

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

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Zuzana Mariničová

**Vliv posttranslačních modifikací minoritních proteinů
a acetylace mikrotubulů na průběh infekce myším polyomavirem**

**The role of posttranslational modifications of minor proteins
and acetylation of microtubules in mouse polyomavirus infection**

Diplomová práce

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

Praha, 2017

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, 2.5.2017

Podpis

Na tomto místě bych chtěla ze srdce poděkovat své školitelce RNDr. Lence Horníkové, Ph.D. za cenné rady, bezmeznou trpělivost a ochotu při vedení této diplomové práce a po celou dobu mého působení v Laboratoři molekulární virologie. Dále děkuji vedoucí laboratoře Doc. RNDr. Jitce Forstové, CSc. a všem současným i bývalým členům za pomoc a rady a také za vytvoření příjemného pracovního prostředí. Mgr. Martinu Fraiberkovi děkuji za elektronmikroskopické snímky a psychickou podporu zejména při sepisování této práce. „Fantastické 4“ a dalším virologickým kolegům děkuji za psychickou podporu po celou dobu studia a společné rozjímání nad klíčovými okamžiky našich diplomových prací. Dále děkuji svojí rodině za materiální podporu a přátelům za rady, trpělivost a psychickou podporu během mého studia. Sestře Veronice vděčím za všechno.

Tato diplomová práce vznikla v roce 2015–2017 za podpory těchto projektů Grantové agentury České republiky:

- GAČR: P302/13-26115S "Doprava genomů polyomaviru do buněčného jádra a interakce strukturních proteinů v hostitelských buňkách"
- GAČR: 16-07977S "Polyomaviry: Buněčné odpovědi na složky virové částice"

Abstrakt

Virion myšího polyomaviru (MPyV) je složen z hlavního kapsidového proteinu VP1 a minoritních kapsidových proteinů VP2 a VP3. Minoritní proteiny nejsou nutné pro sestavení kapsidy, jsou ale klíčové pro infektivita virových částic. Tato práce se v první části zabývá modifikacemi VP2 a VP3, deamidací Asn na pozici 253 VP2 (137 VP3) a N-koncovou acetylací Ala VP3, které by mohly být důvodem dvojitých proužků VP2 a VP3 na SDS-PAGE. V minulosti byly připraveny mutantní genomy MPyV N253D (Asn nahrazen Asp) a N253E (Asn nahrazen Glu) simulující deamidaci a A117V (Ala nahrazen Val) se sníženou acetylací. Připravili jsme mutantní viry ve třech izolacích a potvrdili jsme, že deamidace je příčinou dvojitých proužků. Mutantní viry byly porovnány s divokým typem z hlediska efektivity infekce, vliv deamidace se ale nepodařilo prokázat. Virus s mutací A117V je neinfekční, důvodem může být snížení acetylace nebo aminokyselina na této pozici. Dále se tato práce zabývá vlivem acetylace α -tubulinu na průběh infekce MPyV. Acetylace α -tubulinu je studována z hlediska virové infekce z důvodu vývoje nových antivirových strategií. Po infekci MPyV se acetylace zvyšuje, není to ale důsledek změny exprese mRNA acetylačního (α TAT1) nebo deacetylačního enzymu tubulinu (HDAC6). Inhibice HDAC6 pomocí tubacinu, specifického inhibitoru tubulin deacetylační aktivity, vede ke zvýšení efektivity infekce jak v časně tak pozdní fázi infekce.

Klíčová slova: myší polyomavirus, minoritní proteiny, acetylace mikrotubulů, posttranslační modifikace, deamidace, acetylace, VP2, VP3, HDAC6

Abstract

Mouse polyomavirus (MPyV) capsid is composed of the main capsid protein VP1 and minor capsid proteins VP2 and VP3. Minor proteins are not essential for capsid assembly, but they are key for efficient viral infection. The first part of this thesis studies the modifications of VP2 and VP3, the deamidation of Asn at 253 of VP2 (137 of VP3) and N-terminal acetylation of Ala of VP3, which could be the cause of double bands for VP2 and VP3 on SDS-PAGE. Mutated genomes of MPyV N253D (Asn to Asp) and N253E (Asn to Glu) simulating deamidation and A117V (Ala to Val) with reduced acetylation were prepared previously. We prepared three isolations of the mutant viruses and we confirmed that the deamidation is the cause of the double bands. Mutant viruses were compared to the wild type in terms of efficiency of infection, but the role of deamidation could not be proven. Virus A117V is noninfectious either due to lowered acetylation or the substitution of amino acid at this position. This thesis also studies the role of α -tubulin acetylation in the infection of MPyV. The role of α -tubulin acetylation in viral infection is being investigated to find new antiviral strategies. Acetylation rises after MPyV infection, but this is not due to a change in mRNA expression of tubulin acetylating (α TAT1) or deacetylating enzyme (HDAC6). Inhibition of HDAC6 by tubacin, specific inhibitor of tubulin deacetylating activity, leads to higher efficiency of infection in early and late phase of MPyV infection.

Key words: mouse polyomavirus, minor proteins, microtubule acetylation, posttranslational modification, deamidation, acetylation, VP2, VP3, HDAC6

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Přehled literatury.....	2
2.1	Polyomaviry.....	2
2.2	Myší polyomavirus.....	3
2.2.1	Struktura virionu.....	3
2.2.2	Organizace genomu.....	4
2.2.3	Hlavní strukturní protein VP1.....	5
2.2.4	Minoritní strukturní proteiny VP2 a VP3.....	7
2.2.5	Životní cyklus.....	9
2.2.5.1	Vstup viru do buňky.....	9
2.2.5.2	Transport genomu do jádra.....	10
2.2.5.3	Exprese časných genů a replikace.....	12
2.2.5.4	Exprese pozdních genů a morfogeneze virionů.....	13
2.3	Acetylace mikrotubulů.....	14
2.3.1	Proteiny modifikující acetylaci mikrotubulů.....	15
3	Cíle práce.....	17
4	Materiál a metody.....	18
4.1	Bakteriální kmen.....	18
4.2	Virus.....	18
4.3	Buněčné linie.....	18
4.4	Plasmid.....	18
4.5	DNA primery.....	18
4.6	Markery molekulových hmotností.....	19
4.7	Protilátky.....	20
4.7.1	Primární protilátky.....	20

4.7.2	Sekundární protilátky	20
4.8	Kultivační média	20
4.8.1	Bakteriální médium	20
4.8.2	Média pro tkáňové kultury	21
4.9	Antibiotika.....	21
4.10	Enzymy a inhibitory	21
4.11	Nejčastěji používané roztoky	21
4.12	Sterilizace	22
4.13	Kultivace bakterií v suspenzi	22
4.14	Práce s nukleovými kyselinami.....	22
4.14.1	Izolace plasmidů.....	22
4.14.2	Agarózová DNA elektroforéza.....	22
4.14.3	Restrikční štěpení	23
4.14.4	Srážení DNA	23
4.14.5	Ligace (self-cirkularizace virového genomu)	23
4.14.6	Izolace RNA	23
4.14.7	Syntéza cDNA.....	24
4.14.8	Izolace DNA z virové suspenze	24
4.14.9	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR).....	24
4.14.10	Měření koncentrace nukleových kyselin.....	25
4.15	Práce s buněčnými kulturami	25
4.15.1	Pasážování savčích buněk 3T6 a NIH 3T3	25
4.15.2	Transfekce buněk elektroporací (nukleofekce)	26
4.15.3	Infekce buněk MPyV	26
4.15.4	Testování cytotoxicity inhibitoru tubacinu	27
4.15.5	Testování proliferace buněk 3T6.....	27

4.15.6	Příprava buněčných peletů pro následné analýzy	27
4.15.7	Fixace buněk a detekce proteinů metodou nepřímé imunofluorescence.....	27
4.16	Práce s virem	28
4.16.1	Izolace viru (upraveno podle Horníková et al., 2015)	28
4.16.2	Hemaglutinační test.....	29
4.16.3	Určení infekčního titru viru.....	30
4.17	Negativní barvení pro elektronovou mikroskopii	30
4.18	Práce s proteiny	30
4.18.1	Příprava buněčných lyzátů	30
4.18.2	Denaturační proteinová polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE)	30
4.18.3	Fixace a barvení polyakrylamidových gelů	31
4.18.4	Imobilizace proteinů na membráně	32
4.18.5	Imunodetekce proteinů na membráně	32
4.19	Práce se sekvencemi proteinů	33
4.20	Statistická analýza	33
5	Výsledky.....	34
5.1	Studium posttranslačních modifikací minoritních proteinů VP2 a VP3	34
5.1.1	Příprava virových genomů	34
5.1.2	Izolace viru	37
5.1.2.1	První izolace	37
5.1.2.2	Druhá izolace.....	42
5.1.2.3	Třetí izolace.....	45
5.1.3	Dvojité proužky na SDS-PAGE jsou důsledkem posttranslačně modifikovaných minoritních proteinů VP2 a VP3	50
5.1.4	Mutantní viry N253D, N253E a A117V se liší v efektivitě infekce	51
5.1.5	Porovnání mutovaných pozic s dalšími polyomaviry	53

5.2	Vliv acetylce mikrotubulů na průběh infekce MPyV	54
5.2.1	Infekce buněk 3T6 MPyV vede k nárůstu acetylce mikrotubulů	54
5.2.2	Expres mRNA HDAC6 a α TAT1 se nemění v průběhu infekce MPyV	56
5.2.3	Inhibice HDAC6 zvyšuje efektivitu infekce MPyV	58
6	Diskuze.....	63
6.1	Studium úlohy posttranslačních modifikací minoritních proteinů VP2 a VP3 v životním cyklu viru	63
6.2	Vliv acetylce mikrotubulů na průběh infekce MPyV.....	67
7	Souhrn	71
8	Seznam použité literatury	72

Seznam zkratek

α TAT1	α -tubulin acetyl transferáza 1
α TAT2	α -tubulin acetyl transferáza 2
ATP	adenosintrifosfát
APS	amonium persulfát
BKPyV	polyomavirus BK
BLAST	vyhledávací nástroj pro základní lokální srovnání
bp	páry nukleotidových bazí
BSA	bovinní sérový albumin
cDNA	komplementární DNA
COPI	plášťový proteinový komplex 1
ddH ₂ O	demineralizovaná destilovaná voda
DAPI	4',6-diamidino-2-fenylindol dihydrochlorid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTT	1,4-dithiotreitol
EDTA	kyselina ethylendiaminotetraoctová
ERAD	proteinová degradace asociovaná s endoplasmatickým retikulem
GAPDH	glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenáza
GCN5	histon acetyltransferáza
GD1a/b	disialotetrahexosylgangliosid 1 a/b
GT1a/b	trisialotetrahexosylgangliosid 1 a/b
HD	hydrofobní doména
HDAC5	histon deacetyláza 5
HDAC6	histon deacetyláza 6
HIV	virus lidské imunodeficience
hpi	hodiny po infekci
hpt	hodiny po transfekci
HRP	křenuv peroxidáza
Hsp70	protein teplotního šoku 70
Hsp90	protein teplotního šoku 90
JCPyV	polyomavirus JC

kDa	kilodalton
LB médium	Lurita-Bertani médium
LT	velký T antigen
M	marker molekulových hmotností
MOI	multiplicita infekce
MPyV	Myší polyomavirus
mRNA	messengerová ribonukleová kyselina
MT	střední T antigen
NK	negativní kontrola
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
PBS	fosfátový pufr
PCR H ₂ O	demineralizovaná destilovaná voda bez nukleáz
PDI	protein disulfid izomeráza
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RIPA	pufr na radioimunoprecipitační zkoušku
RNA	ribonukleová kyselina
rpm	otáčky za minutu
RPMI médium	Roswell Park Memorial Institute médium
SDS	dodecylsulfát sodný
siRNA	malá interferující ribonukleová kyselina
SIRT2	sirtuin typu 2
ST	malý T antigen
SV40	Simian virus 40
TAE	Tris-acetátový pufr
TBE	Tris-borátový pufr
TEMED	tetramethylethylenediamin
U	jednotka
VP1/2/3	virový kapsidový protein 1/2/3

1 Úvod

Polyomaviry jsou malé neobalené DNA viry, jejichž studium nám od jejich objevení přineslo řadu objevů na poli virologie i molekulární biologie. V minulosti napomohly například odhalit princip alternativního sestřihu, jaderného lokalizačního signálu, složení komplexů replikační buněčné mašinerie a přispěly také k našemu pochopení mechanismů nádorové transformace. Myší polyomavirus (MPyV) je společně s virem SV40 (Simian virus 40) nejprozkoumanějším zástupcem čeledi *Polyomaviridae* a dodnes je intenzivně studován jako modelový virus tumorogenních DNA virů.

I když probíhá infekce hostitelů těmito viry většinou asymptomaticky, u imunokompromitovaných jedinců mohou způsobovat závažná onemocnění. Polyomaviry se dnes dostávají do popředí zájmu díky nedávným objevům patogenních zástupců infikujících člověka. Je proto velmi důležité zjistit co nejvíce o tom, jak tyto viry vstupují do buněk, dopravují svůj genom do jádra, regulují expresi svých genů a jakým způsobem vzniká virové potomstvo a opouští buňku.

Jelikož mají polyomaviry velmi malý genom a kódují pouze malý počet proteinů, jsou jejich proteiny do velké míry multifunkční a během životního cyklu viru interagují s řadou buněčných komponent. Zkoumání těchto interakcí je klíčové pro pochopení kritických okamžiků v životních cyklech virů, na které je poté možné soustředit naše snahy o cílenou antivirovou terapii.

Poznatky získané studiem polyomavirů jsou využívány i v biomedicínském inženýrství. Hlavního kapsidový protein VP1 má schopnost samouspořádání do viru podobných částic, jejichž povrchové struktury lze modifikovat a měnit tak tkáňovou a buněčnou specifitu těchto struktur. I když se využití polyomavirových viru podobných částic neukázalo jako vhodné pro dopravu extrachromozomální DNA do jádra buněk, jejich potenciál pro specifické rozeznávání například rakovinných buněk a cílenou dopravu terapeutik do místa jejich využití je velký.

Z těchto a dalších důvodů je MPyV v naší laboratoři studován a zabývá se jím i tato diplomová práce. Klademe si za cíl přispět k objasnění dosud nepopsané role některých posttranslačních modifikací minoritních proteinů MPyV a také vliv acetylovaných mikrotubulů na průběh infekce MPyV a přispět tak k prohloubení poznání o tomto modelovém viru.

2 Přehled literatury

2.1 Polyomaviry

Viry z čeledi *Polyomaviridae* jsou malé (průměr kapsidy okolo 45 nm) neobalené viry a jejich genom je tvořen kruhovou dvouvláknovou DNA (cca 5 kbp). Již od objevu prvních polyomavirů, tedy MPyV v roce 1953 (Gross, 1953) a záhy na to viru SV40 v roce 1960 (Sweet a Hilleman, 1960) byly tyto viry intenzivně studovány, což vedlo k celé řadě nových poznatků nejen v oboru virologie. Ukázalo se, že tyto viry mohou vést k rapidní tvorbě mnohačetných nádorů ve studovaných zvířecích modelech, a proto byly studovány zejména z hlediska mechanismů karcinogeneze (shrnutí v Atkin et al., 2009). Díky jejich studiu byly ale také objeveny důležité buněčné mechanismy eukaryotických buněk. Byl díky nim například identifikován jeden z hlavních tumor supresorových genů p53 (Linzer a Levine, 1979) nebo fenomén fosforylace tyrosinu (Eckhart et al., 1979), ze kterého se později stal jeden z nejdůležitějších signalizačních regulačních mechanismů.

Velký zájem o studium polyomavirů vzbudilo zjištění, že vakcína proti obrně připravovaná na opičích ledvinných buňkách byla pravděpodobně kontaminována virem SV40. Dodnes není jasné, zda infekce lidských buněk virem SV40 může vést k tvorbě lidských malignit (shrnutí v Jasani a Butel, 2013; Poulin a DeCaprio, 2006).

Polyomaviry infikují zejména savce a ptáky, ale v posledních letech byla objeven celá řada nových polyomavirů zejména díky obrovským pokrokům v rychlosti a zpracování dat nových molekulárně biologických přístupů. Byly objeveny polyomaviry infikující také ryby (Peretti et al., 2015) a členovce (Buck et al., 2016) a neustále se objevují nové savčí (Dela Cruz Jr. et al., 2017) a lidské polyomaviry (Gheit et al., 2017). Je tedy známo již více než 70 polyomavirů a ty jsou řazeny podle International Committee on Taxonomy of Viruses do čtyř rodů (Alpha-, Beta-, Gamma- a Deltapolyomavirus) na základě podobnosti sekvence kódující jeden z polyomavirových časných proteinů, velký T antigen (LT) (Viruses et al., 2016).

Polyomaviry způsobují asymptomatickou infekci u řady různých hostitelů a také jejich prevalence v lidské populaci je poměrně vysoká (Šroller et al., 2014). Klinické onemocnění způsobují pouze v malém množství případů a to zejména pokud je virová nálož velmi vysoká, a nebo pokud je imunita hostitele kompromitována například imunosupresí (shrnutí v Gottlieb a Villarreal, 2001). Z tohoto důvodu jsou lidské polyomaviry zkoumány a je známa spojitost některých z nich s klinickým onemocněním. Virus BK (BKPyV) může například způsobovat nefropatii u pacientů po transplantaci ledvin a je v této souvislosti dlouhodobě studován

(Einollahi a Lotfian, 2016). Další klinicky významnou infekcí lidským polyomavirem je také prokázaná spojitost viru JC (JCPyV) a progresivní multifokální leukoencefalopatie (Takahashi et al., 2017). Virus karcinomu Merkelových buněk byl dokonce identifikován v buňkách tohoto onemocnění (Feng et al., 2008). Dnes se dále spekuluje i o dalších polyomavirech a jejich roli v patogenezi lidských onemocnění, jako například o roli virů WU a KI v onemocněních respiračního traktu (Rao et al., 2016).

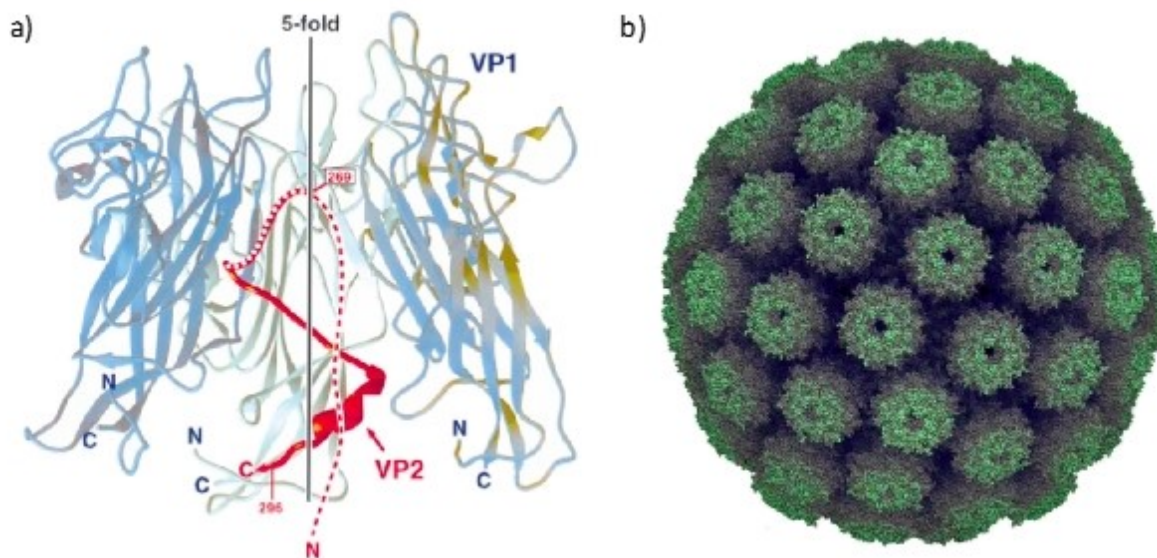
2.2 Myší polyomavirus

Tato práce se věnuje jednomu z nejprostudovanějších polyomavirů, myšimu polyomaviru (MPyV). Po svém objevu v 50. letech minulého století byl označován jako polyomavirus, poté jako myší polyomavirus (tak je také pro jednoduchost označován v této práci) a dnes se nazývá na základě nové klasifikace *Mus musculus* polyomavirus 1 (Viruses et al., 2016). Nejen v naší laboratoři je dnes studován zejména jako model malých DNA virů. Jeho zkoumání přináší poznatky o tom, jak se tyto viry dostávají do buněčného jádra (Zila et al., 2014) nebo jakým způsobem probíhá rozeznávání jejich infekce imunitním systémem (You et al., 2015). MPyV je také pečlivě zkoumán z hlediska použití viru podobných částic v biomedicínských vědách (Zackova Suchanova et al., 2017).

2.2.1 Struktura virionu

Virová částice MPyV je velká přibližně 45 nm s ikosahedrální symetrií a není obalená buněčnou membránou. Kapsida je tvořena hlavním kapsidovým proteinem VP1 a minoritními kapsidovými proteiny VP2 a VP3. Protein VP1 asociuje do pentamerů společně s jedním z proteinů VP2 nebo VP3. Ty jsou umístěny v centrální dutině pentameru, kde pomocí hydrofobních interakcí a vodíkových můstků asociují s proteinem VP1 (Chen et al., 1998) (Obrázek 1a). Celá kapsida je tedy tvořena 72 pentamery, to znamená, že virion obsahuje 360 kopií proteinu VP1 a 72 kopií minoritních kapsidových proteinů (Obrázek 1b), i když se objevují i důkazy, že by zastoupení minoritních proteinů v kapsidě mohlo být vyšší a v jednom pentameru by se tak mohly nacházet až dvě molekuly minoritních proteinů najednou (Schowalter a Buck, 2013). C-koncové části proteinu VP1 jednoho pentameru interagují se sousedícím pentamerem, což umožňuje vazbu pentamerů mezi sebou (Stehle a Harrison, 1997). Stabilita virionu je dále umocněna vápenatými ionty a disulfidickými vazbami (Brady et al., 1977; Stehle a Harrison, 1997). Uvnitř kapsidy se nachází virový minichromozom – virová DNA je asociována s buněčnými histony H2A, H2B, H3 a H4. N-koncová část proteinu VP1

interaguje s virovým genomem (Chang et al., 1993a) a minoritní proteiny VP2 a VP3 interagují s buněčnými histony (Cai et al., 1994).

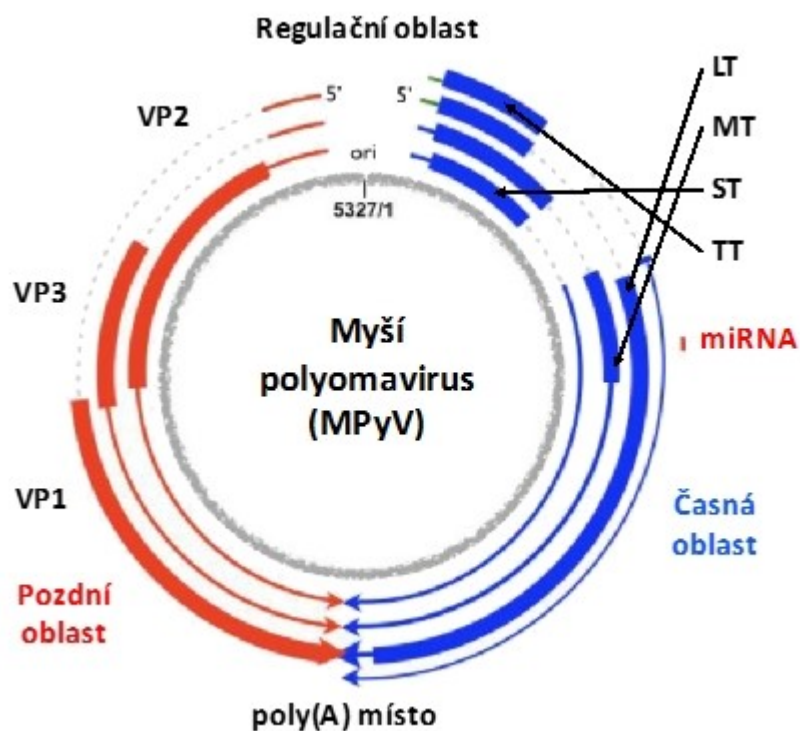


Obr. 1 – Struktura pentameru a virionu MPyV. (a) Model proteinu VP1 a minoritního proteinu tak, jak jsou spolu uspořádány v pentameru. Protein VP1 je modře, minoritní proteiny VP2 a VP3 jsou červeně, přerušovaná část ukazuje část unikátní pro protein VP2 (převzato z Chen et al., 1998). (b) Model virionu MPyV, kapsida se skládá z 72 pentamerů (převzato a upraveno z Stehle a Harrison, 1997).

2.2.2 Organizace genomu

Genom MPyV tvoří malé kruhová dvouvláknová DNA velká přibližně 5,3 kbp. Kóduje sedm proteinů, jejichž geny jsou zorganizovány v rámci genomu tak, že ho dělí na oblast časně a pozdní exprese a regulační oblast (Obrázek 2). Transkripce v časně a pozdní oblast probíhá z okolí regulační oblasti opačnými směry a všechny transkripty jsou ukončeny ve společném polyadenylačním místě. Primární pre-mRNA pro časnou a pozdní oblast podléhají alternativnímu sestřihu. Časná oblast genomu MPyV kóduje velký (LT – 88 kDa), střední (MT – 49 kDa) a malý T antigen (ST – 22 kDa) a také málo známý „tiny“ T antigen (TT – 10 kDa) tvořený N-terminální doménou všech T antigenů s připojenými šesti unikátními aminokyselinami, který je exprimován pouze ve velmi malé míře (Garren et al., 2015; Riley et al., 1997). Pozdní část genomu kóduje kapsidové proteiny MPyV, hlavní strukturní protein VP1 (45 kDa) a minoritní strukturní proteiny VP2 (35 kDa) a VP3 (23 kDa). Protein VP1 je translatován z jiného čtecího rámce než minoritní proteiny, a proto s nimi nesdílí shodnou aminokyselinovou sekvenci. Sekvence, která kóduje otevřený čtecí rámec pro protein VP1 přesahuje asi o 30 nukleotidů otevřený čtecí rámec pro minoritní proteiny. Proteiny VP2 a VP3 jsou translatovány ze stejného čtecího rámce a to tak, že protein VP3 tvoří C-koncovou část proteinu VP2. Konce časných a pozdních primárních transkriptů se překrývají, což je klíčové

pro regulaci exprese časných a pozdních mRNA a přechod do pozdní fáze infekce (Gu et al., 2009). LT váže genom MPyV v regulační oblasti (Dilworth et al., 1984), iniciuje replikaci genomu a podílí se na přepnutí transkripce z časných genů na pozdní (Liu a Carmichael, 1993). Ostatní časné geny nejsou potřebné pro lytickou infekci, ale podílejí se na tumorigenezi (Cheng et al., 2009). Protein LT dále interaguje s proteiny regulujícími buněčný cyklus a proteiny buněčné replikační mašinerie, což je nezbytné pro replikaci virového genomu.



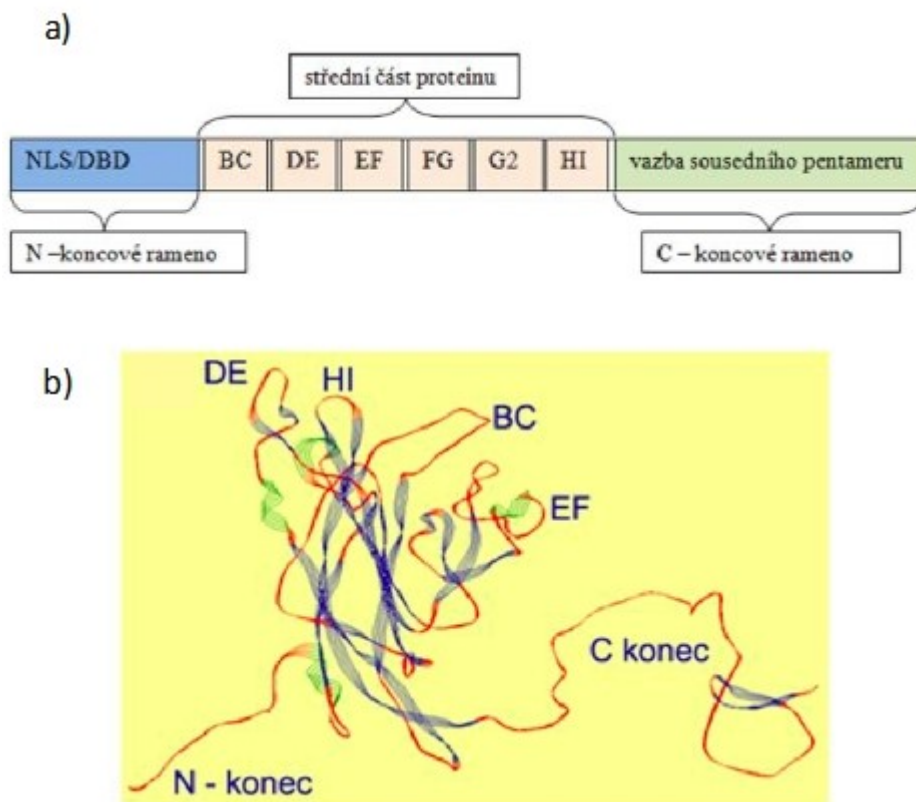
Obrázek 2 – Organizace genomu MPyV. Genom je rozdělen na časnou, pozdní a regulační oblast. V regulační oblasti se nachází replikační počátek, promotory a enhancerové sekvence pro časné a pozdní geny. Časné (modře) a pozdní geny (červeně) jsou přepisovány v jiné orientaci, všechny transkripty jsou zakončeny poly(A) sekvencí. V časně oblasti jsou také kódovány dvě miRNA. Plné linie představují transkripty, obdélníky jsou otevřené čtecí rámce, přerušovaná linie jsou introny. LT je velký, MT střední, ST malý a TT „tiny“ T antigen. Převzato a upraveno z přehledového článku Carmichael, 2016.

2.2.3 Hlavní strukturální protein VP1

Kapsidový protein VP1 je hlavní stavební komponentou virionu MPyV. Samovolně tvoří pentamery (kapsomery) spolu s jednou molekulou minoritního proteinu VP2 nebo VP3, základní jednotky, které dále asociují a vytváří virovou kapsidu. Protein VP1 je také schopen tvořit pentamery a kapsidy bez přítomnosti minoritních proteinů VP2 a VP3 (Montross et al., 1991) a toho je využíváno pro přípravu viru podobných částic pro různé účely (shrnutí v Tegerstedt et al., 2005).

Krystalografické studie ukázaly, že terciární struktura proteinu VP1 může být rozdělena na tři části – N-koncovou, střední a C-koncovou část (Liddington et al., 1991) (Obrázek 3a).

N-koncová část obsahuje DNA vazebnou doménu, která nespecificky interaguje s DNA uvnitř kapsidy (Chang et al., 1993a), a jaderný lokalizační signál (Chang et al., 1992). Střední část je tvořená převážně alfa helixy a beta listy a nestructurované oblasti mezi nimi vytváří šest smyček (BC, DE, EF, FG, G2, HI). Smyčky BC, DE a HI jsou umístěny na povrchu virionu a tvoří tak hlavní antigenní determinanty virové částice MPyV, smyčka EF se nachází po straně a je zodpovědná za vazbu vápenatého kationtu stabilizujícího kapsidu (Obrázek 3b). C-koncová část tvoří flexibilní raménko zodpovědné za interakci stabilizující asociaci pentamerů mezi sebou (Stehle a Harrison, 1997).



Obrázek 3 – Struktura hlavního strukturálního proteinu MPyV VP1. (a) Schéma primární struktury a uspořádání proteinu. (b) Terciární struktura proteinu. Převzato a upraveno z Liddington et al., 1991 podle Horníková, 2012.

Protein VP1 je hlavní strukturou interagujícím s buněčným povrchem a zprostředkovává vazbu virionu a receptoru. Tímto receptorem jsou gangliosidy GD1a, GT1b (Tsai et al., 2003) a GT1a (Buch et al., 2015) na povrchu buňky. Protein VP1 interaguje s kyselinou sialovou na jejich povrchu zejména díky BC a HI smyčkám (Stehle a Harrison, 1997), dále se účastní i vazby na ko-receptor $\alpha 4\beta 1$ integrin (Caruso et al., 2003).

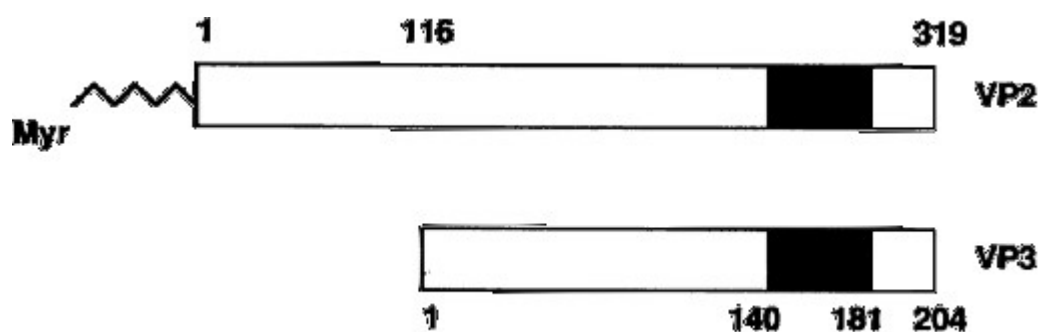
Protein VP1 je hojně posttranslačně modifikován. Popsány byly fosforylace, sulfonylace, acetylace, hydroxylace a methylace (Bolen et al., 1981). Fosforylace serinů a threoninů proteinu VP1 je pravděpodobně nejvýznamnější, jelikož hraje roli při morfogenezi virionů a ve vazbě

na receptor (Li a Garcea, 1994). Pro správnou fosforylaci je důležitá přítomnost minoritních proteinů (Forstová et al., 1993), ale samotné posttranslační modifikace proteinu VP1 nejsou nezbytné pro tvorbu viru podobných částic (Salunke et al., 1986).

Lze předpokládat, že protein VP1 interaguje s řadou buněčných proteinů. Byly popsány interakce s chaperonem Hsp70 (protein teplotního šoku 70) (Chromy et al., 2003), transkripčním faktorem YY1 (Palková et al., 2000), polymerázou poly(ADP) ribózy 1 (Carbone et al., 2006) a karyoferiny (Bird et al., 2008) účastníci se virové transkripce, replikace a morfogeneze virionů. Nedávno byla také popsána interakce proteinu VP1 s mikrotubuly a chaperonem Hsp90 (protein teplotního šoku 90) v pozdní fázi infekce MPyV, díky které dokáže virus zablokovat buněčný cyklus (Horníková et al., 2017).

