

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

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



**Bc. Barbora Vinšová**

**MINORITNÍ STRUKTURNÍ PROTEINY POLYOMAVIRŮ:  
VLASTNOSTI A INTERAKCE S BUNĚČNÝMI STRUKTURAMI**

**MINOR STRUCTURAL PROTEINS OF POLYOMAVIRUSES:  
ATTRIBUTES AND INTERACTIONS WITH CELLULAR STRUCTURES**

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: RNDr. Lenka Horníková, Ph.D.

Praha, 2016

Prohlášení:

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

V Praze, 13. 8. 2016

Podpis

Tato práce vznikla v letech 2014 - 2016 za finanční podpory Grantové agentury České republiky, projekt P302/13-26115S a Evropského fondu pro regionální rozvoj - projekt BIOCEV (CZ.1.05/1.1.00/02.0109).

Na tomto místě bych chtěla velice poděkovat své školitelce **RNDr. Lence Horníkové, Ph.D.** za vedení mé diplomové práce, za její cenné rady a doporučení, bezmeznou ochotu a trpělivost po celou dobu mého působení v laboratoři i během sepisování této práce. Děkuji také vedoucí laboratoře paní **Doc. RNDr. Jitce Forstové, CSc.** za přijetí do kolektivu Laboratoře molekulární virologie a možnost práce jak na Přírodovědecké fakultě, tak v centru BIOCEV. Ráda bych poděkovala **Mgr. Martinu Fraiberkovi** za ochotu a laskavost, se kterou mě zejména v prvním roce mé práce v laboratoři provedl metodami molekulární biologie. **Mgr. Martinu Fraiberkovi** děkuji také za zhotovení elektronmikroskopických snímků a za psychickou podporu v obdobích neúspěšných experimentů. Děkuji i všem členům Laboratoře molekulární virologie za vytvoření příjemného a přátelského pracovního prostředí. Děkuji také **Mgr. Michalu Sýkorovi** za korekce textu a četné připomínky a doporučení k této diplomové práci. Děkuji také mé milující rodině za psychickou i materiální podporu po celou dobu mého studia na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy. V neposlední řadě děkuji také svému příteli za podporu a motivaci k dopsání této diplomové práce.

## Abstrakt

I když jsou polyomaviry intenzivně zkoumány více než 60 let, stále není dostatečně objasněna role minoritních strukturních proteinů VP2 a VP3 v některých důležitých krocích životního cyklu viru, a to zejména jejich úloha při dopravení virového genomu do jádra a také jejich zapojení v pozdní fázi životního cyklu viru. Tato diplomová práce je zaměřena na studium minoritních proteinů Myšího polyomaviru (MPyV) a lidského polyomaviru BK (BKV). V rámci této práce byly připraveny čtyři králičí polyklonální protilátky proti minoritním proteinům virů MPyV nebo BKV. Dvě připravené protilátky jsou namířeny proti minoritním proteinům MPyV ( $\alpha$ -MPyV VP2/3) nebo BKV viru ( $\alpha$ -BKV VP2/3) a další dvě připravené protilátky rozeznávají společnou C-koncovou sekvenci minoritních proteinů VP2 a VP3 MPyV ( $\alpha$ -MPyV C-termVP2/3) nebo BKV viru ( $\alpha$ -BKV C-termVP2/3). V druhé části práce jsme se zaměřili na studium toxicity minoritních proteinů polyomaviru BKV při jejich samostatné produkci v savčích buňkách. Získaná data naznačují, že v porovnání s minoritními proteiny VP2 a VP3 viru MPyV, nevykazují minoritní proteiny BKV viru tak vysokou míru cytotoxicity. Třetí část práce je věnována studiu interakcí minoritních proteinů polyomavirů BKV a MPyV s buněčnými proteiny a mezi sebou navzájem. Pomocí připravených protilátek byly detekovány makromolekulární komplexy minoritních proteinů v lyzátech buněk transientně produkujících minoritní proteiny viru BKV nebo MPyV. Tyto komplexy jsme se pokusili charakterizovat za využití metody modré nativní proteinové elektroforézy. Výsledky naznačují, že jeden z identifikovaných proteinových komplexů by mohl obsahovat jak minoritní proteiny BKV viru, tak buněčný chaperon Hsp 70. Detailnější analýza těchto komplexů však nebyla možná z důvodu jejich malého zastoupení ve vzorku. Proto byly připraveny vektory umožňující expresi minoritních proteinů MPyV nebo BKV viru fúzaných na jejich C-konci s capTEV značkou. Značka capTEV je při produkci těchto fúzních proteinů v savčích buňkách *in vivo* biotinylovaná a umožňuje následnou izolaci fúzního proteinu tandemovou afinitní chromatografií. Přestože připravené expresní vektory obsahují i sekvence pro stabilizaci mRNA vloženého genu, nedocházelo v savčích buňkách k detekovatelné expresi fúzních minoritních proteinů MPyV ani BKV viru. Pro další využití budou muset být tyto vektory ještě upraveny. Do budoucna plánujeme charakterizovat interakce minoritních proteinů obou polyomavirů také v komplexech vznikajících při ko-expresi minoritního proteinu a hlavního kapsidového proteinu VP1 fúzaného s capTEV značkou. Tímto způsobem by mohly být odhaleny buněčné proteiny interagující s celým komplexem pentameru, základní stavební jednotkou virové kapsidy.

**Klíčová slova:** polyomavirus, Myší polyomavirus, BK virus, minoritní strukturní proteiny, VP2, VP3

## Abstract

Even though polyomaviruses have been intensively studied for more than 60 years, the role of minor structural proteins VP2 and VP3 in some important steps of viral life cycle has still not been fully elucidated, explicitly their role in viral genome delivery to the cell nucleus and their involvement in late phases of viral life cycle. This diploma thesis focuses on the study of minor proteins of Mouse polyomavirus (MPyV) and Human polyomavirus BK (BKV). Four rabbit polyclonal antibodies against minor proteins of polyomaviruses MPyV or BKV have been prepared within this diploma thesis. Two of these prepared antibodies target minor proteins of MPyV ( $\alpha$ -MPyV VP2/3) or BKV virus ( $\alpha$ -BKV VP2/3), other two prepared antibodies recognize C-terminal sequence common to minor proteins VP2 and VP3 of MPyV ( $\alpha$ -MPyV C-termVP2/3) or BKV virus ( $\alpha$ -BKV C-termVP2/3). In the second part of this diploma thesis we aimed to study toxicity of BKV virus minor proteins during individual production in mammalian cells. Obtained results suggest that minor proteins of BKV virus might not exhibit as high levels of cytotoxicity as minor proteins of MPyV virus. Third part of this diploma thesis is devoted to investigation of interactions of BKV and MPyV minor proteins with cellular proteins and within one another respectively. Macromolecular complexes of minor proteins were detected in lysates of mammalian cells transiently expressing minor proteins of MPyV or BKV viruses using prepared antibodies. We attempted to further characterize these complexes with the use of Blue-Native Protein Electrophoresis. Obtained results suggest that one of the identified complexes could contain both, minor proteins of BKV virus and cellular chaperon Hsp 70. Further analysis of these complexes was though not possible due to low proportion of complexes in cell lysate samples. Therefore, vectors for expression of MPyV or BKV minor proteins with C-terminal fusion tag capTEV were prepared. During production of fusion proteins in mammalian cells the capTEV tag is naturally biotinylated *in vivo* and enables isolation of fusion proteins by tandem affinity purification system. Although prepared vectors contain sequences for stabilization of mRNA transcripts from inserted gene, production of fusion minor proteins of MPyV nor BKV was detectable in mammalian cells. These vectors will though have to be adjusted for further use. Our future plan is to characterize interactions of both polyomaviral minor proteins in complexes formed during co-expression of minor protein and major capsid protein VP1 fused with capTEV tag. In this manner the cellular proteins interacting with the elementary building unit of viral capsid - whole complex of VP1 pentamer and minor protein could be revealed.

**Key words:** polyomavirus, Mouse polyomavirus, BK virus, minor structural proteins, VP2, VP3

## Seznam zkratek

3D struktura	tří dimenzionální struktura
$\alpha$ -SNAP	$\alpha$ -Soluble NSF ( <i>N</i> -ethylmaleimide sensitive fusion protein) Attachment Protein
A	alanin
Å	Angström ( $10^{-10}$ m)
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonát)
AP3	adaptorový proteinový komplex 3
BAP31	protein 31 asociovaný s receptorem B-lymfocytů (B-cell receptor associated protein 31)
BiP (též GRP78, Hsp 70)	chaperon endoplazmatického retikula (binding immunoglobulin protein)
Bis Tris	2,2-Bis(hydroxymethyl)-2,2',2''-nitrilotriethanol 2-Bis(2-hydroxyethyl)amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl) methan
BKV	Lidský polyomavirus BK
BN-PAGE	modrá nativní polyakrylamidová gelová elektroforéza (Blue native PAGE)
bp	páry (nukleotidových) bazí
BSA	bovinní sérový albumin
COPI	specifický plášťový proteinový komplex 1 (coat protein I)
DAP3	$\delta$ podjednotka adaptorového proteinového komplexu 3
DAPI	4',6-diamidino-2-fenylindol dihydrochlorid
ddH <sub>2</sub> O	demineralizovaná destilovaná voda
dH <sub>2</sub> O	destilovaná voda
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleotidová kyselina
ds DNA	dvouřetězcová DNA
DTT	1,4-dithiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	kyselina ethylendiaminotetraoctová
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ER	endoplazmatické retikulum
ERAD dráha	degradační dráha spojená s endoplazmatickým retikulem
ERp-29	protein endoplazmatického retikula 29 (endoplasmic reticulum protein 29)
EtBr	ethidium bromid
FBS	fetální bovinní sérum
GD1a/b	disialotetrahexosylgangliosid 1 a/b
GFP	zelený fluorescenční protein (green fluorescent protein)
GM1	monosialotetrahexosylgangliosid 1
GT1a/b	trisialotetrahexosylgangliosid 1 a/b
HLA antigen	antigen bílých krvinek (human leukocyte antigen)
HRP	křenová peroxidáza (horseradish peroxidase)
HRPTEC	lidské epiteliální buňky ledvinných vinutých kanálek (Human renal proximal tubular epithelial cells)
Hsc 70	příbuzný protein teplotního šoku 70 (heat shock cognate protein 70)
Hsp 70	protein teplotního šoku 70 (heat shock protein 70)
ICTV	Mezinárodní komise pro taxonomii virů (International Committee on Taxonomy of Viruses)
IF	Imunofluorescence
JCV	Lidský polyomavirus JC
KAc	octan draselný
kDa	kilodalton
KLH	keyhole limpet hemocyanin protein

L	leucin
LB médium	Lurita-Bertani médium
LDH	laktát dehydrogenáza
M	marker molekulových hmotností
MCPyV	Polyomavirus karcinomu Merkelových buněk
MPyV	Myší polyomavirus
mRNA	mesengerová/mediátorová RNA
NK	negativní kontrola
N/C-konec	amino/karboxy konec
NES	jaderný exportní signál
NLS	jaderný lokalizační signál
NMR	nukleární magnetická rezonance
OD	optická denzita
PAA	polyakrylamid
PBS	fosfátový pufr (phosphate buffered saline)
PBS-TK	fosfátový pufr pro tkáňové kultury
PCR	polymerázová řetězová reakce
PCNA	jaderný antigen dělících se buněk (Proliferating cell nuclear antigen)
PDI	protein disulfid-izomeráza
PML	progresivní multifokální leukoencefalopatie
PMSF	fenylmethylsulfonyl fluorid
pre-mRNA	prekurzorová mRNA
PTA	kyselina fosfowolframová
PVDF	polyviniliden difluorid
RNA	ribonukleová kyselina
rpm	otáčky za minutu (rotations per minute)
RPMI médium	Roswell Park Memorial Institute médium
SDS	dodecylsulfát sodný
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
SV40	Opičí virus 40 (Simian vacuolating virus 40)
T/t-antigen	velký/malý tumorový antigen
TK	tkáňové kultury
TM	transmembránový
Tris	tris(hydroxymethyl) aminomethan
U	jednotka
VLPs	Částice podobné viru (Virus-like particles)
VP1/2/3	Virový kapsidový protein 1/2/3 (viral protein)
VP4	Virový protein 4
WB	Western blot



# Obsah

1. Úvod .....	9
2. Literární přehled.....	10
2.1. Polyomaviry .....	10
2.2. Struktura virionu polyomavirů.....	12
2.3. Myší polyomavirus.....	14
2.3.1. Organizace genomu.....	14
2.3.2. Životní cyklus viru .....	15
2.4. Lidský polyomavirus BK .....	17
2.4.1. Organizace genomu.....	17
2.4.2. Životní cyklus viru .....	18
2.5. Strukturální proteiny polyomavirů se zaměřením na BKV a MPyV .....	19
2.5.1. Hlavní kapsidový protein VP1 .....	19
2.5.2. Minoritní kapsidové proteiny VP2 a VP3 .....	21
2.6. Viroporiny .....	24
2.7. Proteiny polyomavirů s viroporinovými vlastnostmi .....	26
2.7.1. Opičí polyomavirus SV40.....	26
2.7.2. Lidský polyomavirus JC.....	29
3. Cíle práce.....	32
4. Materiál a metody.....	33
4.1. Bakteriální kmeny .....	33
4.2. Buněčné linie.....	33
4.3. Rekombinantní bakuloviry .....	33
4.4. Vektory.....	33
4.5. DNA primery.....	35
4.6. Markery molekulových hmotností .....	36
4.7. Protilátky .....	37
4.7.1. Primární protilátky .....	37
4.7.2. Sekundární protilátky .....	37
4.8. Kultivační média .....	38
4.8.1. Bakteriální kultivační média .....	38
4.8.2. Kultivační média pro savčí buňky.....	38
4.9. Použitá selekční antibiotika.....	38
4.10. Sterilizace materiálu a roztoků.....	39
4.11. Práce s bakteriemi .....	39
4.11.1. Kultivace bakterií na agarových plotnách.....	39
4.11.2. Kultivace bakterií v suspenzi .....	39
4.11.3. Příprava kompetentních bakterií pro elektroporaci .....	39
4.11.4. Transformace elektrokompetentních bakterií elektroporací.....	40
4.11.5. Transformace chemicky kompetentních bakterií tepelným šokem .....	40
4.11.6. Uchovávaní bakterií .....	40
4.12. Práce s DNA.....	41
4.12.1. Izolace vektorů komerčními soupravami .....	41
4.12.2. Minipreparace vektorů alkalickou metodou.....	41
4.12.3. Agarózová DNA elektroforéza.....	41
4.12.4. Izolace DNA z gelu .....	42
4.12.5. Restrikční štěpení .....	42

4.12.6. Ligace .....	42
4.12.7. Amplifikace DNA fragmentů polymerázovou řetězovou reakcí (PCR).....	42
4.12.8. Sekvence DNA .....	43
4.12.9. Stanovení koncentrace DNA .....	43
4.12.10. TOPO® klonování.....	43
4.13. Práce s buněčnými kulturami .....	44
4.13.1. Pasážování buněk .....	44
4.13.2. Infekce hmyzích buněk <i>Sf9</i> bakulovirovým inokulem .....	44
4.13.3. Transfekce savčích buněk.....	45
4.13.1. Fixování buněk na mikroskopických sklíčkách.....	46
4.13.2. Nepřímá imunofluorescenční detekce proteinů v buňkách .....	46
4.13.3. Izolace částic podobných viru z hmyzích buněk <i>Sf9</i> .....	46
4.13.4. Negativní barvení preparátů pro elektronovou mikroskopii.....	47
4.13.5. Hemaglutinační test .....	47
4.13.6. Test cytotoxicity minoritních proteinů .....	47
4.14. Práce s Proteiny .....	49
4.14.1. Lyze buněk .....	49
4.14.2. Test rozpustnosti proteinů pro nativní proteinovou elektroforézu.....	49
4.14.3. Měření koncentrace proteinů podle Bradfordové.....	50
4.14.4. Denaturační proteinová elektroforéza SDS-PAGE .....	50
4.14.5. Modrá nativní proteinová elektroforéza Blue Native PAGE (BN-PAGE).....	51
4.14.6. Fixace a barvení polyakrylamidových gelů.....	51
4.14.7. Imobilizace proteinů na membráně .....	51
4.14.8. Imunodetekce proteinů imobilizovaných na membráně.....	52
4.14.9. Odmytí protilátek z membrány pro detekci dalšího antigenu.....	53
4.14.10. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA test) .....	53
4.14.11. Chemické zesíťování proteinů (crosslinking).....	54
4.14.12. Vytipování peptidu pro přípravu protilátky proti C-terminální oblasti minoritních proteinů MPyV a BKV .....	54
4.14.13. Příprava materiálu pro imunizaci králíků k výrobě polyklonální protilátky .....	54
5. Výsledky.....	56
5.1. Příprava a ověření specifických protilátek proti minoritním proteinům MPyV a BKV.....	56
5.1.1. Ověření funkčnosti a specifity protilátek proti C-terminálnímu peptidu minoritních proteinů MPyV a BKV.....	56
5.1.2. Příprava antigenu pro produkci nových polyklonálních protilátek .....	58
5.1.3. Ověření funkčnosti a specifity nových polyklonálních protilátek .....	60
5.2. Porovnání cytotoxicity minoritních proteinů MPyV a BKV .....	61
5.3. Studium interakcí minoritních proteinů MPyV a BKV.....	64
5.3.1. Detekce minoritních proteinů v makromolekulárních komplexech po chemickém zesíťování proteinů .....	64
5.3.2. Sledování nativních proteinových komplexů metodou BN-PAGE .....	65
5.3.3. Příprava expresních vektorů pro studium interakcí minoritních proteinů.....	69
5.3.4. Příprava vektorů pro sledování lokalizace minoritních proteinů BKV .....	77
6. Diskuze.....	81
6.1. Příprava specifických protilátek proti minoritním proteinům MPyV a BKV .....	81
6.2. Porovnání míry cytotoxicity minoritních proteinů MPyV a BKV .....	83
6.3. Studium tvorby komplexů a interakcí a minoritních proteinů MPyV a BKV .....	85
7. Závěr .....	89
8. Seznam použité literatury .....	90
9. Přílohy .....	98

## 1. Úvod

Již od padesátých let dvacátého století, kdy byly objeveny první polyomaviry, přináší studium polyomavirů důležité poznatky v různých oblastech vědy. Přes počáteční problémy s kultivací v buněčných kulturách nakonec modelové polyomaviry SV40 a Myší polyomavirus (MPyV) i díky malé velikosti svých genomů posloužily k objasnění mnoha dějů v oblastech virologie, buněčné a molekulární biologie či onkogeneze. Pozornost vědecké komunity polyomaviry přitahují dodnes, a to zejména kvůli objevení několika patogenních zástupců infikujících člověka, schopnosti polyomavirů vyvolávat nádorové bujení či jejich potenciálnímu využití v genové terapii a dopravování terapeutických látek do buněk. Infekce polyomaviry bývá zpravidla bezpříznaková, u imunosuprimovaných jedinců však může způsobovat závažná onemocnění, často fatální. V dnešní době se s rozvojem autoimunitních onemocnění i jinak neškodné polyomaviry stávají pro člověka určitou hrozbou.

Objev lidského polyomaviru karcinomu Merkelových buněk (MCPyV), jenž je schopen u imunosuprimovaných pacientů vyvolat závažnou formu rakoviny kůže, na důležitost výzkumu polyomavirů upozornil v roce 2008. Vzhledem k potížím spojeným s jeho kultivací v tkáňových kulturách však vzrostl zájem právě o snadno kultivovatelné modelové polyomaviry MPyV a SV40. Přestože jsou tyto polyomaviry známy již přes šedesát let, a i přes intenzivní výzkum zůstávají některé oblasti jejich životního cyklu či buněčných interakcí stále neobjasněny. Základní výzkum modelových polyomavirů nám pomáhá pochopit principy fungování celé čeledi *Polyomaviridae*, ať už se jedná o počáteční interakce viru s buněčnými receptory, pohyb viru uvnitř buňky, rozbalení kapsid a transport virového genomu do buněčného jádra, pomnožení viru v buňce či šíření polyomavirové infekce v organismu. Všechny tyto informace pak tvoří základnu aplikovaného výzkumu, jenž se snaží virové infekci zabránit, zpomalit ji či ji úplně zastavit a v neposlední řadě se pokouší také využít objevené virové mechanismy ve prospěch člověka.

Velmi užitečnou vlastností polyomavirového hlavního kapsidového proteinu VP1 (viral protein 1) je z tohoto hlediska jeho schopnost samo-uspořádat se do částic podobných viru (virus-like particles, VLPs) *in vivo* i *in vitro*, a to i za nepřítomnosti virové DNA. Tyto virové částice mají potenciál stát se molekulárními nástroji moderní medicíny, ať už např. k dopravě kontrastních látek při diagnostice různých onemocnění nebo k dopravě terapeutických látek při jejich léčbě. O proteinu VP1 již bylo zjištěno mnoho, důležitou přirozenou součástí polyomavirové kapsidy jsou ale i minoritní strukturální proteiny VP2 a VP3. Tato diplomová práce se zaměřuje právě na studium minoritních proteinů dvou zástupců čeledi *Polyomaviridae*, na modelový Myší polyomavirus (MPyV) a na lidský polyomavirus BK (BKV) s cílem porovnat některé jejich vlastnosti a schopnosti interakce, ať už s buněčnými strukturami či mezi minoritními proteiny navzájem.

## 2. Literární přehled

### 2.1. Polyomaviry

Od objevení prvního polyomaviru v roce 1953, jímž byl Myší polyomavirus (MPyV) (Gross, 1953a), přispělo studium polyomavirů k mnoha objevům na poli virologie i molekulární biologie. Polyomaviry posloužily jako model ke studiu replikačního cyklu virů, molekulárních mechanismů eukaryotické replikace a transkripce (Ford & Hsu, 1978; Kelly, 1988) či buněčné signalizace, nádorové transformace a onkogeneze [shrnutu např. v (Atkin *et al.*, 2009; Cheng *et al.*, 2009)]. Přesto byl výzkum polyomavirů upozaděn a zastíněn zejména novými objevy na poli retrovirů [např. (Bittner, 1936; Baltimore, 1970; Temin & Mizutani, 1970)] a znovu se začal dostávat do popředí až v 70. a 80. letech dvacátého století.

Celkovému zvýšení zájmu o polyomaviry přispělo i objevení lidských polyomavirů BK v moči pacienta po transplantaci ledvin (Gardner *et al.*, 1971) a polyomaviru JC v mozku pacienta s progresivní multifokální leukoencefalopatií (Zurhein & Chou, 1965; Padgett *et al.*, 1971). O třicet let později následoval objev dalších dvou lidských polyomavirů KI (Allander *et al.*, 2007) a WU (Gaynor *et al.*, 2007). Velký rozruch pak způsobilo objevení polyomaviru karcinomu Merkelových buněk (MCPyV) v roce 2008, zatím jediného lidského polyomaviru s přímo prokázaným vlivem na rozvoj nádorového bujení (Feng *et al.*, 2008). Dnes je známo přes 70 polyomavirů, které jsou podle ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) řazeny do čtyř rodů – Alpha-, Beta-, Gamma- a Deltapolyomavirus. Další polyomaviry či viry podobné polyomavirům se však stále objevují a teprve čekají na své oficiální schválení a zařazení do rodů. Zatím poslední aktualizace taxonomie polyomavirové rodiny proběhla v červnu 2016, kdy byly některé polyomaviry kromě zařazení do nově vytvořených rodů také přejmenovány, aby se jejich pojmenování ve vědecké sféře sjednotilo a usnadnilo (Calvignac-Spencer *et al.*, 2016).

Přirozenými hostiteli polyomavirů jsou členovci, ryby, ptáci a savci včetně člověka (Buck *et al.*, 2016). Přestože je infekce savčími polyomaviry většinou bezpříznaková, u starších či imunosuprimovaných jedinců může vyvolávat závažná onemocnění či způsobovat nádory. Tumorogenní potenciál, tedy schopnost vyvolávat vznik nádorů, dal polyomavirům i jejich název; slovo polyomavirus pochází ze spojení řeckých slov poly- a -oma znamenajících „mnoho nádorů“. Mezi nejděle studované modelové savčí polyomaviry patří právě Myší polyomavirus (MPyV), se kterým pracujeme i v naší laboratoři a na nějž jsem se v rámci své diplomové práce také zaměřila. Z lidských polyomavirů patří mezi nejvíce prozkoumané polyomaviry JCV a BKV a v poslední době se k nim přidává i MCPyV. Seznam dosud objevených lidských polyomavirů a dvou modelových savčích polyomavirů je pro přehlednost uveden v **Tabulce 1**.

<b>Polyomavirus</b>	<b>Zkratka</b>	<b>První izolace</b>	<b>Hostitel</b>
Myší polyomavirus	MPyV	Gross, 1953	myš
Opičí virus 40 (Simian vacuolating virus 40)	SV40	Sweet & Hilleman, 1960	opice
BK virus	BKV	Gardner <i>et al.</i> , 1971	člověk
JC virus	JCV	Padgett <i>et al.</i> , 1971	
Polyomavirus KI	-	Allander <i>et al.</i> , 2007	
Polyomavirus WU	-	Gaynor <i>et al.</i> , 2007	
Polyomavirus karcinomu Merkelových buněk	MCPyV	Feng <i>et al.</i> , 2008	
Lidský polyomavirus 6	HPyV6	Schowalter <i>et al.</i> , 2010	
Lidský polyomavirus 7	HPyV7		
Polyomavirus asociovaný s onemocněním <i>Trichodisplasia spinulosa</i>	TSAV	van der Meijden <i>et al.</i> , 2010	
Lidský polyomavirus 9	HPyV9	Scuda <i>et al.</i> , 2011	
Polyomavirus MW	-	Siebrasse <i>et al.</i> , 2012	
Saint Louis polyomavirus	STLPyV	Lim <i>et al.</i> , 2013	
Lidský polyomavirus 12	HPyV12	Korup <i>et al.</i> , 2013	
New Jersey Polyomavirus	NJPyV	Mishra <i>et al.</i> , 2014	

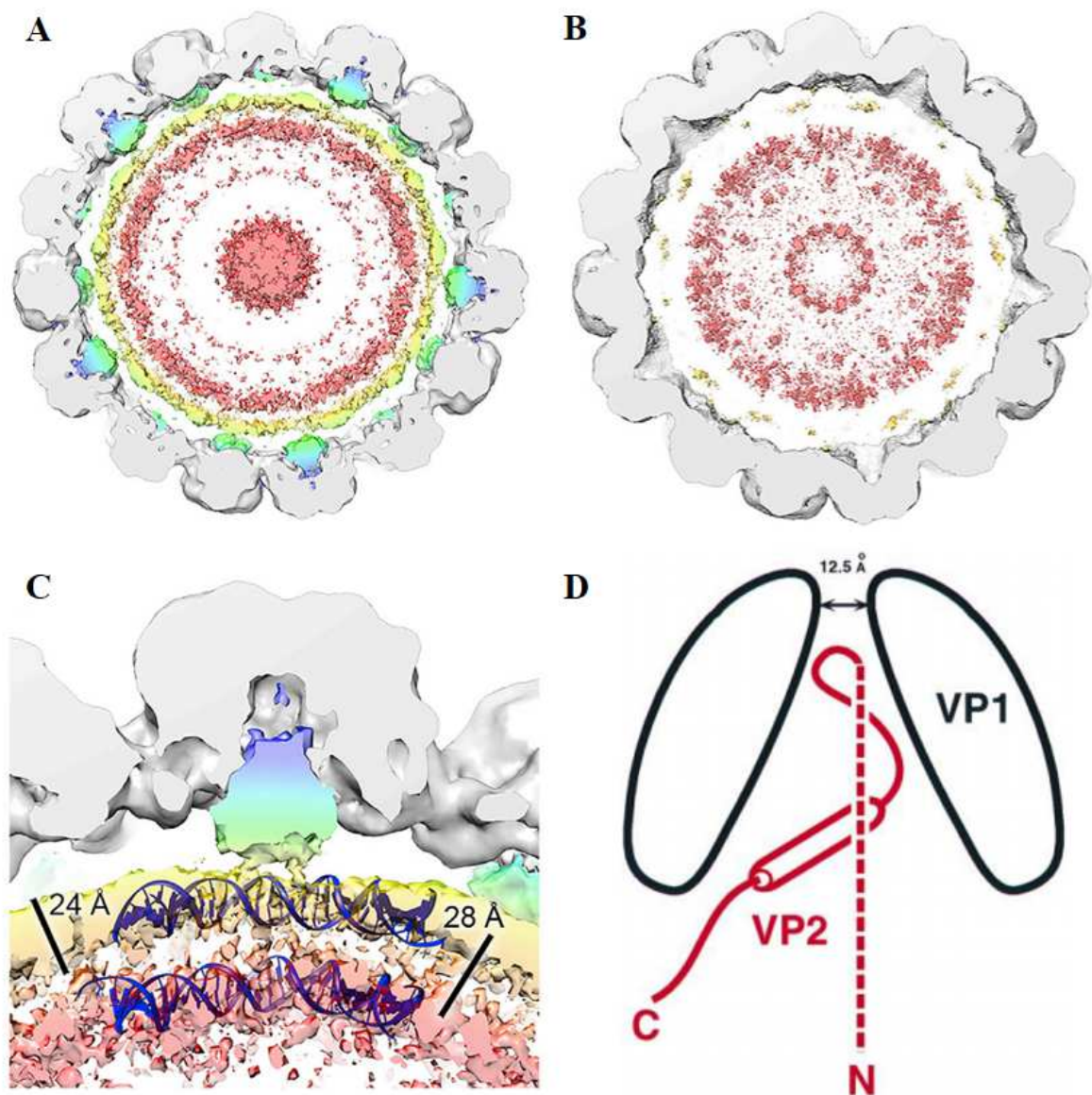
**Tabulka 1. Přehled dosud objevených lidských polyomavirů a dvou modelových savčích polyomavirů.** Modelové savčí polyomaviry jsou v tabulce zvýrazněny šedou barvou.

## 2.2. Struktura virionu polyomavirů

Polyomaviry jsou malé neobalené viry, jejichž genom je tvořen kruhovou dvouvláknovou molekulou DNA o délce asi 5000 párů bazí. Podle Baltimorovy klasifikace jsou polyomaviry řazeny do skupiny I – dvouvláknové DNA (dsDNA) viry. Kapsida těchto virů má ikosahedrální symetrii a v průměru měří přibližně 45 nm. Struktura kapsidy je tvořena z 80 % hlavním kapsidovým proteinem VP1 a zbylých 20 % tvoří minoritními proteiny VP2 a VP3. Hlavní kapsidový protein VP1 se v buňce či ve vhodných podmínkách *in vitro* samovolně uspořádává do pětičetných oligomerů, tzv. pentamerů a teprve ty se uspořádávají do kapsidy (Salunke *et al.*, 1986; Chuan *et al.*, 2010). Virovou kapsidu tvoří 72 pentamerů proteinu VP1 a uvnitř každého pentameru je v jeho centrální dutině navázán jeden ze dvou minoritních kapsidových proteinů (Obr. 1D). Toto uspořádání bylo navrženo na základě rentgenové krystalografie kapsidy MPyV s rozlišením na 25 Å (Griffith *et al.*, 1992).

Ještě detailnější model uspořádání proteinů v kapsidě polyomaviru s rozlišením na 6,7 Å přinesl Hurdiss a kolektiv v roce 2016 (Obr. 1A-C). Tento model kapsidy lidského polyomaviru BKV je založen na kryo-elektronové mikroskopii a kromě uspořádání kapsidových proteinů zobrazuje i místa pravděpodobné interakce proteinů s virovým minichromozomem (Hurdiss *et al.*, 2016). Kapsida polyomavirů je tvořena celkem 360 kopiemi hlavního kapsidového proteinu VP1 a 72 kopiemi minoritních kapsidových proteinů VP2 a VP3. Pentamery jsou vzájemně propojeny disulfidickými můstky a kovalentními vazbami C-koncové části proteinu VP1, která směřuje k okolním pentamerům (Stehle & Harrison, 1997).

Virové kapsidy se vytvářejí za přítomnosti vhodné koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  iontů, které je stabilizují. Proteinová kapsida funkčního infekčního virionu obaluje a chrání molekulu virové genomové DNA, která je navázaná na buněčných histonech s výjimkou histonu H1. Bylo prokázáno, že minoritní proteiny MPyV koimunoprecipitují s buněčnými histony (Cai *et al.*, 1994; Forstová *et al.*, 1993). Protein VP1 přímo interaguje s virovou DNA (Carbone *et al.*, 2004), ale je schopen také vytvořit prázdnou virovou částici či do její dutiny zabalit místo virové DNA vhodně velikou cizorodou molekulu. Takové částice se pak nazývají částice podobné viru, tzv. VLPs (virus-like particles). V posledních letech vzrůstá zájem o využití těchto nanočástic zejména v diagnostice a terapii různých onemocnění či při výrobě tzv. bezpečných vakcín [shrnuté v (Kawano *et al.*, 2013; Tegerstedt *et al.*, 2005)].



**Obr. 1** Uspořádání proteinů v kapsidě polyomaviru. **A)** Řez 3D strukturou virionu. Šedě jsou znázorněny pentamery VP1 proteinů, modro-zeleně umístění minoritních proteinů v centrální dutině pentamerů. **B)** Řez 3D strukturou viru-podobné částice tvořené pouze VP1 proteinem. **C)** Detail řezu pentamerem VP1 s minoritním proteinem znázorněným modro-zeleně. Zároveň je také patrné uložení virového minichromozomu uvnitř kapsidy (tmavě modrá dvoušroubovice) s naznačenými interakcemi minoritních proteinů (žluté výběžky dotýkající se DNA dvoušroubovice). Model zobrazující BKV virus byl vytvořen na základě snímků z kryo-elektronové mikroskopie. Převzato z Hurdiss *et al.*, 2016. **D)** Schematické znázornění uspořádání kapsidových proteinů v pentameru polyomaviru – řez pentamerem. Červeně vyznačený minoritní protein VP2 je umístěn v centrální dutině pentameru VP1. N- i C-koncová část minoritního proteinu VP2 směřují dovnitř virové kapsidy. Převzato z Chen *et al.* 1998.

## 2.3. Myší polyomavirus

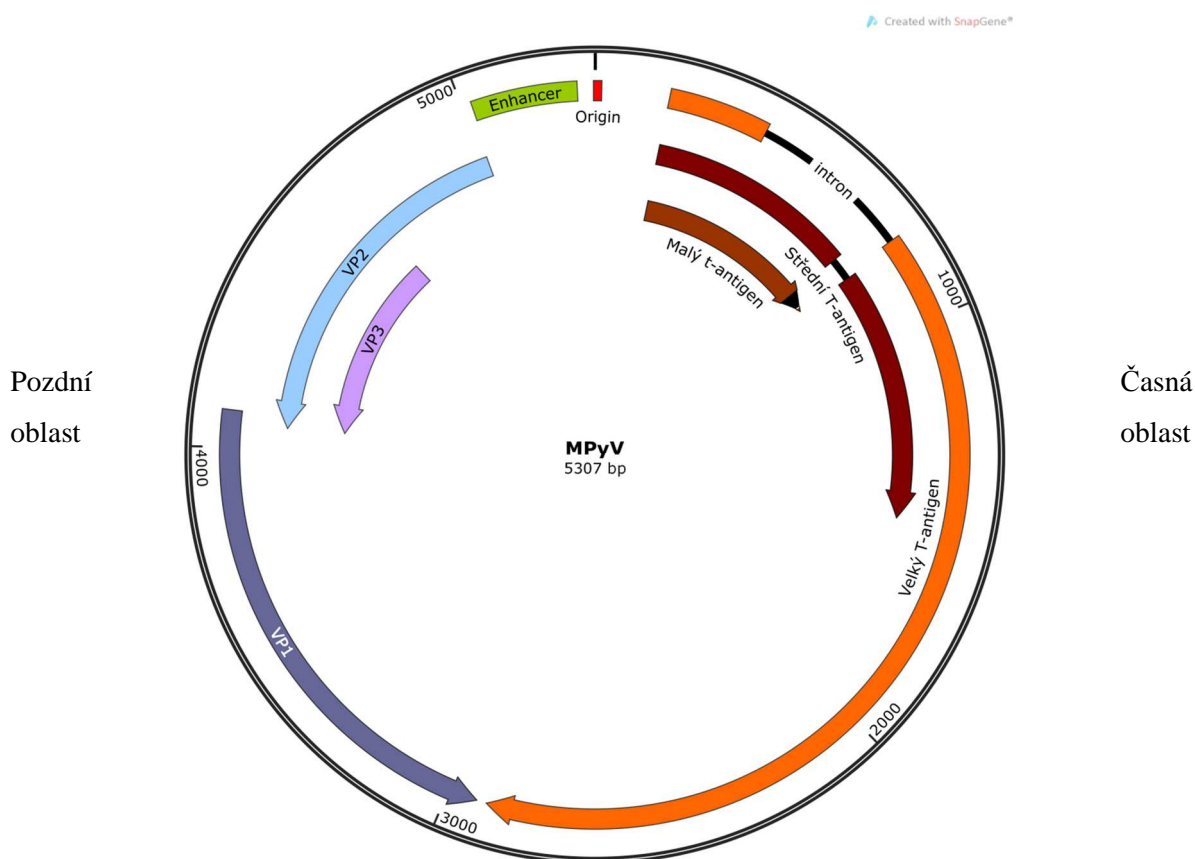
Myší polyomavirus byl poprvé popsán v roce 1953 (Gross, 1953). Od 70. let byl virus označován nejdříve jako K virus a poté jako Polyomavirus, Myší polyomavirus a v roce 2016 byl tento virus přejmenován ICTV na „*Mus musculus* polyomavirus 1“ (Calvignac-Spencer *et al.*, 2016). Z historických důvodů a v návaznosti na předchozí výzkum tohoto viru v naší laboratoři je ponecháno v celé práci starší označení Myší polyomavirus (MPyV). Virus byl objeven v těle transgenních leukemických myší s nádory (Gross, 1953a). Po injekčním podání přefiltrovaného homogenizovaného biologického materiálu získaného z leukemických myší do těla novorozenech transgenních myší laboratorního kmene C3H byla v několika případech pozorována tvorba nádorů slinných žláz a krku. Tím se prokázala přítomnost infekčního agens o průměru menším než 2 mikrometry (průměr pórů použitého filtru), které má v myši tumorogenní potenciál. První komplexnější charakterizaci Myšího polyomaviru pak přinesli o několik let později Eddy a Stewart (Eddy & Stewart, 1959). Zároveň bylo prokázáno, že MPyV způsobuje nádory epiteliálního i mezenchymálního původu nejen v transgenních, novorozenech či imunosuprimovaných myších, ale také v některých tkáních dalších obratlovců – křečků, krys a králíků (Eddy *et al.*, 1958, 1959a, 1959b). U zdravých jedinců však rozvoji nádorů účinně brání maternální protilátky [shrnutí v (Ramqvist & Dalanian, 2009)]. Dosud také nebyl zaznamenán případ infekce člověka myším polyomavirem, a proto je MPyV pokládán za bezpečný modelový virus.

### 2.3.1. Organizace genomu

Genom MPyV je členěn do tří oblastí – časné a pozdní kódující oblasti, z nichž je přepisováno celkem 6 genů, a nekódující regulační oblasti (Obr. 2). V časné oblasti leží geny kódující virové regulační proteiny – malý (22,8 kDa), střední (48,7 kDa) a velký tumorový antigen (87,7 kDa). Virové tumorové antigeny interagují s mnoha buněčnými komponentami, navozují spuštění S-fáze buněčného cyklu, čímž uzpůsobují buněčné prostředí pro úspěšnou replikaci viru a jsou mj. také zodpovědné za rozvoj tumorogeneze. Produkce tumorových antigenů začíná ihned po doručení virové DNA do buněčného jádra a pokračuje i během pozdějších fází virového životního cyklu. V pozdní kódující oblasti genomu se pak nacházejí geny pro strukturní kapsidové proteiny VP1 (45 kDa), VP2 (35 kDa) a VP3 (23 kDa). Jejich exprese začíná až po spuštění replikace virového genomu. V nekódující regulační oblasti se nachází promotory, transkripční „enhancer“ a jediný počátek replikace (origin). Replikace virového genomu probíhá obousměrně a geny časné a pozdní oblasti jsou umístěny na protilehlých vláčkách DNA. Při transkripci vznikají dlouhé molekuly pre-mRNA, z nichž jsou alternativním sestřihem teprve uvolněny mRNA pro jednotlivé proteiny. Všechny tumorové antigeny vznikají z jednoho pre-mRNA transkriptu a tyto proteiny mají společný N-konec. Transkript pro hlavní kapsidový protein VP1 vzniká sestřihem ze stejné pre-mRNA jako mRNA transkripty pro minoritní kapsidové proteiny. Protein VP1 má ale samostatný otevřený čtecí rámec, z něž je translatován. Minoritní proteiny VP2 a VP3 jsou translatovány ze stejného otevřeného čtecího rámce a sdílejí



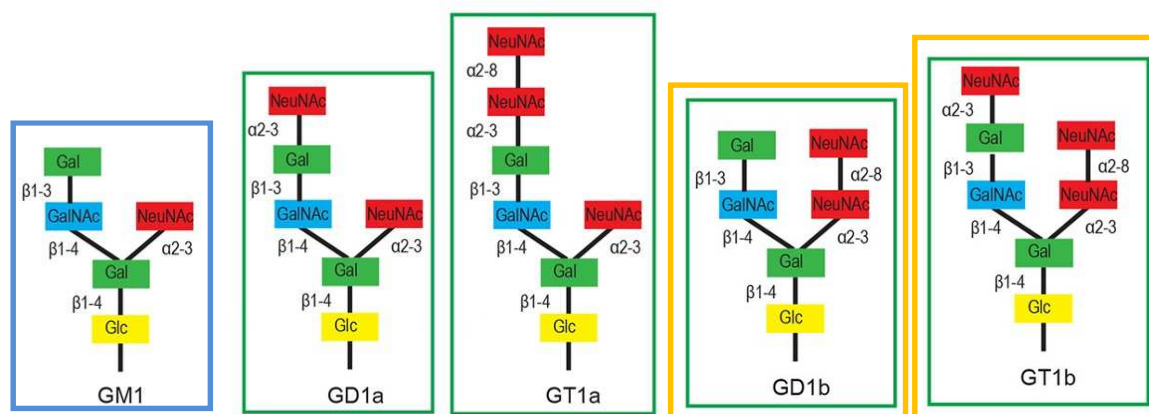
společný C-konec. Protein VP2 obsahuje celou sekvenci minoritního proteinu VP3 a navíc ještě unikátní N-koncovou část o délce asi 120 aminokyselinových zbytků, která je myristylovaná (Streuli & Griffin, 1987).



**Obr. 2** Uspořádání genomu Myšího polyomaviru. Označen je replikační počátek (origin), enhancerová sekvence, geny pro malý t-antigen, střední T-antigen a velký T-antigen přepisované z časně oblastí genomu, geny pro strukturální proteiny VP1, VP2 a VP3 přepisované z pozdní oblasti genomu. Vytvořeno pomocí počítačového softwaru SnapGene.

### 2.3.2. Životní cyklus viru

Při vstupu do buňky využívá MPyV zřejmě čtyři povrchové gangliosidové receptory, na jejichž  $\alpha$ -2,3-vázanou sialovou kyselinu se váže svým hlavním kapsidovým proteinem VP1 (Obr. 3). Dříve byly jako přirozené receptory identifikovány pouze dva gangliosidy GD1a a GT1b (Tsai *et al.*, 2003; Cavaldesi *et al.*, 2004). V roce 2015 však byly identifikovány další dva gangliosidy, které také mohou sloužit jako povrchové receptory MPyV. Jsou jimi receptory GD1b a GT1a. Nedávno bylo totiž objeveno, že  $\alpha$ -2,8-vázaná sialová kyselina přítomná na některých gangliosidových receptorech vazbu mezi VP1 proteinem a  $\alpha$ -2,3-vázanou sialovou kyselinou stabilizuje (Buch *et al.*, 2015). Po navázání na receptor vstupuje virus do buňky endocytózou a putuje dále přes časně a pozdní endozomy, endolysozomy a endoplazmatické retikulum (ER) k buněčnému jádru. Dopravení virového genomu do buněčného jádra je pro virus esenciální, vzhledem k malé velikosti vlastního genomu musí virus využívat buněčný replikační a transkripční aparát.



**Obr. 3 Povrchové receptory polyomavirů.** Receptory pro Myší polyomavirus jsou receptory GD1a, GD1b, GT1a a GT1b (zelené rámečky). Přírodními receptory polyomaviru BKV jsou receptory GD1b a GT1b (oranžové rámečky). Receptor GM1 je receptorem viru SV40 (modrý rámeček), vědcům Neu a kolektivu se však podařilo lidský polyomavirus BKV na tento receptor přeměrovat mutacemi v proteinu VP1 (kap. 2.4.2, Neu *et al.*, 2013). Glc = glukóza, Gal = galaktóza, GalNAc = N-acetyl-galaktosamin, NeuNAc = kyselina neuraminová (sialová kyselina, která interaguje s receptorem viru). Převzato a upraveno podle (You *et al.*, 2015)

Virus při svém putování buňkou nevyužívá klathrinové ani caveolinové váčky (Gilbert & Benjamin, 2000; Liebl *et al.*, 2006), na transportu do ER se nepodílejí ani COPI váčky (Mannová a Forstová, 2003). Při produktivní infekci jsou viriony „sortovány“ z endozomů a endolysozomů do ER, kde dochází k částečnému rozvolnění kapsidy a k jejímu úniku do cytoplazmy (Qian *et al.*, 2009). Bylo zjištěno, že pro infektivitu virionu je důležité zachování kyselého pH buněčných endozomů, které zřejmě rozvolnění kapsidy napomáhá (Mannová a Forstová, 2003; Liebl *et al.*, 2006; Qian *et al.*, 2009). Únik viru z ER nebyl zatím zcela objasněn; všeobecně uznávaný model polyomavirového úniku však přisuzuje určitou roli minoritním kapsidovým proteinům (kap. 2.5.2) a také hostitelské ERAD dráze (degradační dráha spojená s endoplazmatickým retikulem) (Lilley *et al.*, 2006; Bennett *et al.*, 2013; Schelhaas *et al.*, 2007; Kuksin & Norkin, 2012). Z cytoplazmy pak částečně rozvolněné viriony putují k buněčnému jádru, přičemž využívají buněčný mikrotubulární cytoskelet a molekulární motor dynein (Sanjuan *et al.*, 2003; Žíla *et al.*, 2014).

