

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**



# **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**2007**

**Richard Honner**

**Rekombinantní virus vakcinie exprimující EGFP a jeho  
využití pro výzkum interakcí s hostitelskou buňkou**

**Diplomová práce**

**Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta**

**Katedra genetiky a mikrobiologie**

**Richard Honner**

Praha 2007

**Vedoucí diplomové práce: MUDr. Zora Mělková, PhD.**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně s použitím citované literatury.

Praha, 9. září 2007

Richard Honner



Děkuji své školitelce MUDr. Zoře Mělkové, PhD. za odborné vedení, trpělivost a cenné rady, které mi poskytla při vypracování této diplomové práce. Za cenné rady a pomoc také velmi děkuji Mgr. Janě Liškové a všem dalším pracovníkům ÚIM 1. lékařské fakulty UK. Velký dík patří také mé rodině a přátelům za jejich podporu během studia.

Práce byla umožněna díky finanční podpoře GAČR - projekt č. 310/05/0477 a MŠMT - projekt č. MSM0021620806.

# Obsah

<b>Seznam použitých zkratk</b> .....	<b>7</b>
<b>1. Úvod</b> .....	<b>9</b>
<b>2. Literární úvod</b> .....	<b>10</b>
2.1. Obecná charakteristika čeledi <i>Poxviridae</i> .....	10
2.1.1. Klasifikace .....	11
2.1.2. Struktura virionu .....	13
2.1.2.1. Genom.....	14
2.2. GFP .....	15
2.2.1. GFP .....	15
2.2.2. EGFP.....	16
2.3. Mitochondriální membránový potenciál.....	16
2.4. Mitochondriální inhibitory.....	17
2.4.1. Antimycin A .....	17
2.4.2. Oligomycin .....	17
2.4.3. FCCP.....	18
<b>3. Cíle diplomové práce</b> .....	<b>19</b>
<b>4. Materiál a metody</b> .....	<b>20</b>
4.1. Transformace bakterií .....	20
4.1.1. Příprava kompetentních buněk DH5 $\alpha$ pro tepelný šok.....	20
4.1.2. Transformace bakterií tepelným šokem.....	20
4.2. Izolace DNA tzv. vařící metodou (zippy prep).....	21
4.2.1. Pomnožení bakterií obsahujících žádaný plazmid.....	21
4.2.2. Izolace DNA .....	21
4.3. Restrikční analýza DNA .....	22
4.4. Elektroforetické dělení v agarózovém gelu .....	23
4.4.1. Příprava agarózového gelu.....	24
4.4.2. Nastavení elektrického napětí .....	24
4.4.3. Rychlost migrace DNA v agarózovém gelu .....	25
4.5. Precipitace (srážení) DNA amonium acetátem .....	25
4.6. Izolace DNA z agarózového gelu .....	26
4.7. Ligace.....	26

4.8. Defosforylace konců lineární DNA .....	27
4.9. Izolace DNA – maxiprep (Qiagen plasmid midi kit).....	27
4.9.1. Pomnožení bakterií obsahujících žádaný plazmid.....	27
4.9.2. Izolace DNA .....	27
4.10. Určení koncentrace DNA.....	29
4.11. Použité buněčné linie .....	30
4.11.1. Buňky 143 TK <sup>-</sup> .....	30
4.11.2. Buňky HeLa G .....	30
4.11.3. Buňky BSC-40.....	30
4.12. Trypsinizace adherentních buněk .....	31
4.13. Počítání buněk v Neubauerově komůrce .....	32
4.14. Infekce buněk BSC-40, 143 TK <sup>-</sup> a HeLa G virem vakcinie .....	32
4.15. Transfekce buněk BSC-40.....	33
4.16. Selektce rekombinantního viru vakcinie exprimujícího EGFP (WR-EGFP) .....	34
4.16.1. Infekce .....	34
4.16.2. Přidání X-gal k buňkám.....	35
4.16.3. Vypichování modrých virových plaků .....	35
4.16.4. Namnožení rekombinantních virů pro další selekci .....	35
4.16.5. Infekce BSC-40 rekombinantními viry pro vyhodnocení exprese EGFP..	36
4.17. Použité rekombinantní viry vakcinie .....	36
4.18. Izolace vysokomolekulární DNA .....	37
4.18.1. Působení proteinázy K .....	37
4.18.2. Fenol – chloroformová extrakce .....	37
4.19. Southern blot.....	38
4.19.1. Elektroforéza pro Southern blot.....	38
4.19.2. Promývání agarózového gelu.....	38
4.19.3. Transfer DNA na nylonovou membránu .....	39
4.19.4. Fixace DNA na nylonovou membránu .....	39
4.19.5. Příprava hybridizační sondy .....	39
4.19.6. Značení hybridizační sondy digoxigenin-dUTP.....	40
4.19.7. Prehybridizace .....	40
4.19.8. Hybridizace.....	40
4.19.9. Posthybridizační oplachování membrány.....	40
4.19.10. Imunologická detekce .....	41

4.20. Pomnožení viru vakcinie v buňkách BSC-40 .....	42
4.20.1. Namnožení BSC 40 pro infekci .....	42
4.20.2. Infekce .....	42
4.20.3. Sklizení infikovaných buněk BSC-40.....	42
4.21. Titrace .....	43
4.21.1. Infekce .....	43
4.21.2. Barvení krystalovou violetí.....	44
4.22. Měření na průtokovém cytometru.....	44
4.22.1. Mitochondriální inhibitory.....	45
4.22.2. Fluorescenční indikátory (fluorochromy) .....	45
<b>5. Výsledky.....</b>	<b>46</b>
5.1. Klonování.....	46
5.1.1. Izolace fragmentů EGFP a EGFP + SV40 poly A.....	46
5.1.2. Izolace plazmidového vektoru pSC11 .....	48
5.1.3 Vytvoření konstruktů pSC11-EGFP (resp. pSC11-EGFP + SV40 poly A)..	49
5.1.4. Transfekce.....	51
5.2. Selektce rekombinantního viru WR-EGFP.....	52
5.3. Časový průběh fluorescence vyselektovaného WR-EGFP.....	54
5.4. Stanovení fluorescence mitochondriální masy .....	58
5.5. Stanovení mitochondriálního membránového potenciálu ( $\Delta\Psi_m$ ).....	63
<b>6. Diskuze.....</b>	<b>70</b>
6.1. Vytvoření rekombinantního viru vakcinie WR-EGFP .....	70
6.2. Časový průběh fluorescence vyselektovaného WR-EGFP.....	71
6.3. Stanovení fluorescence mitochondriální masy .....	72
6.4. Stanovení mitochondriálního membránového potenciálu ( $\Delta\Psi_m$ ) .....	74
<b>7. Závěr .....</b>	<b>76</b>
<b>8. Seznam použité literatury .....</b>	<b>77</b>

## Seznam použitých zkratek

ADP - adenosindifosfát

AMP - ampicilin

ANT - translokátor adenosinnukleosidů

ATP - adenosintrifosfát

BrdU - bromodeoxyuridin

CEV - s buňkou asociovaný obalený virus (z angl. *cell-associated enveloped virus*)

DH5 $\alpha$  - bakteriální kmen (*Escherichia coli*)

DiOC<sub>6</sub>(3) - 3, 3'- dihexyloxakarbokyanin jodid

DMEM - živné médium (z angl. *Dulbecco's modified Eagle medium*)

DMSO - dimethylsulfoxid

EDTA - ethylendiamintetraoctová kyselina

EEV - extracelulární obalený virus (z angl. *extracellular enveloped virus*)

EGFP - zeleně fluoreskující protein (z angl. *enhanced green fluorescein protein*)

FBS - fetální bovinní sérum (z angl. *foetal bovine serum*)

FCCP - karbonylkyanid-p-(trifluoromethoxy)-fenyldiazon

h.p.i. - počet hodin od infekce buněk (z angl. *hours post infection*)

IEV - vnitrobuněčný obalený virus (z angl. *intracellular enveloped virus*)

IMV - intracelulární zralý virion (z angl. *intracellular mature virion*)

kbp - počet párů kilobází

LB - živné médium Luria-Bertani

m.o.i. - multiplicita infekce

MTOC - mikrotubulové organizační centrum (z angl. *microtubule-organizing centre*)

MTR 580 - chloromethyl-X-rosamin (*Mito-Tracker Red 580*)

NAO - akridin oranž 10-nonyl bromid (z angl. *Nonyl Acridine Orange*)

NCS - neonatální telecí sérum (z angl. *neonatal calf serum*)

PEG - polyethylenglykol

PBS - fosfátový pufr

PFU - jednotka zformování virového plaku (z angl. *plaque forming unit*)

PNC - penicilin G

SAP - alkalická fosfatáza pocházející z krevet (z angl. *shrimp alkaline phosphatase*)

rpm - počet otáček za minutu (z angl. *revolutions per minute*)

SDS - dodecylsulfát sodný

SSC - citrátový pufr

STM - streptomycin sulfát

TBE - tris-borátový pufr - Tris-borát-EDTA

TE - Trisem pufovaný roztok EDTA

TMRE - tetramethylrodamin ethyl ester

Tris - tris (hydroxymethyl) aminomethan

Tween 20 - polyoxyethylensorbitan monolaurát

VDAC - iontový kanál vnější mitochondriální membrány (z angl. *voltage-dependent anion channel*).

WR - divoký kmen viru vakcinie (z angl. *Western Reserve*)

X-gal - chromogenní substrát, 4-bromo-5-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktozid

$\Delta\Psi_m$  - mitochondriální membránový potenciál



# 1. Úvod

Virus vakcinie byl v minulosti využíván k očkování proti černým neštovicím (způsobeným příbuznou variolou), což vedlo k eradikaci této smrtelné choroby. Následně se proti černým neštovicím přestalo očkovat, avšak v současnosti se v souvislosti s možným zneužitím varioly při bioterorismu začíná s očkováním vybraných skupin populace znovu, a to i v dospělosti. Rekombinantní viry vakcinie se staly základem pro vývoj vakcín proti nejrůznějším chorobám, neboť vakcinie vyvolává velmi silnou a dlouhodobou protilátkovou i buněčnou imunitu. Experimentálně je virus vakcinie nadále využíván jako vektor umožňující silnou expresi různých rekombinantních proteinů. Přestože virus vakcinie vyvolává velmi dobrou a poměrně trvalou imunitní odpověď, není přesně známo, čím je charakter této odpovědi podmíněn.

Hlavním cílem této diplomové práce bylo vytvoření rekombinantního viru vakcinie exprimujícího zelený fluorescenční protein (EGFP). Označení viru fluorescenčním proteinem následně umožnilo identifikaci infikovaných buněk pomocí průtokové cytometrie a studování procesů odehrávajících se uvnitř těchto buněk. Fluorescence EGFP, jenž emituje v oblasti FL1, umožnila vybrat pouze infikovanou populaci a na ní v oblasti FL3, díky použití různých fluorochromů, stanovit fluorescenci celkové mitochondriální masy a sledovat změny mitochondriálního membránového potenciálu specifické jen pro dané infikované buňky.

## 2. Literární úvod

### 2.1. Obecná charakteristika čeledi *Poxviridae*

*Poxviridae* jsou čeledí DNA virů replikujících se v cytoplazmě buněk obratlovců i bezobratlých. Pozornost jim je věnována zejména kvůli jejich unikátním biologickým vlastnostem a kvůli jejich vlivu na lidské zdraví (Moss, 2001). Dva zástupci této čeledi, variola virus a molluscum contagiosum virus, jsou obligátními lidskými patogeny a existuje mnoho dalších, které jsou přenosné ze zvířecích hostitelů na člověka.

Variola virus je původcem pravých neboli černých neštovic, kdysi běžné, lidstvo zasahující smrtelné choroby, která byla zcela vymýcena roku 1977, téměř 200 let po zavedení ochranného očkování virem kravských neštovic (*cowpox*) a virem vakcinie (Moss, 2001). Odtud pochází dnes běžně užívaný pojem vakcinace (z lat. *vacca*, kráva), poprvé zavedený roku 1803 Richardem Dunningem pro popsání očkovacích metod Edwarda Jennera (1749 - 1823) (Esposito & Fenner, 2001). Původ viru vakcinie ale přesně znám není (Henderson & Moss, 1988), v některých studiích se objevují spekulace, že by virus vakcinie mohl být původně odvozen od viru koňských neštovic (*horse-pox*), který byl přes lidské hostitele přenesen na krávy, ze kterých Jenner první vakcíny připravil (Huygelen, 1996).

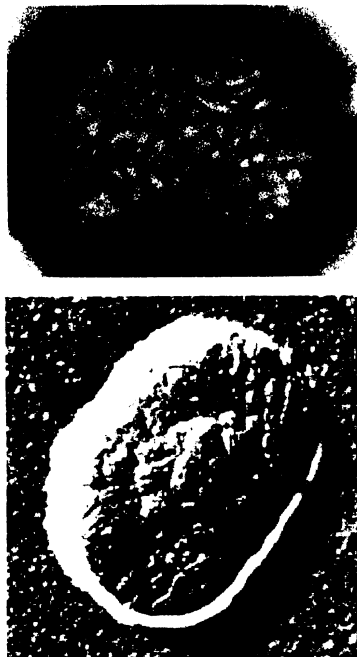
Virus vakcinie je prvním virem, který byl mikroskopicky pozorován, pěstován v tkáňové kultuře, titrován, purifikován a chemicky analyzován. Dříve převládající představa, že viry jsou pouze obalená nukleová kyselina, byla změněna právě po zjištění RNA syntetické aktivity v purifikovaném vakciniovém virionu a tento objev zahájil další výzkumy, které vedly k objevu transkriptázy, reverzní transkriptázy u RNA virů a k objasnění vzhledu virové struktury a struktury eukaryotické mRNA. Významný pokrok znamenalo také objasnění cyklu vakciniové replikace a objevy virem kódovaných proteinů ovlivňujících buněčný růst a imunitní systém (Moss, 2001). Rekombinantní viry vakcinie se staly základem pro vývoj vakcín proti mnoha chorobám, protože vakcinie vyvolává velmi silnou a dlouhodobou protilátkovou i buněčnou imunitu. Experimentálně je virus vakcinie využíván jako vektor umožňující silnou expresi různých rekombinantních proteinů.

### 2.1.1. Klasifikace

Čeď *Poxviridae* je rozdělena do dvou podčeďí, *Chordopoxvirinae* napadající obratlovce a *Entomopoxvirinae* napadající hmyz.

Do podčeďí *Chordopoxvirinae* patří osm rodů: *Orthopoxvirus*, *Parapoxvirus*, *Avipoxvirus*, *Capripoxvirus*, *Leporipoxvirus*, *Suipoxvirus*, *Molluscipoxvirus* a *Yatapoxvirus*. Zástupci každého z rodů si jsou geneticky velmi příbuzní, mají podobnou morfologii a napadají podobné hostitele (Tab. 1). Doposud nejintenzivněji studovanými byli zástupci rodu *Orthopoxvirus*, kam je řazen také již zmiňovaný virus vakcinie (Obr. 1). DNA sekvenování ukázalo, že genomy viru vakcinie, variola viru a viru kravských neštovic jsou z více než 95 % identické (Moss, 2001).

Druhá podčeď *Entomopoxvirinae* zahrnuje tři rody, které jsou rozdělené podle hostitelských řádů hmyzu (Tab. 1).



**Obr. 1:** Virion vakcinie

**Tab. 1:** Klasifikace čeledi *Poxviridae*

Podčeleď	Rod	Druh	Základní rysy
<i>Chordopoxvirinae</i>	<i>Orthopoxvirus</i>	camel pox, cowpox, ectromelia, monkey pox, raccoon pox, skunk pox, <sup>a</sup> Uasin Gishu, <sup>b,c</sup> vaccinia, <sup>c</sup> variola, vole pox	DNA ~ 200kbp G+C ~ 36% briketovitý tvar omezené rozšíření
	<i>Parapoxvirus</i>	<sup>a</sup> Auzduk disease, <sup>a</sup> chamois contagious, ecthyma, <sup>b</sup> orf, pseudocowpox, parapox of deer, <sup>a</sup> seal pox	DNA ~ 140kbp G+C ~ 64% vejcovitý tvar
	<i>Avipoxvirus</i>	canary pox, <sup>b,c</sup> fowl pox, juncopox, mynah pox, pigeon pox, psittacine pox, quail pox, <sup>a</sup> peacock pox, <sup>a</sup> penguin pox, sparrow pox, starling pox, turkey pox	DNA ~ 260kbp G+C ~ 35% briketovitý tvar ptáci
	<i>Capripoxvirus</i>	goat pox, lumpy skin disease, <sup>b</sup> sheep pox	DNA ~ 150kbp briketovitý tvar kopytnatci
	<i>Leporipoxvirus</i>	Hare fibroma, <sup>b,c</sup> myxomy, <sup>c</sup> rabbit fibroma, squirrel fibroma	DNA ~ 160kbp G+C ~ 40% briketovitý tvar hlodavci
	<i>Suipoxvirus</i>	Swine pox	DNA ~ 170kbp omezené rozšíření
	<i>Molluscipoxvirus</i>	<sup>c</sup> Molluscum contagiosum	DNA ~ 180kbp G+C ~ 60% briketovitý tvar člověk
	<i>Yatapoxvirus</i>	Tanapox, <sup>b</sup> Yaba monkey tumor	DNA ~ 145kbp G+C ~ 33% briketovitý tvar primáti a hlodavci
	<i>Entomopoxvirinae</i>	<i>Entomopoxvirus A</i>	<sup>b</sup> Melontha melontha
<i>Entomopoxvirus B</i>		<sup>b,c</sup> Amsacta moorei, <sup>c</sup> Melanoplus sanguinipes	DNA ~ 236 G+C ~ 18% vejcovitý tvar Lepidoptera a Orthoptera
<i>Entomopoxvirus C</i>		<sup>b</sup> Chironimus luridus	DNA ~ 250 až 380kbp briketovitý tvar Diptera

<sup>a</sup> pravděpodobný příslušník rodu <sup>b</sup> typický zástupce <sup>c</sup> kompletně osekvenovaný druh

Zdroj: Moss, Poxviridae, 2001

### 2.1.2. Struktura virionu

Viriony poxvirů patří k největším mezi živočišnými viry. Virion vakcinie má briketovitý tvar o přibližné velikosti  $350 \times 270 \times 250$  nm. Hlavními součástmi virionu jsou enzymy pro syntézu mRNA a genom tvořený jedním lineárním řetězcem dsDNA. Proteiny tvoří 90 %, lipidy (převážně cholesterol a fosfolipidy) 5 % a DNA 3,2 % suché váhy virionu vakcinie, která je odhadována na  $5 \times 10^{-15}$  g (Moss, 2001). Poxvirové infekční částice obsahují transkripční systém provádějící syntézu různých mRNA. Virem kódované enzymy a faktory jsou zabaleny ve virové částici a mnoho z nich, včetně RNA polymerázy, proteinu asociovaného s RNA polymerázou (RAP94), vakciniového časného transkripčního faktoru (VETF), enzymu opatřujícího čepičku na 5' konci, methylačního enzymu, poly(A) polymerázy a nukleosid trifosfát fosfohydrolázy I (NPH) se přímo podílí na syntéze a modifikaci mRNA. Další enzymy se účastní skládání virové partikule, výroby proteinů nebo balení DNA do virové partikule (Moss, 2001).