2.2.4 Minoritní strukturní proteiny VP2 a VP3

Oba minoritní proteiny MPyV VP2 a VP3 jsou kódovány ve stejné části genomu a ve stejném čtecím rámci tak, že protein VP3 je N-terminálně zkrácenou variantou proteinu VP2 (Obrázek 4). Minoritní proteiny MPyV nejsou exponovány na povrchu kapsidy, ale nacházejí se uvnitř, v prohlubni pentameru, kde jsou ukotveny pomocí jejich C-koncového hydrofobního alfa helixu (Obrázek 1a) (Chen et al., 1998), přičemž posledních 12 aminokyselin C-terminální části minoritních proteinů není potřebných pro tuto asociaci (Cai et al., 1994). U zbylé části minoritních proteinů prozatím nebyly odhaleny žádné další sekundární struktury, lze tedy předpokládat, že jsou tyto proteiny pravděpodobně nestrukturované.



Obrázek 4 – Protein VP3 je N-terminálně zkrácenou variantou proteinu VP2. Čísla ukazují pozice počátečních a koncových aminokyselin, počátek proteinu VP3 v kontextu proteinu VP2 a začátek a konec C-terminální vazebné domény (černě), která protein ukotvuje v pentameru VP1 pomocí hydrofobních interakcí. Převzato a upraveno z Barouch a Harrison, 1994.

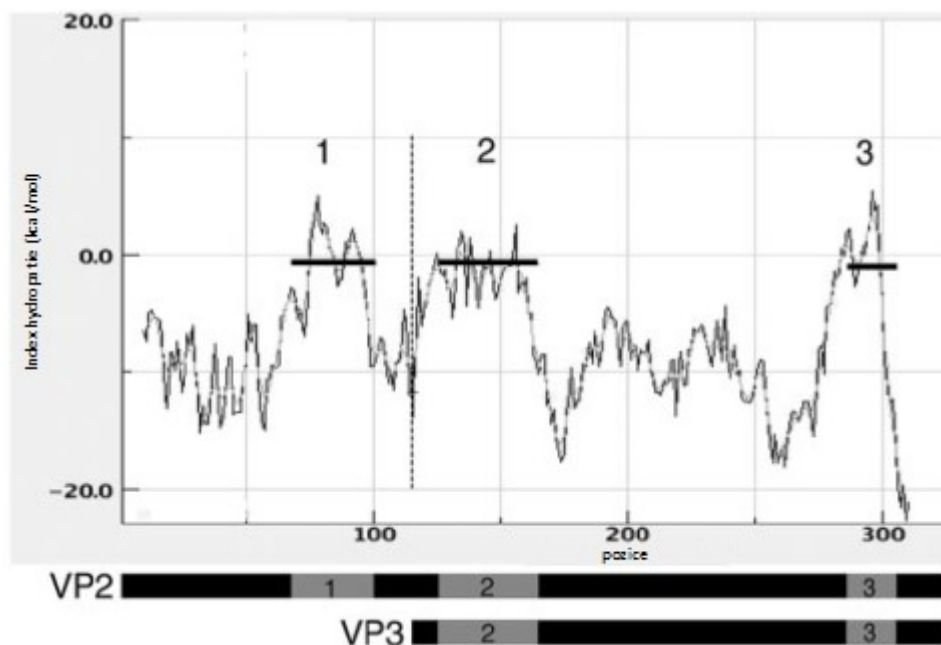
Oba minoritní proteiny mají na svém společném C-konci jaderný lokalizační signál (Chang et al., 1993b). Ten není dostatečný pro jadernou lokalizaci těchto proteinů, pokud jsou exprimovány samostatně v hmyzích buňkách (Forstová et al., 1993). Asociace s proteinem VP1

(i bez vlastního jaderného lokalizačního signálu) usnadňuje translokaci minoritních proteinů do jádra (Cai et al., 1994).

Z posttranslačních modifikací byla u minoritních proteinů MPyV popsána fosforylace (Ponder et al., 1977). Minoritní protein VP2 je na svém N-konci myristylován (Obrázek 4) (Streuli a Griffin, 1987) a ztráta této modifikace snižuje infektivitu zejména při reinfekci. I když je tato modifikace u polyomavirů velmi konzervovaná, není zcela objasněn její význam pro virovou infekci. Je pravděpodobně důležitá pro uvolňování virionů z buňky a při reinfekci (Mannová et al., 2002). Předpoklad, že myristylace by mohla proteinu VP2 umožňovat interakci s buněčnou membránou, nebyl nikdy potvrzen, myristylace by také mohla pomáhat při interakci s dalšími proteiny a ovlivňovat konformaci těchto komplexů. To potvrzuje i fakt, že mutantní viry s chybějící myristylací nejsou rozeznávány některými protilátkami proti povrchovým epitopům kapsidy. Je tedy možné že je ovlivněna morfogeneze nových virionů a ty následně nejsou schopny dopravit genom do jádra, což by vysvětlovalo sníženou efektivitu reinfekce. Virové mutanty bez myristylace jsou méně stabilní v kyselém pH (Krauzewicz et al., 1990), které je vyžadováno pro doručení virového genomu do jádra (viz níže). Dále byla popsána N-koncová acetylace alaninu proteinu VP3 (Vít, 2010) a analýza pomocí hmotnostní spektrometrie odhalila deamidaci argininu na pozici 253 proteinu VP2 (137 proteinu VP3) (Bílková, 2014). Význam těchto modifikací není doposud znám.

I když samotný protein VP1 dokáže tvořit virové kapsidy, minoritní proteiny jsou velmi důležité pro průběh životního cyklu MPyV. U virů exprimujících pouze jeden z minoritních proteinů byla pozorována snížená efektivita infekce zejména při reinfekci, tato efektivita infekce byla nižší než u mutantních virů bez chybějící myristylace (Mannová et al., 2002). Viriony bez obou minoritních proteinů nejsou infekční (Mannová et al., 2002). Bylo zjištěno, že minoritní proteiny váží membrány a při samostatné expresi v buňkách způsobují buněčnou smrt. Avšak v pozdní fázi infekce je tato jejich vlastnost postradatelná a přispívají k buněčné smrti pouze mírně (Huerfano et al., 2010). U minoritního proteinu VP2 byly predikovány tři (dvě pro protein VP3) hydrofobní domény (HD), které mohou asociovat s membránami – HD1 (pozice 60–101 proteinu VP2), HD2 (126–165) a HD3 (287–307) (Obrázek 5) (Huérfano et al., 2017; Rainey-Barger et al., 2007). Huérfano et al., 2017 ukázali, že HD2 společná pro oba minoritní proteiny je pravděpodobně zodpovědná za vazbu membrán minoritními proteiny a HD1, unikátní pro VP2, pravděpodobně stabilizuje tuto interakci a napomáhá úniku virionu z endoplasmatického retikula. HD3 je klíčová pro interakci minoritních proteinů s proteinem VP1 (Rainey-Barger et al., 2007).

Je zajímavé, že MPyV kóduje dva minoritní proteiny, z čehož jeden je pouze zkrácenou verzí druhého. Existuje domněnka, že by tomu tak mohlo být kvůli prostorovým restrikcím uvnitř kapsidy a že by tak nebylo potřeba, aby virová kapsida obsahovala velký počet „plně funkčních“ minoritních proteinů (Barouch a Harrison, 1994).



Obrázek 5 – Predikované hydrofobní domény minoritních proteinů VP2 a VP3. Převzato a upraveno z (Rainey-Barger et al., 2007).

2.2.5 Životní cyklus

Vzhledem k tomu, že je MPyV malý DNA virus a kóduje pouze sedm proteinů, musí tyto proteiny být multifunkční a interagovat s celou řadou buněčných proteinů, které virus využívá ve svém životním cyklu. Zejména interakce s proteiny buněčné replikační mašinerie jsou pro jeho replikaci a tvorbu nových virových částic klíčové. Z toho plyne i fakt, že byla ke dnešnímu dni popsána celá řada interakcí viru s buněčnými komponentami a není příliš snadné odhalit, které interakce jsou pro životní cyklus klíčové a jaká je jejich souslednost. Stále tak zůstává řada nezodpovězených otázek ohledně životního cyklu MPyV, následující odstavce shrnují nejdůležitější dosavadní poznatky.

2.2.5.1 Vstup viru do buňky

Replikační cyklus MPyV začíná vazbou na buněčný povrch a následným vstupem do buňky díky receptorem zprostředkované endocytóze. K navázání MPyV na buňku dochází pomocí interakce hlavního kapsidového proteinu VP1 s receptory na buněčném povrchu. Specifické receptory, na které se váže protein VP1 MPyV jsou gangliosidy GD1a, GT1b (Tsai et al., 2003)

a GT1a (Buch et al., 2015), jako ko-receptor slouží $\alpha 4\beta 1$ integrin (Caruso et al., 2003). Virus je ale také schopen vázat se na celou řadu dalších molekul na buněčném povrchu (Bauer et al., 1999). MPyV je schopen vstupovat do velké škály savčích buněk, k produktivní expresi ale dochází jen v buňkách jeho přirozeného hostitele, ve kterých je velký T antigen schopen vázat buněčné proteiny účastnící se replikace. I v buňkách, ve kterých dochází k abortivní infekci můžeme detekovat expresi časných virových antigenů.

Po vazbě virionu na buněčný receptor dochází pravděpodobně ke změně konformace, jelikož bylo prokázáno *in vitro*, že vazba virionu s fragmenty receptorů zvyšuje odolnost kapsidových proteinů vůči proteázám (Cavaldesi et al., 2004). Změna konformace proteinu VP1 by také mohla vést ke změně konformace minoritních proteinů. Existuje hypotéza, že konformační změna by také mohla vést ke zvětšení póru ve vrcholu pentameru (Obrázek 1a) a to by mohlo vést k interakci minoritního proteinu s buněčným povrchem (Chen et al., 1998). Složení kapsidy z hlediska obsahu minoritních proteinů také hraje roli v dostupnosti epitopů VP1 na povrchu kapsidy pro protilátky (Delos et al., 1995).

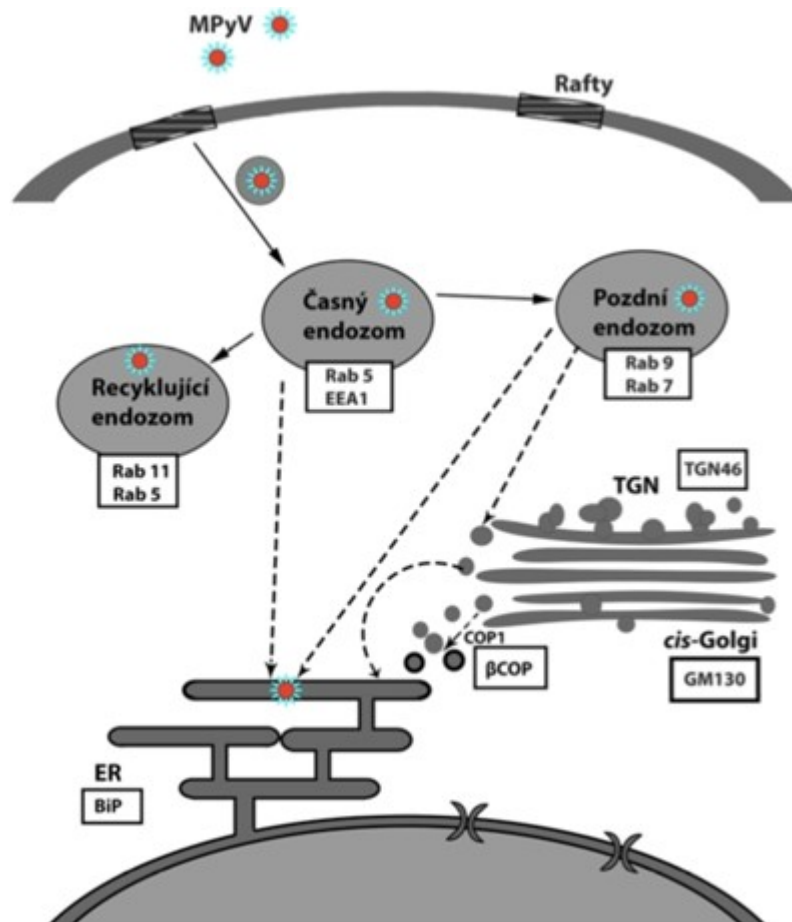
MPyV vstupuje do buňky pomocí monopinocytických váčků, asociuje při vstupu s membránovými rafty a byla také popsána jeho kolokalizace s kaveolinem (Richterová et al., 2001), ale nepřítomnost kaveolinu nebo klatrinových váčků nehraje roli v infekci MPyV (Liebl et al., 2006). Adsorpce a vstup viru probíhá poměrně rychle, již po 30 minutách po infekci je internalizována většina virových částic (Richterová et al., 2001). Krátce po vstupu je pro virus důležitá destabilizace aktinové sítě, naopak destabilizace mikrotubulů nevede k produktivní infekci (Gilbert et al., 2003; Zila et al., 2014).

2.2.5.2 Transport genomu do jádra

Po internalizaci v monopinocytických váčcích je virus pravděpodobně díky asociaci se specifickým receptorem, transportován do časného endozomu, který následně maturuje, což potvrzuje kolokalizace s markery těchto buněčných kompartmentů Rab5 a Rab 7 (Obrázek 6) (Liebl et al., 2006; Qian et al., 2009). Postupná acidifikace těchto kompartmentů je klíčová pro dopravení genomu do jádra a produktivní infekci (Liebl et al., 2006) a pravděpodobně indukuje počátek konformační změny kapsidy, která je poté umocněna v endoplasmatickém retikulu.

Následně byla pozorována i kolokalizace virionů s recyklujícím endozomem (marker Rab 11) (Liebl et al., 2006), inhibice této dráhy ale nevedla ke snížení efektivity, takže lze předpokládat, že jde o neproduktivní větev (Zila et al., 2014). Vazba na specifický receptor GD1a pravděpodobně cílí virovou částici do endoplasmatického retikula, což je předpokladem pro

produktivní infekci a tento přesun je závislý na molekulárním motoru dyneinu (Qian et al., 2009; Zila et al., 2014). Role retrográdního transportu nebyla plně objasněna. Zatímco jednou skupinou bylo pozorováno, že inhibice dráhy COP I váček infektivitu výrazně nesnižuje (Mannová a Forstová, 2003), jiná studie ukázala, že inhibice této dráhy infekci inhibuje (Gilbert a Benjamin, 2004). Nebyla pozorována kolokalizace MPyV s Golgiho aparátem, ale existují náznaky o jeho možné asociaci s COP I váčky a *trans*-Golgi sítovinou (Štach, 2016).



Obrázek 6 – Schéma transportu virionu MPyV do endoplasmatického retikula. Virus vstupuje receptorem zprostředkovanou endocytózou v monopinocytických váčkách do buňky, poté kolokalizuje s časným endozomem, následně s pozdním endozomem až se dostává do endoplasmatického retikula. Přerušovanými liniemi jsou naznačeny možné cesty. Převzato z Štach, 2016.

Poté, co se virus dostane do endoplasmatického retikula již okolo 3 hodin po infekci (Mannová a Forstová, 2003), je dalším klíčovým krokem v jeho životním cyklu transport genomu do cytoplasmy. V endoplasmatickém retikulu dochází pomocí enzymů z rodiny PDI k rozvolnění kapsidy díky rozrušení stabilizujících disulfidických vazeb (Walczak a Tsai, 2011). To je klíčový krok, bez kterého virus není schopen opustit endoplasmatické retikulum (Gilbert et al., 2006). Rozvolnění kapsidy a s tím asociovaná vyšší hydrofobicita virové částice pravděpodobně umožňuje minoritním proteinům uplatnit svou afinitu k buněčné membráně,

destabilizovat ji a uvolnit tak virion do cytoplasmy (Magnuson et al., 2005). Byla popsána interakce kapsidy s Derlinem-2, faktorem ERAD (proteinová degradace asociovaná s endoplasmatickým retikulem) dráhy, který je klíčový pro infekci (Lilley et al., 2006). Je tedy možné, že rozvolněná kapsida je rozpoznána těmito faktory a je jako nesprávně složený protein transportována z endoplasmatického retikula do cytosolu (Liebl et al., 2006).

Jakmile se virus dostane do cytoplasmy, dochází pravděpodobně k dalšímu rozvolnění díky interakci se chaperonem Hsp70 (Chromy et al., 2006). Virus se následně musí dostat do jádra, což se podaří jen malé části virionů (Mannová a Forstová, 2003). Ke kontaktu jádra s okolní cytoplasmou dochází pomocí komplexu jaderného póru, nicméně odhaduje se, že limitní rozměr pro přechod jaderným pórem je 39 nm, který samozřejmě intaktní kapsida MPyV přesahuje. Předpokládá se, že ale po rozvolnění kapsidy by mohl virový genom vstupovat do jádra asociovaný s minoritními proteiny a proteinem VP1. Další možností je, že je virový genom dopraven do jádra díky kontinuitě jaderného obalu s membránami endoplasmatického retikula. Virus by se tedy nemusel být translokován z endoplasmatického retikula do cytosolu, putoval by až do perinukleárního prostoru, kde by překonal membránu a dostal se přímo do jádra (Mackay a Consigli, 1976).

2.2.5.3 *Expresí časných genů a replikace*

Po vstupu do jádra je pro virus klíčová aktivita enzymu polymerázy poly(ADP) ribózy 1, která interaguje s proteinem VP1 v místě jeho DNA vazebné domény a vyvazuje ho tak z komplexu rozvolněného virionu (Carbone et al., 2006). Následně může dojít k transkripci v oblasti časných genů, ke které dochází pomocí buněčné RNA polymerázy II a alternativního sestřihu k expresi virových T antigenů. Poté jsou produkovány proteiny, antigen LT je detekovatelný už 8 hodin po infekci, další časné geny až později (Chen a Fluck, 2001).

LT antigen je díky své schopnosti vázat DNA nepostradatelný v replikaci virového genomu. LT váže sekvenci GA(G)GGC v regulační oblasti virového genomu, vytváří dva homoexamery a za spotřeby ATP funguje jako helikáza. Dále interaguje s proteiny buněčné replikační mašinerie, zejména s α -primázou a replikačním proteinem A a tato interakce určuje, zda dojde k produktivní infekci. Je tedy nezbytné, aby tyto proteiny byly v buňce dostupné, k čemuž dochází zhruba 18 hodin po infekci synchronizovaných buněk během S-fáze buněčného cyklu, kterou virus pro svou replikaci vyžaduje (Chen a Fluck, 2001). Následně probíhá replikace genomu v obou směrech od místa počátku replikace (ori) stejným mechanismem jako při replikaci buněčné DNA. K replikaci dochází zejména v místech

„virových replikačních továren“ (Erickson et al., 2012). Virové antigeny MT a ST se podílejí na deregulaci buněčného cyklu a mitogenních signálních drah, čímž mohou buňku transformovat (Courtneidge a Smith, 1983; Pallas et al., 1990).

2.2.5.4 *Exprese pozdních genů a morfogeneze virionů*

Po začátku replikace virové DNA dochází ke snížení efektivity čtení polyadenylačního signálu a vznikají dlouhé molekuly mRNA obsahující několik kopií virového genomu za sebou, které umožňují umocnit syntézu pozdních genů v pozdější fázi infekce (Acheson, 1978). Alternativním sestřihem jsou primární transkripty opět upravovány tak, že vznikají všechny tři strukturní proteiny, z nichž protein VP1 tvoří asi 80% (Kamen a Shure, 1976).

K předčasnému složení virové kapsidy v cytoplasmě možná brání interakce jaderných importinů s proteinem VP1 (Bird et al., 2008). Po translaci minoritní proteiny pravděpodobně asociují s proteinem VP1 v cytoplasmě a jsou společně transportovány do jádra, kde dochází k morfogenezi nových virových částic (Barouch a Harrison, 1994), které se účastní buněčné chaperony a virový LT antigen (Chromy et al., 2003). Funkce minoritních proteinů při morfogenezi virionů není jasná, i v jejich nepřítomnosti dochází k zabalení DNA (Mannová et al., 2002).

Nedávno byl navržen nový model ohledně jaderné lokalizace procesu morfogeneze nových virionů (Erickson et al., 2012). Byly pozorovány tubulární útvary tvořené pravděpodobně pentamery proteinu VP1 koncentrované v místech „virových replikačních továren“, okolo kterých se nacházely klastry nových virionů, které se odpojují z konců těchto tubulárních útvarů. Nutnost takového procesu by podporoval i fakt, že DNA je do virových částic balena nespecificky, neboť nebyla nalezena sekvence, která by sloužila jako enkapsidační signál, a zdá se, že koncentrace DNA je jediným klíčovým faktorem (Španielová et al., 2014). Protein VP1 vyvazuje z virového genomu histon H1 a váže tak genom v regulační oblasti (Carbone et al., 2004).

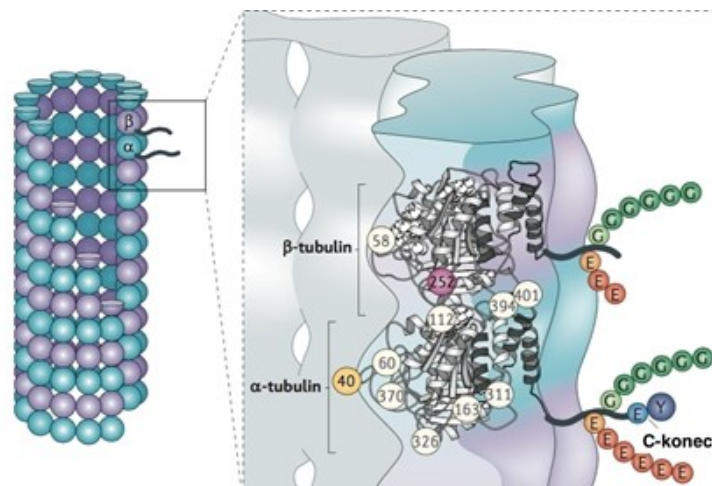
Studie virových proteinových komplexů v pozdních fázích infekce ukázaly, že při morfogenezi virionu pravděpodobně dochází ke konformační změně, která mění sedimentační koeficient virové částice (Yuen a Consigli, 1985). Množství minoritních proteinů bylo stejné ve všech komplexech, ale bylo pozorováno, že nezralé viriony obsahovaly více proteinu VP1 než viriony zralé.

MPyV je neobalený virus a aby se nově vzniklé částice dostaly z infikované buňky ven, je potřeba narušit buněčnou membránu. Při infekci buněčné kultury MPyV je pozorován

cytopatický efekt zhruba 48 hodin po infekci v důsledku masivní exprese strukturních proteinů. V malé míře dochází k apoptóze buněk, ale pozorovat můžeme převážně nekrózu (An et al., 2000), při které dochází ke ztrátě intaktnosti buněčných membrán, což umožňuje virovým částicím dostat se ven z buňky. K buněčné smrti nedochází při produkci viru podobných částic složených pouze z proteinu VP1, což naznačuje roli minoritních proteinů v uvolňování virových částic z buněk. Pokud jsou minoritní proteiny exprimovány samostatně, míra jejich afinity k membránám definuje jejich cytotoxické vlastnosti. Při infekci buněk MPyV se však příliš na buněčné smrti nepodílejí pravděpodobně proto, že jsou z velké části vyvazovány proteinem VP1, který jim brání v zabudování do membrán (Huerfano et al., 2010). Bylo také pozorováno, že pro úspěšnou pozdní fázi infekce je potřeba intaktní mikrotubulární síť a viriony tak možná putují po mikrotubulech od jádra směrem k buněčnému povrchu (Sanjuan et al., 2003).

2.3 Acetylace mikrotubulů

Mikrotubuly podléhají řadě posttranslačních modifikací, které jim dodávají možnost vytvářet strukturně a funkčně rozrůzněné podmnožiny. K nejčastějším posttranslačním modifikacím mikrotubulů patří detyrozinace, odštěpení glutamátu, polyglutamylace a polyglycylace, ke kterým dochází na volných C-koncích α - i β -tubulinu, a také acetylace lysinu na pozici 40 α -tubulinu, který se nachází v lumen polymerovaného vlákna (Obrázek 7).



Obrázek 7 – Schématické znázornění posttranslačních modifikací mikrotubulů v kontextu tubulinového dimeru. Volné C-konce α - a β -tubulinu jsou modifikovány odštěpením koncového tyrozinu, případně i glutamátu, polyglycylací a polyglutamylací, lysin 40 α -tubulinu nacházející se v lumen polymerovaného vlákna je acetylován. Převzato a upraveno z přehledového článku Janke a Bulinski, 2011.

Již od objevení acetylovaných mikrotubulů v 80. letech (LeDizet a Piperno, 1987) se o nich uvažovalo jako o funkčně odlišeně podmnožině stabilnějších mikrotubulů (Black a Keyser, 1987). Dlouhou dobu nicméně nebylo jasné, zda jsou tyto mikrotubuly stabilní díky acetylaci

nebo zda je stabilní podmnožina mikrotubulů preferenčně acetylována (Gaertig a Wloga, 2012; Webster a Borisy, 1989). Pozice acetylačního místa uvnitř mikrotubulárního vlákna a fakt, že k acetylaci dochází až na polymerovaných vláknech (Maruta et al., 1986) také vzbuzoval řadu otázek zejména o tom, jak se modifikační enzymy dostávají k acetylačnímu místu (Howes et al., 2014; Soppina et al., 2012). Také nebylo donedávna vyřešeno, jak přesně je stability této podmnožiny mikrotubulů strukturně dosaženo (Howes et al., 2014).

Na všechny tyto otázky byla schopná odpovědět recentní studie, kde autoři ukázali za pomoci pokročilých biofyzikálních a zobrazovacích metod, že acetylace mikrotubulů je skutečně stabilizačním faktorem a tato podmnožina je tak stabilnější v důsledku acetylace (Portran et al., 2017). Dále také vysvětlují, že acetylace vede k oslabení vazeb mezi sousedními protofilamenty v mikrotubulárním vlákne, a to vede k větší flexibilitě a následné odolnosti mikrotubulárního vlákna proti mechanickému stresu. Toto pozorování také osvětluje, jak se modifikační enzymy dostávají do lumen mikrotubulu.

Role acetylovaných mikrotubulů byla identifikována v buněčné adhezi, migraci, transportu váčků pomocí molekulárních motorů a mechanoreceptci. Z tohoto důvodu je intenzivně studována zejména z hlediska patogeneze a potenciální terapie neurodegenerativních onemocnění, rakoviny a také imunitní odpovědi a infekce buněk patogeny (Li a Yang, 2015).

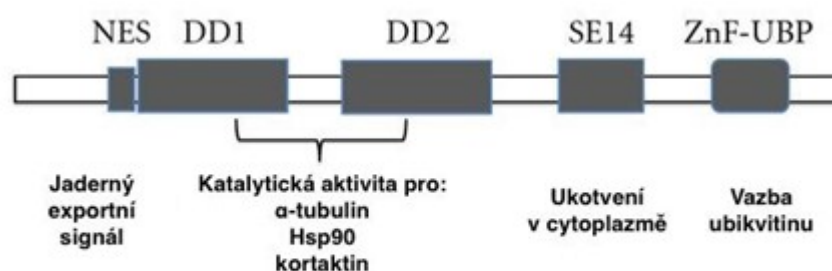
2.3.1 Proteiny modifikující acetylaci mikrotubulů

Navzdory letitému zkoumání acetylovaných mikrotubulů byly konkrétní enzymy zodpovědné za acetylaci a deacetylaci objeveny teprve nedávno. Objevení acetylačního enzymu předcházelo nalezení několika nesespecifických enzymů s tubulin acetyltransferázovou aktivitou, které jsou buď tkáňově specifické, nebo se podílejí na acetylaci mikrotubulů pouze nepřímo (Conacci-Sorrell et al., 2010; Ohkawa et al., 2008; Shen et al., 2009).

Později byla současně dvěma skupinami objevena α -tubulin acetyltransferáza 1 (α TAT1) a její paralog α TAT2 příbuzné histon acetyltransferáze GCN5 (Akella et al., 2010; Shida et al., 2010). Bylo prokázáno, že α TAT1 je hlavním a jediným acetylačním enzymem mikrotubulů u savců a vypnutí jeho exprese má stejný fenotyp jako tubulin, který není možné acetylovat. Enzym α TAT1 je také schopen acetylovat sám sebe a je schopen destabilizovat mikrotubuly nezávisle na své acetyltransferázové aktivitě, což naznačuje, že v buňce zastává i jiné funkce (Kalebic et al., 2013).

O něco dříve byla nalezena tubulin deacetylační aktivita u histon deacetylázy 6 (HDAC6), proteinu z rodiny histon deacetyláz třídy II (Hubbert et al., 2002), a bylo potvrzeno, že změny

exprese tohoto enzymu se projevují v hladině acetylace mikrotubulů *in vivo* (Zhang et al., 2003). Na rozdíl od histon deacetyláz se nachází výhradně v cytoplasmě (Obrázek 8) (Verdel et al., 2000), kde se účastní celé řady buněčných funkcí jako regulace ubikvitinace, formace agregátu, autofágie a regulace odpovědi na patologickou agregaci proteinů (shrnutí v Aldana-Masangkay a Sakamoto, 2011). Dalšími cíli deacetylační aktivity enzymu HDAC6 jsou kortaktin (Zhang et al., 2007) a také chaperon Hsp90 (Bali et al., 2005), který kolokalizuje s acetylovanými mikrotubuly (Giustiniani et al., 2009).



Obrázek 8 – Schématické znázornění domén enzymu HDAC6 a jejich funkcí. Převzato a upraveno z přehledového článku Aldana-Masangkay a Sakamoto, 2011.

Enzym HDAC6 má dvě katalytické domény (Obrázek 8), z nichž obě nebo pouze druhá jsou potřebné pro deacetylaci tubulinu (Miyake et al., 2016; Zhang et al., 2006; Zou et al., 2006). Tubulin deacetylační aktivita enzymu je specificky inhibována inhibitorem tubacinem, zatímco na jiné biologické aktivity nemá tento inhibitor vliv (Haggarty et al., 2003).

Byly identifikovány i další enzymy deacetylující mikrotubuly. Jedním je lidský sirtuin typu 2 (SIRT2), enzym z rodiny histon deacetyláz třídy III, který je ale schopen deacetylovat mikrotubuly pouze v komplexu s enzymem HDAC6 a inhibice exprese jednoho z nich pomocí siRNA stačí k pozorování hyperacetylace mikrotubulů (North et al., 2003). Dále byla identifikována deacetyláza HDAC5 z rodiny histon deacetyláz třídy II, která je specifická pro periferní neurony (Cho a Cavalli, 2012).

