přípravu MPyV VP1 genu:

Ev-MPyV-start-fw: 5' – TCATAGAGGAAGATG GCCCCCAAAG – 3'

- Nasedá na začátek VP1 genu, žlutě je vyznačen iniciační kodon ATG, modře část sekvence plasmidu pBS-PyI ležící za VP1 genem

Ev-MPyV-stop-rw: 5' – TGTAATGTGCAAGAAGGCGACGAC – 3'

- Nasedá za konec VP1 genu

Pro přípravu SV40 VP1 genu:

Ev-SV40-start-fw: 5' – TCATAGAGGAAGATGAAGATGGCCCAACAAAAAGAAA
AGGAAG – 3'

- Nasedá na začátek VP1 genu, modře je vyznačen nástavec komplementární k vektoru, žlutě je vyznačen iniciační kodon ATG

Ev-SV40-stop-rw: 5' – TCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAA – 3'

- Nasedá na konec VP1 genu

Pro přípravu JCV VP1 genu:

Ev-JC-start-fw: 5' – TCATAGAGGAAGATGGCCCCAACAAAAAGAAAAGGAGAA
AGG– 3'

- Nasedá na začátek VP1 genu, modře je vyznačen nástavec komplementární k vektoru, žlutě je vyznačen iniciační kodon ATG

Ev-JC-stop-rw: 5' – TTACAGCATTTTTGTCTGCAACTGTCCAT – 3'

- Nasedá na konec VP1 genu

Pro přípravu BKV VP1 genu:

Ev-BK-start-fw: 5' – TCATAGAGGAAGATGGCCCCAACCAAAAAGAAAAGGAGAGT– 3'

- Nasedá na začátek VP1 genu, modře je vyznačen nástavec komplementární k vektoru, žlutě je vyznačen iniciační kodon ATG

Ev-BK-stop-rw: 5' – TTAAAGCATTTTTGGTTTGCAATTGTCCCTGTT – 3'

- Nasedá na konec VP1 genu

Pro přípravu MCPyV VP1 genu:

Ev-MCV-start-fw: 5' – TCATAGAGGAAGATGGCACCAAAAAGAAAAGCATCATC
CACCT – 3'

- Nasedá na začátek VP1 genu, modře je vyznačen nástavec komplementární k vektoru, žlutě je vyznačen iniciační kodon ATG

Ev-MCV-stop-rw: 5' – TCATAATTCTTGTGTTTGGCTTTCTTTTTGAGAG – 3'

- Nasedá na konec VP1 genu

Pro přípravu vektoru (inverzní PCR):

Ev-Inv-pBS-PyI-fw: 5' – CATCTTCCTCTATGACTGTTGCC – 3'

- Nasedá na začátek VP1 genu, směřuje do vektoru, žlutě je vyznačen iniciační kodon

Ev-Inv-pBS-PyI-opr.-fw: 5' – CATCTTCCTCTATGACTGTTGCCCAAGT – 3'

- Prodloužený předchozí primer, nasedá na začátek VP1 genu, směřuje do vektoru, žlutě je vyznačen iniciační kodon

Ev-Inv-pBS-PyI-rw: 5' – GTCGTCGCCTTCTTGACATTACA – 3'

- nasedá za konec VP1 genu, směřuje do vektoru

Nový primer Ev-Inv-pBS-PyI-rv: 5' – GAACCTCCTTCACAAGACCCTGAA – 3'

- nasedá za konec VP1 genu, směřuje do vektoru, oranžová část je komplementární k primeru Nový primer Ev-MPyV-2. PCR-stop-rw

Pro 1. kolo JBS dNTP-mutageneze:

Nový primer Ev-MPyV-1. PCR-start-fw: 5' – GCCCCCAAAGAAAAAGCGGCGTCT – 3'

- nasedá na začátek VP1 genu MPyV za iniciační kodon

Nový primer Ev-MPyV-1. PCR-stop-rv: 5' – GTGACCAGTTTGCTAGTGAGTGCTC – 3'

- nasedá za VP1 gen MPyV do plasmidu pBS-PyI

Pro 2. kolo JBS dNTP-mutageneze:

Nový primer Ev-MPyV-2. PCR-start-fw:

5' – TCATAGAGGAAGATG GCCCCCAAAGAAAAAGCGGCGTCT – 3'

- shodný s primerem Nový primer Ev-MPyV-1. PCR-start-fw, ale navíc prodloužený o nástavec komplementární k vektoru pBS-PyI vyznačený modře, iniciační kodon ATG vyznačen žlutě

Nový primer Ev-MPyV-2. PCR-stop-rv:

5' – TTGTGAAGGAGTTTCGTGACCAGTTTGCTAGTGAGTGCTC – 3'

- shodný s primerem Nový primer Ev-MPyV-1. PCR-stop-rv, ale navíc prodloužený o nástavec komplementární k vektoru pBS-PyI vyznačený zeleně

Sekvenční primery pro sekvenaci mutovaných VP1 genů:

Sq-MPyV-ATG: 5' – TCACTCCTGACTGGATGCTTCC – 3'

- nasedá do vzdálenosti 81 bp za před začátek VP1 genu na plasmidu pBS-PyI

Sq-MPyV-STOP: 5' – ATTCAGAGTGGAGATACCCTTGCC – 3'

- nasedá do vzdálenosti 221 bp za konec VP1 genu na plasmidu pBS-PyI

Pro selfpriming PCR:

Ev-selfprim: 5' – TCATAGAGGAAGATGGCCCCCAA – 3'

- navržen tak, aby úplně nebo alespoň částečně nasedal na začátky několika polyomavirových VP1 genů

4.1.8 Vektory

MCV-R17a endofree (AddGene)

- plasmid nesoucí VP1 gen polyomaviru karcinomu Merkelových buněk

pCAG-SV40

- plasmid obsahující pozdní oblast viru SV40, včetně genu pro VP1 protein (Nakanishi *et al.*, 2008)

p734A

- plasmid, v němž je vložen celý genom viru BK (včetně VP1 genu), genom je přerušen v sekvenci LT antigenu (prof. Kristina Dorries, Univerzita Würzburg)

pFB Dual + JCV VP1, kolonie 8

- plasmid pFB Dual obsahující VP1 gen viru JC (poskytnut Mgr. Martinou Zajícovou)

pcDNA4/PSMA

- plasmid obsahující gen pro PSMA (poskytnut RNDr. Michalem Šmahelem, Ph.D.)

pmaxGFP

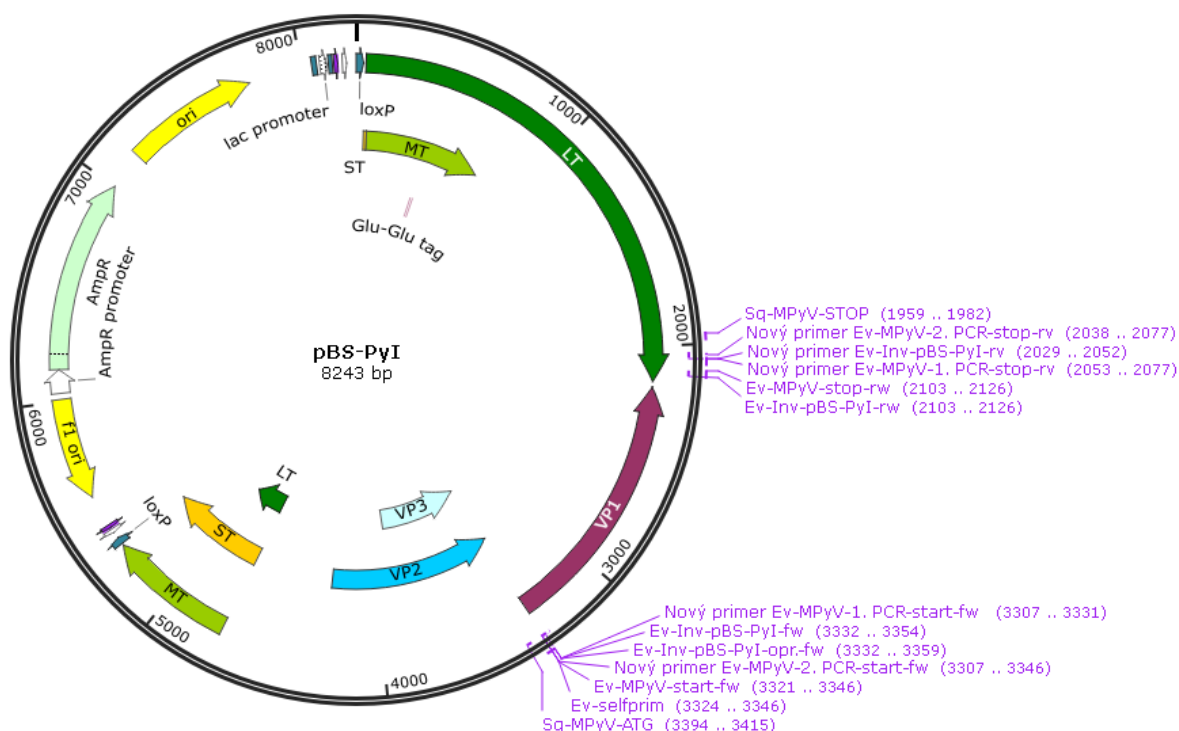
- plasmid nesoucí gen pro zelený fluorescenční protein (GFP) dodávaný jako kontrolní plasmid se soupravou Cell Line Nucleofector® Kit (Lonza), užit pro kontrolu tranfekce

pUC19

- linearizovaný vektor užívaný pro kontrolu účinnosti klonování metodou In-Fusion® (Clontech)

pBS-PyI

- plasmid odvozený od plasmidu pBS, kam byl vložen genom myšího polyomaviru (kmen BG), který je z obou stran ohraničen 2 loxP místy umožňující místně-specifickou rekombinaci (Hron *et al.*, 2013; mapa plasmidu viz obr. 10)



Obr. 10. Mapa plasmidu pBS-PyI. Plasmid obsahuje celý genom myšního polyomaviru zahrnující geny pro velký (LT), střední (MT) a malý (ST) T antigen a kapsidové proteiny VP1, VP2 a VP3. Genom je lemován loxP místy. Mapa byla vytvořena pomocí programu SnapGene.

4.1.9 Bakteriální kmeny

Kompetentní buňky Stellar™ (Clontech)

Bakteriální kmen s vysokou účinností transformace

Genotyp: *F*⁻, *endA1*, *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *relA1*, *gyrA96*, *phoA*, $\Phi 80d$ *lacZ* Δ *M15*, Δ (*Lacha-argF*) *U169*, Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*), Δ *mcrA*, λ -

Top10

Elektrokompetentní kmen bakterie *E. coli*

Genotyp: *F*⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) $\Phi 80$ *lacZ* Δ *M15* Δ *lacX74* *recA1* *araD139* Δ (*ara leu*) 7697 *galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG*

4.1.10 Savčí buněčné linie

NIH-3T6 – linie myších fibroblastů (prof. Griffin, Royal Postgraduate School, London)

NIH-3T3 – linie myších fibroblastů

LNCaP – linie lidských prostatických nádorových buněk, která exprimuje PSMA

PC-3 – linie lidských prostatických nádorových buněk, která neexprimuje PSMA

DU-145 - linie lidských prostatických nádorových buněk, která neexprimuje PSMA

T2 – linie myších embryonálních fibroblastů odvozená od linie NIH-3T6, která vznikla stabilní transformací plasmidem pNit-Cre zajišťující stabilní expresi Cre rekombinázy (Hron *et al.*, 2013)

4.1.11 Viry

Myší polyomavirus (MPyV), kmen BG (prof. Griffin, Royal Postgraduate School, London)

4.1.12 Protilátky a fluorescenční barviva

Primární protilátky

M α VP1-pro WB – myší monoklonální protilátka proti denaturovanému VP1 proteinu myšího polyomaviru (Forstová *et al.*, 1993), ředěna 50x

M α VP1-D4 – myší monoklonální IgG protilátka proti VP1 proteinu myšího polyomaviru (připravena RNDr. Alenou Drda Morávkovou, MBA, Ph.D.), ředěna 20x

Rb α VP1 - králičí polyklonální protilátka proti VP1 proteinu myšího polyomaviru (připravena Mgr. D. Lieblem, ÚMG AV ČR), ředěna 100x

M α PyVP2/3 2C8 - myší monoklonální IgG protilátka proti proteinům VP2 a VP3 (Forstová *et al.*, 1993), ředěna 4x

Rat α LT1 – krysí monoklonální protilátka proti LT antigenu myšího polyomaviru (S. Dilworth, Imperial College School of Medicine, London), ředěna 50x

M α PSMA - myší monoklonální protilátka proti PSMA (získána od RNDr. Pavla Šáchy, Ph.D., ÚOCHB AV ČR), ředěna 50x

Sekundární protilátky

D α M-Ax488 - oslí protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s fluorescenční barvou Alexa Fluor 488 (Molecular Probes), ředěna 1000x

D α Rat-Ax488 - oslí protilátka proti krysím imunoglobulinům konjugovaná s fluorescenční barvou Alexa Fluor 488 (Molecular Probes), ředěna 1000x

D α Rb-Ax546 – oslí protilátka proti králičím imunoglobulinům konjugovaná s fluorescenční barvou Alexa Fluor 546 (Molecular Probes), ředěna 1000x

G α M-Px - kozí protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou, ředěna 1000x (BioRad)

Fluorescenční barviva

Alexa Fluor 488 NHS Ester (Succinimidyl Ester; Molecular Probes)

4.2 Metody

4.2.1 Sterilizace

Roztoky a jednorázové plastové pomůcky (mikrozkumavky a špičky pro mikropipety) byly sterilizovány v autoklávu při tlaku 120 kPa a teplotě 127 °C po dobu 30 minut, sklo bylo sterilizováno horkým vzduchem při teplotě 160 °C po dobu 3 hodin. Roztoky, jež není možné sterilizovat v autoklávu, byly sterilizovány filtrací přes filtry s póry o velikosti 0,45 a 0,22 µm. Pinzety a mikrobiologické hokejky byly po namočení do 96 % (v/v) ethanolu sterilizovány žháním v plameni.

4.2.2 Práce s bakteriálními kulturami

4.2.2.1 Kultivace bakterií

Bakterie byly kultivovány na agarových LB plotnách [1% pepton (Imuna), 0,5% kvasničný autolyzát (Imuna), 1% NaCl (Sigma), 1,5% agar (Imuna)] 16 – 18 hodin při teplotě 37 °C v termostatu nebo v tekutém LB médiu při teplotě 37 °C a 200 rpm v třepačce. Do médií bylo zpravidla přidáno selekční antibiotikum.

4.2.2.2 Příprava kompetentních bakterií pro transformaci elektroporací

Bakterie TOP10 z konzervy byly zaočkovány do 20 ml TPN média a inkubovány 16 hodin při 200 rpm a 37 °C za stálého třepání. Po změření optické hustoty při vlnové délce 560 nm (OD₅₆₀ z angl. optical density) byla bakteriální kultura zaočkována do 400 ml TPN média tak, aby výsledná optická hustota suspenze činila 0,1. Kultura byla dále inkubována za třepání v 37 °C při 200 rpm a pravidelně byla kontrolována její OD. Jakmile hodnota optické hustoty suspenze dosáhla rozmezí 0,5 – 0,7 byla suspenze rozdělena do 8 centrifugačních zkumavek o objemu 50 ml a centrifugována 10 minut při 3 000 x g a 4 °C. Supernatant byl slit a pelet byl resuspendován v 50 ml vychlazené sterilní ddH₂O. Suspenze byla opět centrifugována 10 min při 3000 x g a 4 °C, pelet byl resuspendován ve 25 ml sterilní ddH₂O a směs byla spojena do 4 50 ml-zkumavek. Po centrifugaci (3 000 x g, 10 min, 4 °C) byl pelet resuspendován ve 2 ml 10% glycerolu, suspenze byly spojeny do 2 centrifugačních zkumavek o objemu 50 ml a zde centrifugovány 10 min při 3 000 x g a 4 °C. Pelet byl resuspendován v 1 ml 10% (v/v) glycerolu (Lachema), suspenze byla

rozplněna po 50 či 100 μl do mikrozkušavek, okamžitě zmrazena v tekutém dusíku a uložena do -80 °C.

4.2.2.3 Transformace bakterií elektroporací

(Dower *et al.*, 1988)

Kompetentní bakteriální buňky byly rozmrazeny na ledu. K 49 μl buněk byl přidán 1 μl In-Fusion® reakční směsi a suspenze byla inkubována 1 min na ledu. Následně byla suspenze převedena do vychlazené elektroporační kyvety (o vzdálenosti elektrod 2 mm) a vložena do elektroporátoru Gene Pulser Apparatus (Bio-Rad), kde byl do směsi aplikován pulz (25 μF; 2,5 kV; 200 Ω) o délce zpravidla 4,5 - 5 ms. K suspenzi byl okamžitě přidán 1 ml SOC média. Směs byla přenesena do Erlenmeyerovy baňky a inkubována 1 hod při 37 °C a 200 rpm na třepačce. Bakteriální kultura byla poté vyseta na agarové plotny se selekčním antibiotikem a inkubována 16 – 18 hodin při 37 °C v termostatu.

4.2.2.4 Transformace bakterií teplotním šokem

Kompetentní buňky Stellar™ (Clontech) byly rozmrazeny na ledu. Do centrifugační zkumavky o objemu 15 ml bylo přeneseno 50 μl buněk a přidáno zpravidla 2,5 μl DNA pro transformaci (nejčastěji In-Fusion® reakční směsi, viz dále). Buňky byly inkubovány na ledu 30 minut. Následoval teplotní šok provedený ve vodní lázni při 42 °C po dobu 45 sekund. Buňky byly poté ihned přeneseny na led a zde inkubovány 1,5 - 2 minuty. K buňkám bylo přidáno 450 μl SOC média (Clontech) předeřátého na 37 °C a buněčná suspenze byla inkubována za neustálého třepání 60 – 90 min při 37 °C a 200 rpm. Bakterie byly vysety na selekční agarové plotny a inkubovány 16 – 18 hodin při 37 °C v termostatu.

4.2.2.5 Příprava bakteriálních konzerv

Bakteriální kultura v tekutém médiu byla v mikrozkušavce smíšena s roztokem glycerolu (Lachema) na výslednou koncentraci glycerolu 15 %. Takto připravené konzervy byly uchovány v -80 °C.

4.2.3 Práce s tkáňovými kulturami

4.2.3.1 Pasážování savčích buněk NIH-3T3, NIH-3T6, T2, LNCaP, PC3 a DU-145

Buňky NIH-3T3, NIH-3T6, PC3 a DU-145 byly pěstovány v médiu DMEM se sérem na Petriho miskách (PM). Buňkám T2 bylo navíc do média DMEM dodáváno antibiotikum G-418 v konečné koncentraci 400 µg/ml. Buňky LNCaP byly kultivovány v IMDM médiu s 10% sérem.

Všechny buňky byly uloženy v CO₂ inkubátoru s 5% atmosférou CO₂ při 37 °C. Když buňky na misce dosáhly konfluency, bylo z misky odsáto médium a buňky byly opláchnuty roztokem Versenu (2,5 ml na PMØ10 cm a 1,5 ml na PMØ6 cm). Po prokývání byl Versen odsán, k buňkám byl přidán roztok Trypsinu (1 ml na PMØ10 cm a 0,5 ml na PMØ6 cm) a buňky byly inkubovány v termostatu přibližně 5 min při 37 °C. Buňky byly poté resuspendovány v předehřátém médiu a rozděleny na nové misky do celkového objemu 10 ml (PMØ10 cm) či 5 ml (PMØ6 cm) média v poměru:

buňky NIH-3T3, NIH-3T6, T2 a PC3: 1:6 až 1:15

buňky DU-145: 1:6 až 1:8

buňky LNCaP: 1:2 až 1:4

Buňky byly pasážovány podle hustoty obvykle jednou za 3 – 4 dny.

4.2.3.2 Transfekce savčích buněk metodou Nukleofekce®

Buňky byly předchozí den pasážovány tak, aby v den transfekce dosahovaly 50 – 80% konfluency. Buňky byly opláchnuty Versenem, poté inkubovány s Trypsinem a následně resuspendovány v médiu DMEM se sérem. Takto sklizené buňky byly spočítány v Bürkerově komůrce. Na jednu transfekci bylo použito $4 \cdot 10^6$ buněk, které byly přeneseny do centrifugační zkumavky o objemu 15 ml a centrifugovány 10 min, 90 x g, RT. Buněčný pelet byl resuspendován s 3 – 6 µg plasmidové DNA izolované pomocí soupravy JetStar™ 2.0 Endotoxin-free a 100 µl nukleofekčního roztoku Amaxa Nucleofector Solution V (roztok nesmí zůstat na buňkách déle než 15 minut.) Suspenze byla přenesena do kyvety (vzdálenost elektrod 2,5 mm, Lonza). Pomocí přístroje Amaxa® Cell Line Nucleofector® (Lonza) byl do suspenze aplikován elektrický pulz dle nastavení pro příslušný typ buněk (program U-030 NIH 3T3 pro buňky 3T3 a program T-030 3T3-L1 pre-ad pro buňky T2). Okamžitě po aplikaci pulzu bylo k buňkám přidáno 500 µl média RPMI-1640, suspenze byla přenesena do mikrozukavky a inkubována 15 min při 37 °C

v termostatu. Následně byla buněčná suspenze důkladně resuspendována, 15 – 50 μ l této suspenze bylo vyseto do jamek 24-jamkové destičky s mikroskopickými sklíčky a zbytek suspenze byl vyset na Petriho misku \varnothing 10 cm s 10 ml média DMEM se sérem. Buňky byly uloženy do CO₂ inkubátoru.

Po 4 – 6 hodinách bylo médium v jamkách a miskách vyměněno za čerstvé. Druhý den bylo médium nahrazeno médiem se selekčním antibiotikem. 24 – 72 hodin po transfekci byly buňky na sklíčkách fixovány a pomocí nepřímé imunofluorescence (kapitola 4.2.3.6) byla detekována přítomnost proteinu, jenž byl kódován transfekovaným plasmidem.

Pokud byl transfekován plasmid nesoucí virový genom ohraničený dvěma loxP místy, byly misky s transfekovanými buňkami 72 hodin po transfekci zamrazeny a použity pro izolaci viru (kapitola 4.2.3.8 a dále kapitola 4.2.6.1). V případě transfekce s cílem ustavit buněčnou linii trvale exprimující transfekovaný gen, byly buňky s transfekovaným plasmidem na PM \varnothing 10 cm dále selektovány na příslušené antibiotikum (kapitola 4.2.3.5).

4.2.3.3 Transfekce savčích buněk s využitím kationických polymerů „TurboFect Transfection Reagents“

Buňky byly 24 hodin předem vysety do jamek 24-jamkové destičky s mikroskopickými sklíčky v koncentraci $5 \cdot 10^4$ buněk/jamka v 1 ml média DMEM se sérem. Před samotnou transfekcí bylo v mikrozkrumavce smíseno 100 μ l DMEM bez séra s 1 μ g plasmidové DNA a 2 μ l TurboFect Transfection Reagents a inkubováno 20 minut RT. Následně byla tato suspenze nakapána do jamky s vyšetými buňkami, jemně prokývána a destička s buňkami byla uložena do termostatu (37 °C, 5% CO₂ atmosféra). Zpravidla 24 hodin po transfekci byly buňky na sklíčkách fixovány a exprese vnášených genů byla testována metodou nepřímé imunofluorescence (kapitola 4.2.3.6).

4.2.3.4 Testování rezistence buněk vůči selekčnímu antibiotiku

Buňky NIH-3T3 byly vysety na 24-jamkovou destičku ve dvou koncentracích: $2 \cdot 10^4$ a $4 \cdot 10^4$ buněk/jamka v 0,5 ml média DMEM se sérem. Druhý den bylo do každé jamky (kromě kontrolních) přidáno testované antibiotikum Zeocin™ v 10 různých koncentracích pohybujících se v rozmezí 0 – 2 mg/ml (vzestupná řada po 200 μ g/ml), každá koncentrace antibiotika byla aplikována na buňky vyseté v obou koncentracích. Každé 3 – 4 dny bylo médium odsáto a vyměněno za čerstvé s příslušnou koncentrací antibiotika. Po 14 dnech byl vyhodnocen počet

živých buněk v jamkách. Nejnižší koncentrace antibiotika, při níž v jamkách nezbyla žádná živá buňka, byla poté zvolena pro selekci buněk NIH-3T3 při přípravě linie stabilně exprimující transgen.

4.2.3.5 Ustavení buněčné linie se stabilní expresí transgenu

Cílový gen kódující PSMA umístěný na plasmidu pcDNA4/PSMA (obsahujícím kromě jiných také gen pro rezistenci k antibiotiku Zeocin™) byl vnesen do buněčné linie NIH-3T3 pomocí nukleofekce (viz kapitola 4.2.3.2). 150 µl transfekovné buněčné suspenze bylo vyseto do 10 ml média DMEM na Petriho misku o průměru 10 cm, na druhou misku byl vyset zbytek suspenze (přibližně 450 µl). Druhý den bylo buňkám vyměněno médium za selekční (množství antibiotika v médiu bylo stanoveno dle postupu v kapitole 4.2.3.4) a každé 3 – 4 následující dny bylo selekční médium vyměněno za čerstvé. Během té doby by následkem vysoké koncentrace selekčního antibiotika měly v kultuře zůstat jen buňky, v nichž dochází k trvalé expresi genů kódovaných vloženým plasmidem. Každá taková buňka okolo sebe vytvoří monoklonální kolonii. Ve chvíli, kdy byly monokolonie dostatečně narostlé, ale stále jasně oddělené od ostatních, byla miska opláchnuta 2,5 ml roztoku Versenu, jednotlivé monokolonie byly resuspendovány v 10 µl Trypsinu a přeneseny do 24-jamkové destičky s 1 ml selekčního média. Kolonie na destičce byly pasážovány dle potřeby a exprese transgenu byla otestována pomocí detekce proteinu PSMA pomocí imunofluorescence.

4.2.3.6 Fixace buněk a detekce proteinu metodou nepřímé imunofluorescence

Z jamek 24-jamkové destičky s mikroskopickými sklíčky na dně, na nichž byly pěstovány buňky našeho zájmu, bylo odsáto médium, buňky byly opláchnuty 1 ml 1x PBS a po jeho odátí byly buňky fixovány 0,5 ml 4% (w/v) roztoku paraformaldehydu (Sigma) v 1x PBS po dobu 15 minut. Po odsátí paraformaldehydu byly buňky opláchnuty 1 ml 1x PBS. Buňky byly následně permeabilizovány přidáním 0,5 ml 0,5% (v/v) Tritonu X-100 (Serva) v 1x PBS po dobu 5 minut (ne déle). Poté byly 3x promyty 1 ml 1x PBS. Permeabilizované buňky byly inkubovány min. 30 minut s 0,5 ml blokačního roztoku (0,25% (w/v) bovinní sérový albumin (Sigma), 0,25% (w/v) želatina (Sigma) v PBS). Po odsátí blokačního roztoku byla k buňkám přidána primární protilátka ředěná v blokačním roztoku a inkubována min. 1 hodinu při laboratorní teplotě. Buňky byly promyty 3 x 10 minut 1 ml 1x PBS a inkubovány právě 30 minut s fluorescenčně značenou sekundární protilátkou ředěnou v blokačním roztoku. Po promytí (3 x 10 minut 1 ml 1x PBS) byla

sklíčka s buňkami opláchnuta ddH₂O a montována na podložní sklíčka do kapky 70% (v/v) glycerolu s DAPI. Sklíčka se vzorky byla pozorována na fluorescenčním mikroskopu BX-60 (Olympus).

4.2.3.7 Příprava buněčných lyzátů

Savčí buňky na Petriho miskách byly seškrabány pomocí pryžového škrabátka, resuspendovány a převedeny do centrifugační zkumavky o objemu 15 ml. Buněčná suspenze byla centrifugována 10 min, 2 000 x g, RT. Jedotlivé pelety byly resuspendovány v pufru B, převeden do mikrozkuavky a centrifugovány 20 s, 16 000 x g, RT. Buněčný pelet byl resuspendován ve 100 µl pufru B a následně byl 3krát zmražen v tekutém dusíku a opět rozmražen. 10 µl lyzátu bylo použito pro elektronovou mikroskopii.

4.2.3.8 Infekce savčích buněk virem

Pro testování infekivity polyomaviru divokého typu byly buňky NIH-3T6 a NIH-3T3 vysety do jamek 24-jamkové destičky s mikroskopickými sklíčky na dně v množství $4 \cdot 10^4$ buněk NIH-3T3/jamka a $2 \cdot 10^4$ buněk NIH-3T6/jamka (rostou rychleji). 16 hodin před infekcí byl do některých jamek přidán roztok Gleevecu (Imatinib mezylát; Sigma) na konečnou koncentraci 20 µM. Před infekcí bylo z jamek odsáto médium a buňky byly opláchnuty médiem DMEM bez séra. K buňkám byl následně přidán 1 µl myšího polyomaviru/jamka ve 150 µl média DMEM bez séra. Do některých jamek byl přidán virus, který byl po dobu 10 minut před infekcí inkubován se 100 µM roztokem polyethyleniminu (PEI; Sigma) v médiu DMEM bez séra, taktéž v množství 1 µl viru/jamka ve 150 µl média DMEM bez séra s konečnou koncentrací PEI 50 µM. K buňkám v jamkách sloužících k negativní kontrole bylo přidáno pouze 150 µl média DMEM bez séra. Vše provedeno v duplikátu. Buňky byly inkubovány s virem po dobu 75 minut v termostatu při 37 °C za občasného prokývání. Poté byla virová suspenze odsáta, buňky byly opláchnuty médiem DMEM bez séra, které bylo také odsáto a následně byl do jamek přidán 1 ml média DMEM se sérem a buňky byly inkubovány v termostatu po dobu 30 hodin.

Testování infekivity mutovaných virů probíhalo obdobně, jako je napsáno výše. Buňky NIH-3T3 a NIH-3T6 byly po 16-hodinové preinkubaci buněk s roztokem Gleevecu či bez ní a opláchnutí médiem DMEM bez séra a inkubovány s 50 µl mutantních virů smíšených se 100 µl média DMEM bez séra, izolovaných ze 6 PMØ10 cm s buňkami T2 transfekovanými plasmidy pBS-PyI s mutovanými VP1 geny zmražením a rozmražením transfekovaných buněk a

přečištěním uvolněných virů přes sacharózový polštář (kapitola 4.2.6.2). Virus byl s buňkami inkubován po dobu 1 hodiny při 37 °C, poté byl odsát a k buňkám byl přidán 1 ml média DMEM se sérem. Buňky byly následně inkubovány v termostatu 24 hodin.

Pro infekci buněk NIH-3T6 za účelem izolace viru loxP-wt MPyV (myší polyomavirus s loxP místem v intronu genu pro LT antigen) byl použit virus připravený následujícím způsobem: 7 dní po transfekci buněk T2 plasmidem pBS-PyI (kapitola 4.2.3.2) byly buňky po 2 transfekcích ze 2 PMØ10 cm 2x zmrazeny a rozmrazeny, seškrabány pryžovým škrabátkem a resuspendovány v médiu. Suspenze byla centrifugována při 12 minut, 2 000 rpm, 4 °C. Supernatant byl přenesen do nové centrifugační zkumavky o objemu 50 ml, doplněn médiem DMEM bez séra do 20 ml a důkladně resuspendován. 1 ml této suspenze byl použit na infekci buněk NIH-3T6 pasážovaných předchozí den v poměru 1:20 na misky PMØ10cm. Na několik misek bylo předem vloženo mikroskopické sklíčko pro zjištění míry proinfikovanosti buněk pomocí nepřímé imunofluorescence. Buňkám NIH-3T6 bylo před infekcí odsáto médium a byly opláchnuty médiem DMEM bez séra. Po přidání virové suspenze byly buňky inkubovány v termostatu při 37 °C po dobu 1 hodiny za občasného prokývání. Následně bylo k buňkám přidáno 7 ml média DMEM se sérem a buňky byly po dobu 8 dní inkubovány v termostatu při 37 °C.

4.2.4 Práce s DNA

4.2.4.1 Agarózová elektroforéza

Pro rozdělení molekul DNA podle jejich velikosti byl používán 1% agarózový gel, připravený povařením agarózy (Amresco) v 0,5x koncentrovaném Tris-borátovém pufru (TBE; 45 mM Tris, 45 mM kyselina boritá, 1 mM EDTA-NaOH, pH 8,0) či 1x koncentrovaném Tris-acetátovém pufru (TAE; 40 mM Tris, 20 mM kyselina octová, 1 mM EDTA-NaOH, pH 8,0). Pokud bylo třeba DNA z gelu po rozdělení izolovat, byl připraven gel 0,8%, s poměrem 1:1 klasické agarózy (Amresco) a nízkotající agarózy (NuSieve) v 1x koncentrovaném pufru TAE. Do tekutého gelu byl přidán roztok ethidium bromidu (Serva) na výslednou koncentraci 0,5 µg/ml gelu, gel byl nalit do plastové formy a do horní části gelu byl zasunut hřeben pro vytvoření jamek. Po ztuhnutí byl gel přenesen do elektroforetické vany, zalit pufrům 0,5x TBE či 1x TAE (dle přípravy gelu) a do jamek byla nanášena DNA našeho zájmu smíšená s nanášecí barvičkou [6x DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific) či roztokem bromfenolové modři (40% sacharóza, 0,12% bromfenolová modř)] a marker molekulových vah. Elektroforetické dělení probíhalo za napětí 5 V/cm přibližně

50 minut (podle velikosti zkoumané DNA). Gel s rozdělenou DNA byl poté pozorován pod UV transluminátorem a zachycen na fotografii.

4.2.4.2 Izolace DNA z agarózového gelu

Z agarózového gelu byla pod UV transluminátorem skalpelem vyříznuta oblast, kam doputovala cílová DNA, byla zjištěna hmotnost vyříznutého gelu a DNA byla z gelu izolována pomocí soupravy NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) dle protokolu od výrobce.

4.2.4.3 Polymerázová řetězová reakce

Pro namnožení cílových úseků DNA byla využita polymerázová řetězová reakce (PCR). Jednotlivé VP1 geny různých polyomavirů byly amplifikovány s využitím DNA polymerázy Vent® (NEB). Reakce byla míchána na ledu. Složení reakce a podmínky amplifikace nastavené na termocykleru Mastercycler® ep Gradient S (Eppendorf) jsou uvedeny níže. Pro amplifikaci každého z genů byla optimalizována teplota nasedání primerů (vycházeli jsme z teploty tání primerů), množství vstupního templátu, někdy bylo testováno více templátů, proto je následující předpis obecný a optimalizací zjištěné podmínky amplifikace jsou uvedeny v části Výsledky, kapitola 5.2.2.1.

PCR reakce (50 µl)

- 5 µl 10x koncentrovaného pufru pro Vent polymerázu
- 2 µl 10 µM primeru nasedajícího na začátek VP1 genu
- 2 µl 10 µM primeru nasedajícího za konec VP1 genu
- 1 µl 10 mM dNTPs
- 1 µl Vent DNA polymerázy
- 2 – 20 ng templátového plasmidu
- doplněno ddH₂O do 50 µl

Počet opakování	Teplota	Doba trvání
1x	94 °C	3 min
30x	94 °C	40 s
	55 – 64 °C	50 s
	72 °C	1 min
1x	72 °C	7 min

Při optimalizacích byl objem PCR reakce a s ním i objem všech vstupních reagensů snižen na 25 μ l. Produkt PCR byl zkontrolován pomocí DNA elektroforézy (kapitola 4.2.4.1).

Vektor pro klonování VP1 genů odvozený z plasmidu pBS-PyI byl připraven pomocí inverzní PCR s využitím primerů, nasedajících na konce VP1 genu, mířících směrem z genu ven. Pro amplifikaci vektoru byly použity 3 různé enzymy, reakce byly optimalizovány, uvedeno je vždy pouze složení reakce a reakční podmínky získané optimalizací.

1) Advantage® HD polymerase (Clontech), 25 μ l reakce:

- 16,25 μ l ddH₂O
- 5 μ l 5x Advantage HD pufr s Mg²⁺
- 0,5 μ l 10 μ M primeru Ev-Inv-pBS-PyI-fw
- 0,5 μ l 10 μ M primeru Ev-Inv-pBS-PyI-rv
- 0,5 μ l 10 mM směsi dNTP
- 2 μ l plasmidu pBS-PyI (100 ng/ μ l)
- 0,25 μ l Advantage HD DNA Polymeráza (2,5 U/ μ l)

Počet opakování	Teplota	Doba trvání
1x	94 °C	3 min
30x	98 °C	10 s
	55 °C	5 s
	72 °C	8 min 12 s
1x	72 °C	10 min

2) High Fidelity PCR Enzyme Mix (Thermo Scientific), 50 μ l reakce:

- 37,5 μ l ddH₂O
- 5 μ l 10x High Fidelity PCR pufru s 15 mM MgCl₂
- 2,5 μ l 10 μ M primeru Ev-Inv-pBS-PyI-opr.-fw
- 2,5 μ l 10 μ M primeru Ev-Inv-pBS-PyI-rv či Nový primer Ev-Inv-pBS-PyI-rv
- 1 μ l 10 mM směsi dNTP
- 1 μ l plasmidu pBS-PyI (1 ng/ μ l)
- 0,5 μ l High Fidelity PCR Enzyme Mix (5 U/ μ l)

Počet opakování	Teplota	Doba trvání
1x	94 °C	3 min
10x	94 °C	30 s
	57 °C	30 s
	68 °C	7 min
25x	94 °C	30 s
	57 °C	30 s
	68 °C	7 min + 4 s/cyklus
1x	68 °C	10 min

3) Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with HF Buffer (NEB), 50 µl reakce:

- 17,5 µl ddH₂O
- 2,5 µl 10 µM primeru Ev-Inv-pBS-PyI-opr.-fw
- 2,5 µl 10 µM primeru Ev-Inv-pBS-PyI-rv či Nový primer Ev-Inv-pBS-PyI-rv
- 1,5 µl 100% DMSO
- 25 µl 2x Phusion Master Mix
- 1 µl plasmidu pBS-PyI (1 ng/µl)

Počet opakování	Teplota	Doba trvání
1x	98 °C	10s
1x	98 °C	30 s
30x	98 °C	10 s
	60 °C	30 s
	72 °C	3 min 30 s
1x	72 °C	10 min

4.2.4.4 Mutagenní PCR

Pro zavedení náhodných mutací do VP1 genu pomocí PCR byly použity 2 různé systémy pro mutagenezi.

Prvním byla náhodná mutagenese s využitím nukleotidových analogů, jež je principem, na kterém je založena souprava pro mutagenezi JBS dNTP-Mutagenesis Kit (Jena Bioscience). Metoda je založena na zabudování mutagenních analogů dNTP (8-oxo-dGTP a dPTP) do sekvence během první polymerázové řetězové reakce a jejich nahrazení klasickými nukleotidy v průběhu druhé PCR. Složení reakce a nastavení termocykleru bylo následující:

1. PCR (50 µl):

- 33 µl ddH₂O
- 5 µl 10x pufru pro mutagenezi
- 2,5 µl 10 µM primeru Ev-MPyV-start-fw
- 2,5 µl 10 µM primeru Ev-MPyV-stop-rw
- 2,5 µl 10 mM dNTP Mix
- 2,5 µl 10 mM analogu 8-oxo-dGTP
- 2,5 µl 10 mM analogu dPTP
- 1 µl plasmidu pBS-PyI (100 ng/µl) v případě mutageneze MPyV VP1 nebo 0,55 µl MPyV BCsub VP1 genu (181,7 ng/µl)
- 1 µl Taq DNA polymerázy (5 U/µl)

Počet opakování	Teplota	Doba trvání
1x	92 °C	3 min
7x, 10x, 20x nebo 30x	92 °C	1 min
	55 °C	1,5 min
	72 °C	5 min
1x	72 °C	9 min

Po provedení PCR byl produkt reakce vizualizován elektroforeticky (kapitola 4.2.4.1) a následně byl použit jako templát pro 2. PCR reakci bez přítomnosti analogů dNTP. Často byla ještě celá reakce štěpena restriční endonukleázou *DpnI* pro odstranění výchozího plasmidu ze směsi (kapitola 4.2.4.5).