Jak již bylo zmíněno výše, virus vakcinie se replikuje v cytoplazmě infikovaných buněk a produkuje několik strukturně odlišných forem infekčního potomstva (Smith et al., 2002). První vytvořený infekční virion se nazývá intracelulární zralý virion (IMV, z angl. *intracellular mature virion*), obsahuje jedinou obalovou lipidovou membránu (Hollinshead et al., 1999) a zůstává v buňce až do její lyze. Ačkoli IMV představuje většinu z infekčního potomstva, není dostatečně vhodný pro účinné rozšíření viru z buňky do buňky a proto je tato funkce zastávána viriony, které obsahují další lipidovou membránu (Rodriguez & Smith, 1990; Blasco & Moss, 1991).

Část IMV je transportována cytoplazmou pomocí mikrotubulů pryč z místa jejich vzniku do blízkosti tzv. mikrotubulového organizačního centra (MTOC, z angl. *microtubule-organizing centre*), kde jsou obaleny další membránou a tvoří tzv. vnitrobuněčné obalené viriony (IEV, z angl. *intracellular enveloped virions*) (Smith et al., 2002). IEV se potom dále pohybují pomocí mikrotubulů směrem k buněčnému povrchu (Geada et al., 2001; Hollinshead et al., 2001; Rietdorf et al., 2001; Ward & Moss, 2001), kde fúzí s plazmatickou membránou a utvářejí tzv. s buňkou asociované obalené viriony (CEV, z angl. *cell-associated enveloped virions*). CEV poté pod plazmatickou membránou zahajují polymerizaci aktinu, určenou k vypuzení virionu ven z buňky nebo do přilehlé sousední buňky (Blasco & Moss, 1992). CEV částice oddělená od buňky se nazývá tzv. extracelulární obalený virion (EEV, z angl. *extracellular enveloped virion*). EEV zprostředkovávají rozšíření viru v hostiteli na větší vzdálenosti, přičemž ke vstupu do buněk využívají jiných buněčných receptorů (Vanderplasschen & Smith, 1997)

a rozdílných mechanismů než kterých využívají IMV (Vanderplasschen et al., 1998). IMV vstupují do buněk díky fúzi s plazmatickou membránou (Doms et al., 1990; Locker et al., 2000), zatímco EEV vstupují do buněk pomocí endocytózy (Vanderplasschen et al., 1998).

#### 2.1.2.1. Genom

Genom poxvirů je složen z jedné molekuly lineární dsDNA a jeho velikost se pohybuje v rozmezí od 130 kbp u parapoxvirů do 380 kbp u entomopoxvirů typu C. Virus vakcinie má genom dlouhý 195 kbp kódující 223 proteinů (NCBI Genome Project), kdy kódujících sekvencí je 88 % a celkové množství G+C párů je 33 %. Sekvence genomu vakcinie byla dokončena v květnu 2005. Na obou koncích DNA řetězce jsou identické jen opačně orientované sekvence nukleotidů tzv. ITR sekvence (z angl. *inverted terminal repetitions*), obsahující množství A+T párů, nespárované báze a vlásenkovitou smyčku, jež spojuje oba řetězce DNA v molekulu dsDNA (Goebel et al., 1990). Dále obsahují velmi konzervovaný úsek menší než 100 párů bází, který obsahuje sekvence potřebné k rozkladu replikační konkatemerní formy DNA, krátké sekvence tandemových repetitivních variabilní délky a několik otevřených čtecích rámců, tzv. ORF sekvencí (z angl. *open reading frames*). ITR sekvence jsou variabilní ve své délce vzhledem k možným deletcím, repetitivcím nebo transpozicím (Moss, 2001).

ORF sekvence se převážně nepřesahují a inklinují k výskytu v seskupeních směřujících k jim bližšímu konci genomu. ORF sekvence lokalizované v centrální oblasti seskupení jsou obvykle velmi konzervované a týkají se nezbytných replikačních funkcí, zatímco na konci oblasti se obvykle vyskytují variabilní ORF nebo ORF týkající se interakcí s hostitelem. Pro pojmenování jednotlivých ORF se po použití HindIII restriktivní endonukleázy používá písmene DNA fragmentu, ORF čísla (zleva doprava) ve fragmentu a písmene L nebo R, podle směru ORF sekvence, tedy např. H3L nebo A36R. Výjimka pro toto pravidlo je stanovena u počátečního HindIII C fragmentu, kde jsou jednotlivé ORF číslovány zprava doleva, kvůli vyhnutí se začátku odpočítávání z levého konce genomu, který je vysoce variabilní. Uspořádání šestnácti HindIII fragmentů viru vakcinie je tedy následující: C, N, M, K, F, E, P, O, I, G, L, J, H, D, A, B (Moss, 2001). Pozoruhodná je vysoká podobnost uspořádání centrálních genů u všech rodů podčeledi *Chordopoxvirinae*.

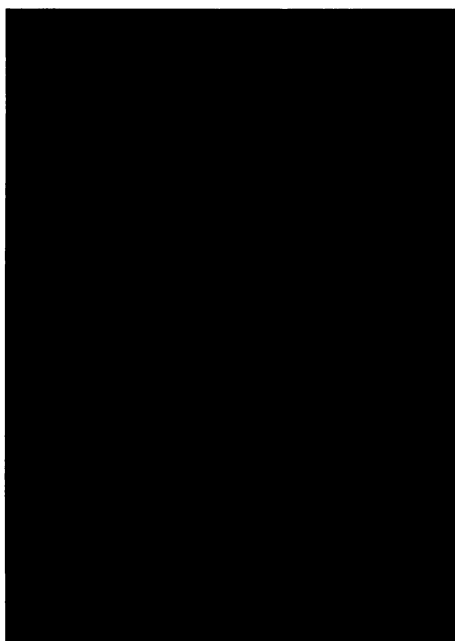
## 2.2. GFP

### 2.2.1. GFP

Zelený fluorescenční protein (GFP) byl poprvé objeven v roce 1961 Dr. Osamu Shimomurou společně s kalcium-senzitivním fotoproteinem aequorinem. Oba proteiny byly izolovány z bioluminiscenční medúzy *Aequorea victoria* (Obr. 2), která žije přes letní měsíce v povrchových vodách zátoky Tichého oceánu Puget Sound (stát Washington) na severozápadě USA (Mills, 1993). Ačkoliv aequorin aktivovaný  $\text{Ca}^{2+}$  produkuje in vitro modré světlo, *A. victoria* in vivo produkuje světlo zelené. Toto světlo je výsledkem druhého proteinu obsaženého v *A. victoria*, GFP. GFP využívá excitační energie aequorinu a emituje světlo zelené. Gen pro GFP může být vložen a poté úspěšně exprimován v mnoha druzích živých organismů (Chalfie et al., 1994).

GFP je molekula sudovitého tvaru skládající se z 238 aminokyselin (28 kDa) o průměru 24 Å a délce 42 Å (Ormö et al., 1996), která absorbuje modré světlo nebo dlouhovlnné UV záření, kdy hlavní excitační vrchol má při 395 nm a druhý minoritní vrchol při 475 nm a emituje zelené záření (emisní vrchol dosahuje 509 nm s úbočím v 540 nm) (Prasher et al., 1992). Velmi výhodnou vlastností GFP je jeho fluorescenční záření bez potřeby dodání jakýchkoli substrátů či kofaktorů a díky této vlastnosti je často využíván k mnoha biotechnologickým a medicínským účelům, jako neagresivní detekční činitel v intaktních živých buňkách a tkáních. Jeho exprese je využívána k monitorování genové exprese a proteinové lokalizace v živých buňkách (Chalfie et al., 1994). GFP nijak neovlivňuje růst buněk a jejich funkce, proto může být vhodným indikátorem buněčné transformace. A v neposlední řadě jeho unikátní vlastnosti umožňují rozdělení GFP-značených živých buněk pomocí fluorescenční průtokové cytometrie (Chalfie et al., 1994).

GFP-mutanty bývají konstruovány se zesílenými vlastnostmi, oproti divokému typu GFP, díky modifikacím jeho primární struktury. Tyto modifikace usnadňují identifikaci fluorescence v prokaryotických i eukaryotických buňkách (Galbraith et al., 1999). Zvýšení fluorescence a její stability lze dosáhnout pomocí tzv. red-shifted varianty, která je vytvořena mutací serinu v pozici 65 za threonin (S65T) (Heim et al., 1995).



**Obr. 2:** *Aequorea victoria*

### **2.2.2. EGFP**

EGFP (z angl. *enhanced green fluorescent protein*) je dokonalejší zesílenou variantou GFP. Pro zesílení soudržnosti celého proteinu (*protein folding*) obsahuje mutaci fenylalaninu v pozici 64 za leucin (P64L) a pro zesílení fluorescence a zvýšení její stability obsahuje mutaci S65T (Baumann & Reyes, 1999). EGFP má excitační vrchol při 488 nm a emisní maximum se pohybuje v rozmezí 507 až 509 nm.

### **2.3. Mitochondriální membránový potenciál**

Stanovení mitochondriálního membránového potenciálu ( $\Delta\Psi_m$ ) se používá k charakterizování buněčného metabolismu, životaschopnosti buněk a apoptózy.  $\Delta\Psi_m$  se skládá z chemické a elektrické složky vytvořené enzymy elektrontransportního řetězce (Chen, 1988). Enzymy elektrontransportního řetězce katalyzují přenos redukčních ekvivalentů ze substrátů respirace na kyslík a energie uvolněná během tohoto přenosu pohání tok protonů přes vnitřní mitochondriální membránu, který vytváří elektrochemický gradient. Tento elektrochemický gradient je poté použit k syntéze ATP v mitochondriální matrix spřažené s translokací protonů přes  $F_0F_1$ ATPázu (Voet & Voet, 1995). Export ATP



z mitochondrie, výměnou za ADP, je závislý na adenosinnukleosid transfokátoru (ANT) a na kanálu VDAC (z angl. *voltage-dependent anion channel*). ANT je lokalizován ve vnitřní mitochondriální membráně (Schlattner et al., 2001), zatímco VDAC je lokalizován v mitochondriální membráně vnější (Mannella, 1998).

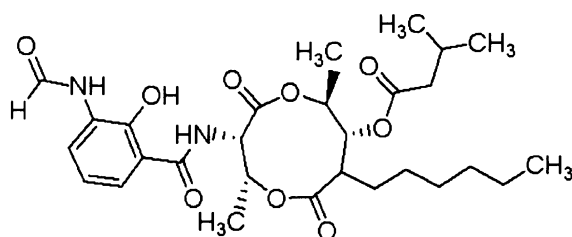
Inhibice transportu elektronů má za následek pokles mitochondriálního membránového potenciálu, kdy se k inhibici velmi citlivý zdá být komplex I - na elektronovém toku závislý (Moreira et al., 2001). Nicméně inhibice komplexu III pomocí antimycinu A a inhibice komplexu IV pomocí KCN (Macouillard-Poullatier et al., 1998) mají za následek depolarizaci membrány, která  $\Delta\Psi_m$  disipuje také. Naproti tomu inhibice mitochondriální  $F_0F_1$ ATPázy pomocí oligomycinu mitochondriální membránový potenciál zvyšuje (Macouillard-Poullatier et al., 1998).  $\Delta\Psi_m$  je dále také ovlivňován cytoplazmatickým ATP, který je tvořen glykolýzou a využívá transportu přes ANT/VDAC (Skowronek et al., 1992).

Změny  $\Delta\Psi_m$  vyvolané mitochondriálními inhibitory tedy dobře charakterizují vlastní příspěvky mitochondrie a glykolýzy k syntéze ATP.

## 2.4. Mitochondriální inhibitory

### 2.4.1. Antimycin A

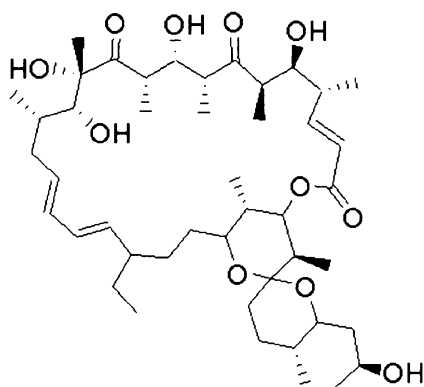
Antimycin A je inhibitorem komplexu III respiračního řetězce a tím pádem inhibuje mitochondriální respiraci spojenou se všemi mitochondriálními dehydrogenázami. Buňky vystavené působení antimycinu A jsou poté závislé pouze na ATP, který je produkován glykolýzou. Antimycin A působí pokles  $\Delta\Psi_m$  u buněčných linií BSC-40 i HeLa G (Kalbáčová et al., 2003).



**Obr. 3:** Strukturní vzorec antimycinu A

### 2.4.2. Oligomycin

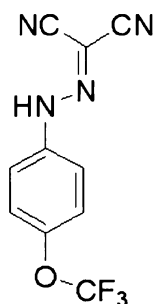
Oligomycin je inhibitorem  $F_0F_1$ ATPázy vnitřní mitochondriální membrány (Linnett & Beechey, 1979). V buňkách BSC-40 působí zvýšení  $\Delta\Psi_m$ , zatímco v buňkách HeLa G působí mírný pokles  $\Delta\Psi_m$ , což ukazuje na rozdílnost mechanismů vytváření  $\Delta\Psi_m$  mezi oběma buněčnými liniemi a na rozdílnost využití mechanismů tvorby ATP, kdy se zdá, že buňky BSC-40 využívají pro tvorbu ATP převážně oxidační fosforylaci, zatímco buňky HeLa G pro tvorbu ATP z větší části využívají glykolýzu (Kalbáčová et al., 2003).



**Obr. 4:** Strukturální vzorec oligomycinu

### 2.4.3. FCCP

Karbonylkyanid-p-(trifluoromethoxy)-fenylhydrazon (FCCP) je protonový ionofor - odpojovač oxidační fosforylace, používaný k disipaci mitochondriální membrány (Benz & McLaughlin, 1983). Vnitřní mitochondriální membránu učiní propustnou pro protony, čímž způsobí disipaci  $\Delta\Psi_m$  (Collins et al., 2000) a inhibici akumulace potenciometrických barviv uvnitř mitochondrie (Kalbáčová et al., 2003). Proto jeho efekt slouží k průkazu energizace mitochondrií.



**Obr. 5:** Strukturální vzorec karbonylkyanid-p-(trifluoromethoxy)-fenylhydrazonu (FCCP)

### **3. Cíle diplomové práce**

- Vytvoření rekombinantního viru vakcinie exprimujícího EGFP (WR-EGFP).
- Stanovení fluorescence mitochondriální masy buněčných linií HeLa G a BSC-40 a určení vlivu infekce virem vakcinie na mitochondriální masu těchto dvou buněčných linií.
- Stanovení mitochondriálního membránového potenciálu buněčných linií HeLa G a BSC-40, určení metabolismu ATP těchto buněčných linií a určení vlivu infekce virem vakcinie na mitochondriální membránový potenciál a ATP metabolismus těchto buněčných linií.