3 Cíle práce

Při separaci virových proteinů MPyV na SDS-PAGE byly za určitých podmínek v naší laboratoři pozorovány dvojité proužky ve velikosti odpovídající minoritním proteinům VP2 i VP3 a bylo zjištěno, že se jedná o dvě izoformy minoritních proteinů. Dříve bylo zjištěno, že se tyto izoformy neliší délkou polypeptidového řetězce (Vít, 2010) a komplikovaná analýza pomocí hmotnostní spektrometrie nakonec odhalila deamidaci asparaginu na pozici 253 VP2 (137 VP3) (Bílková, 2014). Dále bylo zjištěno, že N-koncový methionin VP3 je odštěpen a následující alanin (117A VP2) je acetylován (Vít, 2010). Za účelem studia těchto posttranslačních modifikací a jejich vlivu na životní cyklus viru byly vytvořeny substituční mutanty VP2 a VP3 v těchto pozicích (Bílková, 2014). Asparagin 253 proteinu VP2 byl nahrazen kyselinou asparagovou (N253A) nebo glutamovou (N253E) a alanin 117 byl nahrazen valinem (A117V). Tato diplomová práce navazuje ve své první části na práce Ondřeje Víta a Evy Bílkové, v této části tedy cílem práce bylo:

- **Připravit virová inokula mutantních virů N253D, N253E a A117V a divokého typu MPyV.**
- **Jednoznačně ukázat, že deamidace na pozici 253 proteinu VP2 (137 proteinu VP3) je důvodem pozorovaných dvojitých proužků pro minoritní proteiny na SDS-PAGE.**
- **Porovnat efektivitu infekce mutantních virů s divokým typem MPyV.**

Naše skupina se dále zabývá studiem vlivu virové infekce na hostitelskou buňku. Ukázali jsme, že infekce MPyV vede v permisivních buňkách k nárůstu acetylace mikrotubulů (Horníková et al., 2017). Ve druhé části této diplomové práce na toto zjištění navazujeme a námi vytyčené cíle jsou:

- **Charakterizovat míru acetylace mikrotubulů v průběhu časně i pozdní fáze infekce MPyV v buňkách 3T6.**
- **Určit, zda je za změny v acetylaci mikrotubulů během infekce zodpovědná změna exprese mRNA enzymu acetylujícího (α TAT1) nebo deacetylujícího tubulin (HDAC6).**
- **Ověřit, zda indukované zvýšení acetylace mikrotubulů má vliv na efektivitu infekce MPyV.**

4 Materiál a metody

4.1 Bakteriální kmen

Escherichia coli TOP10:

F- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74 nupG recA1 araD139 Δ (*ara-leu*)7697 *galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1* λ -*

Byli použity tři monokolonie tohoto kmene nesoucí plasmid pMJG s následujícími substitucemi (Bílková, 2014):

MPyV VP2 N253D

MPyV VP2 N253E

MPyV VP2 A117V

4.2 Virus

Myší polyomavirus – kmen BG

4.3 Buněčné linie

Buněčná linie myších fibroblastů **3T6** (ATCC; CCL-96) – Senzitivní a permisivní linie pro MPyV

Buněčná linie myších fibroblastů **NIH 3T3** (ATCC; CRL-1658) – Tato linie není senzitivní pro MPyV, ale je pro tento virus permisivní

4.4 Plasmid

pMJG – plasmid pMJ1 nesoucí kompletní genom MPyV (Krauzewicz et al., 1990)

4.5 DNA primery

MPyV LT – absolutní kvantifikace genomových ekvivalentů

MPYV LT F – 5' – GCTGACAAAGAAAGGCTGCT – 3'

MPyV LT R – 5' – AGCCGGTTCCTCCTAGATTC – 3'

HDAC6 – relativní kvantifikace genové exprese – transkripční varianta 1 a 2

HDAC6 F – 5' – CGGCTGGTAGATGCACTCAT – 3'

HDAC6 R – 5' – TGAGAACCCTCTGAATGCGG – 3'

α TAT1 – relativní kvantifikace genové exprese – transkripční varianta 1 a 2

α TAT1 F – 5' – TTTGAGGATGCAAAGCAACCG – 3'

α TAT1 R – 5' – AGTCCAGAATGCAAAGGGGTT – 3'

GAPDH – relativní kvantifikace genové exprese (referenční gen)

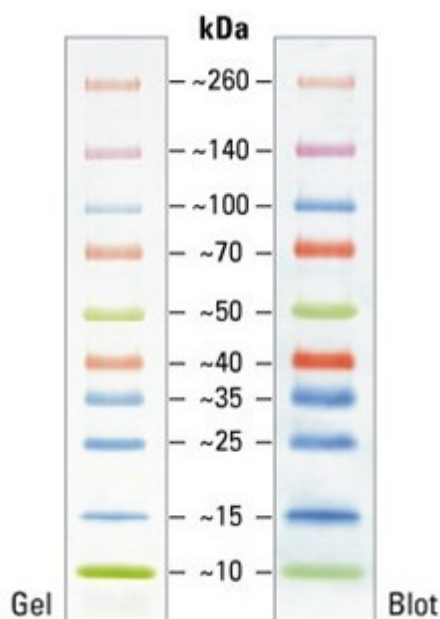
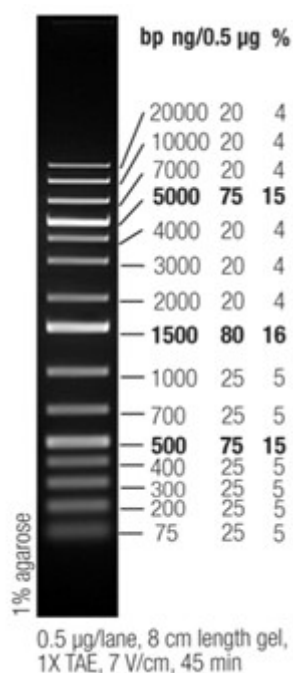
GAPDH F – 5' – ATGACATCAAGAAGGTGGTG – 3'

GAPDH R – 5' – CATAACCAGGAAATGAGCTTG – 3'

4.6 Markery molekulových hmotností

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

SDS-PAGE marker molekulových vah
Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder
(Thermo Fischer Scientific)



SDS-PAGE marker molekulových vah – Prestained Molecular Weight Marker SDS7B2, M.W. 27,000–180,000 (Sigma-Aldrich) – jednotlivé složky markeru a jejich molekulové hmotnosti (jednotlivé hodnoty se mohou lišit důsledkem konjugace s barvou):

α_2 -makroglobulin	173 kDa
β -galaktosidáza	114 kDa
fruktóza-6-fosfátkináza	96 kDa
pyruvátkináza	66 kDa
fumaráza	59 kDa
laktátdehydrogenáza	38 kDa
triózafosfátizomeráza	32 kDa

4.7 Protilátky

4.7.1 Primární protilátky

α -MPyV LT – krysí monoklonální protilátka proti LT antigenu MPyV – pro imunofluorescenci ředěno 50× (S. Dilworth – Imperial College School of Medicine, London)

α -MPyV VP1 D4 – myší monoklonální protilátka proti VP1 proteinu MPyV – pro dot blot ředěno 50× (Morávková, 2001)

α -MPyV VP1 A5 – myší monoklonální protilátka proti VP1 proteinu MPyV – pro dot blot ředěno 10× (Morávková, 2001)

α -MPyV VP1 A – myší monoklonální protilátka proti denaturovanému VP1 proteinu MPyV – pro western blot ředěno 100× (Forstová et al., 1993)

α -MPyV VP2/3 2C8 – myší monoklonální protilátka proti denaturované společné části VP2 a VP3 proteinů MPyV – pro western blot ředěno 5× (Forstová et al., 1993)

α -acetyl α -tubulin – myší monoklonální protilátka proti acetylovanému α -tubulinu – pro western blot ředěno 1000× (Sigma-Aldrich)

α -GAPDH – králičí polyklonální protilátka proti GAPDH – pro western blot ředěno 500× (Santa Cruz Biotechnology)

4.7.2 Sekundární protilátky

D α R AF488 – oslí protilátka proti krysím imunoglobulinům konjugovaná s Alexa Fluor 488 – pro imunofluorescenci ředěno 1000× (Thermo Fisher Scientific)

G α M HRP – kozí protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou (HRP) – pro western blot a dot blot ředěno 1000× (Bio-Rad)

G α Rb HRP – kozí protilátka proti králičím imunoglobulinům konjugovaná s HRP – pro western blot ředěno 1000× (Bio-Rad)

4.8 Kultivační média

4.8.1 Bakteriální médium

LB (Lurita-Bertani) médium – 1% (w/V) pepton (Imuna), 0,5% (w/V) kvasniční autolyzát (Imuna), 1% (w/V) NaCl

4.8.2 Média pro tkáňové kultury

DMEM bez séra – Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma-Aldrich), 2 mM glutamax (Thermo Fisher Scientific)

DMEM s 10% sérem – Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma-Aldrich), 2 mM glutamax (Thermo Fisher Scientific), 10% (V/V) fetální bovinní sérum (Thermo Fisher Scientific)

RPMI médium – RPMI-1640 (Sigma-Aldrich)

4.9 Antibiotika

Ampicilin – 100 µg na ml média (Biomedika)

Směs antibiotik pro tkáňové kultury – 100× koncentrovaný roztok (1ml obsahuje: 10000 jednotek penicilinu, 10 mg streptomycinu, 25 mg amphoptericinu B) (Sigma-Aldrich)

4.10 Enzymy a inhibitory

EcoRI (Fermentas)

T4 DNA ligáza (Fermentas)

DNáza I (Roche)

Proteináza K (Roche)

Neuraminidáza z *Vibria cholerae* (Sigma-Aldrich)

Aprotinin (Sigma-Aldrich)

Trypsin (Sigma-Aldrich)

4.11 Nejčastěji používané roztoky

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

Versen – 0,25% kyselina ethylendiaminotetraoctová (EDTA) v PBS

Trypsin – 0,25% Trypsin (Sigma) v PBS

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

4.12 Sterilizace

Špičky k mikropipetám, mikrozkuhavky a roztoky byly sterilizovány 30 minut v autoklávu při 120 °C a 120 kPa. Alternativně byly některé roztoky sterilizovány pomocí filtrace přes sterilní filtr s póry o průměru 0,22 µm. Laboratorní sklo bylo sterilizováno horkým vzduchem v sušárně 3 hodiny při 160 °C. Pinzety a další nástroje byly sterilizovány namočením do 96% (V/V) ethanolu a vyžiháním nad plamenem kahanu.

4.13 Kultivace bakterií v suspenzi

Zmražené kolonie bakteriálního kmene TOP10 byli zaočkovány do doporučeného objemu LB média s ampicilinem pomocí sterilního párátko v laminárním boxu a suspenze byla inkubována 12–16 hodin při 200 rpm a 37 °C v orbitálním inkubátoru.

4.14 Práce s nukleovými kyselinami

4.14.1 Izolace plasmidů

Pro izolaci plasmidů bez bakteriálních endotoxinů pro následnou transfekci savčích buněk byla použita komerční souprava JetStar® Endotoxin-free Plasmid Purification Kit (Genomed). Bakterie byly inkubovány ve výrobce doporučeném objemu LB média ve 37 °C při 200 rpm přes noc. Bylo postupováno podle návodu výrobce s následujícími odchylkami: vzorky byly po precipitaci v precipitačním pufru (E3) centrifugovány při 15000×g (původně 12000×g) a po precipitaci v isopropanolu a promytí 70% ethanolem byly centrifugovány při 20000×g (původně 12000×g). DNA byla rozpuštěna ve 100 µl TE pufru.

4.14.2 Agarózová DNA elektroforéza

Rozdělení DNA molekul ve vzorcích probíhalo v 1% (w/V) agarózovém gelu. Agaróza (Amresco) byla rozpuštěna povařením v 0,5x koncentrovaném Tris-borátovém pufru (TBE; 45 mM Tris, 45 mM kyselina boritá, 1 mM EDTA-NaOH, pH 8) nebo v 1x koncentrovaném Tris-acetátovém pufru (TAE; 40 mM Tris, 20 mM kyselina octová, 1 mM EDTA-NaOH, pH 8). Po zchladnutí roztoku na zhruba 50–60 °C byl přidán ethydium bromid (výsledná koncentrace 1 µg EtBr na 1 ml gelu) nebo GelRed Nucleic Acid Stain (ředěno 10000×, Biotinum), gel byl nalit do připravené formy a následně byl vložen hřeben pro vytvoření jamek pro nanášení vzorků. Po ztuhnutí gelu byl vyjmut hřeben, gel byl přenesen do aparatury a přelit příslušným puftrem (0,5x TBE nebo 1x TAE). Vzorky byly smíseny s nanášecí barvou DNA Gel Loading Dye 6x (Thermo Fisher Scientific) nebo roztokem bromfenolové modři [40% sacharóza (V/V), 0,12% bromfenolová modř (w/V)] a společně s DNA markerem molekulových vah

(GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder – Thermo Fisher Scientific) nanoseny do jamek gelu. Rozdělení probíhalo při napětí 5–6 V/cm gelu po dobu 45–90 minut, výsledky byly vizualizovány pomocí UV transiluminátoru.

Pokud byla separována pomocí agarózové elektroforézy RNA, byl použit místo 1% (w/V) agarózového gelu 0,8% (w/V) gel v 0,5×TBE nebo 1×TAE.

4.14.3 Restrikční štěpení

Restrikční směs obsahovala 100 µg plasmidu izolovaného pomocí komerční soupravy, 30 jednotek restrikčního enzymu EcoRI (Fermentas), pufr EcoRI (Fermentas) v koncentraci doporučené výrobcem a byla doplněna ddH₂O do objemu 400 µl. Reakce probíhala po dobu 2–16 hodin při 37 °C a byla následně ukončena inaktivací enzymu při 65 °C po dobu 20 minut. Výsledek štěpení byl ověřen pomocí elektroforézy.

4.14.4 Srážení DNA

Linearizovaná DNA byla srážena přidáním 0,1násobku objemu 3 M octanu sodného a 2,5násobkem objemu 96% (V/V) ethanolu při –20 °C přes noc. Následující den byla směs centrifugována při 15000×g při 4 °C po dobu 30 minut, poté byl pelet přečištěn 70% (V/V) ethanolem a po vyschnutí na vzduchu rozpuštěn ve 100 µl H₂O bez nukleáz.

4.14.5 Ligace (self-cirkularizace virového genomu)

70 µg linearizované DNA bylo použito pro ligační reakci pomocí T4 DNA ligázy (14 jednotek, Fermentas), směs dále obsahovala ligační pufr (Fermentas) v koncentraci doporučené výrobcem a H₂O bez nukleáz do konečného objemu 14 ml. Reakce probíhala přes noc při 16 °C.

Virový genom byl po ligaci srážen přidáním 0,1násobku objemu 3 M octanu sodného a 2,5násobkem objemu 96% (V/V) ethanolu při –20 °C přes noc. Následující den byla směs centrifugována při 4000×g při 4 °C po dobu 2 hodin, poté byl pelet přečištěn 70% (V/V) ethanolem, směs byla centrifugována 20 minut při 20000×g a 20 °C a pelet byl rozpuštěn ve 100 µl H₂O bez nukleáz.

4.14.6 Izolace RNA

Celková buněčná RNA byla izolována z buněčných peletů (5×10^5 buněk) pomocí komerční soupravy High Pure RNA Isolation Kit (Roche) podle pokynů výrobce. V posledním kroku byla RNA rozpuštěna v 50 µl elučního pufru a byla změřena koncentrace. Integrita RNA byla ověřena pomocí 0,8% agarózové elektroforézy.

4.14.7 Syntéza cDNA

Pro syntézu cDNA pomocí komerční soupravy iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad) bylo použito 1000 ng izolované RNA na jednu reakci a postup probíhal podle pokynů výrobce. Reakce probíhala za použití přístroje GenePro Thermal Cycler (Bioer).

4.14.8 Izolace DNA z virové suspenze

Požadované množství virové suspenze (10–20 μ l) bylo doplněno do 50 μ l sterilním pufrem B, byl přidán $MgCl_2$ (konečná koncentrace 10 mM) a DNáza I (Roche, konečná koncentrace 0,4 U/ μ l) a směs byla inkubována 1 hodinu při 37 °C. Reakce byla zastavena přidáním EDTA (konečná koncentrace 10 mM) a DNáza I byla inaktivována inkubací směsi při 80 °C 10 minut. Byl přidán Tris (pH 8, konečná koncentrace 10 mM) a proteináza K (Roche, konečná koncentrace 50 μ g/ml) a směs byla inkubována 1 hodinu při 60 °C. Poté byl přidán DTT (konečná koncentrace 25 mM) a směs byla inkubována 30 minut při 60 °C.

Následně byla směs přečištěna fenol-chloroformovou extrakcí. Směs byla naředěna H_2O (4násobek objemu) H_2O a poté byl přidán 5násobek směsi fenolu, chloroformu a isoamylalkoholu (v poměru 25:24:1), směs byla důkladně promísena a centrifugována 5 minut při 16000 \times g a 20 °C. Byla odebrána vrchní vodná fáze a DNA v této fázi byla precipitována přidáním 2,5násobku objemu 96% (V/V) ethanolu a 0,1násobku objemu 3M octanu sodného (pH 5) přes noc při –20 °C. Další den byla směs centrifugována 45 minut při 16000 \times g a 4 °C, pelet byl promyt 70% (V/V) ethanolem a směs centrifugována 10 minut při 16000 \times g a 4 °C. Pelet byl po dostatečném vysušení na vzduchu rozpuštěn v 15 μ l H_2O . Koncentrace izolované DNA byla změřena pomocí přístroje NanoDrop a přesný počet molekul genomu byl změřen qPCR.

4.14.9 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR)

Relativní exprese mRNA pro HDAC6 a α TAT1 vůči referenčnímu genu a počet kopií virového genomu ve virových izolacích byly určeny pomocí qPCR. Byla použita komerční souprava LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche) a složení reakční směsi na 10 μ l reakci bylo následující:

Forward primer (10 μ M)	0,3 μ l
Reverse primer (10 μ M)	0,3 μ l
Templátová DNA	0,5 μ l
LightCycler® 480 SYBR Green I Master (2 \times)	5 μ l
PCR H ₂ O	3,9 μ l

Detekce probíhala pomocí přístroje LightCycler® 480 Instrument II (Roche) podle protokolu doporučeného výrobcem s následujícími úpravami:

Preinkubace	95 °C	5 minut	1 \times
Amplifikace			40 \times
	95 °C	10 sekund	
	58 °C	20 sekund	
	72 °C	30 sekund	
Křivka tání			1 \times
	95 °C	5 sekund	
	65 °C	1 minuta	
	97 °C		
Chladnutí	37 °C	10 sekund	1 \times

Data z měření relativní exprese mRNA byla zpracována pomocí komparativní C_T metody v originálním software dodávaném k přístroji.

Absolutní kvantifikace kopií virového genomu ve virové suspenzi byla zjištěna pomocí změřením signálu pro ředící řadu plasmidu pMJG 10–0,00001 ng/ μ l, vytvoření regresní křivky a interpolací pro naměřený signál pro virovou suspenzi.

4.14.10 Měření koncentrace nukleových kyselin

Stanovení koncentrace nukleových kyselin bylo prováděno spektrofotometricky pomocí přístroje NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific).

4.15 Práce s buněčnými kulturami

4.15.1 Pasážování savčích buněk 3T6 a NIH 3T3

Buněčné kultury byly inkubovány při 37 °C v 5% CO₂ atmosféře v humidifikovaném termostatu. Kultury byly pasážovány dvakrát týdně v poměru buněčné suspenze k médiu 1:6 až 1:20 podle stupně konfluency narostlé buněčné kultury. Bylo odsáto médium a buňky byly opláchnuty přiměřeným množstvím Versenu. Následně byly pomocí inkubace v roztoku

trypsinu (Petriho miska o průměru 60 mm – 300 μ l, 100 mm – 500 μ l, 150 mm – 1000 μ l) po dobu 5 minut ve 37 °C a 5% CO₂ atmosféře uvolněny buňky z povrchu a resuspendovány ve vhodném množství DMEM s 10% sérem. Ve výše uvedeném poměru nebo podle potřeby byla buněčná suspenze rozdělena na nové misky s předehřátým DMEM s 10% sérem (37 °C).

Pro pasáž buněk na imunofluorescenční značení proteinů bylo odsáto médium, miska byla opláchnuta Versenem a byl přidán trypsin, ve kterém byly buňky inkubovány 5 min při 37 °C a 5% CO₂. Následně byly buňky resuspendovány a spočítány pomocí Bürkerovy komůrky. Kruhová mikroskopická sklíčka byla sterilizována pomocí namočení do 96% (V/V) ethanolu a opálení nad kahanem a následně vložena do jamek 24jamkové kultivační destičky. Do takto připravených jamek s předehřátým 1 ml DMEM s 10% sérem (37 °C) bylo vyseto 5×10^4 buněk.

4.15.2 Transfekce buněk elektroporací (nukleofekce)

Transfekce savčích buněk virovým genomem za účelem produkce viru byla provedena pomocí komerční soupravy Amaxa™ Cell Line Nucleofector™ Kit V (Lonza). Den před transfekcí byly pasážovány buňky NIH 3T3 tak, aby v den transfekce dosáhla konfluencce přibližně 70 %. Další den bylo odsáto médium, miska byla opláchnuta Versenem a byl přidán trypsin, ve kterém byly buňky inkubovány 5 min při 37 °C a 5% CO₂. Následně byly buňky resuspendovány, spočítány pomocí Bürkerovy komůrky a alikvóty o 4×10^6 buněk byly centrifugovány při $1500 \times g$ 6 minut při 20 °C. Pelet byl resuspendován ve 100 μ l Nucleofector solution V, bylo přidáno 6 μ g DNA, směs byla přesunuta do elektroporační kyvety a buňky byly porovány pomocí programu U-030 optimalizovaného pro buňky NIH 3T3 přístrojem Amaxa Nucleofector® II. K buňkám bylo okamžitě přidáno 0,5 ml předehřátého RPMI média (37 °C), buňky byly přeneseny do mikrozkuřavky a inkubovány 15 minut při 37 °C. Poté byl každý alikvót buněk vyset na Petriho misky (průměr 100 mm) s předehřátým DMEM s 10% sérem (37 °C).

4.15.3 Infekce buněk MPyV

Buňky 3T6 byly zpasažovány den před infekcí tak, aby v den infekce dosáhla konfluencce zhruba 50%. V den infekce byly buňky opláchnuty předehřátým DMEM bez séra (37 °C) a infikovány virovou suspenzí ředěnou v DMEM bez séra (Petriho miska o průměru 60 mm – 500 μ l, 100 mm – 1000 μ l, jamka 24jamkové destičky – 200 μ l). Buňky byly takto inkubovány po dobu 1 h v 37 °C a 5% CO₂ a byly každých 20 minut zakývány. Následně bylo přidáno předehřáté DMEM s 10% sérem (37 °C) a infikované buňky byly dále inkubovány podle potřeby.

4.15.4 Testování cytotoxicity inhibitoru tubacinu

Buňky 3T6 byly vysety v duplikátech do 24jamkové destičky v hustotě 5×10^4 buněk na jamku, druhý den byly opláchnuty DMEM s 10% sérem (37 °C) a byl přidán tubacin (Sigma-Aldrich, rozpuštěn v DMSO). Buňky byly inkubovány 24 hodin v 37 °C a 5% CO₂ a poté bylo z jedné jamky duplikátu odebráno médium (pro zjištění počtu mrtvých buněk). Ke druhé jamce duplikátu byl přidán 0,1násobek objemu 9% (V/V) Tritonu X-100 (Sigma-Aldrich), buňky byly inkubovány 45 minut při 37 °C a poté bylo odebráno médium (pro zjištění celkového počtu buněk). Média z obou jamek duplikátu byla centrifugována 300×g 5 minut a 30 μl supernatantu bylo odebráno pro měření počtu mrtvých buněk pomocí komerční soupravy CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega). Bylo postupováno podle instrukcí výrobce.

4.15.5 Testování proliferace buněk 3T6

Buňky 3T6 byly vysety do 96jamkové destičky v hustotě 5×10^3 a 10^4 buněk na jamku, druhý den byly opláchnuty DMEM s 10% sérem (37 °C) a byl přidán tubacin (Sigma-Aldrich, rozpuštěn v DMSO). Buňky byly inkubovány 24 hodin v 37 °C a 5% CO₂, poté byl přidán 0,1násobek objemu Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche) a bylo postupováno podle instrukcí výrobce. Měření bylo provedeno po 2 hodinách.

4.15.6 Příprava buněčných peletů pro následné analýzy

Buňky narostlé na Petriho misce byly buď seškrabány z povrchu silikonovým škrabátkem v malém množství původního média, nebo byly opláchnuty Versenem a následně byly pomocí inkubace v roztoku trypsinu (Petriho miska o průměru 60 mm – 300 μl, 100 mm – 500 μl, 150 mm – 1000 μl) po dobu 5 minut ve 37 °C a 5% CO₂ atmosféře uvolněny z povrchu a resuspendovány ve vhodném množství DMEM s 10% sérem (inaktivuje trypsin). Poté byla suspenze přenesena do mikrozkušavky nebo centrifugační zkumavky a centrifugována 5 minut při 700×g a 4 °C. Médium bylo odsáto a pelet byl uchováván při –80 °C.

4.15.7 Fixace buněk a detekce proteinů metodou nepřímé imunofluorescence

Buňky narostlé na mikroskopických sklíčkách ve 24jamkové destičce byly opláchnuty PBS a fixovány pomocí 3% (w/V) formaldehydu v PBS po dobu 30 minut. Poté byly opláchnuty PBS a permeabilizovány působením 0,5% (V/V) Tritonu X-100 (Sigma-Aldrich) v PBS po dobu 5 minut. Následně byly buňky 3× propláchnuty PBS (při posledním opláchnutí byly ponechány v PBS 10 minut). Buňky byly poté inkubovány 30 minut při pokojové teplotě v blokačním roztoku 0,25% (w/V) bovinního sérového albuminu (BSA) a 0,25% (w/V) želatiny v PBS a

následně 60 minut v primární protilátce ředěné v blokačním roztoku. Poté byly 3× promyty PBS po dobu 10 minut a inkubovány 30 minut v sekundární protilátce ředěné v blokačním roztoku. Následovalo promývání v PBS 3 × 10 minut. Sklíčka byla následně promyta ddH₂O, vyjmuta z destičky, ponechána vyschnout při 20 °C a montována stranou porostlou buňkami do kapky 50% (V/V) glycerolu s DAPI na podložní sklíčko. Buňky byly vizualizovány pomocí invertovaného fluorescenčního mikroskopu Olympus IX71.

4.16 Práce s virem

4.16.1 Izolace viru (upraveno podle Horníková et al., 2015)

Buňky transfekované virovým genomem nebo infikované virovou suspenzí byly zmrazeny na –80 °C poté, co alespoň 80 % buněk vykazovalo cytopatický efekt (5–7 dní po infekci). Buňky byly lyzovány rozmražením a následným opětovným zmražením na –80 °C (opakováno 2×), byly seškrábány z misek pomocí silikonového škrabátka, suspenze buněk v médiu byla přenesena do 50ml centrifugační zkumavky a byla centrifugována 10 minut při 8000×g a 4 °C. Byl odebrán supernatant a skladován při 4 °C. Pelet byl resuspendován v 10 mM Tris-HCl, pH 7,4 a homogenizován pomocí Potter-Elvehjemova homogenizátoru na ledu. Směs byla převedena do 50ml centrifugační zkumavky, byla přidána neuraminidáza (konečná koncentrace 0,01 U na 1 ml suspenze, Sigma) a aprotinin (konečná koncentrace 2 µg na 1 ml suspenze, Sigma) a suspenze byla za stálého kývání inkubována přes noc při pokojové teplotě.

Další den byla suspenze centrifugována 10 minut při 8000×g a 4 °C, byl odebrán supernatant a byl zkombinován se supernatantem odebraným předchozí den a dále skladován při 4 °C. Pelet byl resuspendován v 1 ml 10 mM Tris-HCl, pH 9 a suspenze byla za stálého kývání inkubována 4 hodiny při pokojové teplotě. Následně byla směs centrifugována 10 minut 8000×g a 4 °C a supernatant byl zkombinován se supernatanty z předchozích kroků.

Spojený supernatant byl rozdělen do utracentrifugačních zkumavek a podvrstven 5 ml sterilní 10% (w/V) sacharózy v pufru B. Zkumavky byly vyváženy pomocí sterilního pufru B a vzorky byly centrifugovány pomocí rotoru Beckman SW32 a ultracentrifugy Optima XE (Beckman Coulter Life Sciences) 3 hodiny při 80000×g a 4 °C. Získané pelety byly rozplaveny přes noc v 200 µl pufru B.

Následující den byly pelety homogenizovány pomocí homogenizátoru, virová suspenze byla rozdělena do centrifugačních zkumavek a hmotnost obsahu každé zkumavky byla doplněna do 8 g sterilním pufrem B. V suspenzi bylo dále rozpuštěno 3,69 g CsCl (Sigma-Aldrich) a pomocí Abbeho refraktometru byl změřen refraktometrický index. Pokud tato hodnota nebyla

v rozmezí 1,363–1,365, bylo přidáno 100 µl pufru B (zvýšení o 0,001) nebo malé množství CsCl a měření bylo opakováno, dokud refraktometrický index suspenze nebyl v daném rozmezí. Suspenze byla převrstvena parafinovým olejem 2 mm pod okraj a zkumavky byly vyváženy. Vzorky byly centrifugovány pomocí rotoru Beckman SW41 a ultracentrifugy Optima XE (Beckman Coulter Life Sciences) při 150000×g a 18 °C po dobu minimálně 20 hodin.

Po ukončení centrifugace byly jednotlivé gradienty rozděleny do frakcí po zhruba 200–500 µl pomocí zařízení pro rozebírání frakcí (Beckman Coulter). Pro každou frakci byl změřen refraktometrický index a byl detekován hlavní kapsidový protein VP1 (metodou dot blot). Frakce byly na základě refraktometrických indexů (plné viriony mají refraktometrický index v rozmezí 1,365–1,366, prázdné kapsidy 1,362–1,363) a signálu VP1 spojeny do tří frakcí, které byly dialyzovány při 4 °C proti pufru B přes noc.

Další den byly frakce koncentrovány přes sacharózový polštář. Frakce byly převedeny do ultracentrifugačních zkumavek, podvrstveny 2 ml sterilní 10% (w/V) sacharózy, vyváženy pomocí pufru B a centrifugovány pomocí rotoru Beckman SW41 a ultracentrifugy Optima XE (Beckman Coulter Life Sciences) 3 hodiny při 150000×g a 4 °C. Následně byly pelety rozplaveny ve 100 µl sterilního pufru B při 4 °C po dobu alespoň 48 hodin. Poté byly pelety homogenizovány pomocí malého homogenizátoru, virová suspenze byla rozdělena do silikonových zkumavek a uložena v –20 °C.

4.16.2 Hemaglutinační test

Počet částic ve virové suspenzi byl určen hemaglutinačním testem. Do všech jamek 96jamkové mikrotitrační destičky s kulatým dnem bylo nanášeno 50 µl PBS pro tkáňové kultury s 0,2% (w/V) BSA. Do první jamky řady destičky bylo přidáno 50 µl definovaně naředěné virové suspenze a po důkladném promísání bylo vždy odebráno 50 µl a přeneseno do následující jamky. Poté bylo do všech jamek přidáno 50 µl 0,4% roztoku morčecích krvinek v PBS pro tkáňové kultury s 0,2% (w/V) BSA a destička byla inkubována alespoň 1 hodinu při pokojové teplotě.

Poté byla odečtena poslední jamka, kde byla pozorována aglutinace krvinek (n), a byl vypočítán počet částic na ml virové suspenze podle následujícího vzorce (Horníková et al., 2015):

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

4.16.3 Určení infekčního titru viru

Buňky narostlé na mikroskopických sklíčkách ve 24jamkové destičce byly infikovány virovou suspenzí sériově naředěnou 100×, 1000×, 10000×, 100000× a 1000000× v DMEM bez séra (37 °C) a byly 24 hodin po infekci (hpi) fixovány. Byla provedena nepřímá imunofluorescence (popsáno v kapitole 4.15.7), kdy byl virový LT antigen značený pomocí primární protilátky a sekundární protilátky konjugované s fluoroforem Alexa Fluor 488. Ve vhodném ředění byly spočítány LT pozitivní buňky na celém sklíčku (n) a infekční titer byl vypočítán podle následujícího přepočtu (f.f.u – fluorescence forming units):

$$\text{Titř (f.f.u./ml)} = n \times (1/\text{\u0159ed\u011bn\u00ed viru}) \times 5$$

4.17 Negativní barvení pro elektronovou mikroskopii

Negativní barvení a elektronov\u00e1 mikroskopie byly pou\u017eity pro vizu\u00e1ln\u00ed kontrolu virov\u00e9 suspenze. Na kapku virov\u00e9 suspenze byla polo\u017ena m\u011b\u0105enn\u00e1 s\u00ed\u0165ka pro elektronovou mikroskopii pokryt\u00e1 uhl\u00edkem a po inkubaci 10 minut p\u0159i pokojov\u00e9 teplot\u011b byla p\u0159enesena na kapku ddH₂O a promyta 2 \u00d7 30 sekund. Pot\u011b byla s\u00ed\u0165ka p\u0159enesena na kapku 2% (V/V) roztoku kyseliny fosfowolframov\u00e9 (pH 7,2) a prepar\u00e1t byl obarven inkubaci 2 \u00d7 60 sekund. P\u0159ebyte\u0105n\u00e1 kapalina byla ods\u00e1ta pomoc\u00ed filtra\u0105n\u00edho pap\u00edru a prepar\u00e1t byl ponech\u00e1n dosu\u0165it p\u0159i pokojov\u00e9 teplot\u011b. S\u00ed\u0165ky byly pozorov\u00e1ny pomoc\u00ed elektronov\u00e9ho mikroskopu JEOL JEM-1011 s CCD kamerou Veleta.

4.18 Pr\u00e1ce s proteiny

4.18.1 P\u0159\u00edprava bun\u011b\u0105n\u00fdch lyz\u00e1t\u0165

Bun\u011b\u0105n\u00fd pelet byl resuspendov\u00e1n v 150–250 \u00b5l RIPA pufru [150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 0,005% (V/V) NP-40 (Sigma-Aldrich), 1% (w/V) deoxychol\u00e1t sodn\u00fd, 1% (V/V) Triton X-100 (Sigma-Aldrich), 0,1% (w/V) SDS], s inhibitory prote\u00e1z (Complete, Roche) a bu\u0148ky byly lyzov\u00e1ny na ledu 20 minut. N\u00e1sledn\u011b byl lyz\u00e1t centrifugov\u00e1n 20 minut p\u0159i 20000\u00d7g a 4 \u00b0C, byl odebr\u00e1n supernatant a skladov\u00e1n p\u0159i –20 \u00b0C.

4.18.2 Denatura\u0105n\u00ed proteinov\u00e1 polyakrylamidov\u00e1 gelov\u00e1 elektrofor\u00e9za (SDS-PAGE)

(Laemmli,1970)

Podle instrukc\u00ed v\u00fdrobce byla sestavena aparatura pro p\u0159\u00edpravu gel\u0165 Mighty Small II Deluxe Mini Vertical Electrophoresis Unit (Hoefer), ut\u011bsn\u011bn\u00ed bylo zkontrolov\u00e1no nalit\u00edm mal\u011eho mno\u017estv\u00ed ddH₂O a aparatura byla vysu\u0165ena. Byly p\u0159ipraveny spodn\u00ed rozd\u011blovac\u00ed gel, kter\u00fd byl n\u00e1sledn\u011b nalit do aparatury zhruba 1 cm pod \u00farov\u011bn\u011b h\u0159ebenu pro tvorbu jamek, byl p\u0159evrstven

isobutanolem syceným vodou a ponechán polymerovat při pokojové teplotě po dobu 30 minut. Byl připraven vrchní zaostřovací gel, nalit do aparatury na spodní gel, byl zasunut hřeben a gel byl ponechán polymerovat při pokojové teplotě po dobu 30 minut. Gely byly přeneseny do aparatury pro elektroforézu a byly přelity pufrem pro elektroforézu [250 mM Tris, 1,92 M glycin, 0,1% (w/V) SDS, pH 8,3].

Vzorky (buněčný lyzát nebo virová suspenze) byly smíseny s 5× koncentrovaným Laemmliho pufrem [5% (w/V) SDS, 50 mM Tris-HCl (pH 6,8), 50% (V/V) glycerol, 25% (V/V) β-merkapt ethanol, 0,005% (w/V) bromfenolová modř] a inkubovány 5 minut při 100 °C. Do jamek gelu bylo nanášeno 5–20 µl vzorku, dále byl nanášen marker molekulových hmotností Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Fischer Scientific). Elektroforéza probíhala nejprve 30 minut při napětí 8 V/cm gelu a poté 2–3 hodiny při napětí 14 V/cm gelu. Po proběhnutí elektroforézy byl gel vyjmut z aparatury a zaostřovací gel byl odstraněn. Rozdělovací gel byl dále fixován a barven nebo byly proteiny z gelu přeneseny na nitrocelulózu membránu a vizualizovány pomocí metody western blot.

Složení použitých gelů bylo následující (složky s * byly přidány až těsně před nalitím gelu):

	12% spodní gel	10% spodní gel	5% svrchní gel
30% (w/V) akrylamid	2,4 ml	2 ml	0,5 ml
1 M Tris-HCl (pH 8,8)	2,255 ml	2,25 ml	-
1 M Tris-HCl (pH 6,8)	-	-	0,375 ml
10% (w/V) SDS	60 µl	60 µl	30 µl
ddH ₂ O	1,225 ml	1,625 ml	2,11 ml
10% (w/V) APS (amonium persulfát) *	20 µl	45 µl	20 µl
tetramethylethylenediamine (TEMED) *	4,5 µl	4,25 µl	5 µl

30% (w/V) akrylamid = 29% (w/V) akrylamid, 1% (w/V) N,N'-metylenbisakrylamid

4.18.3 Fixace a barvení polyakrylamidových gelů

Pro fluorescenční barvení polyakrylamidového gelu byla použita SYPRO® Ruby Protein Gel Stain (Thermo Fischer Scientific). Gel byl inkubován 2× 30 minut ve fixačním roztoku [50% (V/V) methanol, 7% (V/V) kyselina octová] a následně byl přes noc barven komerčním barvicím roztokem. Další den byl gel inkubován 30 minut v promývacím roztoku [10% (V/V) methanol, 7% (V/V) kyselina octová], dále promyt 2× 5 minut v destilované vodě

a poté byly proteiny vizualizovány pomocí přístroje Amersham™ Imager 600 (GE Healthcare Life Sciences).