2. PCR (50 µl):

- 38 µl ddH₂O
- 5 µl 10x pufru pro mutagenezi
- 2,5 µl 10 µM primeru Ev-MPyV-start-fw
- 2,5 µl 10 µM primeru Ev-MPyV-stop-rw
- 2,5 µl 10 mM dNTP Mix
- 1 µl první PCR reakce (po nebo bez restričního štěpení *DpnI* a teplotní inaktivaci)
- 1 µl Taq DNA polymerázy (5 U/µl)

Počet opakování	Teplota	Doba trvání
1x	92 °C	3 min
25x	92 °C	1 min
	55 °C	1,5 min
	72 °C	5 min
1x	72 °C	9 min

Později byla mutagenese prováděna se dvěma sadami primerů, lišícími se přítomností nástavce komplementárního ke koncům vektoru pro klonování:

1. PCR:

Nový primer Ev-MPyV-1. PCR-start-fw

Nový primer Ev-MPyV-1. PCR-stop-rv

2. PCR:

Nový primer Ev-MPyV-2. PCR-start-fw

Nový primer Ev-MPyV-2. PCR-stop-rv

Druhým způsobem zavádění náhodných mutací do VP1 genu bylo užití soupravy GeneMorph II Random Mutagenesis Kit (Stratagene), využívající Mutazyme® II DNA polymerázu, která v průběhu PCR zařazuje do vlákna chybné nukleotidy. Složení reakce a nastavení termocyklu bylo následující:

- 33 μ l ddH₂O
- 5 μ l 10x Mutazyme II reakčního pufru
- 1 μ l dNTP Mix
- 3,2 μ l 10 μ M primeru Ev-MPyV-start-fw
- 3,2 μ l 10 μ M primeru Ev-MPyV-stop-rw
- 1 μ l Mutazyme II DNA polymerázy (2,5 U/ μ l)
- 3,4 μ l plasmidu pBS-PyI (1 ng/ μ l) nebo 1 μ l plasmidu pBS-PyI (100 ng/ μ l)

Počet opakování	Teplota	Doba trvání
1x	95 °C	2 min
30x	95 °C	30 s
	54 °C	30 s
	72 °C	1,5 min
1x	72 °C	10 min

Pro zvýšení množství mutací byla někdy provedena 2. PCR za stejných podmínek, kde jako templát sloužilo 0,3 μ l výše uvedené PCR.

4.2.4.5 Restriční štěpení DNA

Pro štěpení DNA restričními enzymy byla namíchána směs:

1x restriční pufr zvolený dle doporučení výrobce enzymu

2 – 10 U restričního enzymu

0,1 – 2 µg DNA

Doplněno ddH₂O do požadovaného objemu

Restriční směs byla štěpena při 37 °C nejčastěji po dobu 1,5 – 3 hodin.

V případě štěpení výsledné PCR směsi restriční endonukleázou DpnI:

50 µl PCR reakce

1x pufr Tango

10 U DpnI

Směs byla štěpena 2 hodiny při 37 °C, restriční endonukleáza byla následně inaktivována inkubací 20 min při 80 °C

4.2.4.6 „DNA shuffling“

(Stemmer, 1994a)

„DNA shuffling“, což lze do češtiny přeložit jako „míchání“ DNA je metoda založená na náhodném rozštěpení homologních genů DNázou I a jejich opětovné pospojování v následné PCR reakci, kde jako primery slouží komplementární části vzniklých DNA fragmentů, které jsou schopny na sebe nasednout (proto nazývána „self-priming PCR“. Produkt „self-priming PCR“ je poté namnožen primery nasedajícími na začátek a konec genu. Výsledkem je tedy molekula poskládaná z různých částí vstupních genů.

Pro reakci byly použity sekvence VP1 genů 5 různých polyomavirů (MPyV, SV40, JCV, BKV, MCPyV) a navíc VP1 gen myšího polyomaviru se záměnou v BC smyčce (BCsub MPyV). DNA sekvence byly připraveny polymerázovou řetězovou reakcí (viz kapitola 4.2.4.3). Pro „DNA shuffling“ zmíněných genů byla využita souprava JBS DNA-Shuffling Kit (Jena Bioscience). Sekvence genů byly náhodně štěpeny DNázou I (Jena Bioscience) v následující reakci:

- 5 µl Digestion pufru (Jena Bioscience)
- 500 ng od každého ze 6 VP1 genů
- 3 µl DNázy I (0,1 U/µl; Jena Bioscience)
- Doplněno ddH₂O do objemu 50 µl

Směs byla inkubována 3 minuty při 37 °C v termobločku CH-100 (Biosan), poté k ní bylo přidáno 5 µl DNaseI Stop Solution pufru a DNáza byla inaktivována 10 minut při 75 °C.

Protože však využití soupravy pro „DNA shuffling“ vedlo k úplnému roštěpení vstupních genů, byla pro štěpení genů užívána DNáza I od firmy Roche po provedení optimalizace doby štěpení a koncentrace DNázy (kapitola 4.2.4.7). Složení reakční směsi po optimalizaci bylo následující:

- 5 µl reakčního pufru (25 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂)
- 500 ng od každého ze 6 VP1 genů
- 3 µl DNázy I (Roche, 0,01 U/µl)
- Doplněno ddH₂O do objemu 50 µl

Směs byla inkubována 2,5 minuty při 37 °C v termobločku. Následně bylo ke směsi přidáno 5,6 µl 50 mM roztoku EDTA pro zastavení činnosti DNázyI vycytáním dvojmocných iontů a směs byla inkubována 10 min při 75 °C v termobločku.

Produkt byl nanesen na agarózový gel a fragmenty DNA byly separovány elektroforeticky (viz kapitola 4.2.4.1). Z gelu byla vyříznuta oblast okolo 300 – 500 bp (viz kapitola 4.2.4.2) a DNA byla přečištěna pomocí soupravy NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit (viz kapitola 4.2.4.8).

Izolované fragmenty byly poté pospojovány do rekombinantního VP1 genu pomocí „self-priming PCR“:

- 5 µl 10x Shuffling pufru (Jena Bioscience)
- 1 µl směsi dNTPs
- 0,5 µl Taq DNA polymerázy (5 U/µl)
- Veškeré izolované fragmenty DNA naštěpené v předchozím kroce (750 ng)
- Doplněno ddH₂O do objemu 50 µl

Počet opakování	Teplota	Doba trvání
1x	94 °C	3 min
40x	94 °C	1 min 30 s
	55 °C	30 s
	72 °C	30 s
1x	72 °C	9 min

Produkt „self-priming PCR“ byl poté namnožen finální PCR:

- 5 µl 10x Shuffling pufru (Jena Bioscience)
- 5 µl self-priming PCR
- 1 µl směsi dNTPs
- 4 µl 10 µM primeru Ev-MPyV-start-fw
- 4 µl 10 µM primeru Ev-selfprim
- 0,5 µl Taq DNA polymerázy (5 U/µl)
- Doplněno ddH₂O do objemu 50 µl

Počet opakování	Teplota	Doba trvání
1x	94 °C	3 min
15x	94 °C	30 s
	55 °C	30 s
	72 °C	30 s
1x	72 °C	9 min

Pro nabohacení produktu a odstranění případných deoxyadenosinmonofosfátů z konců genu byla provedena ještě jedna PCR amplifikace s využitím Vent DNA polymerázy za podmínek uvedených v kapitole 4.2.4.3. Do reakce byly vloženy 2 µl finální PCR, primery Ev-selfprim a Ev-MPyV-stop-rw a teplota nasedání primerů byla 55 °C.

4.2.4.7 Optimalizace štěpení DNázou I

Pro získání fragmentů VP1 genu o velikosti 300 – 500 bp po štěpení DNázou I bylo optimalizováno štěpení DNázou I (Roche).

Nejprve byla zjišťována závislost velikosti fragmentů na době štěpení pomocí reakce:

- 2,5 µl 100 mM MgCl₂
- 3 µg DNA fága λ
- 3 µl DNázy I (0,1 U/µl; Roche)
- Doplněno ddH₂O do objemu 50 µl

Štěpeno po dobu 20, 40 a 60 s při 37 °C, poté přidáno 5 µl Stop pufru a inkubováno 10 min při 75 °C.

Dále byla stejným způsobem zjišťována závislost velikosti fragmentů vznikajících při štěpení na koncentraci množství DNázy I v reakci:

- 2,5 µl 100 mM MgCl₂
- 3 µg DNA fága λ
- 3 µl DNázy I – testovány 3 koncentrace: 0,1 U/µl, 0,01 U/µl a 0,001 U/µl
- Doplněno ddH₂O do objemu 50 µl

Štěpeno po dobu 60 s při 37 °C, poté přidáno 5 µl Stop pufru a inkubováno 10 min při 75 °C.

Koncentrace DNázy I získaná z výše uvedeného testování byla poté aplikována na JCV VP1 gen při různých časech štěpení, na základě nichž byla poté stanovena optimální doba pro štěpení polyomavirových VP1 genů:

- 2,5 µl reakčního pufru (25 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂)
- 1,2 µg JCV VP1
- 1,2 µl DNázy I (0,01 U/µl; Roche)
- Doplněno ddH₂O do objemu 15 µl

Štěpeno po dobu 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5 minut při 37 °C, poté přidáno 1,7 µl 50 mM EDTA a inkubováno 10 min při 75 °C.

Byly testovány také různé koncentrace DNázy I dodávané v soupravě JBS DNA-Shuffling Kit (Jena Bioscience) v reakci:

- 5 µl Digestion pufru (Jena Bioscience)
- 3 µg DNA fága λ
- 3 µl DNázy I (Jena Bioscience) – testovány 3 koncentrace: koncentrovaná, 10x ředěná a 100x ředěná
- Doplněno ddH₂O do objemu 50 µl

Štěpeno po dobu 60 s při 37 °C, poté přidáno 5 µl Stop pufru a inkubováno 10 min při 75 °C.

Produkty štěpení byly analyzovány pomocí DNA elektroforézy (kapitola 4.2.4.1).

4.2.4.8 Přečištění PCR směsi a izolace DNA z gelu pomocí komerční soupravy

Pro přečištění PCR směsi od enzymů, zbylých primerů a nukleotidů byla využita souprava NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel), případně metoda fenol-chloroformové extrakce (kapitola 4.2.4.9) a následné srážení DNA (kapitola 4.2.4.10). Stejná souprava byla použita také pro izolaci DNA z agarózového gelu. Při izolaci byl dodržen návod výrobce.

4.2.4.9 Přečištění DNA metodou fenol-chloroformové extrakce

Pokud objem roztoku DNA, která měla být přečištěna, byl nižší než 400 µl, byla směs doplněna ddH₂O do objemu 400 µl. K suspenzi byl přidán stejný objem fenolu, pH 8,0, směs byla důkladně promíchána a centrifugována 3 min při 16 000 x g, RT. Horní vodná fáze byla odebrána a smíšena se stejným objemem směsi fenolu (Lachema), chloroformu (Lachema) a isoamylalkoholu (Lachema) (25:24:1). Po promíchání a centrifugaci (3 min, 16000 x g, RT) byla horní vodná fáze smíšena s objemem směsi chloroformu a isoamylalkoholu (24:1), opět byla směs promíchána a centrifugována (3 min, 16000 x g, RT) a odebrána horní vodná fáze, z níž byla posléze DNA srážena součinností soli a alkoholu (kapitola 4.2.4.10).

4.2.4.10 Srážení DNA součinností soli a alkoholu

Roztok DNA byl smíšen s 1/10 objemu 3M octanu amonného (pH 5,2) a 2,5 objemu vychlazeného 96% ethanolu (Lachema). Směs byla důkladně promíchána a srážena přes noc při -20 °C. Vysrážená suspenze byla centrifugována 30 min, 20 000 x g, 4 °C. Po odebrání supernatantu byl pelet opláchnut 70% ethanolem (Lachema), centrifugován 10 min, 20 000 x g, 4 °C a ethanol byl odsán. Pelet DNA byla vysoušen na vzduchu při pokojové teplotě od zbytků ethanolu a následně byl rozpuštěn v potřebném množství ddH₂O.

4.2.4.11 Klonování pomocí In-Fusion® reakce

Pro spojení vektoru odvozeného od plasmidu pBS-PyI a mutovaných VP1 genů byla zvolena metoda In-Fusion® zajištěná komerční soupravou In-Fusion® HD Cloning (Clontech). Tato metoda umožní spojení vektoru a insertu na základě 15 nukleotidů dlouhých vzájemně komplementárních sekvencí na koncích obou vstupních sekvencí. Do reakce mohou vstoupit DNA sekvence vektoru a insertu amplifikované pomocí PCR (kapitola 4.2.4.3) a následném přečištění (kapitola 4.2.4.8) nebo mohou být použity přímo PCR směsi ošetřené reagensy Cloning Enhancer (Clontech). Množství insertu a vektoru vkládané do reakce po přečištění bylo určeno pomocí on-line programu bioinfo.clontech.com/infusion/molarRatio.do, ačkoli během následných optimalizací reakce byla testována i jiná množství a poměry.

In-Fusion® reakce (10 µl):

- 2 µl 5x enzymového premixu (Clontech)
- 71 ng insertu po přečištění
- 200 ng vektoru po přečištění
- Doplněno ddH₂O do 10 µl

Směs byla inkubována 15 minut při 50 °C v termocykleru a poté přesunuta na led. Pokud nebyla směs okamžitě použita pro transformaci kompetentních bakterií (kapitola 4.2.2.4), byla uchována při 20 °C.

Ošetření PCR směsi reagensy Cloning Enhancer: smíseno 5 µl PCR reakce se 2 µl roztoku Cloning Enhancer, inkubováno 15 minut při 37 °C a následně 15 minut při 80 °C v termocykleru, poté uloženo na led. 1 – 2 µl takto ošetřených sekvencí byly použity do výše uvedené In-Fusion® reakce.

Pokud byly PCR produkty insertu i vektoru specifické a nemusely být izolovány z gelu, bylo možné využít zrychlené reakce spojením aplikace roztoku Cloning Enhancer a In-Fusion® reakce v jediném kroku:

- 2 µl 5x enzymového premixu (Clontech)
- 1 µl roztoku Cloning Enhancer
- 1 – 2 µl PCR směsi insertu
- 1 – 2 µl PCR směsi vektoru
- Doplněno ddH₂O do 10 µl

Směs byla inkubována 15 minut při 37 °C a následně 15 minut při 50 °C v termocykleru.

2,5 µl (při optimalizacích i jiná množství) výsledné In-Fusion® směsi bylo použito pro transformaci kompetentních buněk Stellar™ (kapitola 4.2.2.4), testována byla také transformace buněk Top10 pomocí elektroporace (kapitola 4.2.2.3).

4.2.4.12 Izolace plasmidové DNA pomocí komerční soupravy

Plasmidová DNA byla izolována dle požadavků na její kvalitu alkalickou metodou (viz kapitola 4.2.4.13) nebo za použití některé z komerčních souprav. Za účelem minipreparace plasmidové DNA byla použita souprava GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich). Pro maxipreparaci plasmidové DNA zbavené endotoxinů, která byla dále využita zejména k transfekci savčích buněk byla zvolena souprava JetStar™ 2.0 Endotoxin-free Maxiprep Kit (Genomed). Izolace byla prováděna dle pokynů výrobce.

4.2.4.13 Minipreparace plasmidové DNA alkalickou metodou

Kolonie narostlé na agarové plotně byly párátkem zaočkovány do 700 μ l LB média se selekčním antibiotikem v mikrozkuhavce a inkubovány na třepačce 16 hod při 200 rpm a 37 °C. Buňky byly centrifugovány 7 min, 4 000 x g, 4 °C a buněčný pelet byl důkladně resuspendován ve 250 μ l roztoku I (25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA-NaOH, pH 8). K suspenzi bylo přidáno 250 μ l roztoku II (1% SDS, 0,2 M NaOH) a směs byla promíchána opatrným převrácením mikrozkuhavky. Do 5 minut od přidání roztoku II bylo do mikrozkuhovek odměřeno 250 μ l roztoku III (3 M octan draselný, pH 5,5) a směs byla opět promíchána převrácením. Buňky byly dále centrifugovány 5 min, 17 000 x g při pokojové teplotě. Do nových mikrozkuhovek bylo připraveno 500 μ l 100% isopropanolu a po centrifugaci sem byl přelit vzniklý supernatant. Po promíchání převrácením byla směs centrifugována 10 min, 17 000 x g při pokojové teplotě, supernatant byl ze zkuhovek odsát a pelet byl opláchnut 200 μ l 70% ethanolu. Vzorky byly centrifugovány 5 min, 17 000 x g při pokojové teplotě, ethanol byl ze zkuhovek odsát a otevřené mikrozkuhavky byly ponechány na vzduchu při pokojové teplotě, aby se vzorky zbavily veškerého ethanolu. DNA byla poté resuspendována v ddH₂O s RNázou A (20 μ g/ml; Sigma) a použita k dalším pokusům či uskladněna v -20 °C.

4.2.4.14 Měření koncentrace DNA

K měření koncentrace izolované DNA byl použit spektrofotometr NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies) dle návodu k obsluze. Koncentrace byla stanovována měřením absorbance při vlnové délce 260 nm a pro zjištění čistoty izolované DNA byly kontrolovány poměry absorbancí 260/230 a 260/280 nm. Druhým způsobem určování koncentrace bylo užití fluorometru Qubit™ ve spojení s dodávanými roztoky - Qubit® dsDNA HS Assay Kit pro stanovení nižší (0,2 – 100 ng) koncentrace DNA či Qubit® dsDNA BR Assay Kit pro stanovení vyšší (2 – 1000 ng) koncentrace DNA dle návodu od výrobce (Invitrogen).

4.2.4.15 Sekvence DNA

Vybrané plasmidy s mutovaným genem pro VP1 protein byly sekvenovány pro zjištění četnosti vzniku mutací. Pro sekvenaci bylo použito 300 ng plasmidu a 5 pmol sekvenačního primeru, doplněno ddH₂O do objemu 8 μ l.

K sekvenování genu VP1 byly používány následující primery:

Ev-MPyV-start-fw

Ev-MPyV-stop-rw

Sq-MPyV-ATG

Sq-MPyV-STOP

Sekvenační reakci a analýzu provedla Laboratoř sekvenace DNA (PřF UK) za pomoci přístrojů: čtyřkapilární 3130 Genetic Analyzer, šestnáctikapilární 3130xl Genetic Analyzer či dvacetičtyřkapilární 3500 Genetic Analyzer od firmy Applied Biosystems.

Výsledky sekvenace byly prohlíženy v programu Chromas.

4.2.5 Práce s proteiny

4.2.5.1 Dělení proteinů pomocí denaturační elektroforézy SDS-PAAGE

(Laemmli, 1970)

Vzorky pro proteinovou elektroforézu byly smíseny s 5x koncentrovaným Laemliho pufrem v poměru 4:1 [konečná koncentrace Laemliho pufru: 1% SDS (Sigma), 10 mM Tris-HCl (Sigma), pH = 6,8, 5% β -merkptoethanol (Serva), 10% (v/v) glycerol (Lachema), 0,001% (v/v) bromfenolová modř (Lachema)], a povařeny po dobu 5 minut při 100 °C v termobločku.

Do aparatury pro přípravu gelu byla vložena omytá skla a utěsněna, aby mohl být mezi skla nalit 10% spodní gel [4 ml směsi 30% (w/v) akrylamidu (Serva) a 0,8% (w/v) N,N'-metylenbisakrylamidu (Serva), 4,5 ml Tris-HCl, pH 8,8 (Sigma), 120 μ l 10% SDS (Sigma), 3,25 ml ddH₂O, 40 μ l 10% persíranu amonného (Serva), 8,5 μ l TEMED (Sigma)], který byl převrstven izobutanolem. Po přibližně 30 minutách, kdy gel již zpolymeroval, byl odsán izobutanol a mezi skla byl nalit 10% zaostřovací gel [0,5 ml směsi 30% (w/v) akrylamidu (Serva) a 0,8% (w/v) N,N'-metylenbisakrylamidu (Serva), 0,375 ml Tris-HCl, pH 6,8 (Sigma), 30 μ l 10% SDS (Sigma), 2,11 ml ddH₂O, 20 μ l 10% persíranu amonného (Serva), 5 μ l TEMED (Sigma)]. Do zaostřovacího gelu byl vložen hřeben pro tvorbu jamek. Po zpolymerování horního gelu byla skla z gelem umístěna do aparatury pro proteinovou elektroforézu (Hoefer) a zalita pufrem pro elektroforézu [25 mM Tris (Serva), 192 mM glycin (Sigma), 0,1% SDS pH 8,3]. Do jamek vzniklých hřebem byly nanášeny připravené vzorky a marker molekulových vah (Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder či 1 minutu povařený Prestained Molecular Weight Marker, M.W.

27,000-180,000. Elektroforéza probíhala po dobu 30 minut při napětí 80 V a následně při napětí 120 V, dokud bromfenolová modř nedosáhla čela gelu.

4.2.5.2 Detekce fluorescence proteinů na polyakrylamidovém gelu

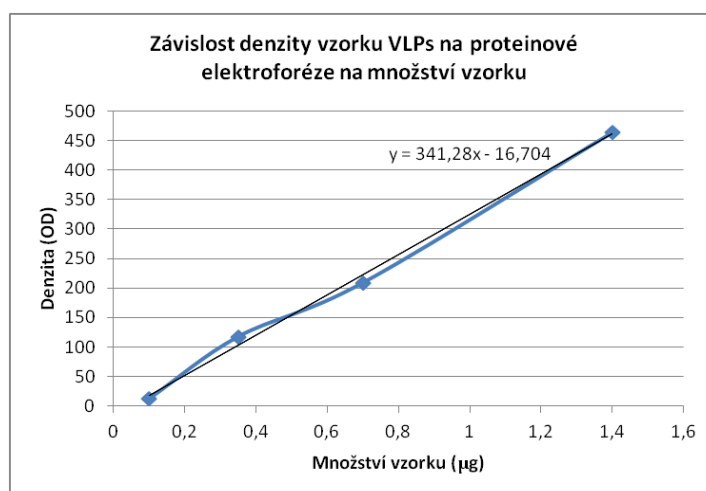
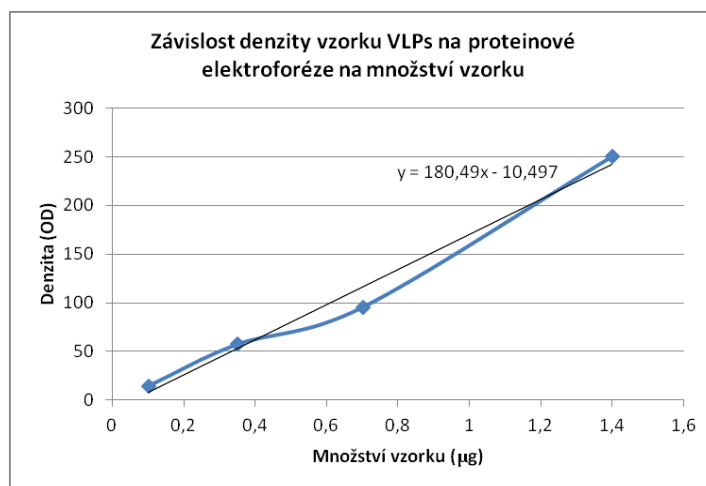
Získaný gel byl skenován fluorometrem Molecular Imager® PharosFX™ (BioRad) při vlnové délce 488 nm pro zachycení fluorescence vzorků.

4.2.5.3 Barvení polyakrylamidového gelu po proteinové elektroforéze

Výsledný gel byl barven inkubací v roztoku barvy GelCode™ Blue Stain Reagent (Thermo Fischer Scientific; založeno na Coomassie Brilliant Blue G-250) po dobu 1 hodiny za stálého třepání, a poté byl opláchnut od barvy inkubací 3 x 10 minut v dH₂O.

4.2.5.4 Stanovení koncentrace proteinů na základě densitometrie polyakrylamidového gelu

Pomocí přístroje Molecular Imager GS 800™ Calibrated Densitometer byl gel obarvený GelCode™ Blue Stain Reagent skenován a v programu Quantity One® byly vyznačeny oblasti jednotlivých proužků, jejichž denzita a plocha byly následně programem vyhodnoceny. Hodnoty denzit jednotlivých proužků byly získány vynásobením hodnot OD/mm² (density) a mm² (area). Vynesením hodnot denzit VLPs užitých jako proteinový standard o známém množství do grafu byla sestrojena standardní křivka, z níž mohly být následně odvozeny neznámé koncentrace analyzovaných vzorků, neboť množství VLP-Ax488 ve vzorku je rovno $(OD_{VLP-Ax488} + 10,497)/180,49$ (obr. 11, horní graf) a množství loxP-Ax488 ve vzorku je rovno $(OD_{loxP-Ax488} + 16,704)/341,28$ (obr. 11, dolní graf).



Obr. 11. Graf závislosti denzity vzorku na množství proteinu ve vzorku. MPyV VP1 VLPs v množství 10 ng, 100 ng, 0,35 µg, 0,7 µg a 1,4 µg byly rozděleny pomocí denaturační proteinové elektroforézy, gel byl obarven pomocí GelCode™ Blue Stain Reagent a intenzity jednotlivých proužků byly zjištěny přístrojem Molecular Imager GS 800™ Calibrated Densitometer a programu Quantity One™. Ze získaných hodnot denzit proužků byla v grafu závislosti denzity proužku na množství nanesených proteinů vytvořena kalibrační křivka. Grafy byly využity pro odhad koncentrace VLP-Ax488 (horní graf) a loxp-Ax488 (dolní graf).

4.2.5.5 Dot Blot

Na nitrocelulózovou membránu NC-45 (Serva) byly nakapány jednotlivé vzorky (v množství 1 µl). Poté, co vzorky na membráně zaschly, byla provedena imunologická detekce nanesených proteinů (kapitola 4.2.5.7).

4.2.5.6 „Western blot“

Vzorky rozdělené denaturační elektroforézou byly z polyakrylamidového gelu přeneseny na nitrocelulózovou membránu metodou „Western blot“. Nejprve byl sestaven tzv. blotovací sendvič v pořadí: plastová mřížka, tenký molitan, 4 filtrační papíry, Whatman, polyakrylamidový

gel, nitrocelulózová membrána NC-45 (Serva), opět Whatman, 4 filtrační papíry, molitan a druhá plastová mřížka. Všechny součásti byly celou dobu sestavování důkladně namáčeny v blotovacím pufru [25 mM Tris (Serva), 195 mM glycin (Sigma), 20% methanol (Lachema), pH 8,3]. Sendvič byl umístěn do blotovací aparatury (BioRad). Přenos proteinů probíhal 1 hodinu (u vzorku VLPs) nebo 3 hodiny (u vzorku viru) při 250 mA.

4.2.5.7 Imunologická detekce proteinů na nitrocelulózové membráně vizualizovaná chemiluminiscencí

Nitrocelulózová membrána se zachycenými proteiny po metodě dot blot či „Western blot“ byla blokována inkubací v 5% (w/v) odtučněném mléce v 1 x PBS po dobu minimálně 30 minut. Následně byla membrána inkubována s primární protilátkou ředěnou v 5% mléce po dobu alespoň 1 hodiny. Membrána byla promyta inkubací 3 x 10 minut v 1x PBS a poté byla inkubována 30 minut se sekundární protilátkou konjugovanou s křenuvou peroxidázou ředěnou v 5% mléce. Membrána byla opět promyta 3 x 10 minut v 1 x PBS. Smíšené vyvolávací roztoky [roztok A: 0,1 M Tris-HCl, pH 8,5 (Sigma), 250 mM luminol (Sigma), 90 mM kyselina p-kumarová (Sigma) v dH₂O a roztok B: 0,1 M Tris-HCl (Sigma), pH 8,5, 0,02% (v/v) H₂O₂ (Sigma) v dH₂O smíšené v poměru 1:1] byly nality na membránu. Po 30 sekundách byla membrána z roztoku vyjmuta a osušena buninou. K membráně byl přiložen RTG film po dobu 5 – 20 sekund a záznam na filmu byl vyvolán namočením filmu do roztoku vývojky a ustalovače.

Pokud bylo třeba detekovat na membráně více proteinů, byla chemiluminiscence membrány zhašena inkubací v 30% H₂O₂ po dobu 15 minut při 37 °C a membrána byla velmi důkladně opláchnuta nejprve dH₂O, a poté 1x PBS. Následně byla membrána znovu blokována 5% mlékem a proteiny na membráně mohly být detekovány jinou sadou protilátek.

4.2.5.8 Měření koncentrace proteinů pomocí přístroje Qubit

Pro určení koncentrace proteinu v roztoku byl využit fluorometr Qubit™ a roztoky ze soupravy Qubit® Protein Assay Kit dle návodu od výrobce (Invitrogen).

4.2.6 Práce s virem a viru podobnými částicemi

4.2.6.1 Izolace viru

(Mahy *et al.*, 1985)

Buňky NIH-3T6 na 20 PMØ10 cm infikované médiem obsahujícím myší polyomavirus s loxP místem v intronu genu pro LT antigen (loxP-wt MPyV) získaným po transfekci T2 buněk (popsáno v kapitole 4.2.3.2) byly 3x zmrazeny (na -20 °C) a rozmrazeny, a poté byly pomocí škrabátka uvolněny z Petriho misky a přeneseny do centrifugační zkumavky o objemu 50 ml. Buněčné suspenze byly centrifugovány 25 min, 4 800 rpm, 4 °C. Supernatanty byly přečištěny centrifugací přes sacharózový polštář (kapitola 4.2.6.2), pelety byly pomocí homogonizátoru homogonizovány v 10 mM roztoku Tris-HCl, pH 7,4 na ledu. Suspenze byla převedena do centrifugační zkumavky o objemu 15 ml a inkubována s neuraminidázou izolovanou z *Vibria cholerae* (Sigma; konečná koncentrace 17 mU/ml suspenze) a aprotininem (Sigma; konečná koncentrace 2 µg/ml suspenze) přes noc. Směs byla centrifugována 30 min, 4 800 rpm, 4 °C. Supernatanty byly přeneseny do ultracentrifugačních zkumavek pro rotor SW41. Pelet byl resuspendován v roztoku 10 mM Tris-HCl, pH 9,0 a inkubován na kývačce po dobu 4 hodin, RT. Suspenze byla centrifugována 30 min, 4 800 rpm, 4 °C. Supernatanty byly spojeny s předchozími v ultracentrifugačních zkumavkách a přečištěny centrifugací přes sacharózový polštář (kapitola 4.2.6.2). Pelety získané po obou ultracentrifugacích byly rozplaveny přes noc v pufru B a následně byly centrifugovány v gradientu chloridu cesného.

4.2.6.2 Centrifugace přes sacharózový polštář

Vzorek viru či částic ředěný v médiu či pufru B byl nanesen do ultracentrifugační kyvety, a poté byl podvrstven přibližně 1,5 cm vrstvou 10% (v případě mutovaných virů) či 20% (v případě loxP-wt MPyV) (w/w) roztoku sacharózy (Serva). Zkumavky s podvrstvenými vzorky byly umístěny do centrifugačních kyvet vyvážený naproti sobě pomocí pufru B. V závislosti na typu ultracentrifugačních zkumavek a tedy i typu rotoru, byly vzorky ve zkumavkách pro rotor SW41 centrifugovány 35 000 rpm, 3 hodiny, 4 °C (Ultracentrifuga Optima TM L-90K; Beckman) a vzorky ve zkumavkách pro rotor SW28 centrifugovány 25 000 rpm, 3 hodiny, 4 °C. Po centrifugaci byl supernatant slit a pelet byl přes noc rozplaven v pufru B při 4 °C.

4.2.6.3 Isopyknická centrifugace v gradientu chloridu cesného

Virový suspenze byla rozdělena do ultracentrifugačních zkumavek pro rotor SW41 a doplněna pufr B do 8,5 g. K suspenzi bylo přidáno 3,88 g CsCl (Serva) a směs byla promíchána otáčením zkumavky. Poté byla suspenze převrstvena parafínovým olejem Bayol F (Serva) a zkumavky se vzorky vložené do centrifugačních kyvet byly vyváženy naproti sobě přidáváním parafínového oleje. Vzorky byly centrifugovány v rotoru SW41 po dobu 20 hodin při 35 000 rpm a 18 °C (Ultracentrifuga Optima TM L-90K; Beckman). Pomocí rozebírače frakcí byly jednotlivé ustavené gradienty rozebrány do 15 frakcí po přibližně 0,5 ml. U každé frakce byl změřen refraktometrický index pomocí refraktometru ABBE (Carl Zeiss Jena) a pomocí metod dot blot (kapitola 4.2.5.5) a následné imunodetekce proteinů (kapitola 4.2.5.7) bylo zjištěno množství VP1 proteinu. Na základě těchto údajů byly podobné frakce spojeny do 4 větších frakcí.

4.2.6.4 Dialýza viru po centrifugaci v gradientu chloridu cesného

4 frakce viru byly nanášeny do dialyzačních střevek (Serva) povařených 10 minut v dH₂O a zasvorkovány. Vzorky v dialyzačních střevech byly vloženy do velkého objemu (2 l) pufru B, proti němuž byly dialyzovány přes noc při 4 °C za stálého míchání, aby se zbavily chloridu cesného. Po jedné hodině byl vyměněn pufr B za čerstvý. Po dialýze byly frakce viru přečištěny centrifugací přes sacharózový polštář (kapitola 4.2.6.2).

4.2.6.5 Elektronová mikroskopie a negativní barvení

Na parafilm byla nanášena vždy jedna kapka vzorku, 2 kapky ddH₂O a 2 kapky 2% kyseliny fosfowolframové, pH 7,0 (Fluka). Mikroskopická měděná síťka potažená parlodionovou pouhlíkovou membránou byla inkubována na kapce vzorku 10 minut, na každé kapce vody 30 s a na každé kapce kyseliny fosfowolframové 1 minutu. Poté byla ze sítěky pomocí buniny opatrně odsáta přebytečná tekutina a sítěky byly ponechány uschnout při pokojové teplotě. Vzorky na sítěkách byly pozorovány pod elektronovým mikroskopem JEOL JEM 1200EX. Některé sítěky a snímky byly vytvořeny J. Žáčkovou Suchanovou či H. Španielovou, některé sítěky a snímky byly vytvořeny mnou s asistencí J. Žáčkové Suchanové.

4.2.6.6 Hemaglutinační test

Hemaglutinační test umožňuje určit přibližné množství virových či viru podobných částic odvozených od myšího polyomaviru ve vzorku díky schopnosti kapsidového VP1 proteinu viru vázat kyselinu sialovou a to i na povrchu červených krvinek. Hemaglutinace neboli zesíťování červených krvinek pomocí virových částic nedovolí krvinkám sedimentovat na kulaté dno jamky 96-jamkové destičky a namísto červeného terčíku sedimentovaných buněk tak pozorujeme v jamce homogenní narůžovělou suspenzi.

Morčecí krev byla centrifugována po dobu 20 minut při 2 600 rpm a 4 °C (centrifuga Beckman Centrifuge GS-15R) a následně 3krát promyta roztokem 0,2% (w/v) BSA (Sigma) v 1 x PBS (Sevac). Pomocí stanovení hematokritu byla určena koncentrace červených krvinek ve vzorku krve: tenká skleněná kapilára byla naplněna 20 µl promyté krve, kapilára byla na jednom konci zatavena a centrifugována po dobu 5 minut při 2 500 rpm, RT (centrifuga MPW 300, rotor pro hematokrit CM-304). Srovnáním cekové výšky sloupce a výšky sloupce červených krvinek v kapiláře po centrifugaci bylo zjištěno procentuální zastoupení červených krvinek ve vzorku. Vzorek krve byl poté naředěn roztokem 0,2% BSA v 1 x PBS na koncentraci červených krvinek 0,4%.

Do každé jamky 96-jamkové destičky s kulatými dny bylo nanášeno 50 µl roztoku 0,2% BSA v 1 x PBS. Následně byly na destičku aplikovány vzorky viru či částic sestupnou dvojkovou ředící řadou tak, že do první jamky byla nanášena suspenze vzniklá smísením 5 µl vzorku a 45 µl 0,2% BSA v 1 x PBS, suspenze v jamce byla důkladně promíchána pipetováním, a poté bylo do vedlejší jamky přeneseno 50 µl této suspenze a důkladně promícháno. Do následující jamky bylo opět nanášeno 50 µl z jamky předcházející a tento postup byl opakován až do poslední jamky destičky, z poslední jamky bylo 50 µl odpipetováno pryč. Následně bylo do každé jamky přidáno 50 µl připravené 0,4% suspenze červených krvinek, jemně promícháno poklepem a destička byla inkubována 1 hodinu při 4 °C. Z pořadí jamky, ve které jako poslední došlo k aglutinaci červených krvinek virem (n), byl odečten hemaglutinační titer vzorku v HAU (hemaglutinační jednotka; 1 HAU u myšího polyomaviru představuje 10⁷ virových částic.)

$$\text{HAU} = \text{případné předchozí ředění vzorku} \cdot 10 \cdot 2^{(n+1)}$$

4.2.6.7 Značení viru podobných částic a viru fluorescenční barvou

Dialýza pro převedení VLPs a viru do vhodného pufru

Před značením byly virové částice v pufru B převedeny do hydrogenuhličitanového pufru (150 mM NaHCO₃, 0,1 mM CaCl₂, pH 8.2) pomocí Slide-A-Lyzer™ MINI Dialysis Device (Sigma-Aldrich) dle návodu výrobce. Dialýza probíhala přes noc za stálého třepání na ledu, pufr byl v průběhu dialýzy 3krát vyměněn za čerstvý. Vzorek loxP-wt MPyV byl následně zakonzentrován umístěním dialyzačního fitru na vrstvu polyethylenglykolu 20 000 (Sigma-Aldrich). Průběžně bylo sledováno ubývající množství vzorku a byla měřena koncentrace proteinů (kapitola 4.2.5.8). Po docílení vhodné koncentrace byl filtr umístěn na 3 minuty do hydrogenuhličitanového pufru pro odmytí polyethylenglykolu.

Po inkubaci s vzorků s fluorescenční barvou byly vzorky stejným způsobem převedeny zpět do pufru B.

Inkubace virových a viru podobných částic s fluorescenční reaktivní barvou

Částice v hydrogenuhličitanovém pufru byly po dobu 1,5 hodiny inkubovány s reaktivní fluorescenční barvou Alexa Fluor 488 NHS Ester (sukcinimidyl ester; Molecular Probes; v práci užívána zkratka Ax488-NHS) v molárním poměru 0,5 ekvivalentu reaktivní fluorescenční barvy ku 1 ekvivalentu exponovaných povrchových lysinů virových částic, na něž se barva váže, při pokojové teplotě za stálého třepání ve tmě.

Množství barvy vložené do reakce bylo vypočteno dle následujícího postupu:

Množství částic ve vzorku bylo zjištěno vydělením celkového množství proteinu ve vzorku (mg) hmotností jedné částice ($2,69 \cdot 10^{-14}$ mg; bohužel jsem při výpočtu množství barvy pro značení viru nezapočítala hmotnost minoritních kapsidových proteinů, která je však oproti hmotnosti všech VP1 proteinů v částici minimální). Zjištěný počet částic byl vynásoben počtem exponovaných volných lysinových zbytků na povrchu částice (720). Celkový počet exponovaných lysinových zbytků v roztoku byl vydělen Avogadrovou konstantou, čímž byla zjištěna molární koncentrace exponovaných lysinových zbytků v roztoku. Tato molární koncentrace byla vynásobena ekvivalentem činidla, který chceme do reakce vložit (v našem případě vynásobeno 0,5). Tím jsme získali počet molů barvy, které máme ke vzorku přidat. Toto látkové množství bylo vyděleno molární koncentrací barvy (15 nmol/μl), čímž jsme zjistili objem barvy, který je třeba přidat k roztoku částic.

4.2.6.8 Zkoumání interakce fluorescenčně značených VLPs či viru s buňkami pomocí průtokové cytometrie

V prvním experimentu, kde byly použity pouze značené VLPs, byly vybrané buněčné linie vysety na 12-jamkovou destičku tak, aby v den měření byla hustota buněk přibližně $3 \cdot 10^5$ buněk/jamka či $6 \cdot 10^5$ buněk/jamka (některým buňkám nesvědčí příliš nízká hustota okolních buněk). Z jamek bylo odsáto médium, buňky byly opláchnuty médiem DMEM se sérem a inkubovány 1 hodinu při 37 °C s částicemi značenými barvou Alexa488 (v množství 650 000 částic na buňku) nebo byly inkubovány se samotnou zreagovanou barvou Alexa488-NHS (5 μ l 0,03 nM Ax488-NHS v 1,5 M hydroxylaminu v hydrogenuhličitanovém pufru bylo přidáno do 0,5 ml média) v médiu DMEM bez séra. Vše bylo ředěno tak, aby na $3 \cdot 10^5$ buněk připadalo 0,5 ml suspenze s potřebným množstvím značených VLPs či samotné barvy. Jako negativní kontrola sloužilo samotné médium DMEM bez séra. Po jedné hodině bylo médium odsáto, k buňkám bylo přidáno 300 μ l 1x akutázy, inkubováno 5 – 10 minut, resuspendováno v 1 ml DPBS, přeneseno do mikrozkuhavky a umístěno na led.