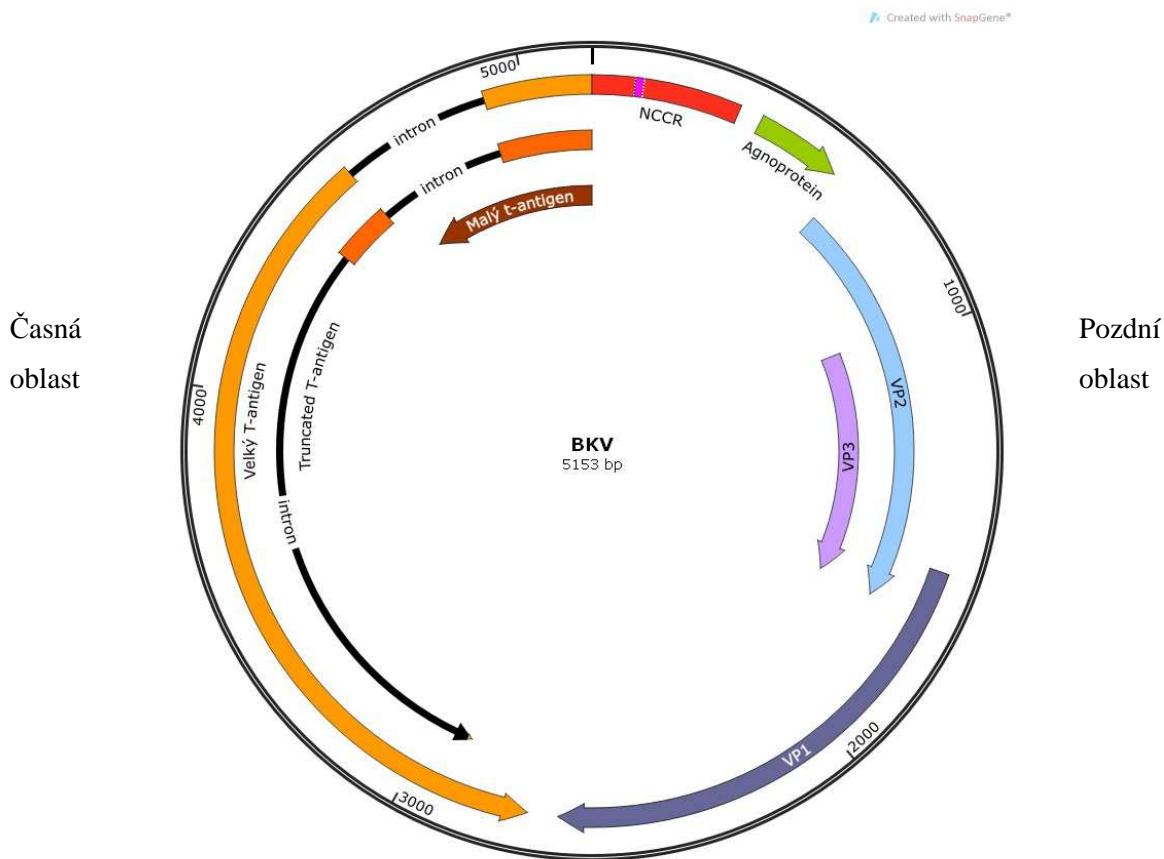
Po vstupu do jádra využívá virová DNA ke své transkripci hostitelskou DNA dependentní RNA polymerázu II. Po vytvoření dostatečného množství tumorových-antigenů a navození S-fáze buněčného cyklu může dojít k replikaci virové DNA. Následně je přepisována pozdní oblast genomu a dochází k translaci mRNA pro kapsidové proteiny. Předčasnému uspořádání virové kapsidy v cytoplazmě by podle Birda a kolektivu mohla bránit interakce hlavního kapsidového proteinu VP1 s jadernými importiny (Bird *et al.*, 2008). Skládání nových virionů totiž probíhá v buněčném jádře, kam musí být nově syntetizované kapsidové proteiny z cytoplazmy dopraveny. Celý životní cyklus Myšího polyomaviru pak trvá asi 48 hodin, poté se objevuje cytopatický efekt a nové viriony se při lyzi buněk uvolňují do okolí.

## 2.4. Lidský polyomavirus BK

Lidský polyomavirus BK (BKV) byl objeven jako jeden z prvních zástupců lidských polyomavirů týmem Gardnerové a kolektivu v roce 1971 (Gardner *et al.*, 1971). Tento virus infikuje močové cesty a infekce je zpravidla bezpříznaková, perzistence viru v močových cestách je pak celoživotní. K prvotní infekci virem dochází u většiny populace již v dětském věku a způsob přenosu viru mezi jedinci nebyl zatím objasněn. Prevalence viru je ve světovém měřítku vysoká, pohybuje se v rozmezí 46 - 94 % [shrnuto v (Hirsch & Steiger, 2003)], v české populaci je to asi 69 % (Šroller *et al.*, 2014). U imunosuprimovaných pacientů může dojít k reaktivaci viru, což způsobuje závažné problémy, jako jsou nefropatie, hemoragické cystitidy (těžké záněty močového měchýře), odhojení ledvinového transplantátu a další onemocnění [shrnuto v (Bennett *et al.*, 2012; Rinaldo *et al.*, 2013)]. Nedávno byly publikovány zajímavé práce shrnující výsledky případů imunosuprimovaných pacientů s BKV infekcí naznačující potenciální vliv BKV infekce na rozvoj nádorů močových cest (Kenan *et al.*, 2015; Papadimitriou *et al.*, 2016), nádorů prostaty (Keller *et al.*, 2015) a lymfomů (Burger-Calderon & Webster-Cyriaque, 2015).

### 2.4.1. Organizace genomu

Genom tohoto viru je velký 5153 párů bazí a jeho organizace je velmi podobná genomové organizaci MPyV (Obr. 4). Stejně, jako je tomu u MPyV, i u polyomaviru BKV jsou od sebe časná a pozdní oblast odděleny nekódující regulační oblastí, také označovanou jako NCCR (non-coding control region). V této oblasti leží replikační počátek viru (origin), promotory a enhancery transkripce a také vazebná místa pro různé transkripční faktory a další buněčné partnery. Z časných oblastí genomu jsou přepisovány geny pro velký T-antigen (80,5 kDa) a malý t-antigen (20,5 kDa) a také zkrácená forma malého t-antigenu, tzv. „truncated“ t-antigen (17 kDa), jehož funkce zatím nebyla objasněna (Abend *et al.*, 2009). V pozdní oblasti genomu je kromě strukturálních kapsidových proteinů VP1 (40,1 kDa), VP2 (38,3 kDa) a VP3 (26,7 kDa) kódován ještě agnoprotein (7,4 kDa) [shrnuto v (Rinaldo *et al.*, 2013)]. Agnoprotein není strukturálním proteinem viru, ale plní regulační funkce, například interaguje s jaderným antigenem dělících se buněk PCNA (proliferating cell nuclear antigen) (Gerits *et al.*, 2015) a pravděpodobně ovlivňuje exocytózu interakcí s proteinem  $\alpha$ -SNAP (Johannessen *et al.*, 2011). Přestože je agnoprotein silně produkován v buňkách zejména v pozdní fázi infekce a nesnižuje hladinu HLA antigenů na povrchu infikovaných buněk (Cioni *et al.*, 2013), je pro imunitní systém neviditelný (Leuenberger *et al.*, 2007). Podle Papadimitriou a kolektivu by mohl agnoprotein za součinnosti s velkým T-antigenem podporovat vznik nádorů (Papadimitriou *et al.*, 2016). Nezbytnost agnoproteinu pro produktivní infekci potvrdil *in vitro* také Myhre a kolektiv (Myhre *et al.*, 2010). Nedávno byl také popsán případ, kdy u imunosuprimovaného pacienta s virémií BKV došlo k rozvoji nádoru ledvin, v němž byl objeven genom BKV viru integrovaný v genomu nádorových buněk (Kenan *et al.*, 2015).



**Obr. 4** Uspořádání genomu lidského polyomaviru BK. Označena je nekódující regulační oblast **NCCR** s replikačním počátkem (origin), geny pro **velký T-antigen**, zkrácený **truncated T-antigen** a **malý t-antigen** přepisované z časně oblasti genomu, geny pro strukturální proteiny **VP1**, **VP2** a **VP3** a geny pro nestrukturní **agnoprotein** přepisované z pozdní oblasti genomu. Vytvořeno pomocí počítačového softwaru SnapGene.

### 2.4.2. Životní cyklus viru

Od objevení viru trvalo poměrně dlouho, než byl objeven jeho přirozený receptor. Celý výzkum viru BKV tím byl velmi zpomalen, protože se virus nedařilo pěstovat v buněčných kulturách. Nejvíce se pro práci s BKV využívala opičí ledvinná buněčná linie Vero, ve které je virus po transfekci schopen dokončit svůj životní cyklus. Virus však není schopen Vero buňky lyzovat a tím pádem nedochází ani k šíření infekce. Ke studiu životního cyklu viru v posledních letech významně přispělo až využití primárních lidských ledvinných buněčných kultur HRPTEC (Human renal proximal tubular epithelial cells, lidské epiteliální buňky ledvinných vinutých kanálků).

Během let bylo postupně prokázáno, že virus způsobuje aglutinaci červených krvinek (Mäntyjärvi *et al.*, 1972) a váže se na receptory přítomné na lidských lymfocytech (Possati *et al.*, 1983). Později se zjistilo, že důležitou roli hraje  $\alpha$ -2,3-vázaná sialová kyselina a receptor má i proteinovou povahu (Haun *et al.*, 1993; Sinibaldi *et al.*, 1990). Nakonec bylo objeveno, že receptorem pro virus BKV je glykoprotein s  $\alpha$ -2,3-vázanou sialovou kyselinou (Dugan *et al.*, 2005) a o rok později bylo potvrzeno, že těmito receptory jsou sialoglykoproteiny GD1b a GT1b s  $\alpha$ -2,3 a  $\alpha$ -2,8-vázanou sialovou kyselinou (Obr. 3) (Low *et al.*, 2006). Virus se na receptory váže prostřednictvím hlavního kapsidového proteinu

VP1, a to žlábkem mezi povrchovými smyčkami BC a HI (Dugan *et al.*, 2007). Kapsidový protein VP1 BKV má také variabilní oblasti mezi aminokyselinovými zbytky 61 – 83 utvářejícími oblast smyček BC1 a BC2. Podle této oblasti rozlišujeme čtyři různé subtypy BKV polyomaviru: I, II, III a IV. Jednotlivé subtypy se navzájem liší rozšířením ve světě, infektivitou i tkáňovým tropismem. Protilátky neutralizující virus subtypu I neměly neutralizační účinky na subtyp III a IV, jednou prodělaná infekce tak nemusí zabránit reinfekci pacienta (Pastrana *et al.*, 2013). Nedávno bylo také mutacemi aminokyselinových zbytků proteinu VP1 ve vazebné oblasti docíleno přesměrování BKV viru na receptor viru SV40 GM1 (Obr. 3) (Neu *et al.*, 2013).

Po navázání na receptor vstupuje virus do buňky endocytózou nezávislou na klathrinu i kaveolinu (Zhao *et al.*, 2016) a jeho pohyb buňkou je obdobný jako pohyb virionů MPyV (Jiang *et al.*, 2009). Dále pak virus putuje po buněčných mikrotubulech k ER, stejně jako MPyV; pohyb BKV viru je však oproti MPyV zřejmě nezávislý na dyneinu (Moriyama & Sorokin, 2008). Kolokalizace viru s Golgiho aparátem nebyla dosud pozorována u BKV ani u MPyV, a tak se předpokládá, že se tomuto kompartmentu oba viry vyhýbají, anebo jím procházejí tak rychle, že jsou nedetekovatelné. Celý výzkum životního cyklu viru BKV Moriyamové i Jiangové a kolektivu byl prováděn za použití buněk HRPTEC, které jsou hlavním přirozeným cílem BKV viru a nabízí tak výsledky velmi se blízcí životnímu cyklu viru *in vivo* (Moriyama & Sorokin, 2008; Jiang *et al.*, 2009). V endoplazmatickém retikulu HRPTEC buněk se BKV objevuje 6 – 8 hodin po infekci. Zde dochází k částečnému rozvolnění kapsidy rozpadem disulfidických vazeb působením proteinů z rodiny protein disulfid-izomeráz (PDI); 8 – 12 h po infekci se také objevují kratší formy proteinu VP1, za jejichž vznik je pravděpodobně zodpovědné proteolytické štěpení. Tento efekt zatím nebyl u polyomavirové infekce nikdy pozorován a jeho význam musí být teprve prozkoumán (Jiang *et al.*, 2009). Z ER se rozvolněné kapsidy uvolňují do cytoplazmy stejným způsobem, jako kapsidy viru SV40 po interakci proteinu VP1 s buněčným proteinem Derlin-1, který hraje roli v ERAD dráze (Jiang *et al.*, 2009). Z cytoplazmy se zatím neprozkoumaným mechanismem dostává virová DNA do buněčného jádra, kde se přepisuje a replikuje. Nové viriony se skládají uvnitř jádra a buňka lyzuje a uvolňuje nové viriony 24 – 48 hodin po infekci.

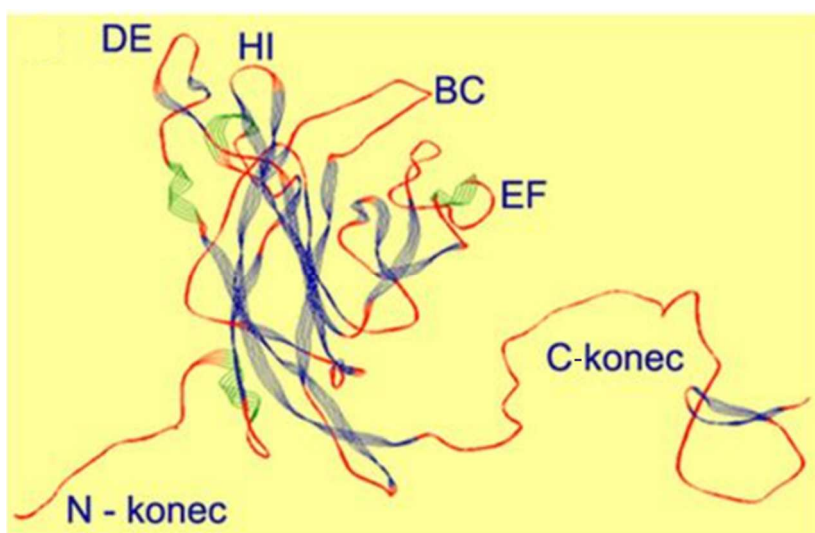
## **2.5. Strukturní proteiny polyomavirů se zaměřením na BKV a MPyV**

### **2.5.1. Hlavní kapsidový protein VP1**

#### **2.5.1.1. Struktura**

Největší část povrchu polyomavirové kapsidy zaujímá hlavní kapsidový protein VP1. Protein VP1 můžeme rozdělit na 3 části: N-koncovou oblast, centrální oblast a C-koncovou oblast. Struktura proteinu VP1 viru MPyV je znázorněna na Obr. 5. V N-koncové oblasti proteinu VP1 leží sekvenčně nespecifická DNA-vazebná doména jak u MPyV (Moreland *et al.*, 1991) tak u BKV viru (Hurdiss *et al.*, 2016) a zároveň se v této oblasti u MPyV nachází i jaderný lokalizační signál (NLS) (Moreland & Garcea, 1991). U BKV je v N-koncové oblasti proteinu sekvence velmi podobná NLS

sekvenci viru SV40 s předpokládanými stejnými vlastnostmi. Ve virionu směřuje N-koncová oblast proteinu VP1 dovnitř centrální dutiny pentameru, kde se váže na virový minichromozom a nahrazuje hostitelský histon H1 (Carbone *et al.*, 2004; Hurdiss *et al.*, 2016). Centrální oblast proteinu VP1 je tvořena  $\alpha$ -helixy a  $\beta$ -listy, které jsou mezi sebou propojeny šesti smyčkami. Tři z těchto smyček (BC, DE a HI) jsou vystaveny na povrchu kapsidy a účastní se interakcí s receptory při vstupu viru do buňky. Smyčka EF spolu s C-koncovou částí proteinu zprostředkuje vazbu  $\text{Ca}^{2+}$  iontů, které stabilizují složené viriony. C-koncová oblast proteinu VP1 je dlouhá a flexibilní a zprostředkuje vazbu mezi pentamery VP1 v rámci virové kapsidy (Obr. 5). Protein VP1 je také cílem mnoha postranlačních modifikací, včetně fosforylace, sulfonylace, acetylace, hydroxylace a metylace, jejichž funkce nebyla zatím zcela objasněna (Fattaey & Consigli, 1989).



**Obr. 5** Vyobrazení terciární struktury hlavního kapsidového proteinu VP1 MPyV. Ve složeném virionu či částici podobné viru jsou smyčky BC, DE a HI vystaveny na povrchu kapsidy, smyčka EF je součástí vazebného místa pro  $\text{Ca}^{2+}$  ionty. Pentamery proteinu VP1 jsou propojeny flexibilním C-koncovým ramenem. Převzato z Liddington, 1991 v Horníková, 2012.

### 2.5.1.2. Funkce

Kromě strukturální funkce při tvorbě virových kapsid a interakce s receptorem má hlavní kapsidový protein v buňkách i další funkce. Protein VP1 se účastní úniku virionů z ER do cytosolu v počátečních fázích infekce. Interakce proteinu VP1 Myšího polyomaviru s proteiny ERp26 a ERp57 z rodiny PDI uvnitř ER nastoluje konformační změny kapsidy vedoucí k částečnému rozvolnění kapsidy a vystavení C-konce tohoto proteinu na povrch. Dojde tak k odhalení hydrofóbní domény proteinu VP1, která je schopná se zabudovat do lipidové dvojvrstvy ER a penetrovat membránu (Magnuson *et al.*, 2005; Rainey-Barger *et al.*, 2007; Walczak & Tsai, 2011). Tato interakce je pro Myší polyomavirus zřejmě důležitá, protože snížení hladiny produkce PDI snižuje infektivitu viru (Gilbert *et al.*, 2006). Protein VP1 lidského polyomaviru BKV prochází v ER také změnami disulfidických vazeb (Jiang *et al.*, 2009).

Další z interakcí vedoucích k uvolnění virionu z ER jsou interakce VP1 proteinu s proteiny ERAD dráhy. U MPyV se jedná např. o interakci s proteinem Derlin-2 (Lilley *et al.*, 2006), BKV virový protein

VP1 interaguje s Derlinem-1 (Jiang *et al.*, 2009), stejně jako virus SV40 (Schelhaas *et al.*, 2007). Oba viry takto využívají hostitelskou ERAD dráhu, obvykle sloužící k přenesení špatně sbalených proteinů z ER do cytosolu a následné degradaci, ke své translokaci do cytosolu.

Protein VP1 by se také mohl uplatňovat při vstupu virového genomu do buněčného jádra. Nedávná studie prováděná na modelovém viru SV40 prokázala přítomnost přestaveb jaderné laminy objevujících se pouze v nedělicích se infikovaných buňkách. Tyto změny byly vyvolány přítomností VP1 pentamerů v cytoplazmě a největší rozsah měly asi 6 hodin po infekci, tedy v okamžiku, kdy virový genom vstupuje do jádra (Butin-Israeli *et al.*, 2011). V naší laboratoři byla při expresi VP1 proteinu MPyV v myších fibroblastech také pozorována jeho interakce s jadernou laminou (nepublikovaná data).

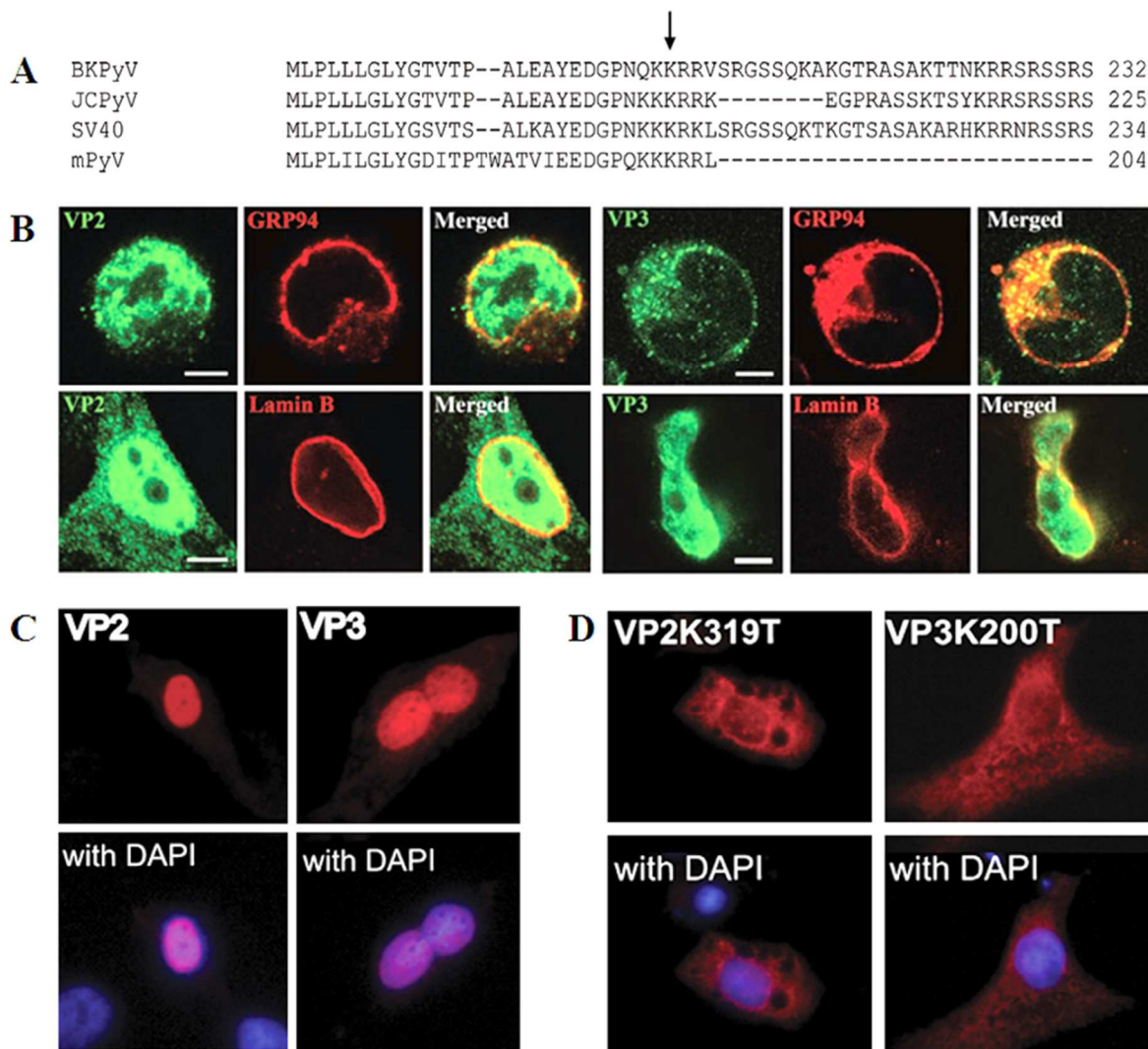
### **2.5.2. Minoritní kapsidové proteiny VP2 a VP3**

Jak už bylo zmíněno, minoritní proteiny tvoří 20 % kapsidy viru, přičemž se nenacházejí na povrchu, ale jsou skryté uvnitř kapsidy. Při samostatné produkci minoritních proteinů MPyV v buňkách bez hlavního kapsidového proteinu VP1 byly prokázány jejich cytotoxické vlastnosti (Huerfano *et al.*, 2010). V průběhu životního cyklu viru se minoritní proteiny pravděpodobně dostávají na povrch kapsidy a svými hydrofóbními částmi se integrují do membrán. Pravděpodobně pak fungují jako viroporiny – tvoří homooligomerní transmembránové póry a narušují tak vnitřní homeostázu buněk. Viroporinům je věnována samostatná kapitola 2.6, polyomavírovým proteinům s viroporinovými vlastnostmi je věnována kapitola 2.7.

#### **2.5.2.1. Struktura**

Minoritní proteiny jsou malé struktury s hydrofóbní povahou, díky níž jsou velmi špatně rozpustné, což značně komplikuje jejich studium. Struktura minoritních proteinů polyomavirů nebyla dosud zcela identifikována. Byla popsána pouze C-koncová oblast společná vždy oběma minoritním proteinům daného polyomaviru, která má  $\alpha$ -helikální podobu a také nese jaderný lokalizační signál (NLS) (Obr. 6A). U viru SV40 je NLS signál minoritních proteinů dostatečný na to, aby byly transportovány do jádra samostatně (Nakanishi *et al.*, 2002), minoritní proteiny MPyV se do jádra transportují v komplexu s VP1 proteinem. Jak bylo ukázáno při expresi v bakulovírovém expresním systému, přítomnost proteinu VP1 mění lokalizaci minoritních proteinů z rozptýlené jaderno-cytoplazmatické na jadernou (Forstová *et al.*, 1993; Delos *et al.*, 1993). Bennettová a kolektiv publikovali v roce 2015 práci, ve které se soustředili na NLS minoritních proteinů BKV viru. Zjistili, že NLS minoritních proteinů BKV je dostačující a zároveň nezbytný pro transport minoritních proteinů do jádra. Jedinou mutací lyzinového zbytku na pozici 319 resp. 200 (pozice v proteinu VP2 resp. VP3) v oblasti NLS (šipka v Obr. 6A) bylo docíleno změny jaderné lokalizace obou proteinů v difúzní jaderno-cytoplazmatickou (Obr. 6D) a virus ztratil infektivitu. Ko-exprese jednotlivých minoritních proteinů BKV s mutovaným NLS s divokým proteinem VP1 v tomto experimentu restaurovala lokalizaci minoritních proteinů zpět do buněčného jádra. Na obrázku 6C je ukázána přirozená jaderná lokalizace minoritních proteinů

divokého viru BKV (Bennett *et al.*, 2015), obrázek 6B reprezentuje přirozenou difúzní jaderno-cytoplazmatickou lokalizaci minoritních proteinů MPyV s afinitou k jadernému obalu a membráně ER (Huerfano *et al.*, 2010).



**Obr. 6 Subcelulární lokalizace minoritních proteinů polyomavirů.** **A)** Srovnání C-koncové sekvence společné minoritním proteinům VP2 a VP3 různých polyomavirů obsahující konzervovanou část reprezentující NLS. Šipka ukazuje na lyzinový zbytek v pozici 200, který byl v práci Bennettové a kolektivu mutován na threoninový zbytek. **B)** Difúzní lokalizace minoritních proteinů MPyV. Oba minoritní proteiny (zeleně) se nachází v jádře a v jeho okolí a mají afinitu k membránám - kolokalizují s jaderným obalem (Lamin B, červeně) a s membránou endoplazmatického retikula (GRP94, červeně). Převzato a upraveno podle (Huerfano *et al.*, 2010). **C)** Jaderná lokalizace minoritních proteinů BKV viru. Oba minoritní proteiny BKV viru mají silný NLS, díky němuž jsou lokalizovány v jádře. **D)** Jedinou mutací v NLS (označena šipkou, obr. 6A) se jaderná lokalizace těchto proteinů BKV viru mění na difúzní. Převzato z Bennett *et al.*, 2015.

Na rozdíl od MPyV mají minoritní proteiny lidských polyomavirů a polyomaviru SV40 na svém C-konci další doménu, která váže DNA. Touto doménou interagují minoritní proteiny s virovým minichromozomem uvnitř kapsidy. DNA-vazebná doména v C-koncové oblasti minoritních proteinů byla popsána u viru SV40 (Dean *et al.*, 1995), lidského polyomaviru JCV (Huang *et al.*, 2003) či predikována u lidského polyomaviru BKV (Hurdiss *et al.*, 2016). U MPyV však bylo prokázáno, že minoritní proteiny DNA-vazebnou doménou nedisponují a virový minichromozom se váže pouze na



hlavní kapsidový protein VP1 (Chang *et al.*, 1993). Minoritní proteiny jsou také posttranslačně modifikovány. Jednou z nejlépe charakterizovaných modifikací je myristylace v N-koncové unikátní části proteinu VP2. Tato modifikace je konzervovaná napříč polyomaviry a má velký význam pro infektivitu viru (Streuli & Griffin, 1987; Krauzewicz *et al.*, 1990).

Na základě analýzy sekvence aminokyselinových zbytků minoritního proteinu VP2 MPyV byly, podobně jako u viru SV40 (Giorda *et al.*, 2013), ve struktuře tohoto proteinu predikovány 3 hydrofóbní domény (Bílková, 2014). Jelikož je minoritní protein VP3 zkrácenou variantou proteinu VP2, jsou jeho součástí pouze dvě z těchto hydrofóbních domén. Hydrofóbní domény jsou pravděpodobně zodpovědné za afinitu minoritních proteinů k buněčným membránám. Sekundární a terciární struktura minoritních proteinů BKV nebyla doposud popsána, ale na základě prací dostupných o ostatních polyomavirech, zejména viru SV40 (Giorda *et al.*, 2013), se výskyt hydrofóbních oblastí v minoritních proteinech BKV viru dá také předpokládat.

#### 2.5.2.2. Funkce

Ačkoliv minoritní proteiny nejsou nezbytné pro formování kapsidy, mají pro virus velký význam. Virion s delecemi či mutacemi v sekvencích minoritních proteinů totiž není schopen vstoupit do buněčného jádra, není schopen správně zabalit genom do kapsid a úspěšně se pomnožit (Dean *et al.*, 1995; Mannová *et al.*, 2002; Gasparovic *et al.*, 2006; Nakanishi *et al.*, 2007a; Giorda *et al.*, 2013; Saribas *et al.*, 2014). Při produkci virionů *in vitro* jsou pak minoritní proteiny nezbytné pro správné zabalení kapsid, což je důležité pro tvorbu VLPs např. pro imunizace nebo transport látek do buněk (Kawano *et al.*, 2006, 2013). Přestože úloha obou minoritních proteinů nebyla doposud zcela objasněna, mohly by dle Danielse a kolektivu hrát roli např. při překonávání membrán, ať už při úniku virionů z ER nebo při vstupu do buněčného jádra. Mohly by uplatňovat své předpokládané viroporinové vlastnosti – tedy schopnost oligomerizovat, zabudovávat se do membrány, tvořit póry a tím umožnit dopravení virového genomu do buněčného jádra nebo naopak únik virionů z buněk (Daniels *et al.*, 2006a, 2006b). Přítomnost predikovaných hydrofóbních oblastí v minoritních proteinech polyomavirů tyto hypotézy podporuje a mechanismus působení minoritních proteinů při úniku viru z ER byl již popsán např. u viru SV40 (Daniels *et al.*, 2006a, 2006b; Giorda *et al.*, 2013).

Další hypotéza navrhuje možné interakce virových proteinů s některými komponentami ER, např. s proteiny rodiny protein disulfid izomeráz, které by mohly rozvolnění kapsidy navodit (Magnuson *et al.*, 2005). Minoritní protein VP2 Myšího polyomaviru je takto schopen penetrovat membránu ER poté, co je aktivován interakcí s proteinem ERp-29; minoritní protein VP3 se za stejných podmínek do membrány pouze integruje (Rainey-Barger *et al.*, 2007). U viru SV40 dochází v případě odhalení N-konce minoritního proteinu VP2 v ER k přenesení virionu přes membránu pomocí proteinů ERAD dráhy. Virion SV40 s volným N-koncem VP2 proteinu je proteiny BiP a BAP31 rozpoznáván a

je z ER transportován translokonovým kanálem do cytosolu (Geiger *et al.*, 2011; Giorda *et al.*, 2013). Podobně by se mohly chovat i minoritní proteiny jiných polyomavirů.

Přes intenzivní výzkum je mechanismus vstupu polyomavirů do buněčného jádra stále nejasný. První hypotéza popisující vstup virionů polyomavirů do jádra předpokládá, že virový minichromozom spolu s částečně rozvolněnou kapsidou vstupuje do jádra jadernými póry. V tomto kroku by se mohly minoritní proteiny uplatňovat např. při interakci s jadernými importiny a destabilizaci jaderné laminy, jako je tomu např. u polyomaviru SV40 (Nakanishi *et al.*, 2002, 2007a, 2007b; Daniels *et al.*, 2006a; Butin-Israeli *et al.*, 2011) nebo by pro virus mohl být důležitý NLS minoritních proteinů, jako u lidského polyomaviru BKV (Bennett *et al.*, 2015). Druhá hypotéza vysvětlující možný mechanismus vstupu polyomavirů do buněčného jádra počítá s přímým vstupem virové DNA z ER do jádra perforací jaderného obalu, aniž by virus vstoupil do cytoplazmy (Rainey-Barger *et al.*, 2007). Perforace jaderného obalu by se také mohly účastnit virové minoritní proteiny se svými předpokládanými viroporinovými vlastnostmi (viz kap. 2.7). Tuto hypotézu podporuje i to, že membrána ER a vnější jaderná membrána jsou propojeny. Virový genom by tak na cestě do jádra musel překonat pouze jedinou membránu.

## 2.6. Viroporiny

Viroporiny jsou malé proteiny virového původu s hydrofóbní povahou, které interagují s membránami hostitelských buněk. Při anotacích virových genomů byly geny těchto proteinů často přehlíženy a až v posledních 20 letech se jim dostává zasloužené pozornosti. Poprvé použil označení viroporin Luis Carrasco v roce 1995, kdy tímto termínem popsal souhrnně několik virových proteinů s podobnými vlastnostmi (Carrasco, 1995 v Gonzalez & Carrasco, 2003). Strukturně jsou viroporiny popisovány jako proteiny tvořené 60 – 120 aminokyselinovými zbytky, které jsou schopné utvořit zpravidla amfipatickou  $\alpha$ -helikální strukturu a nesdílejí výraznou podobnost s buněčnými proteiny [shrnutí v (Gonzalez & Carrasco, 2003; DiMaio, 2014; Royle *et al.*, 2015)]. Amfipatické  $\alpha$ -helixy viroporinů jsou příliš malé, aby mohly samy o sobě perforovat buněčnou membránu. Tento problém vyřešily viroporiny elegantně - po zabudování do membrány vzájemně interagují a tvoří homooligomerní struktury. Tímto způsobem formují transmembránové póry, jimiž pak mohou procházet ionty a malé hydrofilní molekuly. Zajímavé také je, že lyzinové zbytky jsou v transmembránových (TM)  $\alpha$ -helixech viroporinů mnohem více zastoupeny, než v TM doménách jiných proteinů [shrnutí v (Martinez-Gil & Mingarro, 2015)].

Prvním objeveným proteinem s viroporinovými vlastnostmi, jenž má schopnost utvořit iontový kanál v membráně hostitelské buňky, je protein M2 viru chřipky kmene A (Duff & Ashley, 1992). V téže roce byla stejnou výzkumnou skupinou popsána i  $\alpha$ -helikální struktura transmembránové domény tohoto proteinu (Duff *et al.*, 1992). O rok dříve bylo zjištěno, že protein M2 tvoří homodimery a homotetramery, které jsou stabilizovány disulfidickými vazbami (Holsinger & Lamb, 1991). Později

bylo zjištěno, že tento protein tvoří homotetramery i v buněčné membráně. Pomocí nukleární magnetické rezonance bylo potvrzeno, že levotočivé  $\alpha$ -helixy jsou v homotetrameru orientovány hydrofilní oblastí do dutiny tetrameru a hydrofóbní oblastí k membránovým lipidům, a tak tvoří již popsaný iontový kanál (Kovacs & Cross, 1997). Většina popsaných viroporinů pochází z RNA virů, v poslední době se však objevují proteiny s viroporinovými vlastnostmi i u DNA virů (Royle *et al.*, 2015); seznam nejlépe prozkoumaných viroporinů je uveden v Tabulce 2.

Viroporiny mohou kromě  $\alpha$ -helikální domény disponovat i dalšími doménami, které se objevují v aminokyselinových sekvencích napříč viroporinovou rodinou. Jsou jimi např. další hydrofóbní domény nebo domény bohaté na aromatické či bazické aminokyselinové zbytky. Všechny tyto domény mají však ve výsledku stejnou funkci – destabilizují buněčné membrány v průběhu virové infekce a ovlivňují jejich permeabilitu ve prospěch viru [shrnuté v (Gonzalez & Carrasco, 2003; DiMaio, 2014; Royle *et al.*, 2015)].

Struktura	Virus	Viroporin	Počet aminokyselin	Krok v životním cyklu viru	Literatura
Obalené	<i>Influenza virus</i>	M2	97	Infekce Zrání virionů	Lamb <i>et al.</i> (1985), Pinto <i>et al.</i> (1992)
	Hepatitis C virus	p7	63	Skládání a uvolnění virionů	Griffin <i>et al.</i> (2003), Griffin <i>et al.</i> , (2004)
	HIV	Vpu	81	Zrání virionů Uvolnění virionů	Gonzalez and Carrasco (1998), Schubert <i>et al.</i> (1996)
	Alphavirus Coronavirus	6K E protein	60–61 76–83	Uvolnění virionů Skládání a uvolnění virionů	Melton <i>et al.</i> (2002) Liao <i>et al.</i> (2004)
Neobalené	Reovirus	$\mu$ 1N	41	Penetrace membrán	Agosto <i>et al.</i> (2006), Chandran <i>et al.</i> (2003), Odegard <i>et al.</i> (2004)
	Poliovirus	VP4	69	Penetrace membrán	Danthi <i>et al.</i> (2003)
		2B	97	Replikace Uvolnění virionů	Aldabe <i>et al.</i> (1996), Lama and Carrasco (1992)
	Bluetongue virus	NS3	229	Uvolnění virionů	Han and Hartly (2004)
	JC polyomavirus	Agnoprotein	71	Uvolnění virionů	Suzuki <i>et al.</i> (2010)
	SV40 polyomavirus	VP2	352	Infekce	Daniels <i>et al.</i> (2006a), Giorda <i>et al.</i> (2011)
		VP3	234	Infekce	
		VP4	125	Uvolnění virionů	Daniels <i>et al.</i> (2007), Raghava <i>et al.</i> (2011), Giorda <i>et al.</i> (2012)
	Papillomaviruses	E5	83	Nedefinováno	Wetherill <i>et al.</i> (2012)
	Respiratory syncytial virus	SH	64	Nedefinováno	Perez <i>et al.</i> (1997)

**Tabulka 2. Přehled viroporinů obalených a neobalených virů.** Sloupec „Krok v životním cyklu viru“ popisuje část životního cyklu viru, ve které se působení viroporinu uplatňuje. Převzato a upraveno podle (Giorda & Hebert, 2013).

Viroporiny nejsou sice pro virus životně důležité, jejich nepřítomnost ale virus významně oslabuje. Snižuje se schopnost virové propagace, ačkoliv vstup viru do buňky není nepřítomností viroporinů narušen. Destabilizace membrán působením viroporinů se v životním cyklu viru může uplatňovat v mnoha krocích. V časných fázích infekce se viroporiny mohou podílet na úniku virů z membránových kompartmentů, jako jsou endozomy nebo ER. Mohou také permeabilizovat buněčné jádro nedělicích se buněk a umožnit tak transport virového genomu do jádra a jeho replikaci, v závěru životního cyklu viru

mohou usnadňovat buněčnou lyzi a šíření infekce. Důležitou funkcí viroporinů není však jen permeabilizace membrán. Hrají roli také v mnoha protein-proteinových interakcích uvnitř buněk, které viru usnadňují cestu k úspěšnému zakončení životního cyklu [shrnuje v (Nieva & Carrasco, 2015)].

## **2.7. Proteiny polyomavirů s viroporinovými vlastnostmi**

Přestože polyomavirová rodina je poměrně široká a stále se rozrůstá, neexistuje příliš mnoho prací věnovaných jejich viroporinům. Jedinou výjimkou mezi polyomaviry s poměrně dobře prostudovanými viroporiny je opičí polyomavirus SV40 a nedávno byly také publikovány první práce o viroporinech lidského polyomaviru JC (Suzuki *et al.*, 2010).

### **2.7.1. Opičí polyomavirus SV40**

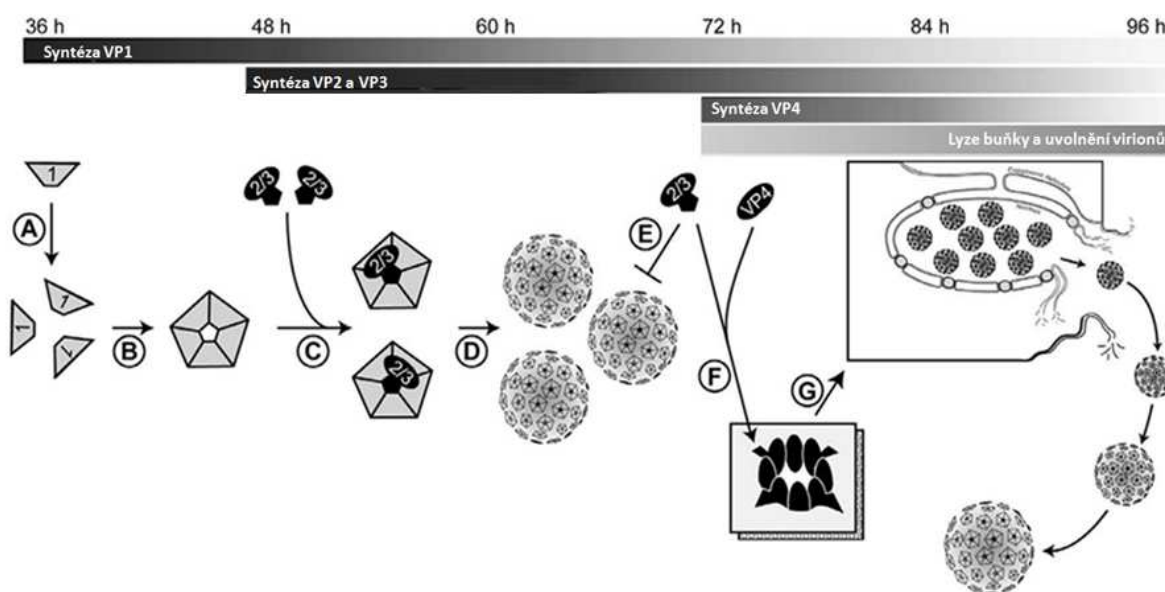
Virus SV40 má genom uspořádaný podobně jako polyomavirus BKV popsáný v kap. 2.4.1. Kóduje geny celkem osmi proteinů: tří tumorových antigenů (velký, malý a 17 kDa T-antigen), tří strukturálních kapsidových proteinů (VP1, VP2 a VP3) a dvou nestrukturních proteinů (VP4 a agnoprotein). Viroporinové vlastnosti proteinů polyomaviru SV40 byly objeveny v roce 2006 Danielsem a kolektivem u minoritních kapsidových proteinů (Daniels *et al.*, 2006b). Tito vědci zaznamenali, že se virové potomstvo při infekci hromadilo v jádře v okolí jaderného obalu v časovém období těsně před permeabilizací membrán jaderného obalu, ER a plazmatické membrány a vypuštěním virionů z buňky. Období, kdy docházelo k permeabilizaci membrán, časově korespondovalo s dobou exprese minoritních proteinů. Inhibice exprese minoritních proteinů zároveň permeabilizaci membrán účinně zamezila. Současně bylo prokázáno, že selektivní exprese minoritních proteinů VP2 a VP3 v bakteriích *Escherichia coli* způsobuje permeabilizaci bakteriální membrány. Protein VP3 dokonce způsobil lyzi bakterií, zatímco exprese hlavního kapsidového proteinu VP1 permeabilizaci membrán nezpůsobovala. Tím bylo prokázáno, že permeabilizace membrán je důsledkem činnosti minoritních proteinů a nikoliv virového proteinu VP1 či buněčných obranných mechanismů (Daniels *et al.*, 2006b). Přestože v roce 2003 bylo postulováno, že schopnost množení virionů postrádajících protein VP2 je stejná jako u divokého viru (Gharakhanian *et al.*, 2003), Daniels a kolektiv tvrdí, že minoritní proteiny VP2 a VP3 mají rozdílné funkce a pro virus jsou důležité oba. Danielsův tým vysledoval, že viriony bez minoritních proteinů nejsou schopny infikovat buňky. Daniels a kolektiv zjistili, že protein VP2 napomáhá vstupu viru do buněk, zatímco protein VP3 se podílí na úniku virového genomu z ER (Daniels *et al.*, 2006b). Za rozdíl ve výsledcích těchto dvou výzkumných skupin může fakt, že v prvním případě byly mutantní genomy do buněk transfekovány a tím přeskočily první fáze životního cyklu viru, ve kterých je minoritní protein VP2 nepostradatelný (Gharakhanian *et al.*, 2003). Danielsova skupina odebírala mutantní viriony z média transfekovaných buněk a ty pak použila k infekci nových buněk, kde se teprve mutace plně projeví v časných fázích virového životního cyklu (Daniels *et al.*, 2006b).

Daniels a kolektiv pokračovali ve svém výzkumu a objevili, že funkce minoritních proteinů je kontrolována hlavním kapsidovým proteinem VP1. Při produkci nových virionů jsou nově syntetizované minoritní proteiny v cytoplazmě obaleny VP1 pentamerem a v tomto komplexu jsou přeneseny do buněčného jádra, kde formují kapsidy vznikajícího virového potomstva. Minoritní proteiny v komplexu s proteinem VP1 se vyskytují v cytoplazmě a jsou solubilní, v nepřítomnosti VP1 se však integrují do membrány ER a jejich solubilita je nízká. Interakcí s proteinem VP1 tak virus reguluje permeabilizační funkci minoritních proteinů, která by jinak vedla k předčasné lyzi buňky a zabití hostitele před úspěšným dokončením životního cyklu viru (Daniels *et al.*, 2006a).

V roce 2013 Giordová a kolektiv provedli sérii mutačních pokusů na minoritních proteinech viru SV40. Vytipované hydrofóbní oblasti minoritních proteinů vkládali do modelového bakteriálního proteinu a rozrušovali je inzercemi nabitých aminokyselinových zbytků, aby potvrdili schopnost těchto proteinových oblastí zabudovávat se do membrán. Na závěr byly tyto rozrušené oblasti vloženy přímo do minoritních proteinů viru. Po infekci mutantními viry s rozrušenými předpokládanými hydrofóbními doménami minoritních proteinů nedocházelo k permeabilizaci membrán a stejně tak byla potlačena schopnost minoritních proteinů tvořit póry, s čímž klesla i infektivita viru (Giorda *et al.*, 2013).