4.18.4 Imobilizace proteinů na membráně

Za účelem imunodetekce byly proteiny rozdělené pomocí SDS-PAGE z gelu přeneseny na nitrocelulózovou membránu pomocí metody western blot. Rozdělovací gel byl po odříznutí zaostřovacího gelu vložen do vychlazeného (4 °C) blotovacího pufru (25 mM Tris, 195 mM glycin, 20% (V/V) methanol, pH 8,3) a byl sestaven blotovací sendvič pro aparaturu TE22 Mighty Small Transfer Tank (Hoefler) pro klasické „wet“ blotování [4× filtrační papír, 1× Whatman® 3mm filtrační papír (Sigma-Aldrich), gel, nitrocelulózová membrána (Amersham Protran 0,45 NC), 1× Whatman® 3mm filtrační papír (Sigma-Aldrich), 4× filtrační papír]. Sendvič byl vložen do aparatury a ta byla naplněna blotovacím pufrem. Transfer proteinů na membránu probíhal za stálého chlazení na ledu 1,5–3 hodiny za stálého stejnosměrného proudu 2,5 mA/cm² a po jeho ukončení byla membrána opláchnuta v PBS a proteiny byly detekovány pomocí imunologického značení.

V případě, že byl prováděn dot blot, byly na nitrocelulózovou membránu (Amersham Protran 0,45 NC) nanášeny proteiny v nativním stavu, např. virová suspenze. Vzorke byly nakapány na membránu a po jejich zaschnutí byla provedena imunodetekce.

4.18.5 Imunodetekce proteinů na membráně

Nitrocelulózová membrána s nanesenými proteiny byla blokována 1 hodinu v 5% (w/V) odtučněném mléce v PBS a poté inkubována 1 hodinu v primární protilátce ředěné v 5% (w/V) odtučněném mléce v PBS. Následně byla promyta 3× 10 minut v PBS a dále inkubována 30 minut v sekundární protilátce konjugované s HRP ředěné v 5% (w/V) odtučněném mléce v PBS. Membrána byla opláchnuta 3× 10 minut v PBS. Membrány byly vyvolány pomocí komerční soupravy „SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate“ (Thermo Fischer Scientific) a exponovány na radiografický film (Foma) nebo byla intenzita jednotlivých proužků změřena pomocí přístroje Amersham™ Imager 600 s originálním software výrobce (GE Healthcare Life Sciences).

Pokud bylo potřeba detekovat také jinou primární protilátkou, byla membrána opláchnuta v destilované vodě a inkubována 15 minut při 37 °C v 30% (V/V) H₂O₂. Následně byla membrána opláchnuta 15 minut v destilované vodě, poté 15 minut v PBS a nakonec inkubována 45 minut v 5% (w/V) odtučněném mléce v PBS. Poté byla provedena imunodetekce dle postupu uvedeného výše.

4.19 Práce se sekvencemi proteinů

Pro účely nalezení a porovnání proteinových sekvencí podobných VP2 MPyV byl použit software veřejně dostupný na internetových stránkách Standard Protein Blast (“BLAST: Basic Local Alignment Search Tool,” n.d.). Pomocí něj bylo vyhledáno 250 nejpodobnějších sekvencí k proteinu VP2 MPyV kmen BG z databáze neredundantních proteinových sekvencí (Altschul et al., 1997, 2005).

4.20 Statistická analýza

Statistická významnost výsledků experimentů byla testována pomocí dvouvýběrového, párového nebo jednovýběrového t-testu za použití software GraphPad Prism. Hladina významnosti byla předem stanovena na 5 %.

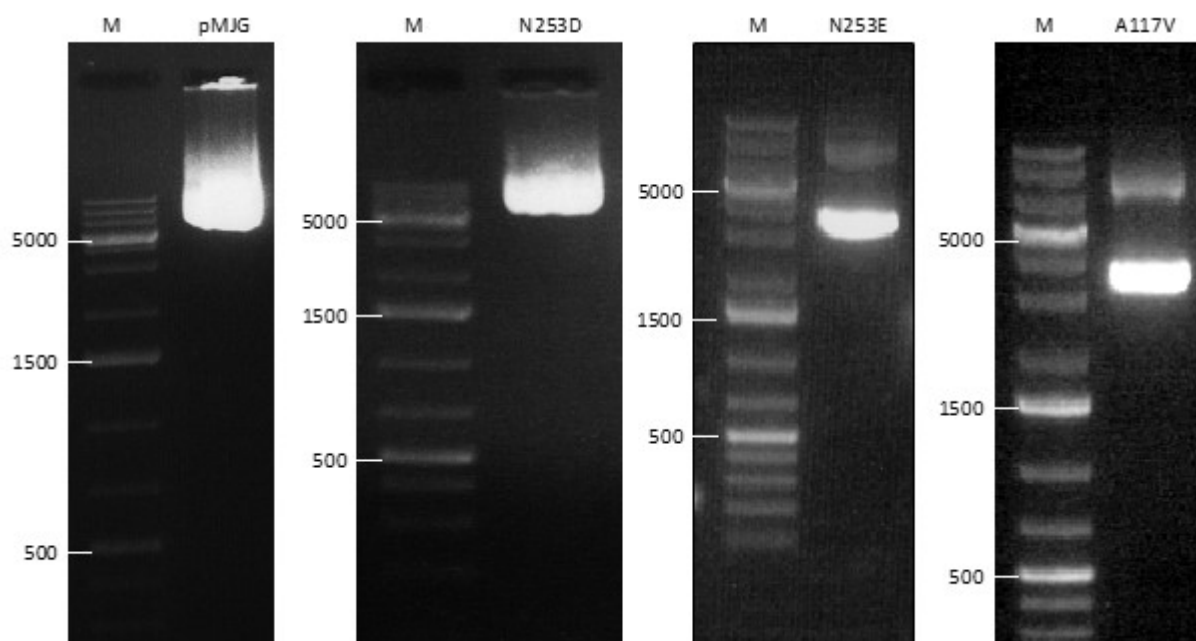
5 Výsledky

5.1 Studium posttranslačních modifikací minoritních proteinů VP2 a VP3

Poté, co analýza pomocí hmotnostní spektrometrie ukázala, že dvojitě proužky VP2 a VP3 na SDS-PAGE se liší zastoupením posttranslační modifikace na pozici 253 VP2 (137 VP3) bylo třeba ukázat, že substituční mutanty simulující deamidovaný stav proteinů VP2 a VP3 (N253D a N253E) dva proužky na SDS-PAGE netvoří. SDS-PAGE buněčných lyzátů transfekovaných těmito mutanty a následná analýza pomocí specifických protilátek tuto skutečnost nepotvrdila (Bílková, 2014). Proto byly pro analýzu použity virové izoláty divokého typu MPyV a jeho mutant N253D, N253E, A117V připravené v této práci.

5.1.1 Příprava virových genomů

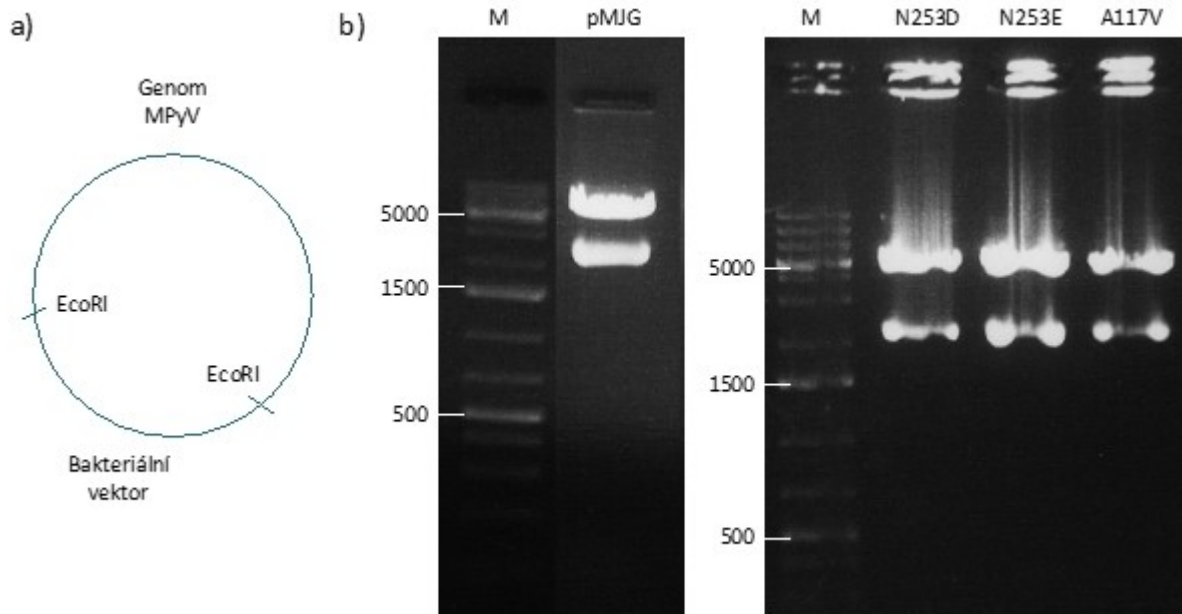
Bakteriální kolonie kmenu *Escherichia coli* TOP10 transformované plasmidem pMJG nesoucím mutované virové genomy (Bílková, 2014) a genom MPyV kmen BG byly pomnoženy a plasmidy byly izolovány pomocí komerční soupravy JetStar® Endotoxin-free Plasmid Purification Kit. Izolované produkty byly ověřeny separací na 1% agarózové DNA elektroforéze (Obrázek 9).



Obrázek 9 – Izolované plasmidy pMJG obsahující genom MPyV kmen BG nebo genom mutovaný ve VP2 na pozici 253 nebo 117 byly ověřeny pomocí 1% agarózové elektroforézy. M – marker (velikosti v bp).

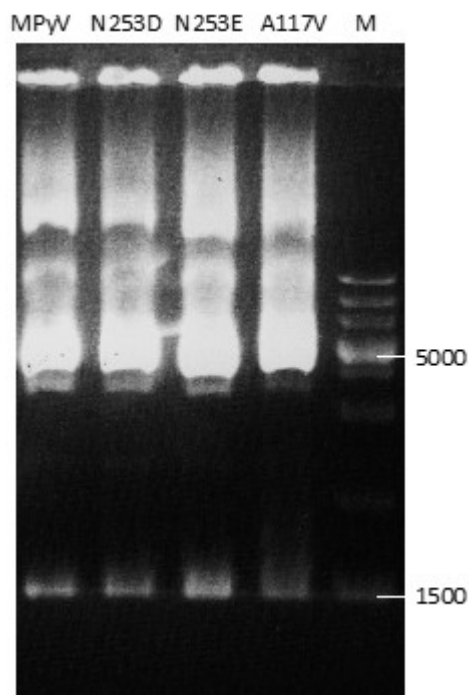
Plasmidy byly následně štěpeny pomocí restriktivního enzymu EcoRI za účelem vyštěpení genomu z plasmidu (Obrázek 10a). Efektivita štěpení byla ověřena na agarózové elektroforéze.

Na Obrázku 10b můžeme pozorovat fragment odpovídající velikosti linearizovanému genomu (5300 bp) a plasmidové kostře (2300 bp).



Obrázek 10 – Štěpení plasmidu pMJG pomocí restrikčního enzymu EcoRI. Schéma míst štěpení na plasmidu (a) a produkty štěpení (linearizovaný genom o velikosti 5300 bp a plasmidová kostra o velikosti 2300 bp) na 1% agarózové elektroforéze pro pMJG nesoucí divoký typ MPyV i mutované viry. M – marker (velikosti v bp).

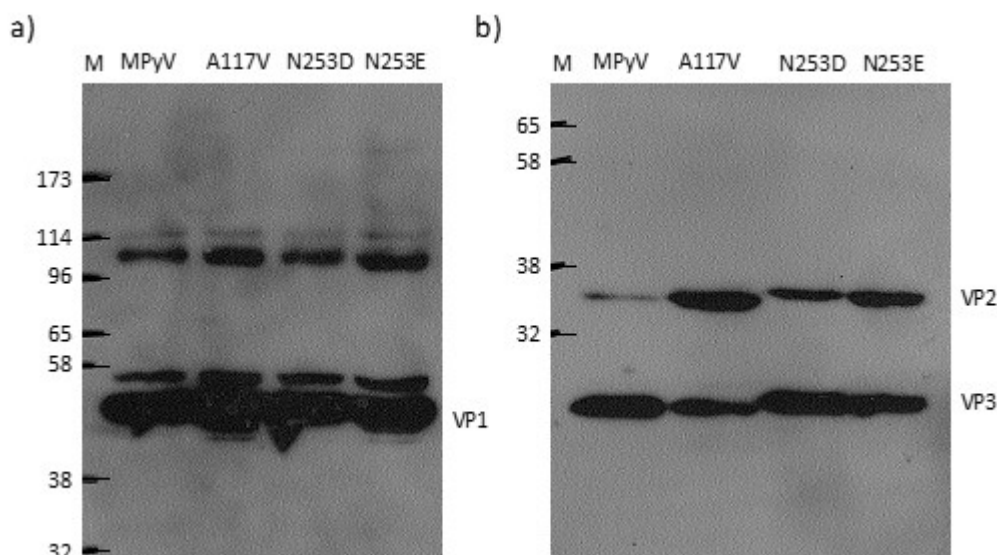
Následně byla směs obou fragmentů použita v ligační reakci pomocí T4 DNA ligázy při nízké koncentraci DNA a ve velkém objemu, aby byla preferována intramolekulární ligace. Produkty ligace byly sráženy za přítomnosti octanu sodného a ethanolu a účinnost ligace byla ověřena elektroforetickou separací (Obrázek 11). Jak jsme očekávali, elektroforetická separace ukazuje řadu produktů ligační reakce, kromě intramolekulárně ligovaného genomu MPyV (fragment o velikosti cca 5300 bp) můžeme pozorovat také intramolekulárně ligovaný bakteriální vektor (velikost cca 1500 bp), původní plasmid (genom a vektor) a také širokou škálu násobně ligovaných i neligovaných genomů a vektorů a jejich kombinací.



Obrázek 11 – Produkty ligace naštěpených plasmidů pMJG nesoucích genom divokého typu MPyV a mutované genomy na 1% agarózové elektroforéze. Byla pozorována řada produktů včetně intramolekulárně ligovaného genomu MPyV (5000 bp), intramolekulárně ligovaného bakteriálního vektoru (1500 bp), původní plasmid (genom a vektor) a širokou škálu násobně ligovaných i neligovaných genomů a vektorů a jejich kombinací. M – marker (velikosti v bp).

Následně jsme ověřili úspěšnost přípravy virových genomů. Byla provedena transfekce NIH 3T3 buněk pomocí Amaxa™ Cell Line Nucleofector™ Kit V. Na každou transfekci byly použity 4 µl směsi produktů lizační reakce. Virová genom je do bakteriálního plasmidu vložen přes unikátní EcoRI místo, které se nachází uprostřed kódující sekvence pro LT antigen. Proto byly transfekované buňky 24 hodin po transfekci (hpt) fixovány a byl detekován LT antigen metodou nepřímé imunofluorescence. Mezi buňkami transfekovanými genomem jak mutantních virů, tak divokého typu, byla část buněk pozitivní na expresi LT.

Dále jsme ověřili produkci strukturálních proteinů MPyV po transfekci. Buňky NIH 3T3 buněk byly transfekovány lizační směsí a 48 hpt byly lyzovány pomocí RIPA pufru. Buněčný lyzát byl separován buněčných pomocí SDS-PAGE s 10% rozdělovacím gelem a 5% zaostřovacím gelem. Poté byly proteiny přeneseny na membránu a pomocí specifických protilátek byly detekovány kapsidové proteiny VP1, VP2 a VP3. V buňkách transfekovaných genomem divokého typu viru i všech mutantních virů byla potvrzena exprese všech kapsidových proteinů VP1, VP2 i VP3 (Obrázek 12), při detekci proteinu VP1 jsme pozorovali také pomaleji se pohybující proužky odpovídající posttranslačně modifikovaným formám proteinu a dimerům.



Obrázek 12 – Buňky transfekované genomem divokého typu viru i všemi mutantními viry exprimují všechny kapsidové proteiny MPyV. Buňky transfekované genomem MPyV a mutantními viry byly lyzovány a proteiny byly separovány na 10% SDS-PAGE. Separované proteiny byly přeneseny na membránu a kapsidové proteiny VP1 (45 kDa) (a), VP2 (35 kDa) (b) a VP3 (23 kDa) (b) byly detekovány pomocí specifických protilátek. Proužky s menší elektroforetickou mobilitou (a) jsou posttranslačně modifikované formy a dimery proteinu VP1. M – marker (velikosti v kDa).

Tato data ukazují, že se podařilo získat genom mutantních virů a transfekce těmito genomy vedla k expresi časných i strukturních proteinů. Tyto genomy byly následně použity pro produkci virových částic.

5.1.2 Izolace viru

Pro studium mutantních virů byly viry izolovány celkem třikrát (mutanta A117V pouze dvakrát). Pro účely první a druhé izolace byly buňky transfekovány virovými genomy, třetí izolace probíhala z buněk infikovaných virovou suspenzí získanou z druhé izolace. Všechny izolace probíhaly, jak je popsáno v kapitole 4.16.1, následující podkapitoly dokumentují průběh a výsledky těchto izolací.

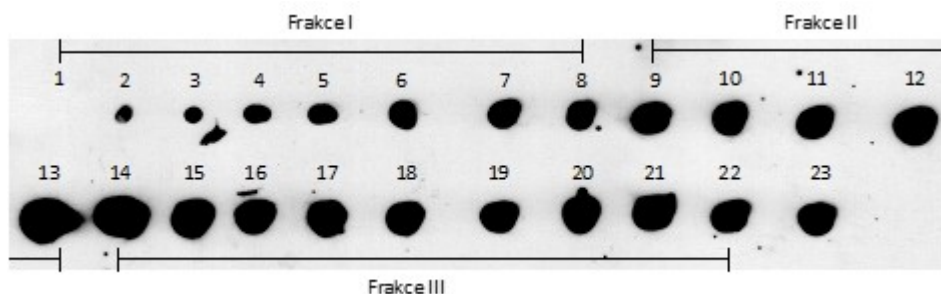
5.1.2.1 První izolace

Transfekované buňky NIH 3T3 ($2-3,2 \times 10^7$ buněk pro každý virus) byly sklizeny poté, co 80 % buněk vykazovalo cytopatický efekt. Virus byl nejprve koncentrován centrifugací přes sacharózový polštář a poté přečištěn pomocí centrifugace v CsCl gradientu. Gradient byl rozdělen na frakce o 200–500 μ l. Pro všechny frakce byl změřen refraktometrický index (n , Tabulka 1–4). Dále byla u všech frakcí provedena detekce přítomnosti hlavního kapsidového proteinu VP1 metodou dot blot (Obrázek 13–16). Jednotlivé frakce byly poté spojeny do tří frakcí I, II a III (Tabulka 1–4) podle experimentálně zjištěných rozmezí refraktometrických

indexů pro divoký typ viru (viriony mají refraktometrický index v rozmezí 1,365–1,366, prázdné kapsidy 1,362–1,363). Tato rozmezí byla upravena tak, aby reflektovala přítomnost VP1 zjištěnou dot blotem. Ve frakci II jsme tedy očekávali převážně přítomnost virionů obsahujících DNA, frakce III by měla obsahovat převážně viru podobné částice neobsahující DNA.

Tabulka 1 – Refraktometrické indexy (n) frakcí divokého typu MPyV rozdělených po centrifugaci viru v CsCl gradientu. Frakce byly následně spojeny na základě těchto indexů a přítomnosti VP1 (určeno metodou dot blot) do 3 frakcí, které byly dále zpracovávány odděleně. Frakce I odpovídá převážně rozpadlým virovým kapsidám, frakce II jsou plné viriony, frakce III jsou prázdné kapsidy.

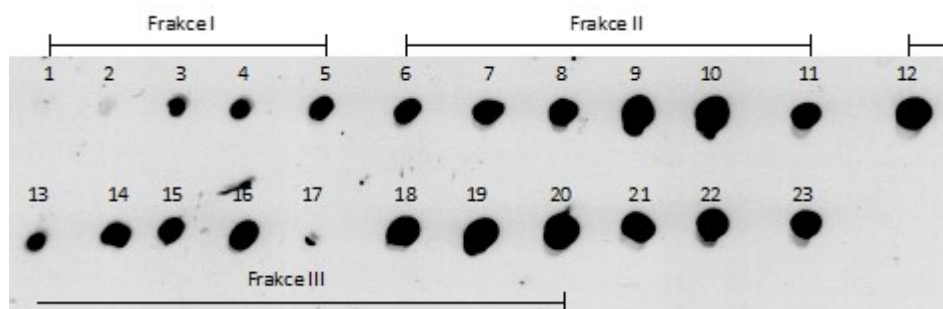
MPyV	Frakce I										
č.	1	2	3	4	5	6	7	8			
n	1,3345	1,3725	1,3745	1,3735	1,371	1,3695	1,368	1,367			
	Frakce II										
č.	9	10	11	12	13						
n	1,3665	1,3655	1,365	1,364	1,364						
	Frakce III										–
č.	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
n	1,3635	1,363	1,363	1,3625	1,362	1,3615	1,3615	1,361	1,360	1,3595	



Obrázek 13 – Přítomnost hlavního kapsidového proteinu VP1 ve frakcích divokého typu MPyV rozdělených po centrifugaci viru v CsCl gradientu byla určena pomocí metody dot blot. Detekováno pomocí primární protilátky proti proteinu VP1 a sekundární protilátky konjugované s HRP.

Tabulka 2 – Refraktometrické indexy (n) frakcí mutantního viru N253D rozdělených po centrifugaci viru v CsCl gradientu. Frakce byly následně spojeny na základě těchto indexů a přítomnosti VP1 (určeno metodou dot blot) do 3 frakcí, které byly dále zpracovávány odděleně. Frakce I odpovídá převážně rozpadlým virovým kapsidám, frakce II jsou plné viriony, frakce III jsou prázdné kapsidy.

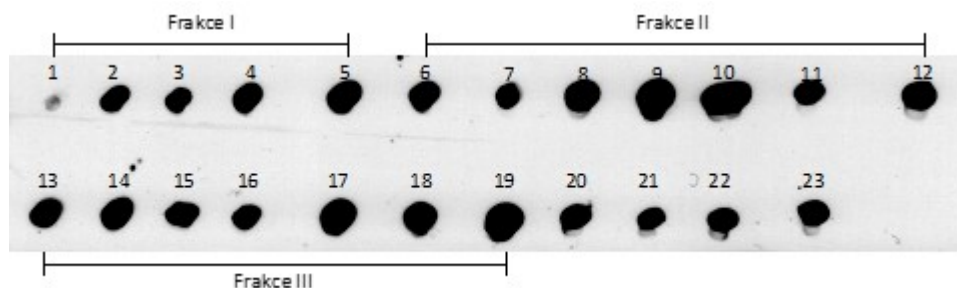
N253D	Frakce I					Frakce II						Frakce III			–								
č.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
n	1,3745	1,373	1,370	1,368	1,367	1,366	1,3655	1,365	1,3645	1,364	1,364	1,3635	1,363	1,363	1,3625	1,362	1,362	1,3615	1,361	1,361	1,360	1,359	1,3585



Obrázek 14 – Přítomnost hlavního kapsidového proteinu VP1 ve frakcích mutantního viru N253D rozdělených po centrifugaci viru v CsCl gradientu byla určena pomocí metody dot blot. Detekováno pomocí primární protilátky proti proteinu VP1 a sekundární protilátky konjugované s HRP.

Tabulka 3 – Refraktometrické indexy (n) frakcí mutantního viru N253E rozdělených po centrifugaci viru v CsCl gradientu. Frakce byly následně spojeny na základě těchto indexů a přítomnosti VP1 (určeno metodou dot blot) do 3 frakcí, které byly dále zpracovávány odděleně. Frakce I odpovídá převážně rozpadlým virovým kapsidám, frakce II jsou plné viriony, frakce III jsou prázdné kapsidy.

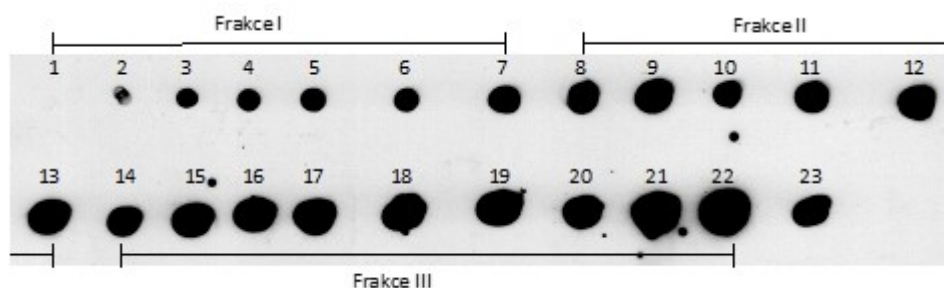
N253E	Frakce I					Frakce II						Frakce III			–								
č.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
n	1,3695	1,372	1,370	1,368	1,3675	1,3665	1,366	1,3655	1,365	1,3645	1,364	1,364	1,3635	1,363	1,3625	1,3625	1,362	1,3615	1,3605	1,3605	1,3595	1,3585	1,3575



Obrázek 15 – Přítomnost hlavního kapsidového proteinu VP1 ve frakcích mutantního viru N253E rozdělených po centrifugaci viru v CsCl gradientu byla určena pomocí metody dot blot. Detekováno pomocí primární protilátky proti proteinu VP1 a sekundární protilátky konjugované s HRP.

Tabulka 4 – Refraktometrické indexy (n) frakcí mutantního viru A117V rozdělených po centrifugaci viru v CsCl gradientu. Frakce byly následně spojeny na základě těchto indexů a přítomnosti VP1 (určeno metodou dot blot) do 3 frakcí, které byly dále zpracovávány odděleně. Frakce I odpovídá převážně rozpadlým virovým kapsidám, frakce II jsou plné viriony, frakce III jsou prázdné kapsidy.

A117V	Frakce I										
č.	1	2	3	4	5	6	7				
n	1,371	1,373	1,372	1,370	1,369	1,368	1,3675				
	Frakce II										
č.	8	9	10	11	12	13					
n	1,3665	1,366	1,3655	1,365	1,3645	1,364					
	Frakce III										–
č.	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
n	1,3635	1,3635	1,363	1,3625	1,3625	1,362	1,3615	1,361	1,3605	1,3595	



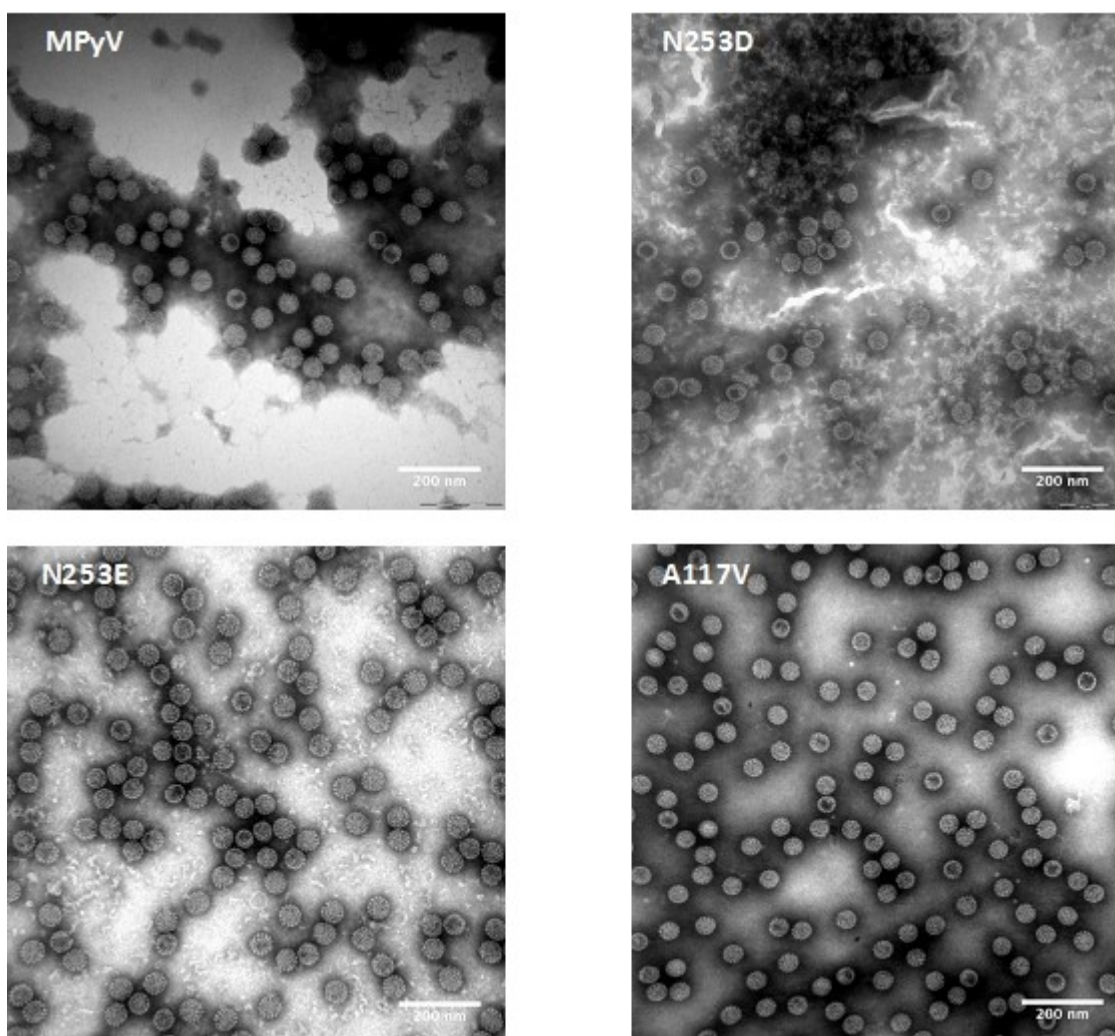
Obrázek 16 – Přítomnost hlavního kapsidového proteinu VP1 ve frakcích mutantního viru A117V rozdělených po centrifugaci viru v CsCl gradientu byla určena pomocí metody dot blot. Detekováno pomocí primární protilátky proti proteinu VP1 a sekundární protilátky konjugované s HRP.

Spojené frakce jednotlivých virů byly poté dialyzovány proti pufru B a koncentrovány pomocí další centrifugace přes sacharózový polštář. Množství částic ve frakcích II a III jednotlivých virových izolátů byl určen pomocí hemaglutinačního testu (Tabulka 5). Integrita izolovaných plných virionů ve frakci II byla ověřena pomocí elektronové mikroskopie. Snímky ukazují pro

všechny viry převážně viriony, dále také můžeme pozorovat malé množství prázdných kapsid a rozpadlého materiálu (Obrázek 17).

Tabulka 5 – Počty částic ve frakcích II a III izolovaných virů byly určeny pomocí hemaglutinačního testu.

Frakce	MPyV II	MPyV III	N253D II	N253D III
Počet částic/ml	$1,02 \times 10^{12}$	$2,05 \times 10^{12}$	$1,02 \times 10^{12}$	$6,4 \times 10^{10}$
Frakce	N253E II	N253E III	A117V II	A117V III
Počet částic/ml	$1,3 \times 10^{14}$	$8,2 \times 10^{12}$	$1,02 \times 10^{12}$	$2,05 \times 10^{12}$



Obrázek 17 – Snímky frakcí II izolovaných virů z transmisního elektronového mikroskopu. Všechny mutanty i divoký typ viru obsahují ve frakci II zejména plné viriony. Snímky pořídil Mgr. Martin Fraiberk.

Pro porovnání mutantních virů mezi sebou a s divokým typem MPyV z hlediska efektivity infekce byl určen počet virových genomových ekvivalentů na μl izolovaného viru. Byla tedy izolována virová DNA z $10 \mu\text{l}$ virové suspenze podle postupu uvedeného v kapitole 4.14.8, koncentrace byla změřena pomocí přístroje NanoDrop a přesný počet virových genomů ve

vzorcích byl určen pomocí qPCR. Jako standard pro vytvoření kalibrační křivky byl použit definovaně naředěný plasmid pMJG a koncentrace genomů ve virových suspenzích byly určeny interpolací (Tabulka 6).

Tabulka 6 – Počet virových genomových ekvivalentů ve virové suspenzi. Byla izolována DNA z virové suspenze a počet genomů byl určen pomocí qPCR.

	MPyV	N253D	N253E	A117V
Počet genomů/μl	1,5×10 ⁶	4×10 ⁸	1,5×10 ⁹	1×10 ⁷

5.1.2.2 Druhá izolace

Druhá izolace virů probíhala de stejného schématu jako první. V Tabulkách 7–10 jsou uvedeny refraktometrické indexy jednotlivých frakcí CsCl gradientu. Na základě refraktometrických indexů byly jednotlivé frakce spojeny do frakcí I, II a III. Počet částic ve frakcích II a III byl určen pomocí hemaglutinačního testu (Tabulka 11) a kvalita izolace frakce II byla ověřena elektronovou mikroskopií (Obrázek 18). Frakce II obsahovaly virové částice a malé množství nečistot. Počet virových genomů na μl byl určen pomocí qPCR (Tabulka 12).

Tabulka 7 – Refraktometrické indexy (n) frakcí divokého typu MPyV rozdělených po centrifugaci viru v CsCl gradientu při druhé izolaci. Frakce byly následně spojeny na základě těchto indexů do 3 frakcí, které byly dále zpracovávány odděleně. Frakce I odpovídá převážně rozpadlým virovým kapsidám, frakce II jsou plné viriony, frakce III jsou prázdné kapsidy.