Ve druhém experimentu, pro nějž byl kromě značených VLPs použit i značený virus, byla před aplikací částic na buňky nejprve část buněk NIH-3T3 inkubována po dobu 16 hodin v médiu DMEM se sérem obsahujícím 20 μ M Gleevec (Imatinib mezylát; Sigma) a část buněk inkubována po dobu 1 hodiny v médiu DMEM bez séra v přítomnosti neuraminidázy pocházející z *Vibria cholerae* (Sigma; 50 mU neuraminidázy na 10^6 buněk). Všechny buněčné linie vybrané pro pokus narostlé na Petriho miskách byly následně sklizeny, spočítány, centrifugovány (10 min, 90 x g, RT), převedeny do média DMEM bez séra a rozděleny do mikrozkuhovek. K buňkám byly přidány VLPs či loxP-wt MPyV značené barvou Alexa488 v množství 400 000 částic na buňku či samotná zreagovaná barva viz výše a inkubovány po dobu 1 hodiny v 37 °C.

Následující část již byla společná oběma experimentům. Buněčné suspenze byly centrifugovány 5 min, 300 g, 4 °C. Poté bylo DPBS odsáto, buněčné pelety byly znovu resuspendovány v 1 ml DPBS, centrifugovány 5 min, 300 g, 4 °C a po odsátí supernatantu byly vzorky na závěr resuspendovány ve 300 μ l DPBS a měřeny na průtokovém cytometru Beckman Coulter CytoFLEX s excitační vlnovou délkou laseru 488 nm, analyzováno vždy 10 000 událostí v každém vzorku. Po celou dobu práce byly vzorky drženy na ledu. Získané hodnoty mediánu intenzity fluorescence vzorků (VZ) po excitaci byly normalizovány vůči mediánu intenzity fluorescence negativní kontroly (NK) po excitaci dle vzorce:

relativní fluorescence vzorku = (medián VZ – medián NK)/medián NK

Hodnoty relativní fluorescence vzorku byly následně vyneseny do grafu.

4.2.7 Statistické vyhodnocení náhodnosti vzniku sekvencí během mutagenní PCR

Po srovnání sekvencí pomocí „Multiple sequence alignment“ (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/) byly spočítány pozice, na nichž došlo k záměnám napříč polyomaviry MPyV, SV40, JCV, BKV a MCPyV a napříč 22 mutantami. Získané četnosti mutovaných a konzervovaných pozic byly zaneseny do tabulky 1 a pomocí χ^2 testu byla testována hypotéza:

Ke vzniku mutací při mutagenní PCR dochází především v nukleotidech, které mezi polyomaviry nejsou konzervované.

(Nulová hypotéza: Mutace při mutagenní PCR vznikají v náhodných nukleotidech.)

Tab. 1. Tabulka četností mutovaných a konzervovaných pozic v sekvenci VP1 genu různých polyomavirů a mutant. Uvedeny jsou pozorované četnosti zjištěné spočítáním mutovaných a nemutovaných pozic VP1 genu napříč polyomaviry a napříč mutantami a dále očekávané četnosti při zcela náhodném rozložení mutací do konzervovaných a nekonzervovaných oblastí. Do tabulky jsou vyneseny počty nukleotidů, které jsou konzervovány u mutant i polyomavirů, konzervované u mutant, ale mutované u polyomavirů, mutované u mutant, ale konzervované u polyomavirů a mutované u mutant i polyomavirů.

Tabulka četností konzervovaných a mutovaných pozic ve VP1 genu napříč polyomaviry a mutantami				
		Konzervované u polyomavirů	Mutované u polyomavirů	Celkem
Konzervované u mutant	Pozorovaná četnost:	211	382	593
	Očekávaná četnost:	223	370	593
Mutované u mutant	Pozorovaná četnost:	224	338	562
	Očekávaná četnost:	212	350	562
Celkem	Pozorovaná četnost:	435	720	1155
	Očekávaná četnost:	435	720	1155

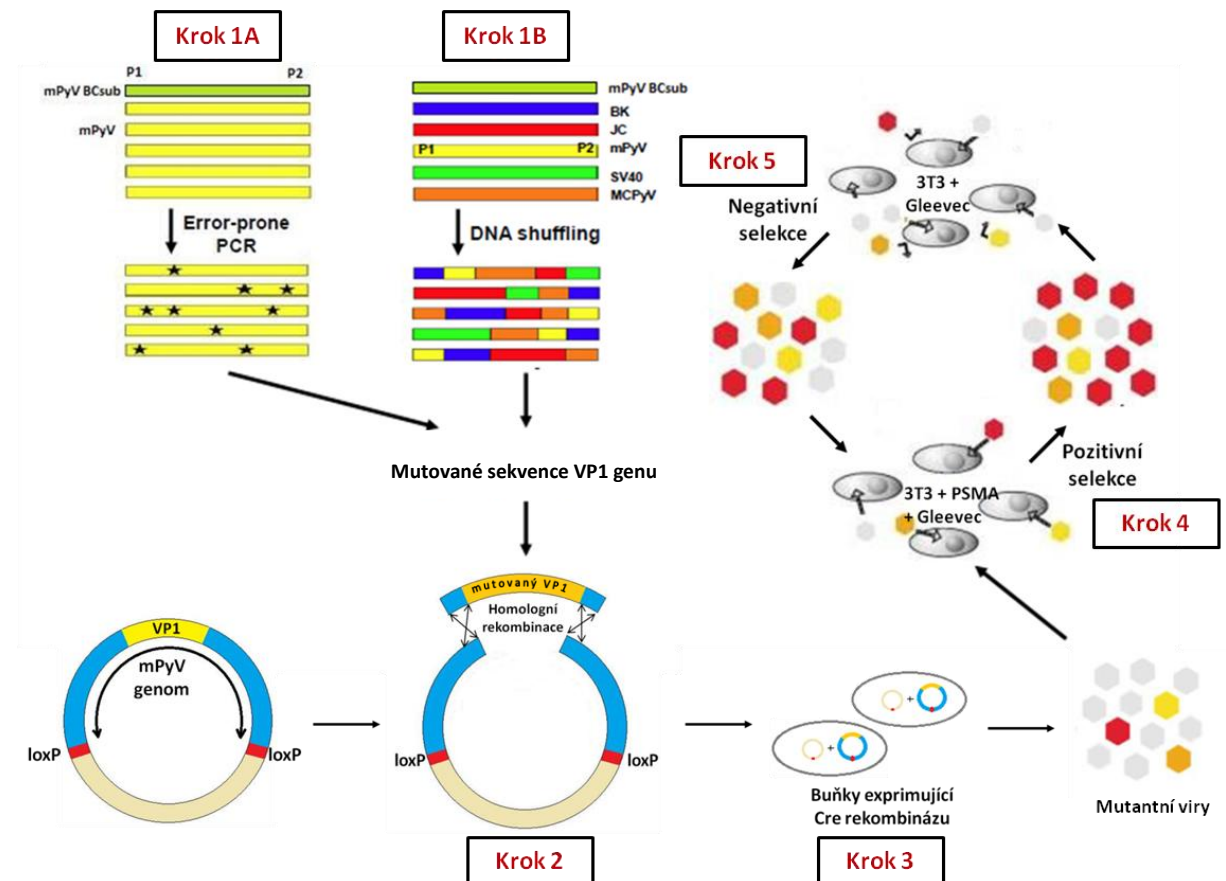
Pomocí funkce CHITEST v programu Microsoft Excel byl z pozorovaných a očekávaných četností vypočten χ^2 test výše uvedených četností s výsledkem $p = 0,13$, $\chi^2 = 2,247$

Nulovou hypotézu tedy nemůžeme zamítnout ($p > 0,05$), z čehož vyplývá, že jsme nenašli souvislost mezi pozicemi mutací zavedených do sekvence během mutagenní PCR a míst, která nejsou konzervovaná napříč polyomaviry.

5 VÝSLEDKY

5.1 Schéma projektu

Projekt, v němž se pokoušíme přeměřovat myší polyomavirus na buňky nádoru prostaty jsme navrhli tak, jak je schematicky znázorněno na obr. 12.



Obr. 12. Schema navrženého projektu s cílem přeměřovat myší polyomavirus na molekulu PSMA. Gen pro kapsidový protein VP1 myšího polyomaviru společně s VP1 genem se substitucí v sekvenci povrchové BC smyčky budou náhodně mutovány pomocí „error-prone PCR“ (Krok 1A). Zmíněné geny v kombinaci s VP1 geny 4 dalších polyomavirů (BK, JC, SV40 a MCPyV) budou také podrobeny metodě „DNA shuffling“, která má umožnit promíchání částí sekvencí vkládaných genů (Krok 1B). Mutované VP1 geny budou následně vloženy do plasmidu obsahujícího zbytek myšího polyomavirového genomu ohraničeného dvěma loxP místy pomocí metody In-Fusion® na základě komplementárních oblastí na koncích insertu a vektoru (Krok 2). Výsledné plasmidy budou transfekovány do savčích buněk produkujících Cre rekombinázu, kde by díky loxP místům mělo dojít k vystřížení genomu rekombinantního myšího polyomaviru a produkci mutovaných polyomavirů (Krok 3). Mutované viry budou nejprve pozitivně selektovány na myších buňkách 3T3 s odstraněným gangliosidem GD1a pomocí Gleevecu, exprimujících na svém povrchu PSMA (Krok 4). Viry schopné vstoupit do těchto buněk budou dále negativně selektovány na buňkách 3T3 ošetřených Gleevecem, kdy odstraníme všechny viry, které byly schopné vstoupit do buněk (Krok 5). Sekvence získaných mutant mohou být podrobeny dalším kolům náhodné mutagenese a selekce. Obrázek vznikl ve spolupráci s J. Žáčkovou Suchanovou a část obrázků ve schématu byla převzata a upravena z publikací Perabo *et al.* (2003) a Bartel *et al.* (2011).

Nejprve je třeba vytvořit rozsáhlou knihovnu náhodně mutovaných polyomavirových genů pro VP1 protein. Toho docílíme jednak využitím „error-prone PCR“, tedy PCR provedené v mutagenních podmínkách, kdy při amplifikaci cílové sekvence dochází ve zvýšené míře k chybné inkorporaci nukleotidů, a jednak využijeme metodu zvanou „DNA shuffling“. „DNA shuffling“ je metoda založená na rekombinaci homologních genů (viz kapitola 2.3.1), při níž dojde k promíchání fragmentů těchto genů a výsledkem je chimerní gen poskládaný z různých částí vstupních genů. Vybrali jsme 4 různé polyomaviry, jejichž VP1 geny by měly společně s VP1 genem myšího polyomaviru vstoupit do reakce „DNA shuffling“, aby vytvořily neobvyklé kombinace částí VP1 sekvencí. Jsou jimi viry JCV, BKV, MCPyV a SV40, jež se dokáží pomnožit v člověku, a každý z nich využívá pro vstup do buňky jiný receptor, čímž by mohly významně přispět k přesměrování viru na lidskou buněčnou linii.

Abychom spojili ryze náhodný přístup s přístupem racionálním a napomohli tak ještě více usměrnit evoluci, zařadíme jak do reakce „DNA shuffling“, tak do „error-prone PCR“ také VP1 gen myšího polyomaviru, který nese substituci v sekvenci kódující povrchovou BC smyčku, která se účastní procesu rozpoznání buněčného receptoru a interakce s ním (označován jako BCsub MPyV VP1). Do DNA sekvence této smyčky byla vnesena sekvence kódující peptid, který by měl dle předpokladů vázat PSMA (molekulu, jež se ve zvýšené míře vyskytuje na povrchu buněk rakoviny prostaty), což se však zatím v kontextu virové částice a buňky nepodařilo experimentálně prokázat (Žáčková Suchanová, nepublikovaná data). Doufáme, že mutace takto substituovaného proteinu by mohly vložený peptid umístit do jiného kontextu či pozice, kde by se jeho vazebné schopnosti pro PSMA mohly projevit. Variabilita mutací v připravené knihovně a jejich vliv na sekvenci hlavního kapsidového proteinu bude analyzována pomocí sekvenace několika modifikovaných VP1 genů.

Následuje vložení mutovaných VP1 genů do vektoru připraveného z plasmidu pBS-PyI, což je plasmid obsahující celý genom myšího polyomaviru. Vektor je připraven pomocí inverzní PCR vycházející z konců VP1 genu. Pro klonování genů byla zvolena metoda In-Fusion® (*Zhu et al.*, 2007), jejímž principem je spojení krátkých komplementárních oblastí na obou koncích vektoru a inzertu následované transformací plasmidu do bakteriálních buněk. Výsledkem by měl být plasmid, kde je v rámci virového genomu původní VP1 gen nahrazen mutovaným VP1 genem.

Genom myšího polyomaviru je na plasmidu ohraničen dvěma loxP místy, jež v buňkách produkujících Cre rekombinázu mohou mezi sebou rekombinovat, čímž dojde k vyštěpení cirkularizovaného genomu MPyV z vektoru. Jediným pozůstatkem v genomu MPyV po

rekombinaci je tak jedno loxP místo umístěné v intronu genu velkého T antigenu (Hron *et al.*, 2013). Velkou výhodou systému Cre/loxP je jednoduchost a nepříliš časově náročná produkce virionů. Stačí totiž pouze transfekovat izolované plasmidy do buněk produkujících Cre rekombinázu, která zajistí vyštěpení virového genomu, z něhož se mohou začít produkovat virové proteiny a posléze vznikat nové virové genomy a virové potomstvo. Není tedy třeba žádné další manipulace s plasmidy zahrnující restriční štěpení a ligaci, které mohou navíc činit potíže a mohou snižovat účinnost produkce mutantů.

Vzniklou knihovnu mutantních virionů je poté třeba selektovat ve vhodně zvolených selekčních podmínkách tak, abychom získali viriony, jež jsou schopné se specificky vázat či vstupovat do buněk nádoru prostaty a zároveň, abychom vyloučili viriony schopné vstupu do necílových buněk

Naším původním záměrem bylo přeměřovat myší polyomavirus na buňky rakoviny prostaty pomocí interakce s bohatě glykosylovaným proteinem PSMA (prostatický specifický membránový antigen, marker buněk nádoru prostaty). Jelikož myší polyomavirus není schopen pomnožit se v lidských buňkách, je třeba selekci provádět na buňkách myších. Za tímto účelem měla být připravena linie myších fibroblastů NIH-3T3 permissivních pro MPyV, které stabilně produkují a transportují na svůj povrch protein PSMA. Získané mutantní viriony budou moci být pozitivně selektovány aplikací na připravenou buněčnou linii produkující PSMA (plasmatická membrána buněk NIH-3T3 obsahuje pouze jeden ze vstupních gangliosidů wt MPyV a to GD1a, ten však bude odstraněn preinkubací buněk s inhibítorem tyrosinových kináz - Gleevecem). Pokud dojde ke vzniku mutace v sekvenci genu VP1 umožňující vazbu hlavního kapsidového proteinu na PSMA, bude takový virion internalizován do buňky a pomnoží se zde. Díky odstranění GD1a by se nemutované viriony neměly v těchto buňkách pomnožit. Pomnožené viriony budou poté navíc negativně selektovány na buňkách NIH-3T3 preinkubovaných s Gleevecem – v tomto kroku se zbavíme nespecificky vstupujících virionů, neboť do dalších kol mutagenese a selekce vezmeme pouze ty viriony, které do těchto buněk nedokázaly vstoupit. Postupně bychom tedy měli získat pouze viriony vstupující do buňky díky vazbě PSMA.

Takto navržené schéma však vycházelo z původního předpokladu, že determinanty na buněčném povrchu určují úspěšnost infekce a přeměrování vazby virionů z GD1a na PSMA (v součinnosti s dalšími molekulami) povede k zahájení infekce. Vzhledem k tomu, že poslední publikované práce u polyomavirů (kapitola 2.1.5) naznačují, že vazba viru na gangliosidy je nutná

pro směrování viru do ER, kde pravděpodobně dochází ke konformačním změnám virionu zodpovědným za průnik viru do cytoplasmy a jádra, rozhodli jsme se nejprve otestovat funkčnost našeho schématu na wt MPyV. Testovali jsme tedy infektivitu divokého MPyV na permisivních buňkách po odstranění receptorů pro vstup viru a také po přidání chemické látky vyvolávající perforaci buněčných váčků (polyethylenimin, PEI). Cílem těchto experimentů bylo ověřit hypotézu, že PEI může stimulovat únik polyomaviru z endozomálního systému bez nutnosti směrování do ER. Pokud by byla naše hypotéza správná, PEI by dokázal stimulovat infekci také těch virionů, které nespecificky (tedy použitím jiných než přirozených receptorů pro vstup do buňky) vstoupily do buňky a za normálních okolností by infekci nedokázaly započít a PEI by tedy mohl být využit v našich experimentech.

V opačném případě by bylo nutné zásadně přehodnotit celé schéma selekce mutant a oddělit kroky pomnožení a selekce viru. V tomto ohledu je zajímavé, že exprese gangliosidů na buněčném povrchu velmi často koreluje s nádorovou progresí a konkrétně u buněčných linií odvozených z kastrované rezistentních nádorů prostaty (linie DU-145 a PC3), které neexprimují PSMA, bylo zjištěno vysoké zastoupení GD1a (Ravindranath *et al.*, 2004, 2005). Stejně tak prostatické nádorové linie ve vysoké míře exprimují RGD-vazebné integriny (Sutherland *et al.*, 2012), na které se MPyV váže (Caruso *et al.*, 2003). Proto jsme se rozhodli také charakterizovat a srovnat vazbu a vstup viru podobných částic odvozených od myšího polyomaviru (a také vazbu a vstup MPyV divokého typu) do vybraných buněčných linií pro zjištění, zda myší polyomavirus má či nemá přirozenou schopnost vstupovat ve zvýšené míře do nádorových buněk. V prvním případě by nebylo nutné virus dále modifikovat, ve druhém případě by nebylo třeba zabývat se odstraněním původního tropismu viru při zvyšování jeho vstupu do lidských nádorových buněk.

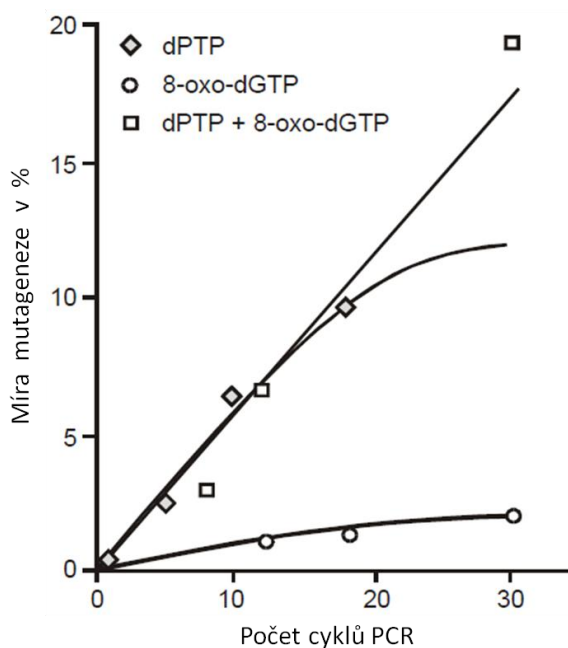
5.2 Zavedení efektivního systému pro generování variant myšího polyomaviru s náhodnými mutacemi v hlavním kapsidovém proteinu

5.2.1 Náhodná mutageneze genu MPyV VP1 a BCsub MPyV VP1 pomocí „error-prone PCR“

První metodou, kterou jsme se rozhodli použít pro zanášení náhodných mutací do genu pro VP1 protein, byla metoda „error-prone PCR“, tedy PCR genu našeho zájmu provedená v mutagenních podmínkách. Vyzkoušeli jsme 2 systémy pro „error-prone PCR“. První z nich - GeneMorph® II Random Mutagenesis Kit využívá Mutazyme® II DNA polymerázu, tedy DNA polymerázu speciálně vyvinutou pro „error-prone PCR“, která by na rozdíl od Taq DNA polymerázy neměla upřednostňovat záměny nukleotidových párů AT za GC. Druhým zvoleným přístupem bylo využití mutagenních analogů dNTP v kombinaci s Taq DNA polymerázou, které jsou v prvním kole PCR začleněny do vznikajících sekvencí, kde způsobí zařazení nesprávných nukleotidů do komplementárního vlákna. Ve druhém kole PCR bez přítomnosti analogů jsou zabudované analogy nahrazeny klasickými deoxyribonukleotidy a v sekvenci zůstanou záměny.

5.2.1.1 Náhodná mutageneze pomocí analogů dNTP

Gen MPyV VP1 z plasmidu pBS-PyI byl amplifikován polymerázovou řetězovou reakcí pomocí Taq polymerázy a primerů Ev-MPyV-start-fw a Ev-MPyV-stop-rw za přítomnosti nukleotidových analogů 8-oxo-dGTP a dPTP (viz kapitola 4.2.4.4). Výrobce přikládá graf frekvence vzniku mutací v závislosti na množství cyklů mutagenní PCR a použitých analogů (viz obr. 13). Aplikovali jsme proto 30 cyklů mutagenní PCR s využitím obou dodaných analogů zároveň pro dosažení co nejvyšší míry mutageneze. Po nahrazení dNTP analogů klasickými nukleotidy ve 2. amplifikační reakci byl však získán produkt se silným smírem a nespecifickými proužky a to i po využití Vent DNA polymerázy namísto dodávané Taq DNA polymerázy a při aplikaci různých teplot nasedání primerů. Proto jsme pro další pokusy snížili počet cyklů mutagenní PCR.



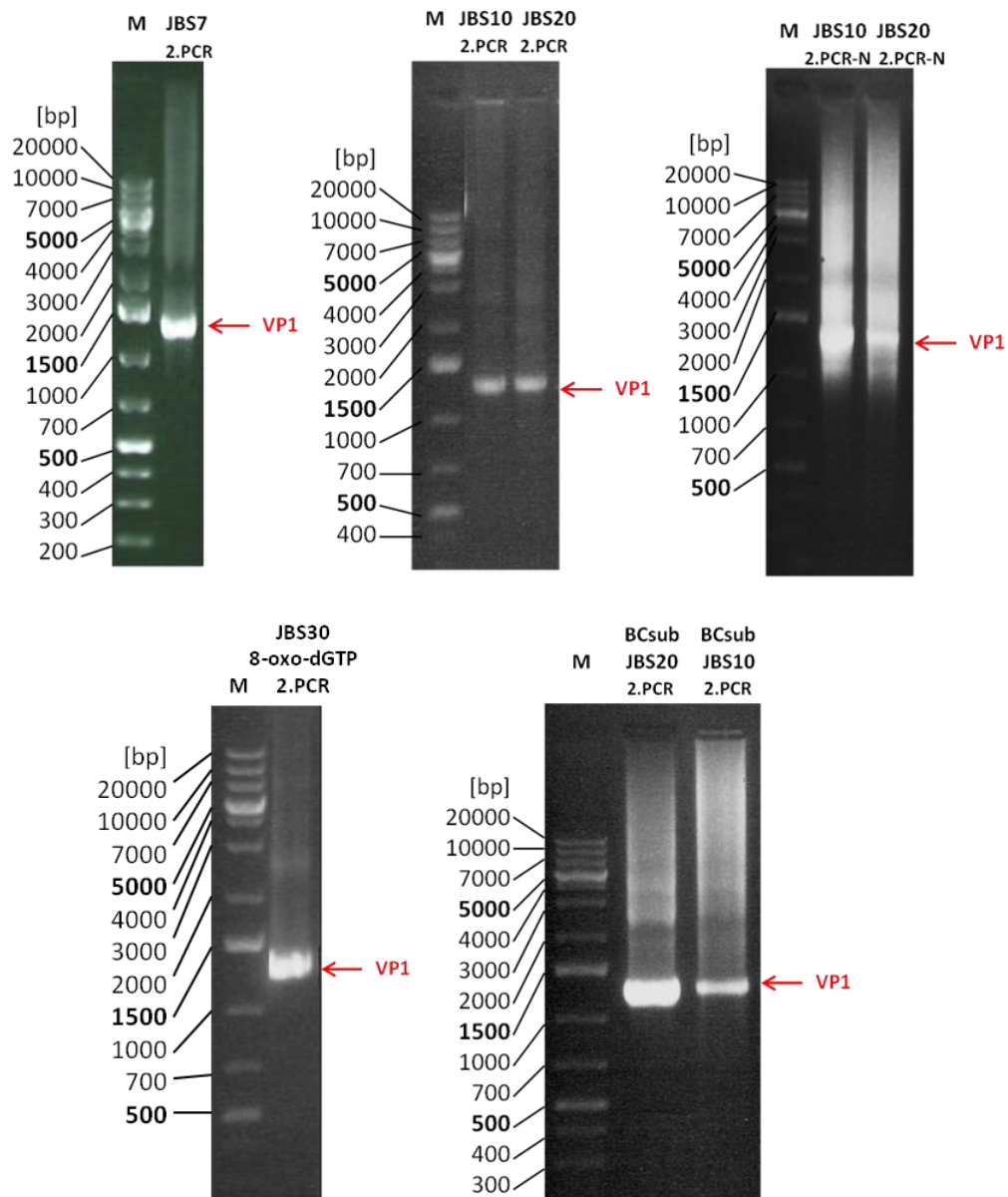
Obr. 13: Graf míry mutagenéze dosažitelné při použití soupravy JBS dNTP Mutagenesis Kit. Míra mutagenéze závisí na počtu cyklů PCR 1. amplifikační reakce a použitých analogiích nukleotidů. Upraveno dle Jena Bioscience, *JBS dNTP-Mutagenesis Kit*. Instruction Manual, 2013.

Snížení počtu mutagenních cyklů PCR na 7 s sebou přineslo nárůst množství produktu o požadované délce a úbytek nescifických proužků na elektroforetogramu po 2. kole PCR (viz obr. 14 vlevo nahoře). Výsledný produkt tedy mohl být přečištěn pomocí soupravy NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up a použit pro klonování (kapitola 5.2.4 ve výsledcích).

Po klonování a sekvenaci takto připravených VP1 genů jsme zjistili, že většina analyzovaných sekvencí neobsahovala mutace. Důvodem je zřejmě fakt, že templátová DNA se do reakce přidává v poměrně velkém množství (2 ng/μl reakční směsi) a není z reakce odstraněna, může být tedy amplifikována ve 2. kole PCR (bez mutagenních nukleotidů) a poté vstoupit do klonovací reakce. Vmezeřili jsme proto mezi 1. a 2. kolo PCR ještě krok ošetření 1. PCR reakce restrikční endonukleázou *DpnI*, která štěpí pouze methylovanou (tedy templátovou) DNA a tím ji odstraní z reakce, takže nemůže být ve 2. kole PCR namnožena.

Takto byly připraveny MPyV VP1 geny, jež prošly 10 nebo 20 mutačními PCR cykly (obr. 14, nahoře uprostřed), a také BCsub MPyV VP1, taktéž po 10 a 20 mutačních cyklech (obr. 14 nahoře vpravo; jako templát zde sloužil MPyV VP1 gen připravený v kapitole 5.2.2.1). Výsledné produkty po mutagenезi MPyV VP1 o požadované délce byly navíc izolovány z gelu po DNA elektroforéze pro odstranění nespecifických produktů.

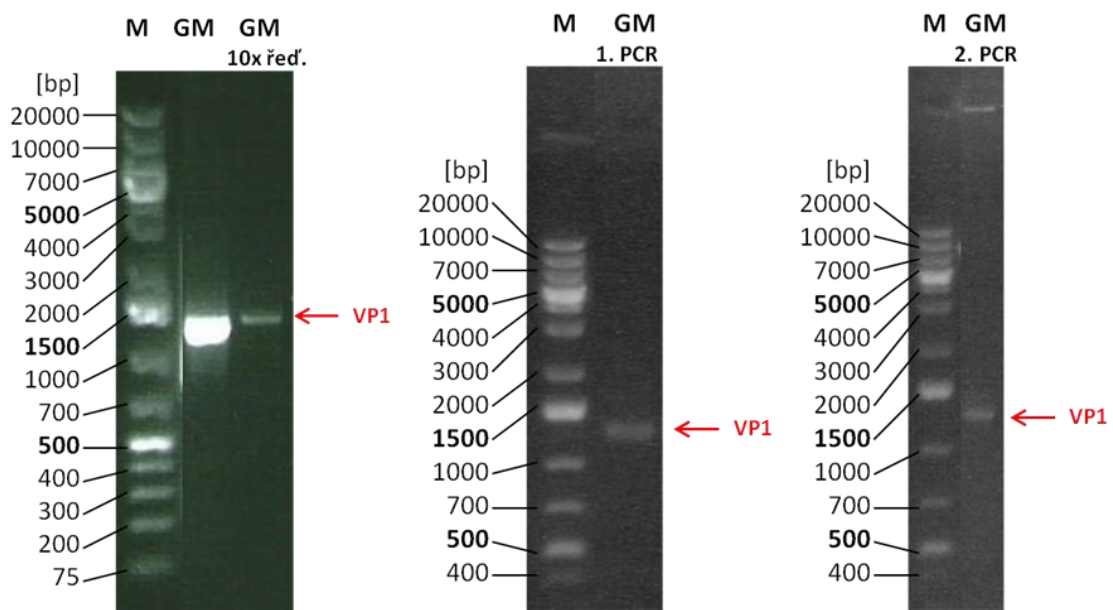
V průběhu klonování pomocí metody In-Fusion® (viz kapitola 5.2.4) jsme se potýkali s problémem nízké účinnosti klonování. Domnívali jsme se, že příčinou by mohlo být mutování koncových oblastí genu v průběhu mutagenní PCR, které v reakci zůstanou i po 2. kole PCR a některé geny tak mohou mít mutované oblasti, které jsou zásadní pro In-Fusion® reakci, jež vyžaduje naprostou sekvenční komplementaritu konců insertu s konci vektoru. Nižší počet genů se správnou sekvencí na koncích by tedy mohl vést ke sníženému množství vznikajících klonů oproti kontrole, ke které nebyly přidány analogy nukleotidů. Připravili jsme proto 2 sady primerů – první sadou jsou klasické primery (Nový primer Ev-MPyV-1. PCR-start-fw a Nový primer Ev-MPyV-1. PCR-stop-rv), druhá sada primerů je shodná s první, ale navíc je prodloužena o 15 nt dlouhé oblasti komplementární ke koncům vektoru na svém 5' konci (Nový primer Ev-MPyV-2. PCR-start-fw a Nový primer Ev-MPyV-2. PCR-stop-rv). Oblast nutná pro klonování nezávislé na ligaci potom tedy nepodstupuje mutagenезi a zůstává nezměněna. Kvůli nevhodné sekvenci v okolí původních primerů pro jejich prodloužení musely být primery nasedající za konec VP1 genu posunuty do ještě o něco vzdálenější oblasti za VP1 gen (obr. 14 vlevo dole). Větší pravděpodobnost dát vzniknout funkčnímu proteinu mají geny mutované menší měrou, proto jsme využili možnost přidat do mutagenní PCR pouze jeden z nukleotidových analogů, a to 8-oxo-dGTP (obr. 14 vpravo dole), což by mělo vést pouze k relativně nízké mutační frekvenci (viz obr. 13).



Obr. 14. Elektroforetogramy výsledných genů získaných metodou „error-prone PCR“. MPyV VP1 gen byl mutován pomocí 7 (obrázek nahoře vlevo, JBS7), 10 (obrázek nahoře uprostřed, JBS10 a obrázek nahoře vpravo, JBS10) či 20 (2. obrázek nahoře uprostřed, JBS20 a obrázek nahoře vpravo, JBS20) cyklů v přítomnosti směsi dvou dNTP analogů a klasických dNTP, případně 30 cyklů (obrázek dole vlevo) pouze v přítomnosti analogu 8-oxo-dGTP a klasických dNTP. Následně bylo provedeno 30 cyklů klasické PCR bez přítomnosti dNTP analogů (odtud název 2. PCR). BCsub MPyV VP1 byl mutován pomocí 10 či 20 mutagenních cyklů (obrázek dole vpravo, BCsub JBS10 a BCsub JBS20). Pro 1. i 2. PCR reakci byly použity primery Ev-MPyV-start-fw a Ev-MPyV-stop-rw, pouze produkty na obrázku vpravo nahoře jsou amplifikovány v 1. kole PCR pomocí nových primerů Nový primer Ev-MPyV-1. PCR-start-fw a Nový primer Ev-MPyV-1. PCR-stop-rv, a ve 2. kole PCR pomocí primerů Nový primer Ev-MPyV-2. PCR-start-fw a Nový primer Ev-MPyV-2. PCR-stop-rv, proto pojmenování 2. PCR-N. Šipka značí očekávanou velikost produktu (přibližně 1200 bp). Na gel bylo naneseno vždy 2,5 μ l markeru GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (M) a 5 μ l PCR směsi (obrázek vlevo nahoře), 3 μ l PCR směsi přečištěné pomocí soupravy NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (obrázek nahoře uprostřed), 5 μ l PCR směsi (obrázek vpravo nahoře) 1 μ l PCR směsi (obrázek vlevo dole) a 4 μ l PCR směsi (obrázek vpravo dole).

5.2.1.2 Náhodná mutagenese pomocí soupravy GeneMorph® II Random Mutagenesis Kit

DNA sekvence MPyV VP1 genu byla mutována také pomocí Mutazyme® II DNA polymerázy. Míra mutagenese by měla záviset především na množství DNA vkládaném do reakce a počtu cyklů PCR. Po aplikování 30 PCR cyklů na 100 ng templátového plasmidu pBS-PyI (tedy 15 ng cílového úseku, jež má být namnožen) s využitím primerů nasedajících na začátek (Ev-MPyV-start-fw) a za konec (Ev-MPyV-stop-rw) MPyV VP1 genu byl na elektroforetogramu patrný jediný specifický proužek (viz obr. 15 vlevo). Po zaklonování genů prošlých touto mutagenesí jsme však zjistili, že žádný z osekvenovaných genů neobsahoval mutace. Přikročili jsme proto ke snížení množství templátového plasmidu na 3,4 ng (tedy 0,5 ng cílového úseku) – viz obr. 15 uprostřed. Pro ještě větší zvýšení počtu mutací jsme navíc použili 0,3 μ l této reakce jako templát pro další kolo PCR provedené s Mutazyme® II DNA polymerázou. Výtěžek této reakce byl velmi nízký, proto na obrázku (obr. 15 vpravo) je zobrazena získaný fragment až po přečištění a zakoncentrování soupravou NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up.



Obr. 15. Elektroforetogramy produktu mutagenese VP1 genu pomocí soupravy GeneMorph® II Random Mutagenesis Kit. Vlevo: 1 μ l koncentrovaného a 1 μ l 10krát ředěného produktu mutagenní amplifikace 100 ng plasmidu pBS-PyI. Uprostřed: 2 μ l produktu mutagenní amplifikace 3,4 ng plasmidu pBS-PyI. Vpravo: 3 μ l přečištěného produktu mutagenní reamplifikace 0,3 μ l produktu 1. kola mutagenní amplifikace. Velikost VP1 genu po amplifikaci zvolenými primery by měla činit 1244 bp. M značí Marker molekulových vah (GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder).

5.2.2 „DNA shuffling“

Rozhodli jsme se rozšířit spektrum mutací v kódující sekvenci VP1 proteinu i jiným způsobem než pouhou náhodnou mutagenézí. Pomocí metod založených na rekombinaci je totiž možné poskládat sekvenci zvoleného genu ze sekvencí tohoto genu v příbuzných organismech či virech. Metoda „DNA shuffling“ umožní vznik chimerních genů pomocí náhodné fragmentace homologních genů DNázou I a následným pospojováním těchto fragmentů pomocí tzv. „selfpriming PCR“, kdy jako primery slouží překrývající se homologní části fragmentů. Závěrečná PCR s využitím primerů komplementárních k začátku a konci cílové sekvence amplifikuje získané rekombinantní geny.

5.2.2.1 Příprava VP1 genů vybraných polyomavirů

Základním krokem pro „DNA shuffling“ je příprava vstupních VP1 genů všech zvolených polyomavirů (MPyV, SV40, JCV, BKV, MCPyV a BCsub MPyV) v dostatečném množství. Geny byly amplifikovány pomocí PCR s primery navrženými tak, aby nasedaly přímo na začátek a konec VP1 genu u všech polyomavirů kromě MPyV, kde je druhý primer umístěn až za koncem VP1 genu a to z několika důvodů. Prvním důvodem byla sekvence v této oblasti, na níž nebylo možné navrhnout primery pro inverzní PCR vektoru, která má běžet na opačnou stranu od VP1 genu, neboť v oblasti se vyskytuje polyA signál a tedy oblasti bohaté na AT, které by v navrhovaných primerech tvořily smyčky a vzájemně komplementární úseky. Primery tedy musely být posunuty dál od VP1 genu. Dalším důvodem byla potřeba zachovat funkční VP1 protein myšího polyomaviru, neboť C-koncová část je zcela zásadní pro tvorbu částic. Krátká delece (méně než 34 aminokyselinových zbytků (Yokoyama *et al.*, 2007; Hrušková – nepublikované výsledky) v C-koncové oblasti vede k tvorbě tubulárních namísto ikosahedrálních částic, větší delece má pak za následek úplnou neschopnost tvorby částic (Roitman-Shemer *et al.*, 2007), proto bylo výhodné, aby sekvenci komplementární k vektoru pro klonování nacházející se za koncem VP1 genu nesl pouze amplifikovaný VP1 gen myšího polyomaviru a v této oblasti tak nemohlo docházet k mutacím způsobených rekombinací s jinými VP1 geny. Důvod, proč nemohly být primery pro všechny vstupní geny posunuty až za VP1 gen je takový, že plasmid, do něž budeme mutované geny vkládat, nese celý genom MPyV a my musíme zachovat jeho sekvenci proto, aby se mohly tvořit funkční viriony a množit se. V oblasti za koncem genu je zároveň oblast kódující C-koncovou část LT antigenu přepisovaného z opačného vlákna, jehož narušení díky

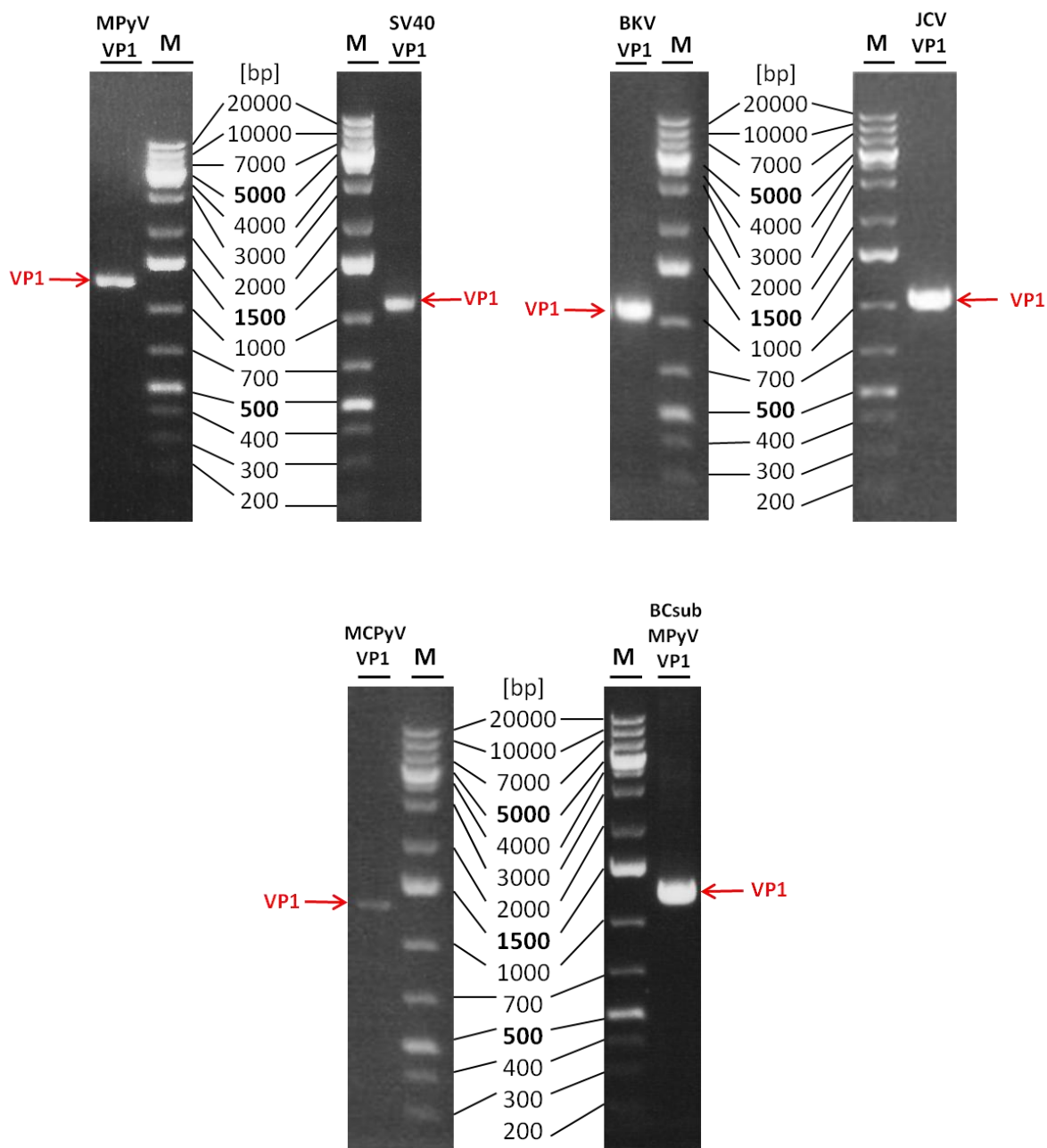
rekombinaci s jiným polyomavirem nebo úplně cizorodou sekvencí z plasmidů využívaných pro amplifikaci VP1 genů různých polyomavirů, by mohlo vést ke vzniku nefunkčního LT antigenu, bez něž se virus v buňce nedokáže pomnožit.