V roce 2007 byl popsán nový 15 kDa velký pozdní protein viru SV40 – protein VP4 (Daniels *et al.*, 2007). Tak jako protein VP3, je protein VP4 translatován ze stejného čtecího rámce jako protein VP2, ale má svůj vlastní iniciační kodon. Je tedy, stejně jako VP3, zkrácenou formou proteinu VP2 a všechny tři proteiny sdílejí shodný C-konec. Protein VP4 je v buňce produkován s 12 – 24 hodinovým zpožděním oproti pozdním proteinům VP1, VP2 a VP3 a na rozdíl od nich je téměř ihned směřován do buněčného jádra. Časovou posloupnost produkce pozdních proteinů viru SV40 znázorňuje obrázek 7. Jaderná lokalizace proteinu VP4 by naznačovala jeho funkci při skládání nových virionů, ale jeho přítomnost ve virionech nebyla prokázána. Časové období, kdy je tento protein produkován, však odpovídá pozdní fázi životního cyklu viru, kdy dochází k uvolňování virionů z buněk. Proto byl dále zjišťován vliv tohoto proteinu na permeabilizaci membrán. Při ko-expresi proteinů VP3 a VP4 v bakteriích *E. coli* bylo dosaženo cytolytického efektu stejně, jako v pokusu z roku 2006 (Daniels *et al.*, 2006b). Při tomtéž pokusu s mutovaným iniciačním AUG kodonem buď proteinu VP3, nebo proteinu VP4, však k lyzi nedošlo. Z toho Daniels a kolektiv usuzovali, že k perforaci bakteriální membrány je potřeba souhra obou dvou proteinů (Daniels *et al.*, 2007). Bylo potvrzeno, že *in vitro* proteiny VP3 a VP4 interagují. Jejich interakce tak pravděpodobně pozměňuje vlastnosti dříve produkovaného proteinu VP3, čímž umožňuje permeabilizaci membrány. Mutace iniciačního AUG kodonu v genu pro protein VP4 také snižuje propagaci viru *in vivo* významným opožděním buněčné lyze při porovnání s divokým virem bez této mutace. Daniels také připouští, že by protein VP4 mohl interagovat *in vivo* s oběma minoritními proteiny VP2 i VP3 (Daniels *et al.*, 2007).

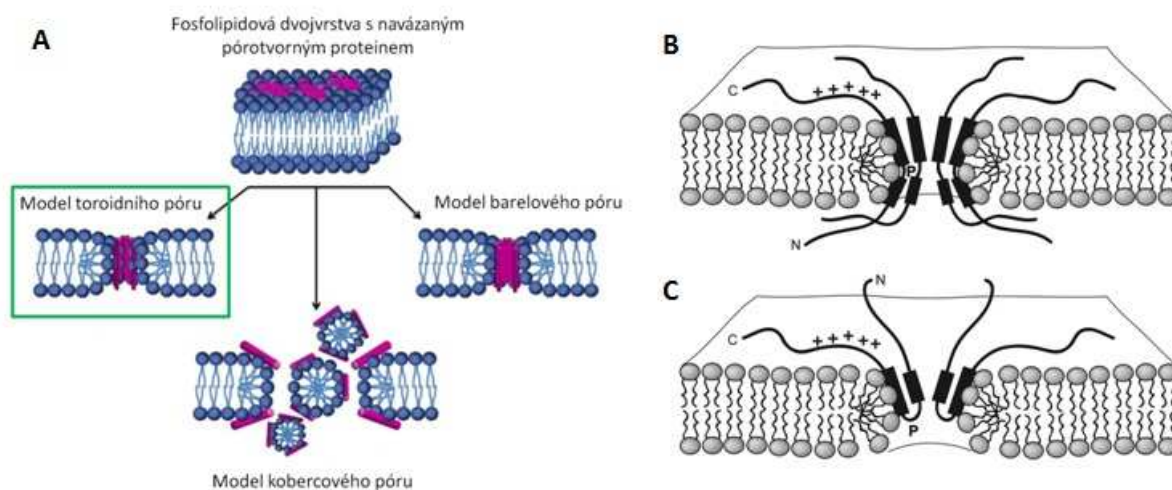
V roce 2011 se proteinem VP4 viru SV40 zabýval další výzkumný tým a bylo ověřeno, že samotný protein VP4 tvoří oligomerní póry v modelových membránách (Raghava *et al.*, 2011). Průměr těchto pórů byl určen na 1 - 5 nm, což je pro únik viru z buňky při průměru kapsidy ~45 nm nedostatečné. I vytvoření takto malých pórů ovšem stačí k destabilizaci membrány, vyvolání „flip-flop“ výměny fosfolipidů a zvýšení permeability, což únik viru usnadňuje. Protein VP4 také dokázal způsobit hemolyzi (lyzi červených krvinek) nezávisle na interakci s dalšími proteiny a tato schopnost byla podmíněna přítomností jeho hydrofóbní domény (Raghava *et al.*, 2011). V roce 2012 byly popsány konkrétní aminokyselinokyselinové zbytky hydrofóbní domény a kladně nabitě bazické C-koncové oblasti NLS proteinu VP4 esenciální pro interakce s membránami (Giorda *et al.*, 2012). Zajímavé je i zjištění, že hydrofóbní doména obsažená v proteinu VP4 a nacházející se také v minoritních proteinech VP2 a VP3 hraje minimálně dvě různé role. V proteinu VP4 funguje jako důležitá integrativní doména při interakci s membránami, v proteinech VP2 a VP3 slouží primárně k hydrofóbní interakci těchto proteinů s centrální dutinou pentameru VP1 při skládání nových virionů. V pozdějších fázích virového životního cyklu, kdy už jsou nové viriony vytvořeny, by ale tato doména proteinů VP2 a VP3 mohla přebírat spíše integrativní funkci popisovanou v proteinu VP4 (Giorda *et al.*, 2012).



**Obr. 7** Expresse pozdních proteinů a jejich funkce v životním cyklu polyomaviru SV40. A) Syntéza proteinu VP1 a B) tvorba pentamerů 36 hodin po infekci. C) Syntéza minoritních proteinů 48 hodin po infekci a jejich integrace do pentamerů proteinu VP1. D) Skládání virionů v buněčném jádře 60 – 72 hodin po infekci. E) Syntéza proteinu VP4 72 hodin po infekci a F) jeho interakce s proteiny VP2 a VP3 neinkorporovanými do pentamerů VP1 nebo kapsid. G) Tvorba oligomerních pórů interakcí minoritních proteinů VP2 a VP3 s proteinem VP4, destabilizace membrán, lyze buňky a uvolnění nových virionů 72 – 96 hodin po infekci. Převzato a upraveno podle (Daniels *et al.*, 2007).

O rok později bylo zjištěno, že protein VP4 tvoří v modelových membránách konkrétní druh pórů – toroidní póry (Obr. 8), kterými vnitřní a vnější membránu propojuje. Proteiny VP2 a VP3 samotné byly sice také schopny integrovat se do modelové membrány, nedokázaly ale vytvořit póry a

mechanismus jejich působení na destabilizaci membrány se zřejmě od mechanismu proteinu VP4 liší (Raghava *et al.*, 2013). Tyto výsledky ale byly získány na umělém modelu membrány a situace *in vivo* by mohla spíše odpovídat výsledkům Danielse a kolektivu, kdy protein VP4 tvoří v buňce heterooligomery s minoritním proteinem VP3 a eventuálně i s proteinem VP2 (Daniels *et al.*, 2007). Hydrofóbní povaha, malá velikost a virový původ proteinů VP2, VP3 a VP4 viru SV40 a jejich schopnost permeabilizovat membrány je bezpečně řadí do rodiny viroporinů.



**Obr. 8 Model vzniku póru ve fosfolipidové dvojvrstvě.** Model toroidního póru využívaný proteinem VP4 viru SV40 je zvýrazněn zeleným rámečkem v obrázku A). Bližší pohled na toroidní pór tvořený oligomerním proteinem VP4 nabízejí modely na obrázcích B) Model klasického toroidního póru a C) Model neuspořádaného toroidního póru. Protein VP4 využívá k tvorbě toroidních pórů patrně jeden či oba navrhované mechanismy. Černými plnými obdélníky jsou označeny hydrofóbní domény proteinu VP4, kladně nabitá bazická C-koncová oblast NLS je označena „+“ značkami. Převzato a upraveno podle (Giorda *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2014).

### 2.7.2. Lidský polyomavirus JC

Uspořádání genomu polyomaviru JCV je velmi podobné uspořádání viru SV40 nebo BKV. Virus kóduje malý a velký T-antigen a produkuje ještě jejich tři zkrácené formy (Bollag *et al.*, 2000; Prins & Frisque, 2001), dále kóduje tři strukturální kapsidové proteiny VP1, VP2 a VP3 a také nestrukturní agnoprotein. Na rozdíl od viru SV40 nebyly viroporinové vlastnosti objeveny u minoritních proteinů JCV, ale u jiného pozdního proteinu – agnoproteinu (Suzuki *et al.*, 2010). Již dříve bylo ukázáno, že agnoprotein i minoritní proteiny se vážou na hlavní kapsidový protein VP1 a aktivují tak replikaci viru (Prins & Frisque, 2001; Safak *et al.*, 2001; Saribas *et al.*, 2012, 2014).

Agnoprotein je 8 kDa velký bazický protein, jenž není součástí virionu. V infikovaných buňkách je ale hojně produkován, což naznačuje, že by mohl mít důležité regulační vlastnosti. Okada a kolektiv popsali jednu z možných funkcí agnoproteinu jako tzv. „shuttle protein.“ V jeho sekvenci se totiž nachází jak jaderný lokalizační signál NLS, tak jaderný exportní signál NES. Pokud je agnoprotein fosforylován, nachází se v cytoplasmě, kde interaguje s mikrotubuly; po defosforylaci translokuje do jádra, kde působí jako aktivátor virové transkripce. Bylo také prokázáno, že při navázání minoritních

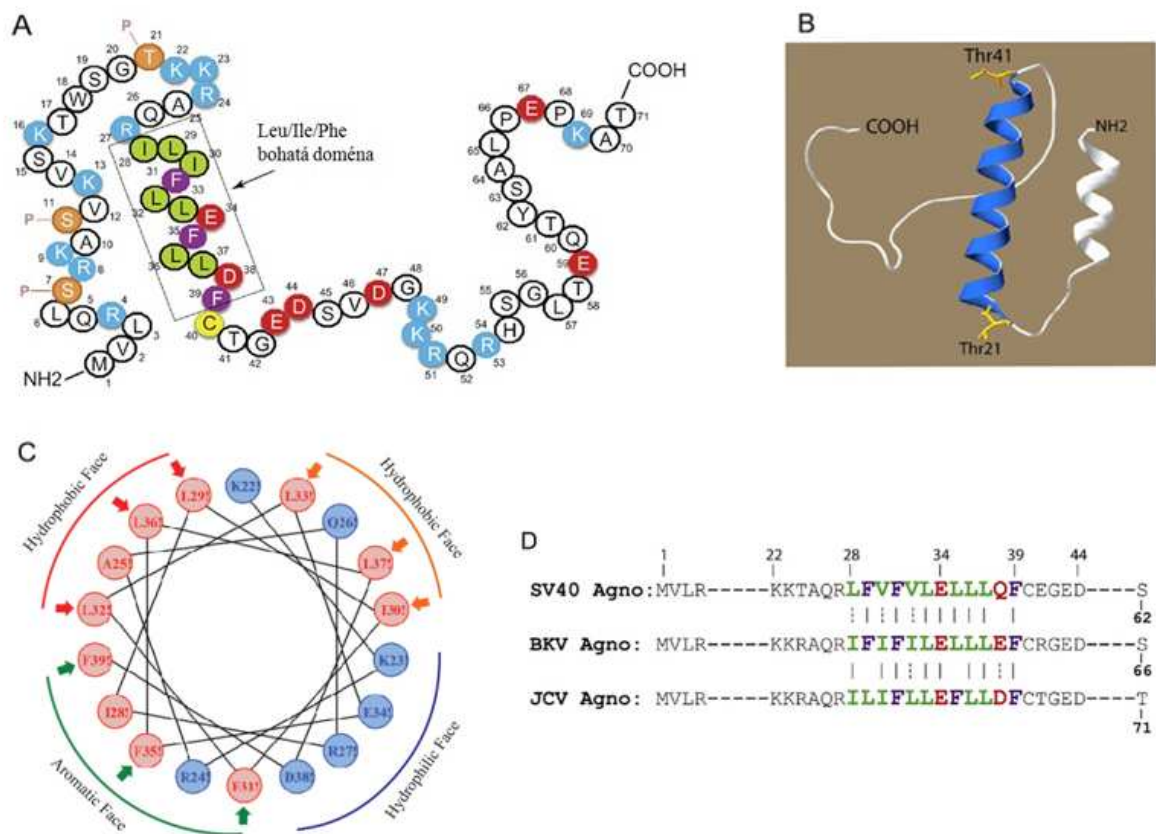
proteinů na protein VP1, který má sám o sobě slabý NLS (Shishido-Hara *et al.*, 2004), podporuje agnoprotein translokaci těchto komplexů do jádra (Okada *et al.*, 2001). Mutační studie prováděná na agnoproteinu také odhalila výskyt defektně sestřižených virových transkriptů, což ukazuje na možnou implikaci agnoproteinu v sestřihu virové RNA (Saribas *et al.*, 2013). Nedávno bylo také objeveno, že agnoprotein JCV je během infekce zřejmě aktivně exportován do okolí infikovaných buněk a neinfikované buňky ho mohou internalizovat. Toto pozorování naznačuje další potenciální funkce agnoproteinu v progresi a patogenezi progresivní multifokální leukoencefalopatie (PML) způsobované virem JCV (Otlu *et al.*, 2014).

Součástí aminokyselinové sekvence agnoproteinu je kromě NLS a NES signálů také N-koncová hydrofóbní doména, jejíž přítomnost je pro viroporiny typická (Suzuki *et al.*, 2010). V N-koncové části agnoproteinu se nachází také oblast bohatá na bazické aminokyselinové zbytky, jejichž přítomnost je esenciální pro zabudování agnoproteinu do membrán. Agnoprotein je nejčastěji detekován v membránách ER a s postupujícím časem infekce se integruje i do plazmatické membrány. Suzuki a kolektiv také zjistili, že agnoprotein JCV viru tvoří homooligomery a zvyšuje permeabilitu buněčné membrány pravděpodobně tvorbou pórů. To indukuje deregulaci homeostáze vpuštěním extracelulárních vápenatých iontů do buňky. Deregulace homeostáze způsobená depolarizací membrány by mohla být spouštěcím mechanismem lyze buňky a mohla by se uplatňovat při úniku nových virionů z buňky. Suzuki a kolektiv ještě dokázali určit, že aminokyselinové zbytky argininu a lyzinu na pozicích 8 a 9 jsou klíčové pro viroporinovou aktivitu agnoproteinu (Suzuki *et al.*, 2010).

Tvorbu agnoproteinových dimerů a oligomerů potvrdili o rok později *in vitro* a *in vivo* i Saribas a kolektiv (Saribas *et al.*, 2011). Bylo upřesněno, že pro dimerizaci a oligomerizaci agnoproteinu je nezbytná centrální oblast agnoproteinu, konkrétně aminokyselinové zbytky na pozicích 17 – 42. Bylo zároveň postulováno, že tato oblast by mohla tvořit amfipatický  $\alpha$ -helix. O dva roky později již Saribas a kolektiv publikovali mutační studii dokazující, že nejdůležitější částí hydrofóbní domény agnoproteinu je oblast aminokyselinových zbytků na pozicích 28 – 39 bohatá na leucinové, isoleucinové a fenylalaninové zbytky (Obr. 9) (Saribas *et al.*, 2013).

V roce 2014 provedli Coric a kolektiv nukleární magnetickou rezonanci (NMR) části agnoproteinu s predikovanou  $\alpha$ -helikální strukturou. Připravili syntetický peptid obsahující agnoproteinové aminokyselinové zbytky na pozicích 17 – 55 (viz Obr. 9A) a několik mutovaných verzí tohoto proteinu. Mutace byly vytipovány do oblasti  $\alpha$ -helixu, jehož struktura byla pomocí NMR potvrzena. Celkem bylo provedeno několik aminokyselinových záměn, největší projevy měly dvě mutace L29A a L36A. Obě mutace způsobovaly problémy při virové replikaci a destabilizovaly protein. Současně bylo potvrzeno, že tyto dva leucinové zbytky v pozicích 29 a 36 se přímo účastní oligomerizace agnoproteinu. Tyto dva leucinové zbytky se tak jeví jako slibný cíl nových léčiv cílících na JCV při PML (Coric *et al.*, 2014).





**Obr. 9** Struktura agnoproteinů lidského polyomaviru JCV. **A)** Primární aminokyselinová struktura agnoproteinů s oblastí bohatou na leucinové, isoleucinové a fenylalaninové zbytky, která je vyznačena obdélníkem. **B)** Predikce 3D struktury agnoproteinů získaná pomocí softwaru I-TASSER. Převzato z Roy *et al.*, 2010 v Saribas *et al.*, 2013. **C)** Pohled na  $\alpha$ -helikální část agnoproteinů shora. Protistojné rozložení hydrofobních (červeně) a hydrofilních (modře) aminokyselinových zbytků naznačuje amfipatický charakter helixu. Převzato z Coric *et al.*, 2014. **D)** Sekvenční srovnání Leu/Ile/Phe bohaté oblasti agnoproteinů polyomaviru SV40, BKV a JCV ukazuje na konzervovanost této domény napříč polyomaviry. Vlastnosti agnoproteinů vyplývající z jeho struktury by tak mohly být polyomavirům společné. Převzato a upraveno podle (Saribas *et al.*, 2013)

V rámci studia agnoproteinů JCV polyomaviru byla také objevena jeho interakce s  $\delta$  podjednotkou adaptorového proteinového komplexu 3 (AP3, DAP3). Tento proteinový komplex funguje jako selektivní přenašeč proteinů z Golgiho aparátu do lysozomu, kde jsou tyto proteiny následně degradovány [shrnuto v (Odorizzi *et al.*, 1998)]. Agnoprotein interakcí s DAP3 zamezuje své translokaci do lysozomu a tím se vyhýbá přímé degradaci. Druhým efektem této interakce je zároveň translokace agnoproteinů v komplexu s DAP3 do plazmatické membrány, kde může uplatňovat své viroporinové vlastnosti, tvořit oligomerní transmembránové póry a permeabilizovat membránu. Interakce agnoproteinů s DAP3 komplexem je tak jedním z příkladů zneužití hostitelského mechanismu ve prospěch viru (Suzuki *et al.*, 2013).

### 3. Cíle práce

V naší laboratoři se zabýváme studiem základních životních dějů virů z čeledi *Polyomaviridae*, a to zejména modelového zástupce této čeledi – Myšího polyomaviru a lidského polyomaviru BK. Jedním z našich dlouhodobých cílů je objasnění role minoritních proteinů v životním cyklu viru. Tato práce navazuje na předchozí výzkum členů naší laboratoře. Mannová a kolektiv (2002) ukázali, že minoritní proteiny jsou nepostradatelné pro úspěšné doručení virového genomu do buněčného jádra (Mannová *et al.*, 2002). Dále bylo ukázáno, že minoritní proteiny MPyV interagují s buněčnými membránami, jsou schopny navodit apoptózu buněk a mohly by vykazovat vlastnosti viroporinů (Huerfano *et al.*, 2010). Ve své práci jsem porovnávala minoritní proteiny MPyV a BKV polyomavirů.

Cílem mé diplomové práce proto bylo:

**A) Připravit králičí polyklonální protilátku specificky rozpoznávající minoritní proteiny MPyV nebo BKV viru, vhodnou pro studium jejich vzájemných interakcí a interakcí s hostitelskými proteiny a strukturami**

**B) Zjistit, zda minoritní proteiny BKV viru vykazují při samostatné expresi v savčích buňkách stejnou míru cytotoxicity, jako minoritní proteiny MPyV**

**C) Charakterizovat potenciální komplexy minoritních proteinů MPyV a BKV vznikající jak interakcí s buněčnými proteiny tak i schopnost oligomerizace mezi monomery navzájem**

Součástí tohoto cíle bylo:

- **Ověřit, že po individuální expresi minoritních proteinů v savčích buňkách dochází k tvorbě makromolekulárních komplexů**
- **Optimalizovat metodu modré nativní elektroforézy pro studium interakcí minoritních proteinů**
- **Připravit expresní vektory pro studium lokalizace a pro vyhledání interakčních partnerů minoritních proteinů v savčích buňkách**

## 4. Materiál a metody

### 4.1. Bakteriální kmeny

**Bakteriální kmen *Escherichia coli* TOP10 (Thermo Fischer Scientific):** F<sup>-</sup> *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74* *recA1* *araD139*  $\Delta$ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL*(StrR) *endA1* *nupG*

**Bakteriální kmen *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ :** F<sup>-</sup>  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1* *endA1* *hsdR17* (rk<sup>-</sup>, mk<sup>+</sup>) *phoA* *supE44*  $\lambda$ *thi*<sup>-1</sup> *gyrA96* *relA1*

### 4.2. Buněčné linie

**Lidská buněčná linie HEK 293T** Stabilní buněčná linie lidských embryonálních ledvinných buněk immortalizovaných adenovirem a dále obsahujících integrovaný genom viru SV40. Linie byla získána of RNDr. Michala Šmahela Ph.D., Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha.

**Myší buněčná linie 3T6** Stabilní buněčná linie myších fibroblastů, senzitivní a permissivní pro Myší polyomavirus (ATCC; CCL-96)

**Myší buněčná linie NIH 3T3** Stabilní buněčná linie myších embryonálních fibroblastů (ATCC; CRL-1658)

**Myší buněčná linie WOP** Buněčná linie myších embryonálních fibroblastů 3T3 stabilně produkující velký T-antigen Myšího polyomaviru (Dailey & Basilico, 1985)

**Hmyzí buněčná linie Sf9** Buněčná linie odvozená z ovaríí můry blyškovky *Spodoptera frugiperda* (ATCC; CRL-1711)

### 4.3. Rekombinantní bakuloviry

Rekombinantní bakulovirus produkující hlavní kapsidový protein VP1 a minoritní protein VP2 Myšího polyomaviru (Řípová, 2002)

Rekombinantní bakulovirus produkující hlavní kapsidový protein VP1 a minoritní protein VP2 polyomaviru BK (Hrušková, nepublikovaný výsledek)

### 4.4. Vektory

**phGf** Cílový vektor pro klonování pomocí LR rekombinace. Obsahuje attR1 a attR2 místa, která umožňují vložení genu našeho zájmu z donorového vektoru pomocí rekombinace *in vitro*. Vložený gen je pod kontrolou silného eukaryotického promotoru E1a. Dále vektor obsahuje sekvence pro stabilizaci RNA transkriptu vloženého genu našeho zájmu a sekvenci

kódující protein GFP pod kontrolou časného promotoru viru SV40. (Buck *et al.*, 2006; Addgene plazmid 22517).

- ph2p** Vektor pro expresi proteinu VP2 Myšího polyomaviru v savčích buňkách. Gen pro protein VP2 je vložen pod kontrolu silného eukaryotického promotoru E1a a dále vektor obsahuje sekvence pro stabilizaci mRNA genu MPyV VP2. Kodony genu pro protein VP2 byly modifikovány pro zvýšenou produkci proteinu v savčích buňkách. Dále vektor obsahuje sekvenci kódující protein GFP pod kontrolou časného promotoru viru SV40 (Tolstov *et al.*, 2009; Addgene plazmid 22520).
- ph3p** Vektor pro expresi proteinu VP3 Myšího polyomaviru v savčích buňkách. Gen pro protein VP3 je vložen pod kontrolu silného eukaryotického promotoru E1a a dále vektor obsahuje sekvence pro stabilizaci mRNA genu MPyV VP3. Kodony genu pro protein VP3 byly modifikovány pro zvýšenou produkci proteinu v savčích buňkách. Dále vektor obsahuje sekvenci kódující protein GFP pod kontrolou časného promotoru viru SV40 (Tolstov *et al.*, 2009; Addgene plazmid 22521).
- ph2b** Vektor pro expresi proteinu VP2 BKV viru v savčích buňkách. Gen pro protein VP2 je vložen pod kontrolu silného eukaryotického promotoru E1a a dále vektor obsahuje sekvence pro stabilizaci mRNA genu BKV VP2. Kodony genu pro protein VP2 byly modifikovány pro zvýšenou produkci proteinu v savčích buňkách. Dále vektor obsahuje sekvenci kódující protein GFP pod kontrolou časného promotoru viru SV40 (Tolstov *et al.*, 2009; Addgene plazmid 32109).
- ph3b** Vektor pro expresi proteinu VP3 BKV viru v savčích buňkách. Gen pro protein VP3 je vložen pod kontrolu silného eukaryotického promotoru E1a a dále vektor obsahuje sekvence pro stabilizaci mRNA genu BKV VP3. Kodony genu pro protein VP3 byly modifikovány pro zvýšenou produkci proteinu v savčích buňkách. Dále vektor obsahuje sekvenci kódující protein GFP pod kontrolou časného promotoru viru SV40 (Tolstov *et al.*, 2009; Addgene plazmid 32110).
- pMPyV VP2-biotin** Vektor pro expresi fúzního proteinu VP2-BE Myšího polyomaviru v savčích buňkách. Sekvence proteinu VP2 je fúzovaná na jeho C-konci s capTEV kotvou, která umožňuje *in vivo* biotinylací a afinitní purifikaci rekombinantního proteinu a s ním asociovaných komplexů. (Fraiberk, nepublikováno)
- pMPyV VP3-biotin** Vektor pro expresi fúzního proteinu VP3-BE Myšího polyomaviru v savčích buňkách. Sekvence proteinu VP2 je fúzovaná na jeho C-konci s capTEV kotvou, která umožňuje *in vivo* biotinylací a afinitní purifikaci rekombinantního proteinu a s ním asociovaných komplexů. (Fraiberk, nepublikováno)
- pBKV VP2-biotin** Vektor pro expresi fúzního proteinu VP2-BE BKV viru v savčích buňkách. Sekvence proteinu VP2 je fúzovaná na jeho C-konci s capTEV kotvou, která umožňuje *in vivo* biotinylací a afinitní purifikaci rekombinantního proteinu a s ním asociovaných komplexů. (Fraiberk, nepublikováno)
- pBKV VP3-biotin** Vektor pro expresi fúzního proteinu VP3-BE BKV viru v savčích buňkách. Sekvence proteinu VP2 je fúzovaná na jeho C-konci s capTEV kotvou,

kteřá umořňuje *in vivo* biotinylaci a afinitní purifikaci rekombinantního proteinu a s ním asociovaných komplexů. (Fraiberk, nepublikováno)

**pENTR™/D-TOPO®** Donorový vektor pro klonování pomocí LR rekombinace. Obsahuje attL1 a attL2 místa, která umožňují vložení genu našeho zájmu do cílového vektoru pomocí rekombinace *in vitro*. Gen našeho zájmu je do vektoru vložěn přímým klonováním za pomoci DNA topoizomerázy I. (Thermo Fischer Scientific).

#### 4.5. DNA primery

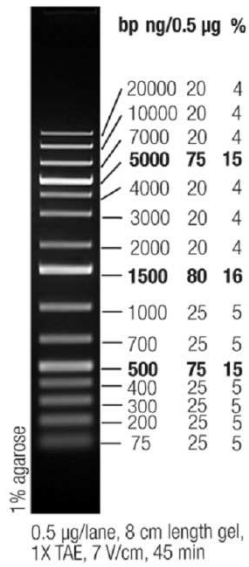
Veškeré sekvence jsou psány ve směru od 5' konce k 3' konci. Nekomplementární přídatné sekvence nezbytné pro TOPO® klonování jsou označeny červeně.

Primer	Sekvence	Popis
Primer č. 1	BKV VP2/TOPO_FW: <b>CACCATGGGTGCTGCTCTAGC</b>	Primer „forward“ pro amplifikaci genu pro protein VP2 viru BKV s capTEV z vektoru pBKV VP2-biotin
Primer č. 2	BKV VP3/TOPO_FW: <b>CACCATGGCTTTGGAATTGTT</b>	Primer „forward“ pro amplifikaci genu pro protein VP3 viru BKV s capTEV z vektoru pBKV VP3-biotin
Primer č. 3	MPyV VP2/TOPO_FW: <b>CACCATGGGAGCCGCACTGACTATTC</b>	Primer „forward“ pro amplifikaci genu pro protein VP2 viru MPyV s capTEV z vektoru pMPyV VP2-biotin
Primer č. 4	MPyV VP3/TOPO_FW: <b>CACCATGGCGTTGATACCATGGC</b>	Primer „forward“ pro amplifikaci genu pro protein VP3 viru MPyV s capTEV z vektoru pMPyV VP3-biotin
Primer č. 5	BioEase kotva CT/TOPO_REV: <b>CTATCATTACTAGGATCCAGAGC</b>	Primer „reverse“ použitý pro amplifikaci všech čtyř výše zmíněných genů pro minoritní proteiny MPyV a BKV s capTEV značkou
Primer č. 6	M13_FW: <b>GTAAAACGACGGCCAGT</b>	Sekvenační primer „forward“ pro ověření vložení genu našeho zájmu do vektoru pENTR™/D-TOPO®.
Primer č. 7	M13_REV: <b>GTCATAGCTGTTTCCTG</b>	Sekvenační primer „reverse“ pro ověření vložení genu našeho zájmu do vektoru pENTR™/D-TOPO®.

## 4.6. Markery molekulových hmotností

### 1) DNA marker molekulových hmotností:

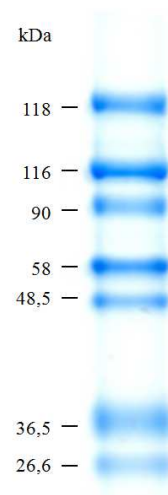
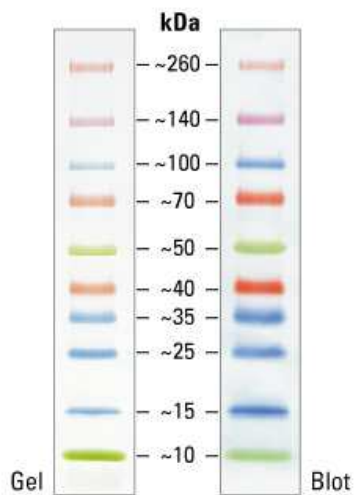
GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fischer Scientific)



### 2) SDS-PAGE markery molekulových hmotností:

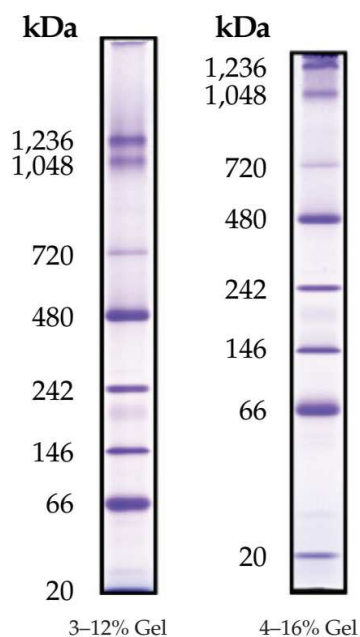
Spectra™ Multicolor Broad Range Protein  
Ladder (Thermo Fischer Scientific)

Prestained Molecular Weight Marker, M.W.  
26,600-180,000 (Sigma-Aldrich)



### 3) Blue Native - PAGE marker molekulových hmotností:

NativeMark™ Unstained Protein Standard (Thermo Fischer Scientific)



## 4.7. Protilátky

### 4.7.1. Primární protilátky

- $\alpha$ -MPyV VP2/3** Králičí polyklonální protilátka proti minoritním proteinům VP2 a VP3 MPyV (antigen připraven v rámci této diplomové práce, Exbio Praha)
- $\alpha$ -MPyV C-term VP2/3** Králičí polyklonální protilátka proti C-terminálnímu peptidu (CTVIEEDGPQKKK) společnému minoritním proteinům VP2 a VP3 MPyV (Clonestar Peptide Services)
- $\alpha$ -BKV VP2/3** Králičí polyklonální protilátka proti minoritním proteinům VP2 a VP3 BKV (antigen připraven v rámci této diplomové práce, Exbio Praha)
- $\alpha$ -BKV C-term VP2/3** Králičí polyklonální protilátka proti C-terminálnímu peptidu (CKTTNKRRSRSSRS) společnému minoritním proteinům VP2 a VP3 BKV (Clonestar Peptide Services)
- $\alpha$ -GFP – AF 488** Králičí polyklonální protilátka proti GFP proteinu konjugovaná s Alexa Fluor 488 (Thermo Fischer Scientific)
- $\alpha$ -biotin** Králičí polyklonální protilátka proti biotinu (Bethyl Laboratories)
- $\alpha$ -Hsp70** Myší polyklonální protilátka proti rodině „heat shock“ proteinů 70 (Santa Cruz Biotechnology)

### 4.7.2. Sekundární protilátky

- G $\alpha$ Rb – AF 488** Kozí monoklonální protilátka proti králičím imunoglobulinům IgG konjugovaná s Alexa Fluor 488 (ředění IF 1:1000, Life Technologies)

- GaRb – AF 546** Kozí monoklonální protilátka proti králičím imunoglobulinům IgG konjugovaná s Alexa Fluor 546 (ředění IF 1:1000, Life Technologies)
- GaRb – HRP** Kozí monoklonální protilátka proti králičím imunoglobulinům IgG konjugovaná s křenovou peroxidázou (ředění WB 1:1000, Bio-Rad)
- GaM – HRP** Kozí monoklonální protilátka proti myším imunoglobulinům IgG konjugovaná s křenovou peroxidázou (ředění WB 1:1000, Bio-Rad)

## 4.8. Kultivační média

### 4.8.1. Bakteriální kultivační média

**LB médium:** 1% (w/V) pepton (Imuna), 0,5% (w/V) kvasničný autolyzát (Imuna), 1% (w/V) NaCl

**Low Salt LB médium:** 1% (w/V) pepton (Imuna), 0,5% (w/V) kvasničný autolyzát (Imuna), 0,5% (w/V) NaCl

**TPN médium:** 2% (w/V) pepton (Imuna), 0,5% (w/V) kvasniční autolyzát (Imuna), 0,5% (w/V) NaCl

**SOC médium:** 2% (w/V) pepton (Imuna), 0,5% (w/V) kvasničný autolyzát (Imuna), 20 mM glukóza, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>

**Živný agar č. 2:** 4% živný agar č. 2 v dH<sub>2</sub>O (Biolife)

### 4.8.2. Kultivační média pro savčí buňky

**DMEM médium s 10% sérem:** DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma-Aldrich), 10% (V/V) fetální bovinní sérum (Sigma-Aldrich), 2 mM L-glutamin (Gibco), podle potřeby 1/100 objemu směsi antibiotik pro tkáňové kultury (Sigma-Aldrich)

**DMEM médium bez séra:** DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma-Aldrich), 2 mM L-glutamin (Gibco)

**Médium pro hmyzí buňky s 10% sérem:** TNM-FH insect medium (Sigma-Aldrich), 10% (V/V) fetální bovinní sérum (Sigma-Aldrich), směs antibiotik pro tkáňové kultury (Sigma-Aldrich)

**Médium pro hmyzí buňky bez séra:** TNM-FH insect medium (Sigma-Aldrich)

**RPMI médium:** RPMI-1640 (Sigma-Aldrich)

## 4.9. Použitá selekční antibiotika

Ampicilin (Biomedika, pracovní koncentrace 100 µg/ml)

Kanamycin (MP Biomedicals, pracovní koncentrace 50 µg/ml)

Zeocin (Invivogen, pracovní koncentrace 25 µg/ml)



Směs antibiotik pro tkáňové kultury (Sigma-Aldrich) 100x koncentrovaný roztok obsahuje na 1 ml – 10 000 jednotek penicilinu, 10 mg streptomycinu, 25 mg amphoptericinu B

#### **4.10. Sterilizace materiálu a roztoků**

Plastové špičky, plastové mikrozskumavky a používané roztoky byly sterilizovány v autoklávu při teplotě 120 °C a tlaku 120 kPa po dobu 30 minut. U roztoků, které nebylo možné sterilizovat v autoklávu a u vody pro metodu polymerázové řetězové reakce (PCR), byla pro sterilizaci použita filtrace přes sterilní filtr s póry o průměru 0,22 μm. Chemické sklo bylo po umytí sterilizováno v sušárně horkým vzduchem o teplotě 160 °C po dobu 3 hodin. Skleněné nástroje pro práci s bakteriemi a pinzety byly sterilizovány namočením do denaturovaného 96% ethanolu (V/V) a vyžháním nad plamenem kahanu.

#### **4.11. Práce s bakteriemi**

##### **4.11.1. Kultivace bakterií na agarových plotnách**

V laminárním boxu byl odebrán odpovídající objem bakteriální suspenze a byl přenesen do středu agarové plotny s příslušným selekčním antibiotikem. Bakteriální suspenze byla rovnoměrně rozprostřena po povrchu plotny a miska byla umístěna dnem vzhůru do termostatu s 37 °C na 12 - 16 hodin.

##### **4.11.2. Kultivace bakterií v suspenzi**

V laminárním boxu byla sterilním párátkem z agarové plotny seškrábnuta část narostlé bakteriální monokolonie a byla přenesena do LB média s příslušným selekčním antibiotikem. Pro minipreparace vektorů byla monokolonie zaočkována do plastové mikrozskumavky se 700 μl živného bujónu č. 2 nebo LB média a s příslušným antibiotikem. Pro izolace vektorů pomocí komerčních souprav byly monokolonie zaočkovány do odpovídajícího objemu LB nebo Low Salt LB média (obvykle 5 ml pro minipreparace DNA, 25 ml pro midi nebo maxipreparace DNA). Suspenze byly kultivovány v orbitálním inkubátoru při 200 rpm a 37 °C 12 - 16 hodin.

##### **4.11.3. Příprava kompetentních bakterií pro elektroporaci**

Bakterie kmene *E. coli* DH5α nebo TOP10 z konzervy byly sterilním párátkem zaočkovány do 10 ml TPN média a kultivovány v orbitálním inkubátoru (200 rpm) při 37 °C. Po 10-16 hodinách kultivace byla změřena optická denzita při 600 nm ( $OD_{600}$ ), bakteriální suspenze byla naředěna do 650 ml TPN média na výslednou  $OD_{600} = 0,1$  a byla dále kultivována v orbitálním inkubátoru při 37 °C. Průběžně byla měřena  $OD_{600}$  až do dosažení hodnoty 0,5 – 0,7. V této fázi byla bakteriální suspenze převedena do plastových zkumavek o objemu 50 ml a peletována centrifugací 10 minut, 4000 g při 4 °C. Od tohoto okamžiku probíhala všechna práce s bakteriální kulturou na ledu. Bakteriální pelet byl resuspendován v 600 ml sterilní deionizované demineralizované vody (ddH<sub>2</sub>O) vychlazené na 4 °C a

zнову peletován centrifugací za stejných podmínek. Pelet byl znovu resuspendován, tentokrát ve 300 ml ddH<sub>2</sub>O a opět peletován za stejných podmínek. Bakteriální pelety byly resuspendovány ve 24 ml sterilního 10% (V/V) roztoku glycerolu, opět peletovány centrifugací a resuspendovány ve 12 ml sterilního 10% (V/V) roztoku glycerolu. Následovala poslední centrifugace, po níž byl pelet resuspendován v 1,2 ml sterilního 10% roztoku glycerolu a rozplněn po alikvótech 50  $\mu$ l nebo 100  $\mu$ l do sterilních vychlazených plastových mikrozkuvek. Mikrozkuvky byly rychle zamraženy v tekutém dusíku a dále uchovávány při -80 °C.

#### **4.11.4. Transformace elektrokompetentních bakterií elektroporací**

Z bakteriální konzervy kompetentních bakterií kmene *E. coli* DH5 $\alpha$  nebo TOP10 bylo po rozmrznutí na ledu odebráno 45  $\mu$ l suspenze a přeneseno do nové vychlazené plastové mikrozkuvky. Dále bylo přidáno 1 – 2  $\mu$ l roztoku obsahujícího 1 pg – 300 ng DNA pro transformaci bakterií (vektor nebo ligační směs), po promíchání byl obsah mikrozkuvky inkubován 1 minutu na ledu a převeden do předem vychlazené elektroporační kyvety (Bio-Rad, vzdálenost elektrod 2 mm). Kyveta byla zvenku osušena a vložena do elektroporátoru Gene Pulser Apparatus (Bio-Rad), byl aplikován pulz stejnosměrného elektrického proudu s parametry 2,5 kV, 25  $\mu$ F a 200  $\Omega$  o délce působení 4 – 5 ms. Bezprostředně poté byl do kyvety přidán 1 ml SOC média bez antibiotik a celý obsah kyvety byl převeden do sterilní Erlenmayerovy baňky. Bakterie byly inkubovány 1 hodinu v orbitálním inkubátoru (200 rpm) při 37 °C a poté byly v několika ředěních vysety na agarové plotny s příslušným antibiotikem (obvykle 10  $\mu$ l, 100  $\mu$ l a 890  $\mu$ l) a inkubovány dnem vzhůru v termostatu při 37 °C, 16 hodin.

#### **4.11.5. Transformace chemicky kompetentních bakterií tepelným šokem**

Do plastové mikrozkuvky s chemokompetentními bakteriemi *E. coli* One Shot® TOP10 (Thermo Fischer Scientific) byly po rozmrznutí na ledu přidány 2  $\mu$ l transformační směsi připravené postupem popsaným v kap. 4.12.10 a směs byla inkubována 10 minut na ledu. Poté byl proveden tepelný šok přenesením plastové mikrozkuvky do vodní lázně vyhřáté na 42 °C po dobu 30 sekund. Ihned poté byly bakterie inkubovány 2 minuty na ledu, poté bylo přidáno 250  $\mu$ l přehřátého SOC média (37 °C) a směs byla inkubována 1 hodinu při 37 °C v orbitálním inkubátoru (200 rpm). Nakonec byly transformované bakterie vysety v objemu 50 a 200  $\mu$ l na agarové plotny s antibiotikem a inkubovány dnem vzhůru v termostatu při 37 °C 16 hodin.

#### **4.11.6. Uchovávání bakterií**

Pro krátkodobé skladování bakterií narostlých na agarových plotnách byly plotny překryty laboratorním parafilmem proti vyschnutí a uchovány při 4 °C dnem vzhůru. Pro dlouhodobé skladování byla bakteriální suspenze smíchána se sterilním roztokem glycerolu tak, že výsledná koncentrace glycerolu byla 20 – 25 % (V/V) a byla uchovávána v plastových mikrozkuvkách při -80 °C.

## 4.12. Práce s DNA

### 4.12.1. Izolace vektorů komerčními soupravami

Suspenze bakterií obsahujících požadovaný vektor byla po inkubaci na třepačce (37 °C, 200 rpm, 16 hodin) peletována centrifugací 7 minut při 4000g. Pelet byl resuspendován v roztoku dodávaném výrobcem soupravy a dále bylo postupováno podle návodu výrobce. Pro izolace vektorů byly použity následující komerční soupravy:

- pro minipreparace vektorů pro použití v bakteriích, PCR apod.
  - GenElute HP Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich)
  - GenBond Plasmid FlexSpin Kit (Renogen Biolab)
- pro midi a maxipreparace vektorů pro použití k transfekci savčích buněk
  - JetStar Plasmid Purification Kit (Genomed)
  - EndoFree Plasmid Maxi Kit (Quiagen)

Pro přečištění DNA po PCR reakci nebo restrikním štěpení byla používána komerční souprava High Pure Purification Kit (Roche).

### 4.12.2. Minipreparace vektorů alkalickou metodou

Do plastových mikrozkušavek se 700 µl živného bujónu č. 2 nebo LB média a s příslušným antibiotikem byly zaočkovány bakteriální monokolonie narostlé na agarových miskách po elektroporaci. Bakterie byly inkubovány v třepačce při 37 °C přes noc při 200 rpm, poté byly peletovány centrifugací 5 minut při 4000g a 4 °C a bakteriální pelet byl resuspendován ve 250 µl Roztoku I (25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA; pH = 8). Bylo přidáno 250 µl čerstvě připraveného lyzačního roztoku II (1% SDS (w/V), 0,2 M NaOH), obsah mikrozkušavky byl promíchán otáčením a následovala inkubace 10 minut při laboratorní teplotě. Pro neutralizaci bylo přidáno 200 µl ledově vychlazeného roztoku III (3 M octan draselný, 11,5 % (V/V) kyselina octová), obsah byl promíchán otáčením a mikrozkušavky byly inkubovány 10 minut na ledu. Vzorky byly peletovány centrifugací 10 minut při 4 °C a 20 000g, supernatant byl opatrně slit do nové plastové mikrozkušavky s 500 µl izopropanolu, obsah byl dobře promíchán a inkubován 10 minut při laboratorní teplotě. Vzorky byly peletovány centrifugací 20 minut při 20 000g a 4 °C, pelet byl promyt 70% ethanolem (V/V) a znovu peletován centrifugací 20 minut při 20 000g a 18 °C. Pelet byl resuspendován ve 20 µl restrikní směsi s RNázou A (10 µg/ml, Thermo Fischer Scientific) pro identifikaci získaného vektoru restrikním štěpením (kap. 4.12.5). Restrikní směs byla inkubována 3 hodiny při 37 °C a následně analyzována pomocí agarózové DNA elektroforézy (kap. 4.12.3).

### 4.12.3. Agarózová DNA elektroforéza

Pro rozdělení DNA vzorků byl nejčastěji používán 0,8 – 1% agarózový gel (w/V) připravený povařením odpovídajícího množství práškové agarózy (Serva) v Tris-acetátovém pufru (TAE; 40mM

Tris, 20 mM kyselina octová, 1 mM EDTA). Po zchladnutí asi na 60 °C byl gel nalit do připravené formy, pro zviditelnění DNA byl přidán do gelu ethidium bromid (do výsledné koncentrace 1 µg EtBr/ml gelu) nebo komerční barva GelRed Nucleic Acid Stain (Biotium, ředění 1:10000), a dále byl do gelu vložen hřeben tvořící jamky o požadovaném objemu. Po ztuhnutí byl z gelu vyňat hřeben, gel byl vložen do elektroforetické aparatury a přelit TAE pufrem. Vzorčky byly nanášeny ve směsi s nanášecí barvou [(40% sacharóza (V/V), 0,12% bromfenolová modř (w/V)] či s komerčním vzorkovým pufrem (DNA Gel Loading Dye 6x, Thermo Fischer Scientific). Elektroforéza probíhala nejčastěji při napětí 5V/cm gelu v TAE pufru po dobu 45 – 90 minut. Vizualizace probíhala pod UV-transiluminátorem.

#### 4.12.4. Izolace DNA z gelu

Požadovaný proužek DNA byl pod UV-transiluminátorem vyříznut skalpelem z agarózového gelu a DNA byla dále izolována pomocí komerční soupravy QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen) dle návodu výrobce.