## 4. Materiál a metody

### 4.1. Transformace bakterií

#### 4.1.1. Příprava kompetentních buněk DH5 $\alpha$ pro tepelný šok

- z glycerolové konzervy odebereme vypálenou kličkou buňky DH5 $\alpha$  a dáme je do LB média
- buňky spolu s LB médiem rozetřeme na plotnu s LB agarem
- necháme růst přes noc v termostatu při 37 °C
- vypálenou kličkou odebereme 1 izolovanou kolonii a dáme ji do 10 ml LB média
- necháme třepat přes noc v termostatu při 37 °C a 240 rpm
- odebereme 1 ml bakterií, dáme do 50 ml LB média a necháme růst ve 37 °C až bude optická denzita LB média s bakteriemi dosahovat hodnot 0,1 - 0,3 při 590 nm
- dáme na 10 min na led (další kroky provádíme také na ledu)
- centrifugujeme 10 min, 3 000 rpm, 4 °C
- pelet resuspendujeme v 10 ml vychlazeného sterilního 50 mM CaCl<sub>2</sub>
- centrifugujeme 10 min, 3 000 rpm, 4 °C
- pelet resuspendujeme v 10 ml vychlazeného sterilního 50 mM CaCl<sub>2</sub>
- dáme minimálně na 1 hod na led
- centrifugujeme 10 min, 3 000 rpm, 4 °C
- pelet resuspendujeme v 1 ml vychlazeného sterilního roztoku 50 mM CaCl<sub>2</sub>, 15% glycerolu
- rozdělíme do zkumavek po 200  $\mu$ l a zamrazíme v -80 °C

#### 4.1.2. Transformace bakterií tepelným šokem

- kompetentní buňky DH5 $\alpha$  rozmrazíme na ledu a dále držíme na ledu
- ke 100  $\mu$ l kompetentních buněk přidáme 1  $\mu$ l plazmidové DNA
- necháme 30 min inkubovat na ledu
- vložíme na 90 s do vodní lázně o 42 °C
- dáme na 30 s na led
- přidáme 200  $\mu$ l LB média (bez antibiotika)
- inkubujeme 60 min ve 37 °C

- buňky (10  $\mu$ l, 50  $\mu$ l, resp. 100  $\mu$ l suspenze) rozetřeme na plotny s LB agarem (obsahujícím selekční antibiotikum - 30  $\mu$ g/ml kanamycinu nebo 100  $\mu$ g/ml ampicilinu) a necháme růst přes noc v termostatu při 37 °C

## **4.2. Izolace DNA tzv. vařící metodou (zippy prep)**

### **4.2.1. Pomnožení bakterií obsahujících žádaný plazmid**

- 1 kolonii bakterií transformovaných plazmidem (nepřekrývající se s ostatními koloniemi) naočkujeme do 5 ml LB média (obsahujícího selekční antibiotikum)
- necháme třepat přes noc v termostatu při 37 °C, 240 rpm

### **4.2.2. Izolace DNA**

- bakterie s LB médiem centrifugujeme 10 min, 3 000 rpm
- pelet resuspendujeme v 0,7 ml lyzačního roztoku (zippy pufru) a přeneseme do eppendorf zkumavky
- přidáme 50  $\mu$ l lysozymu (10 mg/ml) v zippy pufru, protřepeme a inkubujeme 5 min v pokojové teplotě
- vložíme na 45 s do vroucí vodní lázně
- vyndáme, promícháme a ještě jednou na 45 s vložíme do vroucí vodní lázně
- centrifugujeme 10 min, 14 000 rpm, 4 °C a poté pelet ze dna zkumavky odstraníme
- přidáme 0,7 ml studeného isopropanolu a promícháme
- držíme 5 min na suchém ledu, 10 min v -80 °C nebo 30 – 60 min v -20 °C
- centrifugujeme 10 min, 14 000 rpm, 4 °C
- odstraníme supernatant, pelet usušíme a resuspendujeme ve 150  $\mu$ l TE
- přidáme 350  $\mu$ l 7,5 M NH<sub>4</sub>Ac a 1 ml ethanolu, promícháme
- držíme 5 min na suchém ledu, 10 min v -80 °C nebo 30 – 60 min v -20 °C
- centrifugujeme 10 min, 14 000 rpm, 4 °C
- odstraníme supernatant a k peletu přidáme 0,5 ml 70% ethanolu
- centrifugujeme 5 min, 14 000 rpm, 4 °C
- odstraníme supernatant a k peletu přidáme 0,2 ml 70% ethanolu
- centrifugujeme 5 min, 14 000 rpm, 4 °C
- pelet usušíme a resuspendujeme v 50  $\mu$ l TE nebo H<sub>2</sub>O

#### Zippy pufr (lyzační roztok)

Sacharoza	8%
Triton X-100	5%
EDTA	50 mM
Tris pH 8,0	50 mM

- sterilizujeme filtrací přes 0,22 µm filtr

#### TE pufr

EDTA	1 mM
Tris pH 8,0	10 mM

- sterilizujeme filtrací přes 0,22 µm filtr

#### 7,5 M NH<sub>4</sub>Ac

NH <sub>4</sub> Ac	57,81 g
H <sub>2</sub> O	100 ml

- sterilizujeme filtrací přes 0,22 µm filtr

### **4.3. Restrikční analýza DNA**

- připravíme restrikční směs
- inkubujeme 1 hod v termostatu při 37 °C
- výsledek štěpení následně vyhodnotíme elektroforetickým dělením v agarózovém gelu

#### Restrikční směs

DNA (ze zippy prepu)	2,0 µl
Pufr pro enzym	2,0 µl
Restrikční enzym	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	15,5 µl

#### **4.4. Elektroforetické dělení v agarózovém gelu**

Elektroforetické dělení v agarózovém gelu se používá k analýze a separaci nukleových kyselin podle velikosti a konformace molekuly DNA. Je možné u fragmentů, jejichž velikost se pohybuje v rozmezí 250 bp až několika set tisíc bp. Provádí se v horizontální poloze, kdy je gel ponořen v příslušném pufru. Nejčastěji používaným elektroforetickým prostředím je pufr pro analytické gely, 1× koncentrovaný TBE. Rychlost pohybu molekuly DNA v agarózovém gelu závisí na koncentraci agarózy, velikosti, konformaci a flexibilitě molekuly DNA a na velikosti hodnoty elektrického napětí.

Koncentraci agarózy volíme podle velikosti fragmentů, které chceme rozdělit. Ke vzorku DNA přidáváme 10× koncentrované barvivo Blue Juice (obsahující 0,025 % bromfenolové modři), které pomáhá při zavádění vzorku do jamky (zejména při nanášení vzorku pod hladinou elektroforetického pufru – tzv. „submarine” typ nanášení) a umožňuje pozorovat migraci vzorku v gelu díky modrému zabarvení. Molekuly DNA se vizualizují ethidium bromidem, jenž interkaluje do DNA, kterou je poté možno pozorovat pod UV zářením, protože ethidium bromid oranžově fluoreskuje. Dvoušroubovice DNA s interkalovaným ethidium bromidem vykazuje maximum fluorescence ve vlnové oblasti 302 nm, pro dostatečnou viditelnost fragmentů postačuje i vlnová délka 366 nm.

Do jedné jamky v gelu dávkuje marker molekulové hmotnosti, např DNA marker X (DNA Molecular Weight Marker X (0,07-12,2 kbp), Roche) o nám známém složení. Tento marker umožňuje určení molekulové hmotnosti jednotlivých fragmentů a může být také použit pro částečnou kvantifikaci fragmentu separovaného v gelu.

**Doporučené koncentrace agarózy pro dělení fragmentů lineární ds DNA různé velikosti:**

Agaróza %	Separální rozmezí (bp)
0,6	1 000 – 20 000
0,7	800 – 10 000
0,9	500 – 7 000
1,2	400 – 6 000
1,5	200 – 4 000
2,0	100 – 3 000

- závislost mezi elektroforetickou pohyblivostí fragmentu ( $u$ ) a koncentrací agarózy ( $c$ ) je:

$$\log u = \log u_0 - Kc$$

- kde  $Kc$  je konstanta daná vlastnostmi gelu a putujících molekul,  $u_0$  je pohyblivost fragmentu ve volném pufru

#### 4.4.1. Příprava agarózového gelu

- agarózu smísíme s milli-Q H<sub>2</sub>O (množství agarózy a milli-Q H<sub>2</sub>O stanovíme podle požadované koncentrace gelu) a necháme projít varem, aby se agaróza rozpustila
- přidáme 10× koncentrovaný TBE pufr, aby výsledná koncentrace byla 1× koncentrovaný TBE a necháme na několik minut vychladnout při pokojové teplotě
- přidáme ethidium bromid (10 mg/ml), aby výsledná koncentrace byla 0,1 - 0,2 µg/ml gelu)
- přelijeme do plastové vaničky, umístíme do ní hřeben, který ponoříme tak, aby se v gelu po ztuhnutí vytvořily jamky pro nanášení vzorků DNA a necháme ztuhnout (minimálně 30 min)

##### 10× koncentrovaný TBE pufr

Tris-borát	0,089 M
EDTA	0,002 M

- pH upravíme na 7,5 - 8,0

#### 4.4.2. Nastavení elektrického napětí

- pro dělení fragmentů střední velikosti (1 až 10 kb) je vhodná intenzita elektrického pole do 5 V×cm<sup>-1</sup>
- pro fragmenty větší než 10 kb používáme intenzitu elektrického pole do 1 V×cm<sup>-1</sup>
- k analytickým účelům při dělení fragmentů malé až střední velikosti (0,5 až 10 kb) můžeme použít i vyšší intenzitu elektrického pole (až 10 V×cm<sup>-1</sup>)



#### 4.4.3. Rychlost migrace DNA v agarózovém gelu

Pohyblivost fragmentu DNA v gelu klesá s jeho zvyšující se velikostí. Pro lineární molekuly dvojřetězcové DNA přibližně platí:

$$u = K / \log M$$

- kde K je konstanta charakterizující vlastnosti gelu, u je pohyblivost fragmentu DNA a M je velikost fragmentu DNA (bp)

#### 4.5. Precipitace (srážení) DNA amonium acetátem

- DNA obsaženou v roztoku (např. v restriční směsi) precipitujeme přidáním:
  - + 0,5 V (objemu vzorku) 7,5 M NH<sub>4</sub>Ac
  - + 2 V 100% EtOH
- dáme přes noc do -20 °C nebo na 60 min do -20 °C a poté na 10 min do -80 °C
- centrifugujeme 10 min, 14 000 rpm, 4 °C
- odstraníme supernatant a k peletu přidáme 0,5 ml 70% ethanolu
- centrifugujeme 4 min, 14 000 rpm, 4 °C
- odstraníme supernatant a k peletu přidáme 0,2 ml 70% ethanolu
- centrifugujeme 4 min, 14 000 rpm, 4 °C
- pelet usušíme a resuspendujeme v TE nebo H<sub>2</sub>O
- uskladníme v -20 °C

#### **4.6. Izolace DNA z agarózového gelu**

- restrikčními endonukleázami rozštěpíme DNA na požadované fragmenty
- DNA rozdělíme elektroforézou v agarózovém gelu
- z agarózového gelu vyřízneme sterilním skalpelem požadovaný fragment DNA, pro vizualizaci DNA použijeme dlouhovlnné UV záření (366nm; tím snížíme možnost poškození molekuly DNA, oproti tomu kdybychom použili UV záření o 302 nm)
- vyříznutý gel dáme do kolonky (Sigma) (předem protažena 100  $\mu$ l TE krátkou centrifugací), kterou nasadíme do plastové eppendorf zkumavky
- centrifugujeme 10 min, 14 000 rpm
- pipetou změříme objem roztoku s DNA fragmentem, který prošel skrz kolonku
- DNA precipitujeme

#### **4.7. Ligace**

Ligací spojíme dvě různé lineární molekuly DNA (inzertní a vektorovou) vytvořením fosfodiesterové vazby mezi 5'- fosfátovým a 3'- hydroxylovým koncem těchto molekul. Reakce je katalyzována T4 DNA ligázou.

- připravíme ligační směs
- směs necháme inkubovat 12 až 16 hod při 14 °C
- poté ji použijeme k transformaci bakterií

Ligační směs (pro tzv. ligaci na tupo - molekuly DNA nemají kohezní konce)

Vektorová DNA	30 ng
Inzertní DNA	150 ng
5× pufr pro T4 DNA ligázu	4 $\mu$ l
T4 DNA ligáza	2 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	doplníme do celkových 20 $\mu$ l

## **4.8. Defosforylace konců lineární DNA**

Odstranění 5'- fosfátové skupiny z konců lineární molekuly DNA provedeme pomocí SAP. SAP je alkalická fosfatáza pocházející z krevet (z angl. *Shrimp*).

- připravíme směs enzymu, pufru a DNA, kterou chceme defosforylovat
- směs necháme inkubovat 1 hod při 37 °C
- inaktivujeme SAP 15 min při 65 °C a uskladníme v -20 °C

### Směs pro defosforylaci

DNA rozpuštěná v H <sub>2</sub> O	87,5 µl
10× pufr pro SAP	10 µl
SAP (1 U/µl)	2,5 µl

## **4.9. Izolace DNA – maxiprep (Qiagen plasmid midi kit)**

### **4.9.1. Pomnožení bakterií obsahujících žádaný plasmid**

- 1 kolonii bakterií transformovaných plasmidem (nepřekrývající se s ostatními koloniemi) naočkujeme do 5 ml LB média (obsahujícího selekční antibiotikum)
- necháme třepat 8 hod v termostatu při 37 °C, 300 rpm
- přelijeme do erlenmayerovy baňky, přidáme 25 ml LB média (obsahujícího selekční antibiotikum)
- necháme třepat 16 hod v termostatu při 37 °C, 300 rpm

### **4.9.2. Izolace DNA**

- bakterie s LB médiem centrifugujeme 15 min, 6 000 rpm, 4 °C
- pelet resuspendujeme pomocí vortexu ve 4 ml pufru P1 (obsahujícím RNasu A)
- přidáme 4 ml pufru P2, promícháme a necháme 5 min v pokojové teplotě
- přidáme 4 ml chlazeného pufru P3, promícháme a inkubujeme 15 min na ledu
- centrifugujeme 30 min, 14 000 rpm, 4 °C

- supernatant obsahující plazmidovou DNA přelijeme do další zkumavky a ještě jednou centrifugujeme 15 min, 14 000 rpm, 4 °C
- kolonkou (QIAGEN-tip) protáhneme 4 ml pufru QBT a nalijeme do ní supernatant s plazmidovou DNA z předešlého bodu
- kolonku poté prolijeme dvakrát 10 ml pufru QC
- na závěr kolonku prolijeme 5 ml pufru QF (až nyní se DNA z kolonky dostane do zkumavky, kterou chytáme procházející pufr)
- k 5 ml pufru QF obsahujícím požadovanou plazmidovou DNA přidáme 3,5 ml isopropanolu
- centrifugujeme 30 min, 14 000 rpm, 4 °C
- odstraníme supernatant a k peletu přidáme 2 ml 70% ethanolu
- centrifugujeme 5 min, 14 000 rpm, 4 °C
- odstraníme supernatant a k peletu přidáme 1 ml 70% ethanolu
- centrifugujeme 5 min, 14 000 rpm, 4 °C
- pelet usušíme a resuspendujeme ve 100 µl TE nebo H<sub>2</sub>O
- stanovíme koncentraci a čistotu izolované DNA

### Složení pufrů:

#### Pufr P1 (resuspenzní)

Tris (pH 8.0)	50 mM
EDTA	10 mM
RNaseA	100 µg/ml

#### Pufr P2 (lyzační)

NaOH	200 mM
SDS	1%

#### Pufr P3 (neutralizační)

Octan draselný (pH 5.5)	3 M
-------------------------	-----

#### Pufř QBT (ekvilibrační)

NaCl	750 mM
MOPS (pH 7.0)	50 mM
Isopropanol	15%
Triton X-100	0,15%

#### Pufř QC (omývací)

NaCl	1 M
MOPS (pH 7.0)	50 mM
Isopropanol	15%

#### Pufř QF (vymývací)

NaCl	1,25 M
Tris (pH 8,5)	50 mM
Isopropanol	15%

### **4.10. Určení koncentrace DNA**

- roztok DNA zředíme podle potřeby v TE nebo H<sub>2</sub>O (např. 50×, 100×, 200×)
- na spektrofotometru změříme absorbanční (A) při 260 nm (A<sub>260</sub>) a 280 nm (A<sub>280</sub>)
- koncentraci DNA stanovíme podle vzorce:

$$c = A_{260} \times 50 \mu\text{g}/1000 \mu\text{l} \times \text{ředění}$$

(kde platí 1 OD ~ 50 μg/ml)

- čistotu resp. znečištění DNA určuje poměr A<sub>260</sub> / A<sub>280</sub> (dostačující čistota DNA je při hodnotách 1,6 – 2,0)

## **4.11. Použité buněčné linie**

### **4.11.1. Buňky 143 TK**

Buňky 143 TK pocházejí z lidského osteosarkomu. Pěstujeme je v živném médiu DMEM obsahujícím 4,5 g/l glukózy, do kterého přidáme v 65 °C inaktivované sérum FBS, aby jeho celková koncentrace byla 10 %. Dále do 550 ml média se sérem přidáme 1 ml směsi antibiotik PNC (100 U/ml), STM (100 mg/ml) a 1,38 ml zásobního roztoku 5'-bromodeoxyuridinu (10 mg/ml), aby jeho celková koncentrace byla 25 µg/ml. Buňky pěstujeme ve 20 ml výše popsaného živného média v kultivační láhvi pro adherentní buněčné linie o obsahu dna 75 cm<sup>2</sup> při 37 °C, v 5% atmosféře CO<sub>2</sub> a 95% vlhkosti.

### **4.11.2. Buňky HeLa G**

HeLa G buňky pocházejí z lidského cervikálního karcinomu. Jsou epiteliální linií vhodnou k použití při virové diagnostice. Tyto buňky pěstujeme v živném médiu DMEM obsahujícím 4,5 g/l glukózy, do kterého přidáme inaktivované (65 °C) sérum NCS, aby jeho celková koncentrace byla 10 %. Do 550 ml média se sérem přidáváme 1 ml směsi antibiotik PNC (100 U/ml), STM (100 mg/ml). Buňky pěstujeme ve 20 ml výše popsaného živného média v kultivační láhvi pro adherentní buněčné linie o obsahu dna 75 cm<sup>2</sup> při 37 °C, v 5% atmosféře CO<sub>2</sub> a 95% vlhkosti.

### **4.11.3. Buňky BSC 40**

Buňky BSC 40 jsou odvozené od BSC-1 buněk, pocházejících z ledvinné tkáně kočkodana zeleného (*Ceropithecus aethiops*). Jsou, stejně jako buňky HeLa G, epiteliální linií vhodnou k použití při virové diagnostice. Pěstujeme je za stejných podmínek jako buňky HeLa G.

#### 4.12. Trypsinizace adherentních buněk

- pracujeme v laminárním boxu
- z kultivační láhve (o obsahu dna 75 cm<sup>2</sup>) odstraníme médium
- přisedlé buňky opláchneme 1,5 ml roztoku trypsinu
- 1,5 ml roztoku trypsinu vylijeme a přidáme další 2 ml čerstvého roztoku trypsinu
- necháme působit 5 min v termostatu při 37 °C v atmosféře 5% CO<sub>2</sub> a 95% vlhkosti
- po uvolnění buněk ode dna kultivační láhve přidáme 5 ml média s 10% sérem (10%-NCS-DMEM (pro buňky BSC 40 a HeLa G) nebo 10%-FBS-DMEM (pro buňky 143 TK<sup>-</sup>)), sérum inaktivuje trypsin
- propipetujeme o stěnu láhve, abychom rozdělili shluky buněk na jednotlivé buňky
- v kultivační láhvi necháme 0,5 ml suspenze buněk (BSC 40, 143 TK<sup>-</sup>) v médiu, resp. 1 ml suspenze buněk (HeLa G) v médiu, zbylých 6,5 ml, resp. 6 ml suspenze buněk v médiu odebereme a použijeme pro pokusy
- kultivační láhev doplníme 20 ml média s příslušným 10% sérem a dáme do termostatu (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% vlhkost)
- trypsinizaci provádíme každé 3 až 4 dny

##### Roztok trypsinu v PBS

Trypsin	0,25%
EDTA	0,05%
NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,7 mM

#### **4.13. Počítání buněk v Neubauerově komůrce**

Buňky počítáme pod mikroskopem v Neubauerově komůrce, do které nanášíme dobře propipetovanou suspenzi buněk s 0,1% trypanovou modří (1 : 1). Komůrka obsahuje 2 počítací pole, která jsou tvořena 4 velkými čtverci (1 velký čtverec má obsah 1 mm<sup>2</sup>) rozdělenými na 16 malých čtverců. Do jednoho počítacího pole nanášíme 12 μl suspenze. Počítáme všechny buňky obsažené ve velkých čtvercích a na jejich horním a levém okraji. Spočítáme průměrný počet buněk na 1 velký čtverec (N) a z následujícího vzorce určíme počet milionů buněk v 1 ml =  $N \times 2/100$ .