Sekvence VP1 genu vybraných polyomavirů byla amplifikována pomocí Vent DNA polymerázy (viz kapitola 4.2.4.3) za podmínek uvedených v tabulce 2. U všech zvolených genů bylo nejprve nutné optimalizovat teplotu nasedání primerů a množství templátu vstupujícího do reakce, u některých genů také zvolený templátový plasmid a jeho formu (cirkulární či linearizovaná štěpením restriční endonukleázou). I přes tyto optimalizace jsme na snímku elektroforetického gelu u některých produktů amplifikace pozorovali slabý nespecifický proužek mimo oblast o správné velikosti, proto jsme přistoupili k izolaci cílového fragmentu z gelu. Produkty PCR, a stejně tak i produkty požadované velikosti izolované z gelu, byly přečištěny pomocí soupravy NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up a zkontrolovány pomocí DNA elektroforézy (obr. 16).

Tab. 2. Podmínky amplifikace VP1 genů různých polyomavirů (MPyV, SV40, BKV, JCV, MCPyV a BCsub MPyV) pomocí PCR.

	MPyV VP1	SV40 VP1	BKV VP1
Templátový plasmid	pBS-PyI	pCAG-SV40	c734A
Forma templátu	lineární	Cirkulární	Cirkulární
Množství templátu vstupující do 50 µl reakce	20 ng	5 ng	5 ng
Forward primer	Ev-MPyV-start-fw	Ev-SV40-start-fw	Ev-BK-start-fw
Reverse primer	Ev-MPyV-stop-rw	Ev-SV40-stop-rw	Ev-BK-stop-rw
Teplota nasedání primerů	64 °C	59 °C	61 °C
Produkt izolován z gelu	ano	Ne	Ne

	JCV VP1	MCPyV VP1	BCsub MPyV VP1
Templátový plasmid	pPB Dual – JCV VP1	pMCV-R17a	1 µl 10krát ředěné ligační směsi z přípravy plasmidu pMJG BCsub
Forma templátu	cirkulární	Cirkulární	
Množství templátu vstupující do 50 µl reakce	21 ng	8,5 ng	
Forward primer	Ev-JC-start-fw	Ev-MCV-start-fw	Ev-MPyV-start-fw
Reverse primer	Ev-JC-stop-rw	Ev-MCV-stop-rw	Ev-MPyV-stop-rw
Teplota nasedání primerů	61 °C	64 °C	64 °C
Produkt izolován z gelu	ne	Ne	ano



Obr. 16. Elektroforetogramy VP1 genů polyomavirů MPyV, SV40, BKV, JCV, MCPyV a BCsub MPyV amplifikovaných pomocí PCR. Vybrán byl vždy jen jeden vzorek od každého polyomavirového VP1 genu na ukázkou. Geny byly namnoženy za podmínek uvedených v tabulce 2. Naneseno bylo 1 μ l PCR směsi, v případě SV40 VP1 2 μ l. Od BCsub MPyV VP1 byl na gel nanesen 1 μ l PCR po vyříznutí z gelu a přečištění pomocí soupravy NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel). M značí marker molekulových vah (GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder).

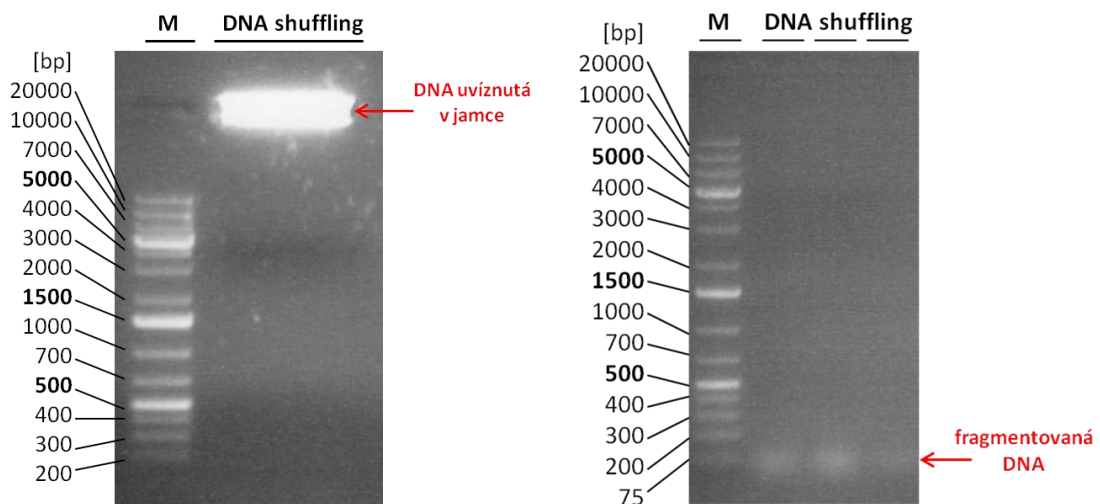
Závěrečné amplifikace za uvedených podmínek byly prováděny na veliko (10 x 50 μ l reakcí) a při přečištění byly zakoncentrovány do relativně malého objemu, neboť požadované množství vstupních genů pro „DNA shuffling“ je poměrně vysoké (0,5 – 2 μ g každého genu) a objem reakce není příliš velký (50 μ l).

5.2.2.2 Náhodná fragmentace vstupních genů

Aby mohly být vstupní geny promíchány, je třeba je nejprve náhodně naštěpit na kratší fragmenty. Pro tento krok byla pořízena souprava JBS DNA-Shuffling kit (Jena Bioscience), která obsahuje DNázu I a pufr vhodný pro štěpení. Frekvence štěpení a tedy i délka výsledných fragmentů je závislá především na době štěpení a množství DNázy I přidané do reakce. Dle grafu přiloženého výrobcem docílíme vzniku přibližně 300 bp dlouhých fragmentů (jež pokládáme za vhodné pro naše účely) po 1 minutě štěpení. Po štěpení DNázou I a inaktivaci DNázy I byly vzniklé fragmenty rozděleny pomocí agarózové elektroforézy a pouze fragmenty o vhodné velikosti měly být z gelu izolovány, aby vstoupily do následné „self-priming PCR“ reakce.

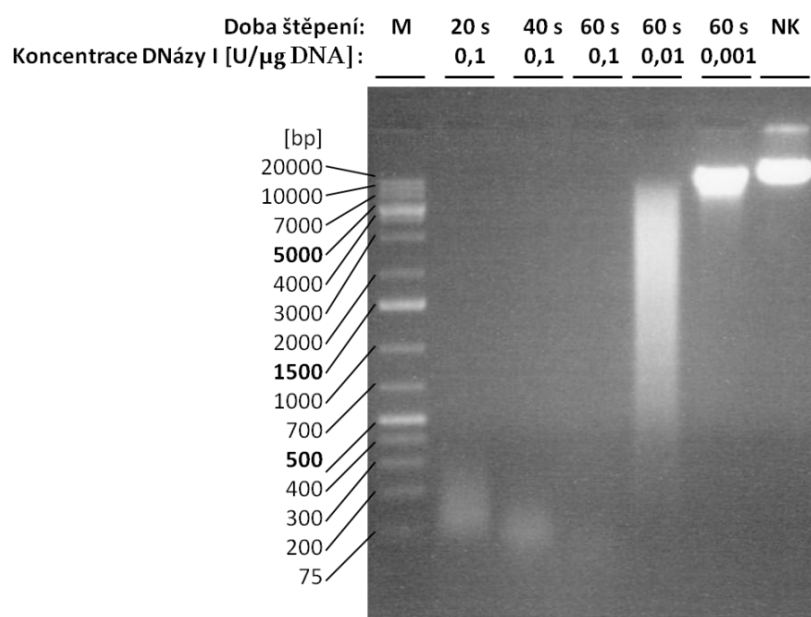
Výsledná DNA se však v gelu vždy nacházela pouze v nanášecích jamkách a nikdy nesestoupila níže, což bránilo dalšímu použití DNA (viz obr. 17 vlevo). Po testování několika možných příčin jsme zjistili, že za setrvání DNA v jamkách je zodpovědná izolepa využívaná k rozšíření nanášecích jamek.

Po odstranění tohoto problému však výsledný elektroforetogram stále nevypadal uspokojivě, fragmentovaná DNA byla totiž naštěpena na velmi krátké fragmenty o velikosti přibližně 75 bp (viz obr. 17 vpravo) Po provedení následujících kroků (izolace DNA z gelu, její přečištění, „self-priming PCR“ a závěrečné amplifikaci) nebyl získán žádný produkt.

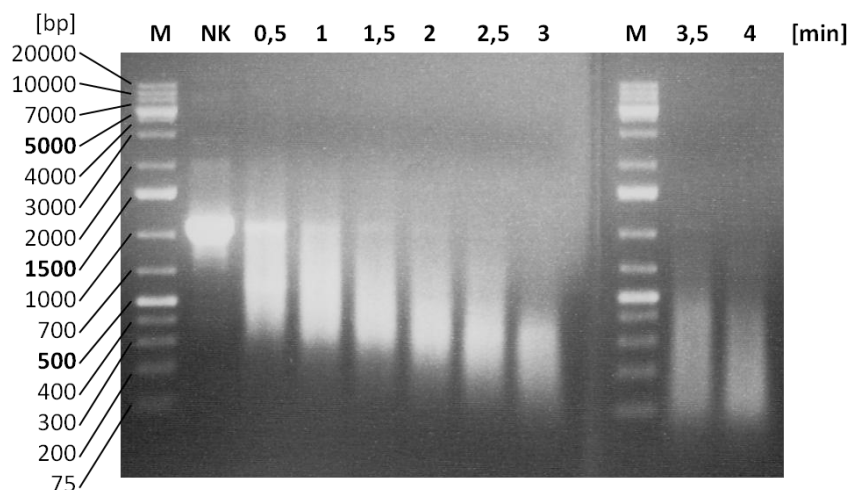


Obr. 17. Elektroforetogramy produktů štěpení 6 VP1 genů polyomavirů MPyV, SV40, JCV, BKV, MCPyV a BCsub MPyV (0,5 µg každého VP1 genu) DNázou I (0,1 U/µg DNA; Jena Bioscience) po dobu 1 minuty při 37 °C. Celá 50 µl reakce inaktivovaná pomocí dvojmocných kationtů a zvýšené teploty byla nanesena do jamek gelu. Vlevo: zuby hřebenu pro tvorbu jamek byly slepeny pomocí izolepy pro zvětšení nanášecích jamek, Vpravo: Při tvorbě jamek nebyla použita izolepa. M značí marker molekulových vah (GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder).

Rozhodli jsme se proto přejít od DNázy I z komerčního kitu Jena Bioscience k DNáze I od firmy Roche v kombinaci s reakčním pufrem 25 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂ a pokusili se reakci optimalizovat tak, abychom dosáhli velikosti vznikajících fragmentů okolo 300 bp. Optimalizace byla prováděna na různých DNA templátech: DNA fága λ (48502 bp), plasmid pGEM®-T (3000 bp), JCV VP1 gen (přibližně 1200 bp). Testovali jsme závislost velikosti vznikajících fragmentů na koncentraci DNázy I (0,1 U/μg DNA, 0,01 U/μg DNA a 0,001 U/μg DNA) a době štěpení obr. 18 a 19).

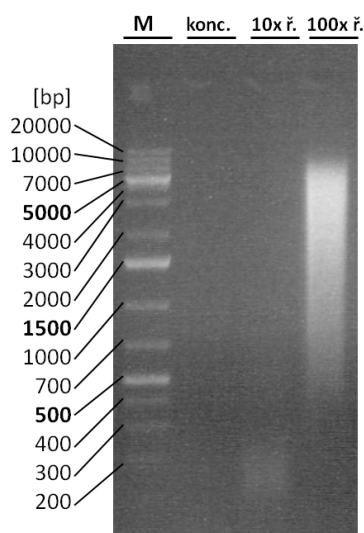


Obr. 18. Závislost velikosti fragmentů po štěpení DNázou I na době štěpení a množství DNázy I (Roche) v reakci. Genomová DNA fága λ (3 μg) byla štěpena různým množstvím DNázy I (Roche) po dobu 20, 40 nebo 60 s. Množství DNázy v reakci je udáno jako počet jednotek DNázy I připadajících na 1 μg λ DNA. Na gel bylo nanášeno 15 μl od každé 50 μl reakce po inaktivaci DNázy I pomocí chelatace dvojmocných kationtů a vysoké teploty. M značí marker molekulových vah (GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder).



Obr. 19. Závislost velikosti fragmentů po štěpení DNázou I (Roche) na době štěpení při konstantním množství DNázy I v reakci. JCV VP1 gen (1,2 μ g) byl štěpen DNázou I (Roche) v množství 0,01 U/ μ g DNA po dobu 0,5 – 4 minut. Na gel byla nanesena vždy celá 15 μ l reakce po inaktivaci DNázy I pomocí chelatace dvojmocných kationtů a vysoké teploty. M značí marker molekulových vah (GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder).

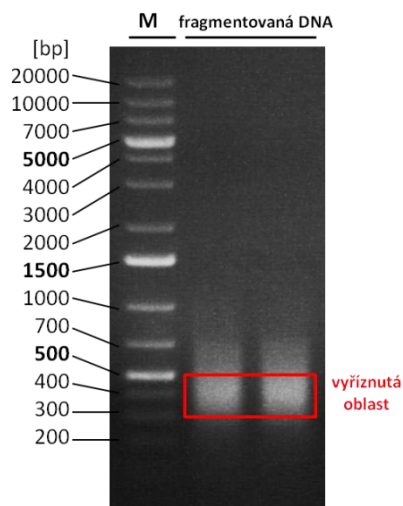
Po příznivých výsledcích optimalizace Roche DNázy I jsme zkusili naředit také DNázu I komerční soupravy pro „DNA Shuffling“ (Jena Bioscience). Z výsledku vyplývá (obr. 20), že výrobce pravděpodobně do soupravy dodal DNázu I o vyšším počtu jednotek, neboť teprve po jejím naředění (10krát) jsme byli schopni dosáhnout širšího spektra velikostí získaných fragmentů namísto úplného rozštěpení vstupní DNA, jako tomu bylo při použití koncentrované DNázy dle doporučení výrobce.



Obr. 20. Závislost velikosti fragmentů po štěpení DNázou I na množství DNázy I z komerční soupravy pro „DNA shuffling“ (Jena Bioscience). Genomová DNA fága λ (3 μ g) byla štěpena neředěnou (konc.), 10x ředěnou (10x ř.) a 100x ředěnou (100x ř.) DNázou I. Na gel bylo naneseno 15 μ l od každé 50 μ l reakce po inaktivaci DNázy pomocí chelatace dvojmocných kationtů a vysoké teploty. M značí marker molekulových vah (GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder).

Pro přípravu fragmentů polyomavirových VP1 genů jsme se však přiklonili k využití DNázy I od firmy Roche. Nejprve jsme celý proces „DNA Shuffling“ otestovali na jediném genu JCV VP1. Po štěpení 2,5 min 0,01 U DNázy I/μg DNA byly fragmenty o velikosti přibližně 300 bp izolovány z gelu, přečištěny a podrobeny „self-priming PCR“ (data nejsou ukázána). Po závěrečné amplifikaci s primery navrženými na konce JCV VP1 genu jsme obdrželi fragment odpovídající velikosti JCV VP1 (data nejsou prezentována), celá reakce se tedy pravděpodobně zdařila.

Následovala aplikace DNázy I (Roche) na amplifikované VP1 geny 6 polyomavirů, kdy 0,5 μg VP1 genu každého polyomaviru bylo společně štěpeno za podmínek otestovaných na JCV VP1 genu. Oblast okolo 400 bp byla z gelu izolována (obr. 21) a DNA byla přečištěna pomocí soupravy NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel).



Obr. 21. Fragmentace VP1 genů 6 různých polyomavirů pomocí DNázy I. 0,5 μg každého VP1 genu bylo v reakci štěpeno DNázou I (Roche) v množství 0,01 U/μg DNA po dobu 2,5 minut. Celá 50 μl reakce inaktivovaná pomocí chelatace dvojmocných kationtů a vysoké teploty byla nanesena do dvou jamek gelu a rozdělena elektroforeticky. Zarámovaná oblast gelu byla vyříznuta a v ní obsažená DNA následně použita pro „self-priming PCR“. M značí marker molekulových vah (GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder).

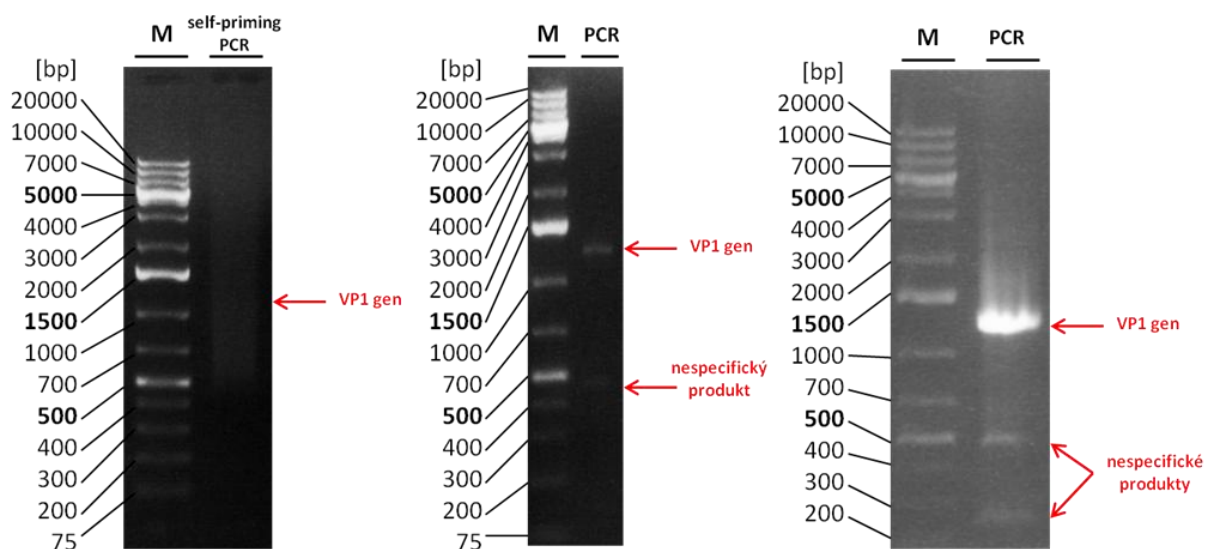
5.2.2.3 „Self-priming PCR“ a závěrečná amplifikace chimerních genů

Přečištěné fragmenty vzniklé štěpením DNázou I byly vloženy do „self-priming PCR“, kde by homologní části fragmentů měly na sebe navzájem nasednout a sloužit tak jako primery pro DNA polymerázu. Tím by mělo dojít k poskládání a propojení jednotlivých fragmentů do chimerních genů. Množství přečištěné DNA nebylo příliš velké (náš výtěžek činil 0,75 ug), proto jsme do „self-priming PCR“ dali veškerou izolovanou DNA, neboť výrobce doporučuje vložit

0,5 - 1 ug DNA. Výsledkem této reakce byly fragmenty tvořící po elektroforetickém dělení slabý smír pokrývající širokou oblast molekulových hmotností (viz obr. 22 vlevo)

Pro závěrečnou PCR bylo použito 5 μ l „self-priming PCR“, primer Ev-MPyV-stop-rw a Ev-selfprim primer, jenž byl navržen tak, aby byl společný začátkům kódujících sekvencí VP1 genů několika různých polyomavirů. Elektroforetogram produktu obdrženého po 15 cyklech PCR ukazuje 2 slabší proužky – jeden v předpokládané oblasti (okolo 1200 bp), druhý v oblasti okolo 500 bp (viz obr. 22 uprostřed). Abychom namnožili cílový produkt, provedli jsme dalších 30 cyklů amplifikace, tentokrát nikoli pomocí komerční soupravy, ale s využitím Vent DNA polymerázy, jež nezanáší na 3' konce fragmentů přesahující adenosin monofosfát, a je proto vhodnější pro následné In-Fusion® klonování (obr. 22 vpravo).

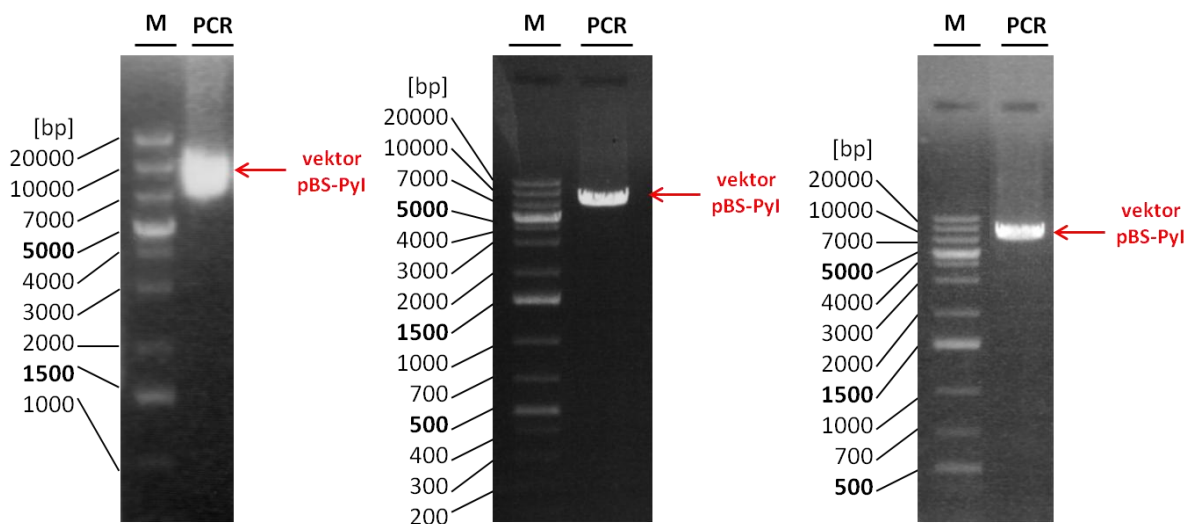
Ve výsledném produktu reakce se druhý menší proužek po elektroforetickém dělení stále vyskytuje, i když o nižší intenzitě a objevuje se i smír. Následná In-Fusion® reakce by však měla s vektorem spojit pouze fragmenty nesoucí na obou koncích sekvence komplementární ke koncovým sekvencím vektoru.



Obr. 22. „DNA shuffling“: Produkt „self-priming PCR“ 6 polyomavirových VP1 genů a výsledek následné amplifikace tohoto produktu s genově specifickými primery. Vlevo: Izolované fragmenty naštěpených VP1 genů byly pomocí „self-priming PCR“ poskládány do chimerního VP1 genu. Na gel bylo naneseno 15 μ l reakce. Uprostřed: Produkt „self-priming PCR“ byl poté amplifikován pomocí primerů nasedajících na začátek a konec chimerního VP1 genu. Na gel bylo naneseno 5 μ l této PCR reakce. Vpravo: Pro nízký výtěžek závěrečné amplifikace byly 2 μ l této reakce použity pro reamplifikaci pomocí PCR, tentokrát s využitím Vent DNA polymerázy. Na gel bylo naneseno 5 μ l reakce. M značí marker molekulových vah (GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder).

5.2.3 Příprava vektoru odvozeného od plasmidu pBS-PyI

Jako výchozí vektor pro veškeré klonování byl použit vektor odvozený od plasmidu pBS-PyI, což je plasmid obsahující kompletní genom myšího polyomaviru (tedy včetně VP1 genu) ohraničený 2 loxP místy. Cílem následného klonování je nahradit původní nemutovaný VP1 gen za tento gen po mutagenезi „error-prone PCR“ a „DNA shuffling“. Proto je třeba připravit vektor odvozený od výše uvedeného plasmidu, jež postrádá VP1 gen. Toho jsme docílili využitím inverzní PCR (viz kapitola 4.2.4.3) s primery orientovanými směrem ven z VP1 genu (primery Ev-Inv-pBS-PyI-fw a Ev-Inv-pBS-PyI-rv. Z důvodu nízké účinnosti klonování připravených VP1 genů jsme následně posunuli primery pro přípravu mutovaných VP1 genů i vektoru směrem ven od VP1 genu (primery: Ev-Inv-pBS-PyI-opr.-fw a Nový primer Ev-Inv-pBS-PyI-rv). PCR pro přípravu vektoru byla několikrát optimalizována pro získání produktu bez většího množství nespecifit [použití 3 různých polymeráz: Advantage® HD polymerase (Clontech), High Fidelity PCR Enzyme Mix (Thermo Scientific) a Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with HF Buffer (NEB), různé teploty nasedání primerů]. Amplifikované vektory byly před vložením do In-Fusion® reakce různým způsobem zpracovány: fragment o správné molekulové hmotnosti byl izolován z agarózového gelu po elektroforéze (kapitola 4.2.4.2) a následně přečištěn pomocí soupravy NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (kapitola 4.2.4.8), případně byla pro In-Fusion® použita přímo PCR směs přečištěná či nepřečištěná výše uvedenou soupravou či fenol-chloroformovou extrakcí následovanou srážením součinností alkoholu a soli (kapitola 4.2.4.9 a 4.2.4.10). Obávali jsme se totiž, zda matrix komerční soupravy nezůstává ve vzorku a neinhibuje In-Fusion® reakci. Výsledek amplifikace vektorů, které byly následně používány pro klonování a poskytly nejvyšší množství kolonií, jsou ukázány na obrázku 23.



Obr. 23. Elektroforetogramy PCR vektorů, do nichž byly následně vkládány mutované VP1 geny. Vlevo: Vektor připravený pomocí High Fidelity PCR Enzyme Mix (Thermo Scientific) a primerů Ev-Inv-pBS-PyI-opr.-fw a Nový primer Ev-Inv-pBS-PyI-rv při teplotě nasedání primerů 60 °C. Na gel byl nanesen 1 µl PCR reakce. Tento vektor byl užit pro počáteční klonování MPyV VP1 i BCsub MPyV VP1 genů mutovaných pomocí JBS dNTP-mutagenese. Uprostřed: Vektor připravený pomocí Phusion HF DNA polymerázy a primerů Ev-Inv-pBS-PyI-opr.-fw a Nový primer Ev-Inv-pBS-PyI-rv při teplotě nasedání primerů 60 °C. Na gel byly naneseny 3 µl PCR reakce. Tento vektor byl užit pro klonování VP1 genů mutovaných pomocí JBS dNTP-mutagenese a dal vzniknout nejvíce koloniím. Vpravo: Vektor připravený pomocí Phusion HF DNA polymerázy a primerů Ev-Inv-pBS-PyI-opr.-fw a Ev-Inv-pBS-PyI-rv při teplotě nasedání primerů 60 °C. Na gel byly naneseny 4 µl PCR reakce. Tento vektor byl užit pro klonování VP1 genů vzniklých metodou „DNA shuffling“. M značí marker molekulových vah (GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder).

5.2.4 Příprava rekombinantních plasmidů

Získané mutované VP1 geny byly vloženy do vektoru pBS-PyI metodou založenou na klonování nezávislém na ligaci pomocí soupravy In-Fusion® HD Cloning Kit (kapitola 4.2.4.11). Pro úspěšné vložení insertu jsou zásadní jeho koncové 15 bp dlouhé sekvence komplementární k té oblasti vektoru, kam je insert vkládán. Po smísení In-Fusion® enzymového premixu s přečištěným vektorem a insertem ve vhodném poměru a jejich inkubaci 15 min v 50 °C jsou směsi transformovány kompetentní buňky Stellar™ a narostlé kolonie jsou testovány na přítomnost rekombinantních plasmidů. Pokud je získán insert i vektor po amplifikaci PCR bez nespécifického pozadí, je možné pro transformaci použít přímo tyto PCR směsi inkubované s roztokem Cloning Enhancer a In-Fusion® premixem, což ještě více urychlí celý proces klonování, neboť není nutné DNA přečišťovat.

Kvůli velkým potížím s účinností klonování (často nevyrostla po transformaci žádná kolonie), jsme se snažili pozměnit co nejvíce parametrů procesu přípravy fragmentů pro In-Fusion® reakci i samotné In-Fusion® reakce. Vyzkoušeli jsme různé polymerázy (High-Fidelity či Phusion HF DNA polymerázu pro přípravu vektoru a Taq či Vent DNA polymerázu pro přípravu

insertu), neboť ačkoli to souprava nevyžaduje, chtěli jsme zajistit, že DNA polymeráza svojí aktivitou nepřidá na konce důležité pro klonování nukleotidy navíc. Testovali jsme také jinou sadu primerů pro přípravu vektoru a insertu (viz kapitoly 5.2.2.1 a 5.2.3), měnili jsme způsob ošetření fragmentů vstupujících do In-Fusion® reakce – PCR směsi vektoru a insertu byly přečištěny komerční soupravou (kapitola 4.2.4.8), izolovány z gelu a izolovány komerční soupravou, přečištěny pomocí fenol-chloroformové extrakce a následované srážením DNA, případně byla použita nepřečištěná PCR směs ošetřená roztokem Cloning Enhancer a různé kombinace zmíněných způsobů pro vektor a insert. Při optimalizaci In-Fusion® reakce jsme měnili poměr vektoru a insertu vkládaného do reakce, celkové množství DNA vkládané do reakce a prodlužovali jsme dobu inkubace buněk v termostatu před jejich výsevem i po výsevu. Maximální dosažený počet kolonií, které po transformaci vyrostly, byl okolo 500 kolonií a to při použití roztoku Cloning Enhancer na 1,5 µl PCR směsi insertu i vektoru připravených s novými primery v jednom kroku se samotnou In-Fusion® reakcí (viz kapitola 4.2.4.11).

Pro vyloučení toxicity DNA pro používaný typ buněk pro transformaci jsme vyzkoušeli také metodu elektroporace do elektrokompetentních buněk Top10 namísto transformace teplotním šokem. Nezáskali jsme však téměř žádné kolonie.

Další změnou bylo použití klonování pomocí inverzní fúzní PCR, která by měla spojit připravený vektor a insert. Po ligaci produktu inverzní fúzní PCR jsme do buněk transformovali ligační směs, opět však bez výrazného zlepšení výtěžku transformace.

Celkový počet kolonií, které dohromady vyrostly po všech transformacích buněk vektory s VP1 genem po mutagenezi, činil přibližně 2500 (celkem provedeno asi 35 transformací In-Fusion® reakční směsí)

Během optimalizace jsme provedli řadu kontrol nejen klonovací reakce, ale i přípravy fragmentů. Výsledně jedna transformační reakce s výrobcem dodávaným insertem a vektorem standardně poskytovala okolo 20 000 kolonií, zatímco reakce s naším kontrolním insertem (mutovaný VP1 gen obsahující nově vzniklé restriční místo) a vektorem poskytovala pouze okolo 2500 kolonií. Pokud jsme však použili v reakci MPyV VP1 gen, který prošel stejnou procedurou jako MPyV VP1 geny při mutagenezi, avšak bez přidání analogů dNTP, byl výtěžek kolonií výrazně nižší (okolo 200 kolonií). Vložení samotného vektoru do reakce (negativní kontrola) zpravidla nevedlo k vytvoření kolonií vůbec.

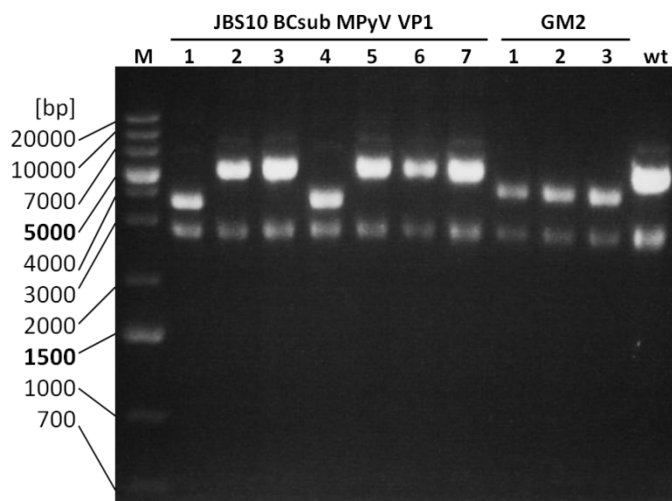
5.2.5 Izolace rekombinantních plasmidů a jejich analýza

Vybrané kolonie byly zaočkovány a použity pro izolaci plasmidů (kapitola 4.2.4.12 a 6.2.4.13). Pro ověření, zda skutečně došlo k vložení mutovaných VP1 genů do vektoru byly tyto plasmidy podrobeny restriktivnímu štěpení (např. obr 24) a/nebo sekvenaci pomocí sekvenačních primerů, v případě VP1 genů mutovaných metodou „DNA shuffling“ také ověřením velikosti plasmidu pomocí elektroforézy (obr. 25).

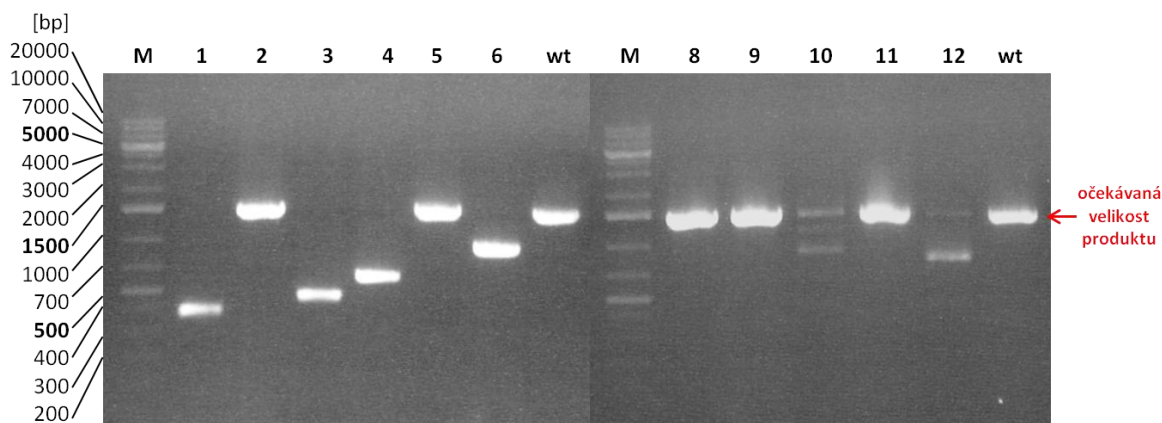
Ze získaných sekvencí jsme analyzovali frekvenci a náhodnost vzniku mutací. Míra vzniku mutací je uvedena v tabulce 3. Mutagenese pomocí „error-prone PCR“ s využitím dNTP analogů (Jena Bioscience) dala povětšinou vzniknout pestré škále mutovaných sekvencí s různou frekvencí vzniku mutací.

Aplikace jednoho kola mutagenní PCR s využitím Mutazyme® II DNA polymerázy (GeneMorph) vedla bohužel ke vzniku pouze jediné mutované sekvence VP1 genu, v ostatních případech došlo ke vzniku nemutovaných sekvencí MPyV VP1 genu. Po aplikaci 2 kol mutagenní PCR s využitím Mutazyme® II DNA polymerázy jsme po sekvenaci dokonce nenalezli žádné vložené VP1 geny do vektoru, stejně tak tomu bylo i u 20 cyklů mutagenní PCR v přítomnosti dNTP analogů (Jena Bioscience) aplikovaných na MPyV BCsub VP1.

Analýza 11 náhodně vybraných rekombinantních plasmidů izolovaných z bakteriálních kolonií vzniklých metodou „DNA shuffling“ (z celkového množství 300 kolonií) pomocí elektroforetické vizualizace plasmidů (obr. 25) a sekvenace několika z nich, odhalila 2 typy produktů reakce „DNA shuffling“. Jednak reakcí vznikaly výchozí VP1 geny, v analyzovaných sekvencích jsme totiž našli kompletní sekvenci MPyV VP1 genu u kolonie 5 a kompletní sekvenci MPyV BCsub VP1 genu kolonií 2, 7, 8, 9, 11 (s několika záměnami získanými zřejmě v průběhu amplifikace Taq DNA polymerázou). A druhým typem produktů byly plasmidy o menší než očekávané molekulové hmotnosti (kolonie 1, 3, 4 a 6; viz obr. 25), u nichž zřejmě došlo k nasednutí pouze dvou krátkých fragmentů VP1 genu na konce vektoru a jejich spojení, neboť většina středové části genu úplně chybí. Kolonie 6 je jediná, kde došlo ke spojení dvou různých VP1 genů – krátký fragment VP1 genu SV40 byl spojen s větším úsekem MPyV VP1 genu. Vzorky z kolonií 11 a 12 vůbec sekvenovány nebyly, dle elektroforetogramu (obr. 25) jde totiž zřejmě o směs několika plasmidů.



Obr. 24. Elektroforetogram restrikčního štěpení rekombinantních plasmidů pro ověření vložení mutovaného VP1 genu. Plasmidy izolované z kolonií 1 – 7 vzniklých po klonování BCsub MPyV VP1 genu mutovaného 10 cykly mutagenní PCR (JBS10 BCsub MPyV VP1) a plasmidy izolované z kolonií 1 – 3 vzniklých po klonování MPyV VP1 genu mutovaného pomocí 2 kol PCR amplifikace s využitím Mutazyme® II DNA polymerázy, GeneMorph (GM2) byly štěpeny restrikčními enzymy *Sall* a *XhoI*. Očekávané velikosti fragmentů vzniklých štěpením jsou přibližně 2895 bp a 5338 bp, pokud došlo k vložení VP1 genu (je tomu tak u JBS10 BCsub MPyV VP1 kolonie 2, 3, 5, 6, 7), případně 2895 bp a 4136 bp, pokud gen VP1 do vektoru vložení nebyl (jako v případě GM2 kolonie 1, 2, 3). U kolonií 1 a 4 JBS10 BCsub MPyV zřejmě nedošlo k vložení VP1 genu a navíc došlo i ke zkrácení vektoru. Jako pozitivní kontrola slouží štěpení nemutovaného plasmidu pBS-PyI (wt). Na gel bylo naneseno vždy 200 ng štěpeného produktu. M značí marker molekulových vah (GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder), naneseno 2,5 μ l.



Obr. 25. Elektroforetogram VP1 genů vzniklých metodou „DNA shuffling“ amplifikovaných z rekombinantních plasmidů pomocí PCR pro ověření vložení genu do vektoru. VP1 geny z kolonií 1 - 12 byly amplifikovány pomocí PCR využívající sekvenčních primerů Sq-MPyV-ATG a Sq-MPyV-STOP a Vent DNA polymerázy. Na gel byly naneseny vždy 4 μ l PCR směsi. Jako kontrola slouží nemutovaný VP1 gen amplifikovaný z plasmidu pBS-PyI (wt). Očekávaná velikost nemutovaného produktu je 1457 bp, velikost mutovaných produktů se může mírně lišit. Pokud by nedošlo k vložení VP1 genu do vektoru, velikost produktu by činila 250 bp. M značí marker molekulových vah (GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder), naneseny 3 μ l.

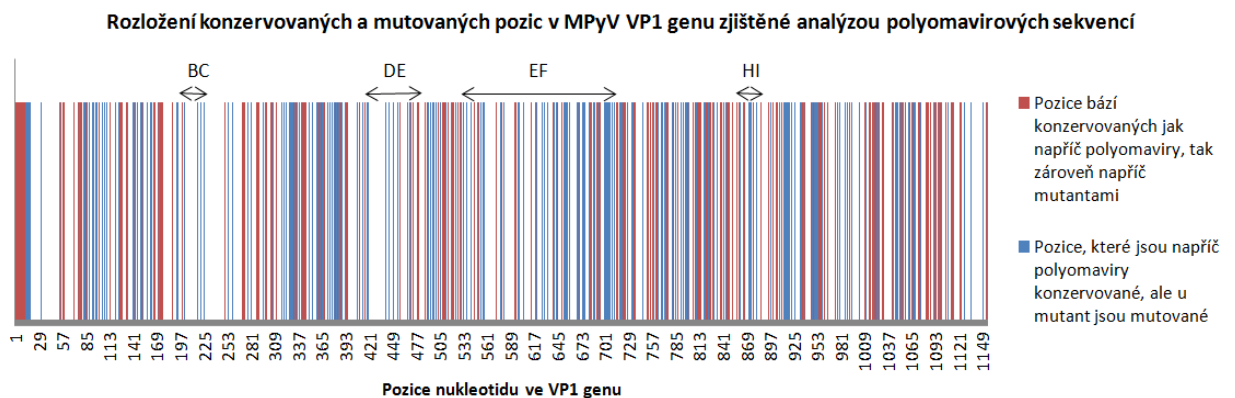
16 nukleotidových sekvencí po mutagenезi pomocí „error-prone PCR“ jsme přeložili do sekvencí proteinových (pomocí on-line programu web.expasy.org/translate) a zjišťovali, zda díky mutacím vznikly v sekvenci VP1 genu nové STOP kodony, či došlo k posunu čtecího rámce (ORF z anglického open reading frame) způsobenému delecí či insercí v sekvenci. Data z tabulky 3 ukazují vznik nových STOP kodonů u velkého množství sekvencí, dle předpokladu byl počet nově vzniklých STOP kodonů vyšší po aplikaci většího počtu cyklů mutagenní PCR. Posun čtecího rámce také u některých sekvencí nastal.