#### 4.12.5. Restrikční štěpení

Restrikční štěpení probíhalo v objemu 20 – 100 µl a v reakci byla obsažena DNA, restrikční enzym (nebo dva restrikční enzymy najednou), příslušný pufr, 1/10 objemu RNázy A (10 µg/ml, Thermo Fischer Scientific) a ddH<sub>2</sub>O k doplnění na požadovaný objem reakce. Štěpení probíhalo 3 – 16 hodin v termostatu při 37 °C. Enzymy byly poté teplotně inaktivovány zahřátím v termobločku na teplotu doporučenou výrobcem, nebo byly vzorčky rovnou analyzovány na DNA elektroforéze.

#### 4.12.6. Ligace

V případě tzv. „self-cirkularizace“ vektoru byl k ligaci konců použit protokol doporučený výrobcem pro cirkularizaci vektoru ve velkém objemu (pro vyloučení zpětného zaligování vyštěpeného fragmentu a tvorby konkatemerů). Ligace probíhala obvykle v objemu 100 µl, v termobločku při 22 °C 16 – 22 hodin.

#### 4.12.7. Amplifikace DNA fragmentů polymerázovou řetězovou reakcí (PCR)

Pro amplifikaci DNA genů pro minoritní proteiny s BioEase™ značkou a jejich následné TOPO klonování (kap. 4.12.10) byla využita termostabilní polymeráza Pfu (Thermo Fischer Scientific), která vytváří fragmenty s tupými konci. Složení PCR směsi (25 µl) bylo následující:

Složka	Objem
primer forward (0,15 µM)	0,75 µl
primer reverse (0,15 µM)	0,75 µl
templátová DNA (c = 10 ng/µl)	0,25 µl
směs dNTPs (10 mM)	0,5 µl
10x koncentrovaný Pfu pufr + MgSO <sub>4</sub> (Thermo Fischer Scientific)	2,5 µl
Pfu DNA polymeráza (2,5 U/µl, Thermo Fischer Scientific)	0,25 µl
ddH <sub>2</sub> O	20 µl

Reakční program:

<b>Krok</b>	<b>Čas</b>	<b>teplota</b>	<b>Počet opakování</b>
Počáteční denaturace DNA	3 minuty	95 °C	1x
Denaturace DNA	30 sekund	95 °C	
Nasedání primerů	30 sekund	50 – 56 °C	30x
Polymerace	3 minuty	72 °C	
Závěrečná polymerace	10 minut	72 °C	1x

#### **4.12.8. Sekvence DNA**

Veškeré sekvenace byly prováděny sekční Laboratoří Sekvence DNA, Viničná 7, Praha 2. Laboratoř má k dispozici tři přístroje pro sekvenaci: 3130 Genetic Analyzer, 3130xl Genetic Analyzer a 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

#### **4.12.9. Stanovení koncentrace DNA**

Stanovení koncentrace DNA bylo prováděno měřením na přístroji NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific) dle přiloženého návodu. Přístroj měří absorbanční DNA v závislosti na spektrofotometrických vlastnostech naneseného vzorku a převádí ji na koncentraci. Výhodou přístroje je schopnost určit koncentraci DNA i z velmi malého objemu vzorku.

#### **4.12.10. TOPO® klonování**

Vložení amplifikovaného PCR fragmentu do vektoru TOPO® klonováním bylo provedeno podle doporučení výrobce soupravy „pENTR™/D-TOPO® Cloning Kit, with One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Thermo Fischer Scientific).“ Použitý poměr volných konců PCR produktu a komerčního vektoru pENTR D-TOPO™ v reakci byl 1:1, celkové množství DNA v reakci nepřesáhlo 30 ng. Do reakce byl přidán 1 µl roztoku solí, který byl součástí soupravy a celkový objem reakce byl doplněn do 6 µl dH<sub>2</sub>O. Směs byla inkubována 5 minut při laboratorní teplotě a poté byla držena na ledu nebo zamrazena v -20 °C pro pozdější použití. Směs byla následně použita k transformaci chemicky kompetentních bakterií *E. coli* One Shot® TOP10, které jsou také součástí soupravy. Transformace chemokompetentních bakterií tepelným šokem je popsána v kap. 4.11.5. Transformované bakterie byly rozprostřeny na agarové plotny s kanamycinem a inkubovány při 37 °C v termostatu 16 hodin dnem vzhůru. Z vybraných monoklonií byly alkalickou minipreparací nukleových kyselin izolovány tzv. „entry vektory“ a byly ověřeny restrikčním štěpením a sekvenací. Poté byla provedena LR rekombinace ověřeného „entry“ vektoru s „destination“ vektorem, expresním vektorem phGf optimalizovaným pro expresi proteinů v savčích buňkách. V plastové mikrozkuhavce bylo smícháno 150 ng „entry“ vektoru, 150 ng „destination“ vektoru a objem reakce byl doplněn do 8 µl TE pufr (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH = 8). Do reakce byly na ledu přidány 2 µl enzymu „LR Clonase™ II enzyme mix“, směs byla promíchána a inkubována 1 hodinu v termobločku při 25 °C. Pro zastavení reakce byl do každé mikrozkuhavky přidána Proteináza K, následovala inkubace 10 minut v termobločku při 37 °C.

Kompetentní bakterie DH5 $\alpha$  byly transformovány 2  $\mu$ l LR rekombinační směsí elektroporací. Pozitivní kolonie byly selektovány na agarových plotnách s ampicilinem.

## **4.13. Práce s buněčnými kulturami**

### **4.13.1. Pasážování buněk**

#### **4.13.1.1. Pasážování savčích buněk HEK 293T, NIH 3T3, NIH 3T6 a WOP**

Skleněnou pasterovou pipetou bylo odsáto médium z buněčné kultury narostlé na Petriho misce na požadovanou konfluenci, buňky byly opláchnuty verzenem (0,02% roztok EDTA v PBS\*), poté byl přidán trypsin (300  $\mu$ l/Petriho miska  $\varnothing$  60 mm; 500  $\mu$ l /Petriho miska  $\varnothing$  100 mm) a následovala inkubace 5 minut v termostatu při 37 °C s 5% atmosférou CO<sub>2</sub>. Bylo přidáno DMEM médium přehřáté na 37 °C s 10% (V/V) fetálním bovinním sérem, buňky byly důkladně resuspendovány a suspenze byla rozdělena na nové Petriho misky s přehřátým DMEM médiem s 10% fetálním bovinním sérem (37 °C). Pasážování buňčné suspenze ku médiu probíhalo v definovaném poměru podle buněčného typu a rychlosti růstu; buňky NIH 3T3, NIH 3T6 a WOP byly pasážovány dvakrát týdně v poměru 1:6 až 1:20, lidské buňky HEK 293T byly pasážovány dvakrát týdně v poměru 1:10. V případě, že byly buňky kultivovány pro následnou imunofluorescenční detekci proteinů, nejdříve byla do 24 jamkové kultivační destičky vložena sterilní krycí sklíčka. Do každé jamky byl přidán 1 ml DMEM média s 10% (V/V) FBS a sklíčka byla přitlačena ke dnu jamek sterilní plastovou špičkou. Do každé jamky bylo po spočítání buněk v počítací Bürkerově komůrce nakapáno odpovídající množství buněčné suspenze a buňky byly inkubovány v termostatu při 37 °C s 5% atmosférou CO<sub>2</sub>.

\***PBS**: 1,37 M NaCl; 0,027 M KCl; 0,018 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH = 7,4; 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  $\times$  12 H<sub>2</sub>O

#### **4.13.1.2. Pasážování hmyzích buněk Sf9**

Hmyzí buňky Sf9 narostlé na Petriho misce v požadovanou konfluenci 90 – 100 % byly seškrábány sterilním pryžovým škrabátkem do stávajícího hmyzího média s 10% FBS (V/V), byly převedeny do 50 ml plastové zkumavky a celkový objem suspenze byl doplněn novým hmyzím médiem na čtyřnásobek objemu suspenze sklizených buněk. Po důkladném resuspendování byly buňky rozděleny na čtyři Petriho misky. Pasážování buňčné suspenze v poměru buňčné suspenze ku médiu 1:4 probíhalo obvykle každé 3 dny.

### **4.13.2. Infekce hmyzích buněk Sf9 bakulovirovým inokulem**

Z čerstvě zpasažovaných hmyzích buněk bylo po přichycení buněk k podkladu (alespoň 1 hodina inkubace) odsáto médium. Na Petriho misku o průměru 100 mm byl přidán 1 ml bakulovirového inokula a Petriho misky byly ponechány 60 – 90 minut na kývačce při laboratorní teplotě. Poté bylo do každé Petriho misky opatrně přidáno 9 ml média pro hmyzí buňky s 10% FBS (V/V) a buňky byly dále inkubovány v termostatu při 28 °C.

### **4.13.3. Transfekce savčích buněk**

#### **4.13.3.1. Transfekce pomocí kationických polymerů (TurboFect, Thermo Fischer Scientific)**

Den před transfekcí byly buňky HEK 293T, NIH 3T3 nebo NIH 3T6 z buněčné kultury narostlé na kofluenci 90 – 100 % pasážovány tak, že jejich konfluenci v den transfekce byla asi 70 – 90 %. Oproti doporučenému počtu buněk v návodu byl v případě buněk HEK 293T den před transfekcí nasazen větší počet buněk; pro transfekci prováděnou na Ø 60mm Petriho misce byl použit alikvót  $2,5 \times 10^6$  buněk, pro transfekci prováděnou v 6-jamkové desce alikvót  $1 \times 10^6$  buněk/jamku. Dále probíhala metoda podle návodu výrobce. Odpovídající množství DNA zbavené endotoxinů bylo v plastové mikrozkušavce smícháno s roztokem „TurboFect Transfection Regent“ v odpovídajícím objemu DMEM média bez přidaného fetálního bovinního séra a směs byla inkubována 15 – 20 minut v termostatu při 37 °C s 5% CO<sub>2</sub> atmosférou. Skleněnou pasturovou pipetou bylo odsáto stávající médium z Petriho misky nebo kultivační destičky s buněčnými kulturami a k buňkám bylo přidáno médium čerstvé. Do každé jamky 6-jamkové kultivační destičky pak bylo opatrně nakapáno 400 µl transfekční směsi, v případě transfekce buněk na Petriho misce o Ø 60mm byl použit objem transfekční směsi 600 µl. Stejným způsobem byla prováděna i transfekce buněk na sklíčkách ve 24 jamkové kultivační destičce pro imunofluorescenční detekci proteinů.

#### **4.13.3.2. Transfekce nukleofekcí (Amaya Nucleofector®, Amaya biosystems)**

Buňky byly den před transfekcí pasážovány 1:5, aby v den transfekce dosáhly asi 70% konfluenci. Po odsátí média byly buňky opatrně opláchnuty verzenem a poté byl přidán trypsin (300 nebo 500 µl/Petriho miska Ø 60 mm nebo Ø 100 mm) a následovala inkubace 5 minut v termostatu při 37 °C s 5% atmosférou CO<sub>2</sub>. Bylo přidáno přehřáté DMEM médium, buňky byly resuspendovány, převedeny do 50 ml plastové zkušavky a spočítány v počítací komůrce. Pro transfekce byl použit alikvót  $4 \times 10^6$  buněk. Buňky byly peletovány centrifugací (6 minut, 1 500 g), skleněnou pasturovou pipetou bylo odsáto médium a buněčný pelet byl resuspendován ve 100 µl roztoku Amaya Nucleofector Solution V. Do plastové mikrozkušavky bylo přeneseno 100 µl suspenze, bylo přidáno 6 µg DNA zbavené endotoxinů, obsah byl promíchán a přenesen do elektroporační kyvety (Lonza, vzdálenost elektrod 2 mm). Na přístroji Amaya Nucleofector® (Amaya biosystems) byl vybrán program pro daný buněčný typ (pro 3T3 buňky program U-030) a buňky byly transformovány elektroporací. Ihned po transformaci bylo přidáno 500 µl přehřátého RPMI média na 37 °C, buňky byly jemně resuspendovány a převedeny sterilní plastovou Pasturovou pipetou do nové plastové mikrozkušavky a inkubovány 15 minut v termostatu při 37 °C s 5% CO<sub>2</sub> atmosférou. Buněčná suspenze byla opatrně nakapána na 1 Petriho misku s přehřátým DMEM médiem na teplou 37 °C (Petriho miska o Ø60 mm/Ø100 mm), na 2 jamky 6-jamkové kultivační destičky nebo do 24 jamkové destičky na 10 sklíček pro imunofluorescenční analýzu.

#### **4.13.1. Fixování buněk na mikroskopických sklíčkách**

Buňky narostlé na mikroskopických sklíčkách ve 24 jamkové destičce byly opláchnuty roztokem PBS a po jeho odsátí byly buňky fixovány 30 minut 3% (V/V) paraformaldehydem v PBS. Poté byly buňky permeabilizovány přidáním 0,5% (V/V) roztoku Tritonu X-100 (Sigma-Aldrich) v PBS (200 µl/jamku) a následně byly buňky 3x po 10 minutách opláchnuty PBS.

#### **4.13.2. Nepřímá imunofluorescenční detekce proteinů v buňkách**

Buňky fixované na sklíčkách ve 24 jamkové destičce byly inkubovány 30 – 60 minut v blokačním roztoku pro imunofluorescenci [0,25% BSA (w/V), 0,25% želatina v PBS (w/V)] a poté byly inkubovány 60 – 90 minut s 200 µl primární protilátky vhodně naředěné v blokačním roztoku. Následovalo promývání buněk roztokem PBS 3x 10 minut na třepačce a 30 minutová inkubace se 200 µl sekundární protilátky naředěné v blokačním roztoku. Poté byly buňky opět promyty 3x 10 minut roztokem PBS. Nakonec bylo po odsátí PBS přidáno 200 µl destilované deionizované vody a sklíčka s buňkami byla pinzetou vyňata z destičky a položena na podložní sklíčko do kapky 50% glycerolu (V/V) s DAPI pro obarvení buněčných jader. Buňky byly pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem BX-60 (Olympus).

#### **4.13.3. Izolace částic podobných viru z hmyzích buněk *Sf9***

Po čtyřech dnech inkubace v termostatu při 28 °C byly hmyzí buňky *Sf9* infikované rekombinantním bakulovirem seškrábány škrabátkem do sterilního B-pufru (10 mM Tris-HCl, pH = 7,4; 150 mM NaCl; 0,01 mM CaCl<sub>2</sub>) a převedeny do plastové zkumavky. Buňky byly lyzovány sonikací skříňovým sonikátorem Soniprep150 (Schoeller Pharmacia Praha) na ledu 3x 30 sekund s amplitudou 5 – 10 mikronů. Buněčný lyzát byl peletován centrifugací 10 minut při teplotě 4 °C a 12 000g, supernatant byl slit do výlevky a pelet byl vyšetřen mikroskopicky na přítomnost nerozbitých buněk. Buněčný lyzát byl přečištěn centrifugací přes polštář 10% (V/V) sacharózy v B-pufru 3 hodiny při 4 °C a 35 000 rpm (centrifuga Beckman Optima L-90K, rotor SW41) a rozplaven v B-pufru přes noc. Rozplavený lyzát byl homogenizován ve skleněném ručním homogenizátoru v 500 µl B-pufru a dále centrifugován v gradientu CsCl 20 – 24 hodin při 18 °C a 35 000 rpm (centrifuga Beckman Optima L-90K, rotor SW55TI). Suspenze byla doplněna B-pufrem na hmotnost 2,5 g a bylo přidáno 1,2 g CsCl, celková hmotnost centrifugačních kyvet byla upravena parafínovým olejem. Pokud byly po centrifugaci ve vzorcích okem viditelné proužky, byly tyto proužky odebrány injekční stříkačkou skrz stěnu centrifugační kyvety. Pokud nebyly proužky viditelné, byl gradient rozebrán na rozebírači frakcí (Beckman) do plastových mikrozukumavek. U každé frakce o objemu cca 0,5 ml byl změřen refraktometrický index (refraktometr ABBE, Carl Zeiss Jena), vybrané frakce byly spojeny a použity pro izolaci virových částic. Pro odstranění CsCl ze vzorku byla provedena dvoustupňová dialýza v B-pufru nanesením vzorků do dialyzační membrány (Serva, průměr 16 mm), která byla předem povařena 10 minut v destilované vodě. Pro závěrečné přečištění byla provedena znovu centrifugace přes



polštář 10% sacharózy v B-puftru 3 hodiny při 4 °C a 35 000 rpm (centrifuga Beckman Optima L-90K, rotor SW41). Sediment byl rozplaven v cca 500 µl B-puftru přes noc a rozplněn po alikvótech do plastových mikrozkuavek. Přítomnost virových částic byla ověřena pozorováním v transmisním elektronovém mikroskopu JEOL JEM-1011 s CCD kamerou Veleta, metodou Dot Blot a hemaglutinačním testem.

#### 4.13.4. Negativní barvení preparátů pro elektronovou mikroskopii

Na parafilm byla kápnuta 5µl kapka částic podobných viru v B-puftru a na ní byla položena měděná elektron-mikroskopická síťka pokrytá uhlíkem. Po 10 minutách inkubace při laboratorní teplotě byla síťka pinzetou přenesena na povrch kapky ddH<sub>2</sub>O o objemu 100µl a promývána 2x 30 sekund. Poté byl vzorek kontrastován položením síťky do kapky 2% (V/V) vodného roztoku PTA (H<sub>3</sub>[P(W<sub>3</sub>O<sub>10</sub>)<sub>4</sub>], pH = 7,0) o objemu 50µl a po 2x 30 sekundách inkubace bylo PTA ze síťky odsáto opatrně filtračním papírem a po vysušení na vzduchu byly preparáty pozorovány pod elektronovým mikroskopem JEOL JEM-1011 s CCD kamerou Veleta.

#### 4.13.5. Hemaglutinační test

Do jamek 96 jamkové kultivační destičky bylo multikanálovou pipetou přeneseno 50 µl roztoku PBS pro TK s 0,2% BSA a v něm byly dvojkovou řadou naředěny částice podobné viru následujícím způsobem. Do první jamky bylo přidáno 5 µl částic spolu s 45 µl roztoku PBS pro TK s 0,2% (w/V) BSA (ředění částic v 1. jamce je 1:20), poté byl obsah jamky promíchán a vždy bylo 50 µl obsahu přeneseno do vedlejší jamky atd. Po naředění částic bylo do všech jamek přidáno 50 µl 0,4% roztoku morčecích červených krvinek v roztoku PBS pro TK s 0,2% (w/V) BSA a kultivační destička byla inkubována 1 hodinu při laboratorní teplotě. Poté byl odečten výsledek hemaglutinační schopnosti částic a byl vypočítán počet částic podobných viru/ ml zásobního roztoku podle vzorce (Horníková *et al.*, 2015):

$$\text{Počet částic podobných viru/ml} = \text{počáteční ředění vzorku} \times 2^{n+1} \times 20 \times 10^7$$

Kde n je číslo poslední jamky, ve které došlo k aglutinaci červených krvinek.

#### 4.13.6. Test cytotoxicity minoritních proteinů

Buňky NIH 3T3 byly transfekovány pomocí přístroje Amaxa Nucleofector vektory ph2b, ph3b, ph2p a ph3p nesoucími geny pro jeden z minoritních proteinů polyomavirů MPyV či BKV a zelený fluorescenční protein, vektorem phGf nesoucím pouze zelený fluorescenční protein (GFP), či došlo pouze k aplikaci elektrického šoku za nepřítomnosti cizorodé DNA (tzv. Mock transfekce). Celkem se jednalo o šest různých vzorků. Postup transfekce je popsán v kap 4.13.3.2. Transfekované buňky v 500 µl RPMI média byly naředěny v 5 ml DMEM média s 10% (V/V) FBS předeřátého na 37 °C a byly rozděleny po 500 µl do 6 jamek 24 jamkové kultivační destičky, zbylá část buněk byla inkubována na Petriho misce. Čtyři hodiny po transfekci bylo buňkám vyměněno DMEM médium s 10% (V/V)

FBS, aby byly odstraněny mrtvé buňky, které lyzovaly následkem transfekce (nikoliv ještě na následky exprese minoritních proteinů).

Po další hodině inkubace, když byly buňky již dobře přichyceny k podkladu, byla vypočtena účinnost transfekce. Z Petriho misky bylo odsáto médium, buňky byly opláchnuty Verzenem a inkubovány 5 minut při 37 °C a v 5% CO<sub>2</sub> atmosféře s trypsinem jako při pasážování (kap. 4.13.1.1). Buňky byly resuspendovány v novém DMEM médiu s 10% (V/V) FBS a suspenze byla nanášena do Bürkerovy počítací komůrky. Pole obsahující přibližně 500 – 1000 buněk bylo spočítáno pod Fluorescenčním mikroskopem Olympus BX-60 nejprve ve viditelném světle a následně byl spočítán poměr zeleně svítících buněk (transfekovaných) vůči celkovému počtu buněk a byla stanovena účinnost transfekce.

Sedm hodin po transfekci byl z některých jamek odebrán supernatant do plastové mikrozkušavky (označeno jako „**Experiment**“) a byl nahrazen 500 µl nového DMEM média s 10% (V/V) FBS a 0,9% (V/V) obsahem Tritonu X-100. Takto byly buňky inkubovány 1 hodinu v termostatu při 37 °C s 5% atmosférou CO<sub>2</sub> a následně bylo i toto médium odebráno do plastových mikrozkušavek a uskladněno při 4 °C (označeno jako „**Triton**“). Přidáním Tritonu X-100 bylo docíleno lyze všech zbývajících buněk v jamce, které ještě nelyzovaly následkem produkce minoritních proteinů polyomavirů MPyV či BKV. Po 12 a 24 hodinách bylo stejným způsobem odebíráno a uchováváno médium z ostatních vzorků. V každém čase byly vzorky odebírány v duplikátech.

Míra cytotoxicity minoritních proteinů polyomavirů MPyV a BKV byla stanovena měřením množství enzymu laktát dehydrogenázy (LDH) uvolněné z mrtvých buněk do média. Množství LDH bylo stanoveno z hodnot absorbance vzorků dle návodu výrobce s využitím soupravy The CytoTox 96® Assay (Promega). Vzorky byly před měřením peletovány v centrifuze 5 minut při 5 000 g a 4 °C, do měřících destiček bylo odebráno vždy 25 µl vzorku z horní části mikrozkušavky. Následovala inkubace vzorků 30 minut ve tmě s 25 µl substrátu „Substrate Mix“ při laboratorní teplotě. Působením enzymu LDH uvolněného z mrtvých buněk a přítomného ve vzorku mění původně bezbarvý substrát barvu na červenou; míra zabarvení vzorku a jeho absorbance tak odpovídá množství enzymaticky aktivní LDH ve vzorku. Po inkubaci se substrátem bylo ke vzorkům přidáno 25 µl Stop roztoku (1M kyselina octová), čímž byla reakce substrátu a LDH zastavena a byla měřena absorbance vzorků přístrojem ELISA Reader (BioTek) při fixní vlnové délce 490 nm. Množství mrtvých buněk ve vzorku bylo spočítáno dle vzorce:

$$\text{Mrtvé buňky (\%)} = \frac{\text{OD}_{490} (\text{„Experiment“})}{\text{OD}_{490} (\text{„Experiment“}) + \text{OD}_{490} (\text{„Triton“})} \times 100$$

Tento vzorec udává množství mrtvých buněk ve vzorku, bez ohledu na to jestli exprimovaly daný protein, či nikoliv. Proto byly tyto hodnoty upraveny na efektivitu transfekce dle následujícího vzorce:

$$\text{Cytotoxicita proteinu (\%)} = \frac{\% \text{ mrtvých buněk} - \% \text{ mrtvých buněk Mock}}{\% \text{ efektivita transfekce}} \times 100$$

## 4.14. Práce s Proteiny

### 4.14.1. Lyze buněk

#### 4.14.1.1. Lyze buněk pomocí RIPA pufru

K buněčnému peletu bylo na ledu přidáno v závislosti na množství buněk 500  $\mu$ l – 1,5 ml RIPA pufru [150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 50 mM Tris-HCl; pH=7,4; 0,05% NP-40 (V/V); 1% deoxycholát sodný (w/V); 1% Triton X-100 (V/V, Sigma-Aldrich); 0,1% SDS (w/V)] a inhibitor proteáz PMSF (c = 100  $\mu$ g/ml). Buňky byly resuspendovány nasáváním pipetou a opětovným vypouštěním a poté byly inkubovány 30 minut na ledu. Následně byly lyzátové peletovány centrifugací 30 minut, 20 000g při 4 °C a supernatant byl zamražen pro další použití.

#### 4.14.1.2. Lyze buněk pomocí mRIPA pufru pro test rozpustnosti proteinů

Z transfekovaných buněk na Petriho misce nebo v 6-jamkové kultivační desce bylo na ledu skleněnou Pasteurovou pipetou odsáto médium, buňky byly opláchnuty PBS pro TK a poté bylo přidáno odpovídající množství mRIPA pufru (50 mM Bis-Tris-HCl, pH = 7; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,05% NP 40 (V/V); 1% deoxycholát sodný (w/V); 1% Triton X-100 (V/V); 1M kyselina amino-kapronová) a inhibitor proteáz PMSF. Lyze probíhala na ledu 30 minut, poté byly buňky seškrábány pryžovým škrabátkem a převedeny do plastové mikrozkušavky nebo plastové zkumavky. V závislosti na dalším využití lyzátu byla v některých případech přidána DNáza I (200U/ml, Roche).

### 4.14.2. Test rozpustnosti proteinů pro nativní proteinovou elektroforézu

Myší embryonální fibroblasty NIH 3T3 a lidské HEK 293T buňky byly transfekovány vektory kódujícími sekvence minoritních proteinů MPyV a BKV pomocí turbofekce (viz kap 4.13.3.1.). Buňky byly prohlédnuty pod mikroskopem a 24 hodin po transfekci byla provedena lyze v různých lyzačních roztocích (LP, TX, LM, RIPA nebo mRIPA). Do každé jamky 6-jamkové kultivační destičky bylo přidáno 250  $\mu$ l lyzačního roztoku a po 30 minutách inkubace na ledu byly buňky seškrábány pryžovým škrabátkem, převedeny do plastové mikrozkušavky a v případě použití pufrů LP, TX a LM byly buňky třikrát zamrazeny a rozmrazeny v tekutém dusíku. Následovala centrifugace (15 minut, 20 000 g, 4 °C), k lyzátoům v RIPA nebo mRIPA roztoku byl přidán MgCl<sub>2</sub> do výsledné koncentrace 2 mM a všechny lyzáty byly inkubovány 30 minut na stole s benzonázou (2U/ $\mu$ l, Sigma-Aldrich). Lyzáty byly peletovány v centrifuze (30 minut, 20 000 g, 4 °C), byl odebrán supernatant a k peletu bylo přidáno 250  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O. Vzorky byly povařeny 5 minut při 100 °C s Laemmliho pufrům a naneseny na 12% polyakrylamidový gel. Proběhla proteinová elektroforéza za denaturačních podmínek, jeden gel byl obarven (kap. 4.14.6) a zároveň byl proveden Western blot (kap. 4.14.7) a imunodetekce minoritních proteinů na membráně (kap. 4.14.8).

Složení lyzačních roztoků:

**LP:** 100mM Tris-HCl (pH = 8,0), 100mM KCl, 200mM EDTA, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 700 ng/ml Pepstatin, komerční směs inhibitorů proteáz PMSF (c=100 µg/ml)

**TX:** 100mM Tris-HCl (pH = 8,0), 100mM KCl, 200mM EDTA, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 700 ng/ml Pepstatin, komerční směs inhibitorů proteáz PMSF (c=100 µg/ml), 1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich)

**LM:** 100mM Tris-HCl (pH = 8,0), 100mM KCl, 200mM EDTA, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 700 ng/ml Pepstatin, komerční směs inhibitorů proteáz PMSF (c=100 µg/ml), 1% DDM (Lauryl-β-D-maltosid, Sigma-Aldrich)

**RIPA:** viz kap. 4.14.1.1

**mRIPA:** viz kap. 4.14.1.2

### 4.14.3. Měření koncentrace proteinů podle Bradfordové

Bylo připraveno činidlo Bradfordové podle návodu: 100 mg barvy Coomassie Brilliant Blue G250 (Serva) bylo rozpuštěno v 50 ml 96% (V/V) ethanolu, po rozpuštění krystalků bylo přidáno 100 ml kyseliny fosforečné a roztok byl doplněn ddH<sub>2</sub>O do finálního objemu 1 litr. Byla připravena standardní ředící řada BSA v 0,15 M roztoku NaCl o koncentracích 0 – 0,25 – 0,5 – 0,75 – 1 mg/ml, mezi jednotlivými měřeními byla ředící řada uchovávána při -20 °C. Do plastových kyvet pro měření ve viditelném spektru byl odměřen 1 ml činidla Bradfordové a do každé bylo přidáno 10 µl roztoku z ředící řady, obsah kyvet byl důkladně promíchán. Po jedné minutě inkubace při laboratorní teplotě byla změřena absorbance roztoku při fixní vlnové délce 595 nm a byla vypočtena směrnice standardní přímky. Vzorek o neznámé koncentraci proteinu byl vhodně naředěn do 0,15 M roztoku NaCl a smíchán s 1 ml činidla Bradfordové. Po jedné minutě inkubace byl vzorek přenesen do plastové kyvety a byla změřena absorbance při vlnové délce 595 nm. Koncentrace proteinu ve vzorku byla poté odečtena ze stanovené standardní křivky.

### 4.14.4. Denaturační proteinová elektroforéza SDS-PAGE

(Laemmli, 1970)

Byla sestavena aparatura PAGE vertical apparatus Hoefer Mighty Small II (Hoefer) pro přípravu polyakrylamidových gelů a destilovanou vodou byla ověřena její těsnost. Aparatura byla vypláchnuta 96% ethanolom (V/V) a pečlivě vysušena. Byl připraven polyakrylamidový (PAA) gel: spodní dělicí 10 nebo 12% gel s horním zaostřovacím 5% gelem. Připravené gely byly umístěny do aparatury pro elektroforézu a zality pufrém pro elektroforézu (25 mM Tris, 192 mM glycin, 0,1% SDS (w/V), pH = 8,3). Vzorky byly smíchány s 5x koncentrovaným Laemmliho pufrém v poměru 4:1 a byly inkubovány při 100 °C po dobu 5 minut. Výsledná koncentrace Laemmliho pufru ve vzorcích byla 1% SDS (w/V), 10 mM Tris-HCl, pH = 6,8, 5% β-merkptoethanol (V/V), 10% glycerol (V/V) a 0,001% bromfenolová modř (w/V). Do každé jamky bylo Hamiltonovou jehlou nanášeno 5 – 30 µl vzorku a SDS-PAGE probíhala 30 minut při napětí 8V/ cm gelu a poté při napětí 14V/ cm gelu cca 2 – 3 hodiny. Velikost

proteinů byla stanovena podle markeru molekulových hmotností Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Fischer Scientific) nebo Prestained Molecular Weight Marker, M.W. 26,600-180,000 (Sigma-Aldrich).

#### **4.14.5. Modrá nativní proteinová elektroforéza Blue Native PAGE (BN-PAGE)**

Podle návodu výrobce (Thermo Fischer Scientific) byly namíchány Katodové pufrы Dark Blue [50 mM Tricin, 15 mM Bis-Tris-HCl, pH = 6,8, 0,02% Coomassie Brilliant Blue G-250 (w/V)] a Light Blue [50mM Tricin, 15mM Bis-Tris-HCl, pH = 6,8, 0,002% Coomassie Brilliant Blue G-250 (w/V)] a Anodový pufr (50 mM Bis-Tris-HCl, pH = 6,8). Z komerčního gradientového gelu („NativePAGE™ Novex® Bis-Tris 3-12% Gels (1.0 mm)“, Thermo Fischer Scientific) byl odstraněn hřeben a bezpečnostní proužek, jamky byly propláchnuty dvakrát 1 ml anodového pufru a poté 1 ml katodového Dark Blue pufru a gel byl upevněn do elektroforetické aparatury. Do vnitřní části aparatury byl nalit katodový Dark Blue pufr, do vnější části Anodový pufr. Vzorky byly po změření koncentrace metodou Bradfordové (kap. 4.14.3) smíchány podle návodu výrobce se vzorkovým pufrém „NativePage Sample Buffer“ (50 mM Bis-Tris-HCl, 50 mM NaCl, 10% glycerol (V/V), 0,001% Ponceau S (w/V), pH=7,2) v poměru 4:1 a s aditivem „NativePAGE 5% G-250 Sample Additive“ [5% Coomassie Brilliant Blue G-250 (w/V) v H<sub>2</sub>O] v poměru 9:1 z výsledného objemu. Proteiny byly separovány při 4 °C v komerčním gradientovém PAA gelu 1 hodinu při napětí 150 V a poté při napětí 250 V. Po 40 minutách, když čelo vzorků bylo asi v 1/3 gelu, byl vyměněn katodový Dark Blue pufr za Light Blue pufr. Elektroforéza byla ukončena po dalších 50 minutách, kdy dosáhlo čelo vzorků spodního okraje gelu.

#### **4.14.6. Fixace a barvení polyakrylamidových gelů**

Po proběhnutí elektroforézy byl gel vyňat z aparatury a důkladně opláchnut destilovanou vodou, pomocí skalpelu byl odstraněn zaostřovací gel s jamkami. Gely byly dále barveny dvěma způsoby:

1) Gel byl na 30 minut vložen do Petriho misky s 50 ml fixačního roztoku (40% methanol (V/V), 10% kyselina octová (V/V) v ddH<sub>2</sub>O), poté byl gel při pokojové teplotě 16 hodin barven ve 25 ml barvicího roztoku [0,5% Coomassie Brilliant Blue G250(w/V)]. Barvicí roztok byl následně recyklován a gel byl několik hodin promýván destilovanou vodou do odbarvení pozadí.

2) Gel byl vložen do Petriho misky s 25 ml barvy GelCode Blue Stain Reagent (Thermo Fischer Scientific) a byl inkubován 1 hodinu bez předchozí fixace. Barva byla poté recyklována a gel byl promýván asi 1 hodinu destilovanou vodou do odbarvení pozadí.

#### **4.14.7. Imobilizace proteinů na membráně**

Při použití metody Dot Blot byly na nitrocelulózovou membránu NC-45 (Serva) nakapány vzorky proteinů v nativním stavu (nepovařené buněčné lyzáty) a NC membrána byla ponechána do zaschnutí

vzorků na vzduchu. Poté byla membrána blokována v 5% odtučněném mléce v PBS (w/V) a proteiny byly následně detekovány pomocí specifických protilátek (kap. 4.14.8).

Při detekci proteinů po SDS-PAGE nebo BN-PAGE bylo nutné proteiny přenést z gelu a imobilizovat je na membráně. K tomu bylo využito metody „wet blot.“ Bylo připraveno 1,5 l blotovacího pufru pro SDS-PAGE (25mM Tris, 195mM glycin, 20% methanol (V/V), pH = 8,3) nebo blotovacího transferového pufru pro BN-PAGE (25 mM bicin, 25 mM Bis-Tris, 1 mM EDTA, pH = 7,2) a pufr byl vychlazen na 4 °C. Gel byl vyňat z elektroforetické aparatury a po odříznutí zaostřovacího gelu byl vložen do blotovacího pufru. Mezitím byl ve vychlazeném blotovacím pufru sestaven do plastových mřížek blotovací sendvič („wet blot“): 3 filtrační papíry, 1x Whatman® 3 mm filtrační papír (Sigma-Aldrich) a nitrocelulózoová membrána NC-45 (Serva), na níž byl mokkými rukavicemi opatrně přenesen polyakrylamidový gel. Ten byl následně překryt opět jedním filtračním papírem Whatman® 3 mm (Sigma-Aldrich) a třemi filtračními papíry, sendvič byl uzavřen do plastové mřížky se dvěma molitany a vložen do blotovací aparatury Hoefer naplněné vychlazeným blotovacím pufrům. Pro imunodetekci vzorků z BN-PAGE byla vždy využívána PVDF membrána Hybond-P (GE Healthcare). V případě použití PVDF membrány byla tato membrána před použitím aktivována ponořením do 100% (V/V) methanolu na 15 sekund, položena do Petriho misky s destilovanou vodou a následně byla inkubována 15 minut v blotovacím pufru. Migrace proteinů z gelu na membránu probíhala 3 hodiny za průchodu stejnosměrného proudu o velikosti 2,5 mA/cm<sup>2</sup> a stálého chlazení aparatury. Poté byl blotovací sendvič rozebrán, membrána byla opláchnuta PBS a následovala imunodetekce proteinů (kap. 4.14.8).

#### **4.14.8. Imunodetekce proteinů imobilizovaných na membráně**

Po ukončení přenosu proteinů z PAA gelu po BN-PAGE byla PVDF membrána fixována 15 sekund v 8% kyselině octové (V/V), byla usušena na vzduchu a poté ponořena na 1 minutu do methanolu, aby se odbarvila od zbytku Coomassie Brilliant Blue G-250. Membrána byla poté rehydratována 5 minut v destilované vodě, 10 minut v PBS a blokována alespoň 45 minut v 5% (w/V) odtučněném mléce v PBS. Další postup se shoduje s imunodetekcí prováděnou na NC membráně.

NC membrána se vzorky po metodě Dot blot nebo Western blot byla inkubována 1 hodinu v 5% odtučněném mléce v PBS (w/V). Poté byla membrána inkubována 1 hodinu s primární protilátkou naředěnou v 5% odtučněném mléce v PBS (w/V) při laboratorní teplotě. Následovalo promývání membrány 3x 10 minut PBS a 30 minutová inkubace membrány se sekundární protilátkou konjugovanou s křenuvou peroxidázou naředěnou v 5% odtučněném mléce v PBS (w/V). Membrána byla opět promývána 3x 10 minut v PBS. Membrána byla vyvolána pomocí „SuperSignal West Femto Maximum sensitivity Substrate“ soupravy (Thermo Fischer Scientific) a signál byl detekován na radiografickém filmu (Foma) nebo byl zachycen pomocí přístroje Amersham™ Imager 600 (GE Healthcare Life Sciences).

#### 4.14.9. Odmytí protilátek z membrány pro detekci dalšího antigenu

Membrána byla inkubována 15 minut při 37 °C v 1 ml 30% vodného roztoku H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (V/V), následovala inkubace 15 minut v dH<sub>2</sub>O, 15 minut v PBS a 1 hodinu v 5% mléce v PBS (w/V). Poté už byla membrána inkubována s primární protilátkou podle postupu popsaného v kap. 4.14.8.

#### 4.14.10. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA test)

Jako proteinový antigen pro pokrytí povrchu dna jamek 96 jamkové mikrotitrační destičky byl použit lyzát buněk 3T3, které byly transfekované vektorem ph2p nebo ph2b. Lyzát byl připraven 24 hodin po transfekci, současně byl připraven i lyzát netransfekovaných buněk sloužící jako negativní kontrola. Buňky byly seškrábány sterilním pryžovým škrabátkem do PBS pro TK, peletovány v centrifuze (4000g, 5 minut) a resuspendovány v malém objemu PBS pro TK (cca 1 ml/Petriho misku Ø 100mm). Buňky byly třikrát zmrazeny v tekutém dusíku a rozmrazeny na stole při laboratorní teplotě, peletovány v centrifuze (20 minut, 20 000g, 4 °C) a do nových plastových mikrozkušavek bylo odebráno 100 µl supernatantu. Ke vzorku bylo přidáno SDS, DTT, EDTA a Tris-HCl pH = 8,5 do výsledné koncentrace ve vzorku 2% SDS (w/V); 50 mM DTT; 25 mM EDTA a 50 mM Tris-HCl pH = 8,5. Směs byla inkubována 10 minut při 65 °C v termobločku a následně byla naředěna v poměru 1:500 do PBS pro TK. Vzorky byly rozplněny po 100 µl do jamek mikrotitrační destičky, přelepeny fólií proti vyschnutí a ponechány 24 hodin ve 4 °C pro navázání proteinů na dno jamek. Jamky byly promyty 4x 200 µl roztoku PBS s 0,1% Tween 20 (V/V), poté bylo do každé jamky přidáno 200 µl 5% odtučněného mléka v PBS, destička byla opět přelepena fólií a inkubována 1 hodinu při laboratorní teplotě. Mléko bylo odsáto, jamky byly promyty 4x 200 µl roztoku PBS s 0,1% Tween 20 a bylo přidáno 100 µl primární protilátky. Pro testování funkčnosti byly protilátky připraveny v různých ředěních v 5% mléce v PBS (w/V) a destička byla inkubována 1 hodinu při laboratorní teplotě. Následovalo opět promytí jamek 4x 200 µl roztoku PBS s 0,1% Tween 20 (V/V) a inkubace se 100 µl sekundární protilátky konjugované s křenovou peroxidázou 1 hodinu při laboratorní teplotě. Na závěr byly jamky opět promyty 4x 200 µl roztoku PBS s 0,1% Tween 20 (V/V) a bylo přidáno 50 µl vyvolávacího roztoku (1 ml ABTS\*, 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 11 ml citrátový pufr\*\*). Destička byla inkubována 10 minut při laboratorní teplotě a poté byla změřena absorbance při fixní vlnové délce 415 nm přístrojem ELISA Reader (BioTek).

\***ABTS** = 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonát), Sigma-Aldrich (#A1888, c = 4 mg/ml)

\*\* **Citrátový pufr**: 0,1M kyselina citronová (pH = 4)

#### **4.14.11. Chemické zesíťování proteinů (crosslinking)**

Chemické zesíťování proteinů v buňkách je možné provádět různými způsoby. V této práci byl postup navržen na základě článku (Suzuki *et al.*, 2010). Lidské 293T buňky nebo myší 3T3 buňky byly transfekovány vektory nesoucími sekvence minoritních proteinů virů MPyV a BKV byly 24 hodin po transfekci seškrábány z povrchu kultivační misky pryžovým škrabátkem, převedeny do plastové zkumavky, peletovány v centrifuzě 6 minut při 1 500 g a pelet byl opláchnut PBS pro TK. Po další centrifugaci za stejných podmínek byl buněčný pelet resuspendován v 500  $\mu$ l nového PBS pro TK a převeden do plastové mikrozukavky. K buněčné suspenzi bylo přidáno ireverzibilní zesíťovací činidlo DSS (disukcinimidyl suberát, Thermo Fischer Scientific) tak, že jeho výsledná koncentrace byla 0 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM a 5 mM. Zesíťování proteinů probíhalo 2 hodiny ve 4 °C, poté byla chemická reakce zastavena 30 minutovou inkubací s 50mM Tris-HCl (pH = 7,4) ve 4 °C. Buňky byly lyzovány v RIPA pufru a proteinové komplexy byly separovány pomocí SDS-PAGE (kap. 4.14.4), imobilizovány na NC membráně a detekovány specifickými protilátkami.

#### **4.14.12. Vytipování peptidu pro přípravu protilátky proti C-terminální oblasti minoritních proteinů MPyV a BKV**

Pro přípravu nové polyklonální protilátky byl využit přístup zahrnující syntézu zvoleného peptidu pro imunizaci. Protože mají minoritní proteiny VP2 a VP3 společnou C-koncovou oblast, byl zvolen v případě MPyV i BKV viru peptid z této společné oblasti. Byly nasyntetizovány peptidy o sekvenci CTVIEEDGPQKKK resp. CKTTNKRRSRSSRS pro přípravu protilátky proti minoritním proteinům MPyV, resp. BKV. Tyto peptidy byly následně pro zvýšení imunogenicity konjugovány s epitopem KLH. Těmito peptidy byla provedena imunizace králíků pro přípravu protilátek; imunoglobuliny byly z krevního séra izolovány afinitní chromatografií. Syntéza peptidu i příprava protilátky byly provedeny firmou Clonestar Peptide Services (Brno).

#### **4.14.13. Příprava materiálu pro imunizaci králíků k výrobě polyklonální protilátky**

Myší WOP buňky 4 h po transfekci BKV VP2 přístrojem Amaxa Nucleofector a lidské 293T buňky 24 h po transfekci MPyV VP2 Turbofectem byly seškrábány pryžovým škrabátkem a lyzovány pomocí RIPA pufru (kap. 4.14.1.1). Byla provedena SDS-PAGE, kromě Markeru molekulových hmotností bylo do jedné jamky gelu vždy nanášeno také 30  $\mu$ l virových částic VP1/2 odpovídajícího viru. Po proběhnutí elektroforézy byl gel ihned přenesen do ledově vychlazeného 0,1 M roztoku KCl, v němž došlo k reverzibilnímu vysrážení proteinů a jejich dočasné vizualizaci. Podle výšky proužku minoritních proteinů VP2 polyomavirů MPyV a BKV z izolovaných virových částic byla z gelu skalpelem vyříznuta odpovídající oblast separovaného buněčného lyzátu a přenesena do plastových mikrozukavek. Tyto proužky gelu obsahující minoritní proteiny byly zmrazeny v tekutém dusíku a homogenizovány pomocí sterilního plastového tyčinkového homogenizátoru. Následně byla gelová drť rozpuštěna ve 100  $\mu$ l PBS pro TK a zamrazena v -20 °C pro pozdější imunizaci králíků k přípravě polyklonálních protilátek.



Polyakrylamid v tomto případě posloužil jako adjuvans. Antigen byl připravován podle modifikovaného protokolu z časopisu *Current Protocols in Molecular Biology* zveřejněného on-line v roce 2001 (Fuller *et al.*, 2001). Imunizace a izolace protilátky byla provedena firmou Exbio, Praha.

## 5. Výsledky

### 5.1. Příprava a ověření specifických protilátek proti minoritním proteinům MPyV a BKV

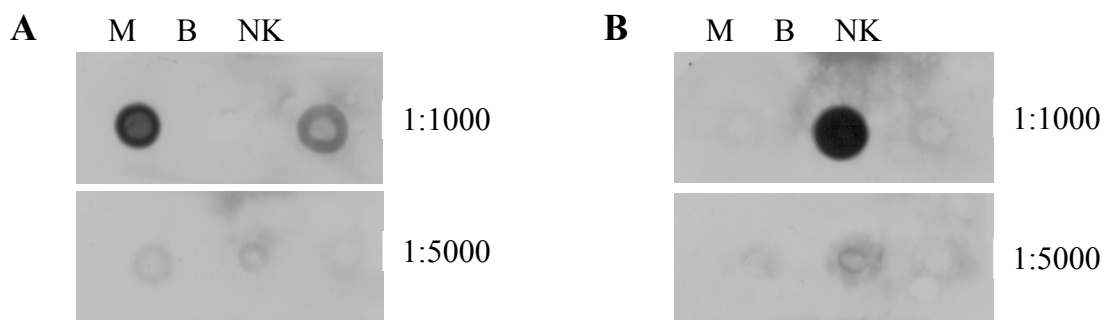
Jedním ze základních předpokladů pro studium životních cyklů virů je možnost využít specifické protilátky, které umožňují detekci jejich strukturních i nestrukturních proteinů. Naše laboratoř se zabývá studiem minoritních proteinů polyomavirů, hlavně jejich rolí při doručení genomu do jádra hostitelské buňky a interakcí s hostitelskými membránami. Studium interakcí těchto proteinů navzájem nebo s proteiny hostitelských buněk je komplikováno dostupností protilátek proti těmto antigenům – v případě MPyV naše laboratoř disponuje pouze jednou monoklonální protilátkou, v případě BKV bohužel žádnou specifickou (doposud se používala polyklonální protilátka proti minoritním proteinům viru SV40). Proto jsme se rozhodli nejprve připravit protilátky specificky rozpoznávající tyto proteiny

#### 5.1.1. Ověření funkčnosti a specificity protilátek proti C-terminálnímu peptidu minoritních proteinů MPyV a BKV

Byly vytipovány peptidy ležící v C-terminální oblasti minoritních proteinů MPyV a BKV, a firmou Clonostar Peptide Services byly na jejich základě připraveny protilátky (kap. 4.14.12). Tyto králičí polyklonální protilátky proti C-koncovému peptidu minoritních proteinů MPyV ( $\alpha$ -MPyV C-term VP2/3) a BKV ( $\alpha$ -BKV C-term VP2/3) byly testovány pomocí metod Dot blot (Obr. 10), Western blot (Obr. 11 a 12) a imunofluorescenční analýzy. Výsledky jsou popsány v následujících podkapitolách.