#### **4.14. Infekce buněk BSC-40, 143 TK<sup>-</sup> a HeLa G virem vakcinie**

- zásobní roztok viru rozmrazíme ve vodní lázni (37 °C), sonikujeme 3× 5 s, 100 W a následně držíme na ledu
- buňky naseté 24 hod předem v koncentraci  $0,3 \times 10^6$  buněk/ml/jamka na 24-jamkovou destičku opláchneme 0,5 ml DMEM vytemperovaným na 37 °C (tzn. odsajeme 1 ml 10%-NCS-DMEM ve kterém buňky rostly a přidáme 0,5 ml DMEM bez séra)
- 0,5 ml DMEM od buněk odsajeme a přidáme 200 μl viru naředěného v DMEM, koncentraci viru určujeme podle požadovaného stupně multiplicity infekce
- inkubujeme 1 hod v termostatu při 37 °C, 5% atmosféře CO<sub>2</sub> a 95% vlhkosti (každých 10 min mírně promícháme zakýváním destičkou)
- virus odsajeme, přidáme 1 ml 2%-NCS-DMEM a dáme zpět do termostatu



#### **4.15. Transfekce buněk BSC-40 infikovaných virem vakcinie kmene WR**

- buňky naseté 24 hod předem v koncentraci  $0,3 \times 10^6$  buněk/ml/jamka na 24-jamkovou destičku infikujeme (m.o.i. = 4)
- vytvoříme komplexy DNA s roztokem Super Fect (Qiagen)

##### Směs DNA - Super Fect

Plazmidová DNA	1 µg
DMEM	60 µl
Super Fect	5 µl

- směs inkubujeme 10 min při pokojové teplotě
- ke komplexům přidáme 400 µl 2%-NCS-DMEM
- infikované buňky 2× opláchneme 0,5 ml DMEM vytemperovaným na 37 °C a přidáme k nim směs s komplexy DNA ve 2%-NCS-DMEM
- inkubujeme 2 hod v termostatu při 37 °C, 5% atmosféře CO<sub>2</sub> a 95% vlhkosti
- odsajeme, přidáme 1 ml 2%-NCS-DMEM a dáme zpět do termostatu
- po 48 hod buňky s rekombinantním virem sklídíme a změříme na průtokovém cytometru nebo zamrazíme v -80 °C a používáme pro další pokusy

## **4.16. Selekcce rekombinantního viru vakcinie exprimujícího EGFP (WR-EGFP)**

Selekci rekombinantního viru vakcinie WR-EGFP od divokého kmene WR provádíme od počáteční infekce, přes růst infikovaných buněk 143 TK<sup>-</sup> v přítomnosti BrdU, následné přidání X-gal, vypichování modrých plaků, namnožení viru pro další selekci, až po infekci pro vyhodnocení exprese EGFP, kvůli dosažení dostatečné čistoty rekombinantního viru celkem 3krát.

### **4.16.1. Infekce**

- na 5 ploten pro adherentní buněčné linie o průměru 60 mm nasejeme buňky 143 TK<sup>-</sup> v koncentraci  $1,2 \times 10^6$  buněk/5 ml 10%-FBS-DMEM (25 µg/ml BrdU)/plotna a dáme růst do termostatu při 37 °C, 5% atmosféře CO<sub>2</sub> a 95% vlhkosti
- 24 hod po nasetí buněk připravíme ředící řadu viru (transfekován plazmidem pSC11-EGFP) v DMEM (od 10<sup>-1</sup> do 10<sup>-5</sup>)
- buňky opláchneme 2 ml DMEM (37 °C), odsajeme a infikujeme 450 µl z každého ředění + 1 ml DMEM po dobu 1 hod s promícháváním po 10 min
- virus odsajeme a každou plotnu zalijeme 6 ml agaru obsahujícího 25 µg/ml BrdU (teplota agaru pro přidání k buňkám je 40 °C)
- necháme ztuhnout a dáme růst do termostatu při 37 °C, v 5% atmosféře CO<sub>2</sub> a 95% vlhkosti

#### **Agar pro zalití infikovaných buněk 143 TK<sup>-</sup>**

1,9% agar	20 ml
2× DMEM	20 ml
FBS	0,8 ml (výsl.koncentrace = 2 %)
BrdU (10 mg/ml)	100 µl (výsl.koncentrace = 25 µg/ml)

#### **2× DMEM**

DMEM	5,4 g
NaHCO <sub>3</sub>	1,48 g
Milli-Q H <sub>2</sub> O	200 ml

- sterilizujeme filtrací přes 0,22 µm filtr

#### 4.16.2. Přidání X-gal k buňkám

- 72 hod po infekci přelijeme každou plotnu buněk rostoucích v agaru 1,5 ml směsi (1,9% agar + 2× DMEM + chromogenní substrát X-gal (Sigma) v DMSO (100 mg/ml)), použitá finální koncentrace X-gal u infikovaných buněk je 60 µg/ml
- směs přidáváme při teplotě 40 °C
- necháme ztuhnout a dáme zpět do termostatu

#### Směs pro přidání X-gal

2× DMEM	5 ml
1,9% agar	5 ml
X-gal v DMSO (100 mg/ml)	30 µl

- přidáváme 1,5 ml na každou plotnu

#### 4.16.3. Vypichování modrých virových plaků

Barevná detekce rekombinantních klonů virů je umožněna díky β-galaktosidáze (gen LacZ) kódované plazmidem pSC11 a chromogennímu substrátu X-gal, který po přidání difunduje agarem k infikovaným buňkám, kde je štěpen β-galaktosidázou za vzniku modrého barviva.

- 48 hod po přidání X-gal vypícheme jednotlivé modře zbarvené virové plaky z agaru sterilní skleněnou pasteurovou pipetou
- každý dáme do 0,5 ml DMEM a zamrazíme v -80 °C

#### 4.16.4. Namnožení rekombinantních virů pro další selekci

- zamražené viry pocházející z vypíchaných modrých plaků rozmrazíme ve vodní lázni (37 °C), promícháme na vortexu, sonikujeme (3× 5s, 100 W) a zmrazíme v -80 °C (tento postup zopakujeme 3×, čímž lyzujeme buňky a uvolníme virus do supernatantu)
- buňky 143 TK<sup>-</sup> naseté 24 hod předem na 24-jamkovou destičku v koncentraci  $0,15 \times 10^6$  buněk/1 ml 10%-FBS-DMEM (25 µg/ml BrdU)/jamka infikujeme 200 µl viru v DMEM po dobu 1 hod
- po 1 hod infekce virus neodsajeme a každou jamku doplníme 800 µl 2,5%-FBS-DMEM (25 µg/ml BrdU)

- virus necháme namožit v termostatu při 37 °C, v 5% atmosféře CO<sub>2</sub> a 95% vlhkosti
- po 72 hod od infikovaných buněk odsajeme 0,5 ml 2%-FBS-DMEM (25 µg/ml BrdU) a doplníme 0,5 ml čerstvého média
- za dalších 72 hod virus sklídíme a zamrazíme v -80 °C

#### 4.16.5. Infekce BSC-40 rekombinantními viry pro vyhodnocení exprese EGFP

Pro zjištění síly exprese EGFP jednotlivých virů, které jsme vypíchlí a následně namnožili infikujeme buňky BSC-40 naseté 24 hod předem v koncentraci  $0,3 \times 10^6$  buněk/ml/jamka na 24-jamkovou destičku: 100 µl viru v DMEM + 100 µl DMEM (celkově ve 200 µl, aby buňky neoschly).

48 hod po infekci buňky sklídíme a vyhodnotíme sílu exprese EGFP fluorescenční mikroskopií a na průtokovém cytometru (EGFP emituje v FL1 oblasti), což nám umožní vybrat vzorky se kterými budeme dále pokračovat v selekci rekombinantního viru WR-EGFP od viru divokého kmene WR.

### 4.17. Použité rekombinantní viry vakcinie

<b>WR-EGFP</b>	rekombinantní virus vakcinie exprimující EGFP pod vakciniovým časným/pozdním promotorem p7.5
<b>WR-GFP</b>	rekombinantní virus vakcinie exprimující GFP pod vakciniovým časným/pozdním promotorem p7.5 (poskytnut Dr. Němečkovou z ÚHK)
<b>WR-Luc</b>	rekombinantní virus vakcinie exprimující luciferázu pod vakciniovým časným/pozdním promotorem p7.5 (Rodriguez et al., 1988)
<b>WR-CAT</b>	rekombinantní virus vakcinie exprimující CAT pod vakciniovým pozdním promotorem p4b (Lee et al., 1997)
<b>WR</b>	divoký, nerekombinantní kmen viru vakcinie ( <i>Western Reserve</i> ), od kterého jsou odvozeny použité rekombinantní viry

## **4.18. Izolace vysokomolekulární DNA**

### **4.18.1. Působení proteinázy K**

- buňky obsahující požadovanou DNA sklídíme do zkumavky
- centrifugujeme 5 min, 3 000 rpm
- odstraníme supernatant a pelet resuspendujeme ve 300  $\mu$ l lyzačního roztoku
- necháme přes noc v termostatu při 37 °C
- DNA od proteinů oddělíme fenol – chloroformovou extrakcí

#### Lyzační roztok (v H<sub>2</sub>O)

Tris (pH 8,0)	50 mM
EDTA	0,1 M
SDS	1%
Proteináza K	100 $\mu$ g/ml

### **4.18.2. Fenol – chloroformová extrakce**

- ke 300  $\mu$ l směsi (požadované DNA a proteinů v lyzačním roztoku) přidáme 300  $\mu$ l roztoku fenol : chloroform : isoamylalkohol (25 : 24 : 1)
- mícháme 5 min na vodorovné třepačce
- centrifugujeme 5 min, 14 000 rpm
- opatrně odebereme vrchní vodní fázi (na rozhraní fází se vytvoří vrstvička proteinů, dbáme abychom je nenapipetovali spolu s vrchní fází) a přidáme k ní 300  $\mu$ l roztoku chloroform : isoamylalkohol (24 : 1)
- mícháme 5 min na vodorovné třepačce
- centrifugujeme 5 min, 14 000 rpm
- odebereme vrchní fázi obsahující DNA, kterou precipitujeme přidáním 0,5 objemu 7,5 M NH<sub>4</sub>Ac a 2 objemy směsi ethanol : isopropanol (1 : 1)
- dáme přes noc do -20 °C
- centrifugujeme 10 min, 14 000 rpm, 4 °C
- odstraníme supernatant a k peletu přidáme 0,5 ml 70% ethanolu
- centrifugujeme 4 min, 14 000 rpm, 4 °C
- odstraníme supernatant a k peletu přidáme 0,2 ml 70% ethanolu

- centrifugujeme 4 min, 14 000 rpm, 4 °C
- pelet usušíme a resuspendujeme ve 100 µl TE nebo H<sub>2</sub>O
- uskladníme v -20 °C

## 4.19. Southern blot

### 4.19.1. Elektroforéza pro Southern blot

- 5 µg vysokomolekulární DNA pročištěné fenol – chloroformovou extrakcí naštěpíme námi zvolenou restrikční endonukleázou přes noc ve 37 °C

#### Restrikční směs

DNA (v H <sub>2</sub> O nebo TE)	5 µg
10× konc. pufr pro danou restriktázu	4 µl
Restrikční endonukleáza	2 µl
H <sub>2</sub> O	doplníme do celkových 40 µl

- naštěpenou DNA rozdělíme elektroforézou v 0,75% agarózovém gelu a 1× TBE, při elektrickém napětí 40 V po dobu prvních 30 min, 60 V v čase 30 min až 90 min, 70 V v čase 90 min až 240 min
- po ukončení elektroforézy gel vyfotografujeme s měřítkem a zářezem označíme polohu markerů molekulové hmotnosti

### 4.19.2. Promývání agarózového gelu

- po skončení elektroforézy promyjeme gel na vodorovné třepačce v plastové vaničce ve 200 ml následujících roztoků:
  - 1.) 2× 20 min v 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl
  - 2.) 2× 20 min v 0,5 M Tris (pH 7,5), 1,5 M NaCl
  - 3.) 15 min ve 20× SSC

#### 4.19.3. Transfer DNA na nylonovou membránu

- do plastové vaničky nalijeme 500 ml 20× koncentrovaného SSC a položíme přes ní skleněnou tabulku
- vytvoříme přemostění: tabulku překryjeme 2 filtračními papíry tak, aby jejich konce byly ponořeny ve 20× SSC a zasahovaly až ke dnu vaničky (dbáme, aby se mezi sklem a filtračními papíry nevytvořily vzduchové bubliny, popř. je odstraníme)
- na přemostění položíme agarózový gel jamkami dolů, odstraníme vzduchové bubliny a gel obložíme po všech stranách parafilmem, aby roztok 20× SSC vzlínal pouze přes gel
- vystříhneme nylonovou membránu o stejných rozměrech jako gel, namočíme ji v H<sub>2</sub>O a poté ve 20× SSC a překryjeme s ní gel (opět opatrně odstraníme vzduchové bubliny)
- membránu překryjeme 4 filtračními papíry stejných rozměrů (první z filtračních papírů předem namočíme ve 20× SSC)
- na suché filtrační papíry navrstvíme 10 cm vysoký sloupec papírových ručníků, který zatížíme 0,5 - 1 kg závažím
- 20× SSC necháme přes noc vzlínat z vaničky přes gel, čímž se DNA z gelu přenesla do nylonové membrány
- po přenosu označíme tužkou na membráně pozici jamek a proužků DNA markeru a podíváme se na agarózový gel i na membránu pod UV zářením, abychom zjistili zda byla přenesena veškerá DNA

#### 20× SSC

Citrát sodný	0,3 M
NaCl	3 M

#### 4.19.4. Fixace DNA na nylonovou membránu

- membránu dáme pinzetou mezi 2 filtrační papíry a vložíme ji na 2 hod do 80 °C

#### 4.19.5. Příprava hybridizační sondy

- gen, který chceme detekovat pomocí Southern blotu, vyštěpíme z příslušného plazmidu restrikčními endonukleázami

- rozštěpenou plazmidovou DNA rozdělíme elektroforézou v agarózovém gelu a fragment obsahující požadovaný gen z gelu izolujeme (kapitola 4.6.)

#### 4.19.6. Značení hybridizační sondy digoxigenin-dUTP (DIG-High Prime DNA labeling and Detection Starter Kit II – Roche)

- 1 µg DNA doplníme do konečných 16 µl H<sub>2</sub>O
- DNA denaturujeme 10 min ve vroucí vodní lázni a následným ochlazením na ledu
- přidáme 4 µl DIG-High Prime
- promícháme a inkubujeme přes noc v termostatu při 37 °C
- reakci zastavíme zahřátím na 65 °C po dobu 10 min

#### 4.19.7. Prehybridizace

- nylonovou membránu prehybridizujeme v 11 ml hybridizačního pufru Dig Easy Hyb, 30 min, ve 42 °C

#### 4.19.8. Hybridizace

- digoxigeninem značenou sondu denaturujeme 5 min ve vroucí vodní lázni a následným ochlazením na ledu
- sondu přidáme k 7 ml hybridizačního pufru Dig Easy Hyb
- nylonovou membránu inkubujeme spolu se sondou v hybridizačním pufru Dig Easy Hyb v termostatu přes noc při 42 °C

#### Hybridizační pufr

SSC	5× koncentrovaný
N-lauroylsarkosin	0,1%
SDS	0,02%
Blokovací roztok s kaseinem (součást kitu)	1%

#### 4.19.9. Posthybridizační oplachování membrány

- po ukončení hybridizace membránu oplachujeme v následujících roztocích:
  - 1.) 2× 5 min ve 2× SSC, 0,1% SDS za pokojové teploty
  - 2.) 2× 15 min v 0,5× SSC, 0,1% SDS v 65 °C
  - 3.) 2× 15 min v 0,1× SSC, 0,1% SDS v 65 °C



#### 4.19.10. Imunologická detekce

- po ukončení posthybridizačního oplachování membránu dále oplachujeme:
  - 1.) 3 min v odmývacím pufru
  - 2.) 1 hod v blokovacím pufru
  - 3.) 40 min v Ab roztoku
  - 4.) 2× 15 min v odmývacím pufru
  - 5.) 20 min v detekčním pufru
- poté membránu položíme na fólii na vodorovné podložce a necháme ji nasáknout 1 ml chemiluminiscenčního substrátu 0,25 mM CSPD (součást kitu)
- necháme 5 min při pokojové teplotě
- odstraníme přebytečný CSPD substrát z membrány a v průsvitné fólii ji vložíme do kazety pro expozici filmů
- dáme inkubovat na 15 min do 37 °C
- ve fotokomoře vložíme do kazety RTG film a exponujeme 5 s, 1 min, 5 min, 10 min a 30 min
- RTG filmy vyvoláme

##### Pufr s kyselinou maleinovou

Kyselina maleinová	0,1 M
NaCl	0,15 M

- pH upavíme na 7,5 (použitím NaOH)

##### Odmývací pufr

Pufr s kyselinou maleinovou	300 ml
Tween 20	0.9 ml (výsl. koncentrace 0,3 %)