Tab. 3. Tabulka frekvence vzniku mutací ve VP1 genu při použití metody „error-prone PCR a počtu sekvencí, u nichž došlo ke vzniku nového STOP kodonu či posunu čtecího rámce (ORF)“. Analyzovány jsou mutace zavedené několika cykly mutagenní PCR v přítomnosti nukleotidových analogů (JBS) nebo mutagenní DNA polymerázou (GeneMorph) do VP1 genu myšího polyomaviru (MPyV VP1) či stejného genu se substitucí v sekvenci kódující BC smyčku (BCsub MPyV VP1). V tabulce je uveden počet sekvencí, v nichž byly mutace analyzovány. Po přeložení kompletně osekvenovaných sekvencí VP1 genu do proteinových sekvencí bylo analyzováno množství nově vzniklých STOP kodonů a případů, kdy delece nukleotidu vedly k posunu čtecího rámce (ORF).

Frekvence vzniku mutací nukleotidů a analýza mutací s ohledem na ORF				
Souprava použitá pro mutagenезi	Míra mutací	Počet sekvencí použitých pro analýzu míry mutací	Počet sekvencí se STOP kodonem navíc/počet všech analyzovaných sekvencí	Počet sekvencí s posunem ORF/počet všech analyzovaných sekvencí
JBS - 7 cyklů mutagenní PCR (MPyV VP1)	109 mutací/kbp	3	1/2	0/2
JBS - 10 cyklů mutagenní PCR (MPyV VP1)	97 mutací/kbp	9	0/3	0/3
JBS - 10 cyklů mutagenní PCR (BCsub MPyV VP1)	61 mutací/kbp	5	5/5	1/5
JBS - 20 cyklů mutagenní PCR (MPyV VP1)	125 mutací/kbp	11	4/5	1/5
JBS – 30 cyklů mutagenní PCR – pouze s 8-oxo-dGTP (MPyV VP1)	7,9 mutací/kbp	14	0/14	2/14
GeneMorph (MPyV VP1)	10 mutací/kbp	1	0/1	0/1

22 sekvencí VP1 genu osekvenovaných od začátku do konce kódující sekvence genu bylo použito pro analýzu náhodnosti vzniku mutací při mutagenní PCR. Zajímalo nás totiž, zda nemá mutagenní PCR tendenci zanášet mutace přednostně do míst, která se napříč různými

polyomaviry liší, a naopak vyhýbat se mutacím v konzervovaných oblastech. Srovnali jsme proto počty záměn na jednotlivých pozicích VP1 genu mezi polyomaviry MPyV, SV40, JCV, BKV a MCPyV a mezi získanými mutantami. Pokud se na dané pozici napříč polyomaviry nevyskytovala žádná záměna, považovali jsme danou bázi za konzervovanou mezi zmíněnými polyomaviry. To samé jsme učinili i se sekvencemi mutant. Poté jsme porovnali četnost vzniku mutací při náhodné mutagenезi na pozicích, které jsou napříč vybranými polyomaviry konzervované a četnost vzniku mutací na pozicích, které jsou mutované i napříč polyomaviry. χ^2 test získaných výsledků (kapitola 4.2.7) nepotvrdil, že pozice vzniku mutací v průběhu mutagenní PCR s vyžitím dNTP analogů souvisí s konzervovaností sekvence VP1 genu polyomavirů ($p = 0,13$). Rozložení mutací vznikajících během mutagenní PCR vzhledem k umístění konzervovaných oblastí napříč polyomaviry jsme dokumentovali graficky (obr. 26) a ukázali jsme také výskyt mutací v povrchových smyčkách VP1 proteinu (obr. 26).



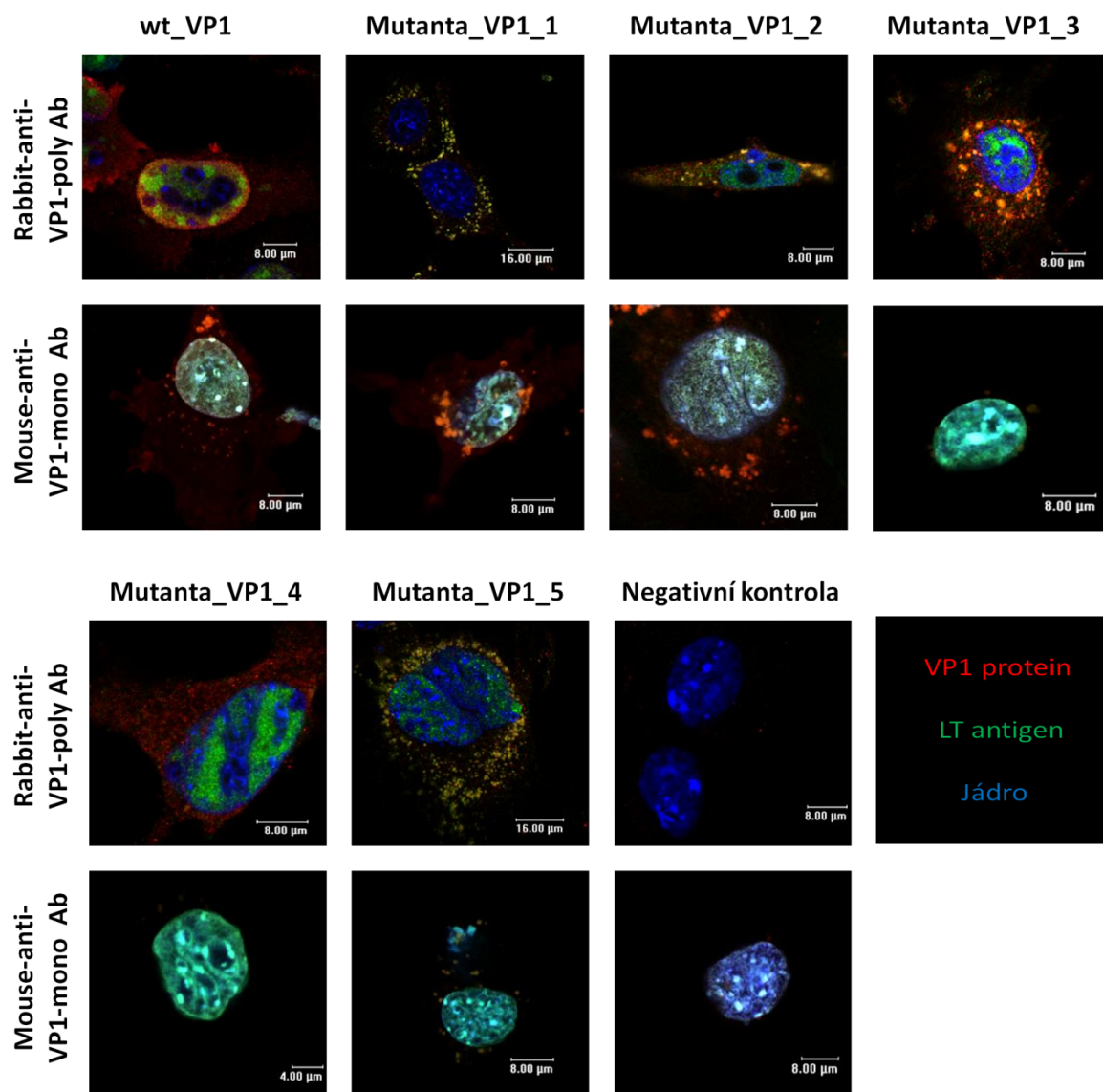
Obr 26. Schema znázorňující rozložení míst vzniku mutací při náhodné mutagenезi vzhledem k rozložení konzervovaných oblastí v rámci VP1 genu myšího polyomaviru (MPyV). Srovnáním sekvencí polyomavirů MPyV, SV40, JCV, BKV a MCPyV byly nalezeny konzervované pozice v rámci MPyV VP1 genu, v nichž nedochází ke vzniku záměn ani u jiných polyomavirů. Srovnáním 22 sekvencí VP1 genů podrobených náhodné mutagenезi byly stejně tak nalezeny konzervované pozice, na nichž se mutace nevyskytovaly. Ve schématu jsou zaneseny pozice, které jsou konzervované jak napříč polyomaviry, tak napříč mutantami (červeně), tak pozice, které, ač konzervované mezi polyomaviry, u mutant mutace obsahovaly (modře). Pozice, které obsahují záměny napříč polyomaviry, ať už na nich během mutagenní PCR vznikaly mutace nebo ne, zůstaly bílé. Šipky vyznačují pozice kódující povrchové smyčky VP1 proteinu: BC smyčka (pozice 196 – 222), DE smyčka (pozice 412 – 477), EF smyčka (507 – 711) a HI smyčka (pozice 862 – 891).

5.2.6 Produkce a předběžná analýza vybraných virových mutant

Abychom zjistili, zda genomy s mutovanými VP1 geny mohou dát vzniknout virionům s funkčním virovým cyklem, ověřili jsme produkci LT antigenu a VP1 proteinu po transfekci buněk T2 (odvozeny od buněčné linie 3T6, produkují Cre rekombinázu) několika rekombinantními plasmidy pBS-PyI s mutovaným VP1 genem. V T2 buňkách by mělo dojít k vyštěpení a recirkularizaci virového genomu v loxP místech, a poté k expresi virových proteinů a posléze i tvorbě virového potomstva. Zároveň bylo třeba ověřit schopnost protilátek namířených proti VP1 proteinu divokého viru detekovat mutované VP1 proteiny, abychom mohli monitorovat infekci mutantními viry.

72 hodin po transfekci byly transfekované buňky sklizeny, supernatant a buněčný pelet odděleně zamrazeny a vzorky transfekovaných buněk vyšetých na mikroskopických sklíčkách byly fixovány. Metodou nepřímé imunodetekce (viz kapitola 4.2.3.6) byla zkoumána přítomnost LT antigenu a kapsidového proteinu VP1. Pro detekci VP1 proteinu byla použita jednak směs monoklonálních protilátek M α VP1-D4 a M α VP1-denat. a jednak polyklonální protilátka Rb α VP1, neboť předpokládáme, že díky mutacím nemusí být možné klasicky užívanou monoklonální protilátkou VP1 protein detekovat. Všech 17 takto testovaných mutant bylo detekováno protilátkou proti LT antigenu a 14 z nich bylo zachyceno také monoklonální a/nebo polyklonální protilátkou proti VP1 proteinu (data nejsou ukázána). Pro vysoké pozadí polyklonální protilátky bylo 5 z těchto mutant navíc analyzováno pomocí konfokální mikroskopie, kterou provedla J. Žáčková Suchanová (obr. 27) Zde byly polyklonální protilátkou zachyceny všechny mutanty, monoklonální protilátka specifická vůči C-konci VP1 proteinu detekovala VP1 protein pouze u 2 z 5 mutant (Mutanta_VP1_1 a 2). Z obrázků je patrné, že i mutanty s poměrně vysokým zastoupením mutovaných nukleotidů mohou dát vzniknout VP1 proteinu, jenž je detekovatelný polyklonální VP1 protilátkou (Mutanta_VP1_5).

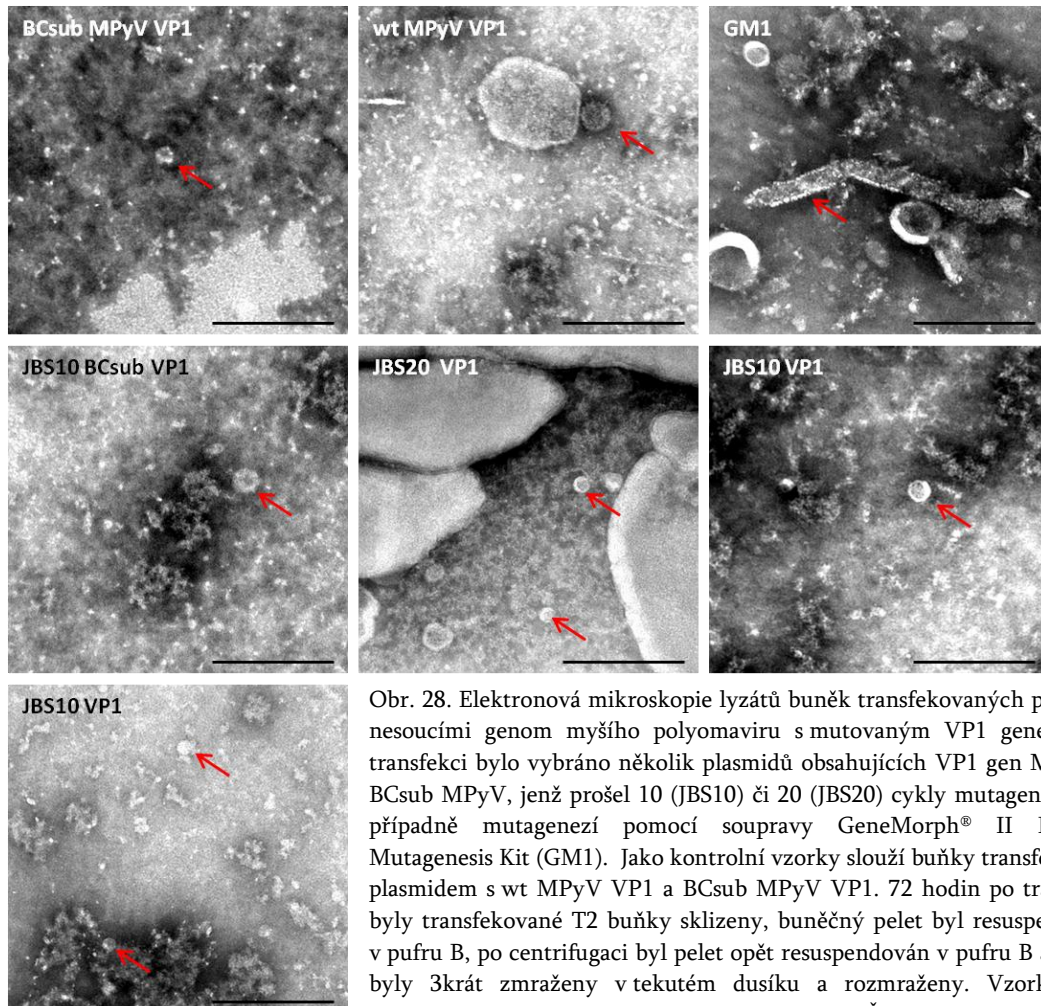
Mutanty, které dle výsledků získaných imunodetekcí virových proteinů pomocí imunofluorescence a metody dot blot (data nejsou ukázána), měly šanci na vznik funkčních virionů, byly poté podrobeny elektronové mikroskopii z buněčných lyzátů po transfekci T2 buněk (elektronovou mikroskopii provedla Jiřina Žáčková Suchanová). Na snímcích 5 mutant ze 7 byly pozorovány útvary podobné virovým částicím (obr. 28 - na fotografiích je pouze zmíněných 5 mutant ze 7).



Frekvence vzniklých mutací u mutant, které byly vizualizovány pomocí konfokální mikroskopie		
Vzorek	Mutované bp (%)	Mutované AA (%)
mutanta_VP1_1 (GM1)	1	2
mutanta_VP1_2 (JBS10)	9	18
mutanta_VP1_3 (JBS10)	7	16
mutanta_VP1_4 (JBS10 BCsub, STOP kodon navíc)	8	17
mutanta_VP1_5 (JBS7, mutovaný STOP kodon)	7	25

Obr. 27. Vizualizace 5 vybraných mutant pomocí konfokální mikroskopie. T2 buňky produkující Cre rekombinázu byly transfekovány plasmidy obsahujícími genom myšího polyomaviru s mutovaným VP1 genem. Pro transfekci bylo vybráno několik plasmidů obsahujících VP1 gen MPyV či BCsub MPyV, jenž prošel 7 (JBS7) či 10 (JBS10) cykly mutagenní PCR, případně mutagenese pomocí soupravy GeneMorph® II Random Mutagenesis Kit (GM1). Jako pozitivní kontrola slouží buňky transfekované plasmidem s MPyV VP1 divokého typu (wt_VP1), jako negativní kontrola sloužily netransfekované buňky. Zda po 72 hodinách došlo k vystřížení cirkulárního genomu myšího polyomaviru v buňkách a expresi virových proteinů bylo ověřeno pomocí nepřímé imunofluorescence fixovaných buněk. Pro detekci LT antigenu byla použita kryší monoklonální protilátka RataLT1 v kombinaci se sekundární protilátkou DαRat-Ax488 (zeleně), jádro bylo vizualizováno pomocí DAPI (modře) a VP1 protein byl detekován jednak králičí polyklonální protilátkou

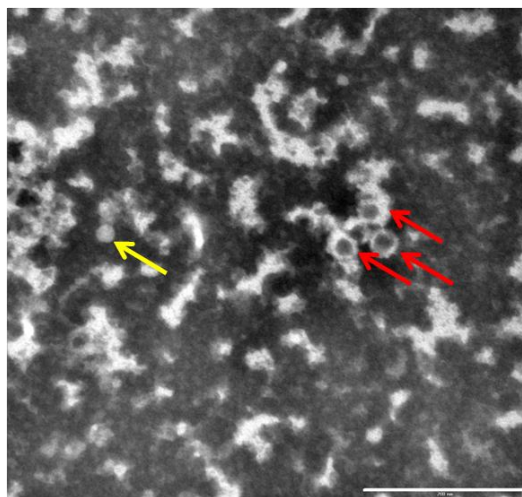
proti VP1 proteinu myšího polyomaviru Rb α VP1 v kombinaci se sekundární protilátkou D α Rb-Ax546 (červeně), a jednak myší monoklonální protilátkou proti VP1 proteinu myšího polyomaviru M α VP1-D4 v kombinaci se sekundární protilátkou D α Rb-Ax546 (červeně). V tabulce jsou uvedena procenta mutovaných bází a mutovaných aminokyselinových zbytků po překlada do proteinové sekvence. Transfekci buněk a konfokální mikroskopii na mikroskopu Leica TCS SP2 provedla J. Žáčková Suchanová.



Obr. 28. Elektronová mikroskopie lyzátů buněk transfekovaných plasmidy nesoucími genom myšího polyomaviru s mutovaným VP1 genem. Pro transfekci bylo vybráno několik plasmidů obsahujících VP1 gen MPyV či BCsub MPyV, jenž prošel 10 (JBS10) či 20 (JBS20) cykly mutagení PCR, případně mutagenézí pomocí soupravy GeneMorph® II Random Mutagenesis Kit (GM1). Jako kontrolní vzorky slouží buňky transfekované plasmidem s wt MPyV VP1 a BCsub MPyV VP1. 72 hodin po transfekci byly transfekované T2 buňky sklizeny, buněčný pelet byl resuspendován v pufru B, po centrifugaci byl pelet opět resuspendován v pufru B a buňky byly 3krát zmrazeny v tekutém dusíku a rozmrazeny. Vzorky byly vizualizovány pomocí negativního barvení. Šipky označují objekty podobné virovým částicím, ať už ikosahedrální či tubulární (vzorek GM1 kol.7). Velikost úsečky je 200 nm. Elektronovou mikroskopii provedla J. Žáčková-Suchanová

5.2.7 Produkce mutovaných virů pro účely selekce

Všechny další kolonie, které nebyly použity pro samostatnou izolaci plasmidů (kapitola 5.2.5), byly hromadně setřeny párátkem a zaočkovány do velkého objemu média pro maxipreparaci plasmidů (kapitola 4.2.4.12) obsahujících genom myšího polyomaviru s mutovaným VP1 genem. Kvalita izolované DNA byla ověřena DNA elektroforézou (data nejsou ukázána). Plasmidy byly následně hromadně transfekovány do T2 buněk pro produkci mutovaných virů na veliko (provedeno 6 nukleofekcí, každá po 5 ug směsi rekombinantních plasmidů, buňky z každé nukleofekce byly vysety na jednu Petriho misku Ø 10 cm a na mikroskopické sklíčko). 72 hodin po transfekci byly transfekované buňky na sklíčkách fixovány a přítomnost LT antigenu v některých buňkách byla detekována pomocí imunofluorescence (data nejsou ukázána). Transfekované buňky na miskách byly 3krát zmrazeny a rozmrazeny pro dosažení lyze buněk a supernatant byl přečištěn centrifugací přes 10% sacharózový polštář (kapitola 4.2.6.2). Získaný pelet rozplavený v pufru B byl sonikován, homogenizován a použit pro zjištění přítomnosti částic pomocí elektronové mikroskopie, kterou provedla H. Španielová (obr. 29), a dále pro infekci buněk NIH-3T3 a NIH-3T6, viz kapitola 4.2.3.8. Virionů se však ve vzorku při pozorování elektronovým mikroskopem nacházelo velmi málo.



Obr. 29. Elektronová mikroskopie mutant získaných po hromadné transfekci T2 buněk plasmidy obsahujícími mutovaný VP1 gen a přečištění média, v němž byly kultivované buňky, přes sacharózový polštář. Vzorek byl vizualizován pomocí negativního barvení. Červené šipky ukazují na útvary podobné prázdným částicím, žlutá šipka ukazuje pravděpodobně na malou plnou částici. Úsečka představuje velikost 200 nm. Elektronovou mikroskopii provedla H. Španielová.

5.3 Charakterizace systému pro selekci mutantních virionů

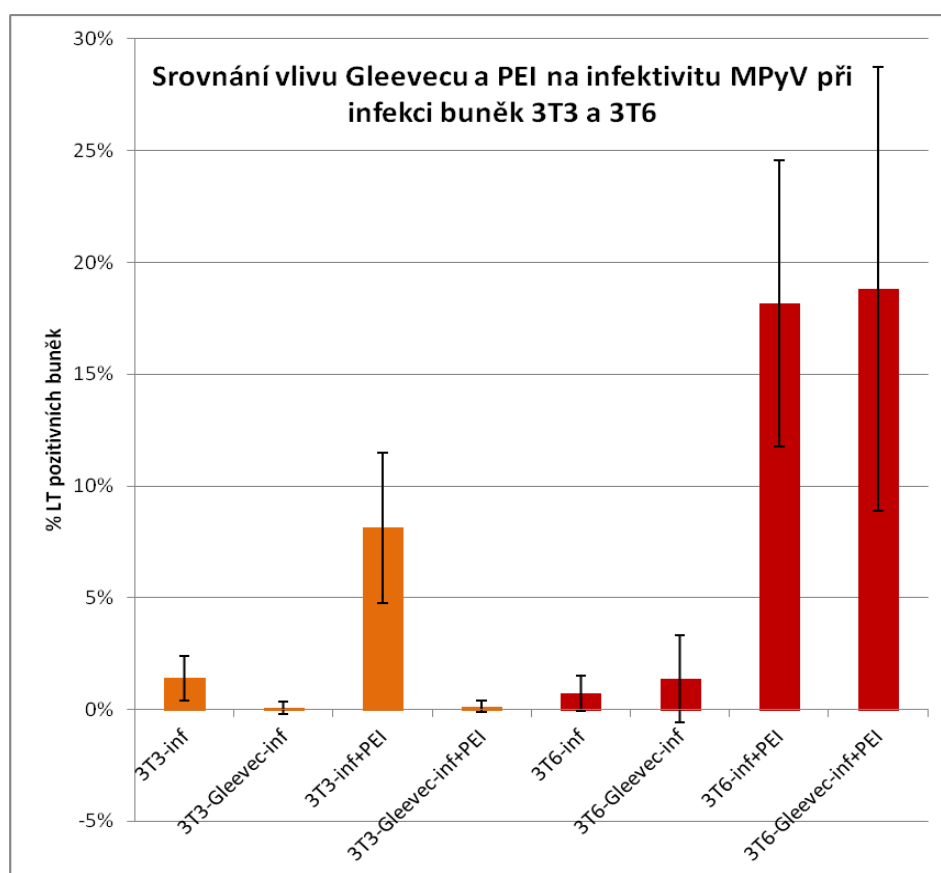
5.3.1 Testování infekitivity pro navržený selekční systém

V původně navrženém selekčním schématu (obr. 12) jsme předpokládali, že se podaří v jediném kroku (krok 4) selektovat viriony upřednostňující vazbu na PSMA před vazbou na gangliosidy GD1a (odstraněny Gleevecem) a zároveň tyto viriony pomnožit. Na základě nově publikovaných dat je však zřejmé, že k tomu může dojít pouze v případě, že u virionů dojde k interakci s odlišným gangliosidem anebo docílíme-li jejich uvolnění z endolysosomálních kompartmentů buňky jiným způsobem. Rozhodli jsem se proto otestovat, zda lze pro tyto účely využít polyethylenimin (PEI). PEI je polymer běžně využívaný k transfekcím DNA do buňky, který napomáhá uvolnění endocytované DNA z váčku do cytoplasmy. Ukazuje se však (Owada *et al.*, 1998; Qiu *et al.*, 1998; Dodds *et al.*, 1999; Polidarová - nepublikované výsledky), že preinkubací PEI s virem může dojít také ke zvýšení infekitivity viru, pravděpodobně podobným mechanismem, tedy usnadněním úniku viru z váčků.

Infektivita viru byla testována na buňkách NIH-3T3 a kontrolních, permisivních buňkách NIH-3T6. V obou liniích je virus schopen se pomnožit, ale linie se liší přítomností gangliosidů na buněčném povrchu a buňky NIH-3T3 zcela postrádají gangliosid GT1b. Gleevec neboli imatinib či STI-571 by měl být schopen v buňkách NIH-3T3 znemožnit využití i GD1a pro vstup MPyV do buňky (více o mechanismu působení kapitola 2.1.5), a proto jsme se rozhodli tento fakt ověřit. Předpokládali jsme, že buňky NIH-3T3 ošetřené látkou Gleevec by díky nedostatku vhodných gangliosidů neměly umožnit pomnožení viru nebo jej umožnit jen v omezené míře. Toho by bylo možné využít při selekci virových mutant – zajistili bychom tím, že virus, který se v buňce pomnoží, do buňky musel vstoupit skrze interakci s jiným než přirozeným gangliosidovým receptorem.

Na druhou stranu by bylo vhodné zajistit účinné pomnožení takto internalizovaného viru a proto jsme testovali i účinek PEI na infektivitu viru v přítomnosti látky Gleevec. Pokud by PEI podpořil infekci i u buněk NIH-3T3 ošetřených Gleevecem, znamenalo by to, že i viriony vstupující jinou cestou než pomocí gangliosidů by bylo možné v buňkách pomnožit.

Aplikovali jsme proto stejné množství myšího polyomaviru divokého typu preinkubovaného či nepreinkubovaného se 50 μ M PEI na buňky NIH-3T3 a NIH-3T6, z nichž polovina byla předtím ošetřena Gleevecem (kapitola 4.2.3.8). 30 hodin po infekci jsme buňky zafixovali a pomocí nepřímé imunofluorescence (kapitola 4.2.3.6) detekovali expresi LT antigenu v buňkách, které virus infikoval. Dle dosažených výsledků (obr. 30) je zřejmé, že na infekci buněk 3T6 nemá preinkubace buněk s Gleevecem vliv, zatímco po preinkubaci buněk NIH-3T3 s Gleevecem nedokáže ani preinkubace viru v PEI zvýšit infektivitu viru, virus tedy potřebuje pro infekci přítomnost gangliosidů.



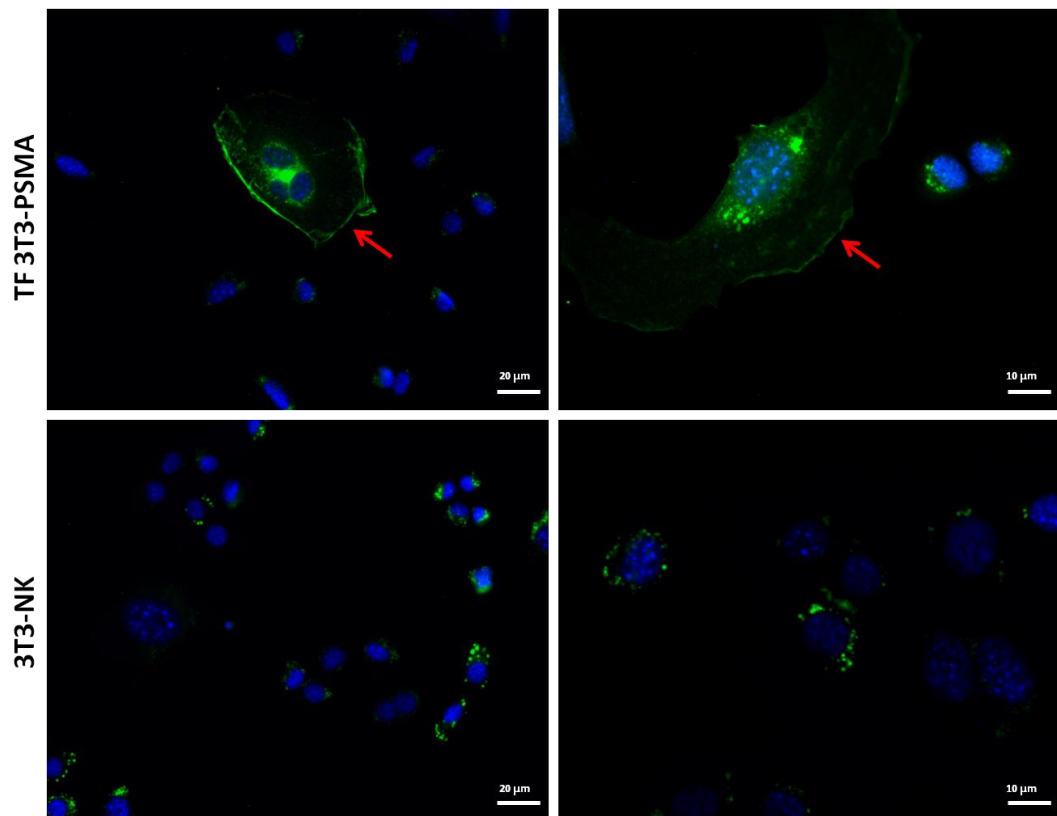
Obr. 30. Závislost množství buněk infikovaných myším polyomavirem divokého typu (wt MPyV) na typu buněk, preinkubaci buněk s Gleevecem a preinkubaci viru s polyethyleniminem (PEI). Myší linie fibroblastů NIH-3T3 a NIH-3T6 byly po dobu 75 minut infikovány stejným množstvím wt MPyV ošetřeným či neošetřeným 100 μ M polyethyleniminem (PEI). Infekci u některých vzorků (označených Gleevec) předcházela ještě 16 hodinová inkubace buněk v přítomnosti 20 μ M roztoku Gleevecu v kulturačním médiu pro odstranění gangliosidu GD1a z povrchu buněk. 36 hodin po infekci byly buňky fixovány a pomocí primární protilátky RatoLT1 a sekundární protilátky D α Rat-Ax488 byl detekován virový LT antigen. Na snímcích z fluorescenčního mikroskopu byla zkoumána exprese LT-antigenu v jednotlivých buňkách (celkem přibližně 1000 – 3000 buněk od každého vzorku). Experiment byl proveden v duplikátu. Procento buněk, v nichž byla detekována přítomnost LT antigenu, je vyneseno v grafu, úsečka značí směrodatnou odchylku získanou ze srovnání proinfikovanosti buněk na jednotlivých snímcích.

V paralelním experimentu jsme rovněž použili pro infekci virus s mutovaným VP1 genem připravený pro účely selekce (kapitola 4.2.3.8). Z jedné preparace viru jsme použili vždy desetinu celkového množství na infekci buněk narostlých na jediném mikroskopickém sklíčku a detekovali pouze 13 infikovaných buněk v buňkách NIH-3T3 a 81 buněk v linii NIH-3T6. V NIH-3T3 buňkách inkubovaných s Gleevecem pak bylo detekováno pouze 2 infikované buňky. Tyto výsledky naznačují, že dosažení efektivního pomnožení mutantního viru v námi navrženém systému bude velmi obtížné.

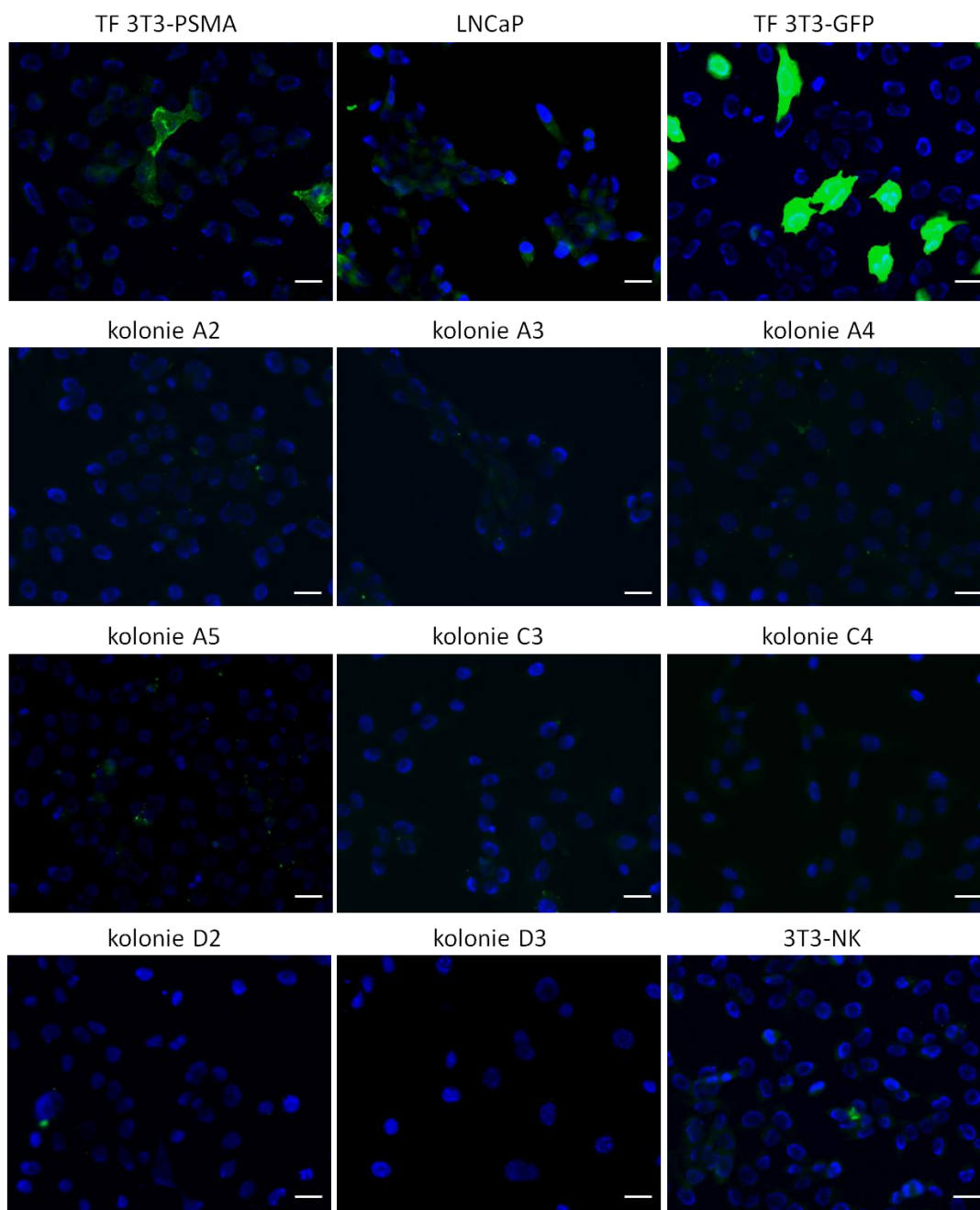
5.3.2 Příprava 3T3-PSMA linie

Pro pozitivní selekci virů vstupujících do buňky skrze interakci s PSMA jsme se pokusili připravit stabilní linii 3T3 buněk produkujících PSMA (3T3-PSMA). Po transfekci (kapitola 4.2.3.2) vektoru pcDNA4/PSMA kódujícího gen pro PSMA do buněk NIH-3T3 (úspěšnost transfekce byla ověřena metodou nepřímé imunodetekce pomocí primární protilátky proti PSMA, viz obr. 31), byly buňky vysety na Petriho misky a kultivovány v médiu DMEM s antibiotikem Zeocin™ v koncentraci 2 mg/ml média (potřebná koncentrace antibiotika byla zjištěna testováním, viz kapitola 4.2.3.4) měněném každé 3-4 dny po dobu 11 dní. Poté, co na miskách byly patrné jednotlivé oddělené kolonie, bylo 24 kolonií izolováno (kapitola 4.2.3.5) a pěstováno odděleně v médiu se Zeocinem. Po 51 dnech byla exprese PSMA 8 přeživších kolonií testována pomocí nepřímé imunofluorescence s primární protilátkou M α PSMA a sekundární protilátkou D α M-Ax488 (obr. 32).

Kvůli vysokému pozadí a zároveň slabému signálu protilátky proti PSMA (signál by se měl objevovat zejména v oblasti plasmatické membrány) nebylo snadné odlišit pozitivní a negativní buňky. Komplikující byl zejména fakt, že nádorové buňky LNCaP, které PSMA produkují, nevykazovaly výrazně silnější signál než negativní kontrola a selektované kolonie, avšak oproti buňkám transfekovaným pcDNA4/PSMA plasmidem 25 hodin před fixací rozdíl viditelný byl. Ze získaných výsledků jsme proto usoudili, že v připravených liniích došlo ke ztrátě exprese PSMA. Vzhledem k tomu, že se jednalo již o druhý neúspěšný pokus o ustavení linie se stabilní expresí PSMA v linii NIH-3T3 (J. Žáčková Suchanová, nepublikované výsledky), rozhodli jsme se již tento experiment neopakovat. Zároveň, v souvislosti s předchozími výsledky (kapitola 5.3.1), jsme se rozhodli přehodnotit celé schéma selekce mutant.



Obr. 31. Detekce PSMA v buňkách po nukleofekci. Buňky NIH-3T3 byly transfekovány Nukleofekcí® plasmidem pcDNA4/PSMA. Buňky byly fixovány 24 hodin po transfekci a exprese PSMA byla detekována pomocí myší monoklonální protilátky proti PSMA M α PSMA a sekundární protilátky D α M-Ax488. Jako negativní kontrola sloužily netransfekované buňky NIH-3T3. Šipky ukazují na buňky produkující protein PSMA.



Obr. 32. Detekce PSMA v selektovaných koloniích. Buňky NIH-3T3 byly transfekovány Nukleofekcí® plasmidem obsahujícím gen pro PSMA a gen pro rezistenci vůči zeocinu, jednotlivé kolonie (A2 – D3) byly odděleny a selektovány v přítomnosti zeocinu po dobu 51 dní. Buňky byly fixovány a exprese PSMA byla detekována pomocí myší monoklonální protilátky proti PSMA M α PSMA a sekundární protilátky D α M-Ax488. Jako pozitivní kontrola sloužily buňky NIH-3T3 transfekované plasmidem pcDNA4/PSMA pomocí Turbofect transfection reagent 25 hodin před fixací a prostatické nádorové buňky LNCaP, jako pozitivní kontrola transfekce sloužily buňky NIH-3T3 transfekované plasmidem pmaxGFP nesoucím gen pro GFP a jako negativní kontrola sloužily netransfekované buňky NIH-3T3. Úsečka znázorňuje 20 μ m.