##### 5.1.1.1. Ověření protilátek - Dot blot

Jako první metodu pro ověření funkčnosti protilátek jsme vybrali dot blot. Jako antigen byl zvolen lyzát hmyzích buněk *Sf9* byly infikovaných rekombinantním bakulovirem nesoucím geny pro MPyV VP3 protein či BKV VP1/3 proteiny. Na NC membránu byly naneseny nepovařené RIPA lyzáty, vždy 5  $\mu$ l od každého. Testované protilátky byly naředěny do roztoku 5% odtučněného mléka v PBS (w/V) v poměru 1:1000 a 1:5000. Po vyvolání v temné komoře bylo ověřeno, že protilátky interagují specificky s příslušným antigenem a pro metodu Dot blot se jako ideální ředění jeví 1:1000 (Obr. 10).



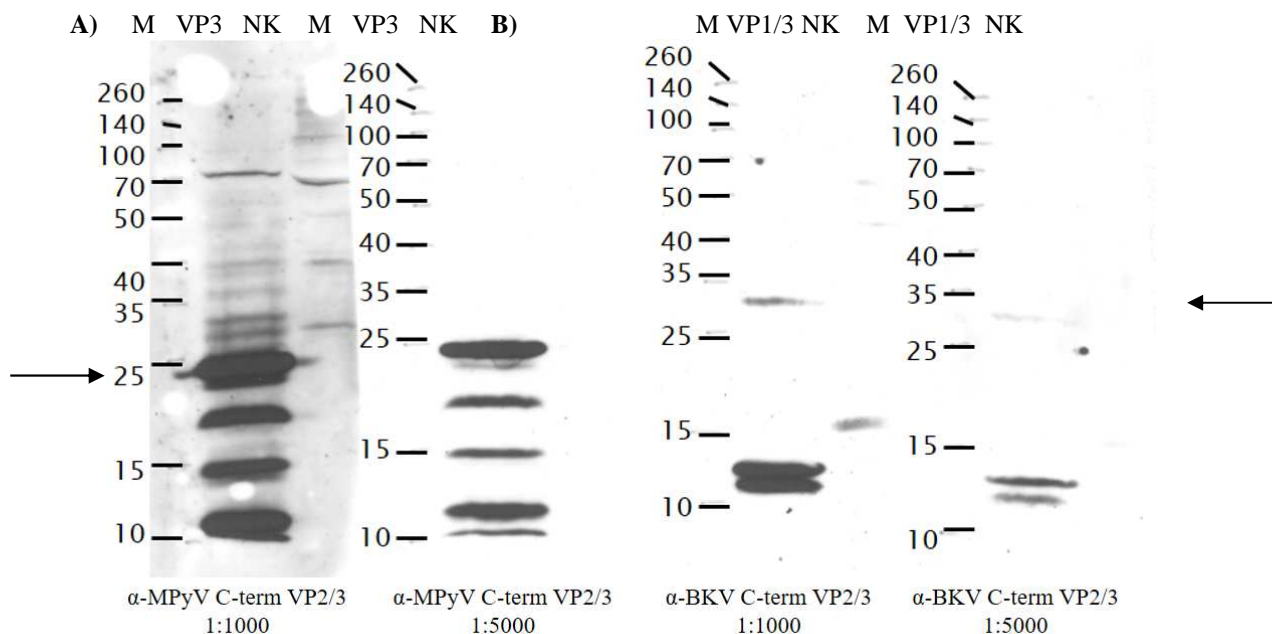
**Obr. 10 Dot blot pro ověření funkčnosti a specificity králíčích polyklonálních protilátek** proti C-koncovému peptidu minoritních proteinů polyomavirů **A**) MPyV **B**) BKV. Antigen: nativní RIPA lyzát buněk *Sf9* infikovaných rekombinantními bakuloviry nesoucími geny pro proteiny MPyV VP3 (M) a BKV VP1/3 (B). NK – lyzát neinfikovaných buněk *Sf9*. Použité ředění primárních protilátek 1:1000 a 1:5000. Sekundární protilátka GαRb – HRP (1:1000).

#### 5.1.1.2. Ověření protilátek - Western blot

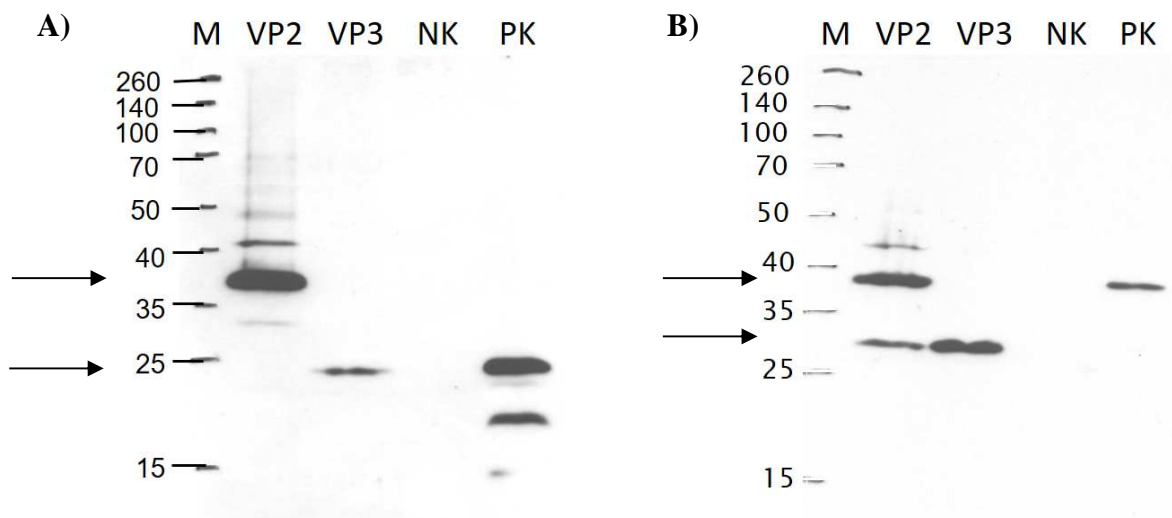
Pro komplexní ověření protilátek pomocí metody Western blot (kap.4.14.7) byly použity stejné *Sf9* buněčné RIPA lyzáty jako pro Dot blot (kap. 5.1, výsledky Obr. 11) a zároveň lyzát buněk HEK 293T transfekovaných vektory ph2b, ph3b, ph2p a ph3p nesoucími geny pro minoritní proteiny VP2 a VP3 (Obr. 12). Denaturované vzorky byly naneseny na 12% PAA gel a po přenesení na NC membránu byla jejich imunodetekcí testována funkčnost a specificita protilátek proti minoritním proteinům. Proužky odpovídající minoritnímu proteinu VP2 MPyV leží v oblasti 35 kDa, VP3 MPyV v oblasti 23 kDa, VP2 BKV v oblasti 38,3 kDa a VP3 BKV v oblasti 26,7 kDa (Obr. 11, 12, označeny šipkami). Kromě proužků s příslušnou molekulovou hmotností jsme detekovali také proužky s nižší molekulovou hmotností zřejmě označující degradáty minoritních proteinů, a proužky s vyšší molekulovou hmotností, které mohou značit komplexy minoritních proteinů, které nebyly zcela rozrušeny při denaturaci vzorků. V drahách, kde byly separovány lyzáty neinfikovaných buněk nedošlo k navázání ani jedné protilátky, potvrdila se tak specificita protilátek proti oběma minoritním proteinům. Ideální ředění protilátek pro metodu Western blot je 1:5000 pro protilátku  $\alpha$ -MPyV C-term VP2/3 a 1:1000 pro protilátku  $\alpha$ -BKV C-term VP2/3. Tyto protilátky byly používány pro detekci minoritních proteinů při studiu jejich interakcí v rámci této diplomové práce.

#### 5.1.1.3. Ověření protilátek - Imunofluorescence

Obě protilátky byly testovány v různých ředěních pro imunodetekci minoritních proteinů v buňkách metodou imunofluorescence. Ať už byly pro transfekce použity buňky NIH 3T3 nebo HEK 293T, protilátky měly nespecifický signál a pro tuto metodu je jejich použití nevhodné. Z toho důvodu bylo nutné připravit antigen pro imunizaci králíků a výrobu nových polyklonálních protilátek, které by pro imunofluorescenci a sledování lokalizace proteinů v buňkách byly použitelná. Výsledky metody s nefunkčními protilátkami  $\alpha$ -MPyV C-term VP2/3 a  $\alpha$ -BKV C-term VP2/3 nejsou uvedeny.



**Obr. 11 Western blot pro ověření funkčnosti a specificity králíčích polyklonálních protilátek** proti C-koncovému peptidu minoritních proteinů polyomavirů MPyV a BKV. Antigen: denaturovaný RIPA lyzát buněk *Sf9* infikovaných rekombinantními bakuloviry nesoucími geny pro proteiny **A)** MPyV VP3 (23 kDa) a **B)** BKV VP1/3 (26,7 kDa). Ideální ředění testovaných primárních protilátek 1:5000 pro  $\alpha$ -MPyV C-term VP2/3 a 1:1000 pro  $\alpha$ -BKV C-term VP2/3. Sekundární protilátka G $\alpha$ Rb – HRP (1:1000).



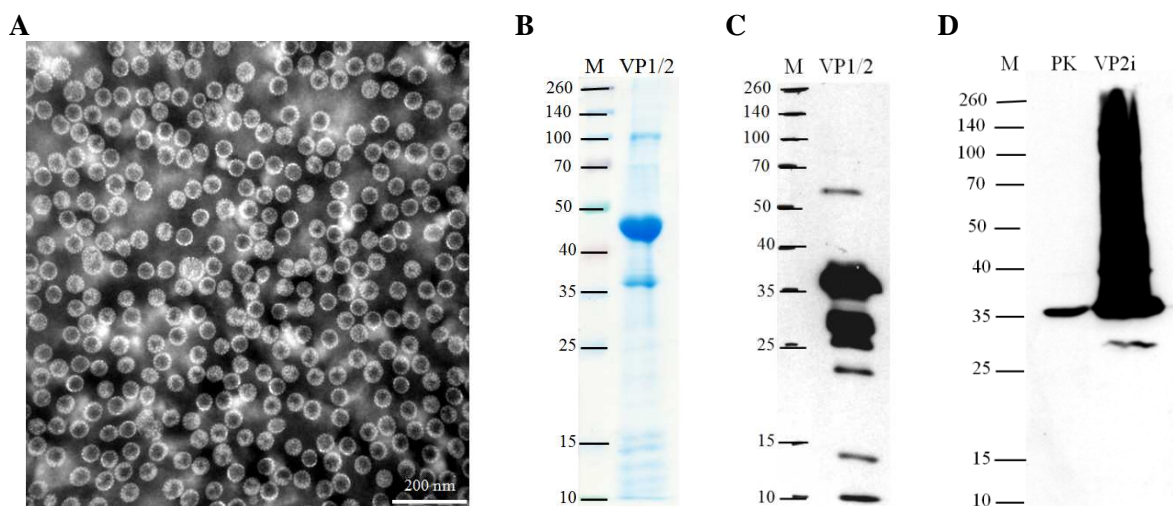
**Obr. 12 Western blot pro ověření funkčnosti a specificity králíčích polyklonálních protilátek** proti C-koncovému peptidu minoritních proteinů polyomavirů MPyV a BKV. Imunodetekce minoritních proteinů na NC membráně. Antigen: denaturovaný RIPA lyzát buněk HEK 293T transfekovaných vektory nesoucími geny pro proteiny **A)** MPyV VP2 (35 kDa) a MPyV VP3 (23 kDa) či **B)** BKV VP2 (38,3 kDa) a BKV VP3 (26,7 kDa). NK – negativní kontrola (lyzát netransfekovaných HEK 293T buněk), PK – pozitivní kontrola (lyzát *Sf9* buněk infikovaných rekombinantním bakulovirem produkujícím minoritní proteiny MPyV a BKV). Ideální ředění testovaných primárních protilátek 1:5000 pro  $\alpha$ -MPyV C-term VP2/3 a 1:1000 pro  $\alpha$ -BKV C-term VP2/3. Sekundární protilátka G $\alpha$ Rb – HRP (1:1000).

### 5.1.2. Příprava antigenu pro produkci nových polyklonálních protilátek

Pro sledování lokalizace minoritních proteinů v buňce bylo potřeba připravit novou protilátku. Materiál pro imunizace byl připraven transfekcí savčích buněk metodou Turbofect nebo nukleofekcí pomocí přístroje Amaxa Nucleofector™ vektory ph2b a ph2p (kap 4.14.12). Aby mohly být minoritní

proteiny z gelu vyřezávány bez předchozí fixace a barvení, bylo potřeba místo markeru molekulových hmotností použít izolované virové partikule obsahující proteiny VP1 a VP2. Po reverzibilním srážení proteinů ledovým 0,1M KCl se proužky ze vzorku VLPs v oblasti proteinu VP1 a VP2 objevily velmi viditelně a bylo možné podle výšky VP2 vyříznout odpovídající proužek z lyzátu transfekovaných buněk.

Virové partikule nutné pro vyřezávání proteinů z gelu byly izolovány centrifugací v CsCl gradientu kap. 4.13.2, a 4.13.3, byly ověřeny hemaglutinačním testem (výsledek neuveden), SDS-PAGE (Obr. 13B), imunodetekcí specifickými protilátkami na NC membráně (Obr. 13C) a elektronovou mikroskopií (Obr. 13A). Pro ilustraci jsou uvedeny pouze výsledky pro MPyV, pro BKV však byly výsledky obdobné. Materiál pro imunizace králíků byl připraven podle postupu uvedeného v kap. 4.14.12, ověřen imunodetekcí na NC membráně (Obr. 13D) a ve formě zamraženého drceného PAA gelu v roztoku PBS pro TK byl předán firmě Exbio k výrobě polyklonální protilátky. Při každé imunizaci byla intraperitoneálně aplikována každému králíkovi jedna dávka antigenu (dva proužky PAA gelu rozdrcené ve 100  $\mu$ l PBS pro TK). Mezi imunizacemi byla odebírána krev a sérum bylo firmou Exbio testováno na přítomnost protilátek. Přečištěné krevní sérum imunizovaných králíků jsme nakonec testovali pomocí metody ELISA a Imunofluorescence. Celkem byly připraveny dvě protilátky; protilátka proti minoritním proteinům BKV ( $\alpha$ -BKV VP2/3) a protilátka proti minoritním proteinům MPyV ( $\alpha$ -MPyV VP2/3).



**Obr. 13 Příprava materiálu pro imunizaci králíků.** Nejdříve byly připraveny a ověřeny VLPs MPyV VP1/2, protože podle výšky proužku VP2 proteinu ve VLPs dobře viditelného v 0,1M KCl byly vyřezávány odpovídající proužky polyakrylamidového gelu s rozdrceným buněčným lyzátem obsahujícím VP2 protein MPyV. Tento materiál byl následně rozdrcen v PBS pro TK a použit na imunizace. **A)** Elektronmikroskopický snímek MPyV VP1/2 VLPs. **B)** Proteinový SDS-PAGE elektroforetogram MPyV VP1/2 VLPs obarvený barvou Coomassie G-250. **C)** Imunodetekce VP2 proteinu specifickou protilátkou na NC membráně ve vzorku MPyV VP1/2 VLPs. **D)** Imunodetekce VP2 proteinu v materiálu připraveném pro imunizace na výrobu nové protilátky. PK – pozitivní kontrola, VP2i – materiál pro imunizace. Použité protilátky: primární protilátka  $\alpha$ -MPyV C-term VP2/3 (1:5000); sekundární protilátka G $\alpha$ Rb – HRP (1:1000).

### 5.1.3. Ověření funkčnosti a specificity nových polyklonálních protilátek

Před použitím nových protilátek bylo potřeba opět ověřit jejich specificitu a funkčnost. Bylo proto provedeno testování pomocí ELISA testu k určení vhodného ředění protilátky a následně testování pomocí metody Imunofluorescence.

#### 5.1.3.1. ELISA test pro určení ředění nových polyklonálních protilátek

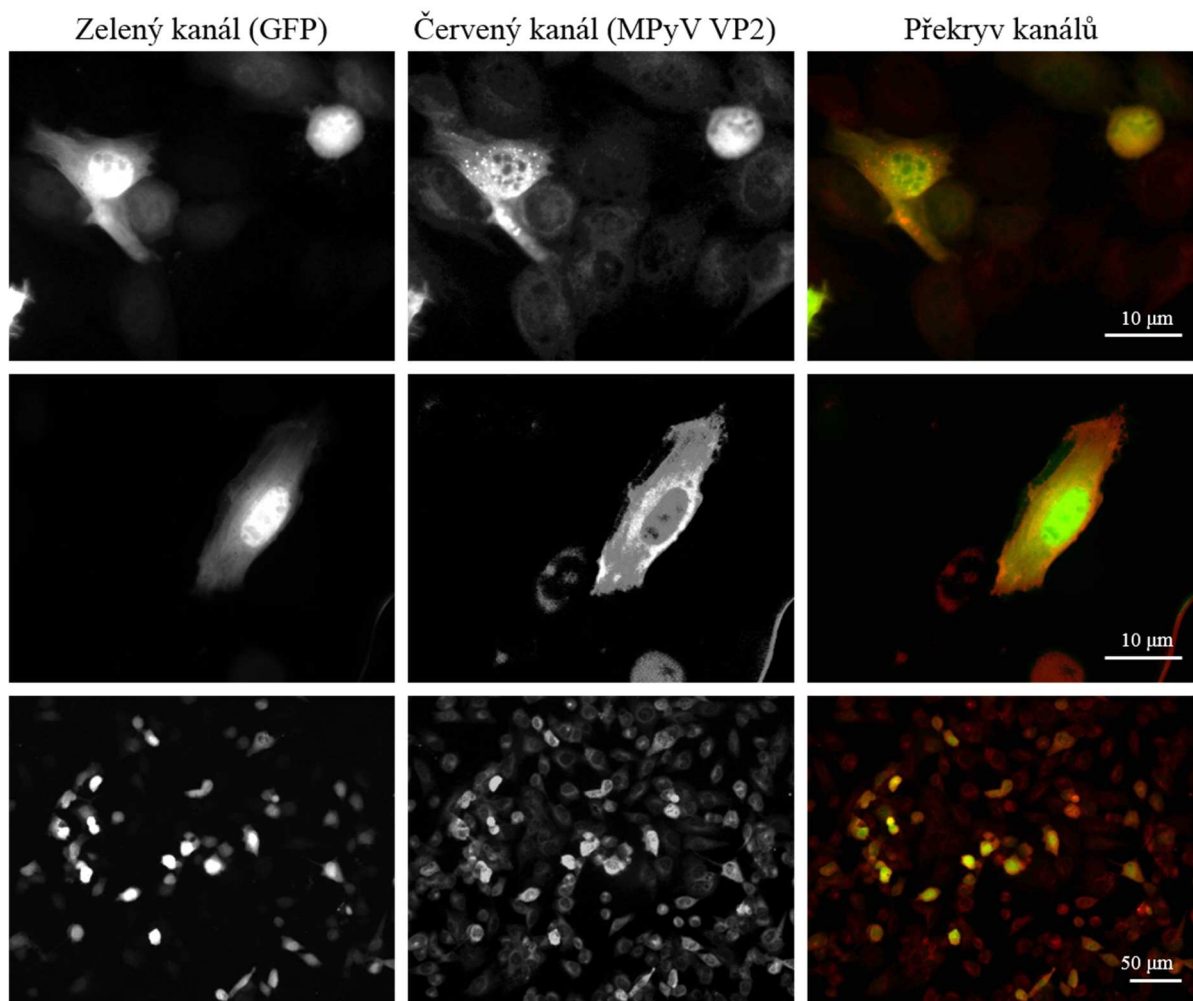
Jako antigen pro testování protilátky byl použit lyzát buněk HEK 293T transfekovaných vektory nesoucími geny pro minoritní proteiny VP2 MPyV (ph2p) nebo BKV (ph2b) a jako kontrola byl použit lyzát netransfekovaných buněk. Králičí sérum bylo před testováním vysyceno přes noc na Petriho misce s konfluentně narostlou kulturou buněk NIH 3T3. Ředění protilátky bylo provedeno v roztoku PBS dvojkovou řadou. Jako nejlepší se podle tohoto testu jeví ředění protilátek 1:80 až 1:160. Při tomto ředění jsme detekovali signál vyšší než 0,1 a zároveň byl signál u negativní kontroly asi poloviční. Výsledky měření absorbance jsou uvedeny v Tabulce 3.

Ředění	10x	20x	40x	80x	160x	320x	640x	1 280x	2 560x	5 120x	10 240x	20 480x
MPyV VP2	1,2237	0,8438	0,6183	0,3942	0,2547	0,1659	0,1153	0,0853	0,07	0,0648	0,0607	0,0583
NK - M	0,9965	0,6566	0,4382	0,2789	0,1717	0,1293	0,1055	0,0774	0,07	0,0631	0,0687	0,0625
BKV VP2	1,0921	0,8402	0,5771	0,4316	0,2797	0,2027	0,1496	0,1185	0,1002	0,0943	0,0926	0,082
NK - B	0,731	0,5219	0,3745	0,2592	0,1929	0,1515	0,114	0,0916	0,0779	0,0687	0,0643	0,0646

**Tabulka 3. ELISA test nových protilátek proti minoritním proteinům BKV a MPyV.** V tabulce jsou uvedeny výsledky měření absorbance. Jako nejvhodnější se jeví ředění protilátek 1:80 až 1:320, ve větším ředění už není příliš patrný rozdíl v absorbanci mezi pozitivním vzorkem a negativní kontrolou.

#### 5.1.3.2. Imunofluorescence

Pro testování protilátek pomocí imunofluorescence byly buňky pasážovány na krycí sklíčka a transfekovány metodou Turbofect vektory nesoucími geny pro minoritní proteiny VP2 virů MPyV (ph2p) a BKV (ph2b). Tyto vektory zároveň nesou referenční gen pro zelený fluorescenční protein, podle nějž je možné kontrolovat úspěšnost transfekce. Z tohoto důvodu bylo nutné pro imunofluorescenční detekci proteinů v buňkách používat sekundární protilátku GαRb – AF 546, která má však větší pozadí, než sekundární protilátky konjugované se zeleným fluoroforem. Protilátky byly připraveny v ředění 1:50 až 1:300, nejlepší výsledek mělo ředění 1:300. Protilátka α-MPyV VP2/3 dosahovala nejlepšího značení při ředění 1:300 (Obr. 14). Pozorovali jsme specifické značení buněk exprimujících GFP (kontrola transfekce) a pouze minimální nespecifické značení. Bohužel, nově připravená protilátka α-BKV VP2/3 se v buňkách vážala pouze nespecificky při všech použitých ředěních (výsledky neuvedeny) a není pro imunofluorescenční detekci minoritních proteinů BKV viru vhodná.

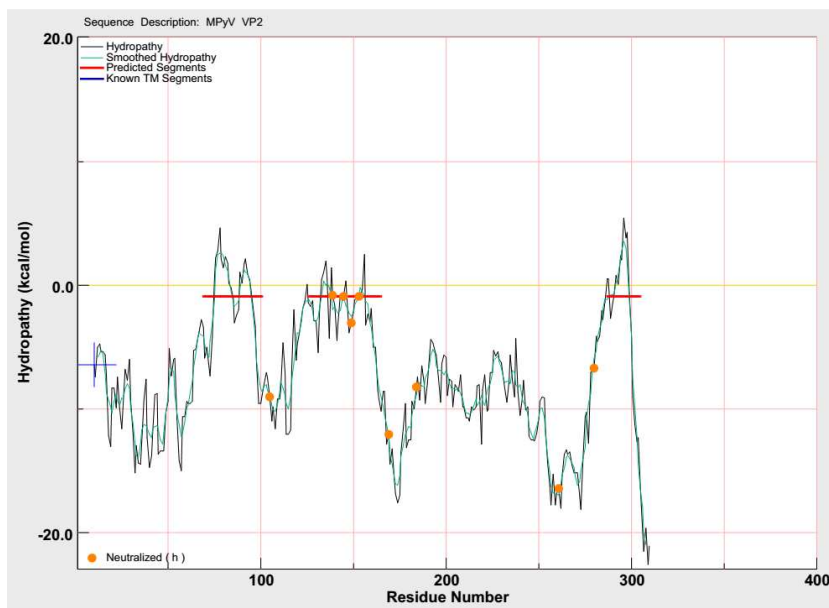


**Obr. 14** Detekce minoritního proteinu VP2 MPyV v buňkách HEK 293T novou protilátkou  $\alpha$ -MPyV VP2/3 metodou imunofluorescence. Pole „zelený kanál“ reprezentuje buňky, v nichž se po transfekci produkuje minoritní protein VP2. Gen pro GFP protein emitující v zeleném spektru viditelného světla je součástí vektoru ph2p používaného k transfekci. Pole „červený kanál“ reprezentuje buňky detekované novou protilátkou  $\alpha$ -MPyV VP2/3 a sekundární protilátkou G $\alpha$ Rb – AF 546 emitující v oranžovém spektru viditelného světla. Pole „překryv kanálů“ znázorňuje překryv zeleného a červeného pole a zobrazuje tak stejnou lokalizaci protilátky s místem produkce minoritního proteinu. Použité ředění primární protilátky je 1:300, sekundární protilátka je ředěna v poměru 1:1000. Snímky byly pořízeny invertovaným fluorescenčním mikroskopem Olympus IX 71 Inverted Fluorescence Microscope (Olympus).

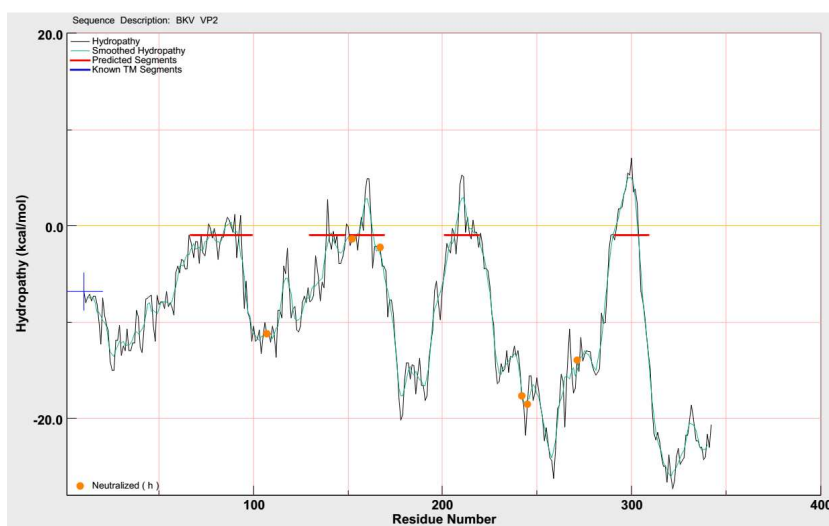
## 5.2. Porovnání cytotoxicity minoritních proteinů MPyV a BKV

Jak bylo již zmíněno v teoretickém úvodu této práce, minoritní proteiny MPyV mají afinitu k buněčným membránám a sekundární strukturou a svou hydrofobicitou se velmi podobají viroporinům. Proto se předpokládá, že stejně jako viroporiny, i ony mají cytotoxický efekt při produkci v buňkách. Cytotoxicita minoritních proteinů MPyV byla také v naší laboratoři ověřena při jejich samostatné produkci v savčích buněčných kulturách (Huerfano *et al.*, 2010). V rámci srovnání vlastností minoritních proteinů MPyV a BKV virů byla provedena predikce hydrofóbních domén minoritního proteinu VP2 pomocí predikčního softwaru Membrane Protein Explorer (verze 3.2.15). Přestože sekvenční podobnost VP2 proteinu těchto dvou polyomavirů není příliš vysoká, predikce hydrofóbních oblastí obou proteinů se jeví velmi podobně (Obr. 15).

A)



B)

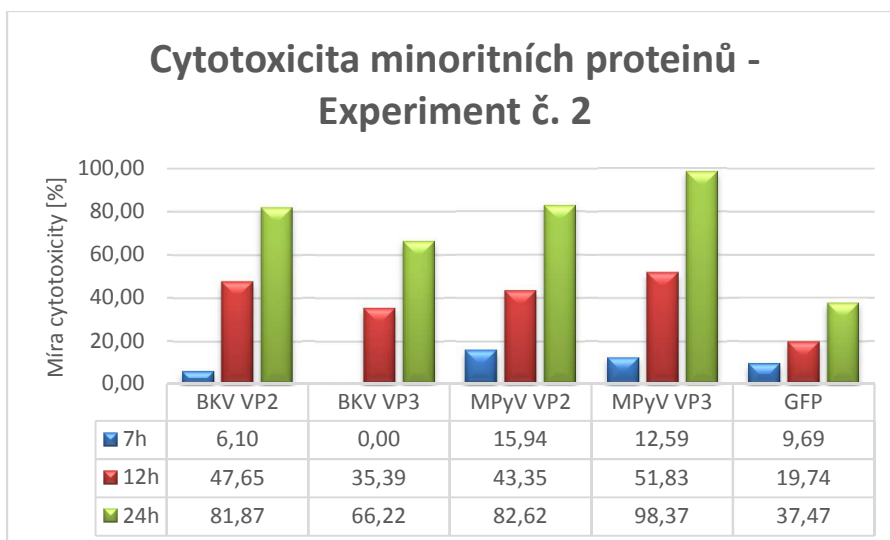
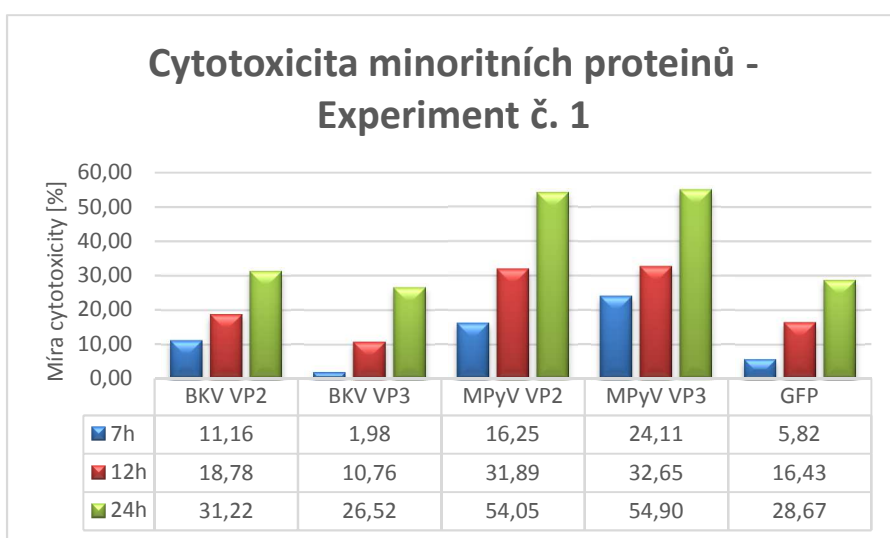


**Obr. 15 Predikce hydrofóbních oblastí minoritního proteinu VP2.** Osa x reprezentuje pořadí aminokyselin v proteinu, na ose y je vynesena predikovaná míra hydrofobicity proteinu. Hydrofóbní oblasti jsou značeny horizontálními červenými úsečkami. **A)** MPyV VP2 s třemi predikovanými hydrofóbními oblastmi. **B)** BKV VP2 se čtyřmi predikovanými hydrofóbními oblastmi. Predikce byla provedena pomocí softwaru Membrane Protein Explorer verze 3.2.15.

Vysoká hydrofobicita minoritních proteinů BKV naznačuje, že i ony by mohly mít cytotoxické vlastnosti, dosud to však nebylo popsáno v literatuře. Proto jsme se rozhodli míru cytotoxicity minoritních proteinů obou virů porovnat. Pro srovnání cytotoxických vlastností minoritních proteinů byla provedena nukleofekce savčích buněk 3T3 vektory ph2b, ph3b, ph2p a ph3p kódujícími geny pro minoritní proteiny obou virů a také gen pro GFP protein. Pro odečtení vlivu GFP proteinu v cytotoxických testech byl jako kontrola k nukleofekci použit také vektor phGf produkující pouze GFP protein. Poslední kontrolou pro určení míry cytotoxicity způsobené samotnou nukleofekcí byly ještě použity buňky 3T3, se kterými bylo manipulováno stejně, jako s transfekovanými buňkami, pouze bez přítomnosti vektoru. Cytotoxicita minoritních proteinů byla detekována měřením enzymatické aktivity uvolněné laktát dehydrogenázy z mrtvých buněk (kap. 4.13.1). Experiment byl proveden ve dvou



opakováních, míra cytotoxicity minoritních proteinů je graficky znázorněna na Obr. 16, naměřené hodnoty a výpočty jsou uvedeny v příloze S1. Oba nezávislé experimenty naznačují stejné výsledky, procentuálně se ale míra cytotoxicity mezi experimenty liší, největší rozdíl lze pozorovat v čase 24 h po transfekci. Zde se míra toxicity minoritních proteinů BKV viru v prvním experimentu blíží toxicitě proteinu GFP, ale v druhém experimentu se vyrovnala toxicita minoritním proteinův MPyV (Obr. 16). Proto pro určení toxicity BKV proteinů v tomto čase bude nutné experiment opakovat. Nicméně výsledky uvedené v Obr. 16 naznačují, že v porovnání s GFP transfekovanými buňkami jeví minoritní proteiny obou polyomavirů vyšší míru cytotoxicity a míra cytotoxicity má u všech sledovaných vzorků stoupající tendenci s narůstajícím časem. Zároveň výsledky naznačují, že minoritní proteiny MPyV vykazují vyšší míru toxicity, než minoritní proteiny BKV polyomaviru.



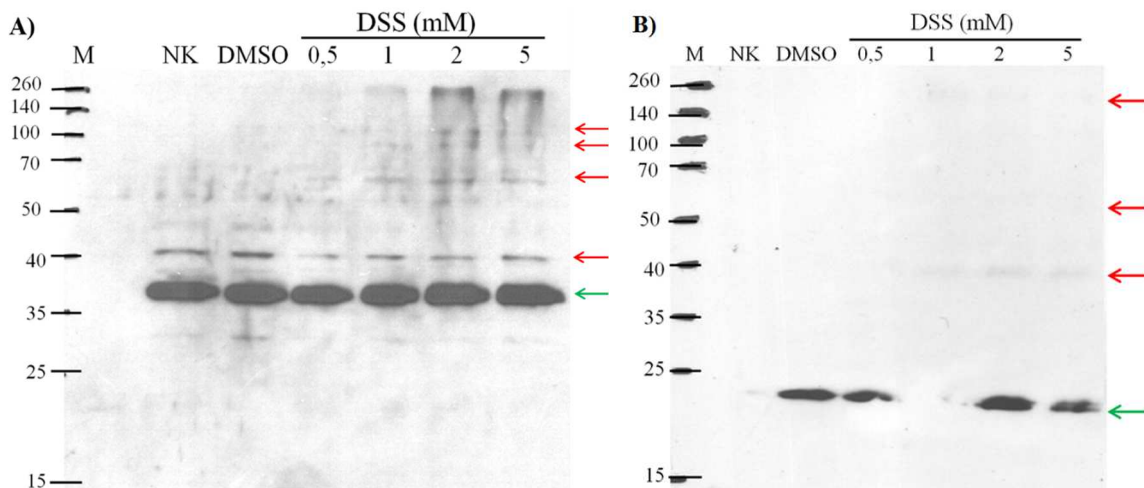
**Obr. 16 Grafické znázornění porovnání míry cytotoxicity minoritních proteinů polyomavirů MPyV a BKV při jejich samostatné produkci v savčích buňkách.** Výsledky dvou nezávislých opakování experimentu uvedené v grafech vycházejí ze stanovení množství enzymaticky aktivní LDH v supernatantech odebraných z jednotlivých vzorků v časových intervalech 7, 12 a 24 hodin po transfekci daným vektorem. Množství enzymu LDH uvolněného do supernatantu je úměrné množství mrtvých buněk ve vzorku. Míra cytotoxicity byla upravena na účinnost transfekce a je vyjádřena v procentech. Číselné hodnoty míry cytotoxicity jsou uvedeny pro přehlednost v tabulkách pod grafy. Primární data a výpočty jsou uvedeny v příloze S1.

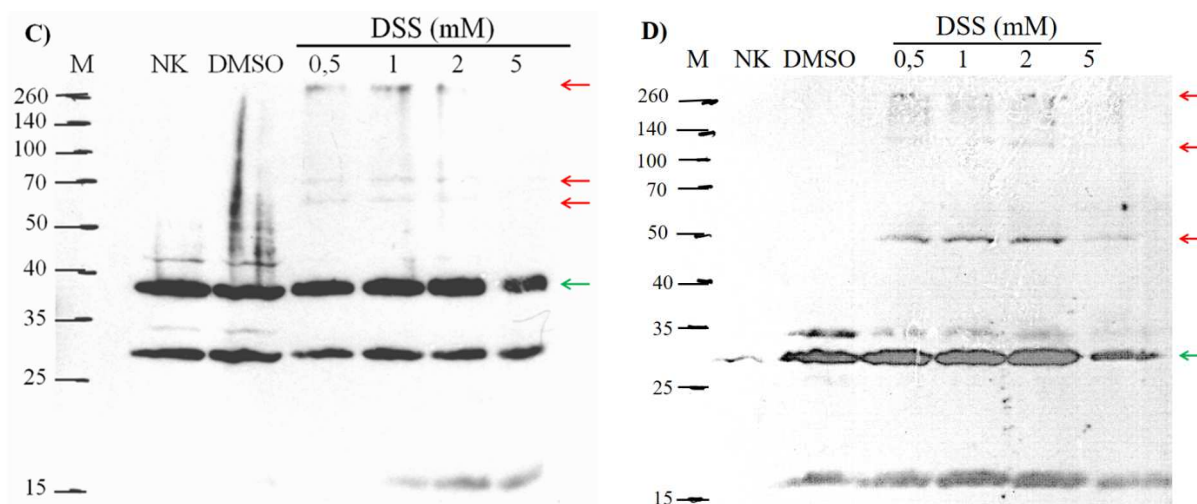
### 5.3. Studium interakcí minoritních proteinů MPyV a BKV

Doposud nebylo popsáno mnoho proteinů, se kterými minoritní proteiny interagují. Z buněčných proteinů byla potvrzena jejich interakce např. s rodinou tzv. protein disulfid izomeráz nebo s proteiny ERAD dráhy (kap. 3.5.2). U viroporinů bylo prokázáno, že tvoří homo nebo heterooligomerní póry v lipidických membránách a protože se minoritní proteiny polyomavirů svou predikovanou terciární strukturou viroporinům velmi podobají, rozhodli jsme se prozkoumat jejich vzájemné interakce.

#### 5.3.1. Detekce minoritních proteinů v makromolekulárních komplexech po chemickém zesíťování proteinů

Pro ověření, jestli minoritní proteiny po individuální expresi vůbec tvoří makromolekulární komplexy, jsme se rozhodli využít metodu chemického „crosslinku“ (kap. 4.14.11). Po chemickém zesíťování proteinů v lyzátech transfekovaných 293T buněk byly komplexy obsahující minoritní proteiny sledovány pomocí metody SDS-PAGE a následné imunodetekce na NC membráně (kap. 4.14.4, 4.14.7 a 4.14.8). V tomto experimentu byly použity dva typy kontrol označených NK a DMSO. Oba vzorky reprezentují lyzát buněk transfekovaných vektorrem kódujícím daný minoritní protein, od ostatních vzorků se liší pouze nepřítomností zesíťovacího činidla DSS. Ve vzorku DMSO je pro kontrolu vlivu na tvorbu komplexů navíc přidán pouze dimethyl sulfoxid, v němž je zesíťovací činidlo DSS ředěno. Přítomnost komplexů ve vzorcích zesíťovaných DSS byla porovnávána právě s těmito dvěma kontrolními vzorky, ve kterých by se komplexy (označené v obrázcích červenými šipkami) neměly objevit. Výsledky tohoto experimentu jsou uvedeny na obr. 17. U všech čtyř vzorků sledovaných minoritních proteinů se po detekci na NC membráně kromě proužku odpovídajícímu jejich přirozené velikosti (označeno zelenou šipkou) objevily také proužky s vyšší molekulovou hmotností (označeno červenými šipkami). Ty mohou reprezentovat proteinové komplexy, v nichž jsou minoritní proteiny přítomny, např. interakce minoritních proteinů s buněčnými proteiny či vzájemné interakce minoritních proteinů.





**Obr. 17 Sledování tvorby komplexů minoritních proteinů virů MPyV a BKV po chemickém zesíťování proteinů.** Lyzáty buněk 293T produkujících po transfekci minoritní proteinu byly chemicky zesíťovány opůsobením DSS (disukcinimidyl suberát) o různé koncentraci. Zpočátku se vzrůstající koncentrací DSS vzrůstá i množství proužků reprezentující komplexy proteinů (červené šipky), po překročení koncentrace 2mM DSS však proužků opět ubývá. Zelené šipky reprezentují monomery minoritních proteinů. **A)** Buňky 293T produkující po transfekci vektorem ph2p MPyV VP2 protein. **B)** Buňky 293T produkující po transfekci vektorem ph3p MPyV VP3 protein. **C)** Buňky 293T produkující po transfekci vektorem ph2b BKV VP2 protein. **D)** Buňky 293T produkující po transfekci vektorem ph3b BKV VP3 protein. NK – lyzát transfekovaných 293T buněk, DMSO - lyzát transfekovaných 293T buněk opůsobený pouze DMSO, v němž je ředěno zesíťovací činidlo DSS. Použité protilátky: primární protilátka  $\alpha$ -MPyV C-term VP2/3 (1:5000), primární protilátka  $\alpha$ -BKV C-term VP2/3 (1:1000); sekundární protilátka GaRb – HRP (1:1000).

### 5.3.2. Sledování nativních proteinových komplexů metodou BN-PAGE

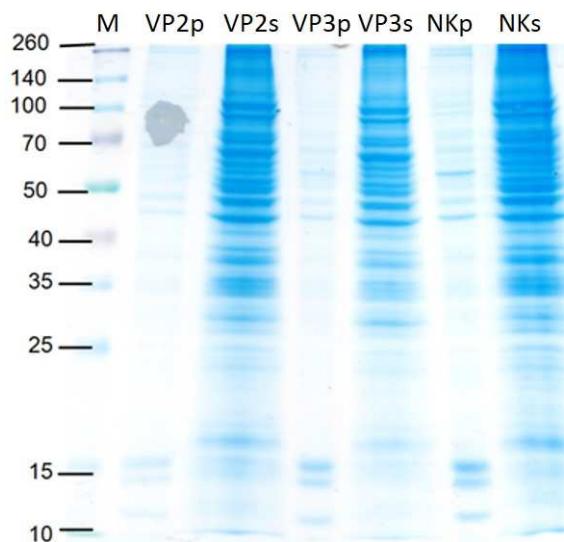
Vzhledem k tomu, že jsme detekovali makromolekulární komplexy tvořené minoritními proteiny, rozhodli jsme se tyto komplexy dále charakterizovat. Pro separaci a následnou charakterizaci proteinových komplexů jsme zvolili modrou nativní proteinovou elektroforézu, tzv. Blue Native – PAGE. Tato metoda umožňuje rozdělení proteinových komplexů v nativním stavu bez nutnosti předchozí denaturace vzorku či aplikace chemických látek způsobujících vzájemné provázání proteinů. Detekce komplexů pomocí protilátek probíhá po přenesení proteinů z gelu na PVDF membránu. Míra rozpustnosti sledovaných proteinů v lyzačním pufru je tak nejdůležitější a zároveň omezující podmínkou celé metody. Abychom mohli tuto metodu použít, bylo třeba nejprve zjistit, za jakých podmínek je rozpustnost minoritních proteinů MPyV i BKV nejlepší. Špatně rozpustné proteiny totiž po nanesení do jamek putují gelem arteficiálně nebo nemusí při elektroforéze do gelu vůbec vstoupit.

#### 5.3.2.1. Testování rozpustnosti minoritních proteinů

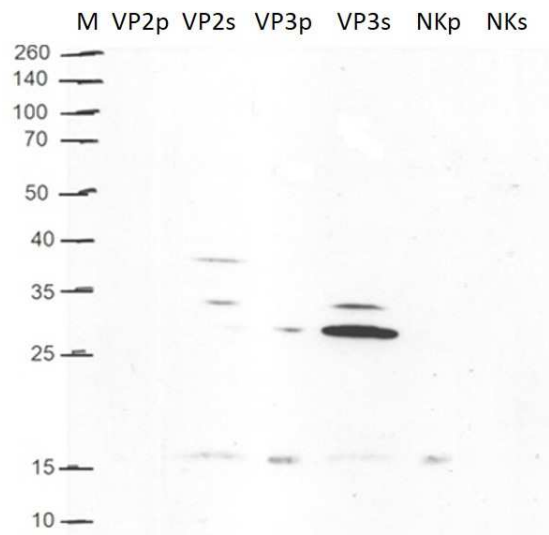
Nejdříve byla testována rozpustnost minoritních proteinů v modifikovaném RIPA pufru (mRIPA, kap. 4.14.1.2), který byl pro tento experiment vybrán na základě výsledků testu rozpustnosti proteinu VP1 MPyV v různých lyzačních pufrech (Horníková, 2012). Buňky transfekované vektory ph2p, ph3p, ph2b nebo ph3b byly lyzovány v mRIPA pufru na ledu (kap. 4.14.1.2). Přítomnost proteinů v solubilní frakci a množství proteinů v nerozpustné frakci bylo analyzováno metodou SDS-PAGE a následným barvením PAA gelu či imunodetekcí minoritních proteinů specifickými protilátkami na NC membráně

(4.14.8). Většina proteinů se v obou případech nacházela v solubilní frakci (Obr. 18. A, C), stejně jako minoritní proteiny BKV viru (Obr. 18 B). Naopak, minoritní proteiny MPyV byly velmi špatně rozpustné, nacházely se především v nerozpustné frakci (Obr. 18 D).