MPyV	Frakce I										
č.	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
n	1,3705	1,3755	1,3745	1,373	1,3715	1,3705	1,369	1,368	1,3675		
	Frakce II										
č.	10	11	12	13	14	15	16	17			
n	1,3665	1,366	1,3655	1,365	1,3645	1,364	1,364	1,364			
	Frakce III										
č.	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
n	1,3635	1,3635	1,3635	1,363	1,363	1,3625	1,362	1,362	1,361	1,359	1,3585

Tabulka 8 – Refraktometrické indexy (n) frakcí mutantního viru N253D rozdělených po centrifugaci viru v CsCl gradientu při druhé izolaci. Frakce byly následně spojeny na základě těchto indexů do 3 frakcí, které byly dále zpracovávány odděleně. Frakce I odpovídá převážně rozpadlým virovým kapsidám, frakce II jsou plné viriony, frakce III jsou prázdné kapsidy.

N253D	Frakce I										
č.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
n	1,376	1,377	1,3755	1,374	1,3725	1,3715	1,370	1,3695	1,368	1,367	1,367
	Frakce II										
č.	12	13	14	15	16	17	18				
n	1,366	1,367	1,3665	1,366	1,366	1,3655	1,365				
	Frakce III										
č.	19	20	21	22	23						
n	1,365	1,3635	1,3635	1,3625	1,361						

Tabulka 9 – Refraktometrické indexy (n) frakcí mutantního viru N253E rozdělených po centrifugaci viru v CsCl gradientu při druhé izolaci. Frakce byly následně spojeny na základě těchto indexů do 3 frakcí, které byly dále zpracovávány odděleně. Frakce I odpovídá převážně rozpadlým virovým kapsidám, frakce II jsou plné viriony, frakce III jsou prázdné kapsidy.

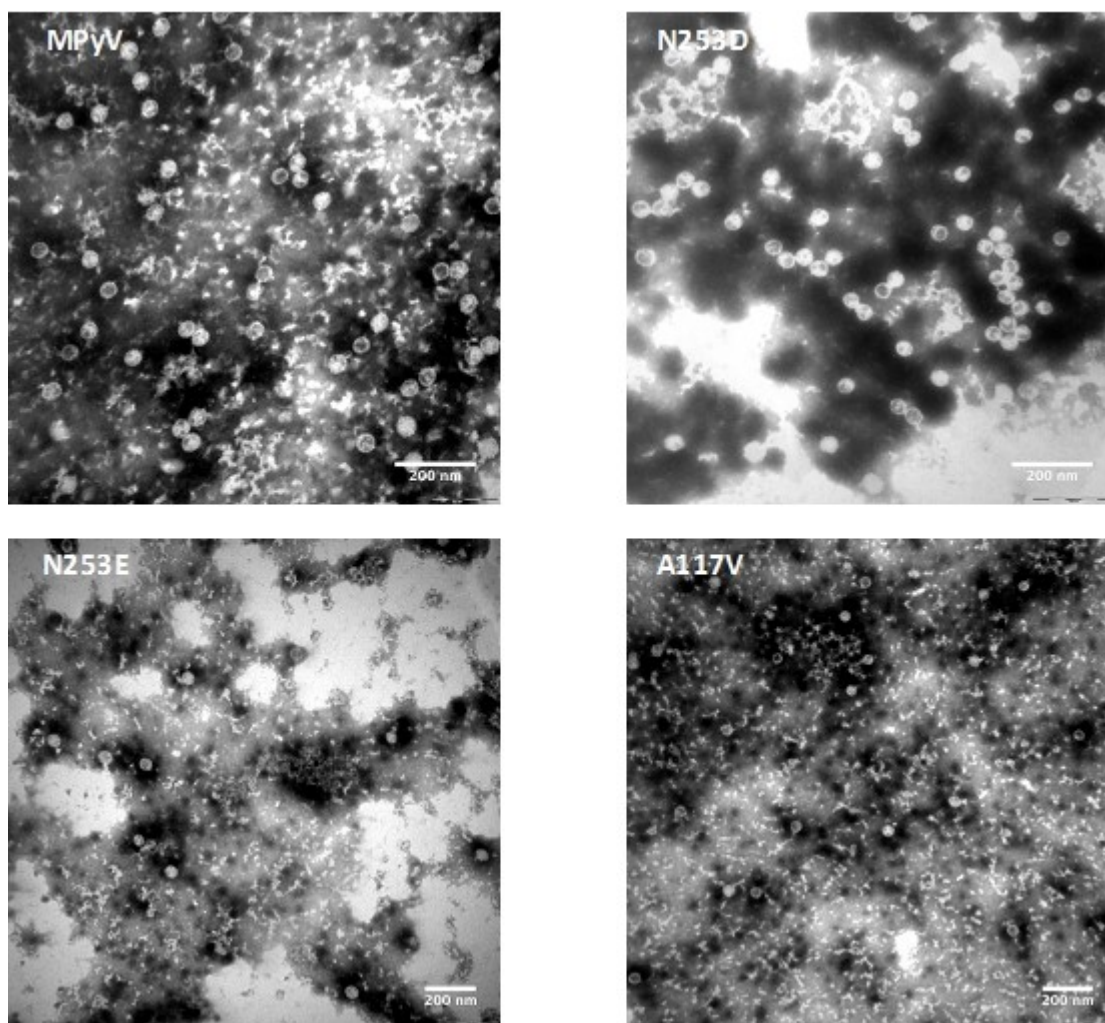
N253E	Frakce I									
č.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
n	1,375	1,3765	1,374	1,373	1,3715	1,370	1,3695	1,368	1,3675	1,367
	Frakce II									
č.	11	12	13	14	15	16	17	18		
n	1,3665	1,366	1,3655	1,3655	1,365	1,365	1,3645	1,364		
	Frakce III									
č.	19	20	21	22						
n	1,3635	1,363	1,362	1,361						

Tabulka 10 – Refraktometrické indexy (n) frakcí mutantního viru A117V rozdělených po centrifugaci viru v CsCl gradientu při druhé izolaci. Frakce byly následně spojeny na základě těchto indexů do 3 frakcí, které byly dále zpracovávány odděleně. Frakce I odpovídá převážně rozpadlým virovým kapsidám, frakce II jsou plné viriony, frakce III jsou prázdné kapsidy.

A117V	Frakce I									
č.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
n	1,3755	1,376	1,3745	1,373	1,3715	1,3705	1,369	1,368	1,367	1,367
	Frakce II						Frakce III			
č.	11	12	13	14	15	16	17	18		
n	1,366	1,3655	1,365	1,3645	1,364	1,364	1,3635	1,3635		
	Frakce III									
č.	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
n	1,3635	1,363	1,363	1,3625	1,3625	1,362	1,362	1,361	1,360	1,359

Tabulka 11 – Počty částic ve frakcích II a III virů izolovaných v druhé izolaci byly určeny pomocí hemaglutinačního testu.

Frakce	MPyV II	MPyV III	N253D II	N253D III
Počet částic/ml	$1,28 \times 10^{12}$	$1,28 \times 10^{12}$	$2,56 \times 10^{12}$	$1,28 \times 10^{12}$
Frakce	N253E II	N253E III	A117V II	A117V III
Počet částic/ml	$2,56 \times 10^{12}$	$6,4 \times 10^{11}$	$1,28 \times 10^{12}$	$6,4 \times 10^{11}$



Obrázek 18 – Snímky frakcí II izolovaných virů v druhé izolaci z transmisního elektronového mikroskopu. Všechny mutanty i divoký typ viru obsahují ve frakci II zejména plné viriony a rozpadlý materiál. Snímky pořídil Mgr. Martin Fraiberk.

Tabulka 12 – Počet virových genomových ekvivalentů ve virové suspenzi druhé izolace. Byla izolována DNA z virové suspenze a počet genomů byl určen pomocí qPCR.

	MPyV	N253D	N253E	A117V
Počet genomů/μl	9×10^8	2×10^9	$3,5 \times 10^8$	1×10^9

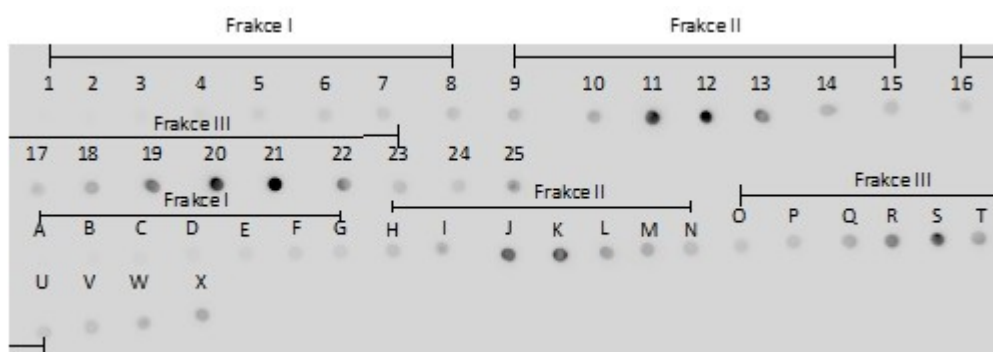
5.1.2.3 Třetí izolace

Na rozdíl od předchozích izolací nebyly pro účely třetí izolace buňky transfekovány virovými genomy, ale pomnožení viru probíhalo infekcí buněk 3T6. Byl použit 1 μl virové suspenze z druhé izolace MPyV a virových mutant N253D, N253E na infekci Petriho misky o průměru 10 cm. Celkem bylo každým virem infikováno 10 Petriho misek a buňky byly sklizeny po 7 dnech. Virová mutanta A117V v této izolaci nebyla izolována, neboť se ukázalo, že je neinfekční (viz kapitola 5.1.4). Jelikož byl virus tentokrát izolován z velkého množství buněk

a zároveň jsme chtěli docílit co nejčistší izolace, byla virová suspenze každého viru rozdělena na dva gradienty CsCl. U jednotlivých frakcí získaných rozdělení CsCl gradientů byl určen refraktometrický index (Tabulky 13–15) a také detekována přítomnost proteinu VP1 metodou dot blot (Obrázky 19–21). Frakce z obou gradientů byly spojeny ve stejných rozmezích refraktometrických indexů (frakce I, II a III), jelikož výsledky dot blotu byly konzistentní s předchozími izolacemi.

Tabulka 13 – Refraktometrické indexy (n) frakcí divokého typu MPyV rozdělených po centrifugaci viru v CsCl gradientu při třetí izolaci. Frakce byly následně spojeny na základě těchto indexů a přítomnosti VP1 (určeno metodou dot blot) do 3 frakcí, které byly dále zpracovávány odděleně. Frakce I odpovídá převážně rozpadlým virovým kapsidám, frakce II jsou plné viriony, frakce III jsou prázdné kapsidy.

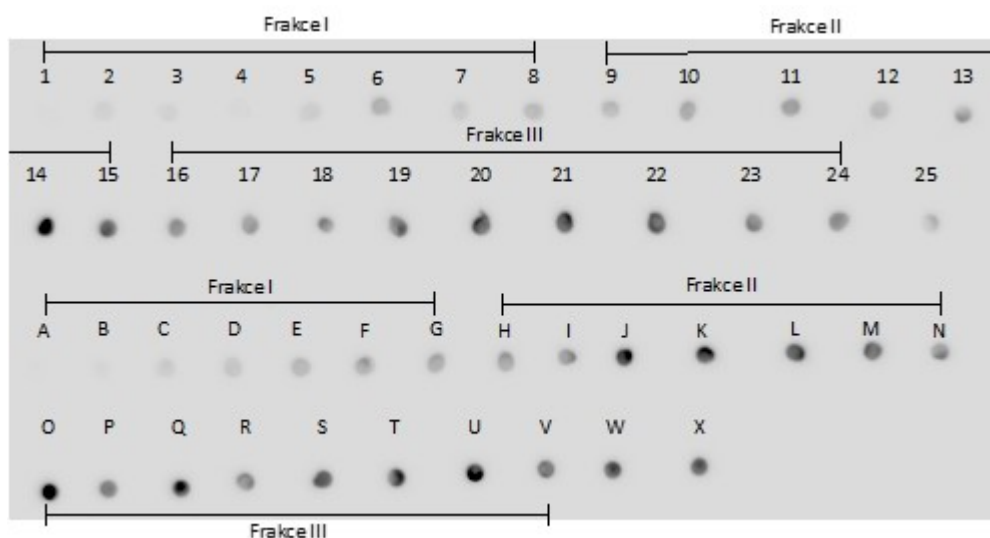
MPyV	Frakce I									
č.	1	2	3	4	5	6	7	8		
n	1,371	1,375	1,373	1,371	1,3695	1,3685	1,3675	1,367		
č.	A	B	C	D	E	F	G			
n	1,3755	1,375	1,3725	1,3705	1,3695	1,3685	1,3675			
	Frakce II									
č.	9	10	11	12	13	14	15			
n	1,3665	1,366	1,3655	1,3645	1,3645	1,364	1,364			
č.	H	I	J	K	L	M	N			
n	1,3665	1,366	1,3655	1,365	1,3645	1,364	1,364			
	Frakce III									
č.	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
n	1,3635	1,363	1,363	1,3625	1,362	1,3615	1,3605	1,360	1,359	1,358
	Frakce III									
č.	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X
n	1,3635	1,363	1,3625	1,362	1,3615	1,361	1,360	1,359	1,3585	1,3575



Obrázek 19 – Přítomnost hlavního kapsidového proteinu VP1 ve frakcích divokého typu MPyV rozdělených po centrifugaci viru v CsCl gradientu při třetí izolaci byla určena pomocí metody dot blot. Detekováno pomocí primární protilátky proti proteinu VP1 a sekundární protilátky konjugované s HRP.

Tabulka 14 – Refraktometrické indexy (n) frakcí mutantního viru N253D rozdělených po centrifugaci viru v CsCl gradientu při třetí izolaci. Frakce byly následně spojeny na základě těchto indexů a přítomnosti VP1 (určeno metodou dot blot) do 3 frakcí, které byly dále zpracovávány odděleně. Frakce I odpovídá převážně rozpadlým virovým kapsidám, frakce II jsou plné viriony, frakce III jsou prázdné kapsidy.

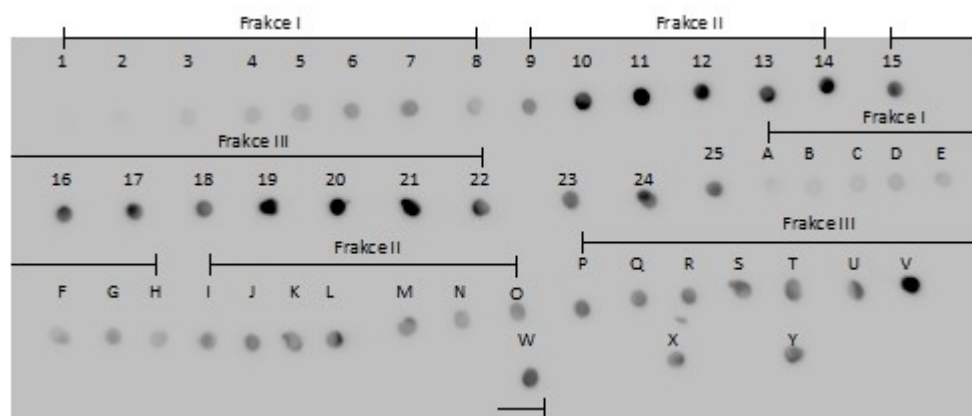
N253D	Frakce I									
č.	1	2	3	4	5	6	7	8		
n	1,3765	1,373	1,371	1,370	1,3685	1,368	1,3675	1,367		
č.	A	B	C	D	E	F	G			
n	1,374	1,375	1,372	1,370	1,369	1,368	1,367			
	Frakce II									
č.	9	10	11	12	13	14	15			
n	1,366	1,3655	1,365	1,3645	1,3645	1,364	1,364			
č.	H	I	J	K	L	M	N			
n	1,3665	1,366	1,3655	1,365	1,3645	1,364	1,364			
	Frakce III									
č.	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
n	1,3635	1,3635	1,363	1,3625	1,3625	1,362	1,3615	1,3605	1,360	1,358
	Frakce III									
č.	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X
n	1,3635	1,363	1,363	1,363	1,3625	1,3615	1,361	1,3605	1,3595	1,3585



Obrázek 20 – Přítomnost hlavního kapsidového proteinu VP1 ve frakcích mutantního viru N253D rozdělených po centrifugaci viru v CsCl gradientu při třetí izolaci byla určena pomocí metody dot blot. Detekováno pomocí primární protilátky proti proteinu VP1 a sekundární protilátky konjugované s HRP.

Tabulka 15 – Refraktometrické indexy (n) frakcí mutantního viru N253E rozdělených po centrifugaci viru v CsCl gradientu při třetí izolaci. Frakce byly následně spojeny na základě těchto indexů a přítomnosti VP1 (určeno metodou dot blot) do 3 frakcí, které byly dále zpracovávány odděleně. Frakce I odpovídá převážně rozpadlým virovým kapsidám, frakce II jsou plné viriony, frakce III jsou prázdné kapsidy.

N253E	Frakce I										
č.	1	2	3	4	5	6	7	8			
n	1,3645	1,3755	1,3735	1,3715	1,370	1,369	1,3675	1,367			
č.	A	B	C	D	E	F	G	H			
n	1,3695	1,375	1,372	1,371	1,3695	1,3685	1,368	1,367			
	Frakce II										
č.	9	10	11	12	13	14					
n	1,366	1,3655	1,365	1,365	1,3645	1,364					
č.	I	J	K	L	M	N	O				
n	1,3665	1,366	1,3655	1,365	1,365	1,3645	1,364				
	Frakce III								–		
č.	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
n	1,3635	1,3635	1,363	1,3625	1,362	1,3615	1,3615	1,3605	1,3595	1,3585	1,3575
	Frakce III								–		
č.	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	
n	1,3635	1,3635	1,363	1,3625	1,362	1,3615	1,361	1,3605	1,3595	1,3585	

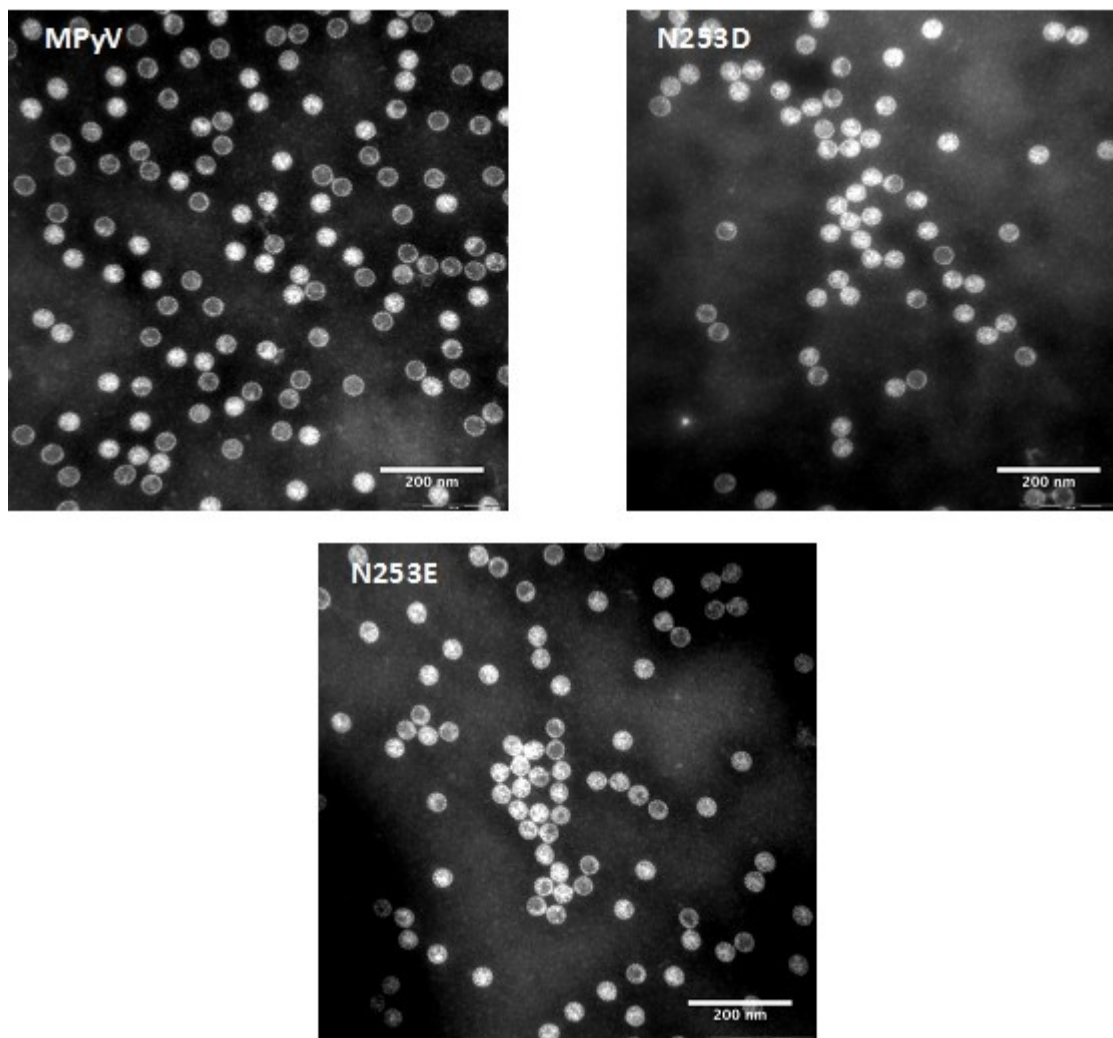


Obrázek 21 – Přítomnost hlavního kapsidového proteinu VP1 ve frakcích mutantního viru N253E rozdělených po centrifugaci viru v CsCl gradientu při třetí izolaci byla určena pomocí metody dot blot. Detekováno pomocí primární protilátky proti proteinu VP1 a sekundární protilátky konjugované s HRP.

Počet částic ve frakcích II byl určen pomocí hemaglutinačního testu (Tabulka 16) a byly pořízeny snímky frakcí II pomocí transmisního elektronového mikroskopu (Obrázek 22). Frakce II obsahovaly virové kapsidy a malý počet prázdných viru podobných částic. Počet virových genomů na μl byl určen pomocí qPCR (Tabulka 17).

Tabulka 16 – Počty částic ve frakcích II virů izolovaných ve třetí izolaci byly určeny pomocí hemaglutinačního testu.

Frakce	MPyV II	N253D II	N253E II
Počet částic/ml	$6,4 \times 10^{10}$	$5,12 \times 10^{11}$	$5,12 \times 10^{11}$



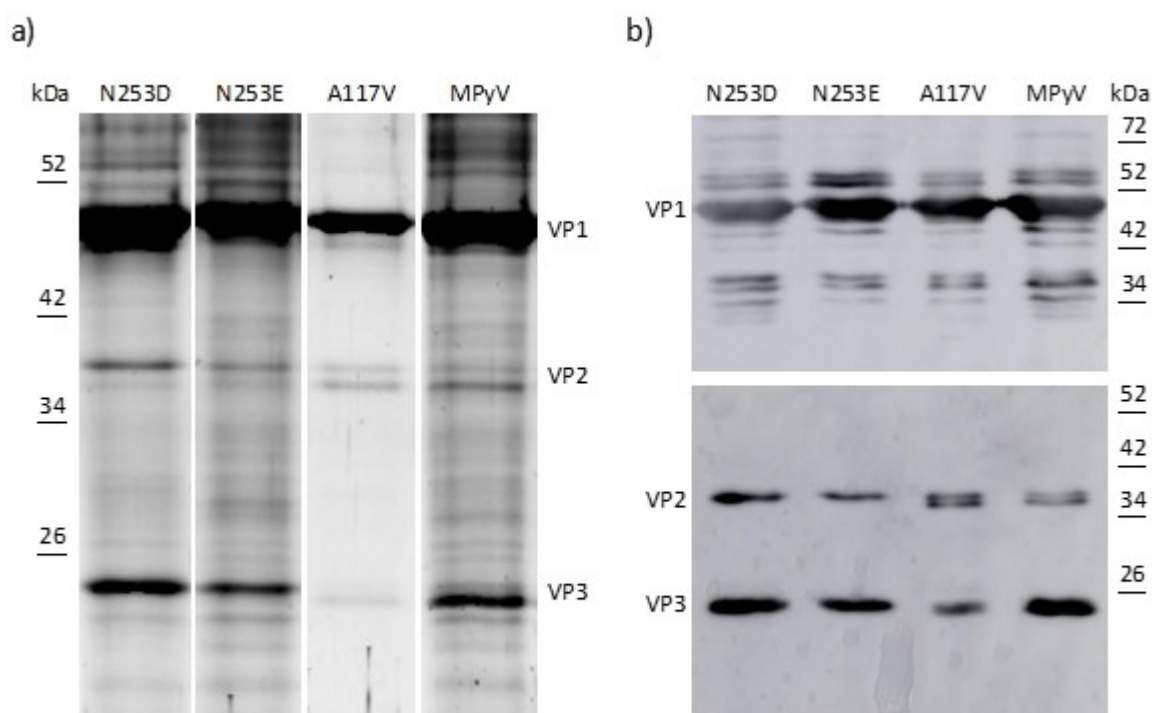
Obrázek 22 – Snímky frakcí II izolovaných virů ve třetí izolaci z transmisního elektronového mikroskopu. Všechny mutanty i divoký typ viru obsahují ve frakci II zejména plné viriony. Snímky pořídil Mgr. Martin Fraiberk.

Tabulka 17 – Počet virových genomových ekvivalentů ve virové suspenzi třetí izolace. Byla izolována DNA z virové suspenze a počet genomů byl určen pomocí qPCR.

	MPyV	N253D	N253E
Počet genomů/ μ l	$2,5 \times 10^9$	$2,5 \times 10^9$	2×10^9

5.1.3 Dvojité proužky na SDS-PAGE jsou důsledkem posttranslačně modifikovaných minoritních proteinů VP2 a VP3

Nejprve byly virové suspenze separovány na 10% rozdělovacím gelu a proteiny byly detekovány pomocí fluorescenční barvy SYPRO® Ruby Protein Gel Stain (Obrázek 23a). Dvojité proužky VP2 a VP3 jsou jasně viditelné u MPyV a při bližším pohledu jsou viditelné i u mutanty A117V. Proužek s vyšší mobilitou odpovídající posttranslačně nemodifikovaná izoformě je mnohem výraznější jak u VP2 tak u VP3. Pro N253D a N253E (mutanty simulují deamidovanou formu s nižší mobilitou) byl u VP3 viditelný pouze jeden proužek odpovídající mobilitě deamidované izoformy. U mutant N253D a N253E nebylo možné jasně určit, zda dvojité proužky viditelné v úrovni odpovídající dvojitým proužkům VP2 jsou skutečně dvě izoformy VP2 nebo se jedná o jiný fragment velmi podobné velikosti. Pozorovali jsme však výraznou převahu horního proužku odpovídajícímu deamidované izoformě.



Obrázek 23 – Horní proužek proteinů VP2 a VP3 s nižší elektroforetickou mobilitou odpovídá deamidované izoformě obou proteinů. a) Virové suspenze mutantních virů N253D, N253E, A117V a divokého typu MPyV byly separovány pomocí 10% SDS-PAGE, proteiny na gelu byly po separaci fluorescenčně obarveny. b) Virové suspenze byly separovány na 12% SDS-PAGE, přeneseny na membránu a proteiny byly detekovány pomocí specifických protilátek. Proužky s vyšší mobilitou po značení proteinu VP1 odpovídají jeho fragmentům, proužky s nižší mobilitou jsou posttranslačně modifikované formy a dimery proteinu VP1. Čísla udávají velikosti fragmentů markeru molekulových vah v kDa.

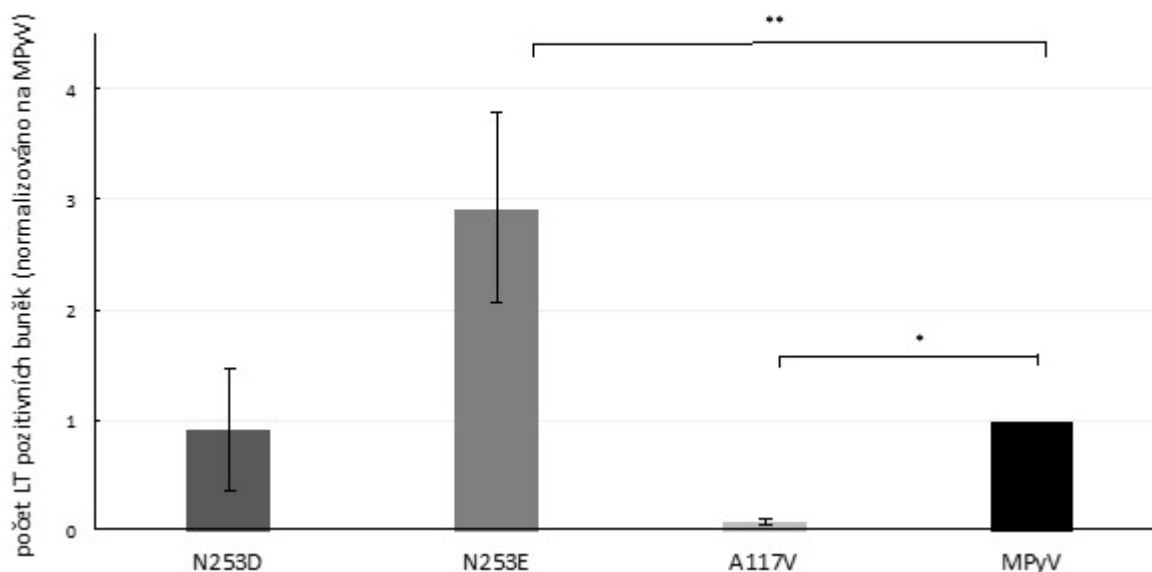
Jelikož absence dvojitého proužku u N253D a N253E nebyla potvrzena, byly virové suspenze dále rozděleny pomocí SDS-PAGE s 12% rozdělovacím gelem a následně byly proteiny přeneseny na membránu (Obrázek 23b). Pomocí specifických protilátek byly detekovány proteiny VP1 a společná část proteinů VP2 a VP3. U N253D a N253E jsme jasně pozorovali pouze jeden proužek pro VP2 odpovídající deamidované izoformě s nižší mobilitou. U A117V a MPyV byl tento proužek detekován, ale společně s proužkem o vyšší mobilitě odpovídající nemodifikované izoformě. U MPyV dokonce nižší proužek slabě převládal. U VP3 mutanty A117V a MPyV dvojité proužky pozorovány nebyly, nicméně lze spekulovat, že je tomu tak kvůli přílišné saturaci signálu. Lze také říci, že VP3 proužky u N253D a N253E se nacházejí v horní polovině signálu pro VP3 u MPyV a odpovídají tedy deamidované izoformě s nižší mobilitou. Signál na membráně značené protilátkou proti VP1 mezi 34 a 42 kDa také naznačuje, že druhý proužek s vyšší mobilitou u VP2 N253D a N253E na fluorescenčně barveném gelu zmíněný výše by mohl být ve skutečnosti fragment VP1. Při specifickém značení proteinu VP1 jsme také pozorovali proužky s vyšší mobilitou odpovídající posttranslačně modifikovaným formám a dimerům proteinu VP1 a proužky s nižší mobilitou, které odpovídají fragmentům proteinu VP1.

5.1.4 Mutantní viry N253D, N253E a A117V se liší v efektivitě infekce

Jelikož pilotní experimenty provedené Bílkovou, 2014 ukázali potenciálně zajímavé rozdíly mezi mutantními viry a divokým typem MPyV, rozhodli jsme se porovnat efektivitu infekce izolovaných virů a pokusit se tak osvětlit možnou roli deamidace na pozici 253 VP2 a acetylace na N konci VP3 v životním cyklu MPyV.

Buňky 3T6 byly infikovány definovaně naředěnou virovou suspenzí tak, že počet virových genomů (zjištěný pomocí qPCR pro každou izolaci) na počet buněk byl vždy stejný v jednom biologickém opakování pro všechny viry a mezi jednotlivými experimenty se pohyboval v rozpětí 2000–4000 genomů na buňku. Buňky byly fixovány 23 hpi a byla provedena detekce exprese LT antigenu pomocí nepřímé imunofluorescence. Průměrný počet LT pozitivních buněk byl normalizován na počet LT pozitivních buněk u MPyV. Následující graf shrnuje výsledky 5 biologických opakování experimentu zahrnujících všechny tři izolace virů (pouze dvě izolace v případě A117V) (Obrázek 24).

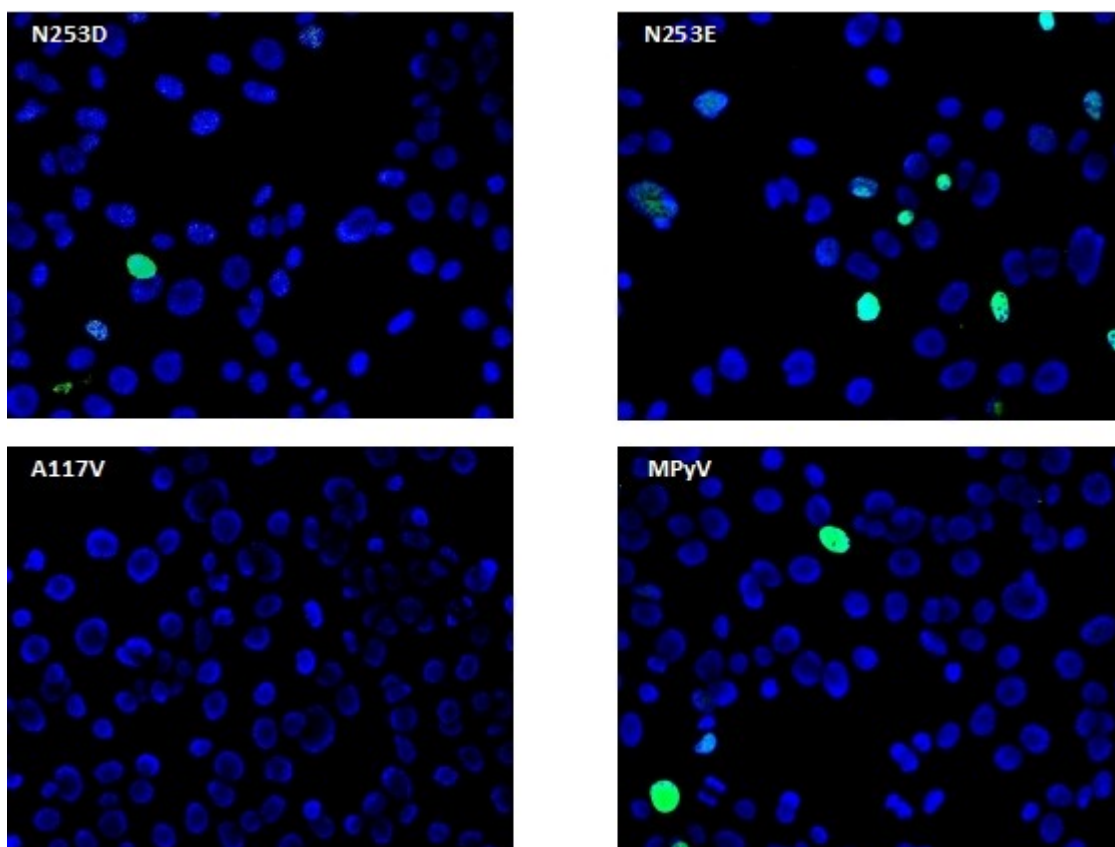
Infektivita mutantních virů



Obrázek 24 – Porovnání efektivity infekce mutantních virů N253D, N253E, A117V a divokého typu MPyV. Buňky 3T6 byly infikovány stejným počtem virových genomů na buňku (2000–4000 genomů na buňku v jednotlivých experimentech), fixovány 23 hpi a byl značen LT antigen pomocí specifické protilátky. Byl spočítán průměrný počet LT pozitivních buněk z deseti optických polí při stejném zvětšení pro všechny viry a výsledek byl normalizován na počet LT pozitivních buněk u MPyV. Graf ukazuje výsledky z 5 nezávislých experimentů, při kterých byly použity k infekci virové suspenze z tří (u A117V pouze z dvou) nezávislých izolací. Počet opakování pro viry N253D, N253E, A117V a MPyV je po řadě 6, 6, 2 a 6. Chybové úsečky udávají směrodatné odchylky. Statistická významnost byla určena pomocí jednovýběrového t-testu, stanovená hladina významnosti je $p=0,05$ (* $p\leq 0,05$, ** $p\leq 0,01$, *** $p\leq 0,001$, **** $p\leq 0,0001$).