5.3.3 Zjišťování schopnosti MPyV VLPs interagovat s vybranými buněčnými liniemi

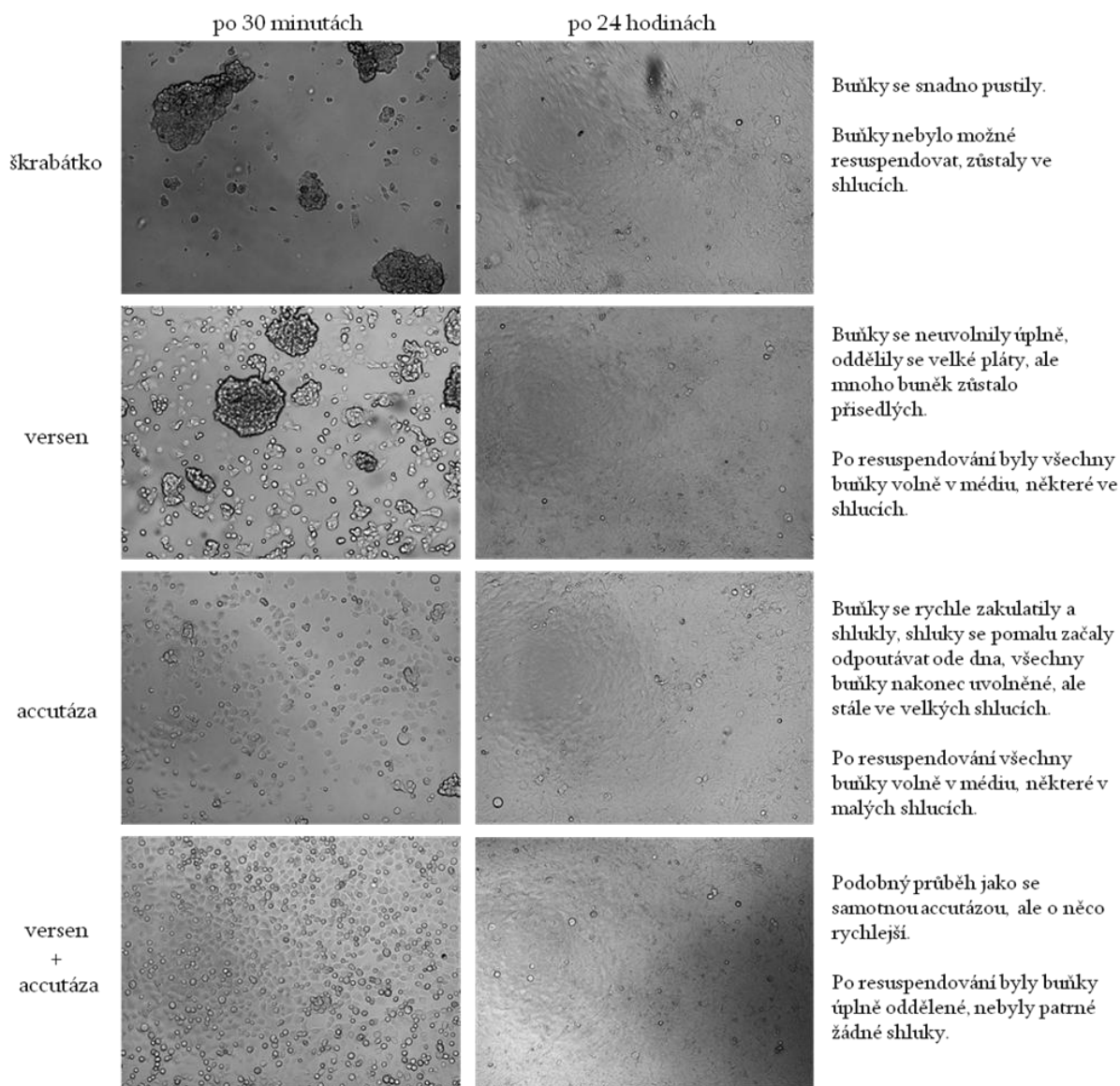
Na základě předchozích výsledků (kapitola 5.3.1 a 5.3.2) jsme se rozhodli otestovat, jaká je přirozená schopnost MPyV vázat se a vstupovat do prostatických nádorových linií. Ty by totiž mohly sloužit ve změněném selekčním systému pro nabohacování virionů s požadovanými vlastnostmi. Za tímto účelem jsme se rozhodli využít metody průtokové cytometrie a kvantifikovat vazbu a vstup MPyV VLPs do vybraných buněčných linií. Pro některé experimenty byl pro srovnání použit také MPyV divokého typu (připravený transfekcí plasmidu pBS-PyI do T2 buněk), abychom zjistili, zda se neliší schopnost vazby a vstupu VLPs a viru a můžeme tedy předpokládat, že do buněk, kam vstoupí VLPs vstoupí i virus.

Optimálním přístupem by byla vizualizace VLPs po inkubaci s buňkami pomocí specifické protilátky proti VP1 genu, kvůli vysokému pozadí, které jsme při několika provedených experimentech pozorovali, jež neumožnilo zjistit rozdíly mezi buněčnými liniemi (králičí polyklonální protilátka proti VP1 proteinu), jsme se však nakonec přiklonili k použití VLPs značených fluorescenční barvou.

5.3.3.1 Testování optimálního způsobu převedení adherentních buněk do suspenze

Testovat vazbu a vstup virových částic do buněk jsme se rozhodli pomocí průtokové cytometrie. Vzhledem k povaze experimentu však bylo nutné zachovat veškeré membránové proteiny na povrchu buněk i při jejich sklizení a také zajistit dokonalé oddělení jednotlivých buněk od sebe, aby mohly být dobře analyzovány cytometrem. Proto jsme se chtěli vyhnout použití trypsinu a rozhodli jsme se proto nejprve otestovat, jaký z dostupných způsobů sklizení buněk je pro naše účely nejvhodnější. Z důvodu náchylnosti některých buněčných linií k uvolňování se od podkladu (zejména LNCaP) bylo třeba minimalizovat i kroky odsávání činidla.

Jednotlivé způsoby sklizení jsou popsány a dokumentovány na obr. 33. Fotografie buněk byly pořízeny 30 minut po převedení do suspenze a resuspendování v médiu, a následně 24 hodin poté (mezitím inkubovány v termostatu).



Obr. 33. Testování vhodného způsobu převedení buněk do suspenze. Pro uvolnění buněk 3T6 narostlých na Petriho miskách byly použity 4 způsoby: buňky byly seškrabány pryžovým škrabátkem nebo byly po odsátí média inkubovány s 0,25% roztokem Versenu či 1 x koncentrovaným roztokem akutázy, případně byly nejprve opláchnuty Versenem a poté inkubovány s accutázou. Následně byly uvolněné buňky resuspendovány v médiu a uloženy do termostatu. 30 minut a 24 hodin po převedení do suspenze byly pořízeny snímky živých buněk na miskách při pozorování invertovaným mikroskopem Zeiss.

Pro naše účely nejvhodnějším způsobem se tedy ukázalo uvolnění buněk pomocí accutázy, pokud jsou buňky odolné k oplachování, je ideální nejprve opláchnout buňky versenem, ačkoli tento postup není uváděn výrobcem (Sigma-Aldrich).

5.3.3.2 Příprava a charakterizace fluorescenčně značených MPyV VLPs

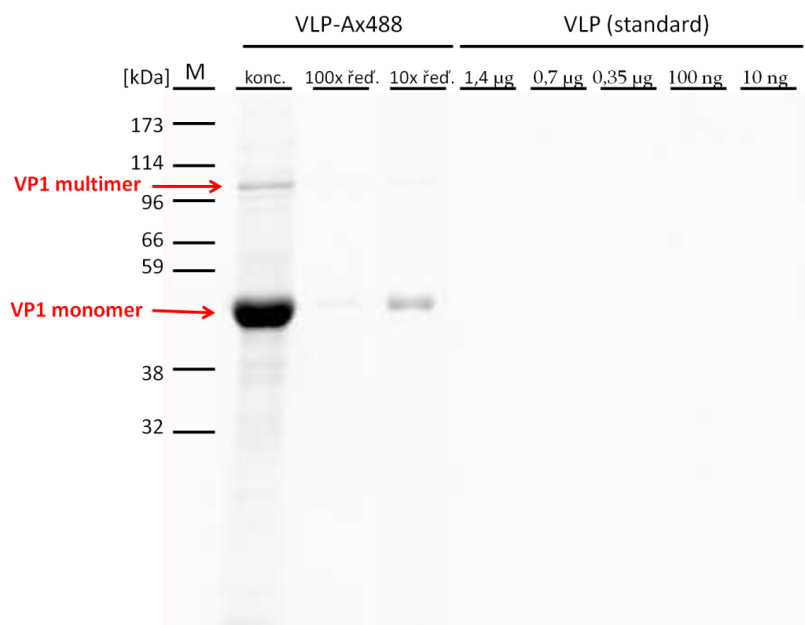
Pro fluorescenční značení VLPs byl zvolen amino-reaktivní N-hydroxysukcinimidyl (NHS) ester fluorescenční barvy Alexa Fluor 488 (Ax488). Tato látka dokáže v mírně zásaditém prostředí reagovat s neprotonovanými aminoskupinami a kovalentně se tak připojit na N-konce proteinů a ϵ -aminoskupiny lysinových zbytků. Z výše uvedeného vyplývá, že prostředí, ve kterém reakce probíhá, musí kromě vhodného pH splňovat podmínku, že je prosto NH_2 skupin. To na rozdíl od běžně užívaných pufrů pro uchování viru (pufr B, či samotný Tris) splňuje například hydrogenuhličitanový pufr. Proto bylo prvním a nezbytným krokem převést VLPs do hydrogenuhličitanového pufru.

K 1,5 mg MPyV VLPs (laskavě poskytnutým J. Žáčkovou Suchanovou) dialyzovaným přes noc do hydrogenuhličitanového pufru byla přidána reaktivní barva Ax488-NHS v poměru 0,5 molárních ekvivalentů barvy na 1 molární ekvivalent povrchových lysinových zbytků částic (výpočet viz kapitola 4.2.6.7) a inkubována 75 minut za jemného třepání při pokojové teplotě ve tmě. Následně byly částice dialyzovány do pufru B pro zastavení reakce, neboť pufr B obsahuje volné NH_2 skupiny, které inaktivují nezreagovanou barvu. Poté byly částice přečištěny od zbytků barvy ultracentrifugací přes sacharózový polštář (kapitola 4.2.6.2).

Pro ověření přítomnosti fluorescenční barvy a odhad koncentrace značených částic jsme využili metody SDS-PAAGE (kapitola 4.2.5.1), měření fluorescence gelu po proteinové elektroforéze (kapitola 4.2.5.2), následného obarvení gelu barvou GelCode™ Blue Stain Reagent (kapitola 4.2.5.3) a měření intenzity proužků pomocí densitometru. Dále pak imunodetekcí VP1 proteinu po metodě „Western blot“ (kapitola 4.2.5.6 a 4.2.5.7), hemaglutinaci (kapitola 4.2.6.6) a měření koncentrace proteinů pomocí přístroje Qubit™ (kapitola 4.2.5.8).

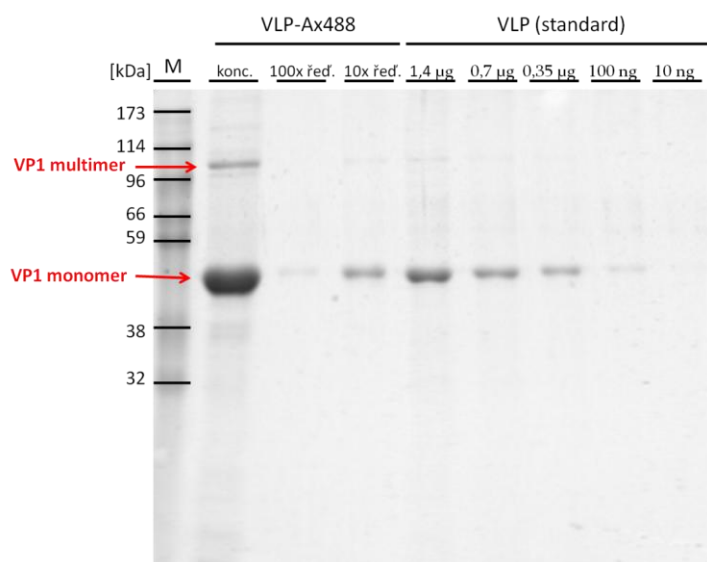
Pro denaturační proteinovou elektroforézu byl použit koncentrovaný, 10x ředěný a 100x ředěný vzorek značených částic a jako standard pro srovnání množství částic byly na 2 gely naneseny neznačené VLPs v množství 1,4 μg , 0,7 μg , 0,35 μg , 100 ng a 10 ng.

Jeden gel byl nejprve skenován fluorometrem Molecular Imager PharosFX pro zjištění, zda opravdu došlo ke konjugaci fluorescenční barvy na povrch VLPs (obr. 34). Ze snímku je patrné, že k označení částic došlo.



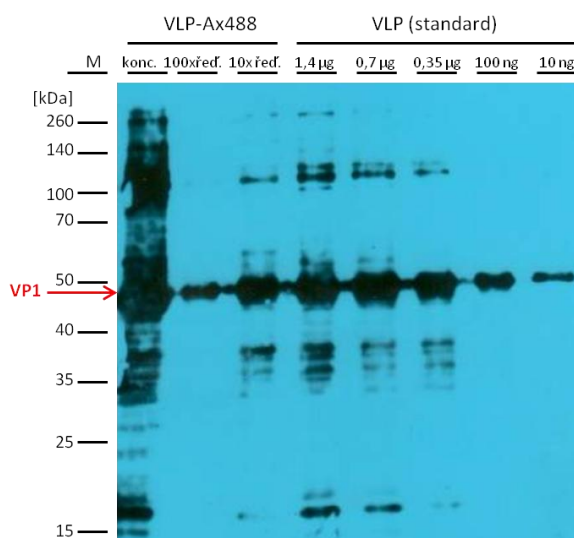
Obr. 34. Snímek polyakrylamidového gelu po denurační proteinové elektroforéze fluorescenčně značených VLPs a standardních VLPs vyfocený fluorometrem Molecular Imager PharosFX v kanálu Alexa488. Na 10% polyakrylamidový gel byl nanesen 1 µl koncentrovaných, 100x ředěných (100x řed.) a 10x ředěných (10x řed.) značených VLPs (VLP-Ax488) a jako standardy pro určení množství VLPs ve vzorku bylo na gel naneseno 1,4 µg, 0,7 µg, 0,35 µg, 100 ng a 10 ng VLPs. Jako marker byl použit Prestained Molecular Weight Marker, M.W. 27,000-180,000. Šipkou je označena předpokládaná pozice monomeru a multimeru proteinu MPyV VP1 (45 kDa).

Ihned po pořízení snímku byl gel obarven roztokem GelCode™ Blue Stain Reagent pro vizualizaci proteinů. Obarvený gel byl skenován přístrojem Molecular Imager® PharosFX™ (obr. 35), jenž zároveň změřil denzitu jednotlivých proužků. Naměřené intenzity VLPs standardů byly použity pro sestavení standardní křivky (kapitola 4.2.5.4) a na základě znalosti množství proteinu v jednotlivých standardech byla z regresní přímky byly odvozena koncentrace značených VLPs.



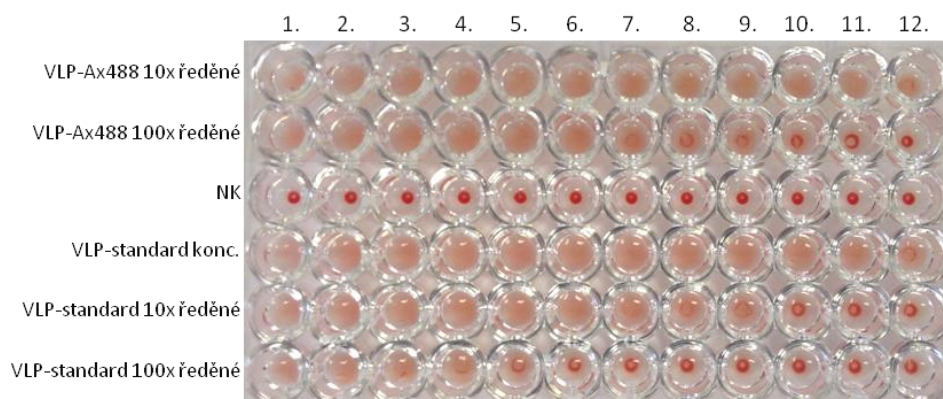
Obr. 35. Snímek polyakrylamidového gelu po denaturační proteinové elektroforéze fluorescenčně značených VLPs a standardních VLPs po obarvení GelCode™ Blue Stain Reagent. Na 10% polyakrylamidový gel byl nanesen 1 µl koncentrovaných, 100x ředěných (100x řed.) a 10x ředěných (10x řed.) značených VLPs (VLP-Ax488) a jako standardy pro určení množství VLPs ve vzorku bylo na gel naneseno 1,4 µg, 0,7 µg, 0,35 µg, 100 ng a 10 ng VLPs. Jako marker byl použit Prestained Molecular Weight Marker, M.W. 27,000-180,000. Šipkou je označena předpokládaná pozice monomeru a multimeru proteinu MPyV VP1 (45 kDa).

Druhý gel byl pomocí metody „Western blot“ (kapitola 4.2.5.6) použit pro detekci VP1 proteinu MPyV (obr. 36). Signál potvrdil přítomnost VP1 proteinu ve všech vzorcích.

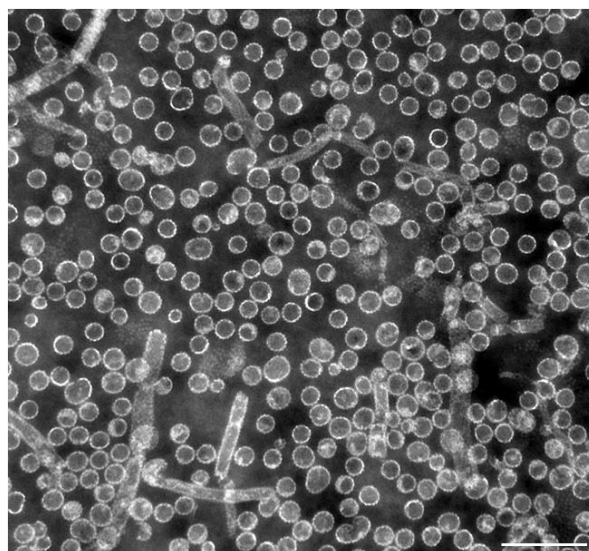


Obr. 36. Snímek výsledku imunodetekce VP1 proteinu po denaturační proteinové elektroforéze fluorescenčně značených VLPs a standardních VLPs a metodě „Western blot“. Vizualizováno chemiluminiscencí na rentgenový film. Na 10% polyakrylamidový gel byl nanesen 1 µl koncentrovaných, 100x ředěných (100x řed.) a 10x ředěných (10x řed.) značených VLPs (VLP-Ax488) a jako standardy pro určení množství VLPs ve vzorku bylo na gel naneseno 1,4 µg, 0,7 µg, 0,35 µg, 100 ng a 10 ng VLPs. Jako marker byl použit Multicolor Broad Range Protein Ladder. Jako protilátky pro detekci MPyV VP1 proteinu byly použity primární protilátka M α VP1-denat. a sekundární protilátka G α M-Px. Šipkou je označena předpokládaná pozice proteinu VP1 (45 kDa). M značí marker molekulových vah (Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder, 5 µl).

Další možností, kterou jsme využili pro určení koncentrace značených VLPs, byla metoda hemaglutinace, která využívá schopnosti VP1 proteinu MPyV vázat se na povrch červených krvinek skrze interakci s kyselinou sialovou (obr. 37). Srovnali jsme proto výsledek hemaglutinace pomocí značených VLPs se standardními neznačenými VLPs. Koncentrace určená hemaglutinací však může být ovlivněna přítomností barvy na povrchu částic a přítomnost fluorescenční barvy pravděpodobně nedovoluje přesně měření ani pomocí fluorometru Qubit využívajícího interakci proteinů s fluorescenčním činidlem. Pro kontrolu kvality značených částic byly částice vizualizovány pomocí elektronové mikroskopie (obr. 38).



Obr. 37. Stanovení koncentrace značených VLPs (VLP-Ax488) pomocí hemaglutinace morčecích krvinek. Pro experiment byly použity 10x či 100x ředěné značené částice a koncentrované, 10x ředěné a 100x ředěné neznačené MPyV VLPs o koncentraci 0,7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Jako negativní kontrola (NK) sloužil 0,2% roztok BSA v PBS.



Obr. 38. Snímek fluorescenčně značených částic VLP-Ax488 z elektronového mikroskopu. Částice byly vizualizovány metodou negativního barvení. Délka úsečky je 200 nm. Elektronovou mikroskopií provedla J. Žáčková Suchanová.

Z velmi rozdílných hodnot koncentrací získaných několika metodami (tab. 4) byla nakonec odhadnuta koncentrace značených VLPs na 3,5 µg/µl.

Tab. 4. Stanovení koncentrace VLP-Ax488 s využitím různých metod

Hodnoty koncentrace VLP-Ax488 stanovené několika metodami	
Qubit (koncentrovaný vzorek)	0,7 µg/µl
Qubit (10x ředěný vzorek, přepočítán na koncentrovaný)	2,8 µg/µl
Hemaglutinace (srovnání s VLPs o známé koncentraci)	7 µg/µl
Odhad pohledem z gelu obarveného Coomassie (srovnání s VLPs o známé koncentraci)	4 µg/µl
Densitometrie proužků na gelu obarveném Coomassie	10 µg/µl
Odhad pohledem z Western blotu (srovnání s VLPs o známé koncentraci)	5 µg/µl

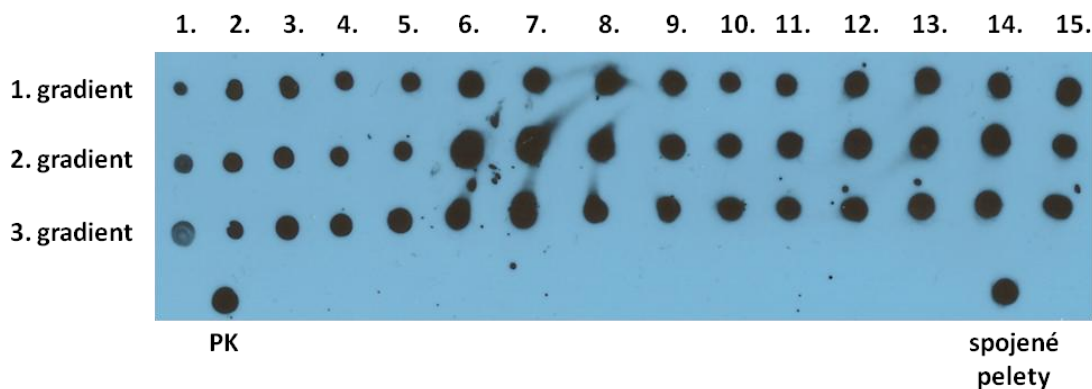
5.3.3.3 Izolace myšího polyomaviru a jeho fluorescenční značení

Pro značení byl připraven virus stejným způsobem, jakým byly produkovány mutované viriony pro experiment usměrněné evoluce – tedy transfekcí plasmidu pBS-PyI nesoucím genom MPyV lemovaný loxP místy do T2 buněk produkujících Cre rekombinázu. Virus je tedy lehce odlišný od divokého typu viru, zůstane mu jedno loxP místo v intronu časně oblasti genomu (v práci označován jako loxP-wt MPyV). Médium, v němž byly kultivovány transfekované buňky po dobu 7 dní bylo použito pro infekci buněk 3T6 na 20 Petriho miskách (Ø 10 cm), jež slouží k pomnožení viru. 8 dní po infekci byly buňky sklizeny a z buněk i kultivačního média byl izolován virus (viz kapitola 4.2.6.1). Virus byl dále přečištěn přes 20% sacharózový polštář (kapitola 4.2.6.2) a centrifugován v gradientu chloridu cesného (kapitola 4.2.6.3). Vzniklé 3 gradienty byly rozebrány na jednotlivé frakce o objemu přibližně 0,5 ml, následně byly změřeny refraktometrické indexy jednotlivých frakcí (viz tab. 5) a 1 µl od každé frakce byl nakapána na nitrocelulózovou membránu, na níž bylo detekováno množství VP1 proteinu MPyV metodou dot blot (obr. 39, viz kapitola 4.2.5.5). Dle výsledku dot blotu a refraktometrického indexu byly výše zmíněné frakce spojeny do 4 větších frakcí (viz barevné vyznačení v tabulce 5), sloučené frakce byly jednotlivě dialyzovány přes noc proti pufru B a přečištěny centrifugací přes 20% sacharózový polštář.

Tab. 5. Hodnoty refraktometrických indexů jednotlivých frakcí (1 – 15) vzniklých rozebráním 3 gradientů chloridu cesného. Pelety na dně každé ultracentrifugační zkumavky byly opláchnuty pufrem B a spojeny do jedné frakce s názvem spojené pelety. Shodnou barvou jsou označeny frakce, jež byly následně spojeny do větších frakcí 1 – 4.

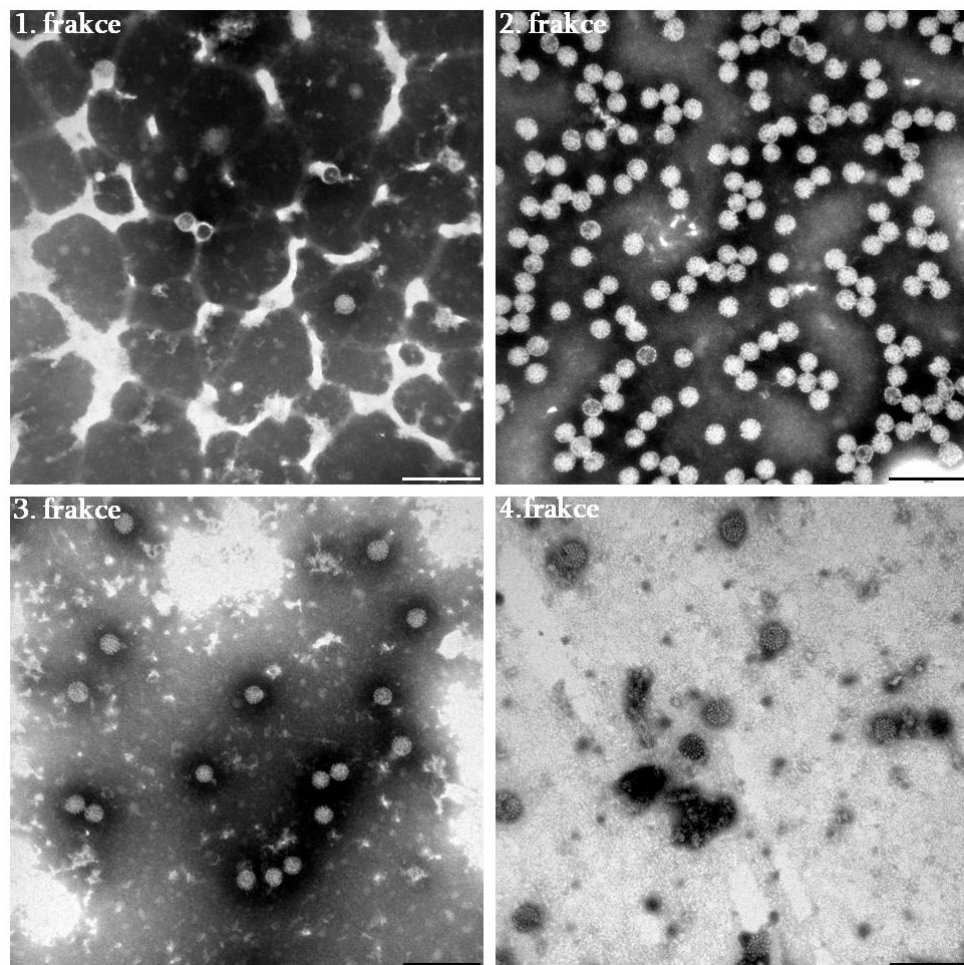
	1. gradient	2. gradient	3. gradient
1. frakce	1,372	1,3715	1,373
2. frakce	1,374	1,3735	1,373
3. frakce	1,371	1,371	1,37
4. frakce	1,368	1,3685	1,368
5. frakce	1,366	1,3665	1,3665
6. frakce	1,365	1,365	1,365
7. frakce	1,364	1,364	1,3645
8. frakce	1,364	1,364	1,364
9. frakce	1,363	1,3635	1,3635
10. frakce	1,363	1,363	1,363
11. frakce	1,3625	1,3625	1,362
12. frakce	1,362	1,362	1,3615
13. frakce	1,361	1,361	1,3605
14. frakce	1,359	1,360	1,359
15. frakce	1,358	1,3585	1,358
spojené pelety	1,3575		

1. frakce
2. frakce
3. frakce
4. frakce



Obr. 39. Detekce VP1 proteinu v jednotlivých frakcích (1 – 15) vzniklých rozebráním 3 cesium-chloridových gradientů metodou dot blot. Pelety na dně každé ultracentrifugační zkumavky byly opláchnuty pufrem B a spojeny do jedné frakce s názvem spojené pelety. 1 μ l každé frakce byl nakapán na nitrocelulózovou membránu. Množství VP1 proteinu ve frakci bylo detekováno primární protilátkou M α VP1-denat. a sekundární protilátkou G α M-Px konjugovanou s křenovou peroxidázou. Jako pozitivní kontrola sloužily MPyV VP1 VLPs.

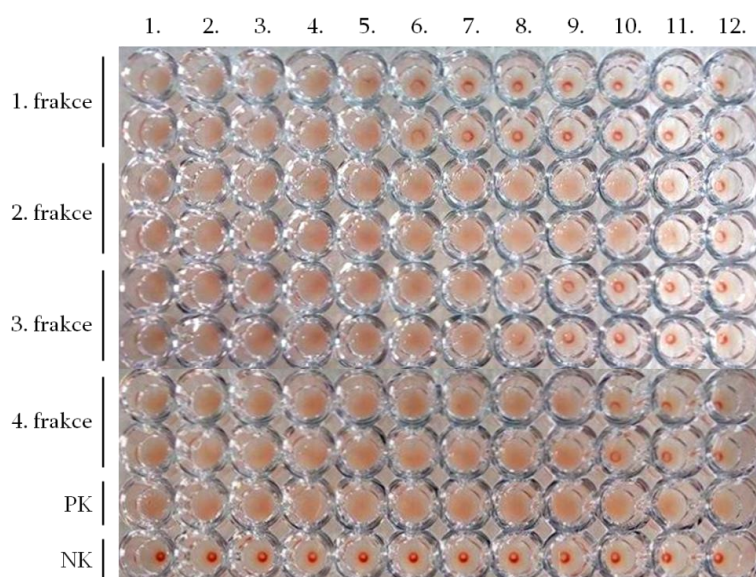
Izolovaný loxP-wt MPyV byl vizualizován pomocí negativního barvení (viz kapitola 4.2.6.5) na elektronovém mikroskopu (s asistencí J. Žáčkové Suchanové) – viz obr. 40.



Obr. 40: Snímky 4 frakcí izolovaného loxP-wt MPyV pořízené při elektronové mikroskopii. Vzorky byly vizualizovány pomocí negativního barvení. Zvětšení: 120 000x. Velikost úsečky je 200 nm. Autoři snímků: Jana Váňová a Jiřina Žáčková Suchanová

Titř viru byl určen pomocí hemaglutinace (kapitola 4.2.6.6) – obr. 41, tedy zřetězení červených krvinek virem skřez vazbu kyseliny sialové, čímž je bráněno sedimentaci krvinek. Výsledný hemaglutinační titř udává celkový počet všech virových částic, tedy infekčních i neinfekčních:

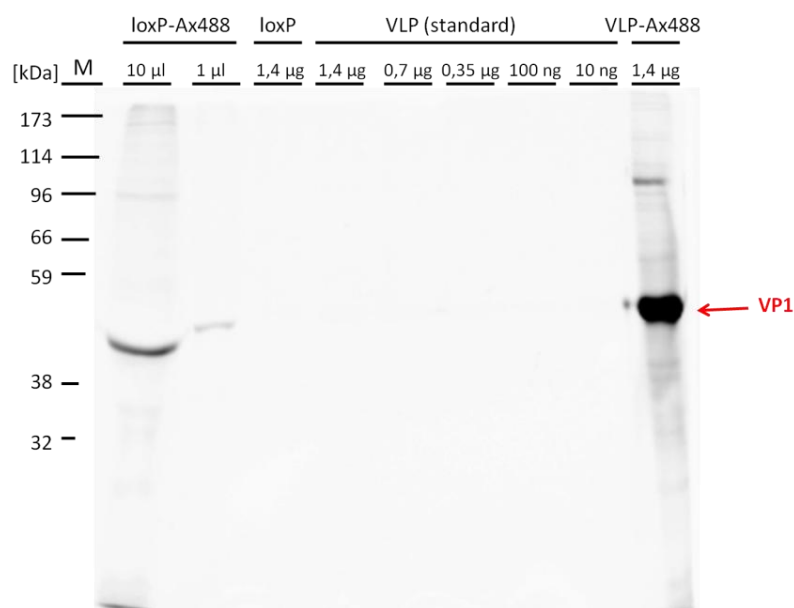
- 1. frakce: 640 HAU
- 2. frakce: 289630 HAU
- 3. frakce: 5120 HAU
- 4. frakce: 10240 HAU



Obr. 41. Stanovení titru izolovaného loxP-wt MPyV ve 4 frakcích pomocí hemaglutinace morčecích krvinek. 2. frakce byla před nanesením 10x ředěna. Jako pozitivní kontrola (PK) byly použity MPyV VP1 VLPs. Jako negativní kontrola (NK) sloužil 0,2% roztok BSA v PBS.

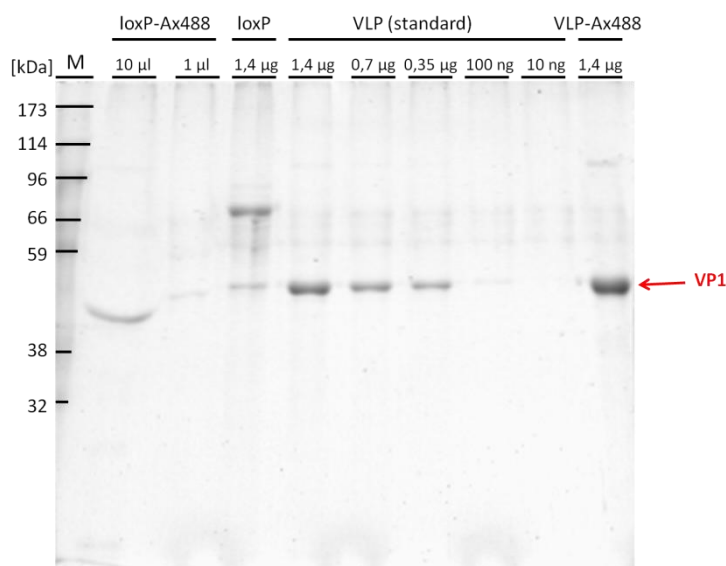
5.3.3.4 Značení izolovaného myššího polyomaviru pomocí fluorescenční barvy

50 μg získaného loxP-wt MPyV převedeného do hydrogenuhlíčanového pufru (kapitola 4.2.6.7) zkoncentrovaného pomocí PEG bylo inkubováno s 0,5 ekvivalentem reaktivní barvy Ax488-NHS na 1 mol povrchových lysinových zbytků, stejně jako předtím VLPs v kapitole 5.3.3.2 a koncentrace, míra značení a kvalita značeného viru (loxP-Ax488) byla taktéž určena přístrojem Qubit, zachycením fluorescence gelu po SDS-PAAGE (obr. 42), následným obarvením gelu barvou GelCode™ Blue Stain Reagent (obr. 43) a měřením intenzity proužků pomocí densitometru, imunodetekcí proteinů VP1, VP2 a VP3 metodou „Western blot“ (obr. 44) a elektronovou mikroskopií (obr. 45). Oproti značení VLPs jsme se však potýkali s příliš nízkým množstvím vstupního materiálu. Na denaturační proteinovou elektroforézu byly společně se značeným virem nanesen také kontrolní neznačený loxP-wt MPyV, a dále značené VLP-Ax488 sloužící jednak jako kontrola fluorescence, a jednak pro alespoň hrubé srovnání míry naznačení loxP-wt MPyV fluorescenční barvou.



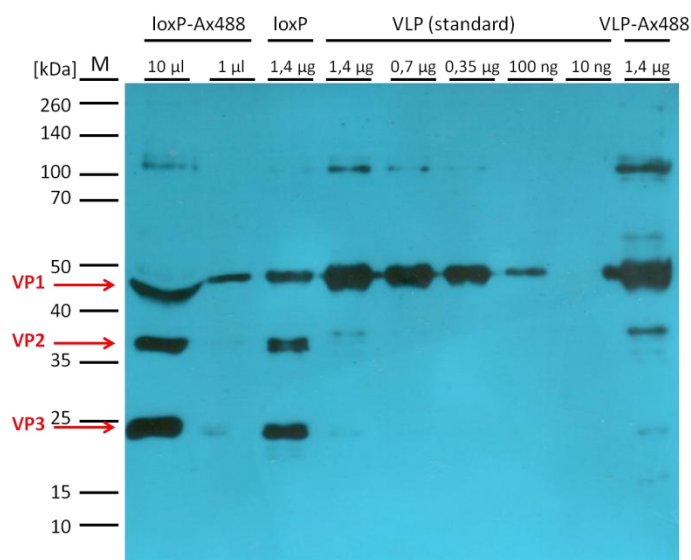
Obr. 42. Snímek polyakrylamidového gelu po denurační proteinové elektroforéze fluorescenčně značeného viru, značených VLPs a standardních VLPs vyfocený fluorometrem Molecular Imager PharoFX v kanálu Alexa488. Na 10% polyakrylamidový gel bylo naneseno 10 μl a 1 μl loxP-Ax488, 1,4 μg kontrolního neznačeného loxP-wt MPyV (loxP) a 1,4 μg VLP-Ax488. Jako standardy pro upřesnění množství značeného viru ve vzorku bylo na gel naneseno 1,4 μg, 0,7 μg, 0,35 μg, 100 ng a 10 ng VLPs. Jako marker byl použit Prestained Molecular Weight Marker, M.W. 27,000-180,000. Šípkou je označena předpokládaná pozice proteinu VP1 (45 kDa).

Ze srovnání snímku výsledného gelu pořízeného fluorometrem (obr. 42) a snímku gelu po obarvení GelCode™ Blue Stain Reagent (obr. 43) jsme nebyli schopni spolehlivě usoudit, zda byl loxP-wt MPyV naznačen fluorescenční barvou stejnou měrou jako VLPs, při následujících experimentech tedy s jistotou nemůžeme srovnávat množství viru a částic pouze na základě detekované fluorescence. Můžeme však srovnávat trend míry vstupu či vazby loxP-wt MPyV a částic do různých buněčných linií v kapitole 5.3.3.5.



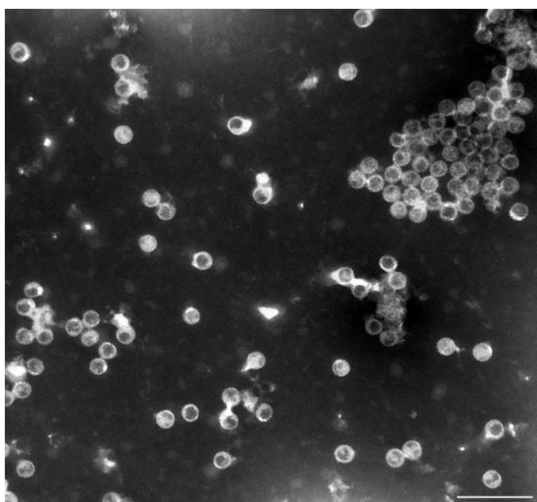
Obr. 43. Snímek polyakrylamidového gelu po denurační proteinové elektroforéze fluorescenčně značeného viru, značených VLPs a standardních VLPs po obarvení GelCode™ Blue Stain Reagent. Na 10% polyakrylamidový gel bylo naneseno 10 µl a 1 µl loxP-Ax488, 1,4 µg kontrolního neznačeného loxP-wt MPyV a 1,4 µg VLP-Ax488. Jako standardy pro upřesnění množství značeného viru ve vzorku bylo na gel naneseno 1,4 µg, 0,7 µg, 0,35 µg, 100 ng a 10 ng VLPs. Jako marker byl použit Prestained Molecular Weight Marker, M.W. 27,000-180,000. Šipkou je označena předpokládaná pozice proteinu VP1 (45 kDa).

Jeden polyakrylamidový gel po proteinové elektroforéze byl opět použit pro imunodetekci proteinů za použití metody „Western blot“. Vzorky byly z gelu po dobu 3 hodin přesávány na nitrocelulózovou membránu. Nejprve byla membrána se vzorky využita pro detekci VP1 proteinu MPyV, poté byla luminiscence luminalu zhasena roztokem H₂O₂ (kapitola 4.2.5.6), a následně byly na membráně detekovány minoritní kapsidové proteiny VP2 a VP3 MPyV pomocí protilátky namířené proti společné C-koncové části těchto proteinů. Na výsledném obrázku rentgenového filmu (obr. 44) jsou současně viditelné proužky odpovídající svou velikostí proteinu VP1 i proteinům VP2 a VP3 (proteiny VP2 a VP3 jsou přítomny pouze ve vzorcích se značeným či neznačeným virem, ve VLPs může být přítomen pouze protein VP1). Příčinou by mohlo být buď nedokonalé zhasnutí signálu po prvním kole imunodetekce nebo pravděpodobněji důvod, že zhasnutí neodstraní protilátku z membrány. Pokud byla primární protilátka v přebytku, zůstaly některé molekuly neobsazené sekundární protilátkou a mohla se tak na ně navázat stejná sekundární protilátka použitá ve 2. kole imunodetekce.