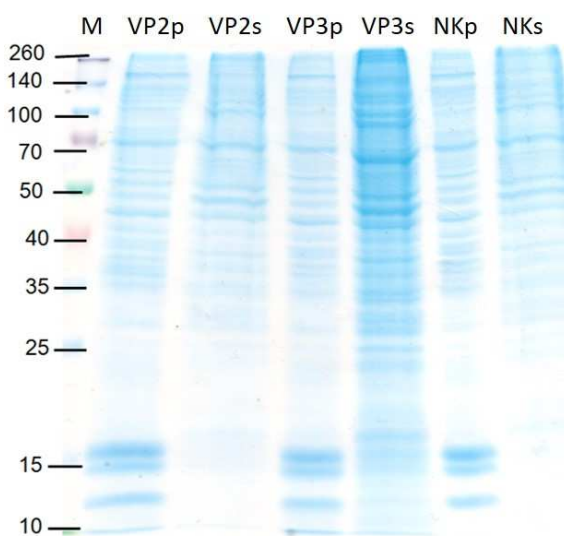
**A) BKV – Celkové proteiny**



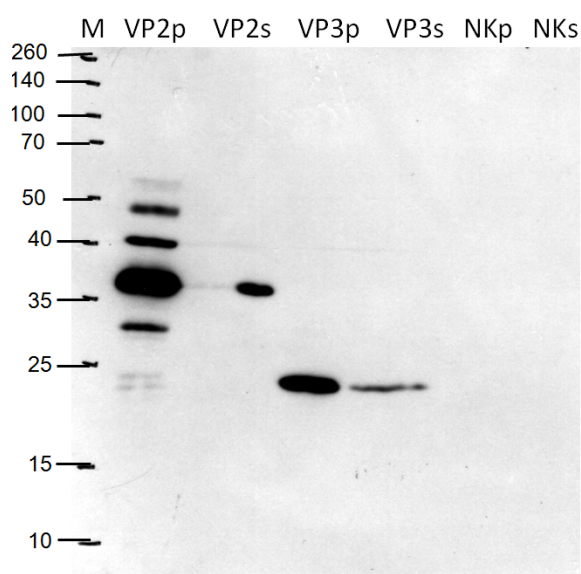
**B) BKV – Imunodetekce minoritních proteinů**



**C) MPyV – Celkové proteiny**

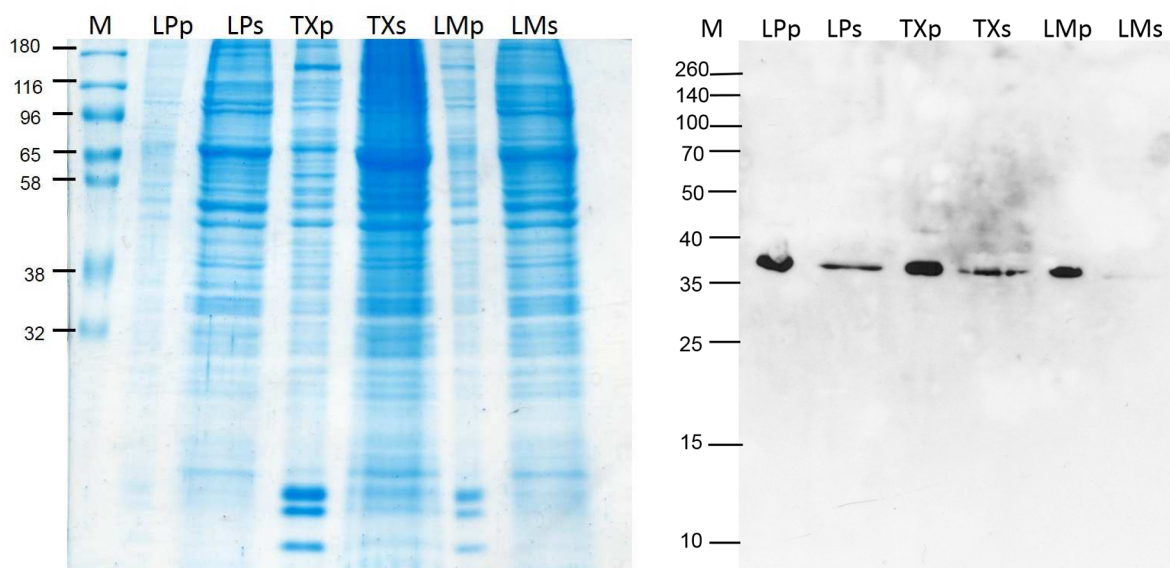


**D) MPyV – Imunodetekce minoritních proteinů**



**Obr. 18 Rozpustnost minoritních proteinů MPyV a BKV virů v mRIPA pufru.** Rozpustnost minoritních proteinů polyomaviru BKV a MPyV v mRIPA pufru byla stanovena pomocí SDS-PAGE a následným barvením PAA gelu Coomassie Brilliant Blue G-250 nebo imunodetekcí minoritních proteinů imobilizovaných na NC membráně. Rozpustnost minoritních proteinů viru BKV je dostačující pro použití při BN-PAGE. Z obrázku je patrné, že jak **A)** celkové proteiny, tak **B)** minoritní proteiny BKV jsou více zastoupeny v supernatantu, než v peletu. Rozpustnost minoritních proteinů MPyV polyomaviru je v mRIPA pufru nízká a pro použití při BN-PAGE nevhodná. **C)** Celkové proteiny jsou sice přítomny jak v peletu, tak v supernatantu vzorků, **D)** minoritní proteiny MPyV jsou však výrazně více nerozpustné a vyskytují se spíše v peletu, než v supernatantu. Označení vzorků: s = supernatant, p = pelet, NK = negativní kontrola (netransfekované buňky HEK 293T). Použité protilátky: primární protilátka  $\alpha$ -MPyV C-term VP2/3 (1:5000), primární protilátka  $\alpha$ -BKV C-term VP2/3 (1:1000); sekundární protilátka GaRb – HRP (1:1000).

Bylo tedy připraveno několik dalších lyzačních roztoků s různým obsahem detergentů – LP (neobsahuje žádný detergent), LM (obsahuje DDM) a TX (obsahující Triton X-100) (kap. 4.14.2) a transfekované buňky produkující MPyV VP2 a VP3 proteiny v nich byly 24 hodin po transfekci lyzovány. Přítomnost proteinů v solubilní frakci a množství proteinů v nerozpustné frakci bylo analyzováno metodou SDS-PAGE a následným barvením PAA gelu či imunodetekcí minoritních proteinů specifickými protilátkami na NC membráně. Jak je patrné z obr. 19, ani v těchto pufrech nebyl protein MPyV VP2 dobře rozpustný, nachází se většinou v nerozpustné frakci, i když většina buněčných proteinů se nachází v supernatantu (rozpustná frakce). Z výsledků testu rozpustnosti vyplývá, že minoritní proteiny MPyV jsou insolubilní ve všech testovaných lyzačních pufrech, proto se BN-PAGE nehodí pro studium jejich interakcí. Nicméně, rozpustnost minoritních proteinů BKV viru je dostačující a takto připravené lyzáty mohou být separovány metodou BN-PAGE.



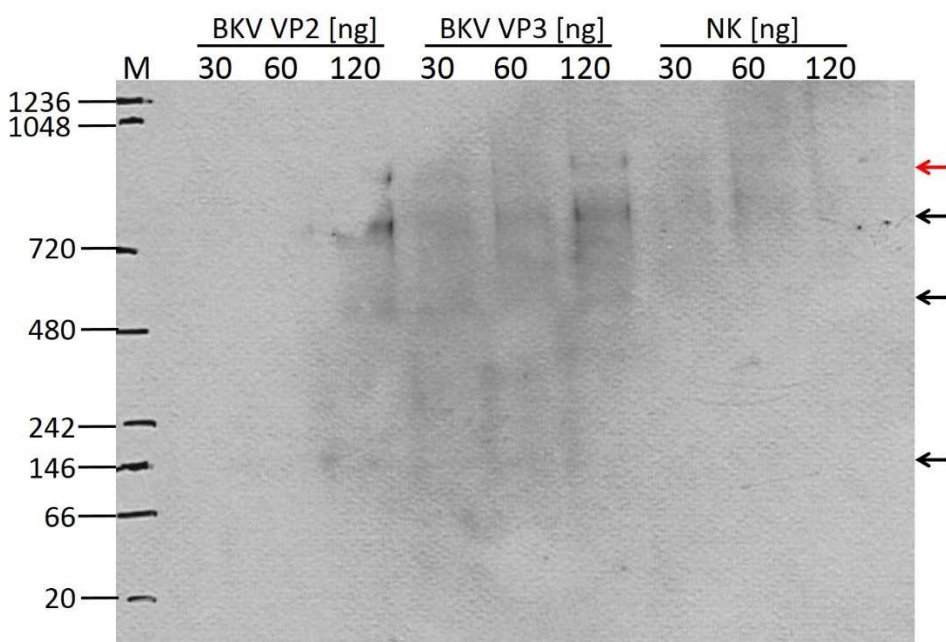
**Obr. 19 Rozpustnost minoritních proteinů MPyV v různých lyzačních pufrech.** Rozpustnost minoritních proteinů polyomaviru MPyV byla stanovena pomocí SDS-PAGE a následným barvením PAA gelu Coomassie Brilliant Blue G-250 nebo imunodetekcí minoritních proteinů imobilizovaných na NC membráně. Přestože rozpustnost celkových proteinů je ve všech pufrech dobrá a více proteinů je obsaženo ve vzorcích supernatantu, než ve vzorcích peletu (vlevo, Coomassie), minoritní proteiny MPyV jsou ve všech třech pufrech velmi málo rozpustné a jejich velká část zůstává v peletu (vpravo, Imunodetekce). Označení vzorků: s = supernatant, p = pelet, NK = negativní kontrola (netransfekované buňky HEK 293T), zkratky LP, TX a LM označují různé lyzační pufr (složení viz kap. 4.14.2). Použité protilátky: primární protilátka  $\alpha$ -MPyV C-term VP2/3 (1:5000), primární protilátka  $\alpha$ -BKV C-term VP2/3 (1:1000); sekundární protilátka GaRb – HRP (1:1000).

### 5.3.2.2. BN-PAGE

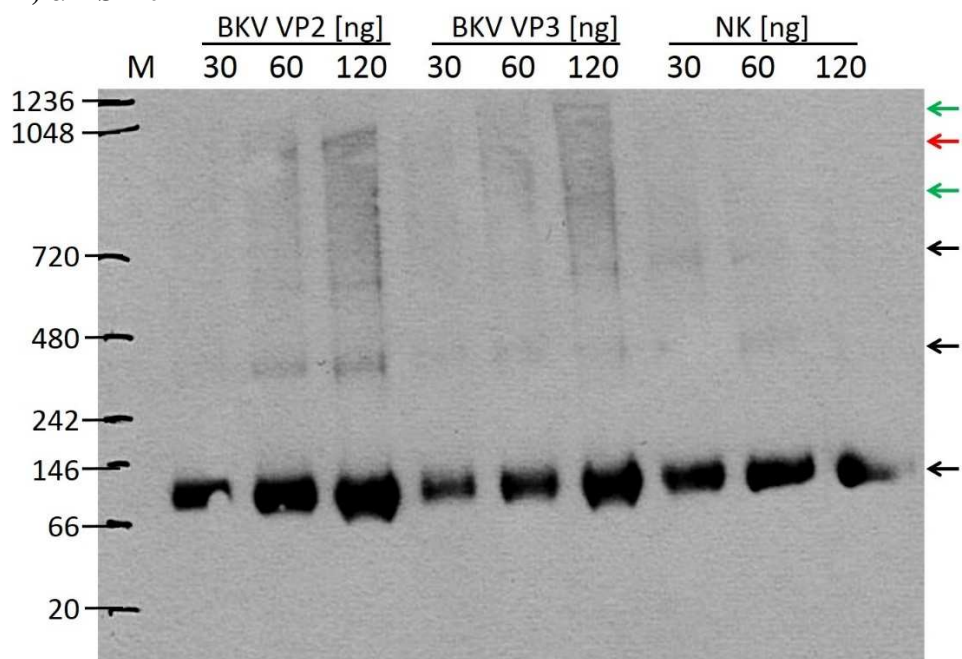
Pro přípravu buněčných lyzátů jsme použili mRIPA pufr, v němž byly minoritní proteiny polyomaviru BKV dobře rozpustné. Lyzáty byly naneseny na 3-12% nativní gel ve 3 různých koncentracích, separované komplexy byly přeneseny na membránu a minoritní proteiny byly označeny protilátkou  $\alpha$ -BKV C-term VP2/3. I když minoritní proteiny nebyly detekovány ve své monomerní podobě, pozorovali jsme velmi slabé proužky s vysokou molekulovou hmotností (obr. 20A), patrně reprezentující makromolekulární komplexy obsahující protein VP2 nebo VP3. Buněčnými proteiny,

kteře interagují téměř se vřemi proteiny při jejich skládání do sprvn konformace, jsou chaperony. Interakce konstitutivn produkovaného savčího chaperonu Hsc70 z chaperonov rodiny Hsp70 s hlavním kapsidovým proteinem VP1 MPyV jř byla prokázána (Cripe *et al.*, 1995; Hornkov, 2012), stejn tak jako interakce Hsc 70 s minoritními proteiny MPyV (Cripe *et al.*, 1995), či Hsp 70 s VP2 proteinem viru SV40 (Geiger *et al.*, 2011; Giorda *et al.*, 2013). Proto jsme předpokládali, že jedním z mořnch proteinů interagujícím s minoritními proteiny BKV viru by mohly být prav chaperony z rodiny Hsp70. Pvodn navzan protilátka  $\alpha$ -BKV C-term VP2/3 byla proto z membrány odmyta podle postupu popsnho v kap. 4.14.9 a pro detekci chaperonů z proteinov rodiny Hsp70 byla pouřita specifick myš polyklonální protilátka  $\alpha$ -Hsp70. Protein Hsp70 byl detekovan ve formě monomeru a ve vřch molekulárních komplexech jak v lyzátech bunek exprimujících BKV VP2/3 tak i v lyzátech kontrolních bunek (obr. 20B, ern šipky). Nicméně v lyzátech bunek exprimujících BKV VP2/3 byly nalezeny i makromolekulární komplexy, kteře byly specifick pouze pro buňky exprimující minoritní proteiny a nevyskytovaly se v lyzátu kontrolních bunek (Obr. 20B, zelen šipky). Navíc byl identifikovan i jeden komplex detekovan protilátkou  $\alpha$ -Hsp70, kteří by svou molekulovou hmotnst mohl odpovídat komplexu specificky označenému i protilátkou  $\alpha$ -BKV C-term VP2/3 (obr. 20A a B, erven šipka). Tyto výsledky naznačují, že minoritní proteiny BKV viru by potenciální mohly vytvářet komplexy s chaperonem Hsp70. Tuto hypotézu vřak bude nutné jeř ověřit.

#### A) $\alpha$ -BKV C-term VP2/3



## B) $\alpha$ -HSP70



### Obr. 20 Detekce nativních proteinových komplexů na PVDF membráně po separaci metodou BN-PAGE.

Vzorky lyzátů 3T3 buněk po nukleofekci vektory ph2b (BKV VP2) a ph3b (BKV VP3) byly naneseny v množství 30, 60 a 120 ng celkového proteinu, jako negativní kontrola (NK) slouží lyzát netransfekovaných 3T3 buněk. **A)** Detekce makromolekulárních komplexů s minoritními proteiny pomocí specifické protilátky proti minoritním proteinům BKV ( $\alpha$ -BKV C-term VP2/3). Komplexy obsahující minoritní proteiny jsou označeny šipkami. **B)** Detekce makromolekulárních komplexů specifickou protilátkou  $\alpha$ -Hsp70. Makromolekulární komplexy obsahující „heat shock“ protein rodiny 70 jsou označeny šipkami, spodní nejvýraznější proužek reprezentuje monomerní „heat shock“ protein Hsp70. Zelené šipky reprezentují komplexy vyskytující se pouze v lyzátu buněk produkujících BKV VP2 nebo VP3 protein, červená šipka znázorňuje potenciální komplex minoritních proteinů BKV viru a proteinu Hsp70. Použité protilátky: primární protilátka  $\alpha$ -Hsp70 (1:1000), primární protilátka  $\alpha$ -BKV C-term VP2/3 (1:100); sekundární protilátka  $\alpha$ Rb – HRP (1:1000), sekundární protilátka  $\alpha$ M – HRP (1:1000).

### 5.3.3. Příprava expresních vektorů pro studium interakcí minoritních proteinů

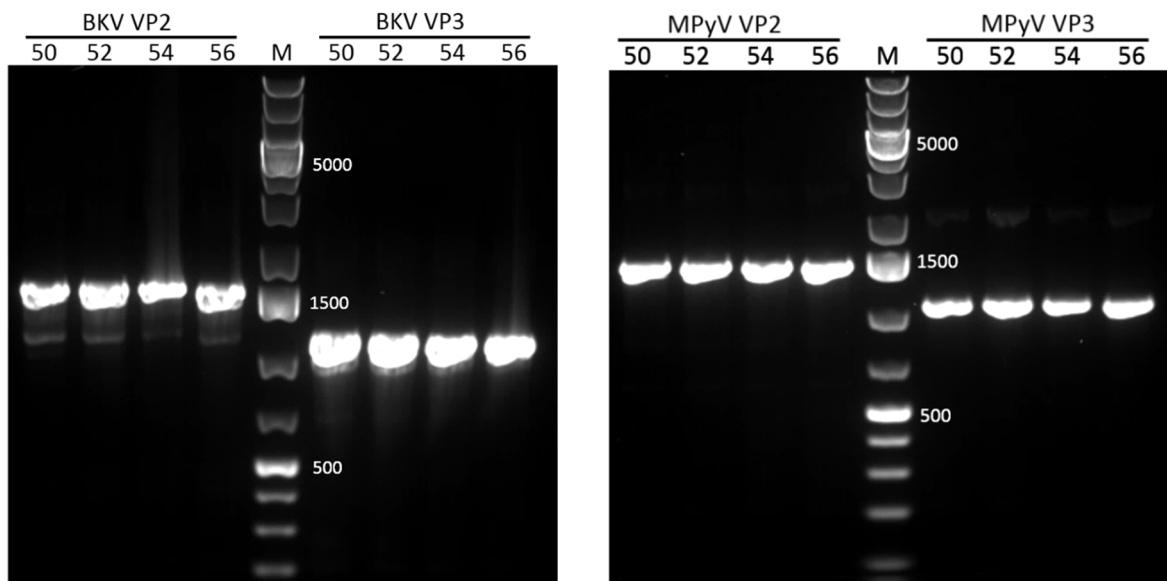
Metodou BN-PAGE jsme detekovali několik makromolekulárních komplexů minoritních proteinů, ale touto metodou jsme nebyli schopni komplexy blíže charakterizovat. Proto jsme se rozhodli využít metodu tandemové afinitní purifikace. Tato metoda vhodná pro studium proteinových komplexů je založená na izolaci proteinových komplexů pomocí fúzních značek uměle připojených k proteinu našeho zájmu. Díky vzájemné interakci proteinů tak pomocí této metody můžeme získat celý interakční komplex a následně jeho složení analyzovat např. pomocí nativní elektroforézy či SDS-PAGE. Aby bylo možné studovat tvorbu homooligomerů minoritních proteinů, je potřeba mít k dispozici minoritní proteiny se dvěma různými fúzními značkami. Vektory nesoucí geny pro minoritní proteiny fúzované s GFP proteinem již byly v naší laboratoři připraveny dříve, mým úkolem bylo připravit expresní vektory kódující sekvence minoritních proteinů s C-koncovou značkou capTEV, která je součástí systému „Native pure purification system“ (Thermo Fischer Scientific). Připojení značky k C-konci proteinu bylo zvoleno záměrně; již dříve bylo v naší laboratoři ověřeno, že minoritní proteiny MPyV s C-koncovou značkou se na rozdíl od N-koncových fúzních proteinů chovají podobně jako proteiny divokého typu (Huerfano *et al.*, 2010). Součástí značky capTEV jsou sekvence označené jako „BioEase

Tag,“ dvě sekvence rozpoznávané TEV proteázou, sekvence pro His Tag a V5 epitop. Tzv. „BioEase Tag“ je sekvence získaná z genomu bakterie *Klebsiella pneumoniae* kódující peptid o velikosti 72 aminokyselinových zbytků. Tento peptid je v bakterii místem přirozené biotinylace a po umělém připojení k proteinu je *in vivo* také biotinylován. „BioEase Tag“ po připojení ke studovanému proteinu slouží k jeho snadné purifikaci afinitní chromatografií díky interakci biotin – avidin/streptavidin. TEV sekvence jsou místa proteolytického štěpení rozeznávaná TEV proteázou (Tobacco Etch Virus) a sloužící k uvolnění proteinového komplexu navázaného na matrix při afinitní chromatografii. His Tag lze využít pro purifikaci proteinu afinitní chromatografií nebo, stejně jako V5 epitop, k imunodetekci proteinu pomocí specifických protilátek. V naší laboratoři již byly připraveny expresní vektory kódující minoritní proteiny MPyV i BKV virů fúzované na C-konci s capTEV značkou (Fraiberk, nepublikovaná data), ale nebyla ověřena produkce fúzního proteinu v savčích buňkách.

Vektory byly izolovány a použity k nukleofekci buněk 3T3 pro detekci proteinů pomocí metody Western blot. Pro imunodetekci proteinů byly použity specifické protilátky jak proti společné části minoritních proteinů ( $\alpha$ -MPyV C-term VP2/3 a  $\alpha$ -BKV C-term VP2/3), tak proti biotinu ( $\alpha$ -biotin). Bohužel, ani jeden protein se nepodařilo v buněčném lyzátu detekovat (výsledky neuvedeny).

Rozhodli jsme se tedy pro překlonování genů rekombinantních minoritních proteinů s capTEV značkou do jiného expresního vektoru, vhodně upraveného pro expresi v savčích buňkách. Tento postup byl již dříve s úspěchem aplikován na expresní vektor kódující gen pro protein VP1 MPyV (Horníková, 2012). Zvolili jsme vektor phGf, který je kostrou funkčních expresních vektorů ph2p, ph3p, ph2b a ph3b, ze kterých jsou produkovány minoritní proteiny obou polyomavirů. Byla tedy provedena PCR reakce pro amplifikaci minoritních proteinů s capTEV značkou s použitím kombinace „forward“ primerů č. 1 - 4 a „reverse“ primeru č. 5 (Obr. 21). Primery „forward“ byly navrženy s počáteční sekvencí CACC, které následně umožňuje tzv. TOPO klonování do vektoru. Jako templát pro PCR reakci byl vždy použit odpovídající neprodukující expresní vektor pMPyV VP2-biotin, pMPyV VP3-biotin, pBKV VP2-biotin nebo pBKV VP3-biotin s kostrou pcDNA 3.2capTEV-CT-V5-DEST, podmínky PCR reakce s teplotním gradientem při nasedání primerů jsou popsány v kap. 4.12.7.

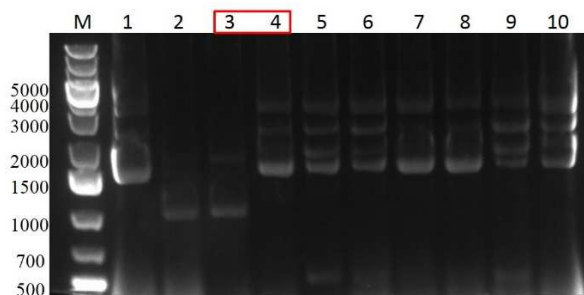




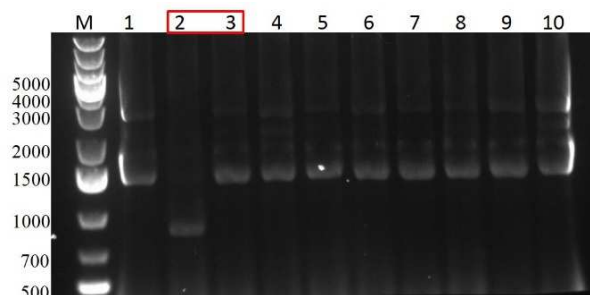
**Obr. 21** Elektroforetogramy fragmentů genů minoritních proteinů s capTEV kotvou amplifikovaných při PCR reakci s teplotním gradientem. Teplotní gradient byl zvolen od 50 do 56 °C, ve všech případech byly produkty PCR reakce specifické. Všechny mikrozkušavky stejného vzorku byly tedy pro další práci spojeny dohromady. Předpokládaná velikost vzniklých fragmentů: BKV VP2: 1483 bp, BKV VP3: 1126 bp, MPyV VP2: 1391 bp, MPyV VP3: 1046 bp. DNA fragmenty byly zviditelněny pomocí GelRed Nucleic Acid Stain.

K amplifikaci sekvence byla použita termostabilní DNA polymeráza Pfu, která vytváří fragmenty s tupými konci. Předpokládaná velikost vzniklých fragmentů byla 1483 bp pro BKV VP2, 1126 bp pro BKV VP3, 1391 bp pro MPyV VP2 a 1046 bp pro MPyV VP3. Amplifikované PCR produkty byly spojeny a přečištěny pomocí soupravy High Pure Purification Kit (Roche), jejich integrita byla ověřena agarózovou elektroforézou (výsledek neuveden) a následovalo jejich vložení do vektoru pENTR D-TOPO (viz kap. 4.12.10). Takto připravenými „entry“ vektory pojmenovanými pEDT-B2-bio, pEDT-B3-bio, pEDT-M2-bio a pEDT-M3-bio byly transformovány elektro-kompetentní bakterie kmene *E. coli* TOP10. V vybraných transformovaných bakteriálních monokloniích byly alkalickou metodou izolovány vektory. Úspěšnost vložení fragmentu do vektoru byla ověřena restrikčním štěpením enzymem AflIII (BKV) nebo BamHI (MPyV) (Obr. 22). Předpokládaná velikost fragmentů vzniklých restrikčním štěpením byla 923 a 3140 bp pro vektor pEDT-B2-bio, 566 a 3140 bp pro vektor pEDT-B3-bio, 1000 a 2977 bp pro vektor pEDT-M2-bio a 1000 a 2632 bp pro vektor pEDT-M3-bio.

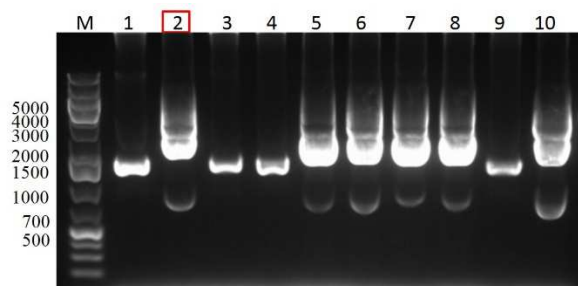
#### pEDT-B2-bio + AflIII



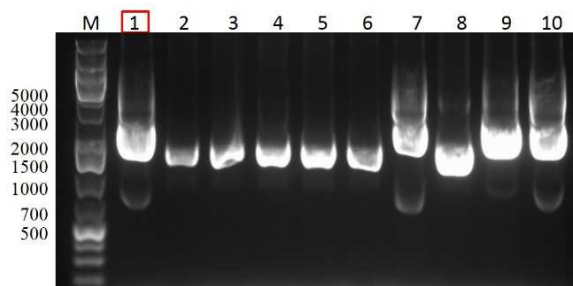
#### pEDT-B3-bio + AflIII



### pEDT-M2-bio + BamHI

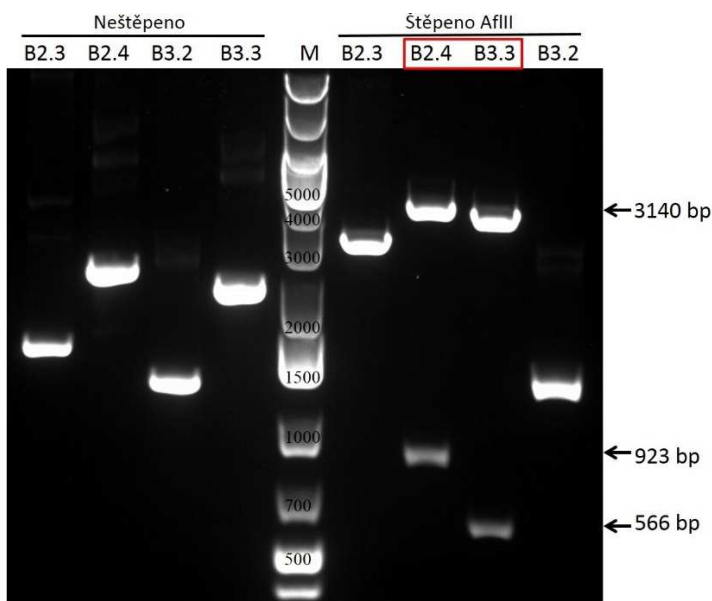


### pEDT-M3-bio + BamHI



**Obr. 22** Elektroforetogramy reprezentující vektory pEDT-B2-bio a pEDT-B3-bio po restričním štěpení enzymem AflIII a vektory pEDT-M2-bio a pEDT-M3-bio po restričním štěpení enzymem Fast Digest BamHI. Předpokládaná velikost fragmentů vzniklých restričním štěpením byla: 923 a 3140 bp (pEDT-B2-bio), 566 a 3140 bp (pEDT-B3-bio), 1000 a 2977 bp (pEDT-M2-bio) a 1000 a 2632 bp (pEDT-M3-bio). DNA fragmenty byly zviditelněny pomocí EtBr.

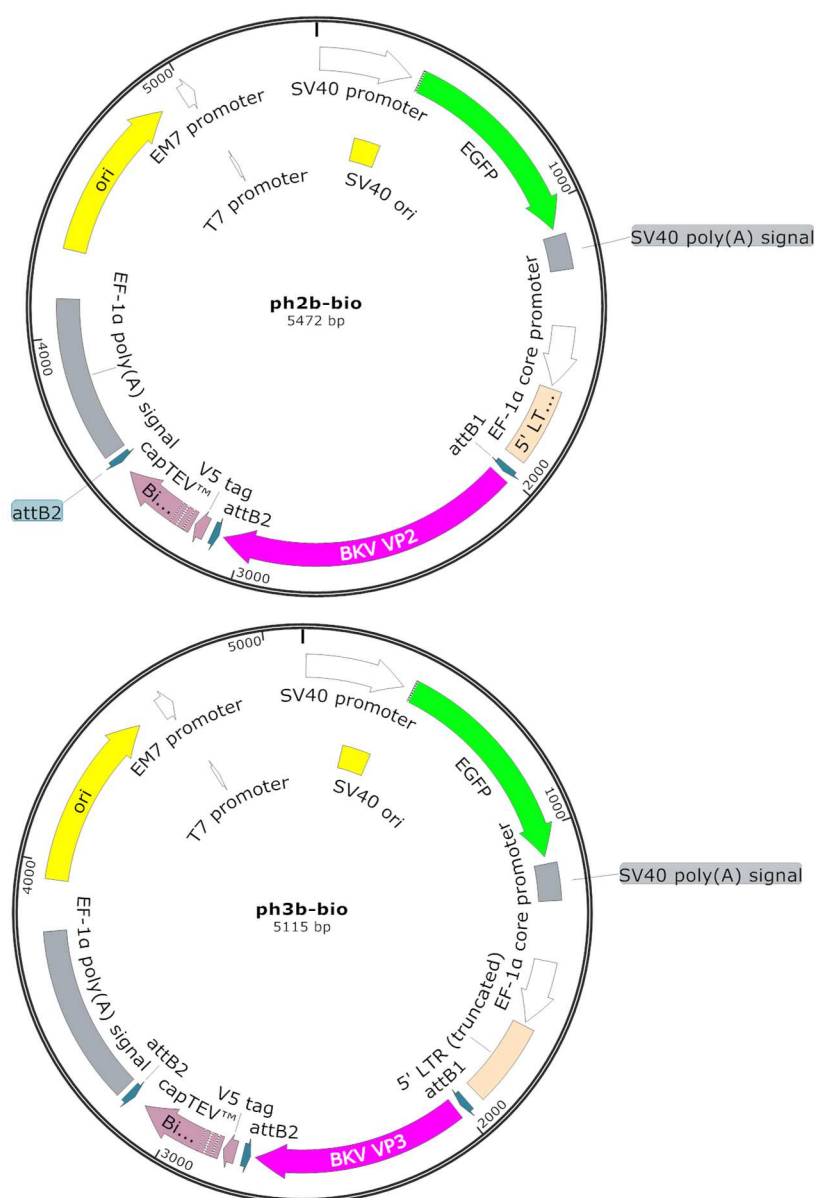
Od každého konstruktů byly pro další práci vybrány bakteriální monokolonie označené červeným obdélníčkem. V případě použití enzymu AflIII nedošlo k úplnému štěpení vektoru a proto byly vektory z vybraných monoklonií ověřeny znovu štěpením (viz Obr. 23). Z vybraných bakteriálních monoklonií byly opět izolovány vektory. Vzhledem k tomu, že při prvním použití enzymu AflIII nedošlo k úplnému štěpení vektoru, byly izolované vektory kódující minoritní proteiny BKV viru znovu ověřeny restričním štěpením enzymem AflIII (Obr. 23).

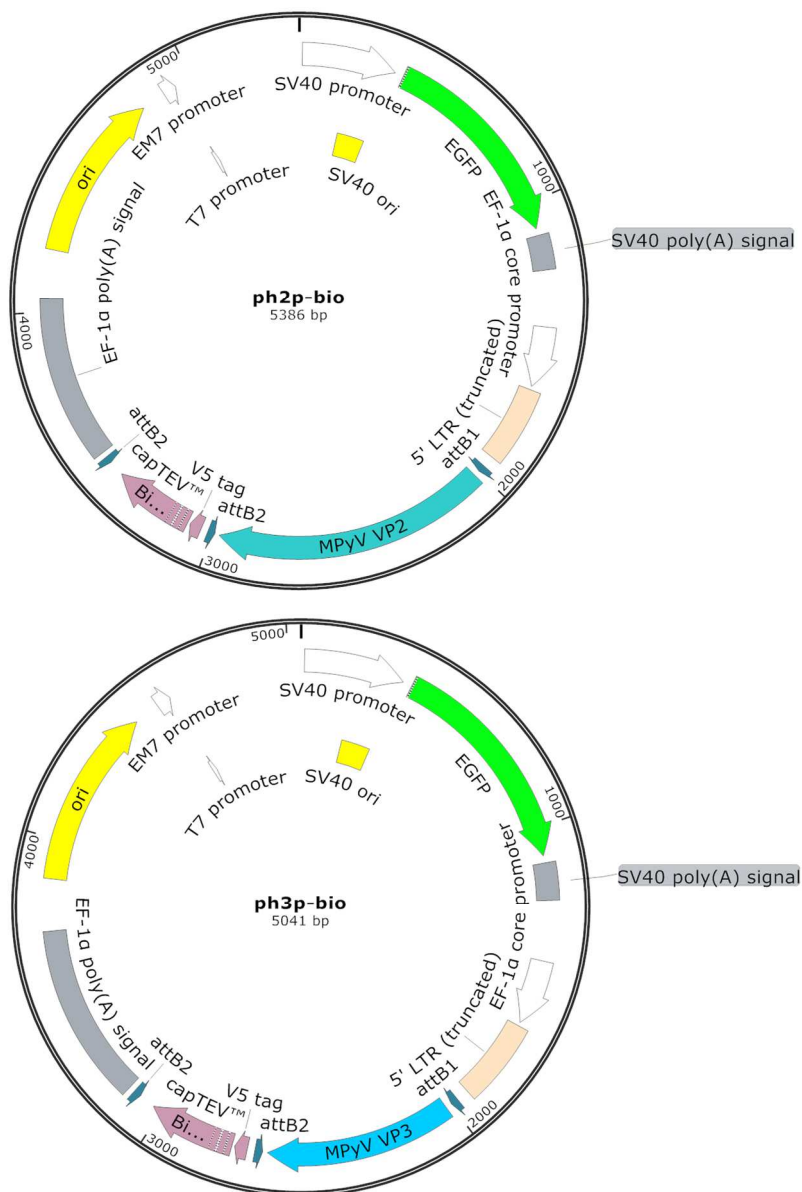


**Obr. 23** Elektroforetogram ověření kondice vektorů pEDT-B2-bio a pEDT-B3-bio a jejich restričního ověření enzymem AflIII. Ze čtyř vybraných monoklonií jsou pouze dva vektory (označeno červeným rámečkem) štěpeny enzymem AflIII podle předpokladu, vznikají proužky o velikosti 3140, 923 a 566 bp. Vektory izolované z těchto dvou monoklonií byly ověřeny také sekvenací. DNA fragmenty byly zviditelněny pomocí GelRed Nucleic Acid Stain.

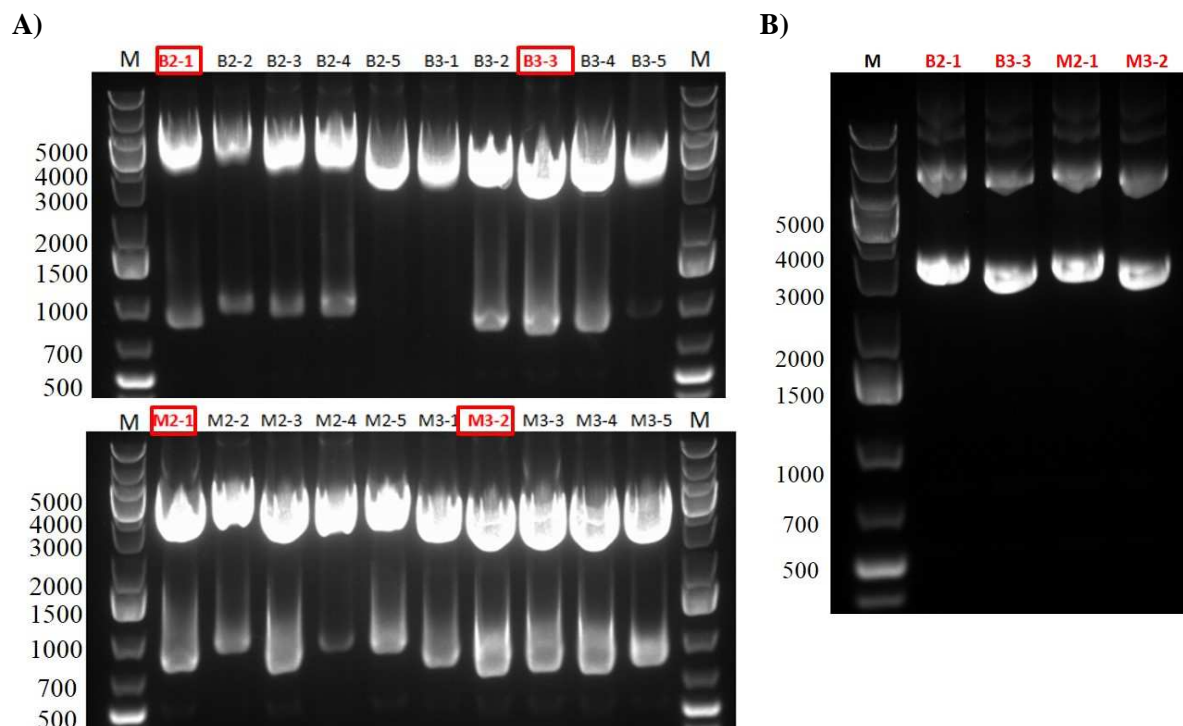
Vektory izolované z jedné monoklonie každého konstruktů byly následně ověřeny sekvenací s použitím primerů č. 6 a 7, které jsou komplementární k sekvenci vektoru pENTR D-TOPO v okolí inzertované sekvence (výsledky neuvedeny). Poté byla provedena LR rekombinace ověřených „entry“ vektorů s „destination“ vektorem phGf (kap. 4.12.10). Tím byly vytvořeny expresní vektory ph2b-bio,

ph3b-bio, ph2p-bio a ph3p-bio kódující sekvence minoritních proteinů BKV a MPyV s C-koncovou značkou capTEV vložené do kostry vektoru phGf. Genomové mapy použitých expresních vektorů jsou na Obr. 24. LR rekombinační směsí byly transformovány bakterie kmene *E. coli* DH5 $\alpha$ , z vybraných monoklonií byly opět alkalickou metodou izolovány vektory a ověřeny restrikcí štěpením enzymem NotI (Obr. 25A). Předpokládaná velikost vzniklých fragmentů byla 906 a 4556 bp pro ph2b-bio, 906 a 4209 bp pro ph3b-bio, 906 a 4480 bp pro ph2p-bio a 906 a 4135 bp pro vektor ph3p-bio. Dále byly vybrány čtyři bakteriální monoklonie transformované vždy jedním z expresních vektorů (v elektroforetogramu označeny červeným rámečkem), vektory byly následně izolovány soupravou JetStar Pasmid Purification Kit (Genomed) a na agarózové DNA elektroforéze byla ověřena jejich integrita (Obr. 25B). Savčí buňky 293T byly následně transfekovány pomocí kationických polymerů TurboFect (kap. 4.13.3.1) expresními vektory ph2b-bio, ph3b-bio, ph2p-bio a ph3p-bio pro ověření produkce minoritních proteinů s capTEV značkou.



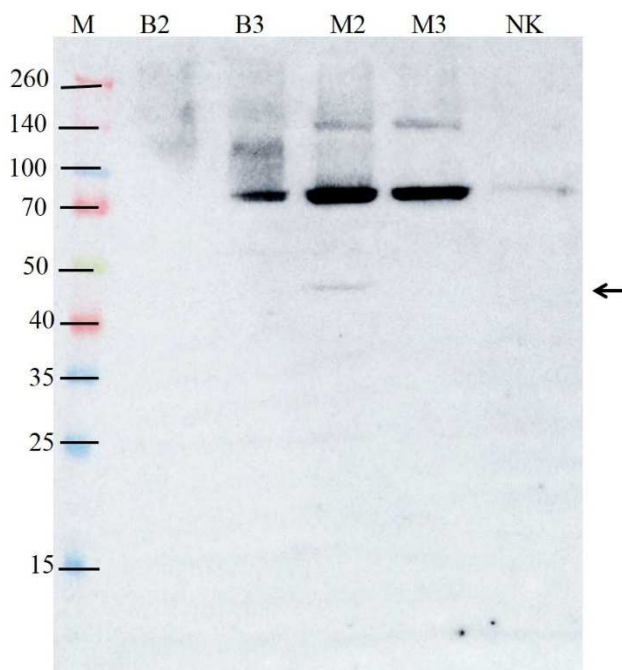


**Obr. 24** Genomové mapy vytvořených expresních vektorů ph2b-bio, ph3b-bio, ph2p-bio a ph3p-bio. Mapy byly vytvořeny pomocí počítačového softwaru Snap Gene.



**Obr. 25** Elektroforetogram reprezentující restriční štěpení expresních vektorů ph2b-bio, ph3b-bio, ph2p-bio a ph3p-bio enzymem NotI a kontrolu integrity vektorů izolovaných z vybraných monoklonií. **A)** Předpokládaná velikost fragmentů: 906 a 4556 bp – ph2b-bio, 906 a 4209 bp – ph3b-bio, 906 a 4480 bp – ph2p-bio a 906 a 4135 bp – ph3p-bio. Pro další práci byly vybrány čtyři monoklonie obsahující požadované vektory (označeny červeně). **B)** Kontrola integrity expresních vektorů ph2b-bio (B2-1), ph3b-bio (B3-2), ph2p-bio (M2-1) a ph3p-bio (M3-2). DNA fragmenty byly zviditelněny pomocí GelRed Nucleic Acid Stain.

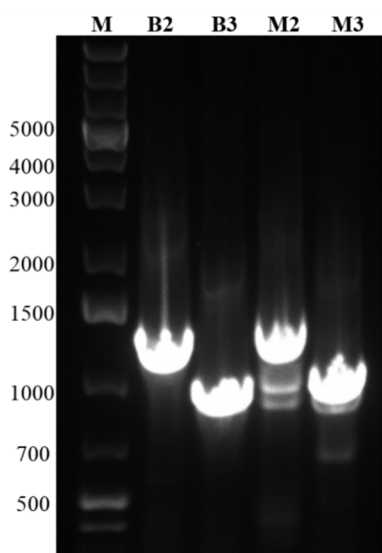
Produkce rekombinantních minoritních proteinů po transfekci savčích buněk připravenými expresními vektory byla ověřována metodou SDS-PAGE, Western Blot a následnou imunodetekcí minoritních proteinů imobilizovaných na NC membráně pomocí specifických protilátek proti biotinu ( $\alpha$ -biotin) (Obr. 26). Připojením značky capTEV k C-konci minoritních proteinů se jejich velikost zvětší o 15 kDa; na NC membráně bychom tedy měli vidět proužky odpovídající jednotlivým biotinylovaným rekombinantním proteinům o následujících velikostech: BKV VP2 – 53,3 kDa, BKV VP3 – 41,7 kDa, MPyV VP2 – 50 kDa a MPyV VP3 – 38 kDa.



**Obr. 26** Ověření exprese minoritních proteinů s C-koncovou capTEV značkou. Detekce rekombinantních proteinů v lyzátu savčích buněk po transfekci expresními vektory ph2b-bio, ph3b-bio, ph2p-bio a ph3p-bio byla provedena na NC membráně pomocí specifické protilátky proti biotinu ( $\alpha$ -biotin, ředění 1:1000) a specifické sekundární protilátky konjugované s křenuvou peroxidázou (GaRb – HRP, ředění 1:1000). K expresi biotinylovaných minoritních proteinů zřejmě nedochází nebo je velmi slabá, jediný proužek, který by mohl reprezentovat MPyV VP2 s biotinovou kotvou je označen šipkou. Předpokládaná velikost rekombinantních proteinů: BKV VP2 – 53,3 kDa, BKV VP3 – 41,7 kDa, MPyV VP2 – 50 kDa a MPyV VP3 – 38 kDa.

Protože připravené expresní vektory nesou kromě genů minoritních proteinů také gen pro GFP protein, bylo možné ověřit účinnost transfekce pozorováním transfekovaných buněk pod fluorescenčním mikroskopem. Ačkoliv transfekce proběhla dle našeho pozorování úspěšně, bohužel se zdá, že i po překlónování do jiného expresního vektoru nedochází v savčích buňkách k produkci minoritních proteinů, anebo je jejich produkce velmi nízká. Specifickou protilátkou proti biotinu jsme detekovali pouze velmi slabý proužek, který by mohl reprezentovat rekombinantní minoritní protein VP2 MPyV (Obr 26, označen šipkou). Ostatní detekované proužky reprezentují endogenní biotinylované proteiny.