##### Detekční pufr

Tris-Cl	0,1 M
NaCl	0,1 M

- pH upavíme na 9,5

### Blokovací pufr

10× Blokovací roztok (součást kitu)	12 ml
Pufr s kyselinou maleinovou	120 ml

### Ab roztok

Anti-Dig-AP konjugát (součást kitu)	2 µl
Blokovací pufr	20 ml

## **4.20. Pomnožení viru vakcinie v buňkách BSC-40**

### **4.20.1. Namnožení BSC-40 pro infekci**

- na 5 ploten pro adherentní buněčné linie o průměru 150 mm nasejeme buňky BSC-40 v koncentraci  $2 \times 10^6$  buněk/20 ml 10%-NCS-DMEM/plotna
- dáme růst do termostatu při 37 °C, v 5% atmosféře CO<sub>2</sub> a 95% vlhkosti
- po 4 dnech buňky trypsinizujeme a rozdělíme je na 10 ploten (150 mm) v koncentraci  $15 \times 10^6$  buněk/20 ml 10%-NCS-DMEM /plotna

### **4.20.2. Infekce**

- po 24 hod od nasetí je v každé plotně cca  $30 \times 10^6$  buněk
- buňky opláchneme 5 ml DMEM a infikujeme (m.o.i.= 0,05) v 6 ml (1 ml ředěného viru + 5 ml DMEM bez séra)
- inkubujeme 1 hod v termostatu při 37 °C, 5% atmosféře CO<sub>2</sub> a 95% vlhkosti
- 6 ml inokula neodsajeme, přidáme 4 ml 10%-NCS-DMEM + 10 ml DMEM bez séra (aby výsledná koncentrace byla 2%-NCS-DMEM) a dáme zpět do termostatu

### **4.20.3. Sklizení infikovaných buněk BSC-40**

- 48 hod po infekci buňky z ploten sklídíme do 50 ml zkumavek
- centrifugujeme 5 min, 4 000 rpm, 4 °C
- každý pelet resuspendujeme ve 2 ml DMEM a přeneseme do jedné zkumavky k ostatním resuspendovaným peletům
- centrifugujeme 5 min, 4 000 rpm, 4 °C

- pelet resuspendujeme v 1,5 ml DMEM
- promícháme na vortexu, sonikujeme (3× 5s, 100 W), zamrazíme v -80 °C a rozmrazíme (tento postup zopakujeme 3×)
- centrifugujeme 5 min, 4 000 rpm, 4 °C
- odebereme 1. supernatant
- pelet resuspendujeme v 1 ml DMEM
- promícháme na vortexu, sonikujeme (3× 5s, 100 W), zamrazíme v -80 °C a rozmrazíme (tento postup zopakujeme 3×)
- centrifugujeme 5 min, 4 000 rpm, 4 °C
- odebereme 2. supernatant
- pelet resuspendujeme v 0,5 ml DMEM
- promícháme na vortexu, sonikujeme (3× 5s, 100 W), zamrazíme v -80 °C a rozmrazíme (tento postup zopakujeme 3×)
- centrifugujeme 5 min, 4 000 rpm, 4 °C
- odebereme 3. supernatant
- 1., 2. a 3. supernatant dáme dohromady a centrifugujeme 5 min, 4 000 rpm, 4 °C
- supernatant rozdělíme do 1,5 ml zkumavek (po 1 ml, 500 µl, 5× 100 µl a 25 µl (na titraci)) a zamrazíme v -80 °C

#### **4.21.1. Titrace**

- zásobní roztok viru rozmrazíme ve vodní lázni (37 °C), sonikujeme 3× 5 s, 100 W a následně držíme na ledu
- připravíme ředící řadu viru v DMEM (od  $10^{-2}$  do  $10^{-8}$ )

#### **4.21.1. Infekce**

- BSC-40 naseté 24 hod předem v koncentraci  $0,3 \times 10^6$  buněk/1 ml/jamka na 12-jamkovou destičku opláchneme 0,5 ml DMEM vytemperovaným na 37 °C
- 0,5 ml DMEM odsajeme a přidáme 200 µl viru z příslušného ředění ( $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ )
- inkubujeme 1 hod v termostatu při 37 °C, 5% atmosféře CO<sub>2</sub> a 95% vlhkosti (každých 10 min mírně promícháme zakýváním destičkou)
- virus odsajeme, přidáme 1 ml 2%-NCS-DMEM a dáme zpět do termostatu

#### 4.21.2. Barvení krystalovou violetí

- 48 hod po infekci odsajeme 2%-NCS-DMEM od buněk a přidáme 1 ml 4% paraformaldehydu
- celou destičku dáme na 2 min do vany se 4% paraformaldehydem (inaktivuje virus)
- destičku vyndáme a do každé jamky přidáme 200  $\mu$ l 1% roztoku krystalové violeti
- necháme 2 min působit a poté přebytečnou krystalovou violet' smyjeme vodou
- dna jamek zůstanou fialově obarvená se světlými místy po jednotlivých virových placích
- virové plaky spočítáme a podle ředění určíme koncentraci viru (PFU/ml)

#### 4.22. Měření na průtokovém cytometru

- nasejeme buňky v koncentraci  $0,3 \times 10^6$  buněk/1 ml/jamka na 24-jamkovou destičku
- 24 hod po nasetí buňky infikujeme (m.o.i. = 2), máme i neinfikované kontrolní jamky
- v intervalech 6 hod a 24 hod po infekci k buňkám přidáme na 30 min příslušný mitochondriální inhibitor
- buňky sklídíme do zkumavek pro měření na průtokovém cytometru (Becton-Dickinson FACScan), přidáme příslušný fluorescenční indikátor a 15 min inkubujeme v termostatu při 37 °C, 5% atmosféře CO<sub>2</sub> a 95% vlhkosti
- vzorky změříme na průtokovém cytometru
- získaná data analyzujeme programem WinMDI 2.8 (Joseph Trotter, <http://facs.scripps.edu/software.html>)

#### 4.22.1. Mitochondriální inhibitory

- mitochondriální inhibitory přidáváme k rostoucím adherovaným buňkám přímo do jamek na 24-jamkové destičce a inkubujeme 30 min v termostatu při 37 °C, 5% atmosféře CO<sub>2</sub> a 95% vlhkosti

**Antimycin A** (Sigma) - zásobní roztok o koncentraci 1 mg/ml, používáme finální koncentraci 5  $\mu$ g/ml

**Oligomycin** (Sigma) - zásobní roztok o koncentraci 1 mg/ml, používáme finální koncentraci 5 µg/ml

**FCCP** (Sigma) - 1 mM zásobní roztok, 10 µM finální koncentrace

#### **4.22.2. Fluorescenční indikátory (fluorochromy)**

- fluorescenční indikátory přidáváme ke sklizeným buňkám a společně inkubujeme 15 min v termostatu při 37 °C, 5% atmosféře CO<sub>2</sub> a 95% vlhkosti

**TMRE** (Sigma) - 1 mM zásobní roztok v ethanolu, 1 µM finální koncentrace, používáme ke stanovení mitochondriálního membránového potenciálu, fluorescenci detekujeme v FL3 oblasti

**NAO** (Molecular Probes) - 0,5 mM zásobní roztok v ethanolu, 50 nM finální koncentrace, používáme ke stanovení mitochondriální masy, fluorescenci detekujeme v FL1 oblasti

**MTR 580** (Molecular Probes) - 0,5 mM zásobní roztok v ethanolu, 40 nM finální koncentrace, používáme ke stanovení mitochondriální masy, fluorescenci detekujeme v FL3 oblasti

## 5. Výsledky

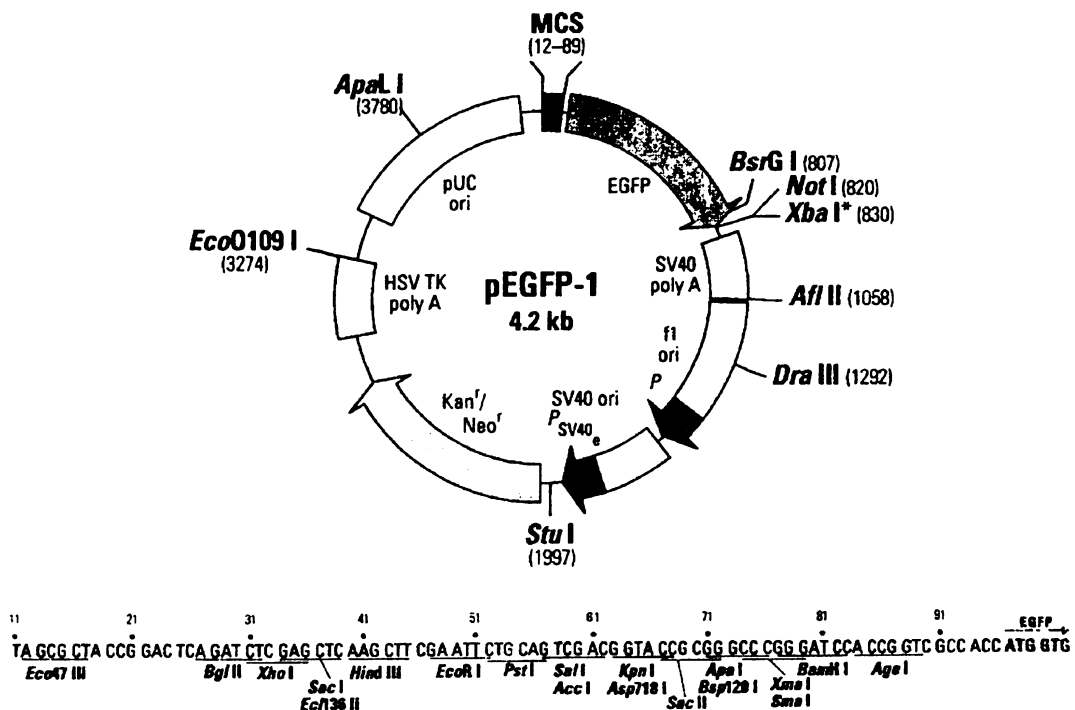
### 5.1. Klonování

Cílem bylo vytvoření rekombinantního viru vakcinie kmene WR exprimujícího zelený fluorescenční protein (EGFP) pod vakciniovým časným/pozdním promotorem p7.5.

Gen pro EGFP jsem vnesl do vakciniového inzerčního vektoru pSC11 (Mackett et al., 1982) pod vakciniovým časným/pozdním promotorem p7.5 a rekombinantní virus následně připravil homologní rekombinací do oblasti genu pro thimidinkinázu vakciniového kmene WR.

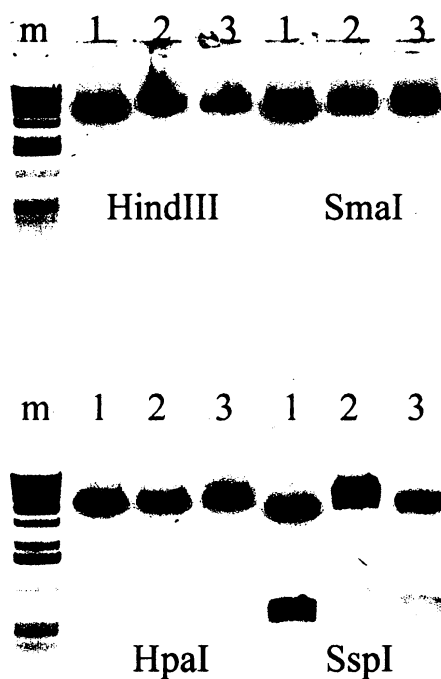
#### 5.1.1. Izolace fragmentů EGFP a EGFP + SV40 poly A

Pro získání dostatečného množství genu pro EGFP jsem transformoval kompetentní buňky DH5 $\alpha$  plazmidem pEGFP-1 (Molecular Probes) (Obr. 6) a z narostlých bakterií plazmidovou DNA izoloval (3 vzorky zipy prep).



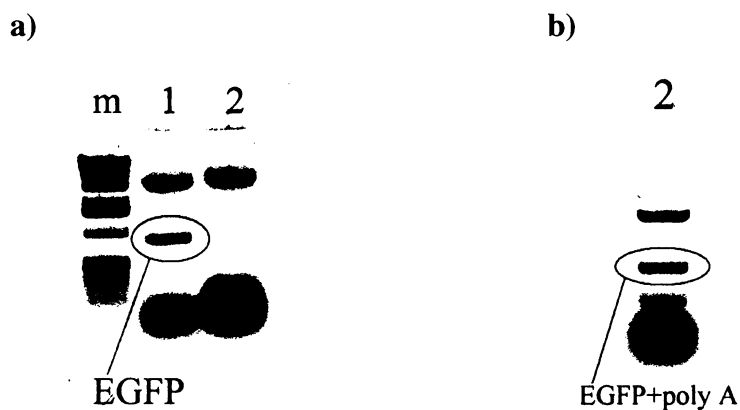
Obr. 6: Schéma plazmidu pEGFP-1

Abych se přesvědčil o totožnosti pEGFP-1 v izolovaných vzorcích a o jejich čistotě, štěpil jsem plazmidovou DNA restrikčními endonukleázami HindIII, SmaI, HpaI a SspI a výsledky štěpení vyhodnotil elektroforézou v agarózovém gelu (30 min, 60 V, 0,8% gel) (Obr. 7).



**Obr. 7:** Restrikční analýza DNA izolované z bakteriálních kolonií transformovaných pEGFP-1 pomocí restrikčních endonukleáz HindIII, SmaI, HpaI a SspI.  
(m - DNA marker X; 1, 2, 3 - vzorky pEGFP-1 (zippy prep))

Restrikci pEGFP-1, ze které jsem následně izoloval EGFP (1) a EGFP + SV40 poly A (2) fragmenty jsem provedl pomocí restrikčních endonukleáz SmaI + HpaI (1) resp. SmaI a SspI (2). K zisku fragmentu EGFP + SV40 poly A (2) bylo potřeba rozštěpenou DNA po štěpení restriktaázou SmaI přesrážet a až poté rozštěpit restriktaázou SspI. Obě štěpení jsem vyhodnotil kontrolní elektroforézou v agarózovém gelu (z 1  $\mu$ l restr. směsi). Zbytek restrikční směsi (39  $\mu$ l) jsem elektroforeticky rozdělil (2 hod, 40 V, 1% gel) a požadované EGFP (1) a EGFP + SV40 poly A (2) fragmenty z agarózového gelu izoloval (Obr. 8).

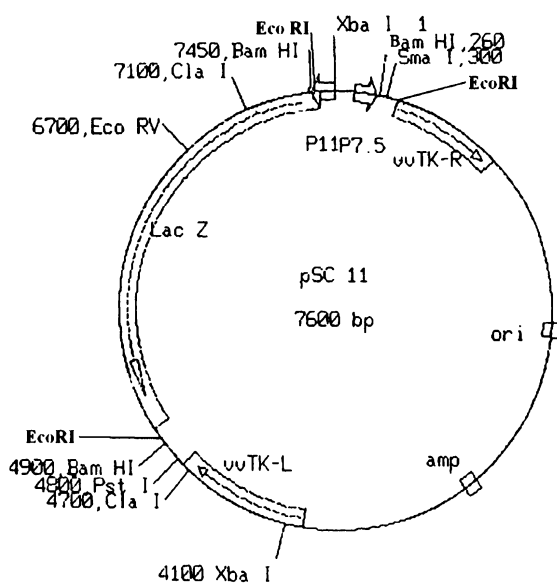


**Obr. 8:** Restrikční analýza DNA izolované z bakteriálních kolonií transformovaných pEGFP-1.

- a) m - DNA marker X; 1 - pEGFP štěpený SmaI + HpaI; 2 - pEGFP štěpený SmaI
- b) 2 - přesrážený vzorek 2 a) dále štěpený SspI

### 5.1.2. Izolace plazmidového vektoru pSC11

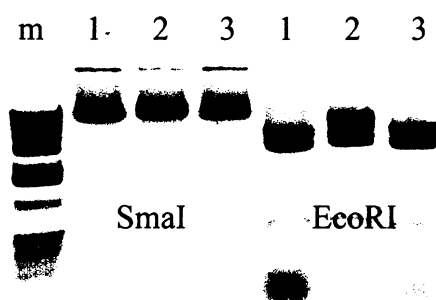
K získání dostatečného množství plazmidového vektoru pSC11 (Obr. 9) jsem jím transformoval kompetentní buňky DH5 $\alpha$  a z narostlých bakterií plazmidovou DNA izoloval (3 vzorky zippy prep).



**Obr. 9:** Schéma vektoru pSC11.



Totožnost plazmidu v izolovaných vzorcích jsem ověřil restriční analýzou pomocí enzymů SmaI a EcoRI, kterou jsem vyhodnotil elektroforézou v agarózovém gelu (30 min, 60 V, 0,8% gel) (Obr. 10).

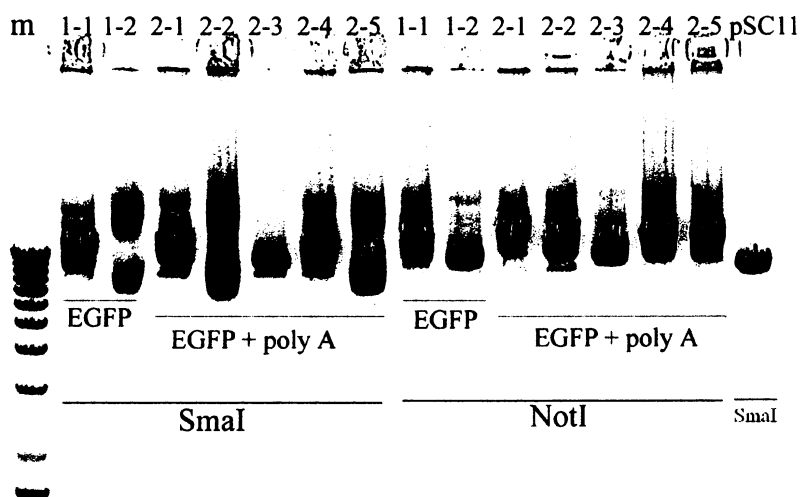


**Obr. 10:** Restriční analýza DNA izolované z bakteriálních kolonií transformovaných pSC11 pomocí restričních endonukleáz SmaI, resp. EcoRI.  
(m - DNA marker X; 1, 2, 3 - vzorky pSC11)

Abych mohl do izolovaného plazmidu pSC11 vložit fragment pro EGFP, resp. pro EGFP + SV40 poly A, linearizoval jsem jej pomocí restriční endonukleázy SmaI a konce lineární molekuly defosforyloval pomocí SAP, která odstranila 5'- fosfátové skupiny z konců molekuly DNA. Linearizovaný a defosforylovaný pSC11 jsem elektroforeticky rozdělil (2 hod, 40 V, 1% gel) a z agarózového gelu izoloval.