Obr. 44. Snímek výsledku imunodetekce proteinů VP1, VP2 a VP3 po denaturační proteinové elektroforéze a metodě „Western blot“ pro vizualizaci fluorescenčně značeného myšího polyomaviru obsahujícího v genomu 1 loxP místo (loxP-Ax488), stejně značených VLPs (VLP-Ax488) a standardních VLPs. Vizualizováno chemiluminiscencí na rentgenový film. Na 10% polyakrylamidový gel bylo naneseno 10 µl a 1 µl loxP-Ax488, 1,4 µg kontrolního neznačeného loxP-wt MPyV a 1,4 µg VLP-Ax488. Jako standardy pro upřesnění množství značeného viru ve vzorku bylo na gel naneseno 1,4 µg, 0,7 µg, 0,35 µg, 100 ng a 10 ng VLPs. Pro detekci VP1 proteinu byly použity primární protilátka M α VP1-denat. a sekundární protilátka G α M-Px. Poté byla luminiscence zhasnuta pomocí roztoku H₂O₂ a na membráně tak mohly být detekovány proteiny VP2 a VP3 protilátkou M α PyVP2/3 2C8 proti společné části těchto proteinů a sekundární protilátkou G α M-Px. Šipkou je označena předpokládaná pozice proteinu VP1 (45 kDa), VP2 (35 kDa) a VP3 (23 kDa). M značí marker molekulových vah (Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder, 5 µl).

Na závěr byl značený virus zkontrolován elektronovou mikroskopií (obr. 45), která opět ukazuje na nižší koncentraci viru ve vzorku.



Obr. 45. Snímek fluorescenčně značeného viru loxP-Ax488 z elektronového mikroskopu. Virus byl vizualizován metodou negativního barvení. Délka úsečky je 200 nm. Elektronovou mikroskopií provedla J. Žáčková Suchanová.

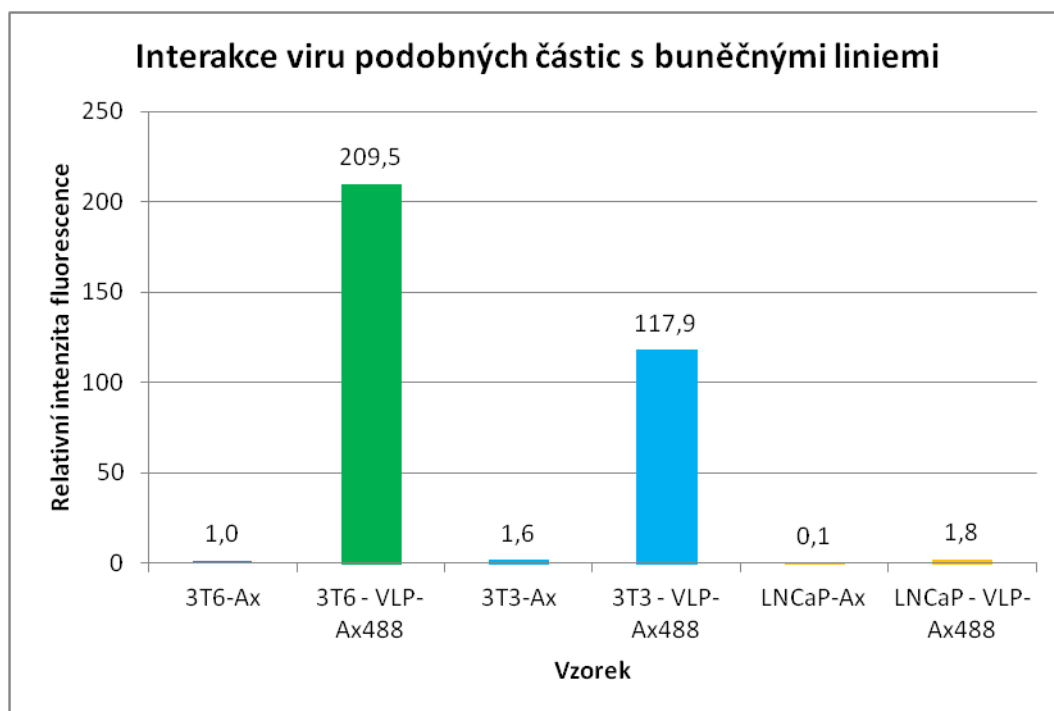
Ze srovnání hodnot koncentrace značeného viru ve vzorku určených několika metodami (tab. 6) jsme jako koncentraci, z níž budeme u tohoto vzorku vycházet, určili 90 ng/μl.

Tab. 6. Stanovení koncentrace značeného viru loxP-Ax488 s využitím různých metod

Hodnoty koncentrace loxP-Ax488 stanovené několika metodami	
Qubit (koncentrovaný vzorek)	120 ng/μl
Odhad pohledem z gelu obarveného Coomassie (srovnání s VLPs o známé koncentraci)	120 ng/μl
Densitometrie proužků na gelu obarveného Coomassie	90 ng/μl
Odhad pohledem z Western blotu (srovnání s VLPs o známé koncentraci)	150 ng/μl

5.3.3.5 Srovnání vazby a vstupu značených VLPs a viru do různých buněčných linií

Připravené značené částice byly poté inkubovány s různými buněčnými liniemi (3T3, 3T6 a LNCaP) v množství 650 000 částic na buňku po dobu 1 hodiny při 37 °C, provedeno v triplicátu (viz kapitola 4.2.6.8). Jako kontrola, zda se samotná barva neváže či nevstupuje do buněk, sloužily buňky inkubované s Ax488-NHS fluorescenční barvou inaktivovanou pomocí hydroxylaminu, jehož NH₂ skupiny zreagovaly s reaktivními skupinami barvy. Negativní kontrolou byly buňky inkubované se samotným médiem. Po resuspendování buněk pomocí akutázy a jejich opláchnutí od zbytků média byly vzorky analyzovány pomocí průtokového cytometru CytoFLEX (Beckman Coulter). Z hodnot mediánu intenzity fluorescence vzorku excitovaném při vlnové délce 488 nm normalizované na negativní kontrolu byl vytvořen graf srovnání interakce VLPs s jednotlivými buněčnými liniemi (obr. 46). Do myší buněčné linie NIH-3T6 částice vstupovaly či se vázaly velkou měrou, přibližně o polovinu méně částice interagovaly s buňkami NIH-3T3 postrádajícími na rozdíl od buněk NIH-3T6 gangliosid GD1a. Naopak do prostatických nádorových buněk LNCaP částice téměř nevstupovaly.

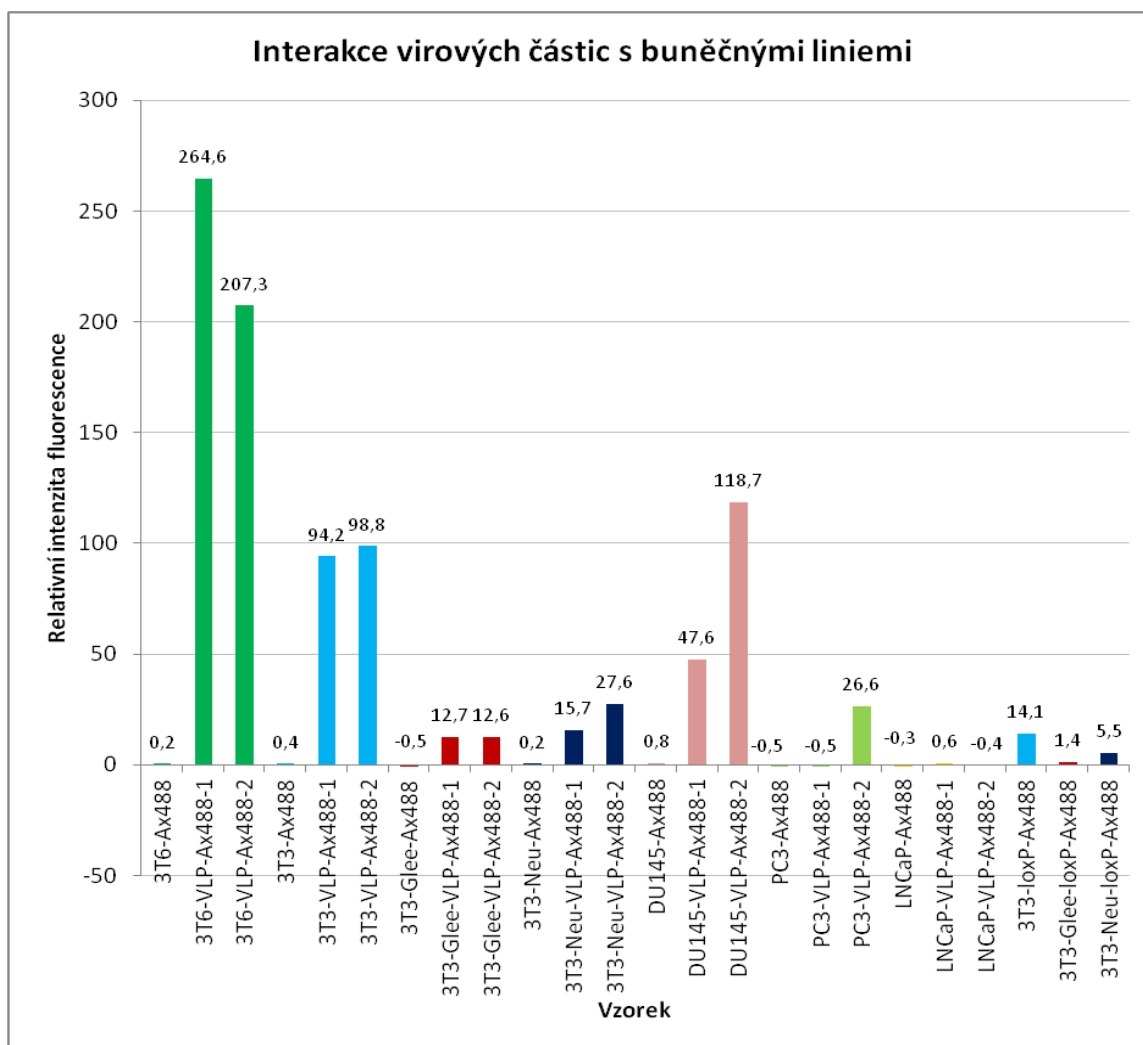


Obr. 46. Testování vazby a vstupu MPyV VLPs značených fluorescenční barvou Alexa488 do myších buněčných linií NIH-3T6, NIH-3T3 a lidské buněčné linie odvozené od nádoru prostaty LNCaP pomocí průtokové cytometrie. Buňky vyšetě na 12-jamkové destičce byly inkubovány 1 hodinu v přítomnosti VLPs v množství 650 000 částic na buňku v triplicátu (-VLP-Ax), inaktivované barvy Alexa Fluor 488 (-Ax488) či pouze v médiu v duplikátu (-NK), následně byly sklizeny pomocí akutázy, promyty DPBS a intenzita fluorescence byla měřena pomocí průtokového cytometru CytoFLEX. Naměřené hodnoty mediánu fluorescence byly průměrovány pro každý triplicát a normalizovány na negativní kontrolu podle vzorce $(x - NK)/NK$.

Poté jsme podobný pokus opakovali s využitím nejen fluorescenčně značených VLPs, ale i značeného viru loxP-Ax488, aplikovaného na vícero buněčných linií v množství 400 000 částic na buňku – kromě předchozích to byly prostatické nádorové linie DU-145 a PC3, které na rozdíl od buněk LNCaP na svém povrchu nemají PSMA, ale naopak ve velkém množství vystavují na svém povrchu gangliosid GD1a (Ravindranath *et al.*, 2004, 2005). Experiment jsme ještě rozšířili preinkubací NIH-3T3 buněk s neuraminidázou (50 mU neuraminidázy v bezsérovém médiu na 10^6 buněk po dobu 1 hodiny) pro kompletní odstranění kyseliny sialové z buněčného povrchu, předpokládající, že bez kyseliny sialové nebudou viriony ani VLPs schopné vstupovat, ani se vázat, na takto ošetřené buňky. Dále jsme využili preinkubace buněk s Gleevecem (inkubace buněk 16 hodin v 20 μ M roztoku Gleevecu v sérovém médiu), jenž odstraňuje z povrchu buněk gangliosid GD1a. Zajímalo nás, zda Gleevec dokáže ovlivnit vazbu viru a částic na povrch buněk.

Srovnání relativních hodnot naměřených intenzit fluorescence v jednotlivých experimentech (obr. 47) ukázalo opět vysokou interakci virových částic s buňkami NIH-3T6,

zhruba o polovinu nižší signál u buněk NIH-3T3 a prakticky žádný signál u buněk LNCaP. Další prostatické nádorové linie interagovaly s částicemi více, nejvíce buňky DU-145 v množství podobném jako buňky NIH-3T3, avšak vzorky v duplikátu se vzájemně velmi lišily. Buňky PC3 interagovaly s viru podobnými částicemi relativně málo, u hodnoty PC3-VLP-2 pravděpodobně došlo k chybě (nepřidání částic k buňkám), neboť signál je srovnatelný s intenzitou fluorescence inaktivované reaktivní fluorescenční barvy a je velmi rozdílný oproti hodnotě vzorku PC3-VLP-1. Preinkubace buněk NIH-3T3 s Gleevecem vedla ke snížení interakce částic s buňkami (přibližně 7,5x), preinkubace buněk NIH-3T3 s neuraminidázou také vedla k poklesu signálu, ale ne takovému jako v případě Gleevecu. Značený loxP-wt MPyV vykazoval výrazně nižší hodnoty intenzity fluorescence v porovnání se značenými VLPs. Jak již bylo zmíněno, množství viru bylo malé, těžko stanovitelné. Při srovnání interakce loxP-wt viru s buňkami NIH-3T3 po ošetření Gleevecem a neuraminidázou vidíme podobný trend jako u VLPs – preinkubace s Gleevecem vedla ke snížení signálu, a to 10krát, preinkubace s neuraminidázou snížila signál pouze 2,5krát.



Obr. 47. Testování vazby a vstupu loxP-wt MPyV a MPyV VP1 VLPs značených fluorescenční barvou Alexa Fluor 488 do myších buněčných linií NIH-3T6, NIH-3T3 a lidských buněčných linií odvozených od nádoru prostaty LNCaP, PC3 a DU-145 pomocí průtokové cytometrie. Buňky vyseté na 12-jamkové destičce byly inkubovány 1 hodinu v přítomnosti VLP-Ax488 (v duplikátu) či viru loxP-Ax488 v množství 400 000 částic či viru na buňku (-VLP-Ax488 či -loxP-Ax488), inaktivované barvy Alexa Fluor 488 (-Ax488) či pouze v médiu (-NK). Buňky NIH-3T3 byly navíc před přidáním viru či částic inkubovány 16 hodin v 20 μ M roztoku Gleevecu v médiu či 50 mU neuraminidázy připadajícími na 10^6 buněk. Následně byly buňky sklizeny pomocí akutázy, promyty DPBS a intenzita fluorescence byla měřena pomocí průtokového cytometru CytoFLEX. Naměřené hodnoty mediánu fluorescence reprezentují jednotlivé vzorky normalizované na negativní kontrolu podle vzorce $(x - NK)/NK$.

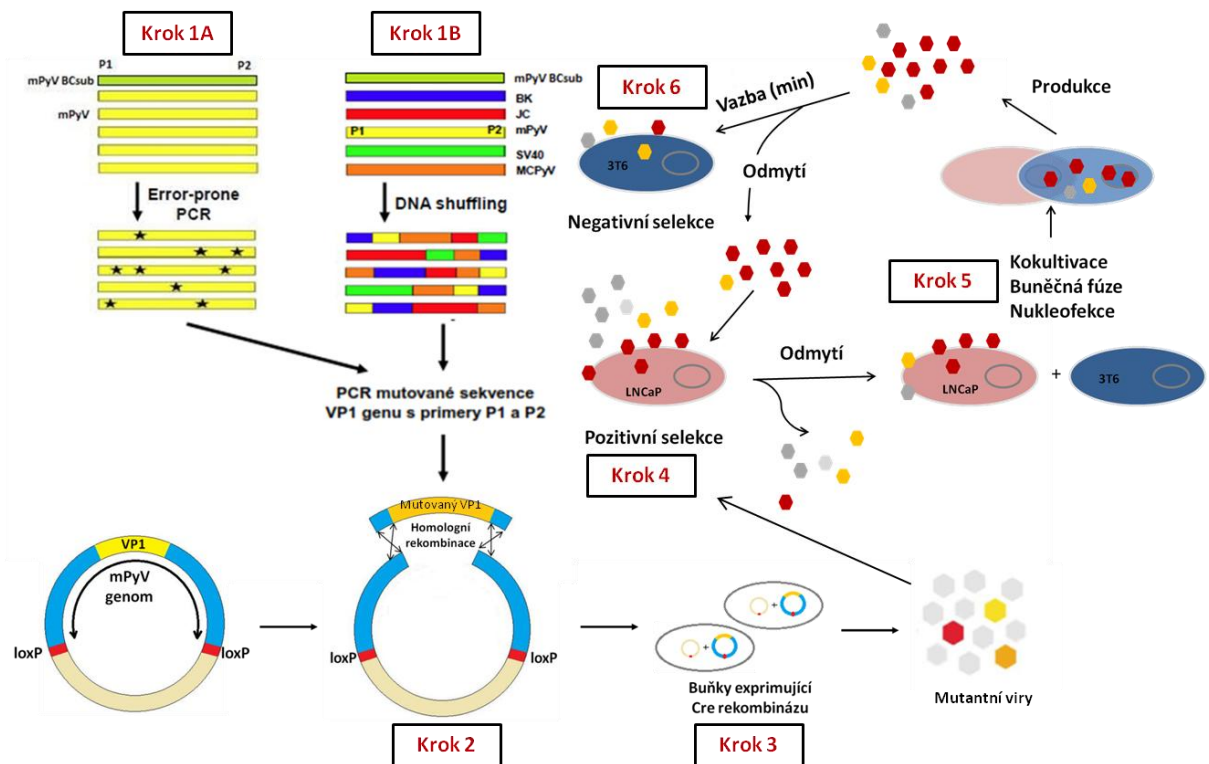
5.3.4 Návrh nového systému pro selekci mutantních virionů

Při návrhu systému pro generování a selekci mutant pomocí metody usměrněné evoluce je třeba zohlednit fakt, že v systému musí existovat propojení mezi mutovaným genotypem a selektovaným fenotypem tak, aby bylo možné po selekci identifikovat kódující sekvenci úspěšné varianty kapsidového proteinu.

Vzhledem k tomu, že pracujeme s myším virem, nemůžeme pro selekci používat lidské nádorové buňky, což by bylo optimální, ale musí jít o buňky myši, aby se v nich virus dokázal pomnožit. Náš původní návrh selekčního systému, založený na myších 3T3 buňkách se však rovněž ukázal jako nevhodný z několika důvodů. Prvním důvodem byl fakt, že se nám opakovaně nepodařilo v těchto buňkách ustavit stabilní expresi proteinu PSMA, který měl sloužit jako hlavní determinanta pro pozitivní selekci. Druhým důvodem jsou nově publikované poznatky, které naznačují, že obecně glykoproteiny (a tedy i PSMA) mohou na buněčném povrchu sloužit k navázání virionů, ale *de facto* pak svádí virus na degradační dráhu a k pomnožení těchto virů nedojde. Náš původně navržený systém by tak pravděpodobně nedovolil generovat genomy virů s příznivými (tj. PSMA vázícími) fenotypovými vlastnostmi.

Naše experimenty rovněž potvrzují již dříve publikovaná pozorování, že pro pomnožení viru je naprosto nezbytné, aby virus interagoval s gangliosidy a jejich odstranění látkou Gleevec by pravděpodobně znamenalo, že bychom nemohli virové potomstvo získat. Naše hypotéza, že PEI by mohl nahradit funkci gangliosidů v tom smyslu, že dokáže uvolnit virus z endolysosomálních kompartmentů, se také ukázala jako mylná, a možnost, že by se podařilo přesměrovat virus na jinou molekulu než gangliosid a pomnožit jej v jediném kroku selekce, se ukázala jako nereálná.

Proto jsme navrhli nové schéma selekčního systému (obr. 48), kde jsou oba kroky téměř odděleny. Lidské nádorové buňky (LNCaP) zde slouží jako afinitní matrix pro navázání virionů, zatímco myší buňky slouží pro pomnožení viru. Virové mutanty necháme navázat či vstoupit do lidských nádorových buněk, důkladně je opláchneme od nenavázaného viru, a poté je kultivujeme nebo navodíme jejich fúzi s myšími buňkami, které poskytnou aparát pro replikaci a pomnožení viru. Pilotní pokusy již proběhly. Zjistili jsme, že virus se pomnožuje nejen v buňkách, které fúzovaly, ale také ve smíšených populacích buněk, které vůbec elektroporaci či fúzi pomocí polyethylenglykolu vystaveny nebyly. Smíšení buněk namísto jejich fúze by značně zjednodušilo celé nastavení experimentu, ale mohlo by vést k opakovanému pomnožování virů divokého typu, které budou pravděpodobně vykazovat v permisivních buňkách vyšší fitness. V tom případě by bylo alternativně možné, nechat viry vstoupit do LNCaP buněk, izolovat z nich virovou extrachromosomální DNA a tu nukleofekcí re-transfektovat do permisivních buněk. Tak by byl s jistotou odstraněn vliv vazby na původní gangliosidy permisivních buněk při pomnožování viru.



Obr. 48. Nově navržené schéma usměrněné evoluce myšího polyomaviru. Po náhodné mutagenězi VP1 genu myšího polyomaviru metodou „error-prone PCR“ (Krok 1A) a „DNA shuffling“ (Krok 1B), vložení mutovaných VP1 genů do vektoru obsahujícího zbytek genomu myšího polyomaviru (Krok 2) a produkci mutovaného virového potomstva (Krok 3), budou mutované viriony inkubovány s buňkami LNCaP (Krok 4). Po odmytí nenavázaných částic bude umožněno pomnožení virionů, které vstoupily, či se alespoň navázaly na buňky LNCaP pomocí 3T6 buněk permisivních pro myší polyomavirus, a to buď ko-kultivací či fúzí buněk LNCaP a 3T6 či transfekcí virové DNA izolované z virionů interagujících s buňkami LNCaP do buněk 3T6 (Krok 5). Vytvořené virové potomstvo bude následně negativně selektováno na samotných buňkách 3T6, kdy všechny viriony, které se během několika minut (min.) na buňky 3T6 navázaly nebo do nich vstoupily, budou ze selektované populace virionů odstraněny (Krok 6). Jak kroky náhodné mutageněze VP1 genu, tak selekční kroky, mohou být poté opakovány. Obrázek vznikl ve spolupráci s J. Žáčkovou Suchanovou a H. Španielovou a část obrázků ve schématu byla převzata a upravena z publikací Perabo et al., (2003) a Bartel et al., (2011).

Lze předpokládat, že náhodná mutageněze a selekce myšího polyomaviru podle tohoto schématu má šanci zvýšit jeho vstup do prostatických nádorových buněk, konkrétně do buněk LNCaP, se kterými přirozeně neinteraguje, a využít od něj odvozené VLPs pro diagnostické účely doručení kontrastní látky do nádorových buněk. V tomto ohledu je rovněž zajímavé, že díky své přirozené schopnosti vázat gangliosidy, vykazují MPyV VLPs i přirozeně vysokou vazebnou afinitu k prostatickým nádorovým buněčným liniím s agresivním růstem (DU-145) a naše nové selekční schéma s pouhou ko-kultivací DU-145 a NIH-3T6 buněk by mohlo tuto vlastnost ještě zvýšit.

6 DISKUZE

Ceněnou vlastností ve výzkumu nové protinádorové léčby je zejména specifická doručení diagnostické či terapeutické látky do nádorových buněk vedoucí ke snížení nežádoucích účinků léčby a zpřesnění a zároveň zvýšení citlivosti detekce ložisek nádorových buněk. Nástrojem pro specifické doručení látek do buněk se mohou stát i viry, je však třeba změnit jejich původní tropismus a přeměřovat je na nádorovou tkáň.

Pro cílení polyomavirů na relativně dobře prozkoumané buňky nádoru prostaty jsme se rozhodli využít metodu usměrněné evoluce, která se skládá z kroku náhodné mutagenese genu kapsidového VP1 proteinu, zodpovědného za interakci s buňkou a následné selekce vzniklých mutovaných virů v podmínkách, které umožní získat variantu, jež je schopná se specificky vázat či vstupovat do nádorových buněk prostaty.

Pro náhodné mutování genu pro hlavní kapsidový protein myšího polyomaviru byla úspěšně použita metoda zabudování nukleotidových analogů do genu během amplifikace sekvence pomocí PCR. Sekvenční analýza mutací ukázala náhodný vznik mutací v míře ne příliš odlišné od míry uváděné výrobcem použité komerční soupravy. Po překladu získaných sekvencí DNA do sekvencí proteinových byl zjištěn častý vznik nových stop kodonů zejména při použití vyšších mutačních frekvencí okolo 60 – 125 jednobázových mutací/kbp. Vyšší frekvence mutací při „error-prone PCR“ vedou exponenciálně ke ztrátě původní aktivity proteinu, avšak bylo zjištěno, že tyto vyšší frekvence mutací dávají vzniknout funkčním proteinům častěji, než se přepokládalo na základě analýz knihoven připravených s nízkou mutační frekvencí a navíc vyšší frekvence (v rozmezí, jaké jsme získali i my) vedou častěji ke vzniku proteinu s novou funkcí (Zaccolo a Gherardi, 1999; Daugherty *et al.*, 2000; Drummond *et al.*, 2005). Při vyšších mutačních frekvencích dochází k pokrytí všech oblastí genu mutacemi a mohou být identifikovány mutace různých oblastí, které společně vedou k požadované změně funkce (Bill *et al.*, 2014). Ze 17 analyzovaných mutantů bylo u 80 % z nich možné detekovat mutovaný VP1 protein pomocí monoklonální či polyklonální protilátky proti VP1 proteinu divokého typu při použití imunofluorescence a pozorování na klasickém či konfokálním fluorescenčním mikroskopu, v několika vzorcích byly také nalezeny virové částice pomocí elektronové mikroskopie. Metoda náhodné mutagenese pomocí soupravy GeneMorph® II Random Mutagenesis Kit nevedla k získání mutovaných genů ani po konzultacích s distributorem soupravy.

Druhým způsobem přípravy mutovaných VP1 genů byl „DNA shuffling“ založený na rekombinaci homologních sekvencí různých variant téhož genu. Použili jsme VP1 geny 6 různých polyomavirů (myšího polyomaviru, viru SV40, viru JC, viru BK, polyomaviru karcinomu Merkelových buněk a myšího polyomaviru se substitucí v sekvenci povrchové BC smyčky). Přestože se nám podařilo úspěšně překonat prvotní problémy s fragmentací genů (výrobce zřejmě v komerční soupravě JBS DNA-Shuffling kit (Jena Bioscience) dodal DNázu I o vyšším počtu jednotek na jednotku objemu) a metodu jsme ve většině kroků optimalizovali, po provedení „self-priming PCR“ a dvou následných reamplifikací této reakce pomocí genově specifických primerů jsme po vložení vytvořených genů do cílového vektoru obdrželi VP1 gen poskládaný z různých částí jednotlivých polyomavirů pouze u jedné z 9 analyzovaných sekvencí a to navíc pouze ve formě spojené počáteční a koncové části kódující sekvence VP1 genu dvou polyomavirů (MPyV a SV40). U ostatních analyzovaných genů sekvenace odhalila nerekombinované vstupní VP1 geny (MPyV VP1 a BCsub MPyV VP1), případně pouze počáteční a koncovou část kódující sekvence VP1 genu s chybějící středovou oblastí. Pravděpodobně tedy došlo ke spojení s vektorem pouze u fragmentů, které obsahovaly místa pro nasedání primerů, avšak nedošlo k nasednutí těchto fragmentů na další fragmenty skrze homologní sekvence a jejich prodloužení během „self-priming PCR“.

Míra sekvenční identity vstupních genů má nejzásadnější vliv na výsledek celé reakce „DNA shuffling“. Ačkoli není vysloveně určena dolní hranice míry sekvenční identity, pod kterou nelze geny rekombinovat, platí, že čím vzdálenější sekvence jsou, tím je větší šance, že se během „self-priming PCR“ nedokáží spojit s fragmenty jiných genů a zůstanou ve výsledném produktu nerekombinovány (Joern *et al.*, 2002). Optimální se zdá být míra sekvenční identity okolo 80 – 90 % (Joern *et al.*, 2002). Míra sekvenční identity polyomavirových genů, které jsme pro reakci používali, se pohybuje mezi 64 – 79 % (Tab. S1). Metodu „DNA shuffling“ na geny několika polyomavirů ve své disertační práci aplikoval Teunissen (2014). Podařilo se mu docílit rekombinace mezi vstupními geny, avšak stejně jako v našem případě, mnoho analyzovaných produktů zůstalo nemutováno a to zejména při rekombinaci mezi sekvenčně vzdálenějšími geny. Zjistil také, že množství rekombinovaných produktů, které mohou dát vzniknout proteinu plné délky, závisí na délce štěpených fragmentů vstupujících do „self-priming PCR“, nejvíce genů vzniklo při použití fragmentů DNA o velikostech 400 – 1000 bp, u kterých však docházelo pouze

přibližně k 1,5 rekombinační události na gen. Při použití fragmentů dlouhých 50 – 200 bp nedošlo ke vzniku žádných rekombinovaných genů.

Dalším důvodem neuspokojivého výsledku reakce „DNA shuffling“ mohla být volba primerů. Byli jsme si vědomi toho, že jediný primer pro „DNA shuffling“ na 3' konec kódující sekvence VP1 genu MPyV v cílovém vektoru pravděpodobně zvýší převahu genů, které z větší části budou tvořeny právě sekvencí MPyV VP1, pro přesměrování viru však potřebujeme zvýšit zejména variabilitu oblastí ve středové části kódující sekvence genu, která kóduje povrchové smyčky proteinu. Z časových důvodů bohužel nebylo možné celý postup zopakovat a připravit dostatečně rozsáhlou knihovnu, abychom našli požadované smíšené geny.

V literatuře (Meyer *et al.*, 2014) je dále doporučováno využít dvou sad primerů – vnější pro přípravu vstupních genů a vnitřní pro závěrečnou amplifikaci cílového produktu. To proto, že koncové oblasti se během procesu „DNA shuffling“ mohou ztratit, a tím je také možné vysvětlit přítomnost necelistvých genů v našem produktu – ačkoli mohlo dojít k pospojování vnitřních oblastí VP1 genu, tyto oblasti postrádaly místa pro nasedání primerů a tedy oblasti komplementární k vektoru, díky čemuž nemohlo dojít k jejich spojení s vektorem. Naopak ke spojení s vektorem došlo u fragmentů obsahujících pouze okrajové sekvence VP1 genu, které postrádaly přítomnost větší části kódující sekvence tohoto genu. Umístit primery vně VP1 genu však nebylo možné, protože oblast vně nebyla u všech plasmidů používaných pro amplifikaci polyomavirových VP1 genů stejná, ne všude byl totiž na plasmidu VP1 gen umístěn v kontextu celého genomu tak, jak bylo pro naše účely potřeba.

Pokud by příčinou našeho neúspěchu byla nízká míra sekvenční identity mezi sekvencemi, je pro její zvýšení možné nechat si vstupní geny nasyntetizovat *in vitro* a pro stejný aminokyselinový zbytek využít napříč geny shodného kodonu, případně i pro 2 různé aminokyselinové zbytky použít kodon s co nejvíce společnými nukleotidy (Meyer *et al.*, 2014). Do reakce je také možné vkládat nikoli celé geny, ale pouze části genů a to i s nižší sekvenční identitou, aby nemohlo dojít ke vzniku genu divokého typu (Joern *et al.*, 2002).

Limitujícím faktorem při přípravě virové knihovny se však neočekávaně stala nízká účinnost klonování mutovaných VP1 genů do vektoru s MPyV genomem. Používali jsme klonování pomocí In-Fusion® reakce, které se zpočátku zdálo být velmi jednoduchou a elegantní metodou a v minulosti se v laboratoři velmi osvědčilo. Ke klonování nezávislému na ligáze metodou In-Fusion® jsme se přiklonili z důvodu nepřítomnosti vhodných restrikčních míst pro

restrikci cílového vektoru a VP1 genu a následnou ligaci. Pro tvorbu knihovny je však dosažený výtěžek 500 kolonií z jedné transformační reakce spíše nedostatečný, ačkoli Zhao *et al.* (2014) zmiňuje, že například pro vylepšení funkce proteinu zpravidla postačí knihovna čítající pouhých 1000 klonů. Optimalizace způsobu přípravy a přečištění použité DNA nepomohla účinnost klonování významně zvýšit. Snažili jsme se také vyloučit vliv nevhodného nastavení celkového množství DNA a poměru vektor:insert a to jak testováním různých poměrů, tak využitím různých množství reakční směsi pro transformaci bakterií či ředěním reakční směsi před transformací. Zcela jiný poměr vektor:insert byl také do reakce vkládán při využití roztoku Cloning Enhancer, který se přidává přímo k produktu PCR, jež se může bez přečištění použít do klonovací reakce. Z množství obdržených klonů bylo patrné, že některé optimalizační kroky zvýšily výtěžek klonovacího procesu, avšak nikdy natolik, aby mohl být tento způsob klonování použit pro přípravu velmi rozsáhlé knihovny mutant. Ani nahrazení In-Fusion® reakce metodou inverzní fúzní PCR a ligací nevedlo ke zvýšení účinnosti klonování. Do budoucna by bylo vhodné vyzkoušet jiný způsob klonování – například „QuickStep-Cloning”, což je rychlý způsob klonování nezávislý na sekvenci, bez použití ligáz a s vysokou účinností transformace, který využívá amplifikaci cílového genu pomocí 2 asymetrických PCR, které na 3' konce amplifikovaného genu přidávají oblasti komplementární k vektoru. Produkty těchto 2 PCR reakcí jsou poté spojeny, vznikne insert s 3' jednovláknovými přesahy na obou koncích. Takový insert poté sám slouží jako primer při PCR amplifikaci vektoru, během níž dojde ke spojení insertu a vektoru do cirkulárního plasmidu s jednovláknovým přerušením, jenž může být vnesen do buněk (Jajesniak a Wong, 2015).

Nedostatečná účinnost klonování se odrazila i na produkci virových mutant. Mutované plasmidy ze všech získaných kolonií byly hromadně izolovány a použity pro transfekci buněk produkujících Cre rekombinázu, v nichž by mělo dojít k rekombinaci mezi loxP místy ohraničujícími genom myšího polyomaviru s mutovaným VP1 genem následované replikací takto vzniklých virových genomů a produkcí virového potomstva. Při následné infekci permisivních buněk jsme pomocí detekce LT antigenu MPyV našli několik málo infikovaných buněk, což může být dáno vysokou mírou mutagenese sekvencí VP1 genu použitých pro přípravu mutant. Chtěli jsme však zjistit, zda i vysoká míra mutagenese může dát vzniknout funkčním virionům. Bylo zřejmé, že pro následná kola selekce mutant by bylo třeba generovat mnohem více virového materiálu.

Při zohlednění komplikací při přípravě rozsáhlé knihovny mutant by jedním z řešení do budoucna mohlo být aplikování náhodné mutagenese pouze na část genu kódující oblast VP1 proteinu účastnící se interakce s receptorem (Giger *et al.*, 2013). Nepotřebovali bychom tolik mutant, protože tato oblast je krátká, celkový počet potřebných jednobázových mutací genu by byl tedy nižší, a především bychom věděli, že s velkou pravděpodobností zachováme funkční protein VP1 se schopností tvorby virových kapsid, takže bychom ušetřili velké množství mutant vedoucích k tvorbě defektních částic.

Naším původním záměrem bylo přeměřovat myši polyomavirus náhodnou mutagenézou a následnou selekcí na protein PSMA, což je membránový protein nadměrně vystavovaný na povrchu nádorových buněk prostaty. Pro účely selekce mutovaných virů vázajících se na protein PSMA jsme se pokusili připravit linii NIH-3T3 buněk stabilně produkující PSMA na svém povrchu. Stejně jako v předchozím pokusu o její ustavení se nám ani nyní tuto buněčnou linii ustavit nepodařilo, buňky po několika týdnech přestaly PSMA produkovat, navzdory tomu, že jiné výzkumné skupiny ve svých pracích myši buněčnou linii stabilně produkující PSMA používají (Zhao *et al.*, 2012; Dassie *et al.*, 2014). Mírně záražející byla také koncentrace selekčního antibiotika Zeocin™, která byla potřebná pro zahubení buněk, jež neexprimovaly gen pro rezistenci vůči němu. Výrobce (InvivoGen) udává hodnoty okolo 50-400 µg antibiotika/ml média pro savčí linie, námi užívané buňky NIH-3T3 však nebyly schopny přežít až při koncentraci 2 mg antibiotika/ml média.

Postupně se z literatury ukázalo, že přeměrování na proteinový receptor jakým je PSMA by však nemuselo být vůbec realizovatelné, protože virus pro produktivní infekci (kterou potřebujeme, aby se během selekce v buňce pomnožil a tím se nabohatil) musí projít endoplasmatickým retikulem (ER), kam se pravděpodobně dostává díky interakci s gangliosidy nesoucími kyselinu sialovou a to zřejmě již na povrchu buňky (Qian *et al.*, 2009). Pokud však virus na povrchu buňky interaguje s glykoproteiny taktéž obsahujícími kyselinu sialovou, jakým je i PSMA (Walczak a Danishefsky, 2012), je sveden na neproduktivní cestu končící v lysozomu, kde je degradován (Qian a Tsai, 2010). Ve zmíněném článku však při demonstraci odstranění glykoproteinů z buněčné membrány, vedoucího ke zvýšenému transportu viru do ER a stimulaci infekce, nedokázali odstranit integriny. Mutagenese vazebných míst pro integrin ve VP1 proteinu vedla u MPyV k 50% snížení infektivit a proto jsou integriny pokládány za důležité koreceptory pro vstup viru (Caruso *et al.*, 2003). Není bez zajímavosti, že právě v nádorových buňkách dochází

k aktivaci a nadprodukcii integrinů (Sutherland *et al.*, 2012) a mohly by tedy sloužit jako významný cíl pro směrování nanočástic odvozených od MPyV na nádorové buňky. Nicméně, přítomnost gangliosidů se jeví pro pomnožení MPyV jako naprosto nezbytná (Buch *et al.*, 2015; You *et al.*, 2015) a naše experimenty s PEI ukazují, že jejich roli v infekčním cyklu nelze nahradit pouhou indukcí uvolnění vironů z endolysosomálního systému. I když přidání kationického polymeru polyethyleniminu (PEI) k viru před infekcí 3T3 buněk vedlo k výraznému zvýšení infekivity viru (přibližně 6 krát), po odstranění gangliosidů pomocí látky Gleevec účinek PEI pominul. PEI je pravděpodobně schopen indukovat pumpování protonů následovaných chloridovými anionty do váčků, v nichž se po endocytóze nachází, čímž dochází ke zvýšení iontové síly ve váčku následovaném prasknutím váčku (Behr, 1997). Tím může také dojít k uvolnění endocytovaného viru z váčků a stimulaci infekce. Předpokládali jsme, že PEI by mohl napomoci i nespecificky endocytovanému viru (velké množství virů je do buňky endocytováno skrze interakci s výše zmíněnými sialyzovanými glykoproteiny) uniknout z endosomálních kompartmentů NIH-3T3 buněk a infikovat buňku. V literatuře uvádějící taktéž zvýšení infekivity zkoumaných virů po preinkubaci s PEI je jako důvod zvýšení udávána také pozorovaná agregace vironů účinkem PEI, která může vést i k volbě jiné cesty endocytózy než u samotných virů (Dodds *et al.*, 1999; Qiu *et al.*, 1998) či zvýšení fluidity membrány (Owada *et al.*, 1998). V našem případě však ani tato schopnost bez přítomnosti gangliosidů na buněčném povrchu nedokázala příznivě ovlivnit infektivitu.

Směrování viru na glykoproteiny jako je PSMA tak lze využít, pokud by naším cílem bylo pouze buňku označit, neboť virus skrze ně do buňky vstoupí, ale nedokáže se pomnožit. Proto jsme se rozhodli v našem nově navrženém selekčním schématu (obr. 48) kroky selekce a pomnožení oddělit.