I přesto, že tzv. „entry vektory“ byly v průběhu klonování ověřeny sekvenací, provedli jsme ještě PCR ověření přítomnosti genu minoritního proteinu s capTEV kotvou ve vytvořených expresních vektorech (Obr. 27). Jako primery „forward“ byly použity primery č. 1, 2, 3 a 4, primer „reverse“ č. 5 komplementární k úseku s capTEV kotvou byl pro všechny čtyři reakce stejný. PCR byla provedena podle postupu popsání v kap. 4.12.7, pouze teplota nasedání primerů byla zvolena na jednotných 54 °C. Pro vizualizaci namnožených úseků bylo naneseno 5  $\mu$ l z každé PCR reakce do jamek agarózového gelu a byla provedena DNA elektroforéza. Z výsledku uvedeného na Obr. 27 vyplývá, že všechny vytvořené expresní vektory kódují sekvenci minoritního proteinu s capTEV kotvou. Vektory však neprodukuje minoritní proteiny v savčích buňkách v dostatečném množství a pro studium interakcí nejsou příliš vhodné.



**Obr. 27** Elektroforetogram ověření přítomnosti sekvence minoritních proteinů s capTEV kotvou v expresních vektorech ph2b-bio (B2), ph3b-bio (B3), ph2p-bio (M2) a ph3p-bio (M3). Předpokládaná velikost fragmentů odpovídá výsledku; ph2b-bio: 1483 bp, ph3b-bio: 1126 bp, ph2p-bio: 1391 bp, ph3p-bio: 1046 bp. DNA fragmenty byly zviditelněny pomocí GelRed Nucleic Acid Stain.

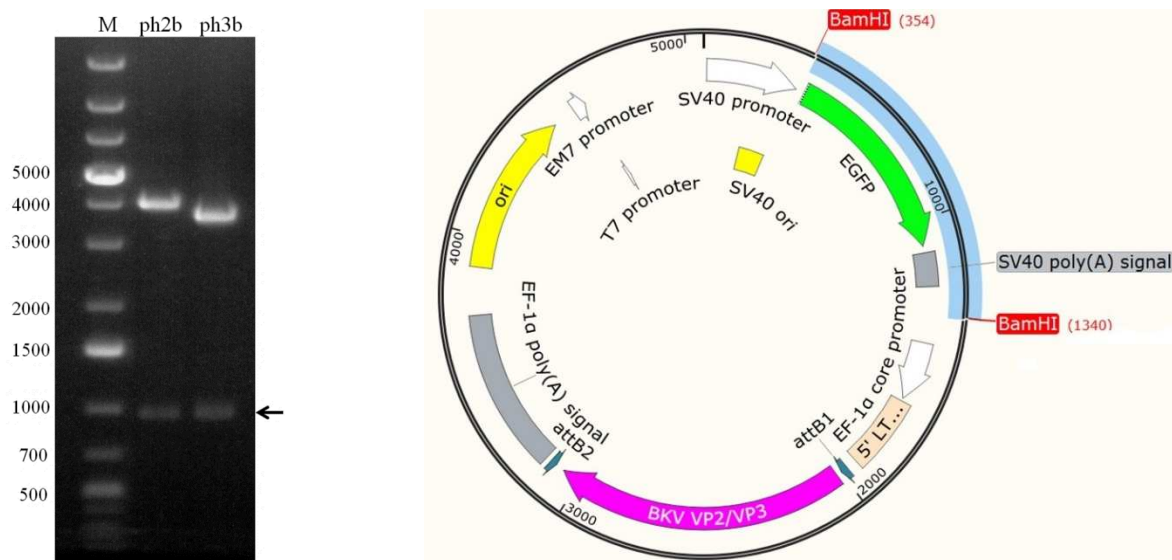
#### 5.3.4. Příprava vektorů pro sledování lokalizace minoritních proteinů BKV

Pro sledování lokalizace a studium interakcí minoritních proteinů v buňkách pomocí metody imunofluorescence bylo nutné připravit varianty vektorů ph2b a ph3b s delecí genu pro GFP protein. Vektory ve svém původním stavu jsou sice vhodné pro transfekce, protože můžeme s výhodou využít sledování exprese GFP proteinu k určení množství transfekovaných buněk. Nejsou však příliš vhodné pro sledování lokalizace minoritních proteinů, a to z několika důvodů.

Zprvé, nadprodukce každého proteinu vytváří abnormální prostředí v buňkách a čím více takových proteinů je produkováno, tím více se vzdalujeme od přirozeného stavu buněk a lokalizace minoritních proteinů v buňkách by tím mohla být ovlivněna. Zadruhé, exprese proteinu GFP je pro buňky toxická. Vzhledem k cytotoxicitě polyomavirových minoritních proteinů (Huerfano *et al.*, 2010) tak není vhodné produkovat GFP a minoritní proteiny najednou. A zatřetí, přítomnost GFP proteinu znemožňuje využití sekundárních protilátek se zeleným fluoroforem pro sledování lokalizace minoritních proteinů v buňkách. Vektory ph2p a ph3p nesoucí geny pro minoritní proteiny MPyV s delecí genu pro GFP byly v naší laboratoři již dříve připraveny, lokalizace minoritních proteinů viru BKV (variant nefúzovaných s GFP) však nebyla v naší laboratoři dosud sledována. Pro sledování lokalizace minoritních proteinů BKV bylo tedy nutné vektory ph2b a ph3b s delecí genu pro GFP připravit.

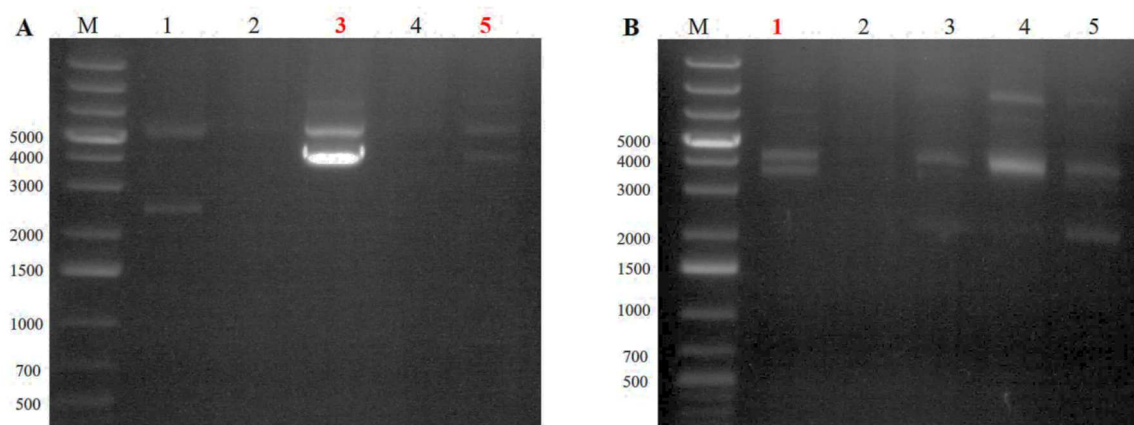
Vektory ph2b a ph3b izolované pomocí soupravy JetStar Plasmid Purification Kit (Genomed) byly štěpeny restriční endonukleázou BamHI. Restriční místa enzymu BamHI leží ve vektorech v těsné blízkosti genu pro GFP, vyštěpený fragment o velikosti 986 nukleotidů obsahuje gen pro GFP a jeho okolí. Restriční enzym byl teplotně inaktivován a výsledek restričního štěpení vektorů byl ověřen pomocí agarózové DNA elektroforézy (Obr. 28). Po ověření vyštěpení fragmentu s genem pro GFP byly

oba vektory přečištěny (viz kap. 4.12.1). Následně byl vektor po vyštěpení GFP fragmentu opět zaligován do cirkulární podoby.



**Obr. 28 Restriční štěpení vektorů ph2b a ph3b enzymem BamHI.** Vyštěpený fragment o velikosti 986 nukleotidů (šipka u elektroforetogramu; modře zvýrazněná oblast vektoru) obsahuje gen pro GFP a jeho nejbližší okolí. Fragменты o velikosti okolo 4000 bp odpovídají zbytku vektorů po vyštěpení genu pro GFP enzymem BamHI. DNA fragmenty byly zviditelněny pomocí GelRed Nucleic Acid Stain. Genomová mapa s vyobrazeným místem štěpení byla vytvořena v počítačovém softwaru SnapGene.

Zaligované vektory ph2b  $\Delta$ GFP a ph3b  $\Delta$ GFP byly elektroporovány do kompetentních bakterií kmene *E. coli* TOP10 selektovány na agarových plotnách se zeocinem. Z vybraných monoklonií byly izolovány vektory alkalickou metodou (kap. 4.12.2) a úspěšnost vyštěpení genu pro GFP byla ověřena restričním štěpením enzymem BamHI. V případě obou vektorů byla očekávána jejich linearizace. Vektory byly štěpeny 3 hodiny v termostatu, štěpení ovšem neproběhlo úplně a ve všech vzorcích jsou patrné i nedoštěpené vektory (Obr. 29). Bakteriální monoklonie č. 3 a 5 transformované vektorem ph2b  $\Delta$ GFP a bakteriální monoklonie č. 1 transformovaná vektorem ph3b  $\Delta$ GFP byly tedy vybrány a zaočkovány pro další práci (Obr. 29, označeny červeně).

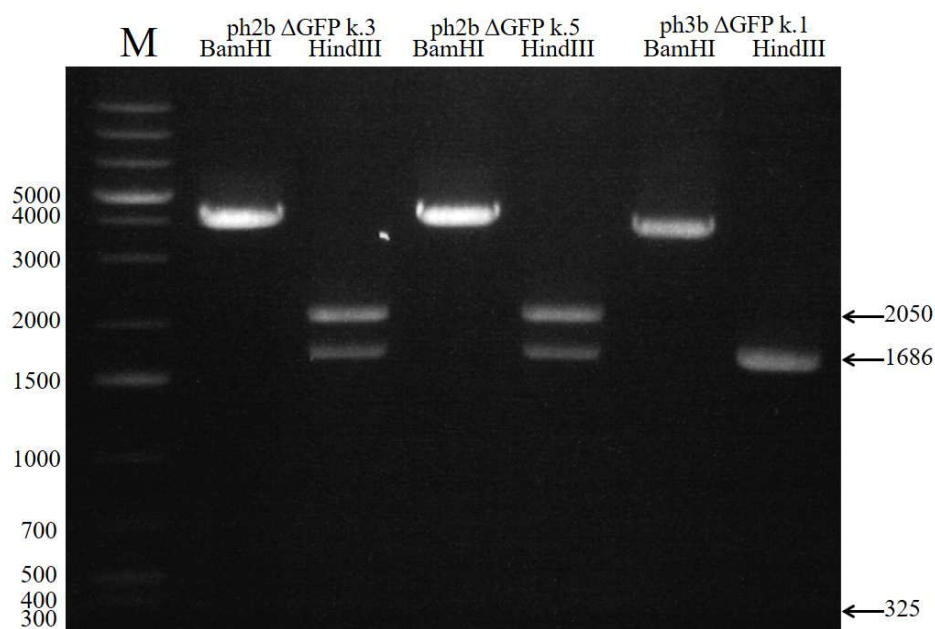


**Obr. 29 Vektory izolované z vybraných monoklonií kompetentních bakterií *E. coli* TOP10 transformovaných vektory A) ph2b  $\Delta$ GFP a B) ph3b  $\Delta$ GFP štěpené enzymem BamHI.** Uvnitř vektoru je jen jedno restriční místo pro enzym BamHI, proto byla očekávána linearizace vektorů, štěpení však nebylo úplně a ve vzorcích je přítomen i proužek reprezentující neštěpený vektor. Monoklonie označené červeně byly vybrány a zaočkovány pro další použití. DNA fragmenty byly zviditelněny pomocí GelRed Nucleic Acid Stain.

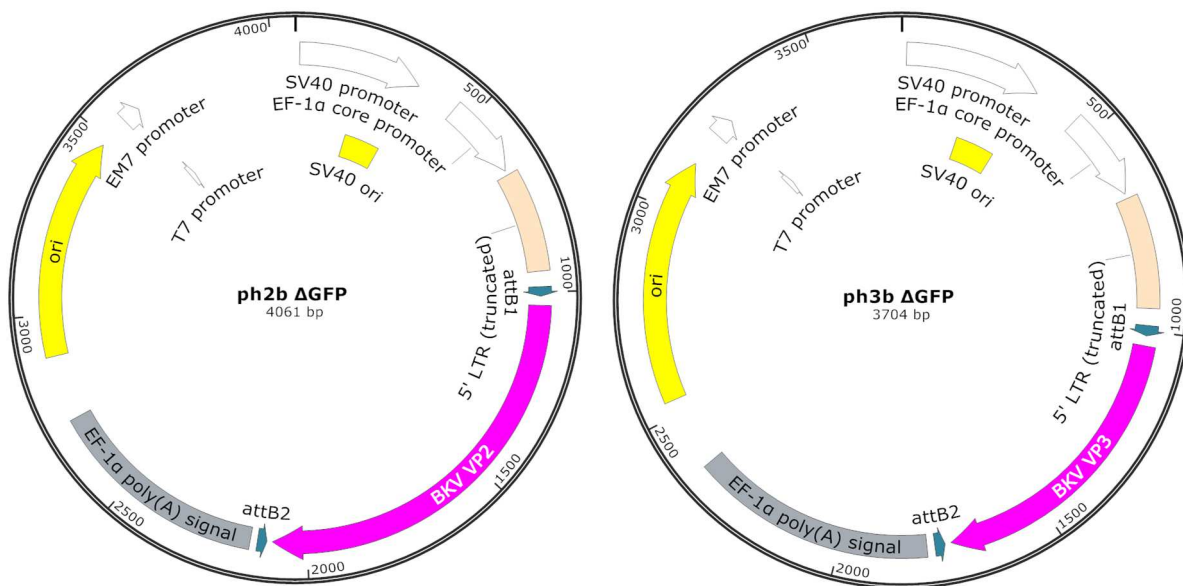


Vektory ze zaočkovaných monoklonií byly izolovány pomocí komerční soupravy GenElute HP Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) a pro jistotu znovu ověřeny restričním štěpením enzymy BamHI a HindIII. Enzym BamHI byl vybrán pro potvrzení linearizace a v jiné reakci byly vektory štěpeny enzymem HindIII, který štěpí oba vektory na 3 části. V případě vektoru ph2b ΔGFP vznikají fragmenty o velikosti 2050 bp, 1686 bp a 325 bp, v případě vektoru ph3b ΔGFP vznikají dva fragmenty o velikosti 1686 bp viditelné jako jeden proužek a fragment o velikosti 325 bp. Nejmenší proužek je na elektroforetogramu špatně viditelný, při pozorování agarózového gelu obarveného barvou GelRed Nucleic Acid Stain pod UV-transiluminátorem byl však ve všech třech vzorcích patrný (Obr. 30).

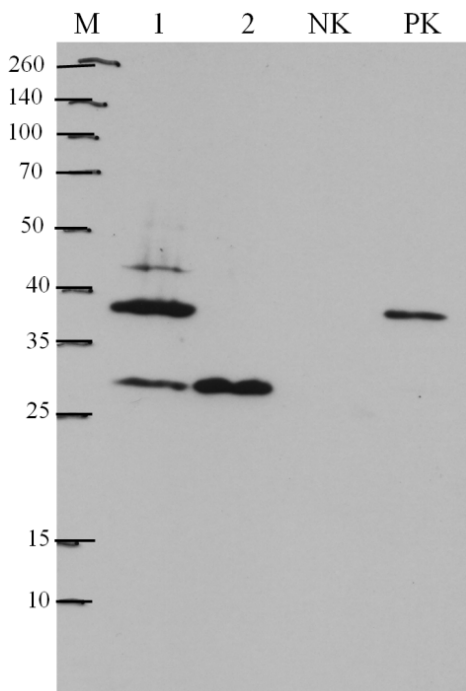
Byly zaočkovány bakteriální monoklonie produkující oba připravené vektory ph2b ΔGFP a ph3b ΔGFP a vektory byly izolovány pomocí soupravy JetStar Plasmid Purification Kit (Genomed). Genomové mapy připravených vektorů jsou uvedeny na Obr. 31. Vektory byly použity pro transfekci savčích buněk NIH 3T3 pomocí přístroje Amaxa Nucleofector™. Produkce minoritních proteinů byla ověřena rozdělením lyzátů transfekovaných buněk pomocí metody SDS-PAGE a následnou imunodetekcí na NC membráně. Z Obr. 32 je patrné, že oba vytvořené vektory ph2b ΔGFP i ph3b ΔGFP po transfekci do savčích buněk úspěšně produkují minoritní proteiny viru BKV a jsou tak připraveny pro sledování lokalizace minoritních proteinů viru BKV v buňkách. Samotné sledování lokalizace minoritních proteinů MPyV a BKV v savčích buňkách nebylo zatím z časových důvodů provedeno.



**Obr. 30** Ověření vektorů z vybraných monoklonií restričním štěpením enzymy BamHI a HindIII. Velikost proužků odpovídá předpokládané velikosti. Enzym BamHI vektor ve všech případech pouze linearizoval, enzym HindIII naštěpil vektor ph2b ΔGFP na 3 části o velikosti 2050, 1686 a 325 bp. Enzym HindIII naštěpil vektor ph3b ΔGFP také na tři části a to na dvě shodně velké o velikosti 1686 bp a menší část o velikosti 325 bp. Nejmenší proužek je na elektroforetogramu špatně viditelný, pod UV-transiluminátorem byl však ve všech třech vzorcích patrný. DNA fragmenty byly zviditelněny pomocí GelRed Nucleic Acid Stain.



**Obr. 31** Genomové mapy vytvořených expresních vektorů **ph2b ΔGFP** a **ph3b ΔGFP**. Mapy byly vytvořeny v počítačovém softwaru SnapGene.



**Obr. 32** Ověření produkce minoritních proteinů BKV po transfekci připravenými vektory **ph2b ΔGFP** a **ph3b ΔGFP**. Imunodetekce minoritních proteinů v lyzátu buněk 3T3 transfekovaných vytvořenými vektory. BKV VP2 (38,3 kDa) – dráha 1, BKV VP3 (26,7 kDa) – dráha 2, NK – negativní kontrola, RIPA lyzát netransfekovaných buněk NIH 3T3, PK – pozitivní kontrola, RIPA lyzát NIH 3T3 buněk transfekovaných vektorem ph2b nesoucím gen pro BKV VP2 protein. Oba vytvořené vektory úspěšně produkují minoritní proteiny viru BKV. Použité protilátky: primární protilátka  $\alpha$ -BKV C-term VP2/3 (1:1000); sekundární protilátka GaRb – HRP (1:1000).

## 6. Diskuze

I přesto, že jsou polyomaviry studovány již několik dekad, stále chybí základní poznatky o minoritních proteinech, zejména o jejich možných rolích v životním cyklu viru, potenciálních interakčních buněčných partnerech a povaze interakcí s buněčnými strukturami. Je to dáno tím, že minoritní kapsidové proteiny polyomavirů jsou poměrně nesnadným objektem zkoumání. Problémy způsobuje jejich cytotoxicita při expresi, a to jak v bakteriích (Daniels *et al.*, 2006b), tak i v tkáňových kulturách (Huerfano *et al.*, 2010) a také jejich nerozpustnost. Díky tomu je jejich výzkum značně komplikován a využití některých klasických nástrojů pro studium např. protein-proteinových interakcí je značně problematické. Všechny tyto komplikace jsou způsobené jen vlastnostmi minoritních proteinů, při práci se k nim přidávají i další technické problémy, jako je nedostatek funkčních protilátek či velmi omezené informace o minoritních proteinech jiných polyomavirů, než modelových virů SV40 a MPyV. Jejich výzkum je však důležitou součástí porozumění životnímu cyklu polyomavirů a přes všechny obtíže se i v naší laboratoři podařilo během let pozorování a experimentování na modelu MPyV vnést do studia struktury a funkce minoritních proteinů nové poznatky. Tato diplomová práce navazuje na výsledky předchozího studia minoritních proteinů polyomavirů v naší laboratoři a zaměřuje se na studium cytotoxicity a interakcí minoritních proteinů polyomavirů BKV a MPyV. Součástí této práce byla také příprava a testování specifických polyklonálních protilátek proti minoritním proteinům obou polyomavirů, které by v budoucnu mohly přispět k vylepšení technického zázemí studia polyomavirů v naší laboratoři.

### 6.1. Příprava specifických protilátek proti minoritním proteinům MPyV a BKV

Ke studiu minoritních proteinů je nezbytné disponovat funkčními specifickými protilátkami. Během let výzkumu se i v naší laboratoři uskutečnilo mnoho pokusů o přípravu polyklonálních či monoklonálních protilátek proti proteinům polyomavirů. Zatímco příprava protilátek proti hlavnímu kapsidovému proteinu VP1 polyomavirů je téměř bezproblémová (Morávková, 2001; Kozmanová, 2011; Sauerová, 2013), pokusy o přípravu protilátek proti minoritním kapsidovým proteinům se potýkají s mnoha problémy. Již na počátku přípravy protilátky činí potíže nízká rozpustnost minoritních proteinů, kvůli níž se v průběhu práce minoritní proteiny „ztrácejí“ a výtěžky jejich izolace jsou velmi malé. Příprava monoklonálních protilátek je velice časově náročná a nezaručuje pozitivní výsledek; v naší laboratoři se přes velké úsilí dosud nepodařilo získat hybridom stabilně produkující specifickou protilátku proti minoritnímu proteinu virů BKV nebo MCPyV (Podolská, 2008; Vochyánová, 2013; Kojzarová, nepublikovaná data). V jednom případě se při přípravě protilátky proti minoritnímu proteinu podařilo získat hybridom stabilně produkující monoklonální protilátku, tato protilátka však byla specifická proti hlavnímu kapsidovému proteinu VP1. Tento zvláštní jev byl způsoben kontaminací

antigenů pro imunizaci. Minoritní protein pro imunizaci byl v tomto případě připraven vyříznutím z PAA gelu, na němž byly separovány VLPs obsahující hlavní i minoritní kapsidový protein BKV viru. I přesto, že proužky obou proteinů byly po separaci v PAA gelu od sebe velmi vzdálené, byl VP2 proužek zřejmě kontaminován malým množstvím degradovaného proteinu VP1. Ten je velice imunogenní a po imunizaci tímto materiálem byl získán hybridom produkující protilátku proti hlavnímu kapsidovému proteinu. Hybridomy produkující protilátky proti minoritnímu proteinu se sice také podařilo selektovat, ale byly příliš nestabilní a po několika pasážích uhynuly (Podolská, 2008). Abychom se všem těmto problémům vyhnuli, zvolili jsme jiný přístup.

Nejdříve jsme vytypovali dva peptidy ve společné C-koncové oblasti minoritních proteinů MPyV nebo BKV viru, nechali jsme je nasyntetizovat a následně jimi byli imunizováni králíci. Takto získané králíčí protilátky proti C-koncovému peptidu minoritních proteinů MPyV ( $\alpha$ -MPyV C-term VP2/3) a BKV ( $\alpha$ -BKV C-term VP2/3) jsou sice polyklonální, ale vzhledem k délce peptidů použitých pro imunizaci (13, resp. 14 aminokyselinových zbytků pro MPyV, resp. BKV) se chovají spíše jako protilátky monoklonální. Specifita obou protilátek byla testována několika metodami. Bylo zjištěno, že obě protilátky lze využít pro imunodetekci jak nativních, tak i denaturovaných proteinů imobilizovaných na nitrocelulózové membráně. Bohužel, při použití pro imunofluorescenční detekci proteinů v buňkách nebyl detekován specifický signál. Navíc obě protilátky nesespecificky interagovaly s buněčnými strukturami, nejsou tudíž pro tuto metodu použitelné. Možným vysvětlením tohoto jevu by mohlo být právě to, že při samostatné produkci minoritních proteinů v buňkách se tvoří makromolekulární struktury, uvnitř kterých je C-terminální oblast minoritních proteinů skryta a protilátka s ní nemůže interagovat. Zároveň existuje možnost, že uvnitř buňky se nachází nějaký protein, jehož sekvence se částečně shoduje se sekvencí peptidů použitých pro přípravu obou protilátek. V tomto případě by ale také musel vznikat nesespecifický signál i při použití protilátek pro imunodetekci minoritních proteinů z buněčných lyzátů na nitrocelulózové membráně. Nejspíše se tedy jedná o nesespecifickou interakci protilátky s náhodnými buněčnými strukturami, čemuž napovídá i skutečnost, že při imunofluorescenční analýze vytvářejí obě protilátky v buňkách velké nesespecifické pozadí (neuvedené výsledky). Možností jak tyto interakce eliminovat je vysycení polyklonální protilátky proti nesespecifickým antigenům, to ale v případě této protilátky, připravené proti krátkým peptidům, bohužel není vhodným řešením.

Pro sledování minoritních proteinů obou polyomavirů uvnitř buněk metodou imunofluorescence bylo tedy nutné připravit nové specifické protilátky. Rezignovali jsme na izolaci minoritních proteinů z virových částic, které již dříve nebyly úspěšné (Podolská, 2008) a antigen jsme připravili separací proteinů denaturovaného lyzátu savčích buněk, jež byly transfekovány vektory kódujícími sekvence minoritních proteinů polyomavirů MPyV nebo BKV. Tím jsme eliminovali kontaminaci antigenů pro imunizaci hlavním kapsidovým proteinem VP1. Přítomnost PAA gelu zároveň sloužila při imunizaci králíků jako adjuvans. Připravené polyklonální protilátky  $\alpha$ -MPyV VP2/3 a  $\alpha$ -BKV VP2/3 byly

primárně testovány pro použití k imunofluorescenční detekci lokalizace minoritních proteinů v buňkách. Bylo zjištěno, že protilátka  $\alpha$ -MPyV VP2/3 interaguje specificky s minoritním proteinem VP2 MPyV samostatně produkovaným v savčích buňkách. Protilátka  $\alpha$ -BKV VP2/3 však má nespecifický signál a pro sledování lokalizací minoritních proteinů BKV v buňce je nevhodná. Zda bude tyto protilátky možné použít pro imunodetekci proteinů imobilizovaných na nitrocelulóзовé membráně bude dále testováno.

V rámci této práce byly navrženy a otestovány celkem čtyři protilátky proti minoritním proteinům polyomavirů BKV a MPyV. Dvě protilátky ( $\alpha$ -MPyV C-term VP2/3 a  $\alpha$ -BKV C-term VP2/3) mají specifický signál při imunodetekci proteinů na nitrocelulóзовé membráně, pouze jedna protilátka ( $\alpha$ -MPyV VP2/3) je vhodná pro imunofluorescenční detekci proteinů v buňkách. Obě protilátky  $\alpha$ -MPyV VP2/3 a  $\alpha$ -BKV VP2/3 však ještě vyžadují důkladné ověření.

## 6.2. Porovnání míry cytotoxicity minoritních proteinů MPyV a BKV

Cytotoxicita minoritních proteinů MPyV při jejich samostatné produkci v buňkách již byla potvrzena dříve (Huerfano *et al.*, 2010), cytotoxicita minoritních proteinů polyomaviru BKV však nebyla dosud v literatuře popsána, a proto jsme se rozhodli ji studovat. Predikce sekundární struktury minoritních proteinů VP2 obou polyomavirů naznačuje jistou podobnost v rozložení hydrofóbních domén a předpovídá tvorbu amfipatického  $\alpha$ -helixu, který je typickým rysem viroporinů (Martinez-Gil & Mingarro, 2015; Nieva & Carrasco, 2015). Vlastností, která spojuje viroporiny s cytotoxickým efektem, je právě schopnost amfipatických helixů oligomerizovat a tvořit póry v membránách buněk, jako je tomu např. u agnoproteinu lidského polyomaviru JCV (Suzuki *et al.*, 2010). Vysoká afinita viroporinů k buněčným membránám také snižuje jejich rozpustnost a znesnadňuje jejich izolaci, pravděpodobně je i jednou z příčin jejich cytotoxických vlastností. Oligomerní póry tvořené minoritními proteiny polyomavirů by mohly napomáhat proděravění buněčných membrán, ať už v počátečních fázích virového životního cyklu (při vstupu viru do buňky či uvolnění virionů z endozomů) nebo v pozdních fázích virového životního cyklu při úniku virového potomstva z buňky. Předpokládali jsme, že by minoritní proteiny viru BKV mohly vykazovat nižší míru cytotoxicity, než minoritní proteiny viru MPyV. Příčinou podněcující tuto naši myšlenku je přítomnost agnoproteinu ve viru BKV, pozdního nestrukturního proteinu kódovaného virem BKV, nikoliv však virem MPyV. Pokud by se agnoprotein viru BKV choval podobně, jako agnoprotein lidského polyomaviru JCV (Suzuki *et al.*, 2010), mohl by zajistit tvorbu pórů v buněčné membráně v konečné fázi virového životního cyklu. V takovém případě by minoritní proteiny BKV viru mohly primárně sloužit pouze k částečnému narušení buněčných membrán při vstupu viru do buněk a míra jejich cytotoxicity by tak mohla být v porovnání s minoritními proteiny viru MPyV nižší. Virus MPyV totiž žádný agnoprotein ve svém genomu nekóduje a jeho minoritní proteiny tak pravděpodobně musí zastávat obě výše zmíněné funkce. Podobně se chovají i minoritní proteiny viru SV40, jimž při lyzi buněk napomáhá ještě další pozdní protein VP4 (Daniels *et al.*, 2007).

Abychom mohli porovnávat míru cytotoxicity minoritních proteinů obou polyomavirů mezi sebou, transfekovali jsme buňky 3T3 vektory nesoucími sekvenci vždy jednoho z minoritních proteinů a zároveň sekvenci proteinu GFP a v časových intervalech 7, 12 a 24 hodin po transfekci jsme měřili množství mrtvých buněk. Pro posouzení toxicity samotného GFP proteinu jsme také provedli transfekci buněk vektorem kódujícím pouze gen pro GFP protein. Výsledky dvou nezávislých opakování experimentu naznačují, že minoritní proteiny obou polyomavirů jsou při samostatné produkci v buňkách cytotoxické. V porovnání s minoritními proteiny BKV viru a také s GFP proteinem, který je sám o sobě cytotoxický (Liu *et al.*, 1999), vykazují minoritní proteiny MPyV vyšší míru cytotoxicity. Míra cytotoxicity všech sledovaných minoritních proteinů i proteinu GFP s časem narůstá. Výsledek našeho pozorování minoritních proteinů MPyV se shoduje s pozorováním Huerfano a kolektivu (Huerfano *et al.*, 2010). Aby se potvrdila statistická významnost tohoto trendu, bude ale potřeba experiment ještě zopakovat. Ideální by také bylo sledovat souvislost mezi produkcí minoritních proteinů a množstvím mrtvých buněk ve vzorku v delším čase. Předpokládáme, že při sledování míry cytotoxicity od transfekce po 48 nebo 72 hodin po transfekci, by byla její zvyšující se tendence průkaznější.

Metoda detekce aktivní LDH uvolněné z mrtvých buněk, kterou jsme pro sledování cytotoxicity zvolili, však není pro dlouhodobější experiment vhodná. Výsledky by totiž v pozdějších fázích experimentu mohly být zkresleny přítomností dělících se buněk, které touto metodou nejsme schopni odlišit od buněk původních. Hlavním nedostatkem této metody je také velký vliv transfekce na její výsledek. Transfekce samotná je pro buňky velkou zátěží a oproti informacím uváděným výrobcem (viabilita buněk po transfekci cca 90 %), byla v našem experimentu viabilita buněk mnohem nižší (viz příloha S1). Přestože 4 hodiny po transfekci byla většina buněk zabíjených transfekcí ze vzorků odstraněna spolu s výměnou média, nemůžeme vyloučit ovlivnění výsledku zbytkovým množstvím mrtvých buněk ve vzorku. Dalším problémem je nestejná efektivita transfekce při použití různých vektorů a také její závislost na vnějších podmínkách, jako je např. stáří a celkový stav transfekovaných buněk. Tento problém jsme vyřešili zahrnutím efektivitu transfekce do závěrečného výpočtu míry cytotoxicity. Je to však řešení pouze přibližné, protože ve vzorku vždy zůstává velké množství netransfekovaných buněk, které mohou během experimentu umírat a ovlivňovat tak primární naměřené hodnoty. Přestože jsme vždy používali buňky v nízké pasáži a podmínky pokusu jsme se snažili zachovat, procentuální hodnoty dvou opakování experimentu jsou i tak mírně odlišné, obecný trend však zůstává zachován.

Pro sledování cytotoxicity minoritních proteinů v delších časových intervalech navrhujeme využít metodu průtokové cytometrie. Průtoková cytometrie je metoda umožňující jak odlišení několika generací buněk (Lyons & Parish, 1994; Lyons, 2000), což dosavadní metoda neumožňuje, tak sledování několika různých markerů najednou. Bylo by tak možné z každého vzorku vybrat pouze skupinu transfekovaných buněk a teprve v této skupině buněk určovat poměr mrtvých a živých buněk v různých časových intervalech po transfekci. V literatuře se nám však nepodařilo najít protokol pro stanovení míry cytotoxicity v transfekovaných buňkách a metoda tak jistě bude vyžadovat mnohé optimalizace.

Ideálním řešením celé situace by bylo samozřejmě vytvoření stabilní buněčné linie s vloženými geny pro kapsidové proteiny sledovaných polyomavirů, jejichž produkce by byla regulována inducibilními promotory. V takovém případě by ke studiu cytotoxicity minoritních proteinů stačilo „vypnout“ produkci hlavního kapsidového proteinu umlčením inducibilního promotoru a dále jen sledovat úmrtnost buněk v čase při samostatné produkci minoritních proteinů. Takovouto linii jsme se pokusili v naší laboratoři připravit, bohužel zatím neúspěšně.

### **6.3. Studium tvorby komplexů a interakcí a minoritních proteinů MPyV a BKV**

Výše zmíněné výsledky měření míry cytotoxicity naznačují možné zařazení minoritních proteinů mezi viroporiny, podobně jako je tomu např. u proteinu VP4 polyomaviru SV40 nebo agnoproteinu polyomaviru JCV (Suzuki *et al.*, 2010; Raghava *et al.*, 2011; Royle *et al.*, 2015). Proto jsme směřovali náš další výzkum na studium oligomerizací, jejichž výskyt je pro viroporiny typický (Saribas *et al.*, 2011, 2013; Raghava *et al.*, 2013). Interakce minoritních proteinů MPyV s hlavním kapsidovým proteinem VP1 zesiluje jadernou lokalizaci virových kapsidových proteinů, zatímco produkované samostatně jsou minoritní proteiny lokalizovány jak v jádře, tak v cytoplazmě (Forstová *et al.*, 1993; Huerfano *et al.*, 2010). Vycházeli jsme tedy z předpokladu, že hlavní kapsidový protein ihned po syntéze v cytoplazmě interaguje s minoritními proteiny (Cai *et al.*, 1994), brání tak jejich interakci s membránami a také mezi sebou navzájem. Interakce minoritních proteinů s pentamery proteinu VP1 je však pro virus zcela esenciální, neboť zajišťuje správnou stechiometrii strukturních proteinů v nově vznikající kapsidě. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli sledovat interakce minoritních proteinů v buňkách za nepřítomnosti hlavního kapsidového proteinu VP1. Ačkoliv se tento stav jeví jako vysoce nefyziologický, u polyomaviru SV40 bylo prokázáno, že v pozdních fázích životního cyklu viru se v buňce vyskytuje nadbytek minoritních proteinů, které se shlukují do útvarů s vysokou afinitou k buněčným membránám (Daniels *et al.*, 2007). Sledování oligomerizací minoritních proteinů *in vivo* při infekci virem je bohužel technicky špatně proveditelné vzhledem ke vzrůstající úmrtnosti buněk s postupujícím životním cyklem viru. Domníváme se, že právě oligomerní póry tvořené minoritními proteiny virů MPyV a BKV by se mohly podílet na deregulaci buněk v pozdních fázích infekce.

Vzhledem k tomu, že existence oligomerů minoritních proteinů MPyV a BK viru je pouze hypotetická, doposud nebyla experimentálně ověřena, nejprve jsme testovali, zda minoritní proteiny při samostatné expresi vůbec tvoří nějaké makromolekulární úvary. K tomuto účelu nám dobře posloužila metoda chemického zesíťování proteinů pomocí DSS činidla v buňkách transfekovaných vektory kódujícími jednotlivé minoritní proteiny. Pokus byl navržen podle publikace Suzukiho a kolektivu, kteří podobný experiment prováděli s agnoproteinem polyomaviru JCV (Suzuki *et al.*, 2010). Ireverzibilní zesíťování proteinů umožňuje následnou separaci komplexů denaturační metodou SDS-PAGE. Z našich výsledků po imunodetekci minoritních proteinů na nitrocelulósově membráně vyplývá, že se uvnitř buněk po chemickém zesíťování opravdu nacházejí makromolekulární úvary s obsahem minoritních

proteinů. Tyto útvary mají větší molekulovou hmotnost než monomerní minoritní proteiny. Není však jasné, zda se jedná o oligomerní komplexy minoritních proteinů či jde o komplexy minoritních proteinů interagujících s některými buněčnými strukturami.

Abychom se přiblížili přirozenému stavu proteinových komplexů v buňkách, chtěli jsme se vyhnout využití chemického zesilovacího činidla DSS. Z toho důvodu jsme se rozhodli použít pro separaci proteinů modrou nativní elektroforézu BN-PAGE, která umožňuje separaci proteinů za nedenaturujících podmínek. Proteiny, které se přirozeně nacházejí v buňce v komplexech, díky tomu zůstávají při separaci spojeny a putují gelem jako jeden celek. Největším úskalím použití BN-PAGE je nezbytnost dobré rozpustnosti analyzovaných proteinových komplexů ve zvoleném lyzačním pufru. Pokud není tento předpoklad splněn, protein našeho zájmu nemůže z buněčného lyzátu efektivně vstoupit do PAA gelu a metodu BN-PAGE nelze pro jeho separaci použít. Rozpustnost minoritních proteinů jako vstupní podmínka celé metody se pro nás v případě MPyV stala neřešitelným problémem. I když jsme na základě našeho předešlého výzkumu minoritních proteinů očekávali komplikace, doufali jsme, že použití různých detergentů by mohlo zajistit alespoň částečnou rozpustnost minoritních proteinů. V rámci optimalizace metody byla testována rozpustnost minoritních proteinů obou polyomavirů v různých lyzačních pufrech, které již byly dříve pro tuto metodu úspěšně použity při analýze komplexů hlavního kapsidového proteinu VP1 (Horníková, 2012). V případě minoritních proteinů BKV viru byla rozpustnost v mRIPA pufru uspokojivá, minoritní proteiny MPyV však zůstaly téměř nerozpustné ve všech testovaných pufrech. Chování těchto proteinů je podobné minoritním proteinům viru SV40, jež se při nedostatečné produkci proteinu VP1 v pozdní fázi virového životního cyklu shlukují do oligomerů, které se integrují do buněčných membrán a jsou prakticky nerozpustné (Daniels *et al.*, 2006a). Použití metody BN-PAGE tím bylo omezeno pouze pro separaci a detekci komplexů tvořených minoritními proteiny polyomaviru BKV.

Po separaci lyzátů buněk produkujících VP2 nebo VP3 protein BKV viru pomocí BN-PAGE jsme detekovali specifickou protilátkou  $\alpha$ -BKV C-term VP2/3 makromolekulární komplexy minoritních proteinů BKV viru. Jako jeden z buněčných proteinů interagujících s minoritními proteiny polyomaviru MPyV byl popsán chaperon Hsc 70 (Cripe *et al.*, 1995), proto jsme se rozhodli ověřit, jestli námi pozorované komplexy minoritních proteinů BKV viru také neobsahují tento protein. Pomocí specifické protilátky (rozeznávající jak Hsp 70 tak i Hsc 70) jsme detekovali monomer proteinu Hsp 70 a několik makromolekulárních komplexů s vyšší molekulovou hmotností. Makromolekulární komplex o molekulové hmotnosti přibližně 750 kDa byl označen oběma specifickými protilátkami a pravděpodobně by mohl představovat komplex těchto proteinů. Bohužel, pomocí této metody se nám nepodařilo určit bližší složení identifikovaných komplexů. Pro další charakterizaci by bylo vhodné separované komplexy dále rozdělit v druhém rozměru pomocí SDS-PAGE (Camacho-Carvajal *et al.*, 2004). Vzhledem k tomu, že tento postup zahrnuje denaturaci komplexů a jejich následnou separaci, umožňuje hlubší detekci všech jejich složek. Také by mohl odhalit další



komplexy, které nebyly protilátkou  $\alpha$ -BKV C-term VP2/3 detekovány. C-koncová oblast minoritních proteinů, proti které je protilátka naměřena, může být v proteinových komplexech skrytá špatně přístupná pro navázání protilátky. Tento postup však nemohl být použit, protože se komplexy vyskytovaly v lyzátech ve velmi malém množství. Pro jejich bližší charakterizaci by tedy bylo přínosem je „zakoncentrovat“, pokud možno bez využití specifické protilátky, kdy mohly by nastat stejné problémy s nepřístupností epitopů.

Metodou volby se proto pro nás stal modifikovaný pull-down systém, tzv. „Native pure affinity purification system.“ Tento systém slouží k izolaci nativních proteinových komplexů s využitím tandemové afinitní purifikace. Aby bylo možné komplexy izolovat, musí být označeny značkami. Jako značku jsme zvolili capTEV, která se v živých systémech biotinyluje a je součástí systému pro afinitní purifikace proteinů. Vektory nesoucí sekvenci minoritních proteinů s touto značkou byly v naší laboratoři již připraveny (Fraiberk, nepublikovaná data), ale bylo nutné otestovat jejich expresi v savčích buňkách. Bohužel se ukázalo, že tyto vektory po transfekci savčích buněk minoritní proteiny neprodukuje.

Sekvence minoritních proteinů s capTEV značkou byly tedy z těchto vektorů přeneseny do vektoru phGf, který je vhodně upraven pro produkci proteinů v savčích buňkách. Očekávali jsme, že v tomto uspořádání již bude produkce minoritních proteinů s capTEV značkou bezproblémová. Kostra vektoru phGf je totiž identická s kostrou expresních vektorů ph2p, ph3p, ph2b a ph3b, které úspěšně produkují minoritní proteiny polyomavirů MPyV a BKV po transfekci do savčích buněk. Obdobný postup byl také s úspěchem aplikován na hlavní kapsidový protein VP1 myšího polyomaviru (Horníková, 2012). Bohužel, z připravených expresních vektorů se nepodařilo minoritní proteiny s capTEV značkou v savčích buňkách vyprodukovat. Jednou z dalších možností úpravy těchto expresních vektorů je delece genu pro GFP protein. Přestože je přítomnost GFP proteinu v transfekovaných buňkách pro nás přínosem při sledování efektivity transfekce, je možné, že produkce proteinu GFP nějakým způsobem koliduje s produkcí daného minoritního proteinu polyomavirů MPyV nebo BKV. Odstraněním genu pro GFP protein by také mohlo dojít ke zvýšení míry transkripce genu pro minoritní protein MPyV či BKV. Důvodem tohoto jevu by mohlo být přiblížení promotorové oblasti SV40 do blízkosti genu pro minoritní protein MPyV či BKV viru, jež ve vektoru původně podporovala transkripci genu pro GFP protein. Pokud by ani delece genu pro GFP protein nepomohla ke zvýšení produkce minoritních proteinů MPyV či BKV v savčích buňkách, existuje ještě další možnost, jak tyto expresní vektory upravit. Zvolili bychom postup, který aplikoval vědecký tým laboratoře dr. Bucka (Pastrana *et al.*, 2009; Schowalter *et al.*, 2011). Přestože MPyV i BKV infikují savce a z evolučního hlediska by měly být na svého hostitele adaptovány, jejich tripletové kódování aminokyselin není patrně úplně optimalizováno pro savčí buňky. Vědci z týmu dr. Bucka totiž v expresních vektorech ph2p, ph3p, ph2b a ph3b provedli „překódování“ tripletů kódujících jednotlivé aminokyseliny minoritních proteinů polyomavirů MPyV a

BKV na optimalizovaný savčí kodónový systém, čímž docílili úspěšné produkce polyomavirových minoritních proteinů v savčích buňkách (Pastrana *et al.*, 2009; Schowalter *et al.*, 2011).

Přes neúspěch při produkci minoritních proteinů s capTEV značkou nemusíme na systém tandemové afinitní purifikace proteinových komplexů zanevřít. V naší laboratoři byl již dříve zaveden tento systém pro studium interakcí proteinu VP1 Myšího polyomaviru (Horníková, 2012) a je připravován i pro BKV virus. Některé interakce minoritních proteinů by tak bylo možné sledovat v komplexech vznikajících při ko-expresi minoritního proteinu z vektorů ph2p, ph3p, ph2b nebo ph3b a hlavního kapsidového proteinu VP1 fúzaného s capTEV značkou. Přítomnost hlavního kapsidového proteinu zvyšuje rozpustnost minoritních proteinů (Delos *et al.*, 1993) a navíc přítomnost obou proteinů v jedné buňce přibližuje podmínky experimentu reálným podmínkám *in vivo* při virové infekci. Tento systém by tak mohl být efektivně využit pro vyhledávání buněčných proteinů interagujících s kapsidovými proteiny polyomavirů.

## 7. Závěr

Výsledky představené v této diplomové práci můžeme shrnout do několika následujících bodů.

**Prvním cílem práce bylo připravit protilátky specificky rozpoznávající minoritní proteiny MPyV a BKV, které by byly vhodné pro studium jejich vzájemných interakcí a také interakcí s buněčnými strukturami.**

- Byly připraveny specifické polyklonální protilátky  $\alpha$ -BKV C-term VP2/3 a  $\alpha$ -MPyV C-term VP2/3 vhodné pro imunodetekce proteinů imobilizovaných na membráně.
- Připravili jsme specifické polyklonální protilátky  $\alpha$ -BKV VP2/3 a  $\alpha$ -MPyV VP2/3, přičemž protilátka  $\alpha$ -MPyV VP2/3 je použitelná pro imunofluorescenční detekci minoritních proteinů MPyV.

**Druhým cílem práce bylo zjistit, zda minoritní proteiny BKV vykazují stejnou míru cytotoxicity, jako minoritní proteiny MPyV.**

- Výsledky experimentu naznačují, že minoritní proteiny viru BKV nedosahují stejné míry cytotoxicity jako minoritní proteiny viru MPyV.