### 5.1.3. Vytvoření konstruktů pSC11-EGFP (resp. pSC11-EGFP + SV40 poly A)

Linearizovaný plazmid pSC11 jsem spojil s genem pro EGFP, resp. s genem pro EGFP + SV40 poly A pomocí T4 DNA ligázy. Vzniklým konstruktem jsem transformoval kompetentní buňky DH5 $\alpha$  a z narostlých bakterií plazmidovou DNA izoloval (2 vzorky zippy prep pSC11-EGFP a 5 vzorků zippy prep pSC11-EGFP + poly A). Abych vybral od každého plazmidu pouze 1 vzorek pro jeho následnou homologní rekombinaci do genomu viru vakcinie, provedl jsem restriční analýzu všech vzorků restriktázami SmaI a NotI (80 min, 60 V, 0,8% gel) (Obr. 11).



**Obr. 11:** Restrikční analýza DNA izolované z bakteriálních kolonií transformovaných pSC11-EGFP a pSC11-EGFP + SV40 poly A pomocí restrikčních endonukleáz SmaI, resp. NotI. Jako kontrolu jsem použil plazmid pSC11 bez inzertní DNA rozštěpený SmaI.

Pro další práci jsem vybral vzorky 1-1 (pSC11-EGFP) a 2-4 (pSC11-EGFP + SV40 polyA) - izolované pomocí komerční sady QIAGEN PLASMID MIDI KIT a změřil jsem jejich koncentraci.

Koncentrace DNA ve vzorcích:

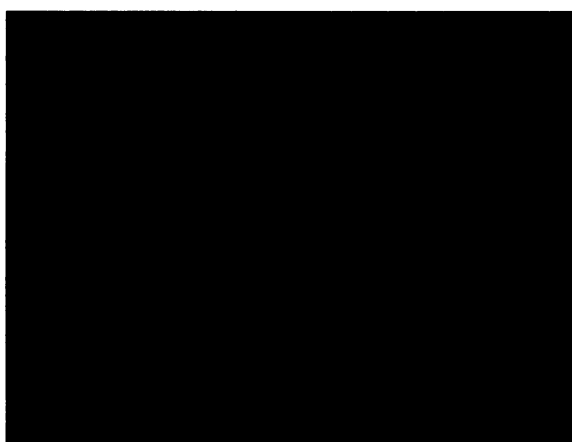
pSC11-EGFP.....907,45 µg/ml  
 pSC11-EGFP + SV40 polyA.....714,27 µg/ml

Pro transfekci do genomu viru vakcinie jsem dále použil pouze plazmid pSC11-EGFP.

#### 5.1.4. Transfekce

Rekombinantní virus vakcinie jsem připravil homologní rekombinací vakciniového inzerčního vektoru pSC11 obsahujícího gen pro EGFP (pSC11-EGFP) do oblasti genu pro thymidinkinázu vakciniového kmene WR.

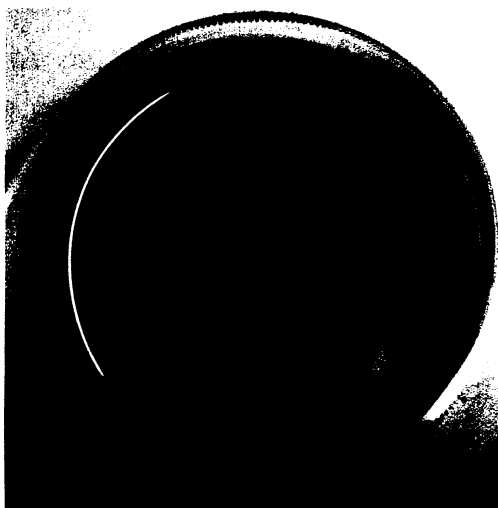
Buňky BSC-40 jsem infikoval virem vakcinie kmene WR (m.o.i. = 4) a 1 hod po infekci jsem tyto buňky transfekoval plazmidem pSC11-EGFP. 48 hod po transfekci jsem buňky obsahující rekombinantní virus (WR-EGFP) sklídl a expresi EGFP stanovil měřením na průtokovém cytometru a fluorescenční mikroskopií (Obr. 12).



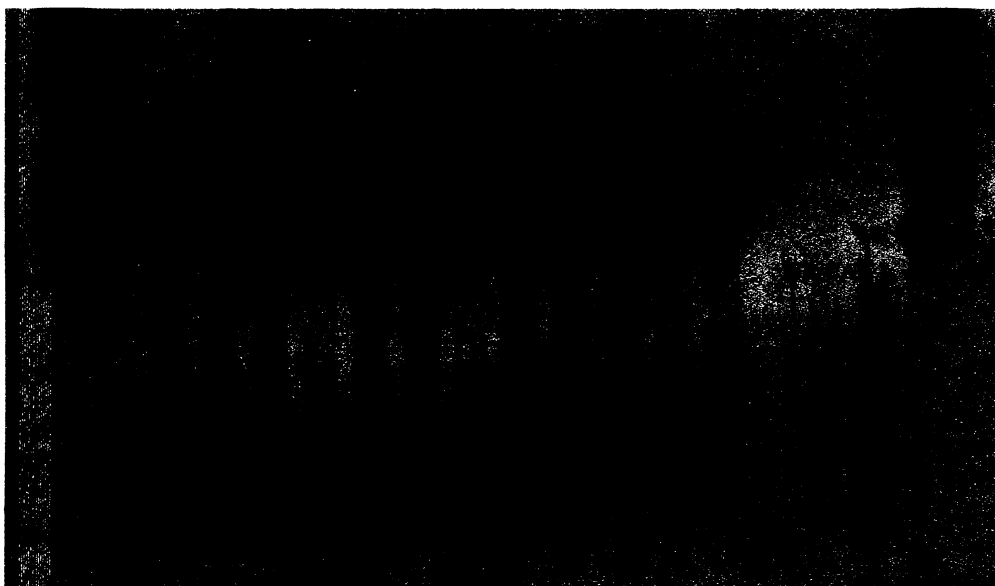
**Obr. 12:** Buňky BSC-40 infikované rekombinantním virem vakcinie (WR-EGFP) exprimujícím zeleně fluoreskující protein EGFP.

## **5.2. Selekcce rekombinantního viru vakcinie WR-EGFP**

Rekombinantní virus vakcinie WR-EGFP jsem selektoval od viru vakcinie divokého kmene WR vypichováním modře zbarvených virových plaků z agarů obsahujících dva selekční markery - chromogenní substrát X-gal (60  $\mu\text{g/ml}$ ) a BrdU (25  $\mu\text{g/ml}$ ) (Obr. 13). Tyto virové plaky byly tvořeny rekombinantním kmenem viru (Blasco & Moss, 1995). Pro dosažení maximální čistoty rekombinantního viru jsem vypichování modrých virových plaků provedl tříkolově. Čistotu vzorků WR-EGFP po třetím kole vypichování jsem ověřil pomocí Southern blot analýzy (Obr. 14), dva vybrané vzorky bez příměsi divokého kmene WR jsem pomnožil v buňkách BSC-40 a pomocí titrace určil jejich koncentraci (PFU/ml).



**Obr. 13:** Modré plaky tvořené rekombinantním virem vakcinie (WR-EGFP) v agaru obsahujícím dva selekční markery - chromogenní substrát X-gal (60  $\mu\text{g/ml}$ ) a BrdU (25  $\mu\text{g/ml}$ ).



**Obr. 14:** RTG film - Southern blot analýza pro ověření čistoty WR-EGFP vzorků po 3. kole selekce. (m - DNA marker X; 1 - mock; 2 - WR-CAT; 3 - WR; 4 až 13 vyselektované vzorky WR-EGFP: 4 - 3.3.2, 5 - 3.3.3, 6 - 3.4.1, 7 - 7.1.2, 8 - 7.1.5, 9 - 7.5.1, 10 - 7.5.5, 11 - 8.1.2, 12 - 8.2.1, 13 - 8.2.4; 14 - mock; 15 - WR-CAT; 16 - WR)

Stopa po příměsi divokého kmene WR se vyskytla ve vzorcích WR-EGFP 7.5.1 a WR-EGFP 8.2.4. Pro další pokusy jsem vybral vzorky WR-EGFP 7.1.5 a WR-EGFP 3.3.2, které příměs kmene WR neobsahovaly a po měření na průtokovém cytometru vykazovaly nejintenzivnější fluorescenci. Tyto dva vzorky jsem pomnožil v buňkách BSC-40 a pomocí titrace stanovil jejich koncentraci (PFU/ml).

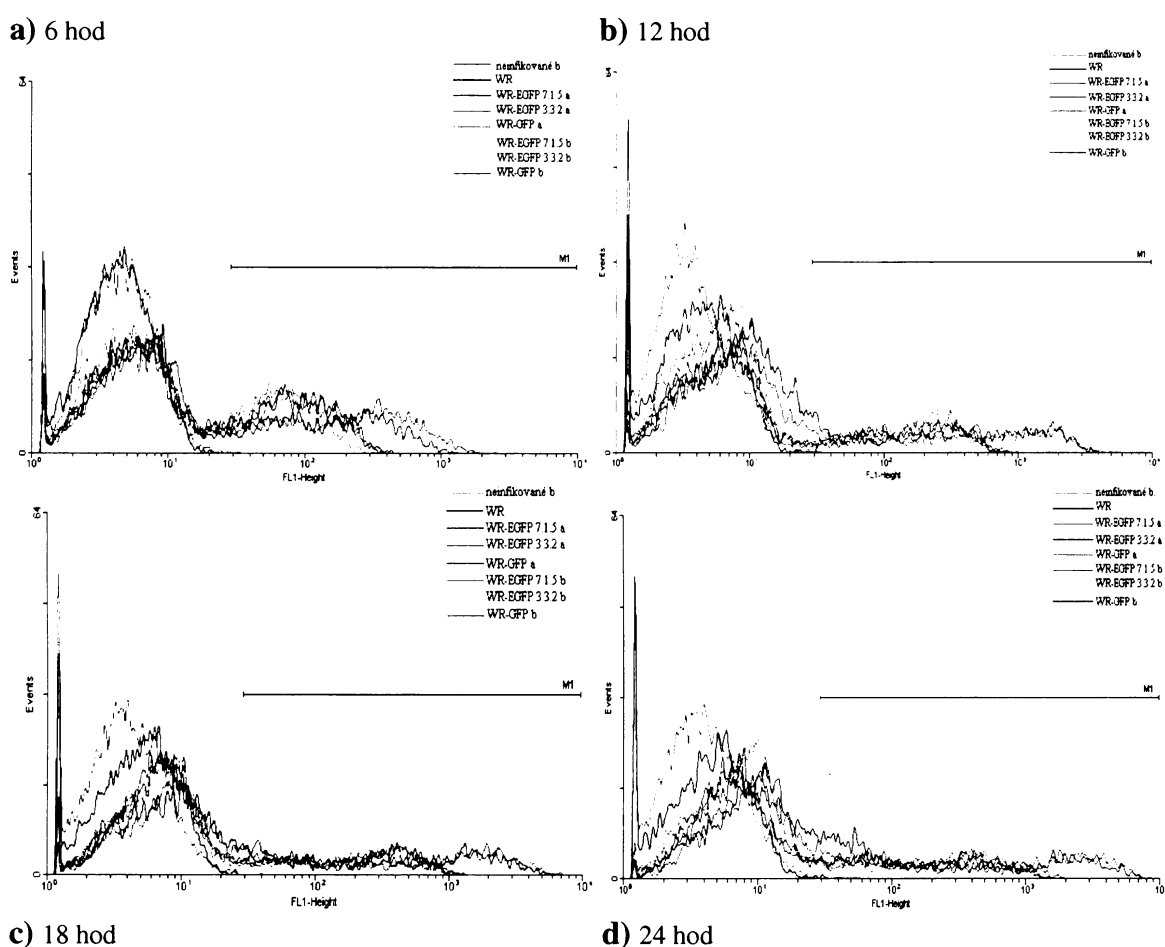
Koncentrace vzorků WR-EGFP (7.1.5 a 3.3.2)

WR-EGFP 7.1.5.....	$1,7 \times 10^9$ PFU/ml
WR-EGFP 3.3.2.....	$1,7 \times 10^9$ PFU/ml

### 5.3. Časový průběh fluorescence vyselektovaného WR-EGFP

Průběh fluorescence EGFP v infikovaných buňkách BSC-40 jsem měřil u dvou různých izolátů vyselektovaného rekombinantního WR-EGFP (7.1.5 a 3.3.2) v časech 6 hod, 12 hod, 18 hod a 24 hod po infekci. Porovnával jsem:

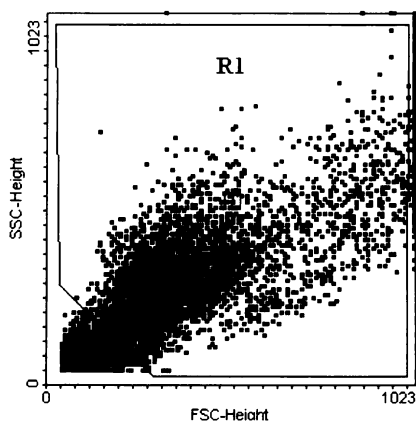
- průběh fluorescence izolátů WR-EGFP mezi sebou (Obr.15) (Tab. 2)
- průběh fluorescence izolátů WR-EGFP s WR-GFP (Obr.15) (Tab. 2)  
(laskavě poskytnut Dr. Němečkovou z ÚHK)
- růst izolátů WR-EGFP (Tab. 3)



**Obr. 15:** Průběh fluorescence EGFP (izoláty 7.1.5 a 3.3.2) a GFP v časových intervalech 6, 12, 18 a 24 hod po infekci BSC-40 (m.o.i. = 2).

Kontrolní vzorky: BSC-40 infikované WR a neinfikované BSC-40.

Měřeny jsou pouze buňky nacházející se v oblasti R1 (Obr. 16).



**Obr. 16:** Oblast R1 obsahující buňky které byly použity pro hodnocení jednotlivých měření. Vně R1 se nachází buněčná drť a dublety buněk.

**Tab. 2:** Počet buněk BSC-40 infikovaných WR-EGFP (izoláty 7.1.5 a 3.3.2) nebo WR-GFP v časových intervalech 6, 12, 18 a 24 hod po infekci (m.o.i. = 2).

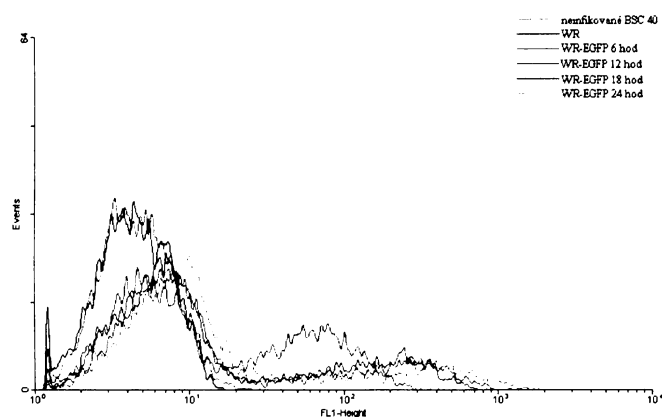
h.p.i.	Virus	Zelená fluorescence (% buněk z celkové označené populace)
		průměr (n=2)
6	WR-EGFP 7.1.5	32,28
	WR-EGFP 3.3.2	31,89
	WR-GFP	36,25
12	WR-EGFP 7.1.5	23,00
	WR-EGFP 3.3.2	22,73
	WR-GFP	28,71
18	WR-EGFP 7.1.5	24,55
	WR-EGFP 3.3.2	23,64
	WR-GFP	33,01
24	WR-EGFP 7.1.5	25,53
	WR-EGFP 3.3.2	23,66
	WR-GFP	36,39

označená populace = buňky pod markerem M (viz Obr. 15) nacházející se v oblasti R1 (viz Obr. 16)

**Tab. 3:** Růst WR-EGFP 7.1.5, WR-EGFP 3.3.2 a WR-Luc v buňkách BSC-40 a HeLa G 6 hod a 24 hod po infekci (m.o.i. = 2).

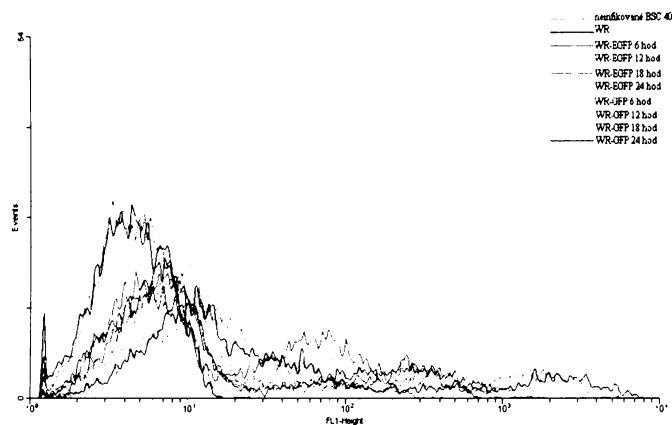
Virus	BSC-40		HeLa G	
	h.p.i.		h.p.i.	
	6 hod	24 hod	6 hod	24 hod
	PFU/ml	PFU/ml	PFU/ml	PFU/ml
WR-EGFP 7.1.5	$4,85 \times 10^5$	$2,10 \times 10^7$	$1,70 \times 10^5$	$2,03 \times 10^7$
WR-EGFP 3.3.2	$4,58 \times 10^5$	$2,40 \times 10^7$	$1,90 \times 10^5$	$1,98 \times 10^7$
WR-Luc	$5,68 \times 10^5$	$2,28 \times 10^7$	$1,28 \times 10^5$	$2,45 \times 10^7$

Na překryvu všech čtyř časových intervalů (6 hod, 12 hod, 18 hod, 24 hod) byla zřejmá zvyšující se fluorescence EGFP v infikovaných buňkách BSC-40 (Obr. 17). Také byl patrný rozdíl mezi fluorescencí EGFP a GFP při překryvu fluorescence všech čtyř časových intervalů obou proteinů (Obr. 18)



**Obr. 17:** Časový průběh fluorescence EGFP v BSC-40 infikovaných WR-EGFP (izolát 7.1.5) v časových intervalech 6 hod, 12 hod, 18 hod a 24 hod po infekci (m.o.i. = 2).  
Kontrolní vzorky: BSC-40 infikované WR a neinfikované BSC-40.