Je zajímavé, že i díky vysokoafinitní vazbě na kyselinu sialovou, představuje MPyV pro směrování na nádorové buňky atraktivní nástroj. Během nádorové transformace totiž často dochází ke změnám v expresi povrchových gangliosidů (častá je nadměrná exprese některých běžně se vyskytujících gangliosidů), některé gangliosidy jsou dokonce pro nádorové buňky charakteristické (a často také zároveň pro zárodečnou tkáň) – shrnuto v Fredman *et al.* (2003). Navíc přesměrování polyomaviru na jiný gangliosid se již několika skupinám podařilo (Magaldi *et al.*, 2012; Neu *et al.*, 2013), a co je ještě povzbudivější pro náš projekt - k přesměrování viru v obou případech stačila záměna pouhého jediného aminokyselinového zbytku hlavního kapsidového

proteinův místě účastnícím se interakce s receptorem (v tom má využití polyomavirů oproti jiným virům výhodu, neboť zpravidla je interakčních míst určujících vazbu specifického receptoru vícero).

Experiment, v němž jsme testovali infektivitu viru na buňkách NIH-3T6 a NIH-3T3, kterým na rozdíl od buněk NIH-3T6 chybí gangliosid GT1b, inkubovaných s Gleevecem, jenž odstraňuje i druhý vstupní gangliosid GD1a potvrdil dříve publikovaný výsledek (Swimm *et al.*, 2010), že u buněk 3T3 inkubovaných s Gleevecem skutečně dochází ke snížení počtu infikovaných buněk na minimum a můžeme je tedy po ošetření Gleevecem považovat za téměř neinfikovatelné MPyV divokého typu. Naše experimenty, kde jsme pomocí průtokové cytometrie zkoumali interakci fluorescenčně značených VLPs s myšími liniemi NIH-3T6 a NIH-3T3 po ošetření Gleevecem či neuraminidázou, potvrdili i to, že obě látky vazbu VLPs na buněčný povrch snižují (Swimm *et al.*, 2010; Neu *et al.*, 2011). Jak ošetření buněk neuraminidázou *Vibrio cholerae* (odštěpuje kyselinu sialovou z polysacharidů, glykoproteinů i glykolipidů), tak Gleevecem, snížilo interakci VLPs s buňkami, Gleevec však ve vyšší míře. Gleevec svou inhibicí některých tyrosinových kináz aktivuje sialidázy na buněčném povrchu (zejména neuraminidázu 3), která odstraňuje kyselinu sialovou - zejména z povrchu gangliosidů na plasmatické membráně (Miyagi *et al.*, 2004). To naznačuje, že snížení infekivity v buňkách bez přítomnosti gangliosidů je do jisté míry dáno taktéž omezenou vazbou částic na buněčný povrch. To je v rozporu s prací (Buch *et al.*, 2015), kde nepřítomnost gangliosidů neměla vliv na vazbu či internalizaci částic odvozených od polyomaviru. You *et al.* (2015) zase říká, že ačkoli je MPyV schopen vázat se na buněčnou membránu i bez přítomnosti gangliosidů, v přítomnosti gangliosidů vykazuje vyšší míru akumulace na povrchu buňky a tato akumulace je navíc závislá na konkrétním složení gangliosidů. Náš experiment u linií LNCaP, PC3 a DU-145 však potvrdil, že vazba VLPs odpovídá publikovaným úrovním exprese gangliosidů GD1a i u těchto linií (Ravindranath *et al.*, 2004, 2005) a lze tedy konstatovat, že gangliosidy vazbu viru podobných částic na buněčný povrch ovlivňují. Předpokládali jsme, že na nádorové buňky se VLPs budou vázat hojně díky nadměrné expresi gangliosidů a sializaci glykoproteinů (Munkley *et al.*, 2016). Překvapením proto bylo zjištění, že s prostatickými nádorovými buňkami LNCaP VLPs interagují vůbec nejméně. To však poskytuje ideální výchozí stav pro přesměrování VLPs na tyto buňky.

Z několika málo měření za použití loxP viru se zdá, že virus, co se týče interakce s buněčnými liniemi, zachovává podobné trendy jako VLPs, kvůli malému množství a kvalitě experimentálního materiálu však nejsou výsledky srovnatelné.

Ač zbývá odstranit ještě mnoho překážek, metoda usměrněné evoluce by v budoucnu mohla pomoci přeměrovat myší polyomavirus na prostatické nádorové buňky. K tomuto cíli jsme opět o krok blíží díky zavedení systému pro tvorbu náhodných mutací v hlavním kapsidovém proteinu myšího polyomaviru a díky nově vytvořenému schématu selekce virových částic, jež bylo navrženo na základě poznatků plynoucích mimo jiné také z této práce.

7 SOUHRN

Tato práce si kladla za úkol prozkoumat možnosti, které nabízí metoda usměrněné evoluce pro přípravu virových částic se změněnými vazebnými schopnostmi a to prostřednictvím dvou cílů:

- 1) Zavést efektivní systém pro generování náhodných variant myšího polyomaviru s mutacemi v hlavním kapsidovém proteinu.
 - a) Metodou „error-prone PCR“ byl úspěšně mutován VP1 gen myšího polyomaviru.
 - b) Analýza sekvencí získaných mutant potvrdila náhodnost vzniku mutací a poukázala na častý vznik non-sense mutací.
 - c) Pro mutagenezi pomocí metody „DNA shuffling“ byly připraveny VP1 geny vybraných polyomavirů. I přes optimalizaci některých kroků metody „DNA shuffling“ však převážná část získaných genů, jež byly analyzovány, nevznikla rekombinací různých částí vkládaných polyomavirových genů.
 - d) Mutované VP1 geny byly pomocí rekombinace vloženy do vektoru obsahujícího genom myšího polyomaviru ohraničený loxP místy. Po transfekci vybraných rekombinantních plasmidů do buněčné linie exprimující Cre rekombinázu byla metodou nepřímé imunofluorescence zjištěna tvorba virových proteinů v buňkách.

- 2) Ověřit funkčnost navrženého selekčního schématu a případně jej modifikovat tak, aby došlo k výběru takových variant polyomaviru, které se budou vázat na nádorové buňky prostaty s vysokou afinitou.
 - a) Testování infekivity MPyV divokého typu na permisivních buňkách po odstranění specifických receptorů pro vstup viru do buňky (gangliosidů GD1a) potvrdilo minimální infekivitu viru v tomto systému. Infektivitu viru v tomto systému nebylo možno obnovit ani přidáním polyethyleniminu, který ovlivňuje způsob endocytózy. Buněčný systém bez GD1a tedy nelze pro jednokrokovou selekci a pomnožení MPyV použít.

- b) Charakterizovali a srovnali jsme vazbu a vstup fluorescenčně značených viru podobných částic odvozených od myšího polyomaviru do vybraných buněčných linií pomocí průtokové cytometrie. Prostatické nádorové linie se významně lišily ve schopnosti vázat tyto částice. Na modelovou linii LNCaP stabilně exprimující membránový antigen specifický pro nádorové buňky prostaty (PSMA) se částice vázaly velmi málo.
- c) Nepodařilo se připravit myší buněčnou linii stabilně exprimující PSMA. Obtížnost přípravy takové linie naznačuje i dříve provedený neúspěšný pokus.
- d) S ohledem na výsledky předchozích experimentů a poznatky z odborné literatury byl navržen nový způsob selekce mutantních polyomavirů pomocí buněčné fúze prostatických nádorových buněk a pro virus permisivních myších buněk.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Aggarwal, S., Singh, P., Topaloglu, O., Isaacs, J.T., and Denmeade, S.R. (2006). A Dimeric Peptide That Binds Selectively to Prostate-Specific Membrane Antigen and Inhibits its Enzymatic Activity. *Cancer Res.* *66*, 9171–9177.
- Anassi, E., and Ndefo, U.A. (2011). Sipuleucel-T (Provenge) Injection. *Pharm. Ther.* *36*, 197–202.
- Assetta, B., Maginnis, M.S., Gracia Ahufinger, I., Haley, S.A., Gee, G.V., Nelson, C.D.S., O'Hara, B.A., Ramdial, S.A.A., and Atwood, W.J. (2013). 5-HT₂ Receptors Facilitate JC Polyomavirus Entry. *J. Virol.* *87*, 13490–13498.
- Atkin, S.J.L., Griffin, B.E., and Dilworth, S.M. (2009). Polyoma virus and simian virus 40 as cancer models: History and perspectives. *Semin. Cancer Biol.* *19*, 211–217.
- Banerjee, S.R., Wang, B., Pullambhatla, M., Foss, C.A., Pomper, M.G., and Morgan, R.H. (2014). Albumin-based nanoformulation for prostate-specific membrane antigen (PSMA). *Nucl. Med. Biol.* *41*, 641–642.
- Bařinka, C., Rojas, C., Slusher, B., and Pomper, M. (2012). Glutamate carboxypeptidase II in diagnosis and treatment of neurologic disorders and prostate cancer. *Curr. Med. Chem.* *19*, 856.
- Bartel, M., Schaffer, D., and Büning, H. (2011). Enhancing the Clinical Potential of AAV Vectors by Capsid Engineering to Evade Pre-Existing Immunity. *Front. Microbiol.* *2*, 204.
- Bartholdi, M.F., Wu, J.M., Pu, H., Troncoso, P., Eden, P.A., and Feldman, R.I. (1998). In situ hybridization for gastrin-releasing peptide receptor (GRP receptor) expression in prostatic carcinoma. *Int. J. Cancer* *79*, 82–90.
- Bauer, P.H., Bronson, R.T., Fung, S.C., Freund, R., Stehle, T., Harrison, S.C., and Benjamin, T.L. (1995). Genetic and structural analysis of a virulence determinant in polyomavirus VP1. *J. Virol.* *69*, 7925–7931.
- Behr, J.-P. (1997). The Proton Sponge: a Trick to Enter Cells the Viruses Did Not Exploit. *Chim. Int. J. Chem.* *51*, 34–36.
- Bill, A., Rosethorne, E.M., Kent, T.C., Fawcett, L., Burchell, L., van Diepen, M.T., Marelli, A., Batalov, S., Miraglia, L., Orth, A.P., et al. (2014). High throughput mutagenesis for identification of residues regulating human prostacyclin (hIP) receptor expression and function. *PloS One* *9*, e97973.
- Buch, M.H.C., Liaci, A.M., O'Hara, S.D., Garcea, R.L., Neu, U., and Stehle, T. (2015). Structural and Functional Analysis of Murine Polyomavirus Capsid Proteins Establish the Determinants of Ligand Recognition and Pathogenicity. *PLoS Pathog.* *11*. e1005104
- Buck, C.B., Van Doorslaer, K., Peretti, A., Geoghegan, E.M., Tisza, M.J., An, P., Katz, J.P., Pipas, J.M., McBride, A.A., Camus, A.C., et al. (2016). The Ancient Evolutionary History of Polyomaviruses. *PLoS Pathog.* *12*. e1005574
- Caruso, M., Belloni, L., Sthandier, O., Amati, P., and 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.
- Cerchia, L., Hamm, J., Libri, D., Tavitian, B., and de Franciscis, V. (2002). Nucleic acid aptamers in cancer medicine. *FEBS Lett.* *528*, 12–16.

- Coney, L.R., Tomassetti, A., Carayannopoulos, L., Frasca, V., Kamen, B.A., Colnaghi, M.I., and Zurawski, V.R. (1991). Cloning of a tumor-associated antigen: MOv18 and MOv19 antibodies recognize a folate-binding protein. *Cancer Res.* *51*, 6125–6132.
- Croswell, J.M., Kramer, B.S., and Crawford, E.D. (2011). Screening for prostate cancer with PSA testing: current status and future directions. *Oncol. Williston Park N* *25*, 452–460, 463.
- Dassie, J.P., Hernandez, L.I., Thomas, G.S., Long, M.E., Rockey, W.M., Howell, C.A., Chen, Y., Hernandez, F.J., Liu, X.Y., Wilson, M.E., et al. (2014). Targeted Inhibition of Prostate Cancer Metastases with an RNA Aptamer to Prostate-specific Membrane Antigen. *Mol. Ther.* *22*, 1910–1922.
- Daugherty, P.S., Chen, G., Iverson, B.L., and Georgiou, G. (2000). Quantitative analysis of the effect of the mutation frequency on the affinity maturation of single chain Fv antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 2029–2034.
- Ding, H., and Wu, F. (2012). Image Guided Biodistribution and Pharmacokinetic Studies of Theranostics. *Theranostics* *2*, 1040–1053.
- Dodds, E., Piper, T.A., Murphy, S.J., and Dickson, G. (1999). Cationic Lipids and Polymers Are Able to Enhance Adenoviral Infection of Cultured Mouse Myotubes. *J. Neurochem.* *72*, 2105–2112.
- Dower, W.J., Miller, J.F., and Ragsdale, C.W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* *16*, 6127–6145.
- Drummond, D.A., Iverson, B.L., Georgiou, G., and Arnold, F.H. (2005). Why high-error-rate random mutagenesis libraries are enriched in functional and improved proteins. *J. Mol. Biol.* *350*, 806–816.
- Eder, M., Schäfer, M., Bauder-Wüst, U., Haberkorn, U., Eisenhut, M., and Kopka, K. (2014). Preclinical evaluation of a bispecific low-molecular heterodimer targeting both PSMA and GRPR for improved PET imaging and therapy of prostate cancer. *The Prostate* *74*, 659–668.
- Elphick, G.F., Querbes, W., Jordan, J.A., Gee, G.V., Eash, S., Manley, K., Dugan, A., Stanifer, M., Bhatnagar, A., Kroeze, W.K., et al. (2004). The Human Polyomavirus, JCV, Uses Serotonin Receptors to Infect Cells. *Science* *306*, 1380–1383.
- Erickson, K.D., Garcea, R.L., and Tsai, B. (2009). Ganglioside GT1b is a putative host cell receptor for the Merkel cell polyomavirus. *J. Virol.* *83*, 10275–10279.
- Ewers, H., Römer, W., Smith, A.E., Bacia, K., Dmitrieff, S., Chai, W., Mancini, R., Kartenbeck, J., Chambon, V., Berland, L., et al. (2010). GM1 structure determines SV40-induced membrane invagination and infection. *Nat. Cell Biol.* *12*, 11–18.
- Faust, H., Pastrana, D.V., Buck, C.B., Dillner, J., and Ekström, J. (2011). Antibodies to Merkel Cell Polyomavirus Correlate to Presence of Viral DNA in the Skin. *J. Infect. Dis.* *203*, 1096–1100.
- Feng, H., Shuda, M., Chang, Y., and Moore, P.S. (2008). Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science* *319*, 1096–1100.
- Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J.W.W., Comber, H., Forman, D., and Bray, F. (2013). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *Eur. J. Cancer* *49*, 1374–1403.

- Fifis, T., Gamvrellis, A., Crimeen-Irwin, B., Pietersz, G.A., Li, J., Mottram, P.L., McKenzie, I.F.C., and Plebanski, M. (2004). Size-dependent immunogenicity: therapeutic and protective properties of nano-vaccines against tumors. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *173*, 3148–3154.
- Fleury, M.J.J., Nicol, J.T.J., Samimi, M., Arnold, F., Cazal, R., Ballaire, R., Mercey, O., Gonneville, H., Combelas, N., Vautherot, J.-F., et al. (2015). Identification of the Neutralizing Epitopes of Merkel Cell Polyomavirus Major Capsid Protein within the BC and EF Surface Loops. *PLoS ONE* *10*. e0121751
- Forstová, J., Krauzewicz, N., Wallace, S., Street, A.J., Dilworth, S.M., Beard, S., and Griffin, B.E. (1993). Cooperation of structural proteins during late events in the life cycle of polyomavirus. *J. Virol.* *67*, 1405–1413.
- Fowler, F.J., Barry, M.J., Walker-Corkery, B., Caubet, J.-F., Bates, D.W., Lee, J.M., Hauser, A., and McNaughton-Collins, M. (2006). The impact of a suspicious prostate biopsy on patients' psychological, socio-behavioral, and medical care outcomes. *J. Gen. Intern. Med.* *21*, 715–721.
- Fredman, P., Hedberg, K., and Brezicka, T. (2003). Gangliosides as therapeutic targets for cancer. *BioDrugs Clin. Immunother. Biopharm. Gene Ther.* *17*, 155–167.
- Freund, R., Garcea, R.L., Sahli, R., and Benjamin, T.L. (1991). A single-amino-acid substitution in polyomavirus VP1 correlates with plaque size and hemagglutination behavior. *J. Virol.* *65*, 350–355.
- Fuchs, A.V., Tse, B.W.C., Pearce, A.K., Yeh, M.-C., Fletcher, N.L., Huang, S.S., Heston, W.D., Whittaker, A.K., Russell, P.J., and Thurecht, K.J. (2015). Evaluation of Polymeric Nanomedicines Targeted to PSMA: Effect of Ligand on Targeting Efficiency. *Biomacromolecules* *16*, 3235–3247.
- Gardner, S.D., Field, A.M., Coleman, D.V., and Hulme, B. (1971). New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet Lond. Engl.* *1*, 1253–1257.
- Giger, L., Caner, S., Obexer, R., Kast, P., Baker, D., Ban, N., and Hilvert, D. (2013). Evolution of a designed retro-aldolase leads to complete active site remodeling. *Nat. Chem. Biol.* *9*, 494–498.
- Gilbert, J., and Benjamin, T. (2004). Uptake pathway of polyomavirus via ganglioside GD1a. *J. Virol.* *78*, 12259–12267.
- Gilbert, J., Dahl, J., Riney, C., You, J., Cui, C., Holmes, R., Lencer, W., and Benjamin, T. (2005). Ganglioside GD1a Restores Infectibility to Mouse Cells Lacking Functional Receptors for Polyomavirus. *J. Virol.* *79*, 615–618.
- Gilbert, J., Ou, W., Silver, J., and Benjamin, T. (2006). Downregulation of Protein Disulfide Isomerase Inhibits Infection by the Mouse Polyomavirus. *J. Virol.* *80*, 10868–10870.
- Gillessen, S., Omlin, A., Attard, G., de Bono, J.S., Efstathiou, E., Fizazi, K., Halabi, S., Nelson, P.S., Sartor, O., Smith, M.R., et al. (2015). Management of patients with advanced prostate cancer: recommendations of the St Gallen Advanced Prostate Cancer Consensus Conference (APCCC) 2015. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* *26*, 1589–1604.
- Gref, R., Minamitake, Y., Peracchia, M.T., Domb, A., Trubetskov, V., Torchilin, V., and Langer, R. (1997). Poly(ethylene glycol)-coated nanospheres: potential carriers for intravenous drug administration. *Pharm. Biotechnol.* *10*, 167–198.
- Grgacic, E.V.L., and Anderson, D.A. (2006). Virus-like particles: Passport to immune recognition. *Methods* *40*, 60–65.

- Griffith, J.P., Griffith, D.L., Rayment, I., Murakami, W.T., and Caspar, D.L.D. (1992). Inside polyomavirus at 25-Å resolution. *Nature* *355*, 652–654.
- Gross, L. (1953). A filterable agent, recovered from Ak leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N* *83*, 414–421.
- Hirsch, H.H., Knowles, W., Dickenmann, M., Passweg, J., Klimkait, T., Mihatsch, M.J., and Steiger, J. (2002). Prospective study of polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal-transplant recipients. *N. Engl. J. Med.* *347*, 488–496.
- Hron, T., Spanielová, H., Suchanová, J., and Forstová, J. (2013). The Cre/loxP recombination system for production of infectious mouse polyomavirus. *Virus Res.* *176*, 128–136.
- Chang, D., Haynes, J.I., Brady, J.N., and Consigli, R.A. (1992). The use of additive and subtractive approaches to examine the nuclear localization sequence of the polyomavirus major capsid protein VP1. *Virology* *189*, 821–827.
- Chang, S.S., Reuter, V.E., Heston, W.D., Bander, N.H., Grauer, L.S., and Gaudin, P.B. (1999). Five different anti-prostate-specific membrane antigen (PSMA) antibodies confirm PSMA expression in tumor-associated neovasculature. *Cancer Res.* *59*, 3192–3198.
- Chen, H., Zheng, X., Di, B., Wang, D., Zhang, Y., Xia, H., and Mao, Q. (2013). Aptamer modification improves the adenoviral transduction of malignant glioma cells. *J. Biotechnol.* *168*, 362–366.
- Chen, X.J.S., Stehle, T., and 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 J.* *17*, 3233–3240.
- Cho, C.F., Sourabh, S., Simpson, E.J., Steinmetz, N.F., Luyt, L.G., and Lewis, J.D. (2014). Molecular Targeted Viral Nanoparticles as Tools for Imaging Cancer. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *1108*, 211–230.
- Imperiale, M.J. (2001). Oncogenic transformation by the human polyomaviruses. *Oncogene* *20*, 7917.
- Israeli, R.S., Powell, C.T., Fair, W.R., and Heston, W.D.W. (1993). Molecular Cloning of a Complementary DNA Encoding a Prostate-specific Membrane Antigen. *Cancer Res.* *53*, 227–230.
- Jajesniak, P., and Wong, T.S. (2015). QuickStep-Cloning: a sequence-independent, ligation-free method for rapid construction of recombinant plasmids. *J. Biol. Eng.* *9*, 15.
- Jang, J.-H., Lim, K., and Schaffer, D.V. (2007). Library selection and directed evolution approaches to engineering targeted viral vectors. *Biotechnol. Bioeng.* *98*, 515–524.
- Jaunarena, J.H., Villamil, W., Martínez, P.F., Gueglio, G., and Giudice, C.R. (2016). The role of radical prostatectomy as an initial approach for the treatment of high-risk prostate cancer. *Actas Urol. Esp.* *40*, 353–360.
- Joern, J.M. (2003). DNA shuffling. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *231*, 85–89.
- Joern, J.M., Meinhold, P., and Arnold, F.H. (2002). Analysis of shuffled gene libraries1. *J. Mol. Biol.* *316*, 643–656.
- Kean, J.M., Rao, S., Wang, M., and Garcea, R.L. (2009). Seroepidemiology of Human Polyomaviruses. *PLoS Pathog* *5*, e1000363.

- Kelkar, S.S., and Reineke, T.M. (2011). Theranostics: combining imaging and therapy. *Bioconjug. Chem.* *22*, 1879–1903.
- Kipnis, Y., and Baker, D. (2012). Comparison of designed and randomly generated catalysts for simple chemical reactions. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* *21*, 1388–1395.
- Knipe, D.M., and Howley, P.M. (2007). *Fields' Virology* (Lippincott Williams & Wilkins).
- Kumar, A., and Singh, S. (2013). Directed evolution: tailoring biocatalysts for industrial applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* *33*, 365–378.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680–685.
- Lencer, W.I., and Tsai, B. (2003). The intracellular voyage of cholera toxin: going retro. *Trends Biochem. Sci.* *28*, 639–645.
- Lewis, J.D., Destito, G., Zijlstra, A., Gonzalez, M.J., Quigley, J.P., Manchester, M., and Stuhlmann, H. (2006). Viral nanoparticles as tools for intravital vascular imaging. *Nat. Med.* *12*, 354–360.
- Liddington, R.C., Yan, Y., Moulai, J., Sahli, R., Benjamin, T.L., and Harrison, S.C. (1991). Structure of simian virus 40 at 3.8-Å resolution. *Nature* *354*, 278–284.
- Liebl, D., Difato, F., Horníková, L., Mannová, P., Štokrová, J., and Forstová, J. (2006). Mouse Polyomavirus Enters Early Endosomes, Requires Their Acidic pH for Productive Infection, and Meets Transferrin Cargo in Rab11-Positive Endosomes. *J. Virol.* *80*, 4610–4622.
- Lilja, H., Ulmert, D., and Vickers, A.J. (2008). Prostate-specific antigen and prostate cancer: prediction, detection and monitoring. *Nat. Rev. Cancer* *8*, 268–278.
- Lilley, B.N., Gilbert, J.M., Ploegh, H.L., and Benjamin, T.L. (2006). Murine Polyomavirus Requires the Endoplasmic Reticulum Protein Derlin-2 To Initiate Infection. *J. Virol.* *80*, 8739–8744.
- Low, J.A., Magnuson, B., Tsai, B., and Imperiale, M.J. (2006). Identification of gangliosides GD1b and GT1b as receptors for BK virus. *J. Virol.* *80*, 1361–1366.
- Lupold, S.E., and Rodriguez, R. (2004). Disulfide-constrained peptides that bind to the extracellular portion of the prostate-specific membrane antigen. *Mol. Cancer Ther.* *3*, 597–603.
- Magaldi, T.G., Buch, M.H.C., Murata, H., Erickson, K.D., Neu, U., Garcea, R.L., Peden, K., Stehle, T., and DiMaio, D. (2012). Mutations in the GM1 Binding Site of Simian Virus 40 VP1 Alter Receptor Usage and Cell Tropism. *J. Virol.* *86*, 7028–7042.
- Magnuson, B., Rainey, E.K., Benjamin, T., Baryshev, M., Mkrtchian, S., and Tsai, B. (2005). ERp29 triggers a conformational change in polyomavirus to stimulate membrane binding. *Mol. Cell* *20*, 289–300.
- Mahy, B.W.J., Türler, H., and Beard, P. (1985). Simian virus 40 and polyoma virus: growth, titration, transformation and purification of viral components. *Viol. Pract. Approach* 169–192.
- Mannová, P., and Forstová, J. (2003). Mouse Polyomavirus Utilizes Recycling Endosomes for a Traffic Pathway Independent of COPI Vesicle Transport. *J. Virol.* *77*, 1672–1681.
- Meyer, A.J., Ellefson, J., and Ellington, A.D. (2014). Library Generation by Gene Shuffling. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* Ed. Frederick M Ausubel Al *105*, Unit-15.12.
- Mezes, B., and Amati, P. (1994). Mutations of polyomavirus VP1 allow in vitro growth in undifferentiated cells and modify in vivo tissue replication specificity. *J. Virol.* *68*, 1196–1199.

- Mhawech-Fauceglia, P., Zhang, S., Terracciano, L., Sauter, G., Chadhuri, A., Herrmann, F.R., and Penetrante, R. (2007). Prostate-specific membrane antigen (PSMA) protein expression in normal and neoplastic tissues and its sensitivity and specificity in prostate adenocarcinoma: an immunohistochemical study using multiple tumour tissue microarray technique. *Histopathology* *50*, 472–483.
- Miyagi, T., Wada, T., Yamaguchi, K., and Hata, K. (2004). Sialidase and malignancy: a minireview. *Glycoconj. J.* *20*, 189–198.
- Miyagi, T., Wada, T., Yamaguchi, K., Hata, K., and Shiozaki, K. (2008). Plasma membrane-associated sialidase as a crucial regulator of transmembrane signalling. *J. Biochem. (Tokyo)* *144*, 279–285.
- Montross, L., Watkins, S., Moreland, R.B., Mamon, H., Caspar, D.L., and Garcea, R.L. (1991). Nuclear assembly of polyomavirus capsids in insect cells expressing the major capsid protein VP1. *J. Virol.* *65*, 4991–4998.
- Moon, S.-H., Yang, B.Y., Lee, Y.-S., Lee, D.S., Chung, J.-K., and Jeong, J.M. (2014). Development of a PSMA targeting nanoparticle as PET/MR multimodal imaging probe. *Nucl. Med. Biol.* *41*, 630.
- Moreland, R.B., Montross, L., and Garcea, R.L. (1991). Characterization of the DNA-binding properties of the polyomavirus capsid protein VP1. *J. Virol.* *65*, 1168–1176.
- Munkley, J., Mills, I.G., and Elliott, D.J. (2016). The role of glycans in the development and progression of prostate cancer. *Nat. Rev. Urol.* *13*, 324–333.
- Nakanishi, A., Chapellier, B., Maekawa, N., Hiramoto, M., Kuge, T., Takahashi, R., Handa, H., and Imai, T. (2008). SV40 vectors carrying minimal sequence of viral origin with exchangeable capsids. *Virology* *379*, 110–117.
- Neu, U., Stehle, T., and Atwood, W.J. (2009). The Polyomaviridae: Contributions of virus structure to our understanding of virus receptors and infectious entry. *Virology* *384*, 389–399.
- Neu, U., Bauer, J., and Stehle, T. (2011). Viruses and sialic acids: rules of engagement. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *21*, 610–618.
- Neu, U., Allen, S.A., Blaum, B.S., Liu, Y., Frank, M., Palma, A.S., Stroeh, L.J., Feizi, T., Peters, T., Atwood, W.J., et al. (2013). A Structure-Guided Mutation in the Major Capsid Protein Retargets BK Polyomavirus. *Plos Pathog.* *9*, e1003688.
- Oh, P., Li, Y., Yu, J., Durr, E., Krasinska, K.M., Carver, L.A., Testa, J.E., and Schnitzer, J.E. (2004). Subtractive proteomic mapping of the endothelial surface in lung and solid tumours for tissue-specific therapy. *Nature* *429*, 629–635.
- Owada, T., Miyashita, Y., Motomura, T., Onishi, M., Yamashita, S., and Yamamoto, N. (1998). Enhancement of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection via increased membrane fluidity by a cationic polymer. *Microbiol. Immunol.* *42*, 97–107.
- Padgett, B.L., Walker, D.L., ZuRhein, G.M., Eckroade, R.J., and Dessel, B.H. (1971). Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *Lancet Lond. Engl.* *1*, 1257–1260.
- Pastrana, D.V., Tolstov, Y.L., Becker, J.C., Moore, P.S., Chang, Y., and Buck, C.B. (2009). Quantitation of human seroresponsiveness to Merkel cell polyomavirus. *PLoS Pathog.* *5*, e1000578.

- Pelkmans, L., Kartenbeck, J., and 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.
- Perabo, L., Büning, H., Kofler, D.M., Ried, M.U., Girod, A., Wendtner, C.M., Enssle, J., and Hallek, M. (2003). In Vitro Selection of Viral Vectors with Modified Tropism: The Adeno-associated Virus Display. *Mol. Ther.* *8*, 151–157.
- Pfestroff, A., Luster, M., Jilg, C.A., Olbert, P.J., Ohlmann, C.H., Lassmann, M., Maecke, H.R., Ezziddin, S., Bodei, L., and Radionuclide Therapy Committee of the European Association of Nuclear Medicine (2015). Current status and future perspectives of PSMA-targeted therapy in Europe: opportunity knocks. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* *42*, 1971–1975.
- Polyomaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Calvignac-Spencer, S., Feltkamp, M.C.W., Daugherty, M.D., Moens, U., Ramqvist, T., Johne, R., and Ehlers, B. (2016). A taxonomy update for the family Polyomaviridae. *Arch. Virol.* *161*, 1739–1750.
- Qian, M., and Tsai, B. (2010). Lipids and Proteins Act in Opposing Manners To Regulate Polyomavirus Infection. *J. Virol.* *84*, 9840–9852.
- Qian, M., Cai, D., Verhey, K.J., and Tsai, B. (2009). A Lipid Receptor Sorts Polyomavirus from the Endolysosome to the Endoplasmic Reticulum to Cause Infection. *PLOS Pathog* *5*, e1000465.
- Qiu, C., De Young, M.B., Finn, A., and Dichek, D.A. (1998). Cationic liposomes enhance adenovirus entry via a pathway independent of the fiber receptor and alpha(v)-integrins. *Hum. Gene Ther.* *9*, 507–520.
- Rainey-Barger, E.K., Magnuson, B., and Tsai, B. (2007). A Chaperone-Activated Nonenveloped Virus Perforates the Physiologically Relevant Endoplasmic Reticulum Membrane. *J. Virol.* *81*, 12996–13004.
- Ravindranath, M.H., Muthugounder, S., Presser, N., Selvan, S.R., Portoukalian, J., Brosman, S., and Morton, D.L. (2004). Gangliosides of organ-confined versus metastatic androgen-receptor-negative prostate cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *324*, 154–165.
- Ravindranath, M.H., Muthugounder, S., Presser, N., Ye, X., Brosman, S., and Morton, D.L. (2005). Endogenous immune response to gangliosides in patients with confined prostate cancer. *Int. J. Cancer* *116*, 368–377.
- Richterová, Z., Liebl, D., Horák, M., Palková, Z., Štokrová, J., Hozák, P., Korb, J., and 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.
- Rietbergen, J.B., Kruger, A.E., Kranse, R., and Schröder, F.H. (1997). Complications of transrectal ultrasound-guided systematic sextant biopsies of the prostate: evaluation of complication rates and risk factors within a population-based screening program. *Urology* *49*, 875–880.
- Robinson, M.B., Blakely, R.D., Couto, R., and Coyle, J.T. (1987). Hydrolysis of the brain dipeptide N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamate. Identification and characterization of a novel N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase activity from rat brain. *J. Biol. Chem.* *262*, 14498–14506.
- Roitman-Shemer, V., Stokrova, J., Forstova, J., and Oppenheim, A. (2007). Assemblages of simian virus 40 capsid proteins and viral DNA visualized by electron microscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *353*, 424–430.

- Salunke, D.M., Caspar, D.L., and Garcea, R.L. (1986). Self-assembly of purified polyomavirus capsid protein VP1. *Cell* **46**, 895–904.
- Schröder, F.H., Hugosson, J., Roobol, M.J., Tammela, T.L.J., Ciatto, S., Nelen, V., Kwiatkowski, M., Lujan, M., Lilja, H., Zappa, M., et al. (2009). Screening and prostate-cancer mortality in a randomized European study. *N. Engl. J. Med.* **360**, 1320–1328.
- Schwarzmann, G. (2001). Uptake and metabolism of exogenous glycosphingolipids by cultured cells. *Semin. Cell Dev. Biol.* **12**, 163–171.
- Shobana, R., Samal, S.K., and Elankumaran, S. (2013). Prostate-specific antigen-retargeted recombinant newcastle disease virus for prostate cancer virotherapy. *J. Virol.* **87**, 3792–3800.
- Silver, D.A., Pellicer, I., Fair, W.R., Heston, W.D., and Cordon-Cardo, C. (1997). Prostate-specific membrane antigen expression in normal and malignant human tissues. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **3**, 81–85.
- Skerra, A. (2007). Alternative non-antibody scaffolds for molecular recognition. *Curr. Opin. Biotechnol.* **18**, 295–304.
- Smith, G.P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **228**, 1315–1317.
- Smith, A.E., Lilie, H., and Helenius, A. (2003). Ganglioside-dependent cell attachment and endocytosis of murine polyomavirus-like particles. *FEBS Lett.* **555**, 199–203.
- Šroller, V., Hamšíková, E., Ludvíková, V., Vochozková, P., Kojzarová, M., Fraiberk, M., Saláková, M., Morávková, A., Forstová, J., and Němečková, Š. (2013). Seroprevalence rates of BKV, JCV, and MCPyV polyomaviruses in the general Czech Republic population. *J. Med. Virol.* **86**, 1560–1568
- Stehle, T., and Harrison, S.C. (1996). Crystal structures of murine polyomavirus in complex with straight-chain and branched-chain sialyloligosaccharide receptor fragments. *Struct. Lond. Engl.* **1993** **4**, 183–194.
- Steinmetz, N.F. (2010). Viral nanoparticles as platforms for next-generation therapeutics and imaging devices. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **6**, 634–641.
- Stemmer, W. (1994a). Dna Shuffling by Random Fragmentation and Reassembly - in-Vitro Recombination for Molecular Evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 10747–10751.
- Stemmer, W.P.C. (1994b). Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature* **370**, 389–391.
- Štokrová, J., Palková, Z., Fischer, L., Richterová, Z., Korb, J., Griffin, B.E., and Forstová, J. (1999). Interactions of heterologous DNA with polyomavirus major structural protein, VP1. *FEBS Lett.* **445**, 119–125.
- Suchanová, J. (2012): Cílení umělých virových partikulí polyomaviru na buňky nádoru prostaty. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Praha.
- Sutherland, M., Gordon, A., Shnyder, S.D., Patterson, L.H., and Sheldrake, H.M. (2012). RGD-Binding Integrins in Prostate Cancer: Expression Patterns and Therapeutic Prospects against Bone Metastasis. *Cancers* **4**, 1106–1146.
- Sweet, B.H., and Hilleman, M.R. (1960). The vacuolating virus, S.V. 40. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N* **105**, 420–427.

- Swimm, A.I., Bornmann, W., Jiang, M., Imperiale, M.J., Lukacher, A.E., and Kalman, D. (2010). Abl Family Tyrosine Kinases Regulate Sialylated Ganglioside Receptors for Polyomavirus. *J. Virol.* *84*, 4243–4251.
- Teunissen, E.A. (2014). Towards the directed evolution of virus-like particles derived from polyomaviruses.
- Tsai, B., Gilbert, J.M., Stehle, T., Lencer, W., Benjamin, T.L., and Rapoport, T.A. (2003). Gangliosides are receptors for murine polyoma virus and SV40. *Embo J.* *22*, 4346–4355.
- Tykvart, J., Schimer, J., Bařinková, J., Pachel, P., Pořtová-Slavětínská, L., Majer, P., Konvalinka, J., and Šácha, P. (2014). Rational design of urea-based glutamate carboxypeptidase II (GCPII) inhibitors as versatile tools for specific drug targeting and delivery. *Bioorg. Med. Chem.* *22*, 4099–4108.
- Vaillant, O., El Cheikh, K., Warther, D., Brevet, D., Maynadier, M., Bouffard, E., Salgues, F., Jeanjean, A., Puche, P., Mazerolles, C., et al. (2015). Mannose-6-phosphate receptor: a target for theranostics of prostate cancer. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* *54*, 5952–5956.
- Vilner, B.J., John, C.S., and Bowen, W.D. (1995). Sigma-1 and sigma-2 receptors are expressed in a wide variety of human and rodent tumor cell lines. *Cancer Res.* *55*, 408–413.
- Walczak, M.A., and Danishefsky, S.J. (2012). Solving the Convergence Problem in the Synthesis of Triantennary N -Glycan Relevant to Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA). *J. Am. Chem. Soc.* *134*, 16430–16433.
- Wallis, C.J.D., Saskin, R., Choo, R., Herschorn, S., Kodama, R.T., Satkunasivam, R., Shah, P.S., Danjoux, C., and Nam, R.K. (2016). Surgery Versus Radiotherapy for Clinically-localized Prostate Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Eur. Urol.* *70*, 21–30.
- Wang, X., Raulji, P., Mohapatra, S.S., Patel, R., Hellermann, G., Kong, X., Vera, P.L., Meyer-Siegler, K.L., Coppola, D., and Mohapatra, S. (2011). Natriuretic peptide receptor a as a novel target for prostate cancer. *Mol. Cancer* *10*, 56.
- Welch, H.G., and Black, W.C. (2010). Overdiagnosis in Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* *102*, 605–613.
- Wilson, D.S., and Keefe, A.D. (2001). Random mutagenesis by PCR. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* Ed. Frederick M Ausubel Al *Chapter 8*, Unit8.3.
- Yao, V., Berkman, C.E., Choi, J.K., O'Keefe, D.S., and Bacich, D.J. (2010). Expression of prostate-specific membrane antigen (PSMA), increases cell folate uptake and proliferation and suggests a novel role for PSMA in the uptake of the non-polyglutamated folate, folic acid. *The Prostate* *70*, 305–316.
- Yarden, Y. (2001). Biology of HER2 and its importance in breast cancer. *Oncology* *61*, 1–13.
- Yokoyama, N., Kawano, M., Tsukamoto, H., Enomoto, T., Inoue, T., Takahashi, R., Nakanishi, A., Imai, T., Wada, T., and Handa, H. (2007). Mutational analysis of the carboxyl-terminal region of the SV40 major capsid protein VP1. *J. Biochem. (Tokyo)* *141*, 279–286.
- You, J., O'Hara, S.D., Velupillai, P., Castle, S., Levery, S., Garcea, R.L., and Benjamin, T. (2015). Ganglioside and Non-ganglioside Mediated Host Responses to the Mouse Polyomavirus. *PLoS Pathog.* *11*. e1005175
- Zaccolo, M., and Gherardi, E. (1999). The effect of high-frequency random mutagenesis on in vitro protein evolution: a study on TEM-1 beta-lactamase. *J. Mol. Biol.* *285*, 775–783.

Zhao, J., Kardashliev, T., Joëlle Ruff, A., Bocola, M., and Schwaneberg, U. (2014). Lessons from diversity of directed evolution experiments by an analysis of 3,000 mutations. *Biotechnol. Bioeng.* *111*, 2380–2389.

Zhao, L.-Y., Mao, X.-P., Chao, K.-Y., Guo, S.-J., and Qiu, S.-P. (2012). Prostate-specific membrane antigen can promote in vivo osseous metastasis of prostate cancer cells in mice. *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Médicas E Biológicas Soc. Bras. Biofísica A1* *45*, 737–745.

Zhu, B., Cai, G., Hall, E.O., and Freeman, G.J. (2007). In-fusion assembly: seamless engineering of multidomain fusion proteins, modular vectors, and mutations. *BioTechniques* *43*, 354–359.

9 PŘÍLOHY PRÁCE

Tab. S1. Tabulka míry identity nukleotidových sekvencí VP1 genů užívaných pro reakci „DNA shuffling“ (uvedeno v %). Autor analýzy: J. Žáčková Suchanová.

SV40	BK virus	JC virus	MCPyV	
64	65	66	64	mPyV
	79	75	65	SV40
		76	67	BK virus
			64	JC virus