**Třetím cílem této práce bylo charakterizovat potenciální komplexy minoritních proteinů MPyV a BKV vznikající jak interakcí s buněčnými proteiny tak i schopnost oligomerizace mezi monomery minoritních proteinů navzájem.**

- Metodou chemického zesíťování proteinů bylo ověřeno, že po individuální expresi minoritních proteinů virů MPyV a BKV dochází v buňkách ke tvorbě makromolekulárních komplexů.
- Byla testována rozpustnost minoritních proteinů virů MPyV a BKV v různých lyzačních pufrech. Pufř mRIPA byl vybrán jako optimální pro studium proteinů viru BKV metodou BN-PAGE.
- Minoritní proteiny viru MPyV byly ve všech testovaných pufrech nerozpustné.
- Po separaci lyzátů buněk transfekovaných vektory kódujícími minoritní proteiny BKV viru metodou BN-PAGE jsme detekovali několik makromolekulárních komplexů tvořených minoritními proteiny BKV viru. Pro bližší charakterizaci komplexů však není tato metoda vhodná.
- Pro bližší charakterizaci nalezených makromolekulárních komplexů a vyhledání nových interakčních partnerů minoritních proteinů metodou tandemové afinitní purifikace byly připraveny expresní vektory ph2p-bio, ph3p-bio, ph2b-bio a ph3b-bio. Po transfekci savčích buněk připravenými vektory však nedochází k produkci fúzních minoritních proteinů se značkou capTEV.
- Byly připraveny expresní vektory ph2b  $\Delta$ GFP a ph3b  $\Delta$ GFP pro studium lokalizace minoritních proteinů v buňce imunofluorescenční detekcí. Produkce minoritních proteinů po transfekci savčích buněk těmito vektory byla ověřena imunodetekcí minoritních proteinů specifickou protilátkou po jejich separaci SDS-PAGE a imobilizaci na membráně.

## 8. Seznam použité literatury

Shrnující články (review) jsou označeny v seznamu citací hvězdičkou(\*).

- Abend, J.R., Joseph, A.E., Das, D., Campbell-Cecen, D.B., Imperiale, M.J., 2009. A truncated T antigen expressed from an alternatively spliced BK virus early mRNA. *Journal of General Virology* 90, 1238–1245.
- Allander, T., Andreasson, K., Gupta, S., Bjerkner, A., Bogdanovic, G., Persson, M.A.A., Dalianis, T., Ramqvist, T., Andersson, B., 2007. Identification of a third human polyomavirus. *Journal of Virology* 81, 4130–4136.
- \*Atkin, S.J.L., Griffin, B.E., Dilworth, S.M., 2009. Polyoma virus and simian virus 40 as cancer models: history and perspectives. *Seminars in Cancer Biology* 19, 211–217.
- Baltimore, D., 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 226, 1209–1211.
- \*Bennett, S.M., Broekema, N.M., Imperiale, M.J., 2012. BK polyomavirus: emerging pathogen. *Microbes and Infection* 14, 672–683.
- Bennett, S.M., Jiang, M., Imperiale, M.J., 2013. Role of cell-type-specific endoplasmic reticulum-associated degradation in polyomavirus trafficking. *Journal of Virology* 87, 8843–8852.
- Bennett, S.M., Zhao, L., Bosard, C., Imperiale, M.J., 2015. Role of a nuclear localization signal on the minor capsid proteins VP2 and VP3 in BKPyV nuclear entry. *Virology* 474, 110–116.
- Bird, G., O'Donnell, M., Moroianu, J., Garcea, R.L., 2008. Possible role for cellular karyopherins in regulating polyomavirus and papillomavirus capsid assembly. *Journal of Virology* 82, 9848–9857.
- Bittner, J.J., 1936. Some possible effects of nursing on the mammary gland tumor incidence in mice. *Science* 84, 162.
- Bílková, Eva. Studium vlastností minoritních strukturních proteinů myšího polyomaviru. Praha, 2014. Diplomová práce. Vedoucí práce Jitka Forstová.
- Bollag, B., Prins, C., Snyder, E.L., Frisque, R.J., 2000. Purified JC virus T and T' proteins differentially interact with the retinoblastoma family of tumor suppressor proteins. *Virology* 274, 165–178.
- Buch, M.H.C., Liaci, A.M., O'Hara, S.D., Garcea, R.L., Neu, U., Stehle, T., 2015. Structural and Functional Analysis of Murine Polyomavirus Capsid Proteins Establish the Determinants of Ligand Recognition and Pathogenicity. *Plos Pathogens* 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., McDermott, A.J., Dill, J.A., Delwart, E., Ng, T.F.F., Farkas, K., Austin, C., Kraberger, S., Davison, W., Pastrana, D.V., Varsani, A., 2016. The Ancient Evolutionary History of Polyomaviruses. *Plos Pathogens* 12, e1005574.
- \*Burger-Calderon, R., Webster-Cyriaque, J., 2015. Human BK Polyomavirus-The Potential for Head and Neck Malignancy and Disease. *Cancers (Basel)* 7, 1244–1270.
- Butin-Israeli, V., Ben-nun-Shaul, O., Kopatz, I., Adam, S.A., Shimi, T., Goldman, R.D., Oppenheim, A., 2011. Simian virus 40 induces lamin A/C fluctuations and nuclear envelope deformation during cell entry. *Nucleus* 2, 320–330.
- Cai, X., Chang, D., Rottinghaus, S., Consigli, R.A., 1994. Expression and purification of recombinant polyomavirus VP2 protein and its interactions with polyomavirus proteins. *Journal of Virology* 68, 7609–7613.
- Calvignac-Spencer, S., Feltkamp, M.C.W., Daugherty, M.D., Moens, U., Ramqvist, T., Johne, R., Ehlers, B., Polyomaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 2016. A taxonomy update for the family Polyomaviridae. *Archives of Virology* 161, 1739–1750.
- Camacho-Carvajal, M.M., Wollscheid, B., Aebersold, R., Steimle, V., Schamel, W.W.A., 2004. Two-dimensional Blue native/SDS gel electrophoresis of multi-protein complexes from whole cellular lysates: a proteomics approach. *Molecular & Cellular Proteomics* 3, 176–182.
- Carbone, M., Ascione, G., Chichiarelli, S., Garcia, M.-I., Eufemi, M., Amati, P., 2004. Chromosome-Protein Interactions in Polyomavirus Virions. *Journal of Virology* 78, 513–519.

- Cavaldesi, M., Caruso, M., Sthandier, O., Amati, P., Garcia, M.I., 2004. Conformational Changes of Murine Polyomavirus Capsid Proteins Induced by Sialic Acid Binding. *Journal of Biological Chemistry* 279, 41573–41579.
- Chang, D., Cai, X., Consigli, R.A., 1993. Characterization of the DNA binding properties of polyomavirus capsid protein. *Journal of Virology* 67, 6327–6331.
- \*Cheng, J., DeCaprio, J.A., Fluck, M.M., Schaffhausen, B.S., 2009. Cellular transformation by Simian Virus 40 and Murine Polyoma Virus T antigens. *Seminars in Cancer Biology* 19, 218–228.
- Chuan, Y.P., Fan, Y.Y., Lua, L.H.L., Middelberg, A.P.J., 2010. Virus assembly occurs following a pH- or Ca<sup>2+</sup>-triggered switch in the thermodynamic attraction between structural protein capsomeres. *Journal of Royal Society Interface* 7, 409–421.
- Cioni, M., Mittelholzer, C., Wernli, M., Hirsch, H.H., 2013. Comparing effects of BK virus agnoprotein and herpes simplex-1 ICP47 on MHC-I and MHC-II expression. *Clinical and Developmental Immunology* 2013, 626823.
- Coric, P., Saribas, A.S., Abou-Gharbia, M., Childers, W., White, M.K., Bouaziz, S., Safak, M., 2014. Nuclear magnetic resonance structure revealed that the human polyomavirus JC virus agnoprotein contains an  $\alpha$ -helix encompassing the Leu/Ile/Phe-rich domain. *Journal of Virology* 88, 6556–6575.
- Cripe, T.P., Delos, S.E., Estes, P.A., Garcea, R.L., 1995. *In vivo* and *in vitro* association of hsc70 with polyomavirus capsid proteins. *Journal of Virology* 69, 7807–7813.
- Dailey, L., Basilico, C., 1985. Sequences in the polyomavirus DNA regulatory region involved in viral DNA replication and early gene expression. *Journal of Virology* 54, 739–749.
- Daniels, R., Rusan, N.M., Wadsworth, P., Hebert, D.N., 2006a. SV40 VP2 and VP3 insertion into ER membranes is controlled by the capsid protein VP1: implications for DNA translocation out of the ER. *Molecular Cell* 24, 955–966.
- Daniels, R., Rusan, N.M., Wilbuer, A.-K., Norkin, L.C., Wadsworth, P., Hebert, D.N., 2006b. Simian virus 40 late proteins possess lytic properties that render them capable of permeabilizing cellular membranes. *Journal of Virology* 80, 6575–6587.
- Daniels, R., Sadowicz, D., Hebert, D.N., 2007. A very late viral protein triggers the lytic release of SV40. *Plos Pathogens* 3, e98.
- Dean, D.A., Li, P.P., Lee, L.M., Kasamatsu, H., 1995. Essential role of the Vp2 and Vp3 DNA-binding domain in simian virus 40 morphogenesis. *Journal of Virology* 69, 1115–1121.
- Delos, S.E., Montross, L., Moreland, R.B., Garcea, R.L., 1993. Expression of the polyomavirus VP2 and VP3 proteins in insect cells: coexpression with the major capsid protein VP1 alters VP2/VP3 subcellular localization. *Virology* 194, 393–398.
- \*DiMaio, D., 2014. Viral miniproteins. *Annual Reviews in Microbiology* 68, 21–43.
- Duff, K.C., Ashley, R.H., 1992. The transmembrane domain of influenza A M2 protein forms amantadine-sensitive proton channels in planar lipid bilayers. *Virology* 190, 485–489.
- Duff, K.C., Kelly, S.M., Price, N.C., Bradshaw, J.P., 1992. The secondary structure of influenza A M2 transmembrane domain A circular dichroism study. *FEBS Letters* 311, 256–258.
- Dugan, A.S., Eash, S., Atwood, W.J., 2005. An N-linked glycoprotein with alpha(2,3)-linked sialic acid is a receptor for BK virus. *Journal of Virology* 79, 14442–14445.
- Dugan, A.S., Gasparovic, M.L., Tsomaia, N., Mierke, D.F., O'Hara, B.A., Manley, K., Atwood, W.J., 2007. Identification of Amino Acid Residues in BK Virus VP1 That Are Critical for Viability and Growth. *Journal of Virology* 81, 11798–11808.
- Eddy, B.E., Stewart, S.E., 1959. Characteristics of the SE Polyoma Virus. *American Journal of Public Health and Nation's Health* 49, 1486–1492.
- Eddy, B.E., Stewart, S.E., Kirschstein, R.L., Young, R.D., 1959a. Induction of subcutaneous nodules in rabbits with the SE polyoma virus. *Nature* 183, 766–767.
- Eddy, B.E., Stewart, S.E., Stanton, M.F., Marcotte, J.M., 1959b. Induction of tumors in rats by tissue-culture preparations of SE polyoma virus. *Journal of the National Cancer Institute* 22, 161–171.
- Eddy, B.E., Stewart, S.E., Young, R., Mider, G.B., 1958. Neoplasms in hamsters induced by mouse tumor agent passed in tissue culture. *Journal of the National Cancer Institute* 20, 747–761.
- Fattaey, A.R., Consigli, R.A., 1989. Synthesis, posttranslational modifications, and nuclear transport of polyomavirus major capsid protein VP1. *Journal of Virology* 63, 3168–3175.

- Feng, H., Shuda, M., Chang, Y., Moore, P.S., 2008. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science* 319, 1096–1100.
- Ford, J.P., Hsu, M.T., 1978. Transcription pattern of in vivo-labeled late simian virus 40 RNA: equimolar transcription beyond the mRNA 3' terminus. *Journal of Virology* 28, 795–801.
- Forstová, J., Krauzewicz, N., Wallace, S., Street, A.J., Dilworth, S.M., Beard, S., Griffin, B.E., 1993. Cooperation of structural proteins during late events in the life cycle of polyomavirus. *Journal of Virology* 67, 1405–1413.
- Fuller, S.A., Takahashi, M., Hurrell, J.G., 2001. Immunization of mice. *Current Protocols in Molecular Biology* Chapter 11, Unit11.4.
- Gardner, S.D., Field, A.M., Coleman, D.V., Hulme, B., 1971. New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet* 1, 1253–1257.
- Gasparovic, M.L., Gee, G.V., Atwood, W.J., 2006. JC Virus Minor Capsid Proteins Vp2 and Vp3 Are Essential for Virus Propagation. *Journal of Virology* 80, 10858–10861.
- Gaynor, A.M., Nissen, M.D., Whiley, D.M., Mackay, I.M., Lambert, S.B., Wu, G., Brennan, D.C., Storch, G.A., Sloots, T.P., Wang, D., 2007. Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. *Plos Pathogens* 3, e64.
- Geiger, R., Andritschke, D., Friebe, S., Herzog, F., Luisoni, S., Heger, T., Helenius, A., 2011. BAP31 and BiP are essential for dislocation of SV40 from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Nature Cell Biology* 13, 1305–1314.
- Gerits, N., Johannessen, M., Tümmeler, C., Walquist, M., Kostenko, S., Snapkov, I., van Loon, B., Ferrari, E., Hübscher, U., Moens, U., 2015. Agnoprotein of polyomavirus BK interacts with proliferating cell nuclear antigen and inhibits DNA replication. *Virology Journal* 12, 7.
- Gharakhanian, E., Muñoz, L., Mayorca, L., 2003. The simian virus 40 minor structural protein Vp3, but not Vp2, is essential for infectious virion formation. *Journal of General Virology* 84, 2111–2116.
- Gilbert, J., Ou, W., Silver, J., Benjamin, T., 2006. Downregulation of protein disulfide isomerase inhibits infection by the mouse polyomavirus. *Journal of Virology* 80, 10868–10870.
- Gilbert, J.M., Benjamin, T.L., 2000. Early steps of polyomavirus entry into cells. *Journal of Virology* 74, 8582–8588.
- Giorda, K.M., Hebert, D.N., 2013. Viroporins Customize Host Cells for Efficient Viral Propagation. *DNA and Cell Biology* 32, 557–564.
- Giorda, K.M., Raghava, S., Hebert, D.N., 2012. The Simian Virus 40 Late Viral Protein VP4 Disrupts the Nuclear Envelope for Viral Release. *Journal of Virology* 86, 3180–3192.
- Giorda, K.M., Raghava, S., Zhang, M.W., Hebert, D.N., 2013. The viroporin activity of the minor structural proteins VP2 and VP3 is required for SV40 propagation. *Journal of Biological Chemistry* 288, 2510–2520.
- \*Gonzalez, M.E., Carrasco, L., 2003. Viroporins. *FEBS Letters* 552, 28–34.
- Griffith, J.P., Griffith, D.L., Rayment, I., Murakami, W.T., Caspar, D.L., 1992. Inside polyomavirus at 25-A resolution. *Nature* 355, 652–654.
- Gross, L., 1953a. A Filterable Agent, Recovered from Ak Leukemic Extracts, Causing Salivary Gland Carcinomas in C3H Mice. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)* 83, 414–421.
- Gross, L., 1953b. A Filterable Agent, Recovered from Ak Leukemic Extracts, Causing Salivary Gland Carcinomas in C3H Mice. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)* 83, 414–421.
- Haun, G., Keppler, O.T., Bock, C.T., Herrmann, M., Zentgraf, H., Pawlita, M., 1993. The cell surface receptor is a major determinant restricting the host range of the B-lymphotropic papovavirus. *Journal of Virology* 67, 7482–7492.
- \*Hirsch, H.H., Steiger, J., 2003. Polyomavirus BK. *Lancet Infect Dis* 3, 611–623.
- Holsinger, L.J., Lamb, R.A., 1991. Influenza virus M2 integral membrane protein is a homotetramer stabilized by formation of disulfide bonds. *Virology* 183, 32–43.
- Horníková, Lenka. Hlavní strukturální protein myšičího polyomaviru: interakce s buněčnými strukturami. Praha, 2012. Dizertační práce. Vedoucí práce Jitka Forstová.
- Huang, Y.-L., Wang, M., Ou, W.-C., Fung, C.-Y., Chen, L.-S., Chang, D., 2003. Analysis of DNA-binding activity of the JC virus minor capsid protein VP2. *Journal of Neurovirology* 9 Suppl 1, 21–24.

- Huerfano, S., Zíla, V., Boura, E., Spanielová, H., Stokrová, J., Forstová, J., 2010. Minor capsid proteins of mouse polyomavirus are inducers of apoptosis when produced individually but are only moderate contributors to cell death during the late phase of viral infection. *FEBS Journal* 277, 1270–1283.
- Hurdiss, D.L., Morgan, E.L., Thompson, R.F., Prescott, E.L., Panou, M.M., Macdonald, A., Ranson, N.A., 2016. New Structural Insights into the Genome and Minor Capsid Proteins of BK Polyomavirus using Cryo-Electron Microscopy. *Structure* 24, 528–536.
- Jiang, M., Abend, J.R., Tsai, B., Imperiale, M.J., 2009. Early events during BK virus entry and disassembly. *Journal of Virology* 83, 1350–1358.
- Johannessen, M., Walquist, M., Gerits, N., Dragset, M., Spang, A., Moens, U., 2011. BKV agnoprotein interacts with  $\alpha$ -soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion attachment protein, and negatively influences transport of VSVG-EGFP. *Plos One* 6, e24489.
- Kawano, M., Inoue, T., Tsukamoto, H., Takaya, T., Enomoto, T., Takahashi, R., Yokoyama, N., Yamamoto, N., Nakanishi, A., Imai, T., Wada, T., Kataoka, K., Handa, H., 2006. The VP2/VP3 minor capsid protein of simian virus 40 promotes the *in vitro* assembly of the major capsid protein VP1 into particles. *Journal of Biological Chemistry* 281, 10164–10173.
- \*Kawano, M., Matsui, M., Handa, H., 2013. SV40 virus-like particles as an effective delivery system and its application to a vaccine carrier. *Expert Review of Vaccines* 12, 199–210.
- \*Keller, E.X., Delbue, S., Tognon, M., Provenzano, M., 2015. Polyomavirus BK and prostate cancer: a complex interaction of potential clinical relevance. *Reviews in Medical Virology* 25, 366–378.
- \*Kelly, T.J., 1988. SV40 DNA replication. *Journal of Biological Chemistry* 263, 17889–17892.
- \*Kenan, D.J., Mieczkowski, P.A., Burger-Calderon, R., Singh, H.K., Nিকেleit, V., 2015. The oncogenic potential of BK-polyomavirus is linked to viral integration into the human genome. *Journal of Pathology* 237, 379–389.
- Korup, S., Rietscher, J., Calvignac-Spencer, S., Trusch, F., Hofmann, J., Moens, U., Sauer, I., Voigt, S., Schmuck, R., Ehlers, B., 2013. Identification of a novel human polyomavirus in organs of the gastrointestinal tract. *Plos One* 8, e58021.
- Kovacs, F.A., Cross, T.A., 1997. Transmembrane four-helix bundle of influenza A M2 protein channel: structural implications from helix tilt and orientation. *Biophysical Journal* 73, 2511–2517.
- Kozmanová, Alexandra. Příprava monoklonální protilátky proti hlavnímu štruktúrnemu proteínu VP1 BK vírusu a konštrukcia plazmidov pre vyhládávanie proteínových interakcií metódou BiFC. Praha, 2011. Diplomová práce. Vedoucí práce Jitka Forstová.
- Krauzewicz, N., Streuli, C.H., Stuart-Smith, N., Jones, M.D., Wallace, S., Griffin, B.E., 1990. Myristylated polyomavirus VP2: role in the life cycle of the virus. *Journal of Virology* 64, 4414–4420.
- Kuksin, D., Norkin, L.C., 2012. Disassembly of simian virus 40 during passage through the endoplasmic reticulum and in the cytoplasm. *Journal of Virology* 86, 1555–1562.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Leuenberger, D., Andresen, P.A., Gosert, R., Binggeli, S., Ström, E.H., Bodaghi, S., Rinaldo, C.H., Hirsch, H.H., 2007. Human polyomavirus type 1 (BK virus) agnoprotein is abundantly expressed but immunologically ignored. *Clinical and Vaccine Immunology* 14, 959–968.
- Liebl, D., Difato, F., Horníková, L., Mannová, P., Štokrová, J., Forstová, J., 2006. Mouse Polyomavirus Enters Early Endosomes, Requires Their Acidic pH for Productive Infection, and Meets Transferrin Cargo in Rab11-Positive Endosomes. *Journal of Virology* 80, 4610–4622.
- Lilley, B.N., Gilbert, J.M., Ploegh, H.L., Benjamin, T.L., 2006. Murine Polyomavirus Requires the Endoplasmic Reticulum Protein Derlin-2 To Initiate Infection. *Journal of Virology* 80, 8739–8744.
- Lim, E.S., Reyes, A., Antonio, M., Saha, D., Ikumapayi, U.N., Adeyemi, M., Stine, O.C., Skelton, R., Brennan, D.C., Mkakosya, R.S., Manary, M.J., Gordon, J.I., Wang, D., 2013. Discovery of STL polyomavirus, a polyomavirus of ancestral recombinant origin that encodes a unique T antigen by alternative splicing. *Virology* 436, 295–303.
- Liu, H.S., Jan, M.S., Chou, C.K., Chen, P.H., Ke, N.J., 1999. Is green fluorescent protein toxic to the living cells? *Biochemical and Biophysical Research Communications* 260, 712–717.

- Low, J.A., Magnuson, B., Tsai, B., Imperiale, M.J., 2006. Identification of gangliosides GD1b and GT1b as receptors for BK virus. *Journal of Virology* 80, 1361–1366.
- Lyons, A.B., 2000. Analysing cell division *in vivo* and *in vitro* using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *Journal of Immunological Methods, Flow Cytometry* 243, 147–154.
- Lyons, A.B., Parish, C.R., 1994. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods* 171, 131–137.
- Magnuson, B., Rainey, E.K., Benjamin, T., Baryshev, M., Mkrtchian, S., Tsai, B., 2005. ERp29 triggers a conformational change in polyomavirus to stimulate membrane binding. *Molecular Cell* 20, 289–300.
- Mannová, P., Forstová, J., 2003. Mouse Polyomavirus Utilizes Recycling Endosomes for a Traffic Pathway Independent of COPI Vesicle Transport. *Journal of Virology* 77, 1672–1681.
- Mannová, P., Liebl, D., Krauzewicz, N., Fejtová, A., Štokrová, J., Palková, Z., Griffin, B.E., Forstová, J., 2002. Analysis of mouse polyomavirus mutants with lesions in the minor capsid proteins. *Journal of General Virology* 83, 2309–2319.
- Mäntyjärvi, R.A., Arstila, P.P., Meurman, O.H., 1972. Hemagglutination by BK virus, a tentative new member of the papovavirus group. *Infection and Immunity* 6, 824–828.
- \*Martinez-Gil, L., Mingarro, I., 2015. Viroporins, Examples of the Two-Stage Membrane Protein Folding Model. *Viruses* 7, 3462–3482.
- Mishra, N., Pereira, M., Rhodes, R.H., An, P., Pipas, J.M., Jain, K., Kapoor, A., Briese, T., Faust, P.L., Lipkin, W.I., 2014. Identification of a novel polyomavirus in a pancreatic transplant recipient with retinal blindness and vasculitic myopathy. *Journal of Infectious Diseases* 210, 1595–1599.
- Morávková, Alena. Příprava protilátek proti hlavnímu strukturnímu proteinu myšího polyomaviru. Praha, 2001. Diplomová práce. Vedoucí práce Jitka Forstová.
- Moreland, R.B., Garcea, R.L., 1991. Characterization of a nuclear localization sequence in the polyomavirus capsid protein VP1. *Virology* 185, 513–518.
- Moreland, R.B., Montross, L., Garcea, R.L., 1991. Characterization of the DNA-binding properties of the polyomavirus capsid protein VP1. *Journal of Virology* 65, 1168–1176.
- Moriyama, T., Sorokin, A., 2008. Intracellular trafficking pathway of BK Virus in human renal proximal tubular epithelial cells. *Virology* 371, 336–349.
- Myhre, M.R., Olsen, G.-H., Gosert, R., Hirsch, H.H., Rinaldo, C.H., 2010. Clinical polyomavirus BK variants with agnogene deletion are non-functional but rescued by trans-complementation. *Virology* 398, 12–20.
- Nakanishi, A., Itoh, N., Li, P.P., Handa, H., Liddington, R.C., Kasamatsu, H., 2007a. Minor capsid proteins of simian virus 40 are dispensable for nucleocapsid assembly and cell entry but are required for nuclear entry of the viral genome. *Journal of Virology* 81, 3778–3785.
- Nakanishi, A., Li, P.P., Qu, Q., Jafri, Q.H., Kasamatsu, H., 2007b. Molecular dissection of nuclear entry-competent SV40 during infection. *Virus Research* 124, 226–230.
- Nakanishi, A., Shum, D., Morioka, H., Otsuka, E., Kasamatsu, H., 2002. Interaction of the Vp3 Nuclear Localization Signal with the Importin  $\alpha$ 2/ $\beta$  Heterodimer Directs Nuclear Entry of Infecting Simian Virus 40. *Journal of Virology* 76, 9368–9377.
- Neu, U., Allen, S.A., Blaum, B.S., Liu, Y., Frank, M., Palma, A.S., Ströh, L.J., Feizi, T., Peters, T., Atwood, W.J., Stehle, T., 2013. A Structure-Guided Mutation in the Major Capsid Protein Retargets BK Polyomavirus. *Plos Pathogens* 9.
- \*Nieva, J.L., Carrasco, L., 2015. Viroporins: Structures and Functions beyond Cell Membrane Permeabilization. *Viruses* 7, 5169–5171.
- \*Odorizzi, G., Cowles, C.R., Emr, S.D., 1998. The AP-3 complex: a coat of many colours. *Trends in Cell Biology* 8, 282–288.
- Okada, Y., Endo, S., Takahashi, H., Sawa, H., Umemura, T., Nagashima, K., 2001. Distribution and function of JCV agnoprotein. *Journal of Neurovirology* 7, 302–306.
- Otlu, O., De Simone, F.I., Otalora, Y.-L., Khalili, K., Sariyer, I.K., 2014. The agnoprotein of polyomavirus JC is released by infected cells: evidence for its cellular uptake by uninfected neighboring cells. *Virology* 468–470, 88–95.
- Padgett, B.L., Walker, D.L., ZuRhein, G.M., Eckroade, R.J., Dessel, B.H., 1971. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *Lancet* 1, 1257–1260.



- \*Papadimitriou, J.C., Randhawa, P., Rinaldo, C.H., Drachenberg, C.B., Alexiev, B., Hirsch, H.H., 2016. BK Polyomavirus Infection and Renourinary Tumorigenesis. *American Journal of Transplantation* 16, 398–406.
- Pastrana, D.V., Ray, U., Magaldi, T.G., Schowalter, R.M., Çuburu, N., Buck, C.B., 2013. BK polyomavirus genotypes represent distinct serotypes with distinct entry tropism. *Journal of Virology* 87, 10105–10113.
- Pastrana, D.V., Tolstov, Y.L., Becker, J.C., Moore, P.S., Chang, Y., Buck, C.B., 2009. Quantitation of Human Seroresponsiveness to Merkel Cell Polyomavirus. *Plos Pathogenes* 5: e1000578.
- Podolská, Kateřina. Příprava monoklonálních protilátek a expresních plazmidů pro studium vlastností strukturních proteinů polyomaviru BK. Praha, 2008. Diplomová práce. Vedoucí práce Jitka Forstová.
- Possati, L., Rubini, C., Portolani, M., Gazzanelli, G., Piani, M., Borgatti, M., 1983. Receptors for the human papovavirus BK on human lymphocytes. *Archives of Virology* 75, 131–136.
- Prins, C., Frisque, R.J., 2001. JC virus T' proteins encoded by alternatively spliced early mRNAs enhance T antigen-mediated viral DNA replication in human cells. *Journal of Neurovirology* 7, 250–264.
- Qian, M., Cai, D., Verhey, K.J., Tsai, B., 2009. A lipid receptor sorts polyomavirus from the endolysosome to the endoplasmic reticulum to cause infection. *Plos Pathogenes* 5, e1000465.
- Raghava, S., Giorda, K.M., Romano, F.B., Heuck, A.P., Hebert, D.N., 2013. SV40 late protein VP4 forms toroidal pores to disrupt membranes for viral release. *Biochemistry* 52, 3939–3948.
- Raghava, S., Giorda, K.M., Romano, F.B., Heuck, A.P., Hebert, D.N., 2011. The SV40 late protein VP4 is a viroporin that forms pores to disrupt membranes for viral release. *Plos Pathogenes* 7, e1002116.
- Rainey-Barger, E.K., Magnuson, B., Tsai, B., 2007. A chaperone-activated nonenveloped virus perforates the physiologically relevant endoplasmic reticulum membrane. *Journal of Virology* 81, 12996–13004.
- \*Ramqvist, T., Dalianis, T., 2009. Murine polyomavirus tumour specific transplantation antigens and viral persistence in relation to the immune response, and tumour development. *Seminars in Cancer Biology* 19, 236–243.
- \*Rinaldo, C.H., Tylden, G.D., Sharma, B.N., 2013. The human polyomavirus BK (BKPyV): virological background and clinical implications. *APMIS* 121, 728–745.
- \*Royle, J., Dobson, S.J., Müller, M., Macdonald, A., 2015. Emerging Roles of Viroporins Encoded by DNA Viruses: Novel Targets for Antivirals? *Viruses* 7, 5375–5387.
- Safak, M., Barrucco, R., Darbinyan, A., Okada, Y., Nagashima, K., Khalili, K., 2001. Interaction of JC virus agno protein with T antigen modulates transcription and replication of the viral genome in glial cells. *Journal of Virology* 75, 1476–1486.
- Salunke, D.M., Caspar, D.L., Garcea, R.L., 1986. Self-assembly of purified polyomavirus capsid protein VP1. *Cell* 46, 895–904.
- Sanjuan, N., Porrás, A., Otero, J., 2003. Microtubule-dependent intracellular transport of murine polyomavirus. *Virology* 313, 105–116.
- Saribas, A.S., Abou-Gharbia, M., Childers, W., Sariyer, I.K., White, M.K., Safak, M., 2013. Essential roles of Leu/Ile/Phe-rich domain of JC virus agnoprotein in dimer/oligomer formation, protein stability and splicing of viral transcripts. *Virology* 443, 161–176.
- Saribas, A.S., Arachea, B.T., White, M.K., Viola, R.E., Safak, M., 2011. Human polyomavirus JC small regulatory agnoprotein forms highly stable dimers and oligomers: implications for their roles in agnoprotein function. *Virology* 420, 51–65.
- Saribas, A.S., Mun, S., Johnson, J., El-Hajmoussa, M., White, M.K., Safak, M., 2014. Human polyoma JC virus minor capsid proteins, VP2 and VP3, enhance large T antigen binding to the origin of viral DNA replication: evidence for their involvement in regulation of the viral DNA replication. *Virology* 449, 1–16.
- Saribas, A.S., White, M.K., Safak, M., 2012. JC virus agnoprotein enhances large T antigen binding to the origin of viral DNA replication: evidence for its involvement in viral DNA replication. *Virology* 433, 12–26.

- Sauerová, Pavla. Studium vlastností genových produktů Polyomaviru karcinomu Merkelových buněk: Příprava protilátek a konstrukce expresních vektorů. Praha, 2013. Diplomová práce. Vedoucí práce Jitka Forstová.
- Schelhaas, M., Malmström, J., Pelkmans, L., Haugstetter, J., Ellgaard, L., Grünewald, K., Helenius, A., 2007. Simian Virus 40 depends on ER protein folding and quality control factors for entry into host cells. *Cell* 131, 516–529.
- Schowalter, R.M., Pastrana, D.V., Buck, C.B., 2011. Glycosaminoglycans and sialylated glycans sequentially facilitate Merkel cell polyomavirus infectious entry. *Plos Pathogens* 7, e1002161.
- Schowalter, R.M., Pastrana, D.V., Pumphrey, K.A., Moyer, A.L., Buck, C.B., 2010. Merkel cell polyomavirus and two previously unknown polyomaviruses are chronically shed from human skin. *Cell Host & Microbe* 7, 509–515.
- Scuda, N., Hofmann, J., Calvignac-Spencer, S., Ruprecht, K., Liman, P., Kühn, J., Hengel, H., Ehlers, B., 2011. A novel human polyomavirus closely related to the african green monkey-derived lymphotropic polyomavirus. *Journal of Virology* 85, 4586–4590.
- Shishido-Hara, Y., Ichinose, S., Higuchi, K., Hara, Y., Yasui, K., 2004. Major and Minor Capsid Proteins of Human Polyomavirus JC Cooperatively Accumulate to Nuclear Domain 10 for Assembly into Virions. *Journal of Virology* 78, 9890–9903.
- Siebrasse, E.A., Reyes, A., Lim, E.S., Zhao, G., Mkakosya, R.S., Manary, M.J., Gordon, J.I., Wang, D., 2012. Identification of MW polyomavirus, a novel polyomavirus in human stool. *Journal of Virology* 86, 10321–10326.
- Silva, P.M., Gonçalves, S., Santos, N.C., 2014. Defensins: antifungal lessons from eukaryotes. *Frontiers in Microbiology* 5, 97.
- Sinibaldi, L., Goldoni, P., Pietropaolo, V., Longhi, C., Orsi, N., 1990. Involvement of gangliosides in the interaction between BK virus and Vero cells. *Archives of Virology* 113, 291–296.
- Šroller, V., Hamšíková, E., Ludvíková, V., Vochozková, P., Kojzarová, M., Fraiberk, M., Saláková, M., Morávková, A., Forstová, J., Němečková, S., 2014. Seroprevalence rates of BKV, JCV, and MCPyV polyomaviruses in the general Czech Republic population. *Journal of Medical Virology* 86, 1560–1568.
- Stehle, T., Harrison, S.C., 1997. High-resolution structure of a polyomavirus VP1-oligosaccharide complex: implications for assembly and receptor binding. *The EMBO Journal* 16, 5139–5148.
- Streuli, C.H., Griffin, B.E., 1987. Myristic acid is coupled to a structural protein of polyoma virus and SV40. *Nature* 326, 619–622.
- Suzuki, T., Orba, Y., Makino, Y., Okada, Y., Sunden, Y., Hasegawa, H., Hall, W.W., Sawa, H., 2013. Viroporin activity of the JC polyomavirus is regulated by interactions with the adaptor protein complex 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 18668–18673.
- Suzuki, T., Orba, Y., Okada, Y., Sunden, Y., Kimura, T., Tanaka, S., Nagashima, K., Hall, W.W., Sawa, H., 2010. The human polyoma JC virus agnoprotein acts as a viroporin. *Plos Pathogens* 6, e1000801.
- Sweet, B.H., Hilleman, M.R., 1960. The vacuolating virus, S.V. 40. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 105, 420–427.
- \*Tegerstedt, K., Franzén, A.V., Andreasson, K., Joneberg, J., Heidari, S., Ramqvist, T., Dalianis, T., 2005. Murine Polyomavirus Virus-like Particles (VLPs) as Vectors for Gene and Immune Therapy and Vaccines against Viral Infections and Cancer. *Anticancer Research* 25, 2601–2608.
- Temin, H.M., Mizutani, S., 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 226, 1211–1213.
- Tsai, B., Gilbert, J.M., Stehle, T., Lencer, W., Benjamin, T.L., Rapoport, T.A., 2003. Gangliosides are receptors for murine polyoma virus and SV40. *EMBO Journal* 22, 4346–4355.
- van der Meijden, E., Janssens, R.W.A., Lauber, C., Bouwes Bavinck, J.N., Gorbalenya, A.E., Feltkamp, M.C.W., 2010. Discovery of a new human polyomavirus associated with trichodysplasia spinulosa in an immunocompromized patient. *Plos Pathogens* 6, e1001024.
- Vochyánová, Klára. Preparation of Monoclonal Antibodies Against VP2 Protein of Human Polyomaviruses. Praha, 2013. Diplomová práce. Vedoucí práce Alena Morávková.

- Walczak, C.P., Tsai, B., 2011. A PDI family network acts distinctly and coordinately with ERp29 to facilitate polyomavirus infection. *Journal of Virology* 85, 2386–2396.
- You, J., O'Hara, S.D., Velupillai, P., Castle, S., Lavery, S., Garcea, R.L., Benjamin, T., 2015. Ganglioside and Non-ganglioside Mediated Host Responses to the Mouse Polyomavirus. *Plos Pathogens* 11, e1005175.
- Zhao, L., Marciano, A.T., Rivet, C.R., Imperiale, M.J., 2016. Caveolin- and clathrin-independent entry of BKPyV into primary human proximal tubule epithelial cells. *Virology* 492, 66–72.
- Žíla, V., Difato, F., Klimova, L., Huerfano, S., Forstova, J., 2014. Involvement of Microtubular Network and Its Motors in Productive Endocytic Trafficking of Mouse Polyomavirus. *Plos One* 9, e96922.
- Zurhein, G., Chou, S.M., 1965. Particles resembling Papova viruses in human cerebral demyelinating disease. *Science* 148, 1477–1479.

## 9. Přílohy

čas	vzorek	experimentální duplikát	bez tritonu	s tritonem	bez tritonu průměr	s tritonem průměr	mrtvé buňky průměr [%]	upraveno na účinnost transfekce [%]
7 h	BKV VP2	1	0,075	0,341	0,068	0,345	16,05	11,16
	BKV VP2		0,061	0,349				
	BKV VP2	2	0,148	0,820	0,151	0,815		
	BKV VP2		0,154	0,809				
	BKV VP3	1	0,237	1,702	0,233	1,657	13,26	3,95
	BKV VP3		0,228	1,611				
	BKV VP3	2	0,212	1,267	0,210	1,266		
	BKV VP3		0,207	1,264				
	MPyV VP2	1	0,208	0,899	0,204	0,865	17,42	16,25
	MPyV VP2		0,200	0,830				
	MPyV VP2	2	0,213	1,104	0,208	1,111		
	MPyV VP2		0,202	1,117				
	MPyV VP3	1	0,268	1,078	0,269	1,045	19,87	24,11
	MPyV VP3		0,269	1,011				
	MPyV VP3	2	0,251	1,053	0,255	1,068		
	MPyV VP3		0,259	1,082				
	GFP	1	0,198	1,344	0,195	1,295	14,27	5,82
	GFP		0,191	1,246				
	GFP	2	0,262	1,442	0,263	1,434		
	GFP		0,263	1,425				
Mock	1	0,113	1,290	0,113	1,275	11,81		
Mock		0,113	1,260					
Mock	2	0,229	1,271	0,232	1,264			
Mock		0,234	1,256					
12 h	BKV VP2	1	0,242	0,793	0,238	0,711	24,71	18,78
	BKV VP2		0,234	0,629				
	BKV VP2	2	0,400	1,232	0,396	1,231		
	BKV VP2		0,392	1,229				
	BKV VP3	1	0,354	1,396	0,348	1,309	21,50	10,76
	BKV VP3		0,342	1,222				
	BKV VP3	2	0,344	1,217	0,335	1,188		
	BKV VP3		0,326	1,158				
	MPyV VP2	1	0,346	0,959	0,353	0,887	28,58	31,89
	MPyV VP2		0,360	0,814				
	MPyV VP2	2	0,394	0,921	0,370	0,919		
	MPyV VP2		0,345	0,917				
	MPyV VP3	1	0,359	1,155	0,356	1,064	28,48	32,65
	MPyV VP3		0,352	0,973				
	MPyV VP3	2	0,431	0,898	0,413	0,881		
	MPyV VP3		0,395	0,864				
	GFP	1	0,410	1,314	0,403	1,238	24,51	16,43
	GFP		0,396	1,161				
	GFP	2	0,410	1,281	0,410	1,267		
	GFP		0,410	1,252				
Mock	1	0,183	1,275	0,206	1,229	17,58		
Mock		0,229	1,183					
Mock	2	0,304	1,188	0,306	1,164			
Mock		0,307	1,139					

čas	vzorek	experimentální duplikát	bez tritonu	s tritonem	bez tritonu průměr	s tritonem průměr	mrtvé buňky průměr [%]	upraveno na účinnost transfekce [%]
24 h	BKV VP2	1	0,310	0,638	0,312	0,654	31,09	31,22
	BKV VP2		0,313	0,670				
	BKV VP2	2	0,607	1,404	0,591	1,385		
	BKV VP2		0,575	1,365				
	BKV VP3	1	0,531	1,406	0,527	1,391	28,91	26,52
	BKV VP3		0,522	1,375				
	BKV VP3	2	0,545	1,257	0,531	1,218		
	BKV VP3		0,516	1,178				
	MPyV VP2	1	0,476	0,693	0,460	0,737	37,87	54,05
	MPyV VP2		0,444	0,781				
	MPyV VP2	2	0,473	0,800	0,472	0,792		
	MPyV VP2		0,470	0,784				
	MPyV VP3	1	0,511	0,947	0,486	0,957	37,56	54,90
	MPyV VP3		0,461	0,966				
	MPyV VP3	2	0,571	0,835	0,583	0,824		
	MPyV VP3		0,594	0,812				
	GFP	1	0,548	1,210	0,539	1,196	31,32	28,67
	GFP		0,530	1,182				
	GFP	2	0,548	1,214	0,558	1,209		
	GFP		0,568	1,204				
Mock	1	0,310	1,316	0,299	1,321	19,23		
Mock		0,288	1,326					
Mock	2	0,345	1,404	0,347	1,387			
Mock		0,348	1,369					

S1 A)

Vzorek	Účinnost transfekce [%]
BKV VP2	38
BKV VP3	36,5
MPyV VP2	34,5
MPyV VP3	33,4
GFP	42,2

S1 B)

čas	vzorek	experimentální duplikát	bez tritonu	s tritonem	bez tritonu průměr	s tritonem průměr	mrtvé buňky průměr [%]	upraveno na účinnost transfekce [%]
7 h	BKV VP2	1	0,203	0,749	0,209	0,772	22,13	6,10
	BKV VP2		0,214	0,794				
	BKV VP2	2	0,253	0,815	0,248	0,829		
	BKV VP2		0,242	0,843				
	BKV VP3	1	0,209	0,863	0,198	0,887	20,07	0,00
	BKV VP3		0,187	0,91				
	BKV VP3	2	0,283	0,996	0,284	1,012		
	BKV VP3		0,284	1,028				
	MPyV VP2	1	0,231	0,709	0,237	0,724	24,79	15,94
	MPyV VP2		0,242	0,738				
	MPyV VP2	2	0,258	0,765	0,256	0,771		
	MPyV VP2		0,254	0,776				
	MPyV VP3	1	0,257	0,808	0,262	0,834	24,94	12,59
	MPyV VP3		0,267	0,86				
	MPyV VP3	2	0,276	0,828	0,293	0,834		
	MPyV VP3		0,309	0,839				
	GFP	1	0,303	0,744	0,305	0,775	25,96	9,69
	GFP		0,306	0,805				
	GFP	2	0,26	0,815	0,261	0,840		
	GFP		0,262	0,865				
Mock	1	0,259	0,914	0,256	0,933	20,13		
Mock		0,252	0,951					
Mock	2	0,225	0,967	0,219	0,949			
Mock		0,213	0,93					
12 h	BKV VP2	1	0,572	0,623	0,537	0,617	46,37	47,65
	BKV VP2		0,502	0,611				
	BKV VP2	2	0,529	0,59	0,500	0,582		
	BKV VP2		0,471	0,574				
	BKV VP3	1	0,537	0,802	0,525	0,799	38,67	35,39
	BKV VP3		0,513	0,796				
	BKV VP3	2	0,519	0,869	0,521	0,862		
	BKV VP3		0,523	0,854				
	MPyV VP2	1	0,505	0,59	0,475	0,618	43,40	43,35
	MPyV VP2		0,444	0,646				
	MPyV VP2	2	0,473	0,622	0,468	0,611		
	MPyV VP2		0,462	0,599				
	MPyV VP3	1	0,566	0,567	0,560	0,572	50,54	51,83
	MPyV VP3		0,553	0,576				
	MPyV VP3	2	0,603	0,56	0,615	0,576		
	MPyV VP3		0,626	0,592				
	GFP	1	0,482	0,636	0,485	0,639	42,63	19,74
	GFP		0,488	0,642				
	GFP	2	0,452	0,615	0,452	0,622		
	GFP		0,452	0,628				
Mock	1	0,366	0,854	0,372	0,857	30,74		
Mock		0,377	0,859					
Mock	2	0,419	0,852	0,389	0,857			
Mock		0,359	0,861					

čas	vzorek	experimentální duplikát	bez tritonu	s tritonem	bez tritonu průměr	s tritonem průměr	mrtvé buňky průměr [%]	upraveno na účinnost transfekce [%]
24 h	BKV VP2	1	0,723	0,466	0,727	0,493	59,88	81,57
	BKV VP2		0,731	0,52				
	BKV VP2	2	0,639	0,42	0,626	0,414		
	BKV VP2		0,612	0,408				
	BKV VP3	1	0,678	0,706	0,669	0,722	47,96	214,10
	BKV VP3		0,659	0,737				
	BKV VP3	2	0,643	0,681	0,621	0,678		
	BKV VP3		0,599	0,674				
	MPyV VP2	1	0,62	0,479	0,612	0,479	57,25	82,62
	MPyV VP2		0,604	0,479				
	MPyV VP2	2	0,596	0,428	0,598	0,426		
	MPyV VP2		0,599	0,423				
	MPyV VP3	1	0,839	0,348	0,835	0,350	70,70	98,37
	MPyV VP3		0,831	0,352				
	MPyV VP3	2	0,769	0,312	0,807	0,331		
	MPyV VP3		0,845	0,349				
	GFP	1	0,614	0,494	0,621	0,496	55,69	37,47
	GFP		0,627	0,497				
	GFP	2	0,581	0,497	0,592	0,470		
	GFP		0,603	0,442				
Mock	1	0,444	0,803	0,419	0,824	33,13		
Mock		0,394	0,844					
Mock	2	0,383	0,779	0,379	0,785			
Mock		0,374	0,791					

S1 C)

Vzorek	Účinnost transfekce [%]
BKV VP2	32,8
BKV VP3	22,4
MPyV VP2	29,2
MPyV VP3	38,2
GFP	60,2

S1 D)

**S1: Tabulky výpočtů a výsledků porovnání míry cytotoxicity minoritních proteinů polyomavirů MPyV a BKV při jejich samostatné produkci v savčích buňkách.**

- A) Experiment 1 – výsledky a výpočty
- B) Experiment 1 – účinnost transfekce
- C) Experiment 2 – výsledky a výpočty
- D) Experiment 2 – účinnost transfekce