Po infekci mutantním virem A117V nebyly pozorovány téměř žádné LT pozitivní buňky a je tedy možné předpokládat, že je naprosto neinfekční. Z tohoto důvodu také nebyl izolován ve třetí izolaci virů (kapitola 5.1.2.3) a další experimenty nebyly prováděny. Virové mutanty N253D a N253E simulující deamidovanou izoformu VP2 a VP3 ukazují rozdílné výsledky. Zatímco infekce mutantním virem N253D vedla v průměru ke stejnému počtu LT pozitivních buněk jako divoký typ MPyV a lze tedy předpokládat, že je zhruba stejně infekční, infekce N253E vedla překvapivě k 2–4× vyššímu počtu LT pozitivních buněk než MPyV.

Na Obrázku 17 jsou ilustrační kompozitní fotografie z fluorescenčního mikroskopu buněk 3T6 infikovaných mutantními viry N253D, N253E, A117V a divokým typem MPyV stejným způsobem jako experimenty v grafu na Obrázku 25. Trendy viditelné v tomto grafu jsou pozorovatelné i na těchto fotografiích.



Obrázek 25 – Reprezentativní fotografie buněk 3T6 infikovaných mutantními viry N253D, N253E, A117V a divokým typem MPyV. Buňky byly infikovány virovou suspenzí, fixovány 23 hpi, LT antigen byl označen specifickou protilátkou (zeleně) a DNA byla označena DAPI (modře).

5.1.5 Porovnání mutovaných pozic s dalšími polyomaviry

Jelikož jsme pozorovali rozdíly v efektivitě infekce mutantních virů v porovnání s divokým typem MPyV, zajímalo nás, do jaké míry jsou mutované pozice konzervované, popřípadě jaké další aminokyseliny se na těchto pozicích vyskytují u minoritních kapsidových proteinů příbuzných virů.

Pomocí software Standard Protein Blast (“BLAST: Basic Local Alignment Search Tool,” n.d.) bylo vyhledáno 250 nejpodobnějších proteinů k proteinu VP2 MPyV kmenu BG z databáze neredundantních proteinových sekvencí (Altschul et al., 1997, 2005). Mezi nalezenými proteiny byly minoritní kapsidové proteiny VP2 a VP3 dalších kmenů MPyV a také ostatních velmi dlouho zkoumaných podobných polyomavirů jako JCPyV, BKPyV a SV40 a také řada dalších savčích a jiných polyomavirů.

Porovnání těchto sekvencí ukázalo, že v pozici odpovídající 117 VP2, což je pro většinu porovnávaných polyomavirů místo začátku překryvu s proteinem VP3, je alanin téměř výlučně konzervován (Obrázek 26). Pouze u pár polyomavirů, které nemají VP3 nebo jejich VP3 začíná

na jiné pozici VP2, alanin na této pozici nemá. Je ale nutno podotknout, že pokud VP3 začíná na jiné pozici, za počátečním methioninem se vždy nachází alanin.

MPyV	VNR-----NMALI PWRDPALI
HaPyV	VNR-----NMALI PRRPADYY
JCPyV	STVGLFQQPAMALQLFNPEDYY
BKPyV	STVGLYQQSGMALELFPDEYY
SV40	STVGLYQQPGMAVDLYRPDDYY
APyV	GNN-----MALQVWR--DQM
	. **;

Obrázek 26 – Alanin na pozicích odpovídajících pozici 117 proteinu VP2 MPyV je u polyomavirů konzervován. Ukázka srovnaných sekvencí MPyV, křeččího polyomaviru (HaPyV), JCPyV, BKPyV, SV40 a ptačího polyomaviru (APyV).

Aminokyseliny na pozicích odpovídajících pozici 253 VP2 MPyV byly obecně mnohem méně konzervované. U všech kmenů MPyV se sice na této pozici vyskytuje výlučně asparagin, to však neplatí pro ostatní polyomaviry. U polyomavirů obecně se na této pozici objevuje řada aminokyselin, nejčastěji serin a glutamin zejména u JCPyV a SV40, následuje zmíněný asparagin pro MPyV a další. Aspartát a glutamát, které jsou na této pozici u mutant studovaných v této práci, se také poměrně často vyskytují zejména u různých lidských a dalších savčích polyomavirů. U dalších polyomavirů jsou na této pozici také histidin, tyrosin, threonin a arginin. Zdá se tedy, že na této pozici u příbuzných virů nepřevládá jedna aminokyselina, spíše je patrná slabá preference pro hydrofilní aminokyseliny.

5.2 Vliv acetylce mikrotubulů na průběh infekce MPyV

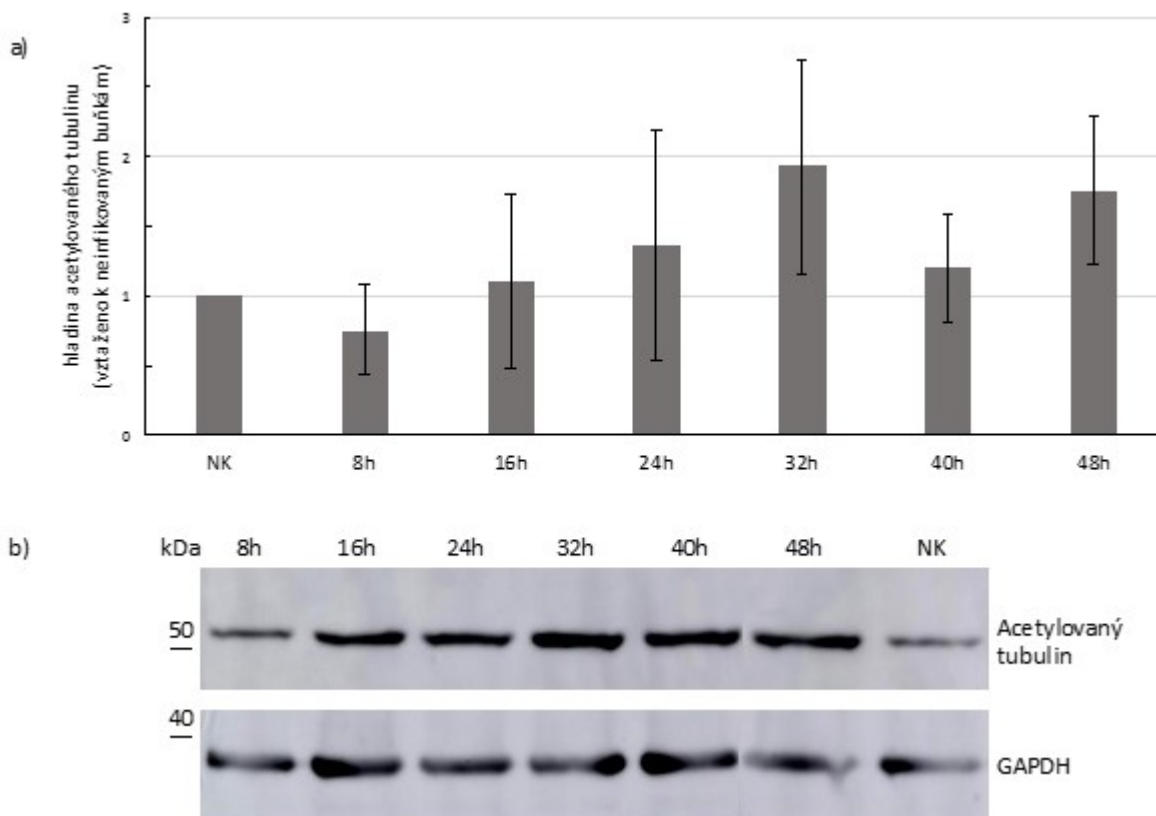
5.2.1 Infekce buněk 3T6 MPyV vede k nárůstu acetylce mikrotubulů

Nejprve bylo potřeba ověřit, že po infekci MPyV dochází v buňkách 3T6 při námi zvoleném experimentálním postupu ke zvýšení acetylce mikrotubulů. Schéma experimentu je zobrazeno na Obrázku 27. Den před experimentem byly vysety buňky 3T6 a další den byly infikovány MPyV s multiplíciitou infekce (MOI) 5 pfu na buňku. Buňky vždy z jedné misky byly sklizeny v 8 hodinových intervalech, byly lyzovány v RIPA pufru, lyzát byl separován pomocí 10% SDS-PAGE a proteiny byly přeneseny na membránu. Acetylovaný α -tubulin a GAPDH byly detekovány pomocí specifických protilátek (Obrázek 28b). GAPDH byl vybrán jako referenční protein pro normalizaci nanášky pro jednotlivé vzorky. Jako referenční hodnota bylo použito množství acetylovaného tubulinu v neinfikovaných buňkách.



Obrázek 27 – Schéma experimentu pro ověření růstu acetylce mikrotubulů po infekci buněk 3T6 pomocí MPyV. Buňky 3T6 byly infikovány MPyV s MOI=5 pfu na buňku, byly sklizeny v 8 hodinových intervalech a lyzovány. Následně byla provedena SDS-PAGE a western blot.

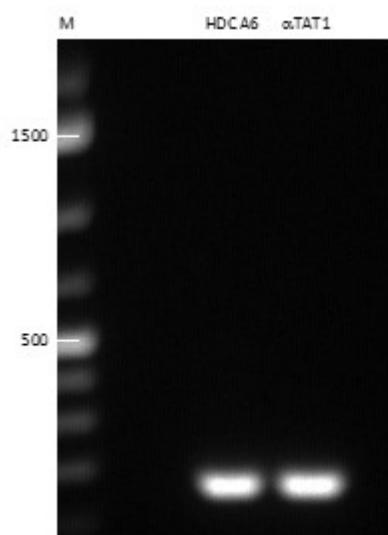
Byly provedeny čtyři nezávislé experimenty. Obrázek 28a zobrazuje graf průměrných hodnot hladiny acetylovaného α -tubulinu normalizované na GAPDH a vztažených k množství acetylovaného tubulinu v neinfikovaných buňkách (NK). Acetylce mikrotubulů po infekci MPyV rostla, pouze ve 40 hpi můžeme pozorovat mírný pokles, který je ale opět následován nárůstem ve 48 hpi. Tato data ukazují, že po infekci buněk 3T6 MPyV acetylce mikrotubulů roste.



Obrázek 28 – Po infekci buněk 3T6 MPyV roste acetylce α -tubulinu. Buňky 3T6 byly infikovány MPyV s MOI=5 pfu na buňku, byly sklizeny v 8 hodinových intervalech a lyzovány. Lyzáty byly separovány pomocí 10% SDS-PAGE, proteiny byly přeneseny na membránu a acetylovaný α -tubulin a GAPDH byly detekovány pomocí specifických protilátek (b). Graf ukazuje hladinu acetylovaného α -tubulinu normalizovanou na expresi GAPDH v jednotlivých vzorcích a vztaženou na neinfikované buňky (a). Data byla získána ze 4 nezávislých opakování, chybové úsečky ukazují směrodatnou odchylku. Statistická významnost byla ověřena pomocí párového t-testu, hladina významnosti byla stanovena na $p=0,05$ (* $p\leq 0,05$, ** $p\leq 0,01$, *** $p\leq 0,001$, **** $p\leq 0,0001$).

5.2.2 Exprese mRNA HDAC6 a α TAT1 se nemění v průběhu infekce MPyV

Poté, co bylo ověřeno, že po infekci buněk 3T6 MPyV roste acetylace mikrotubulů, jsme přikročili k analýze exprese mRNA HDAC6 a α TAT1 pomocí qPCR. Z buněk 3T6 byla izolována RNA a syntetizována cDNA pomocí reverzní transkripce. Nejprve jsme ověřili specifitu primerů. Navržené primery pro HDAC6 a α TAT1 a primery pro referenční gen GAPDH (kapitola 4.5) byly testovány dle protokolu (kapitola 4.14.9) za teploty nasedání 58 °C. Tvorba specifického produktu byla ověřena pomocí analýzy křivky tání produktu provedené v originálním software k přístroji LightCycler® 480 Instrument II, na kterém byly prováděny experimenty. Produkt byl také ověřen separací v agarózovém gelu (Obrázek 29). Pozorovali jsme pouze očekávané fragmenty o velikosti 170 bp, námi testované primery jsou tedy specifické.



Obrázek 29 – Navržené primery pro HDAC6 a α TAT1 vedou za použitých podmínek k amplifikaci jednoho specifického fragmentu (170 bp). Produkty amplifikace pomocí qPCR byly rozděleny na 1% agarózové elektroforéze. M – marker (velikosti v bp).

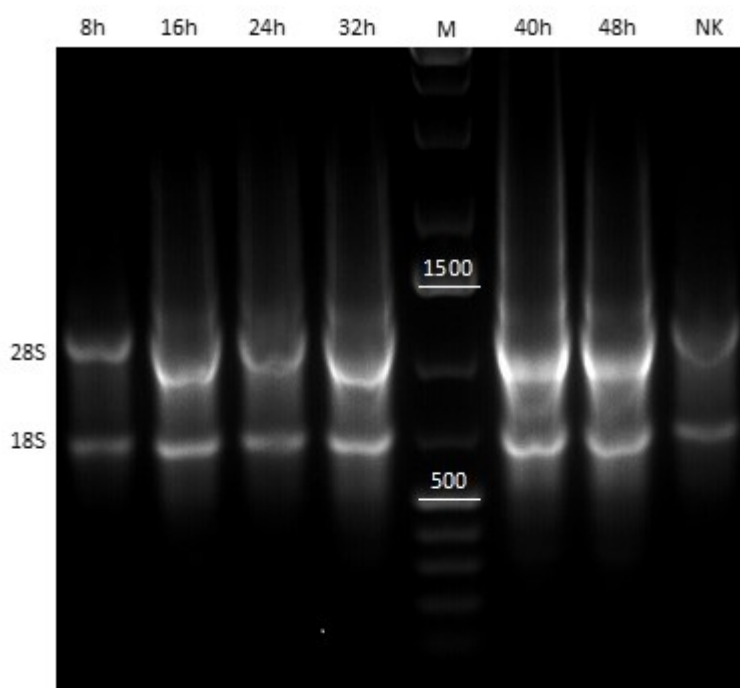
Dále byla testována efektivita amplifikace jednotlivých mRNA za daných podmínek pomocí změření signálu u sériově 10 \times naředěné cDNA. Efektivita amplifikace pro HDAC6, α TAT1 a GAPDH byla po řadě 105,8%, 96,6% a 96,8%. Jelikož se efektivita pro jednotlivé geny nelišila o více než 10 %, byly rozdíly v efektivitě amplifikace pro další analýzy zanedbány.

Schéma experimentu pro pozorování změn exprese mRNA HDAC6 a α TAT1 bylo stejné jako pro předchozí pokus a je znázorněno na Obrázku 30. Buňky 3T6 byly vysety, další den byly infikovány MPyV s MOI=5 pfu na buňku a sklizeny v 8 hodinových intervalech. Negativní kontrolou byly neinfikované buňky. Byla izolována RNA a její integrita byla ověřena na 0,8% agarózové elektroforéze (Obrázek 31). Jelikož jsme pozorovali dva silné proužky

odpovídající 28S a 18S RNA a mezi nimi je patrná rozmazaná stopa odpovídající celkové mRNA, izolovaná RNA nebyla degradovaná a mohla být použita pro další experimenty. Poté byla syntetizována cDNA a byla provedena qPCR.

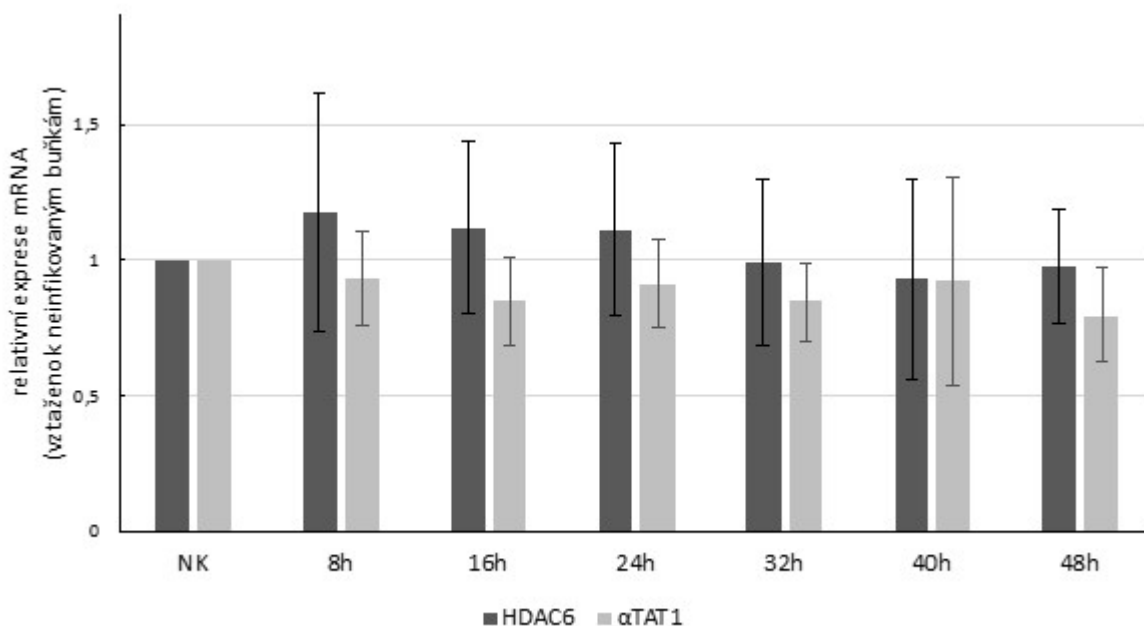


Obrázek 30 – Schéma experimentu pro ověření změn v expresi mRNA HDAC6 a α TAT1 po infekci buněk 3T6 pomocí MPyV. Buňky 3T6 byly infikovány MPyV s MOI=5 pfu na buňku a byly sklizeny v 8 hodinových intervalech. Ze sklizených buněk byla izolována RNA, syntetizována cDNA a byla provedena qPCR.



Obrázek 31 – Kvalita izolované RNA. Izolovaná RNA byla separována pomocí 0,8% agarózové elektroforézy (vzorový gel pro jednu sadu vzorků). Jelikož jsou viditelné dva silné proužky (intenzita horního proužku je zhruba dvakrát vyšší než spodního) odpovídající 28S a 18S RNA a mezi nimi je patrná rozmazaná stopa odpovídající celkové mRNA, izolovaná RNA není degradována a mohla být použita pro další experimenty. M – marker (velikosti v bp).

Expresí mRNA pro HDAC6 a α TAT1 změřená pomocí qPCR byla normalizovaná na expresi referenčního genu GAPDH a vztažená k expresi v neinfikovaných buňkách. Pozorovali jsme velmi malé rozdíly v expresi mRNA, nepřesahující 1,5násobek kontroly. Tato data ukazují, že v průběhu infekce buněk 3T6 MPyV se exprese mRNA HDAC6 a α TAT1 příliš nemění (Obrázek 32).



Obrázek 32 – Expres mRNA HDAC6 a α TAT1 se během infekce buněk 3T6 MPyV nemění. Buňky 3T6 byly infikovány MPyV s MOI=5 pfu na buňku a byly sklizeny v 8 hodinových intervalech. Byla izolována RNA, syntetizována cDNA a byla provedena qPCR, kdy byla měřena expres mRNA pomocí specifických primerů pro HDAC6, α TAT1 a GAPDH. Graf ukazuje expresi mRNA HDAC6 a α TAT1 normalizovanou na expresi GAPDH a vztaženou k neinfikovaným buňkám. Data byla získána ze čtyř nezávislých opakování, chybové úsečky ukazují směrodatnou odchylku. Statistická významnost byla ověřena pomocí párového t-testu, hladina významnosti byla stanovena na $p=0,05$ (* $p\leq 0,05$, ** $p\leq 0,01$, *** $p\leq 0,001$, **** $p\leq 0,0001$).

5.2.3 Inhibice HDAC6 zvyšuje efektivitu infekce MPyV

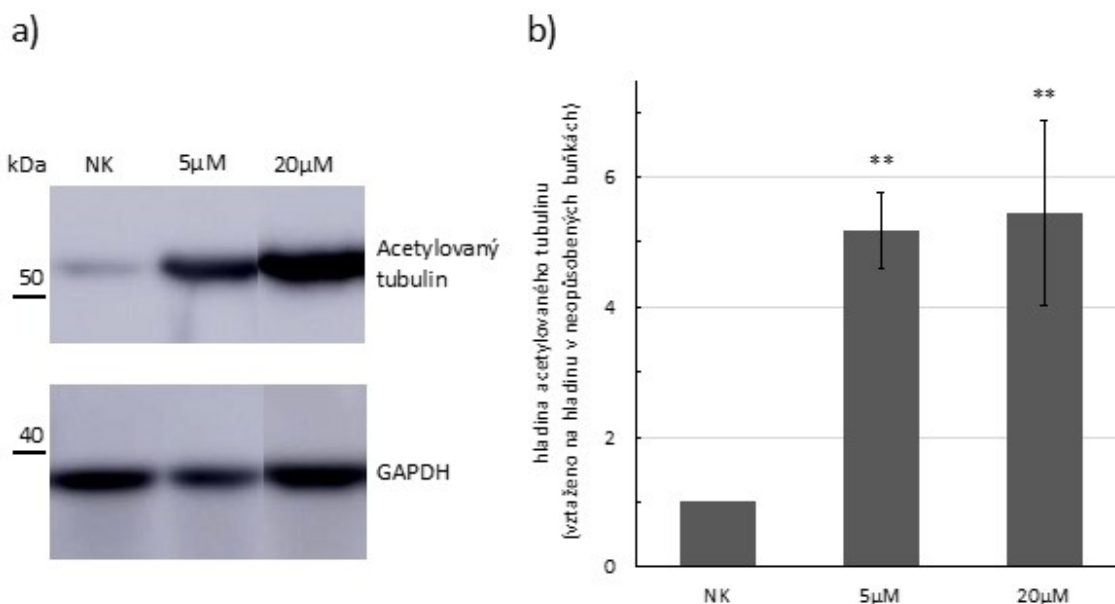
Jelikož jsme pozorovali zvýšení acetylace mikrotubulů rozhodli jsme se otestovat, zda je toto zvýšení důležité pro infekci MPyV. Využili jsme proto specifického inhibitoru HDAC6 tubacinu, který specificky inhibuje tubulin deacetylační aktivitu tohoto enzymu (Haggarty et al., 2003).

Nejprve bylo potřeba otestovat toxicitu tubacinu a proliferaci buněk po působení tohoto inhibitoru. Pro test toxicity byly vysety buňky 3T6 den před experimentem a druhý den byl přidán tubacin ve dvou testovaných koncentracích 5 μ M a 20 μ M. Po 24 hodinách byl změřen počet mrtvých buněk a tato hodnota byla porovnána s negativní kontrolou. Pro test proliferace byly buňky 3T6 inkubovány 24 hodin s inhibitorem v koncentracích 5 μ M a 20 μ M a byla změřena proliferace buněk pomocí Cell Proliferation Reagent WST-1. Jako negativní kontrola byly použity buňky 3T6 bez přidání inhibitoru. Výsledky testu cytotoxicity inhibitoru tubacinu a proliferace pro jednotlivé koncentrace jsou shrnuty v Tabulce 18. Tubacin není v naší testovaných koncentracích toxický a proliferace buněk 3T6 není výrazně ovlivněna.

Tabulka 18 – Výsledky testu toxicity tubacinu a vlivu na proliferaci buněk 3T6. Byly testovány dvě koncentrace inhibitoru 5 μ M a 20 μ M. Hodnoty byly vztaženy na negativní kontrolu (buněk 3T6 bez přidání inhibitoru). Měření byla provedena v duplikátech pro tři nezávislá opakování. V tabulce jsou uvedeny průměry se směrodatnými odchylkami. Statistická významnost byla ověřena pomocí párového t-testu, hladina významnosti byla stanovena na $p=0,05$ (* $p\leq 0,05$, ** $p\leq 0,01$, *** $p\leq 0,001$, **** $p\leq 0,0001$).

Koncentrace tubacinu	Relativní počet buněk po testu cytotoxicity (vztaženo ke kontrole)	Relativní množství proliferujících buněk (vztaženo ke kontrole)
– (NK)	1	1
5 μ M	1,18 \pm 0,17	0,89 \pm 0,02 *
20 μ M	1,01 \pm 0,02	0,78 \pm 0,02 ****

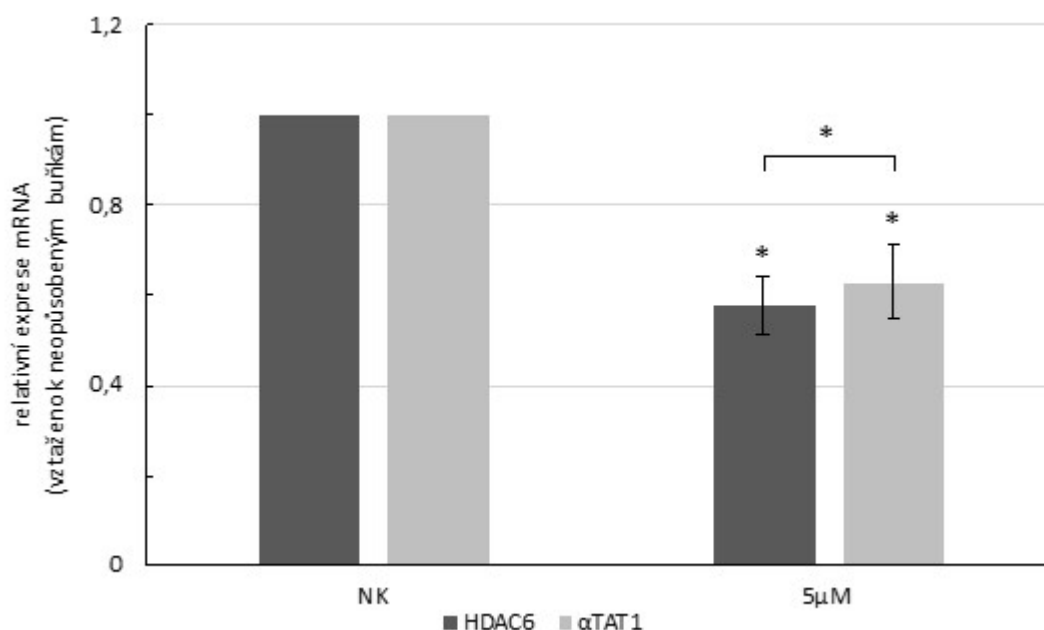
Dále jsme testovali, v jaké míře se inhibice projevuje na námi pozorovaném efektu – acetylaci α -tubulinu. Buněk byly inkubovány 24 hodin v přítomnosti tubacinu v koncentraci 5 μ M a 20 μ M a byly lyzovány pomocí RIPA pufru. Proteiny byly separovány pomocí SDS-PAGE a byly přeneseny na membránu, kde byly detekovány pomocí specifických protilátek (Obrázek 33a). Jako negativní kontrola byly použity buněk 3T6 bez přidání inhibitoru. Výsledky ze tří nezávislých experimentů byly normalizovány na GAPDH a vztaženy na negativní kontrolu (Obrázek 33b).



Obrázek 33 – Hladina acetylovaného α -tubulinu roste po přidání specifického inhibitoru HDAC6 tubacinu. K buňkám 3T6 byl přidán tubacin (5 μ M nebo 20 μ M). Buněk byly inkubovány 24 hodin, byly lyzovány pomocí RIPA pufru a proteiny byly rozděleny pomocí SDS-PAGE a přeneseny na membránu. Acetylovaný α -tubulin a GAPDH byly detekovány pomocí specifických protilátek (a), hladina acetylovaného α -tubulinu byla normalizována na hladinu GAPDH a vztažena k buňkám bez přidání inhibitoru (b). Data byla získána ze tří nezávislých opakování, chybové úsečky ukazují směrodatnou odchylku. Statistická významnost byla ověřena pomocí dvouvýběrového t-testu, hladina významnosti byla stanovena na $p=0,05$ (* $p\leq 0,05$, ** $p\leq 0,01$, *** $p\leq 0,001$, **** $p\leq 0,0001$).

Inkubace buněk 3T6 s tubacinem vedla v obou testovaných koncentracích inhibitoru ke zhruba pětinasobnému nárůstu acetylce α -tubulinu. Jelikož změna acetylce při 5 μ M koncentraci tubacinu se výrazně neliší od změny při použití 20 μ M koncentrace, a i s ohledem na výsledky testu toxicity a proliferace, jsme se rozhodli v dalších experimentech pracovat s 5 μ M koncentrací tubacinu.

Dále nás zajímalo, jestli u buněk opůsobených tubacinem v koncentraci 5 μ M stejně jako v předchozím experimentu nedochází ke změně exprese mRNA pro HDAC6. Následující graf zobrazuje výsledky tří nezávislých experimentů (Obrázek 34).

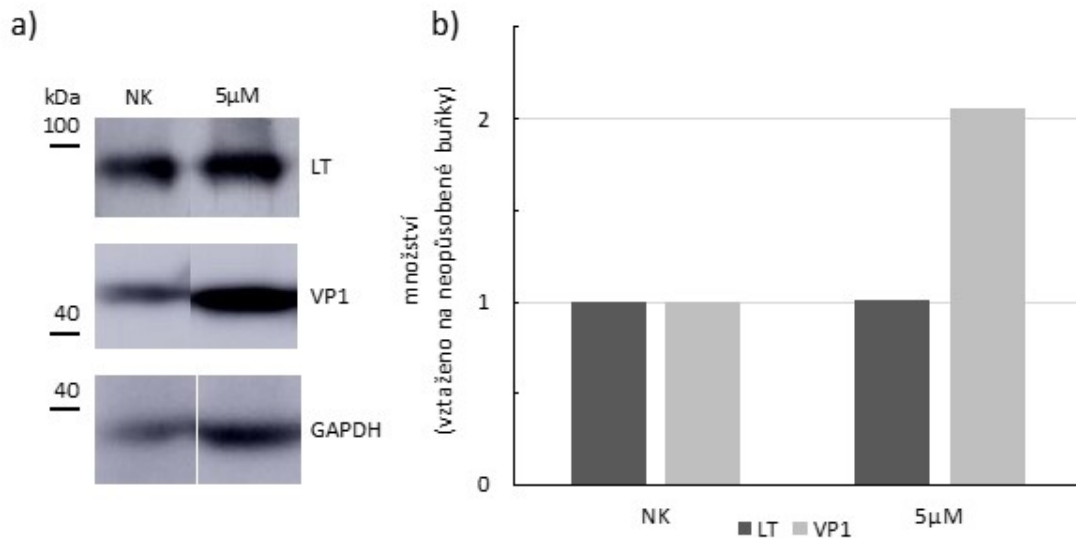


Obrázek 34 – Inhibice HDAC6 pomocí tubacinu vede ke změně exprese mRNA HDAC6 a α TAT1. K buňkám 3T6 byl přidán tubacin (5 μ M nebo 20 μ M). Buňky byly inkubovány 24 hodin, byla izolována RNA a syntetizována cDNA. Byla provedena qPCR, kdy byla měřena exprese mRNA pomocí specifických primerů pro HDAC6, α TAT1 a GAPDH. Graf ukazuje expresi mRNA HDAC6 a α TAT1 normalizovanou na expresi GAPDH a vztahenou na expresi v neopůsobených buňkách. Data byla získána ze tří nezávislých opakování, chybové úsečky ukazují směrodatnou odchylku. Statistická významnost byla ověřena pomocí dvouvýběrového a párového t-testu, hladina významnosti byla stanovena na $p=0,05$ (* $p\leq 0,05$, ** $p\leq 0,01$, *** $p\leq 0,001$, **** $p\leq 0,0001$).

Výsledky ukazují, že působení specifického inhibitoru HDAC6 na buňky 3T6 vede ke změně exprese mRNA HDAC6 a α TAT1. Expresе obou genů klesá zhruba na polovinu exprese v buňkách bez přidání inhibitoru. Jelikož klesla exprese mRNA obou enzymů ve stejné míře, předpokládali jsme, že by tato změna neměla mít vliv na celkovou hladinu acetylovaného α -tubulinu.