**Obr. 18:** Porovnání průběhu fluorescence EGFP vs. GFP v buňkách BSC-40 infikovaných WR-EGFP (7.1.5) resp. WR-GFP v časových intervalech 6, 12, 18 a 24 hod od infekce (m.o.i. = 2). Kontrolní vzorky: BSC-40 infikované WR a neinfikované BSC 40.

### Shrnutí kapitoly 5.3.

- Fluorescence i růst izolátů WR-EGFP 7.1.5 a WR-EGFP 3.3.2 byly srovnatelné.
- WR-GFP vykazoval vyšší fluorescenci než oba izoláty WR-EGFP, pravděpodobně díky vyšší expresi regulované syntetickým promotorem.
- Při infekci všemi 3 rekombinantními viry bylo v čase 6 hod po infekci infikováno přibližně 30 - 35 % buněk (z označené populace), kdy můžeme s určitostí říci, že v tomto čase ještě nemohlo dojít k sekundární infekci.
- Pro další pokusy jsem vybral izolát WR-EGFP 7.1.5.

#### **5.4. Stanovení fluorescence mitochondriální masy**

Při stanovení mitochondriální masy buněčných linií HeLa G a BSC-40 jsme vycházeli z předpokladu, že fluorescence mitochondriální masy by měla samotnou mitochondriální masu představovat. Ke stanovení fluorescence mitochondriální masy v infikovaných, resp. neinfikovaných buňkách HeLa G a BSC-40 jsem použil dva různé fluorochromy - MTR 580 a NAO. MTR 580 emituje v oblasti FL3 a NAO v oblasti FL1. Abych ověřil jestli se fluorochromy neakumulují v mitochondriích v závislosti na jejich membránovém potenciálu, stanovoval jsem fluorescenci mitochondriální masy v buňkách vystaveným působení ionoforu FCCP po dobu 30 min (+ FCCP) i v buňkách působení FCCP nevystaveným (- FCCP). Pomocí MTR 580 a NAO jsem stanovil fluorescenci mitochondriální masy v celkové populaci buněk (směs buněk infikovaných a neinfikovaných) HeLa G (Tab. 4), resp. BSC-40 (Tab. 5) v čase 0 hod, 6 hod a 24 hod po infekci.

MTR 580 emitující v oblasti FL3 jsem dále použil pro stanovení fluorescence mitochondriální masy pouze v infikované populaci buněk HeLa G (Tab. 6), resp. BSC-40 (Tab. 7) v čase 6 hod a 24 hod po infekci. Buňky jsem infikoval virem WR-EGFP, jehož zelená fluorescence emituje v oblasti FL1, díky čemuž jsem mohl vybrat pouze infikovanou populaci a na té v oblasti FL3 změřit fluorescenci mitochondriální masy pomocí MTR 580. Pro porovnání jsem také ve všech případech měřil buňky mock-infikované (simulovaná infekce).

**Tab. 4:** Fluorescence mitochondriální masy v buňkách **HeLa G** - v celkové populaci. Stanovena pomocí fluorochromů MTR 580 a NAO, 0 hod, 6 hod a 24 hod po infekci viry WR-EGFP (izolát 7.1.5) a kontrolním WR-Luc. Fluorescence mitochondriální masy je měřena v buňkách vystaveným ionoforu FCCP (+ FCCP) i v buňkách FCCP nevystaveným (- FCCP). (m.o.i. = 2)

h.p.i.	Virus	Mitochondriální masa		Mitochondriální masa	
		(Fluorescence FL3) - průměr		(Fluorescence FL1) - průměr	
		průměr (n=4)	S.E.M.	průměr (n=4)	S.E.M.
0		<b>- FCCP</b>		<b>- FCCP</b>	
	Uninf.	9,16	0,77	10,83	0,25
		<b>+ FCCP</b>		<b>+ FCCP</b>	
	Uninf.	8,20	0,17	7,93	0,15
6		<b>- FCCP</b>		<b>- FCCP</b>	
	Mock	18,07	1,40	28,205	5,42
	WR-EGFP	18,55	0,19	-	-
	WR-Luc	19,48	0,62	23,755	4,64
		<b>+ FCCP</b>		<b>+ FCCP</b>	
	Mock	12,05	0,50	19,43	5,49
	WR-EGFP	12,43	0,50	-	-
	WR-Luc	12,89	0,45	21,365	4,90
24		<b>- FCCP</b>		<b>- FCCP</b>	
	Mock	12,64	0,43	21,46	4,27
	WR-EGFP	13,59	0,51	-	-
	WR-Luc	13,10	0,22	17,89	2,27
		<b>+ FCCP</b>		<b>+ FCCP</b>	
	Mock	10,65	1,56	16,66	1,93
	WR-EGFP	12,01	1,07	-	-
	WR-Luc	11,21	1,47	17,4	2,67

S.E.M. - standardní odchylka od průměru (standard error of mean)

Uninf. - neinfikované buňky, Mock - mock-infikované buňky (simulovaná infekce)

**Tab. 5:** Fluorescence mitochondriální masy v buňkách **BSC-40** - v celkové populaci. Stanovena pomocí fluorochromů MTR 580 a NAO, 0 hod, 6 hod a 24 hod po infekci viry WR-EGFP (izolát 7.1.5) a kontrolním WR-Luc. Fluorescence mitochondriální masy je měřena v buňkách vystaveným ionoforu FCCP (+ FCCP) i v buňkách FCCP nevystaveným (- FCCP). (m.o.i. = 2)

h.p.i.	Virus	Mitochondriální masa		Mitochondriální masa	
		(Fluorescence FL3) - průměr		(Fluorescence FL1) - průměr	
		průměr (n=4)	S.E.M.	průměr (n=4)	S.E.M.
0		<b>- FCCP</b>		<b>- FCCP</b>	
	Uninf.	20,96	0,15	16,51	1,10
		<b>+ FCCP</b>		<b>+ FCCP</b>	
	Uninf.	15,73	0,10	17,01	0,32
6		<b>- FCCP</b>		<b>- FCCP</b>	
	Mock	29,72	5,07	25,96	3,80
	WR-EGFP	25,91	6,07	-	-
	WR-Luc	25,76	5,73	32,92	5,35
		<b>+ FCCP</b>		<b>+ FCCP</b>	
	Mock	17,43	3,36	29,81	2,61
	WR-EGFP	17,96	3,27	-	-
	WR-Luc	16,93	3,36	29,26	4,04
24		<b>- FCCP</b>		<b>- FCCP</b>	
	Mock	16,30	0,78	31,44	3,28
	WR-EGFP	20,26	0,48	-	-
	WR-Luc	16,79	0,92	24,04	0,31
		<b>+ FCCP</b>		<b>+ FCCP</b>	
	Mock	11,18	1,48	29,24	4,95
	WR-EGFP	14,55	1,49	-	-
	WR-Luc	12,48	1,66	29,35	4,35

S.E.M. - standardní odchylka od průměru (standard error of mean)

Uninf. - neinfikované buňky, Mock - mock-infikované buňky (simulovaná infekce)

## Shrnutí Tab. 4 a Tab. 5

### 1. Závislost akumulace fluorochromů na mitochondriálním membránovém potenciálu

Akumulace obou fluorochromů se jevila jako potenciálově závislá. MTR 580 nejevil tak velké rozdíly mezi vzorky v rámci jedné skupiny (časového intervalu). K dalšímu hodnocení jsem proto použil výsledky ze vzorků, ke kterým byl ionofor FCCP přidán (+ FCCP).

## 2. Porovnání fluorescence charakterizující mitochondriální masu mezi buňkami HeLa G a BSC-40

Fluorescence mitochondriální masy buněk HeLa G byla přibližně dvakrát nižší než fluorescence mitochondriální masy buněk BSC-40.

## 3. Vliv infekce na mitochondriální masu celkové populace

Mitochondriální masa charakterizovaná fluorescencí, byla obdobná v mock-infikovaných buňkách i v celkové populaci obsahující buňky infikované i neinfikované. (Lze vysledovat tendenci ke zvýšení fluorescence v celkové populaci buněk.)

**Tab. 6:** Fluorescence mitochondriální masy v buňkách **HeLa G** - v infikované populaci. Stanovena pomocí fluorochromu MTR 580, 0 hod, 6 hod a 24 hod po infekci rekombinantním virem WR-EGFP (izolát 7.1.5). Fluorescence mitochondriální masy je měřena v buňkách vystaveným ionoforu FCCP (+ FCCP) i v buňkách FCCP nevystaveným (- FCCP). (m.o.i. = 2)

h.p.i.	Virus	Mitochondriální masa	
		(Fluorescence FL3) - průměr	
		průměr (n=4)	S.E.M.
0		<b>- FCCP</b>	
	Uninf.	9,16	0,77
		<b>+ FCCP</b>	
	Uninf.	8,20	0,17
6		<b>- FCCP</b>	
	Mock	18,07	1,40
	WR-EGFP	24,82	0,33
		<b>+ FCCP</b>	
	Mock	12,05	0,50
	WR-EGFP	16,36	1,05
24		<b>- FCCP</b>	
	Mock	12,64	0,43
	WR-EGFP	19,94	0,29
		<b>+ FCCP</b>	
	Mock	10,65	1,56
	WR-EGFP	16,48	1,96

S.E.M. - standardní odchylka od průměru (standard error of mean)

Uninf. - neinfikované buňky, Mock - mock-infikované buňky (simulovaná infekce)

**Tab. 7:** Fluorescence mitochondriální masy v buňkách **BSC-40** - v **infikované populaci**. Stanovena pomocí fluorochromu MTR 580, 0 hod, 6 hod a 24 hod po infekci rekombinantním virem WR-EGFP (izolát 7.1.5). Fluorescence mitochondriální masy je měřena v buňkách vystaveným ionoforu FCCP (+ FCCP) i v buňkách FCCP nevystaveným (- FCCP). (m.o.i. = 2)

h.p.i.	Virus	Mitochondriální masa	
		(Fluorescence FL3) - průměr	
		průměr (n=4)	S.E.M.
0		<b>- FCCP</b>	
	Uninf.	20,96	0,15
		<b>+ FCCP</b>	
6	Uninf.	15,73	0,10
		<b>- FCCP</b>	
	Mock	29,72	5,07
	WR-EGFP	25,67	5,08
		<b>+ FCCP</b>	
24	Mock	17,43	3,36
	WR-EGFP	19,81	2,35
		<b>- FCCP</b>	
	Mock	16,30	0,78
	WR-EGFP	30,91	1,01
	<b>+ FCCP</b>		
	Mock	11,18	1,48
	WR-EGFP	22,60	2,44

S.E.M. - standardní odchylka od průměru (standard error of mean)

Uninf. - neinfikované buňky, Mock - mock-infikované buňky (simulovaná infekce)

### **Shrnutí Tab. 6 a Tab.7**

#### **Vliv infekce na mitochondriální masu infikovaných buněk**

Infekce virem vakcinie vede ke zvýšení mitochondriální masy infikovaných buněk oproti mock-infikovaným buňkám. 6 hod po infekci byla mitochondriální masa v infikovaných buňkách HeLa G o 36 % vyšší oproti buňkám mock-infikovaným, 24 hod po infekci byla mitochondriální masa v infikovaných buňkách HeLa G vyšší dokonce o 55 %. V infikovaných buňkách BSC-40 se mitochondriální masa 6 hod po infekci zvýšila o 14 % oproti buňkám mock-infikovaným, 24 hod po infekci byla mitochondriální masa vyšší dokonce o 102 % oproti buňkám mock-infikovaným.

## **5.5. Stanovení mitochondriálního membránového potenciálu ( $\Delta\Psi_m$ )**

Pro stanovení mitochondriálního membránového potenciálu buněčných linií HeLa G a BSC-40 jsem použil potenciometrické barvivo TMRE, které se v mitochondriích akumuluje v závislosti na jejich membránovém potenciálu (Farkas et al., 1989). Fluorescence akumulovaného TMRE poté samotnému mitochondriálnímu membránovému potenciálu odpovídá (Darzynkiewicz et al., 1982; Bunting et al., 1989). TMRE emituje v oblasti FL3. Pozorování změn mitochondriálního membránového potenciálu infikovaných buněk v průběhu infekce mi umožnilo označení viru vakcinie EGFP, jehož zelená fluorescence emituje v oblasti FL1. Díky této skutečnosti jsem mohl vybrat pouze infikovanou populaci buněk a na té v oblasti FL3 změřit fluorescenci TMRE, která membránový potenciál mitochondrií představovala.

Cílem pokusu bylo určit z jakých metabolických drah (glykolízy nebo oxidační fosforylace) získávají dvě různé buněčné linie (HeLa G a BSC-40) ATP pro udržení mitochondriálního membránového potenciálu a jak se toto mění v infikovaných buňkách v průběhu infekce. Buňky proto byly před sklizením vystaveny na 30 min působení mitochondriálních inhibitorů - antimycinu A, oligomycinu nebo FCCP (viz kapitola 2.4.).

Měřil jsem fluorescenci TMRE charakterizující mitochondriální membránový potenciál celkové populace buněk (obsahující infikované i neinfikované buňky) HeLa G (Tab. 8), resp. BSC-40 (Tab. 9) v časech 0 hod, 6 hod a 24 hod po infekci virem WR-EGFP (izolát 7.1.5) a kontrolním virem WR-Luc.

Dále jsem pomocí TMRE stanovoval  $\Delta\Psi_m$  pouze infikované populace buněk HeLa G (Tab. 10), resp. BSC-40 (Tab. 11), kterou jsem identifikoval díky infekci virem WR-EGFP.

**Tab. 8:** Fluorescence TMRE charakterizující mitochondriální membránový potenciál v celkové populaci buněk HeLa G - 0 hod, 6 hod a 24 hod po infekci viry WR-EGFP (izolát 7.1.5) a kontrolním WR-Luc. Buňky byly 30 min před sklizením vystaveny působení mitochondriálních inhibitorů FCCP, oligomycinu nebo antimycinu A. (m.o.i. = 2)

h.p.i.	Mitochondriální inhibitor	Virus	% buněk s vyšším potenciálem		% mock-infik. buněk bez inhibitoru
			(TMRE - Fluorescence FL3) - průměr		
			průměr (n=4)	S.E.M.	
0	0	Uninf.	41,03	1,21	100,00
	FCCP	Uninf.	3,19	0,27	7,77
	Oligomycin	Uninf.	54,53	1,64	132,91
	Antimycin A	Uninf.	25,59	0,96	63,38
6	0	Mock	25,99	0,93	100,00
		WR-EGFP	17,65	1,49	67,92
		WR-Luc	18,50	1,56	71,17
	FCCP	Mock	1,88	0,83	7,24
		WR-EGFP	3,67	0,81	14,10
		WR-Luc	3,47	1,08	13,33
	Oligomycin	Mock	23,09	2,44	88,85
		WR-EGFP	14,91	0,43	57,35
		WR-Luc	18,07	0,63	69,51
	Antimycin A	Mock	10,31	0,72	39,65
		WR-EGFP	10,88	0,66	41,86
		WR-Luc	11,02	0,77	42,40
24	0	Mock	13,50	1,40	100,00
		WR-EGFP	10,56	1,26	78,23
		WR-Luc	7,41	1,07	54,84
	FCCP	Mock	3,64	0,48	26,94
		WR-EGFP	4,93	1,22	36,51
		WR-Luc	3,92	1,08	29,03
	Oligomycin	Mock	15,84	1,54	117,33
		WR-EGFP	11,37	1,31	84,21
		WR-Luc	8,77	0,99	64,97
	Antimycin A	Mock	7,92	0,69	58,64
		WR-EGFP	12,08	0,40	89,46
		WR-Luc	9,29	0,36	68,82

S.E.M. - standardní odchylka od průměru (standard error of mean)

Uninf. - neinfikované buňky, Mock - mock-infikované buňky (simulovaná infekce)



**Tab. 9:** Fluorescence TMRE charakterizující mitochondriální membránový potenciál v celkové populaci buněk BSC-40 - 0 hod, 6 hod a 24 hod po infekci viry WR-EGFP (izolát 7.1.5) a kontrolním WR-Luc. Buňky byly 30 min před sklizením vystaveny působení mitochondriálních inhibitorů FCCP, oligomycinu nebo antimycinu A. (m.o.i. = 2)

h.p.i.	Mitochondriální inhibitor	Virus	% buněk s vyšším potenciálem		% mock-infik. buněk bez inhibitoru
			(TMRE - Fluorescence FL3) - průměr		
			průměr (n=4)	S.E.M.	
0	0	Uninf.	11,50	0,71	100,00
	FCCP	Uninf.	1,49	0,09	12,93
	Oligomycin	Uninf.	31,58	1,89	274,51
	Antimycin A	Uninf.	0,87	0,27	7,52
6	0	Mock	2,63	1,02	100,00
		WR-EGFP	5,86	0,72	222,84
		WRLuc	5,46	0,50	207,61
	FCCP	Mock	0,43	0,13	16,18
		WR-EGFP	0,87	0,12	33,21
		WRLuc	0,82	0,21	31,11
	Oligomycin	Mock	5,20	0,58	198,00
		WR-EGFP	14,90	1,79	567,17
		WRLuc	12,63	0,98	480,49
	Antimycin A	Mock	0,56	0,11	21,41
		WR-EGFP	0,96	0,40	36,63
		WRLuc	1,11	0,32	42,25
24	0	Mock	8,80	2,62	100,00
		WR-EGFP	2,41	0,54	27,37
		WRLuc	1,92	0,62	21,83
	FCCP	Mock	2,07	0,31	23,51
		WR-EGFP	4,60	0,80	52,25
		WRLuc	2,05	1,47	23,25
	Oligomycin	Mock	10,57	0,75	120,21
		WR-EGFP	4,60	0,85	52,33
		WRLuc	4,46	1,00	50,65
	Antimycin A	Mock	2,25	0,33	25,58
		WR-EGFP	2,57	0,91	29,25
		WRLuc	1,13	0,37	12,82