Dále nás zajímalo, zda by mohla být infekce buněk 3T6 MPyV ovlivněna působením inhibitoru HDAC6 a potažmo změnou hladiny acetylovaného α -tubulinu. Proto byly buňky 3T6

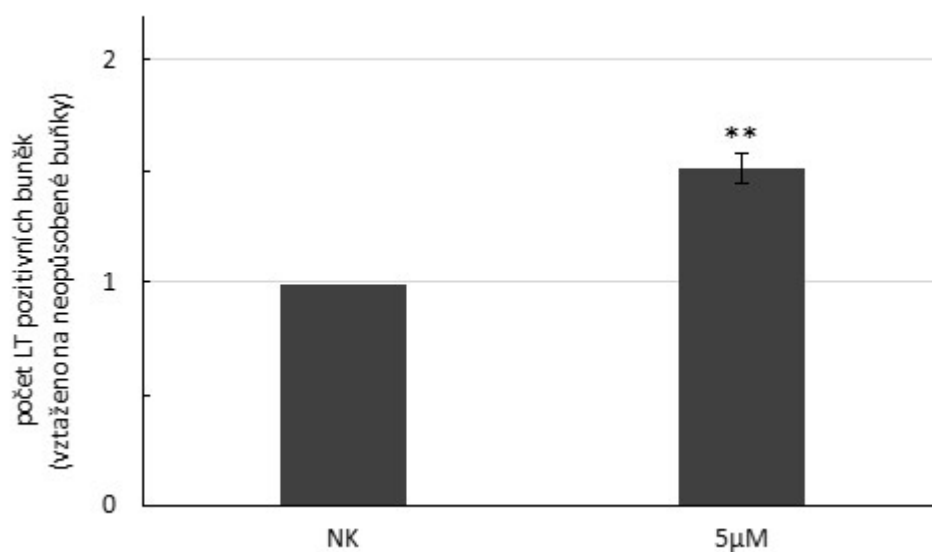
infikovány MPyV s MOI=5 pfu na buňku, po dalších 24 hodinách byl přidán inhibitor tubacin v 5 μ M koncentraci a po následujících 16 hodinách (40 hpi) byly buňky lyzovány pomocí RIPA pufru. Proteiny byly separovány pomocí SDS-PAGE, byly přeneseny na membránu a detekovány pomocí specifických protilátek (Obrázek 35a). V následujícím grafu jsou výsledky jednoho pilotního experimentu, kde byla hladina LT antigenu a proteinu VP1 normalizována na hladinu GAPDH a vztažena na hladinu těchto proteinů v infikovaných buňkách bez přidání inhibitoru (Obrázek 35b).



Obrázek 35 – Inhibice HDAC6 v pozdní fázi infekce zvyšuje expresi proteinu VP1. Buňky byly infikovány s MOI=5 a 24 hpi byl přidán tubacin (5 μ M). Buňky byly sklizeny 40 hpi (16 hodin po přidání inhibitoru), byly lyzovány pomocí RIPA pufru a proteiny byly rozděleny pomocí SDS-PAGE a přeneseny na membránu. Pomocí specifických protilátek byly detekovány LT antigen a proteiny VP1 a GAPDH (a). Výsledky exprese proteinu VP1 a LT antigenu byly normalizovány na GAPDH a vztaženy na hladinu těchto proteinů v infikovaných buňkách neopůsobených inhibitorem (b). Výsledky představují data z jednoho pilotního experimentu.

Data z tohoto experimentu naznačují, že přidání tubacinu má pozitivní vliv na expresi virových proteinů. Zatímco exprese LT se nelišila od neošetřených buněk, exprese hlavního kapsidového proteinu VP1 se zvýšila dvakrát.

Dále nás zajímalo, jestli inhibice HDAC6 a tím zvýšená acetylace mikrotubulů, bude mít vliv na efektivitu infekce. Buňky byly infikovány za přítomnosti inhibitoru (5 μ M) a 24 hpi byl detekován LT antigen nepřímou imunofluorescencí. Byl spočítán průměrný počet LT pozitivních buněk z deseti optických polí při stejném zvětšení a výsledek byl vztažen na kontrolu na počet pozitivních buněk v infikovaných buňkách neopůsobených inhibitorem (Obrázek 36). Výsledky tří nezávislých opakování ukázaly, že infekce buněk MPyV vedla v přítomnosti tubacinu ke zhruba jeden a půl krát vyššímu počtu LT pozitivních buněk, lze se tedy domnívat, že efektivita infekce je vyšší.



Obrázek 36 – Působení tubacinu, specifického inhibitoru HDAC6, vede ke změně efektivity infekce MPyV. Buňky 3T6 byly infikovány MPyV s MOI=5 pfu na buňku, následně byl 1 hpi přidán inhibitor tubacin (5µM) a buňky byly fixovány 24 hpi. Byla provedena nepřímá imunofluorescence, kdy byl specifickými protilátkami detekován LT antigen. Průměrný počet LT pozitivních buněk z deseti optických polí při stejném zvětšení byl vztažen na počet LT pozitivních buněk u infikovaných buněk neopůsobených inhibitorem. Graf ukazuje výsledky ze tří nezávislých experimentů, chybové úsečky ukazují směrodatnou odchylku. Statistická významnost byla ověřena pomocí dvouvýběrového t-testu, hladina významnosti byla stanovena na $p=0,05$ (* $p\leq 0,05$, ** $p\leq 0,01$, *** $p\leq 0,001$, **** $p\leq 0,0001$).

6 Diskuze

6.1 Studium úlohy posttranslačních modifikací minoritních proteinů VP2 a VP3 v životním cyklu viru

Již Gibson v roce 1974 popsal několik izoform minoritních kapsidových proteinů pozorovaných při elektroforetické separaci virových kapsid. Následně bylo pozorováno, že při delší inkubaci infikovaných buněk je více patrná „vrchní“ izoforma s nižší mobilitou u obou minoritních proteinů, a bylo navrženo, že by to mohlo být způsobeno jiným rozložením posttranslačních modifikací v obou izoformách (Friedmann, 1976). Předchozí studie provedená v naší laboratoři ukázala, že po infekci myších fibroblastů MPyV je v lyzátu infikovaných buněk v čase 36 hpi detekována pouze „nižší“ izoforma s vyšší mobilitou, nicméně v čase 48 hpi se začíná objevovat druhý vrchní proužek. Dále bylo v této práci potvrzeno, že izoformy nejsou výsledkem proteolytického štěpení, neboť byly u obou minoritních proteinů detekovány intaktní C-konce (Vít, 2010).

Následující práce si kladla dále za cíl odhalit posttranslační modifikace minoritních proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie. Ukázalo se, že N-koncový methionin proteinu VP3 je odštěpen a následující alanin je (A117 proteinu VP2) acetylován (Vít, 2010) a že izoformy minoritních proteinů se liší zastoupením posttranslační modifikace deamidace asparaginu na pozici 253 proteinu VP2 (N137 proteinu VP3) (Bílková, 2014).

Za účelem potvrzení tohoto pozorování a také zkoumání možné role deamidace ve virové infekci byly vytvořeny substituční mutanty na této pozici, kdy byl asparagin nahrazen za kyselinu asparagovou a jí svými vlastnostmi podobnou kyselinu glutamovou, které simulují deamidovanou izoformu proteinů VP2 a VP3 (Bílková, 2014). Pro studium významu nalezené N-koncové acetylce proteinu VP3 byla rovněž vytvořena substituční mutanta, kdy byl alanin nahrazen valinem. Valin byl vybrán jako aminokyselina podobná alaninu. Má také podobný stabilizační efekt N-koncové aminokyseliny, ale na rozdíl od alaninu je frekvence acetylce valinu mnohem nižší (99 % pro alanin, 45 % pro valin) (Bílková, 2014).

Pilotní experimenty ukázaly možné rozdíly v efektivitě infekce mutantních virů, ale nebylo možné potvrdit tvorbu popřípadě nepřítomnost dvojitých proužků po rozdělení lyzátů transfekovaných buněk na SDS-PAGE pro divoký typ viru a mutantní viry (Bílková, 2014). Proto bylo cílem této diplomové práce vyprodukovat virové mutanty transfekcí tkáňové kultury a získané virové suspenze poté charakterizovat a porovnat z hlediska efektivitě infekce.

Již ověření produkce strukturních proteinů viru po transfekci ligační směsí přineslo zajímavé výsledky. Pilotní experimenty provedené Evou Bílkovou naznačovaly, že transfekce mutantním genomem A117V (mutant se sníženou acetylací N-koncové aminokyseliny) nevede k produkci proteinu VP3. Naše výsledky ale ukazují, že protein VP3 je produkován, byť ve trochu menší míře než je tomu u divokého typu MPyV a ostatních mutant (Obrázek 23). Nicméně jsme nebyli schopni pozorovat dvojité proužky u divokého typu a jasnou absenci jednoho proužku u mutantních virů N253D a N253E, proto byly další pokusy o ověření provedeny separací virové suspenze.

Deamidace samotná zvýší relativní molekulovou hmotnost proteinu pouze o 0,984 a to by samo o sobě nestačilo pro tak výrazný posun izoform na SDS-PAGE. Předpokládali jsme, že změna náboje způsobená deamidací asparaginů z kladného na záporný by mohla být za tento posun zodpovědná. Pomocí SDS-PAGE separace virových suspenzí a následné fluorescenční detekce nebo imunodetekce virových proteinů se nám podařilo prokázat přítomnost dvojitých proužků pro oba minoritní proteiny u divokého typu a jejich absenci u mutantních virů N253D a N253E. Naše výsledky tedy definitivně potvrzují, že se izoformy minoritních proteinů projevující se jako dvojité proužky na SDS-PAGE liší deamidací asparaginu na pozici 253 proteinu VP2 a 137 proteinu VP3.

Dále nás zajímalo, jestli mutace asparaginu 253 bude mít vliv na efektivitu infekce. Pro účely srovnání mutantních virů s divokým typem MPyV byly provedeny tři nezávislé virové izolace, dvě z buněčné kultury transfekované ligační směsí a jedna přímou infekcí mutantními viry z druhé izolace. Ve všech třech izolacích jsme byli schopni získat virové částice.

Pilotní experimenty efektivitu infekce virových mutant provedené Evou Bílkovou neukázaly velké rozdíly mezi mutantními viry N253D, N253E a divokým typem MPyV. Naše experimenty ukazují, že mutantní virus N253D je skutečně svou efektivitou infekce velmi podobný divokému typu viru. Asparagin je zde substituován za kyselinu asparagovou, a tato záměna má simulovat deamidovanou izoformu minoritních proteinů. Velmi zajímavá je ale zhruba třikrát vyšší efektivita infekce mutantního viru N253E (asparagin nahrazen kyselinou glutamovou) v porovnání s divokým typem MPyV. Jelikož se mutantní viry N253D a N253E mezi sebou v tomto liší, nemůžeme přisoudit změnu v efektivitě infekce posttranslační modifikaci deamidací, roli bude hrát pravděpodobně samotná aminokyselina na této pozici.

Deamidace je posttranslační modifikace, kdy dochází k odštěpení amidové skupiny, která je nahrazena karboxylem. Bývá spojována zejména se značením starých proteinů pro degradaci (shrnuto v Lindner a Helliger, 2001), ale byla pozorována i účast na regulaci biologické role

proteinů (Mastrangeli et al., 2016). V eukaryotických buňkách dochází k této modifikaci samovolně a asparagin je konvertován na asparagovou a isoasparagovou kyselinu v poměru zhruba 3:7, přičemž isoasparagová kyselina je dále konvertována na asparagovou kyselinu pomocí enzymu protein L-isoaspartyl O-methyltransferáza (Johnson et al., 1987). Analýza pomocí hmotnostní spektrometrie ukázala, že se v izoformách s nižší elektroforetickou mobilitou obou minoritních proteinů nachází téměř výhradně isoasparagová kyselina (Bílková, 2014). Tento fakt nebyl nikdy vysvětlen a je otázkou, jak je dosaženo tak vysokého zastoupení kyseliny isoasparagové. Minoritní proteiny obsahující tuto aminokyselinu by mohly být například inkorporovány do virionů preferenčně ze sterických důvodů, tím pádem by díky zabalení do kapsidy nemusely být dostupné pro protein L-isoaspartyl O-methyltransferázu. Otázkou zůstává, zda je možné z hlediska porovnání efektivity infekce považovat kyselinu asparagovou a isoasparagovou za identické a vztahovat tak skutečnosti zjištěné pro mutantní virus N253D na přirozeně deamidovanou izoformu minoritních proteinů.

Jak již bylo zmíněno, v souladu s dřívějším pozorováním Evy Bílkové se zdá, že mutantní virus A117V je neinfekční. Pozorovaný fenotyp se velmi podobá fenotypu mutantního MPyV neobsahujícího VP3, který byl popsán dříve (Mannová et al., 2002), i když jsme u tohoto viru byli schopni potvrdit přítomnost proteinu VP3 ve virové suspenzi. Jelikož transfekce mutovaným virovým genomem dala vzniknout virovému potomstvu obsahujícímu jak prázdné částice, tak viriony obsahující genom MPyV, lze předpokládat, že pozdní fáze infekce a tedy produkce virových částic není do velké míry ovlivněna. Tyto virové částice ale již zřejmě nejsou schopny doručit virový genom do jádra, což potvrzuje fakt, že jsme nepozorovali expresi časných genů v čase 24 hpi.

Pokud se podíváme na SDS-PAGE separace transfekované buněčné kultury či virové suspenze mutantních virů divokého typu MPyV, můžeme si povšimnout určité nekonzistence mezi poměrným zastoupením proteinů VP2 a VP3 vůči sobě. Zatímco u divokého typu MPyV a obou mutantních virů N253D a N253E převažuje přítomnost proteinu VP3 nad proteinem VP2, u mutantního viru A117V se to zdá být naopak a silnější proužek je pozorován pro protein VP2. Jelikož pozorujeme podobné poměry minoritních proteinů i u separované virové suspenze, lze předpokládat, že toto rozložení reflektuje zastoupení minoritních proteinů vůči sobě ve virových částicích. Proces skládání virionů je pravděpodobně náhodný a lze tedy předpokládat, že i malá změna v poměru syntézy minoritních proteinů by mohla způsobit tvorbu částic s jejich jiným zastoupením. Je možné, že například pouze viriony se správným poměrem minoritních proteinů v kapsidě jsou infekční.

Jak již bylo zmíněno, alanin je v eukaryotických buňkách acetylován s frekvencí zhruba 99 %, valin s frekvencí 45 %. Zdá se tedy poněkud nepravděpodobné, že by snížení acetylce na polovinu bylo zodpovědné za tak velkou změnu v efektivitě infekce virového potomstva. Analýza sekvencí minoritních proteinů sekvencně podobných minoritním proteinům MPyV ukázala, že alanin na pozici odpovídající 117 proteinu VP2 MPyV je velmi konzervovaný pro polyomaviry, které v tomto místě kódují počátek proteinu VP3, což souhlasí s dříve publikovanými daty (Schowalter a Buck, 2013). Je tedy těžké říci, zda je námi pozorovaný fenotyp způsoben snížením acetylce na této pozici nebo záměnou aminokyseliny.

N-koncová acetylce je velmi běžná posttranslační modifikace proteinů v eukaryotických buňkách a existují domněnky, že by mohla být spojená jak se stabilizací proteinů tak i jejich cílením k degradaci. Vliv acetylce na biologické funkce proteinů byl extenzivně studován, její role byla dokumentována v modulaci funkce a aktivity proteinů, stabilizaci flexibilních N-konců proteinů a byl dokonce popsán i její význam pro cílení proteinů do různých buněčných kompartmentů (shrnuto v Dörfel a Lyon, 2015). Některé z těchto dosud popsaných funkcí by se mohly uplatňovat i u acetylovaného proteinu VP3. Vzhledem k tomu, že jsme pozorovali změnu v hladině produkce a přítomnosti proteinu VP3 ve virové suspenzi mutantního viru A117V, je možné spekulovat o potenciální stabilizační roli acetylce na této pozici pro protein VP3.

Ať už jsou tedy rozdíly v efektivitě infekce u mutantních virů N253E a A117V způsobené přítomností či nepřítomností posttranslační modifikace nebo konkrétní aminokyselinou na těchto pozicích, je řada možných okamžiků v životním cyklu MPyV, kde by tyto změny mohly hrát roli. Ani jedna z mutovaných pozic se sice nenachází v předpovězených hydrofobních doménách minoritních proteinů (pozice 117 se nachází těsně před začátkem druhé hydrofobní domény, 253 několik desítek aminokyselin před třetí hydrofobní doménou) (Huérfano et al., 2017), nelze nicméně vyloučit, že i aminokyseliny mimo tyto oblasti mohou mít vliv na funkci těchto domén a měnit tak schopnost viru translokovat z endoplasmatického retikula. Pro velkou část minoritních proteinů, kromě C-koncového α -helixu, nebyla předpovězena sekundární struktura a tato část se zdá tedy být do velké míry nestrukturovaná (Chen et al., 1998). Je tedy možné, že právě tato část je po rozvolnění virionu v endoplasmatickém retikulu rozeznávána ERAD dráhou jako nesbalený protein a je tak umožněn výstup z endoplasmatického retikula. Posttranslační modifikace či záměna aminokyseliny by mohla změnit uspořádání této nestrukturované oblasti a opět ovlivnit schopnost virionu translokovat z endoplasmatického retikula do cytoplasmy. Dále by také tyto substituce mohly změnit povrchové epitopy virionu

a mohla by tak být ovlivněna vazba na receptor a následný vstup do buňky (Krauzewicz et al., 1990; Mannová et al., 2002). To by mohlo vést k rozdílnému cílení virionů v rámci buňky a ovlivnit tak, zda bude preferována produktivní nebo neproduktivní cesta po vstupu do buňky (Krauzewicz et al., 2000).

Pro další upřesnění našich výsledků a zjištění, které části životního cyklu MPyV jsou ovlivněny těmito substitucemi, bude potřeba dalších experimentů. Zajímavé by bylo zejména zjistit jaká je exprese jak časných tak i pozdních genů v pozdějších časech než 24 hpi a zda například pozorovaná téměř nulová exprese časných antigenů v případě mutantního viru A117V není dána pouze zpožděním v dopravě virového genomu do jádra vůči divokému typu. Pokud se virový genom nedostává do jádra ani v pozdějších časech, bylo by vhodné se zaměřit na pozorování kolokalizace mutantního viru s buněčnými kompartmenty po infekci a zjistit tak, zda není například po vstupu virus cílen do neproduktivní dráhy infekce. Vhodné by dále také bylo provést analýzu pomocí hmotnostní spektrometrie a ověřit tak přítomnost či nepřítomnost (popřípadě i procentuální zastoupení) acetylace na N-koncovém valínu.

6.2 Vliv acetylce mikrotubulů na průběh infekce MPyV

Acetylované mikrotubuly jsou již několik let intenzivně studovány v souvislosti s virovou infekcí zejména u viru chřipky, HIV a herpesvirů (shrnuto v Zheng et al., 2017). V naší laboratoři bylo nedávno pozorováno, že v pozdní fázi infekce MPyV dochází k nárůstu acetylce mikrotubulů vlivem masivní exprese kapsidového proteinu VP1 (Horníková et al., 2017). Na toto zjištění navazujeme v této diplomové práci. Ukázali jsme, že k nárůstu hladiny acetylovaných mikrotubulů dochází již v čase 24 hpi a že se acetylce mikrotubulů stabilně zvyšuje. To koresponduje s expresí proteinu VP1, která začíná 18–20 hpi (Chen a Fluck, 2001).

Dále nás zajímalo, jestli je tento nárůst způsoben změnou exprese enzymů odpovědných za acetylaci mikrotubulů nebo změnou jejich aktivity. Bohužel jsme ale neměli k dispozici specifické protilátky proti těmto enzymům, proto jsme se v dalších experimentech zaměřili na zkoumání změn exprese mRNA pro enzymy acetylující a deacetylující α -tubulin, tedy α TAT1 a HDAC6. I když se acetylací mikrotubulů během virových infekcí zabývá celá řada studií (Zhang et al., 2017; Zhong et al., 2014), nebyla doposud publikována práce, která by se zabývala změnami exprese těchto enzymů. Z našich dat vyplývá, že exprese mRNA α TAT1 ani HDAC6 se v průběhu infekce MPyV nemění. Velmi malé rozdíly v průběhu infekce, které jsme v našich experimentech pozorovali, nejsou sami o sobě postačující pro vysvětlení

pozorovaného růstu acetylace mikrotubulů, a proto je velmi pravděpodobné, že dochází spíše k ovlivnění aktivity enzymů, než ke změnám jejich exprese.

Vzhledem k tomu, že během infekce dochází k nárůstu acetylace mikrotubulů, zajímalo nás, jestli je tento jev důležitý pro průběh virové infekce. Rozhodli jsme se použít tubacin, specifický inhibitor tubulin deacetylační aktivity HDAC6 (Haggarty et al., 2003), ke zkoumání vlivu zvýšené acetylace mikrotubulů na efektivitu infekce MPyV. Naše experimenty ukazují, že inhibice tubulin deacetylační aktivity HDAC6 a následné zvýšení acetylace mikrotubulů má pozitivní vliv na infekci MPyV. Přidání inhibitoru v čase infekce vedlo ke zvýšení počtu buněk exprimujících časný virový protein, LT antigen, tedy ke zvýšení počtu buněk, ve kterých byl v daném čase virový genom úspěšně dopraven do jádra. Pilotní experiment, kdy byl tubacin přidán až 24 hpi, neukázal žádný rozdíl v expresi časných genů mezi buňkami opůsobenými a neopůsobenými inhibitorem, nicméně jsme pozorovali zhruba dvojnásobný nárůst hladiny strukturního proteinu VP1. Překvapivě jsme také pozorovali, že působení tubacinu snížilo expresi mRNA pro α TAT1 i HDAC6 zhruba na polovinu hodnoty v neopůsobených buňkách. Jelikož se ale exprese obou genů snížila velmi podobně, neměl by tento fakt mít vliv na celkovou hladinu acetylace mikrotubulů. Tato data dohromady ukazují, že inhibice deacetylační aktivity HDAC6 má zřejmě pozitivní vliv na časnou i pozdní fázi infekce MPyV. Otázkou ale zůstává, jestli je pro infekci důležitá acetylace mikrotubulů, nebo jiná deacetylační aktivita enzymu HDAC6.

Od svého objevení, jako hlavní deacetylační enzym tubulinu (Hubbert et al., 2002), je HDAC6 společně s acylací mikrotubulů intenzivně studována pro svou roli ve virové infekci. Jejich společný význam ve virové infekci byl pozorován snad ve všech fázích životních cyklů virů, acetylace mikrotubulů může hrát roli už při vstupu do buňky (Valenzuela-Fernández et al., 2005), při pohybu virionů buňkou do místa jejich replikace (Cao et al., 2014; Sabo et al., 2013) a při dopravě virových komponent na místo skládání nových virových částic a jejich vypuštění z buňky (Husain a Cheung, 2014). Téměř ve všech případech bylo pozorováno, že zvýšení acetylace mikrotubulů je provázeno lepší efektivitou infekce, naopak nadprodukce HDAC6 měla protektivní účinek před infekcí buněk viry (Zhang et al., 2017). HDAC6 může deacetylovat celou řadu proteinů a nelze zatím s určitostí říci, zda samotné acetylované mikrotubuly jsou pro virovou infekci výhodné nebo je to pouze vedlejší efekt a virus využívá i jiných funkcí HDAC6.

Role HDAC6 ve virové infekci byla taktéž popsána v buněčné odpovědi vůči virové infekci. HDAC6 se účastní aktivace transkripce interferonů I. třídy (Zhu et al., 2011), detekce cizích

nukleových kyselin v buňce (její role v detekci cizorodé DNA nebyla zatím popsána) (Choi et al., 2016), v adaptivní imunitní odpovědi (Lazaro et al., 2011; Núñez-Andrade et al., 2016), při rozvoji zánětu (Youn et al., 2015) a chronického onemocnění (Miura et al., 2008).

HDAC6 je schopná kromě tubulinu deacetylovat celou řadu dalších proteinů, mimo jiné i molekulární chaperony (shrnutí v Zheng et al., 2017). Chaperony pomáhají proteinům dosáhnout správné konformace a dopravit je na správné místo v buňce, aby zde mohly vykonávat své funkce. Během pozdní fáze infekce je produkováno velké množství virových strukturních proteinů a na jejich správném složení ve správný čas záleží, zda bude vytvořen dostatek kvalitního virového potomstva obsahující virový genom. Proto je logické, že se viry naučili tuto mašinerii využívat.

HDAC6 deacetyluje jedny z nejvíce zastoupených chaperonů Hsp90 (Kovacs et al., 2005) a Hsp70 (Zhang et al., 2015) a tím je aktivuje pro vykonávání jejich chaperonové aktivity za spotřeby ATP (shrnutí v Glozak et al., 2005). Bylo popsáno, že chaperon Hsp90 se účastní například dopravy virových komponent do jádra při infekci virem chřipky (Panella et al., 2016) a jeho role byla pozorována i u dalších virů (shrnutí v Geller et al., 2012). Tyto chaperony se také účastní životního cyklu myšího polyomaviru. Hsp70 interaguje s kapsomerami produkovánými v cytoplasmě v pozdní fázi infekce, pravděpodobně zabraňuje jejich předčasnému složení a dopravuje je do jádra, kde teprve dochází k jejich složení do virové kapsidy (Chromy et al., 2003). Hsp70 se pravděpodobně také účastní rozvolnění kapsidy v cytoplasmě při pohybu buňkou k jádru (Chromy et al., 2006). Pohybu virové kapsidy MPyV k jádru by se mohl účastnit i Hsp90, jako to bylo popsáno například u viru hepatitidy E (Zheng et al., 2010).

Virové T antigeny obsahují DnaJ doménu (Campbell et al., 1997), která tvoří konzervovaný motiv pro vazbu chaperonů jinými chaperony. Tato doména byla nedávno identifikována jako jeden z hlavních cílů deacetylační aktivity HDAC6 (Zhang et al., 2015). U viru SV40 byla pozorována asociace LT antigenu s chaperonem Hsp90 a tato asociace by mohla hrát roli při replikaci virového genomu (Miyata a Yahara, 2000). U SV40 byl dále pozorován LT antigen v komplexech s chaperonem Hsp70 a hlavním kapsidovým proteinem VP1 (Li et al., 2009). Bylo také pozorováno, že infekce MPyV vede ke zvýšení exprese Hsp90 a Hsp70 (Khandjian a Türler, 1983).

Z těchto pozorování vyplývá, že infekce MPyV do velké míry využívá molekulárních chaperonů a lze předpokládat, že jsou v průběhu infekce masivně rekrutovány do míst, kde je jejich funkce vyžadována virem. Pro vykonávání jejich funkce je potřeba chaperony aktivovat

a to právě deacetylací. Je tedy možné, že infekce MPyV způsobí, že deacetylační aktivita HDAC6 je najednou vyžadována pro aktivaci velkého množství molekulárních chaperonů a potenciálně i LT antigenu. Jelikož se exprese mRNA pro HDAC6 nemění, je možné, že mikrotubuly po infekci buňky MPyV kompetují o deacetylační aktivitu HDAC6 s molekulárními chaperony, což by vysvětlovalo nárůst acetylace mikrotubulů již v časných fázích infekce. Dále je možné, že v pozdní fázi infekce protein VP1 rekrutuje na mikrotubuly nově syntetizované chaperony, které je potřeba deacetylovat a HDAC6, která se nachází v blízkosti mikrotubulů je deacetyluje a tím dochází k ještě většímu nárůstu acetylace mikrotubulů zejména v oblastech komplexů VP1 a Hsp90.

Podobná strategie byla popsána u viru chřipky. Bylo pozorováno, že dokáže využít role HDAC6 ve tvorbě agrezomu, rekrutuje ji k místu úniku kapsid z endozomu a využívá její schopnosti vázat ubikvitin pro rozvolnění své kapsidy (Banerjee et al., 2014). Zvýšená hladina acetylace mikrotubulů během infekce virem chřipky byla pozorována dříve (Husain a Cheung, 2014). Je možné, že právě rekrutování velkého množství HDAC6 může způsobit lokální nedostatek enzymu vedoucí ke zvýšení acetylace mikrotubulů.

Pro naše experimenty jsme použili tubacin, který specificky inhibuje tubulin deacetylační aktivitu HDAC6 (Haggarty et al., 2003), ale její aktivita vůči dalším cílům by měla být zachována a i v přítomnosti inhibitoru by tedy mělo docházet k deacetylaci chaperonů. I přesto by bylo dále vhodné naši teorii ověřit, například použitím jiného inhibitoru HDAC6, který není specifický pouze pro tubulin deacetylační aktivitu. Také infekce MPyV buněk neexprimujících HDAC6 by měla za takového předpokladu vést k poklesu efektivity infekce.

Zatímco u většiny virů, včetně MPyV, se jeví zvýšení exprese HDAC6 jako dobrá potenciální antivirová terapie, objevují se i případy, kdy naopak inhibice deacetylační aktivity má protektivní účinky, což do značné míry komplikuje využití této strategie jako univerzální antivirové terapie. Zdá se tedy, že i z důvodu různorodosti cílových proteinů HDAC6 by bylo lepší se zaměřit spíše na další proteiny, které HDAC6 během virové infekce ovlivňuje a inhibovat tak konkrétní efekty (shrnutí v Zheng et al., 2017).

7 Souhrn

Tato diplomová práce byla rozdělena do dvou částí s oddělenými cíli. Následuje shrnutí naplnění jednotlivých cílů této diplomové práce:

- **Virová inokula mutantních virů N253D, N253E a A117V a divokého typu MPyV byla připravena celkem třikrát (A117V pouze dvakrát) z buněčné kultury NIH 3T3 transfekované ligační směsí mutovaných genomů nebo plasmidem pMJG nebo infikované virovými suspenzemi získanými ve druhé izolaci.**
- **Byli jsme schopni pozorovat absenci dvojitých proužků minoritních proteinů u mutantních virů N253D a N253E a jejich přítomnost u divokého typu MPyV při separaci pomocí SDS-PAGE a prokázali jsme tedy, že deamidace je příčinou pozorovaných dvojitých proužků.**
- **Efektivita infekce mutantního viru N253D je velmi podobná divokému typu viru. Mutantní virus N2D3E se zdá mít zhruba třikrát vyšší efektivitu infekce a A117V je téměř neinfekční.**
- **Acetylace mikrotubulů po infekci buněk 3T6 MPyV s malými výkyvy stabilně roste, a to jak v časně tak pozdní fázi infekce.**
- **Exprese mRNA pro α TAT1 a HDAC6 se během infekce MPyV v buňkách 3T6 nemění.**
- **Indukce acetylace mikrotubulů má pozitivní vliv jak na časnou tak pozdní fázi infekce MPyV.**

8 Seznam použité literatury

(přehledové články jsou označeny *)

Acheson, N.H., 1978. Polyoma virus giant RNAs contain tandem repeats of the nucleotide sequence of the entire viral genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75, 4754–4758.

Akella, J.S., Wloga, D., Kim, J., Starostina, N.G., Lyons-Abbott, S., Morrissette, N.S., Dougan, S.T., Kipreos, E.T., Gaertig, J., 2010. MEC-17 is an α -tubulin acetyltransferase. *Nature* 467, 218–222. doi:10.1038/nature09324

* Aldana-Masangkay, G.I., Sakamoto, K.M., 2011. The Role of HDAC6 in Cancer. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011. doi:10.1155/2011/875824

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389–3402.

Altschul, S.F., Wootton, J.C., Gertz, E.M., Agarwala, R., Morgulis, A., Schäffer, A.A., Yu, Y.-K., 2005. Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. *FEBS J.* 272, 5101–5109. doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04945.x

An, K., Fattaey, H.K., Paulsen, A.Q., Consigli, R.A., 2000. Murine polyomavirus infection of 3T6 mouse cells shows evidence of predominant necrosis as well as limited apoptosis. *Virus Res.* 67, 81–90. doi:10.1016/S0168-1702(00)00133-7

* Atkin, S.J.L., Griffin, B.E., Dilworth, S.M., 2009. Polyoma virus and simian virus 40 as cancer models: History and perspectives. *Semin. Cancer Biol., The Polyomaviruses* 19, 211–217. doi:10.1016/j.semcancer.2009.03.001

Bali, P., Pranpat, M., Bradner, J., Balasis, M., Fiskus, W., Guo, F., Rocha, K., Kumaraswamy, S., Boyapalle, S., Atadja, P., Seto, E., Bhalla, K., 2005. Inhibition of Histone Deacetylase 6 Acetylates and Disrupts the Chaperone Function of Heat Shock Protein 90 A NOVEL BASIS FOR ANTILEUKEMIA ACTIVITY OF HISTONE DEACETYLASE INHIBITORS. *J. Biol. Chem.* 280, 26729–26734. doi:10.1074/jbc.C500186200

Banerjee, I., Miyake, Y., Nobs, S.P., Schneider, C., Horvath, P., Kopf, M., Matthias, P., Helenius, A., Yamauchi, Y., 2014. Influenza A virus uses the aggresome processing machinery for host cell entry. *Science* 346, 473–477. doi:10.1126/science.1257037

Barouch, D.H., Harrison, S.C., 1994. Interactions among the major and minor coat proteins of

polyomavirus. *J. Virol.* 68, 3982–3989.

Bauer, P.H., Cui, C., Stehle, T., Harrison, S.C., DeCaprio, J.A., Benjamin, T.L., 1999. Discrimination between Sialic Acid-Containing Receptors and Pseudoreceptors Regulates Polyomavirus Spread in the Mouse. *J. Virol.* 73, 5826–5832.

Bílková, E., 2014. Studium vlastností minoritních strukturních proteinů myšního polyomaviru, Diplomová práce. Univerzita Karlova.

Bird, G., O'Donnell, M., Moroianu, J., Garcea, R.L., 2008. Possible Role for Cellular Karyopherins in Regulating Polyomavirus and Papillomavirus Capsid Assembly. *J. Virol.* 82, 9848–9857. doi:10.1128/JVI.01221-08

Black, M.M., Keyser, P., 1987. Acetylation of alpha-tubulin in cultured neurons and the induction of alpha-tubulin acetylation in PC12 cells by treatment with nerve growth factor. *J. Neurosci.* 7, 1833–1842.

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool [WWW Document], n.d. URL <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (accessed 4.15.17).

Bolen, J.B., Anders, D.G., Trempey, J., Consigli, R.A., 1981. Differences in the subpopulations of the structural proteins of polyoma virions and capsids: biological functions of the multiple VP1 species. *J. Virol.* 37, 80–91.

Brady, J.N., Winston, V.D., Consigli, R.A., 1977. Dissociation of polyoma virus by the chelation of calcium ions found associated with purified virions. *J. Virol.* 23, 717–724.

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 Pathog.* 11. doi:10.1371/journal.ppat.1005104

Buck, C.B., Doorslaer, K.V., 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 Pathog.* 12, e1005574. doi:10.1371/journal.ppat.1005574

Cai, X., Chang, D., Rottinghaus, S., Consigli, R.A., 1994. Expression and purification of recombinant polyomavirus VP2 protein and its interactions with polyomavirus proteins. *J. Virol.* 68, 7609–7613.

- Campbell, K.S., Mullane, K.P., Aksoy, I.A., Stubdal, H., Zalvide, J., Pipas, J.M., Silver, P.A., Roberts, T.M., Schaffhausen, B.S., DeCaprio, J.A., 1997. DnaJ/hsp40 chaperone domain of SV40 large T antigen promotes efficient viral DNA replication. *Genes Dev.* 11, 1098–1110.
- Cao, J., Lin, C., Wang, H., Wang, L., Zhou, N., Jin, Y., Liao, M., Zhou, J., 2014. Circovirus Transport Proceeds via Direct Interaction of the Cytoplasmic Dynein IC1 Subunit with the Viral Capsid Protein. *J. Virol.* 89, 2777–2791. doi:10.1128/JVI.03117-14
- Carbone, M., Ascione, G., Chichiarelli, S., Garcia, M.-I., Eufemi, M., Amati, P., 2004. Chromosome-Protein Interactions in Polyomavirus Virions. *J. Virol.* 78, 513–519. doi:10.1128/JVI.78.1.513-519.2004
- Carbone, M., Reale, A., Di Sauro, A., Sthandier, O., Garcia, M.-I., Maione, R., Caiafa, P., Amati, P., 2006. PARP-1 Interaction with VP1 Capsid Protein Regulates Polyomavirus Early Gene Expression†. *J. Mol. Biol.* 363, 773–785. doi:10.1016/j.jmb.2006.05.077
- * Carmichael, G.G., 2016. Gene Regulation and Quality Control in Murine Polyomavirus Infection. *Viruses* 8. doi:10.3390/v8100284
- Caruso, M., Belloni, L., Sthandier, O., Amati, P., Garcia, M.-I., 2003. $\alpha 4\beta 1$ Integrin Acts as a Cell Receptor for Murine Polyomavirus at the Postattachment Level. *J. Virol.* 77, 3913–3921. doi:10.1128/JVI.77.7.3913-3921.2003
- Cavaldesi, M., Caruso, M., Sthandier, O., Amati, P., Garcia, M.I., 2004. Conformational Changes of Murine Polyomavirus Capsid Proteins Induced by Sialic Acid Binding. *J. Biol. Chem.* 279, 41573–41579. doi:10.1074/jbc.M405995200
- Conacci-Sorrell, M., Ngouenet, C., Eisenman, R.N., 2010. Myc-nick: A cytoplasmic cleavage product of Myc that promotes α -tubulin acetylation and cell differentiation. *Cell* 142, 480–493. doi:10.1016/j.cell.2010.06.037
- Courtneidge, S.A., Smith, A.E., 1983. Polyoma virus transforming protein associates with the product of the c-src cellular gene. *Nature* 303, 435–439.
- Dela Cruz Jr., F.N., Li, L., Delwart, E., Pesavento, P.A., 2017. A novel pulmonary polyomavirus in alpacas (*Vicugna pacos*). *Vet. Microbiol.* 201, 49–55. doi:10.1016/j.vetmic.2017.01.005
- Delos, S.E., Cripe, T.P., Leavitt, A.D., Greisman, H., Garcea, R.L., 1995. Expression of the polyomavirus minor capsid proteins VP2 and VP3 in *Escherichia coli*: in vitro interactions with recombinant VP1 capsomeres. *J. Virol.* 69, 7734–7742.

Dilworth, S.M., Cowie, A., Kamen, R.I., Griffin, B.E., 1984. DNA binding activity of polyoma virus large tumor antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 1941–1945.

* Dörfel, M.J., Lyon, G.J., 2015. The biological functions of Naa10 — From amino-terminal acetylation to human disease. *Gene* 567, 103–131. doi:10.1016/j.gene.2015.04.085

Eckhart, W., Hutchinson, M.A., Hunter, T., 1979. An activity phosphorylating tyrosine in polyoma T antigen immunoprecipitates. *Cell* 18, 925–933. doi:10.1016/0092-8674(79)90205-8

Einollahi, B., Lotfian, I., 2016. BK Virus and Nephropathy in Kidney Transplant Recipients. *Int. J. Organ Transplant. Med.* 7, 238–240.

Erickson, K.D., Bouchet-Marquis, C., Heiser, K., Szomolanyi-Tsuda, E., Mishra, R., Lamothe, B., Hoenger, A., Garcea, R.L., 2012. Virion Assembly Factories in the Nucleus of Polyomavirus-Infected Cells. *PLoS Pathog.* 8. doi:10.1371/journal.ppat.1002630

Feng, H., Shuda, M., Chang, Y., Moore, P.S., 2008. Clonal Integration of a Polyomavirus in Human Merkel Cell Carcinoma. *Science* 319, 1096–1100. doi:10.1126/science.1152586

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. *J. Virol.* 67, 1405–1413.

Friedmann, T., 1976. Structural proteins of polyoma virus: proteolytic degradation of virion proteins by exogenous and by virion-associated proteases. *J. Virol.* 20, 520–526.

Gaertig, J., Wloga, D., 2012. Microtubules: MEC-17 Moonlights in the Lumen. *Curr. Biol.* 22, R483–R485. doi:10.1016/j.cub.2012.05.027

Garren, S.B., Kondaveeti, Y., Duff, M.O., Carmichael, G.G., 2015. Global Analysis of Mouse Polyomavirus Infection Reveals Dynamic Regulation of Viral and Host Gene Expression and Promiscuous Viral RNA Editing. *PLoS Pathog.* 11. doi:10.1371/journal.ppat.1005166

* Geller, R., Taguwa, S., Frydman, J., 2012. Broad action of Hsp90 as a host chaperone required for viral replication. *Biochim. Biophys. Acta* 1823, 698–706. doi:10.1016/j.bbamcr.2011.11.007

Gheit, T., Dutta, S., Oliver, J., Robitaille, A., Hampras, S., Combes, J.-D., McKay-Chopin, S., Le Calvez-Kelm, F., Fenske, N., Cherpelis, B., Giuliano, A.R., Franceschi, S., McKay, J., Rollison, D.E., Tommasino, M., 2017. Isolation and characterization of a novel putative human

polyomavirus. *Virology* 506, 45–54. doi:10.1016/j.virol.2017.03.007

Gibson, W., 1974. Polyoma virus proteins: a description of the structural proteins of the virion based on polyacrylamide gel electrophoresis and peptide analysis. *Virology* 62, 319–336.

Gilbert, J., Benjamin, T., 2004. Uptake Pathway of Polyomavirus via Ganglioside GD1a. *J. Virol.* 78, 12259–12267. doi:10.1128/JVI.78.22.12259-12267.2004

Gilbert, J., Ou, W., Silver, J., Benjamin, T., 2006. Downregulation of Protein Disulfide Isomerase Inhibits Infection by the Mouse Polyomavirus. *J. Virol.* 80, 10868–10870. doi:10.1128/JVI.01117-06

Gilbert, J.M., Goldberg, I.G., Benjamin, T.L., 2003. Cell Penetration and Trafficking of Polyomavirus. *J. Virol.* 77, 2615–2622. doi:10.1128/JVI.77.4.2615-2622.2003

Giustiniani, J., Daire, V., Cantaloube, I., Durand, G., Poüs, C., Perdiz, D., Baillet, A., 2009. Tubulin acetylation favors Hsp90 recruitment to microtubules and stimulates the signaling function of the Hsp90 clients Akt/PKB and p53. *Cell. Signal.* 21, 529–539. doi:10.1016/j.cellsig.2008.12.004

* Glozak, M.A., Sengupta, N., Zhang, X., Seto, E., 2005. Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene* 363, 15–23. doi:10.1016/j.gene.2005.09.010

* Gottlieb, K.A., Villarreal, L.P., 2001. Natural Biology of Polyomavirus Middle T Antigen. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65, 288–318. doi:10.1128/MMBR.65.2.288-318.2001

Gross, L., 1953. A filterable agent, recovered from Ak leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y.* N 83, 414–421.

Gu, R., Zhang, Z., DeCerbo, J.N., Carmichael, G.G., 2009. Gene regulation by sense–antisense overlap of polyadenylation signals. *RNA* 15, 1154–1163. doi:10.1261/rna.1608909

Haggarty, S.J., Koeller, K.M., Wong, J.C., Grozinger, C.M., Schreiber, S.L., 2003. Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 4389–4394. doi:10.1073/pnas.0430973100

Horníková, L., 2012. Hlavní strukturní protein myšího polyomaviru: interakce s buněčnými strukturami, Dizertační práce. Univerzita Karlova.

Horníková, L., Fraiberk, M., Man, P., Janovec, V., Forstová, J., 2017. VP1, the major capsid protein of the mouse polyomavirus, binds microtubules, promotes their acetylation and blocks

the host cell cycle. *FEBS J.* 284, 301–323. doi:10.1111/febs.13977

Horníková, L., Žíla, V., Španielová, H., Forstová, J., 2015. Mouse Polyomavirus: Propagation, Purification, Quantification, and Storage. *Curr. Protoc. Microbiol.* 38, 14F.1.1-26. doi:10.1002/9780471729259.mc14f01s38

Howes, S.C., Alushin, G.M., Shida, T., Nachury, M.V., Nogales, E., 2014. Effects of tubulin acetylation and tubulin acetyltransferase binding on microtubule structure. *Mol. Biol. Cell* 25, 257–266. doi:10.1091/mbc.E13-07-0387

Hubbert, C., Guardiola, A., Shao, R., Kawaguchi, Y., Ito, A., Nixon, A., Yoshida, M., Wang, X.-F., Yao, T.-P., 2002. HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* 417, 455–458. doi:10.1038/417455a

Huérfino, S., Ryabchenko, B., Španielová, H., Forstová, J., 2017. Hydrophobic domains of mouse polyomavirus minor capsid proteins promote membrane association and virus exit from the ER. *FEBS J.* 284, 883–902. doi:10.1111/febs.14033

Huerfano, S., Žíla, V., Bouřa, E., Španielová, H., Štokrová, J., Forstová, J., 2010. Minor capsid proteins of mouse polyomavirus are inducers of apoptosis when produced individually but are only moderate contributors to cell death during the late phase of viral infection. *FEBS J.* 277, 1270–1283. doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07558.x

Husain, M., Cheung, C.-Y., 2014. Histone Deacetylase 6 Inhibits Influenza A Virus Release by Downregulating the Trafficking of Viral Components to the Plasma Membrane via Its Substrate, Acetylated Microtubules. *J. Virol.* 88, 11229–11239. doi:10.1128/JVI.00727-14

Chang, D., Cai, X., Consigli, R.A., 1993a. Characterization of the DNA binding properties of polyomavirus capsid protein. *J. Virol.* 67, 6327–6331.

Chang, D., Haynes, J.I., Brady, J.N., Consigli, R.A., 1993b. Identification of amino acid sequences in the polyomavirus capsid proteins that serve as nuclear localization signals. *Trans. Kans. Acad. Sci. Kans. Acad. Sci.* 96, 35–39.

Chang, D., Haynes, J.I., Brady, J.N., Consigli, R.A., 1992. The use of additive and subtractive approaches to examine the nuclear localization sequence of the polyomavirus major capsid protein VP1. *Virology* 189, 821–827.

Chen, L., Fluck, M., 2001. Kinetic Analysis of the Steps of the Polyomavirus Lytic Cycle. *J. Virol.* 75, 8368–8379. doi:10.1128/JVI.75.18.8368-8379.2001

- Chen, X.S., Stehle, T., Harrison, S.C., 1998. Interaction of polyomavirus internal protein VP2 with the major capsid protein VP1 and implications for participation of VP2 in viral entry. *EMBO J.* 17, 3233–3240. doi:10.1093/emboj/17.12.3233
- Cheng, J., DeCaprio, J.A., Fluck, M.M., Schaffhausen, B.S., 2009. Cellular Transformation by Simian Virus 40 and Murine Polyoma Virus T antigens. *Semin. Cancer Biol.* 19, 218–228. doi:10.1016/j.semcancer.2009.03.002
- Cho, Y., Cavalli, V., 2012. HDAC5 is a novel injury-regulated tubulin deacetylase controlling axon regeneration. *EMBO J.* 31, 3063–3078. doi:10.1038/emboj.2012.160
- Choi, S.J., Lee, H., Kim, J., Park, S.Y., Kim, T., Lee, W., Jang, D., Yoon, J., Choi, Y., Kim, S., Ma, J., Kim, C., Yao, T., Jung, J.U., Lee, J., Lee, J., 2016. HDAC6 regulates cellular viral RNA sensing by deacetylation of RIG-I. *EMBO J.* 35, 429–442. doi:10.15252/emboj.201592586
- Chromy, L.R., Oltman, A., Estes, P.A., Garcea, R.L., 2006. Chaperone-Mediated In Vitro Disassembly of Polyoma- and Papillomaviruses. *J. Virol.* 80, 5086–5091. doi:10.1128/JVI.80.10.5086-5091.2006
- Chromy, L.R., Pipas, J.M., Garcea, R.L., 2003. Chaperone-mediated in vitro assembly of Polyomavirus capsids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 10477–10482. doi:10.1073/pnas.1832245100
- * Janke, C., Bulinski, J.C., 2011. Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 773–786. doi:10.1038/nrm3227
- * Jasani, B., Butel, J.S., 2013. Can SV40 infect and immortalize human B-lymphocytes and mesothelial cells as a natural pathogen? *Leuk. Res.* 37, 607–608. doi:10.1016/j.leukres.2013.03.008
- Johnson, B.A., Murray, E.D., Clarke, S., Glass, D.B., Aswad, D.W., 1987. Protein carboxyl methyltransferase facilitates conversion of atypical L-isoaspartyl peptides to normal L-aspartyl peptides. *J. Biol. Chem.* 262, 5622–5629.
- Kalebic, N., Martinez, C., Perlas, E., Hublitz, P., Bilbao-Cortes, D., Fiedorczuk, K., Andolfo, A., Heppenstall, P.A., 2013. Tubulin Acetyltransferase α TAT1 Destabilizes Microtubules Independently of Its Acetylation Activity. *Mol. Cell. Biol.* 33, 1114–1123. doi:10.1128/MCB.01044-12
- Kamen, R., Shure, H., 1976. Topography of polyoma virus messenger RNA molecules. *Cell* 7, 361–371. doi:10.1016/0092-8674(76)90165-3

- Khandjian, E.W., Türler, H., 1983. Simian virus 40 and polyoma virus induce synthesis of heat shock proteins in permissive cells. *Mol. Cell. Biol.* 3, 1–8.
- Kovacs, J.J., Murphy, P.J.M., Gaillard, S., Zhao, X., Wu, J.-T., Nicchitta, C.V., Yoshida, M., Toft, D.O., Pratt, W.B., Yao, T.-P., 2005. HDAC6 Regulates Hsp90 Acetylation and Chaperone-Dependent Activation of Glucocorticoid Receptor. *Mol. Cell* 18, 601–607. doi:10.1016/j.molcel.2005.04.021
- Krauzewicz, N., Stokrová, J., Jenkins, C., Elliott, M., Higgins, C.F., Griffin, B.E., 2000. Virus-like gene transfer into cells mediated by polyoma virus pseudocapsids. *Gene Ther.* 7, 2122–2131. doi:10.1038/sj.gt.3301322
- 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. *J. Virol.* 64, 4414–4420.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lazaro, E., Kadie, C., Stamegna, P., Zhang, S.C., Gourdain, P., Lai, N.Y., Zhang, M., Martinez, S.A., Heckerman, D., Le Gall, S., 2011. Variable HIV peptide stability in human cytosol is critical to epitope presentation and immune escape. *J. Clin. Invest.* 121, 2480–2492. doi:10.1172/JCI44932
- LeDizet, M., Piperno, G., 1987. Identification of an acetylation site of *Chlamydomonas* alpha-tubulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 5720–5724.
- Li, L., Yang, X.-J., 2015. Tubulin acetylation: responsible enzymes, biological functions and human diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* 72, 4237–4255. doi:10.1007/s00018-015-2000-5
- Li, M., Garcea, R.L., 1994. Identification of the threonine phosphorylation sites on the polyomavirus major capsid protein VP1: relationship to the activity of middle T antigen. *J. Virol.* 68, 320–327.
- Li, P.P., Itoh, N., Watanabe, M., Shi, Y., Liu, P., Yang, H.-J., Kasamatsu, H., 2009. Association of simian virus 40 vp1 with 70-kilodalton heat shock proteins and viral tumor antigens. *J. Virol.* 83, 37–46. doi:10.1128/JVI.00844-08
- Liddington, R.C., Yan, Y., Moulai, J., Sahli, R., Benjamin, T.L., Harrison, S.C., 1991. Structure of simian virus 40 at 3.8-Å resolution. *Nature* 354, 278–284. doi:10.1038/354278a0
- 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. *J. Virol.* 80, 4610–4622. doi:10.1128/JVI.80.9.4610-4622.2006

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. *J. Virol.* 80, 8739–8744. doi:10.1128/JVI.00791-06

* Lindner, H., Helliger, W., 2001. Age-dependent deamidation of asparagine residues in proteins. *Exp. Gerontol., Molecule Aging* 36, 1551–1563. doi:10.1016/S0531-5565(01)00140-1

Linzer, D.I., Levine, A.J., 1979. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17, 43–52.

Liu, Z., Carmichael, G.G., 1993. Polyoma virus early-late switch: regulation of late RNA accumulation by DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 8494–8498.

Mackay, R.L., Consigli, R.A., 1976. Early events in polyoma virus infection: attachment, penetration, and nuclear entry. *J. Virol.* 19, 620–636.

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. *Mol. Cell* 20, 289–300. doi:10.1016/j.molcel.2005.08.034

Mannová, P., Forstová, J., 2003. Mouse Polyomavirus Utilizes Recycling Endosomes for a Traffic Pathway Independent of COPI Vesicle Transport. *J. Virol.* 77, 1672–1681. doi:10.1128/JVI.77.3.1672-1681.2003

Mannová, P., Liebl, D., Krauzewicz, N., Fejtová, A., Štokrová, J., Palková, Z., Griffin, B.E., Forstová, J., 2002. Analysis of mouse polyomavirus mutants with lesions in the minor capsid proteins. *J. Gen. Virol.* 83, 2309–2319. doi:10.1099/0022-1317-83-9-2309

Maruta, H., Greer, K., Rosenbaum, J.L., 1986. The acetylation of alpha-tubulin and its relationship to the assembly and disassembly of microtubules. *J. Cell Biol.* 103, 571–579.

Mastrangeli, R., Iozzino, L., Lanzoni, L., Angiuoni, G., Ferrao, C., Izzo, A., Fiumi, S., Camerini, F., Mascia, M., Palinsky, W., Bierau, H., 2016. Biological Functions of Interferon β -1a Are Enhanced By Deamidation. *J. Interferon Cytokine Res.* 36, 534–541. doi:10.1089/jir.2016.0025

- Miura, K., Taura, K., Kodama, Y., Schnabl, B., Brenner, D.A., 2008. Hepatitis C virus–induced oxidative stress suppresses hepcidin expression through increased histone deacetylase activity. *Hepatology* 48, 1420–1429. doi:10.1002/hep.22486
- Miyake, Y., Keusch, J.J., Wang, L., Saito, M., Hess, D., Wang, X., Melancon, B.J., Helquist, P., Gut, H., Matthias, P., 2016. Structural insights into HDAC6 tubulin deacetylation and its selective inhibition. *Nat. Chem. Biol.* 12, 748–754. doi:10.1038/nchembio.2140
- Miyata, Y., Yahara, I., 2000. p53-independent association between SV40 large T antigen and the major cytosolic heat shock protein, HSP90. *Oncogene* 19, 1477–1484. doi:10.1038/sj.onc.1203475
- Montross, L., Watkins, S., Moreland, R.B., Mamon, H., Caspar, D.L., Garcea, R.L., 1991. Nuclear assembly of polyomavirus capsids in insect cells expressing the major capsid protein VP1. *J. Virol.* 65, 4991–4998.
- Morávková, A., 2001. Příprava protilátek proti hlavnímu strukturnímu proteinu myšního polyomaviru, Diplomová práce. Univerzita Karlova.
- North, B.J., Marshall, B.L., Borra, M.T., Denu, J.M., Verdin, E., 2003. The Human Sir2 Ortholog, SIRT2, Is an NAD⁺-Dependent Tubulin Deacetylase. *Mol. Cell* 11, 437–444. doi:10.1016/S1097-2765(03)00038-8
- Núñez-Andrade, N., Iborra, S., Trullo, A., Moreno-Gonzalo, O., Calvo, E., Catalán, E., Menasche, G., Sancho, D., Vázquez, J., Yao, T.-P., Martín-Cófreces, N.B., Sánchez-Madrid, F., 2016. HDAC6 regulates the dynamics of lytic granules in cytotoxic T lymphocytes. *J. Cell Sci.* 129, 1305–1311. doi:10.1242/jcs.180885
- Ohkawa, N., Sugisaki, S., Tokunaga, E., Fujitani, K., Hayasaka, T., Setou, M., Inokuchi, K., 2008. N-acetyltransferase ARD1-NAT1 regulates neuronal dendritic development. *Genes Cells* 13, 1171–1183. doi:10.1111/j.1365-2443.2008.01235.x
- Palková, Z., Španielová, H., Gottifredi, V., Hollanderová, D., Forstová, J., Amati, P., 2000. The polyomavirus major capsid protein VP1 interacts with the nuclear matrix regulatory protein YY1. *FEBS Lett.* 467, 359–364. doi:10.1016/S0014-5793(00)01170-4
- Pallas, D.C., Shahrik, L.K., Martin, B.L., Jaspers, S., Miller, T.B., Brautigan, D.L., Roberts, T.M., 1990. Polyoma small and middle T antigens and SV40 small t antigen form stable complexes with protein phosphatase 2A. *Cell* 60, 167–176.
- Panella, S., Marcocci, M.E., Celestino, I., Valente, S., Zwergel, C., Li Puma, D.D., Nencioni,

- L., Mai, A., Palamara, A.T., Simonetti, G., 2016. MC1568 inhibits HDAC6/8 activity and influenza A virus replication in lung epithelial cells: role of Hsp90 acetylation. *Future Med. Chem.* doi:10.4155/fmc-2016-0073
- Peretti, A., FitzGerald, P.C., Bliskovsky, V., Pastrana, D.V., Buck, C.B., 2015. Genome Sequence of a Fish-Associated Polyomavirus, Black Sea Bass (*Centropristis striata*) Polyomavirus 1. *Genome Announc.* 3. doi:10.1128/genomeA.01476-14
- Ponder, B.A.J., Robbins, A.K., Crawford, L.V., 1977. Phosphorylation of Polyoma and SV40 Virus Proteins. *J. Gen. Virol.* 37, 75–83. doi:10.1099/0022-1317-37-1-75
- Portran, D., Schaedel, L., Xu, Z., Théry, M., Nachury, M.V., 2017. Tubulin acetylation protects long-lived microtubules against mechanical ageing. *Nat. Cell Biol.* 19, 391–398. doi:10.1038/ncb3481
- * Poulin, D.L., DeCaprio, J.A., 2006. Is there a role for SV40 in human cancer? *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 24, 4356–4365. doi:10.1200/JCO.2005.03.7101
- Qian, M., Cai, D., Verhey, K.J., Tsai, B., 2009. A Lipid Receptor Sorts Polyomavirus from the Endolysosome to the Endoplasmic Reticulum to Cause Infection. *PLoS Pathog.* 5. doi:10.1371/journal.ppat.1000465
- Rainey-Barger, E.K., Magnuson, B., Tsai, B., 2007. A Chaperone-Activated Nonenveloped Virus Perforates the Physiologically Relevant Endoplasmic Reticulum Membrane. *J. Virol.* 81, 12996–13004. doi:10.1128/JVI.01037-07
- Rao, S., Lucero, M.G., Nohynek, H., Tallo, V., Lupisan, S.P., Garcea, R.L., Simões, E.A.F., 2016. WU and KI polyomavirus infections in Filipino children with lower respiratory tract disease. *J. Clin. Virol.* 82, 112–118. doi:10.1016/j.jcv.2016.07.013
- Richterová, Z., Liebl, D., Horák, M., Palková, Z., Štokrová, J., Hozák, P., Korb, J., Forstová, J., 2001. Caveolae Are Involved in the Trafficking of Mouse Polyomavirus Virions and Artificial VP1 Pseudocapsids toward Cell Nuclei. *J. Virol.* 75, 10880–10891. doi:10.1128/JVI.75.22.10880-10891.2001
- Riley, M.I., Yoo, W., Mda, N.Y., Folk, W.R., 1997. Tiny T antigen: an autonomous polyomavirus T antigen amino-terminal domain. *J. Virol.* 71, 6068–6074.
- Sabo, Y., Walsh, D., Barry, D.S., Tinaztepe, S., de los Santos, K., Goff, S.P., Gundersen, G.G., Naghavi, M.H., 2013. HIV-1 induces the formation of stable microtubules to enhance early infection. *Cell Host Microbe* 14. doi:10.1016/j.chom.2013.10.012

- Salunke, D.M., Caspar, D.L.D., Garcea, R.L., 1986. Self-assembly of purified polyomavirus capsid protein VP1. *Cell* 46, 895–904. doi:10.1016/0092-8674(86)90071-1
- Sanjuan, N., Porrás, A., Otero, J., 2003. Microtubule-dependent intracellular transport of murine polyomavirus. *Virology* 313, 105–116. doi:10.1016/S0042-6822(03)00309-X
- Schowalter, R.M., Buck, C.B., 2013. The Merkel Cell Polyomavirus Minor Capsid Protein. *PLoS Pathog.* 9. doi:10.1371/journal.ppat.1003558
- Shen, Q., Zheng, X., McNutt, M.A., Guang, L., Sun, Y., Wang, J., Gong, Y., Hou, L., Zhang, B., 2009. NAT10, a nucleolar protein, localizes to the midbody and regulates cytokinesis and acetylation of microtubules. *Exp. Cell Res.* 315, 1653–1667. doi:10.1016/j.yexcr.2009.03.007
- Shida, T., Cueva, J.G., Xu, Z., Goodman, M.B., Nachury, M.V., 2010. The major α -tubulin K40 acetyltransferase α TAT1 promotes rapid ciliogenesis and efficient mechanosensation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 21517–21522. doi:10.1073/pnas.1013728107
- Soppina, V., Herbstman, J.F., Skiniotis, G., Verhey, K.J., 2012. Luminal Localization of α -tubulin K40 Acetylation by Cryo-EM Analysis of Fab-Labeled Microtubules. *PLoS ONE* 7. doi:10.1371/journal.pone.0048204
- Španielová, H., Fraiberk, M., Suchanová, J., Soukup, J., Forstová, J., 2014. The encapsidation of polyomavirus is not defined by a sequence-specific encapsidation signal. *Virology* 450–451, 122–131. doi:10.1016/j.virol.2013.12.010
- Šroller, V., Hamšíková, E., Ludvíková, V., Vochozková, P., Kojzarová, M., Fraiberk, M., Saláková, M., Morávková, A., Forstová, J., Němečková, Š., 2014. Seroprevalence rates of BKV, JCV, and MCPyV polyomaviruses in the general Czech Republic population. *J. Med. Virol.* 86, 1560–1568. doi:10.1002/jmv.23841
- Štach, M., 2016. Studium pohybu polyomavirů z pozdního endozómu směrem k buněčnému jádru, Diplomová práce. Univerzita Karlova.
- Stehle, T., Harrison, S.C., 1997. High-resolution structure of a polyomavirus VP1-oligosaccharide complex: implications for assembly and receptor binding. *EMBO J.* 16, 5139–5148. doi:10.1093/emboj/16.16.5139
- Streuli, C.H., Griffin, B.E., 1987. Myristic acid is coupled to a structural protein of polyoma virus and SV40. *Nature* 326, 619–622. doi:10.1038/326619a0
- Sweet, B.H., Hilleman, M.R., 1960. The vacuolating virus, S.V. 40. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*

Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N 105, 420–427.

Takahashi, K., Sekizuka, T., Fukumoto, H., Nakamichi, K., Suzuki, T., Sato, Y., Hasegawa, H., Kuroda, M., Katano, H., 2017. Deep-Sequence Identification and Role in Virus Replication of a JC Virus Quasispecies in Patients with Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. *J. Virol.* 91. doi:10.1128/JVI.01335-16

* 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 Res.* 25, 2601–2608.

Tsai, B., Gilbert, J.M., Stehle, T., Lencer, W., Benjamin, T.L., Rapoport, T.A., 2003. Gangliosides are receptors for murine polyoma virus and SV40. *EMBO J.* 22, 4346–4355. doi:10.1093/emboj/cdg439

Valenzuela-Fernández, A., Álvarez, S., Gordon-Alonso, M., Barrero, M., Ursa, Á., Cabrero, J.R., Fernández, G., Naranjo-Suárez, S., Yáñez-Mo, M., Serrador, J.M., Muñoz-Fernández, M.Á., Sánchez-Madrid, F., 2005. Histone Deacetylase 6 Regulates Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *Mol. Biol. Cell* 16, 5445–5454. doi:10.1091/mbc.E05-04-0354

Verdel, A., Curtet, S., Brocard, M.-P., Rousseaux, S., Lemerrier, C., Yoshida, M., Khochbin, S., 2000. Active maintenance of mHDA2/mHDAC6 histone-deacetylase in the cytoplasm. *Curr. Biol.* 10, 747–749. doi:10.1016/S0960-9822(00)00542-X

Viruses, P.S.G. of the I.C. on T. of, Calvignac-Spencer, S., Feltkamp, M.C.W., Daugherty, M.D., Moens, U., Ramqvist, T., Johne, R., Ehlers, B., 2016. A taxonomy update for the family Polyomaviridae. *Arch. Virol.* 161, 1739–1750. doi:10.1007/s00705-016-2794-y

Vít, O., 2010. Studium minoritních kapsidových proteinů myšího polyomaviru, Diplomová práce. Univerzita Karlova.

Walczak, C.P., Tsai, B., 2011. A PDI Family Network Acts Distinctly and Coordinately with ERp29 To Facilitate Polyomavirus Infection. *J. Virol.* 85, 2386–2396. doi:10.1128/JVI.01855-10

Webster, D.R., Borisy, G.G., 1989. Microtubules are acetylated in domains that turn over slowly. *J. Cell Sci.* 92, 57–65.

You, J., O'Hara, S.D., Velupillai, P., Castle, S., Levery, S., Garcea, R.L., Benjamin, T., 2015. Ganglioside and Non-ganglioside Mediated Host Responses to the Mouse Polyomavirus. *PLoS*

Pathog. 11. doi:10.1371/journal.ppat.1005175

Youn, G.S., Ju, S.M., Choi, S.Y., Park, J., 2015. HDAC6 mediates HIV-1 tat-induced proinflammatory responses by regulating MAPK-NF-kappaB/AP-1 pathways in astrocytes. *Glia* 63, 1953–1965. doi:10.1002/glia.22865

Yuen, L.K., Consigli, R.A., 1985. Identification and protein analysis of polyomavirus assembly intermediates from infected primary mouse embryo cells. *Virology* 144, 127–138.

Zackova Suchanova, J., Neburkova, J., Spanielova, H., Forstova, J., Cigler, P., 2017. Retargeting Polyomavirus-Like Particles to Cancer Cells by Chemical Modification of Capsid Surface. *Bioconjug. Chem.* 28, 307–313. doi:10.1021/acs.bioconjchem.6b00622

Zhang, L., Liu, S., Liu, N., Zhang, Y., Liu, M., Li, D., Seto, E., Yao, T.-P., Shui, W., Zhou, J., 2015. Proteomic identification and functional characterization of MYH9, Hsc70, and DNAJA1 as novel substrates of HDAC6 deacetylase activity. *Protein Cell* 6, 42–54. doi:10.1007/s13238-014-0102-8

Zhang, S., Jiang, Y., Cheng, Q., Zhong, Y., Qin, Y., Chen, M., 2017. Inclusion Body Fusion of Human Parainfluenza Virus Type 3 Regulated by Acetylated α -Tubulin Enhances Viral Replication. *J. Virol.* 91. doi:10.1128/JVI.01802-16

Zhang, X., Yuan, Z., Zhang, Y., Yong, S., Salas-Burgos, A., Koomen, J., Olashaw, N., Parsons, J.T., Yang, X.-J., Dent, S.R., Yao, T.-P., Lane, W.S., Seto, E., 2007. HDAC6 Modulates Cell Motility by Altering the Acetylation Level of Cortactin. *Mol. Cell* 27, 197–213. doi:10.1016/j.molcel.2007.05.033

Zhang, Y., Gilquin, B., Khochbin, S., Matthias, P., 2006. Two Catalytic Domains Are Required for Protein Deacetylation. *J. Biol. Chem.* 281, 2401–2404. doi:10.1074/jbc.C500241200

Zhang, Y., Li, N., Caron, C., Matthias, G., Hess, D., Khochbin, S., Matthias, P., 2003. HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules in vivo. *EMBO J.* 22, 1168–1179. doi:10.1093/emboj/cdgl115

* Zheng, K., Jiang, Y., He, Z., Kitazato, K., Wang, Y., 2017. Cellular defence or viral assist: the dilemma of HDAC6. *J. Gen. Virol.* 98, 322–337. doi:10.1099/jgv.0.000679

Zheng, Z.-Z., Miao, J., Zhao, M., Tang, M., Yeo, A.E.T., Yu, H., Zhang, J., Xia, N.-S., 2010. Role of heat-shock protein 90 in hepatitis E virus capsid trafficking. *J. Gen. Virol.* 91, 1728–1736. doi:10.1099/vir.0.019323-0

Zhong, M., Zheng, K., Chen, M., Xiang, Y., Jin, F., Ma, K., Qiu, X., Wang, Q., Peng, T., Kitazato, K., Wang, Y., 2014. Heat-Shock Protein 90 Promotes Nuclear Transport of Herpes Simplex Virus 1 Capsid Protein by Interacting with Acetylated Tubulin. *PLoS ONE* 9. doi:10.1371/journal.pone.0099425

Zhu, J., Coyne, C.B., Sarkar, S.N., 2011. PKC alpha regulates Sendai virus-mediated interferon induction through HDAC6 and β -catenin. *EMBO J.* 30, 4838–4849. doi:10.1038/emboj.2011.351

Zila, 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. doi:10.1371/journal.pone.0096922

Zou, H., Wu, Y., Navre, M., Sang, B.-C., 2006. Characterization of the two catalytic domains in histone deacetylase 6. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 341, 45–50. doi:10.1016/j.bbrc.2005.12.144