S.E.M. - standardní odchylka od průměru (standard error of mean)

Uninf. - neinfikované buňky, Mock - mock-infikované buňky (simulovaná infekce)

**Tab. 10:** Fluorescence TMRE charakterizující mitochondriální membránový potenciál v infikované populaci buněk HeLa G - 0 hod, 6 hod a 24 hod po infekci rekombinantním virem WR-EGFP (izolát 7.1.5). Buňky byly 30 min před sklizením vystaveny působení mitochondriálních inhibitorů FCCP, oligomycinu nebo antimycinu A. (m.o.i. = 2)

h.p.i.	Mitochondriální inhibitor	Virus	% buněk s vyšším potenciálem		% mock-infik. buněk bez inhibitoru	% infik. buněk bez inhibitoru
			(TMRE - Fluorescence FL3) - průměr			
			průměr (n=4)	S.E.M.		
0	0	Uninf.	41,03	1,21	100,00	
	FCCP	Uninf.	3,19	0,27	7,77	
	Oligomycin	Uninf.	54,53	1,64	132,91	
	Antimycin A	Uninf.	25,59	0,96	63,38	
6	0	Mock	25,99	0,93	100,00	100,00
		WR-EGFP	70,51	2,03	271,32	
	FCCP	Mock	1,88	0,83	7,24	13,60
		WR-EGFP	9,59	2,68	36,91	
	Oligomycin	Mock	23,09	2,44	88,85	91,08
		WR-EGFP	64,22	2,86	247,11	
	Antimycin A	Mock	10,31	0,72	39,65	81,72
		WR-EGFP	57,62	2,77	221,71	
24	0	Mock	13,50	1,40	100,00	100,00
		WR-EGFP	29,84	1,37	220,96	
	FCCP	Mock	3,64	0,48	26,94	23,86
		WR-EGFP	7,12	1,13	52,73	
	Oligomycin	Mock	15,84	1,54	117,33	76,76
		WR-EGFP	22,90	0,84	169,62	
	Antimycin A	Mock	7,92	0,69	58,64	87,91
		WR-EGFP	26,23	2,29	194,24	

S.E.M. - standardní odchylka od průměru (standard error of mean)

Uninf. - neinfikované buňky, Mock - mock-infikované buňky (simulovaná infekce)

**Tab. 11:** Fluorescence TMRE charakterizující mitochondriální membránový potenciál v infikované populaci buněk BSC-40 - 0 hod, 6 hod a 24 hod po infekci rekombinantním virem WR-EGFP (izolát 7.1.5). Buňky byly 30 min před sklizením vystaveny působení mitochondriálních inhibitorů FCCP, oligomycinu nebo antimycinu A. (m.o.i. = 2)

h.p.i.	Mitochondriální inhibitor	Virus	% buněk s vyšším potenciálem		% mock-infik. buněk bez inhibitoru	% infik. buněk bez inhibitoru
			průměr (n=4)	S.E.M.		
			(TMRE - Fluorescence FL3) - průměr			
0	0	Uninf.	11,50	0,71	100,00	
	FCCP	Uninf.	1,49	0,09	12,93	
	Oligomycin	Uninf.	31,58	1,89	274,51	
	Antimycin A	Uninf.	0,87	0,27	7,52	
6	0	Mock	2,63	1,02	100,00	
		WR-EGFP	16,85	2,63	641,39	100,00
	FCCP	Mock	0,43	0,13	16,18	
		WR-EGFP	1,77	0,86	67,27	10,49
	Oligomycin	Mock	5,20	0,58	198,00	
		WR-EGFP	53,14	6,82	2022,26	315,29
Antimycin A	Mock	0,56	0,11	21,41		
	WR-EGFP	1,01	0,17	38,44	5,99	
24	0	Mock	8,80	2,62	100,00	
		WR-EGFP	4,69	1,25	53,35	100,00
	FCCP	Mock	2,07	0,31	23,51	
		WR-EGFP	1,43	0,66	16,20	30,37
	Oligomycin	Mock	10,57	0,75	120,21	
		WR-EGFP	12,98	1,32	147,58	276,61
Antimycin A	Mock	2,25	0,33	25,58		
	WR-EGFP	0,82	0,36	9,30	17,42	

S.E.M. - standardní odchylka od průměru (standard error of mean)

Uninf. - neinfikované buňky, Mock - mock-infikované buňky (simulovaná infekce)

## Shrnutí kapitoly 5.5.

### Infikované buňky HeLa G

- **po 6 hod infekce:** Inhibice komplexu III dýchacího řetězce antimycinem A snížila  $\Delta\Psi_m$  o 18 % oproti infikovaným buňkám bez mitochondriálního inhibitoru a inhibice  $F_0F_1$ ATPázy oligomycinem snížila  $\Delta\Psi_m$  o 9 % oproti infikovaným buňkám bez mitochondriálního inhibitoru. To znamená, že buňky k udržení  $\Delta\Psi_m$  využívaly spíše glykolýzu než oxidační fosforylaci.

- **po 24 hod infekce:** Antimycin A snížil  $\Delta\Psi_m$  o 12 % a oligomycin snížil  $\Delta\Psi_m$  o 23 % oproti infikovaným buňkám bez mitochondriálního inhibitoru. Z toho vyplývá, že buňky HeLa G i 24 hod po infekci využívaly k udržení  $\Delta\Psi_m$  spíše glykolýzu než oxidační fosforylaci.

### Mock-infikované buňky HeLa G

- **po 6 hod:** Antimycin A snížil  $\Delta\Psi_m$  o 60 % a oligomycin snížil  $\Delta\Psi_m$  o 11 % oproti mock-infikovaným buňkám bez mitochondriálního inhibitoru. Buňky k udržení  $\Delta\Psi_m$  využívaly spíše glykolýzu než oxidační fosforylaci.

- **po 24 hod:** Antimycin A snížil  $\Delta\Psi_m$  o 41 % a oligomycin zvýšil  $\Delta\Psi_m$  o 17 % oproti mock-infikovaným buňkám bez mitochondriálního inhibitoru. Vzdělával tedy příspěvek oxidační fosforylace k udržení  $\Delta\Psi_m$ .

### Infikované buňky BSC-40

- **po 6 hod infekce:** Antimycin A snížil  $\Delta\Psi_m$  o 94 % a oligomycin zvýšil  $\Delta\Psi_m$  o 215 % oproti infikovaným buňkám bez mitochondriálního inhibitoru. Buňky k udržení  $\Delta\Psi_m$  tedy využívaly převážně oxidační fosforylaci.

- **po 24 hod infekce:** Antimycin A snížil  $\Delta\Psi_m$  o 83 % a oligomycin zvýšil  $\Delta\Psi_m$  o 177 % oproti infikovaným buňkám bez mitochondriálního inhibitoru. Infikované buňky BSC-40 tedy využívaly k udržení  $\Delta\Psi_m$  i po 24 hod infekce převážně oxidační fosforylaci.

### Mock-infikované buňky BSC-40

- **po 6 hod:** Antimycin A snížil  $\Delta\Psi_m$  o 79 % a oligomycin zvýšil  $\Delta\Psi_m$  o 98 % oproti mock-infikovaným buňkám bez mitochondriálního inhibitoru. Pro udržení  $\Delta\Psi_m$  tedy využívaly převážně oxidační fosforylaci.

- **po 24 hod:** Antimycin A snížil  $\Delta\Psi_m$  o 74 % a oligomycin zvýšil  $\Delta\Psi_m$  o 20 % oproti mock-infikovaným buňkám bez mitochondriálního inhibitoru. Pro udržení  $\Delta\Psi_m$  tedy vzrostl příspěvek glykolýzy.

## 6. Diskuze

### 6.1. Vytvoření rekombinantního viru vakcinie WR-EGFP

Zelený fluorescenční protein exprimovaný rekombinantním virem vakcinie umožňuje detekci infikovaných buněk pomocí průtokové cytometrie (Dominguez J. et al., 1998). Abych mohl studovat procesy odehrávající se pouze v infikované populaci buněk a odlišit změny odehrávající se v těchto buňkách v průběhu infekce od procesů odehrávajících se v neinfikovaných buňkách, bylo potřeba vytvořit rekombinantní virus vakcinie exprimující zelený fluorescenční protein (EGFP).

Gen pro EGFP jsem vnesl do vakciniového inzerčního vektoru pSC11 (Mackett et al., 1982) pod vakciniovým časným/pozdním promotorem p7.5 a samotný rekombinantní virus jsem následně připravil homologní rekombinací do oblasti genu pro thymidinkinázu vakciniového kmene WR (Mackett et al., 1984).

Potřeboval jsem získat dostatečné množství genu pro EGFP, proto jsem transformoval kompetentní buňky DH5 $\alpha$  plazmidem p-EGFP-1 (Molecular probes) požadovaný gen obsahujícím. Z narostlých bakterií jsem plazmidovou DNA izoloval, vhodnými restrikázami ji rozštěpil, tak abych mohl gen pro EGFP samostatně vyizolovat, rozdělil elektroforézou v agarózovém gelu a fragment DNA kódující EGFP z gelu izoloval. Fragment pro EGFP jsem následně vložil pomocí T4 DNA ligázy do vakciniového inzerčního vektoru pSC11 pod vakciniovým časným/pozdním promotorem p7.5. Plazmidový inzerční vektor pSC11 jsem předtím rovněž pomnožil v kompetentních buňkách DH5 $\alpha$ , následně jej izoloval, a aby bylo umožněno vložení fragmentu pro EGFP jsem jej linearizoval a konce lineární molekuly defosforyloval pomocí SAP.

Rekombinantní virus vakcinie kmene WR jsem následně připravil homologní rekombinací připraveného vakciniového inzerčního vektoru pSC11 obsahujícího gen pro EGFP (konstrukt pSC11-EGFP) do oblasti genu pro thymidinkinázu (Mackett et al., 1984).

Připravený rekombinantní virus WR-EGFP jsem poté musel vyselektovat od divokého kmene WR vypichováním modře zbarvených virových plaků z živného agaru, který obsahoval dva selekční markery pro určení rekombinantů - chromogenní substrát X-gal (60  $\mu$ g/ml) a BrdU (25  $\mu$ g/ml). Selekcí WR-EGFP od případné příměsi divokého kmene WR jsem provedl tříkolově a čistotu vyselektovaných vzorků WR-EGFP jsem poté ověřil pomocí Southern blot analýzy. Přesto i po třech kolech selekce stopu po příměsi

divokého kmene WR obsahovaly dva vzorky z celkových deseti. Vybral jsem dva vzorky rekombinantního viru WR-EGFP (izoláty 7.1.5 a 3.3.2) neobsahující příměs divokého kmene WR, které jsem pomnožil v buňkách BSC-40. Následně jsem pomnožené viry purifikoval od lyzovaných buněk a pomocí titrace a barvení krystalovou violetí stanovil koncentraci vzorků (PFU/ml) již čistých rekombinantních virů (Earl et al., 1998).

Oba izoláty, WR-EGFP 7.1.5 i WR-EGFP 3.3.2, měly koncentraci shodnou:  $1,7 \times 10^9$  PFU/ml, což je zřejmě dílem náhody a také důsledkem stejného zacházení s oběma vzorky při jejich pomnožení v buňkách BSC-40 a při jejich následném purifikování od zbytků lyzovaných buněk.

## **6.2. Časový průběh fluorescence vyselektovaného WR-EGFP**

Ke stanovení mitochondriální masy a mitochondriálního membránového potenciálu infikovaných buněk jsem potřeboval vybrat pouze jeden ze dvou získaných rekombinantních virů - WR-EGFP 7.1.5 nebo WR-EGFP 3.3.2.

Abych vybral vhodnější z izolátů, porovnal jsem průběh fluorescence EGFP obou rekombinantních virů pomocí průtokové cytometrie (Earl et al., 2003). Fluorescenci EGFP obou rekombinantních virů jsem dále také porovnával s fluorescencí GFP rekombinantního viru vakcinie WR-GFP, který byl připraven v laboratoři Dr. Němečkové z ÚHKT. Fluorescenci EGFP, resp. GFP v infikovaných buňkách BSC-40 jsem měřil na průtokovém cytometru v oblasti FL1 v časech 6 hod, 12 hod, 18 hod a 24 hod po infekci (m.o.i. = 2).

V časech 6 hod a 24 hod od infekce jsem kromě měření fluorescence EGFP také odebral vzorky infikovaných buněk ve 2%-NCS-DMEM pro titraci (Earl et al., 1998), abych na základě zjištěných koncentrací viru mohl určit případný rozdíl v rychlosti růstu mezi oběma izoláty.

Z naměřených výsledků vyplynulo, že fluorescence i růst izolátů WR-EGFP 7.1.5 a WR-EGFP 3.3.2 jsou srovnatelné.

WR-GFP vykazoval vyšší fluorescenci než oba izoláty WR-EGFP, pravděpodobně díky vyšší expresi regulované syntetickým promotorem. Aby se toto dalo říci jednoznačně, musela by se stanovit hladina proteinu, eventuelně mRNA. Navíc nelze vyloučit jinou intenzitu fluorescence, detekovanou jiným způsobem díky spektrálním vlastnostem GFP a EGFP. Při použití fluorescenční mikroskopie vykazoval WR-GFP kromě zelené

fluorescence i fluorescenci červenou a kvůli této jeho nejednoznačné rozlišitelnosti při použití červených fluorescenčních barviv jsem s ním nepracoval. (Právě kvůli této vlastnosti WR-GFP bylo potřeba připravit nový rekombinantní virus exprimující zelený fluorescenční protein - WR-EGFP, což bylo základem mé diplomové práce.) Připravený izolát WR-EGFP vykazoval při fluorescenční mikroskopii pouze zelenou fluorescenci, tak jak jsme předpokládali.

Při infekci všemi 3 rekombinantními viry bylo v čase 6 hod po infekci infikováno přibližně 30 - 35 % buněk (z označené populace), kdy můžeme s určitostí říci, že v tomto čase ještě nemohlo dojít k sekundární infekci. Použitá m.o.i. = 2 by teoreticky měla infikovat všechny buňky, avšak je známo, že k téměř 100% infekci buněk používají různí autoři 10-100 PFU/buňka. 30% infekce odpovídá tomu, co naměřili jiní (Earl et al., 2003).

Pro další pokusy jsem vybral izolát WR-EGFP 7.1.5.

### **6.3. Stanovení fluorescence mitochondriální masy**

Vycházel jsem z předpokladu, že fluorescence mitochondriální masy by měla samotnou mitochondriální masu představovat (Jacobson et al., 2002). Ke stanovení fluorescence mitochondriální masy v infikovaných, resp. neinfikovaných buňkách HeLa G a BSC-40 jsem použil dva různé fluorochromy - MTR 580 a NAO.

Získaná data ukázala, že akumulace obou fluorochromů je závislá na mitochondriálním membránovém potenciálu, i když MTR 580 nejevil velké rozdíly mezi mock-infikovanými a infikovanými buňkami, a tak dával relativně obdobné výsledky při použití ionoforu FCCP i při jeho nepoužití. Akumulace fluorochromu NAO v mitochondriích buněk HeLa G i BSC-40 se jevila jako potenciálově závislá. Potenciálově závislou byla hodnocena i předchozími studiemi (Métivier et al., 1998; Keij et al., 2000; Jacobson et al., 2002). K vyhodnocení výsledků jsem proto použil data získaná ze vzorků, ke kterým byl přidán odpojovač oxidační fosforylace FCCP.

Porovnání fluorescence charakterizující mitochondriální masu mezi buněčnými liniemi HeLa G a BSC-40 ukázalo na přibližně dvakrát větší fluorescenci buněk BSC-40 oproti buňkám HeLa G. Tento výsledek je ale pravděpodobně ovlivněn faktem, že ke sklizeným buňkám BSC-40 jsem přidával fluorochromy čerstvě připravené ze zásobního roztoku příslušného fluorochromu v ethanolu, zatímco fluorochromy přidávané ke



sklizeným buňkám HeLa G čerstvě připravené nebyly. Roztoky fluorochromů přidávané ke sklizeným buňkám HeLa G byly připraveny přibližně 2 hod před přidáním k samotným buňkám ze zásobního roztoku - naředěním v 1× PBS. Tento čas ve vodném prostředí pravděpodobně díky oxidacím snížil fluorescenční vlastnosti MTR 580 i NAO. Podle předchozích studií je mitochondriální masa buněčných linií BSC-40 a HeLa G srovnatelná (Kalbáčová et al., 2002).

Výsledky měření fluorescence mitochondriální masy v celkové populaci buněk (obsahující buňky infikované, ale i neinfikované) neprokázaly významnější vliv infekce na změnu velikosti mitochondriální masy této celkové populace v porovnání s populací mock-infikovaných buněk.

Naproti tomu výsledky měření fluorescence mitochondriální masy pouze infikovaných buněk ukázaly zřejmé zvýšení mitochondriální masy v buňkách HeLa G i BSC-40 v důsledku infekce.

V průběhu infekce se mitochondriální masa charakterizovaná fluorescencí zvyšovala. 6 hod po infekci byla mitochondriální masa infikovaných buněk HeLa G o 36 % vyšší oproti buňkám mock-infikovaným, 24 hod po infekci byla mitochondriální masa infikovaných buněk HeLa G vyšší o 55 %. V infikovaných buňkách BSC-40 byla mitochondriální masa 6 hod po infekci vyšší o 14 % oproti buňkám mock-infikovaným, 24 hod po infekci byla mitochondriální masa buněk BSC-40 dokonce o 102 % vyšší oproti mock-infikovaným buňkám.

Zvýšení mitochondriální masy infikovaných buněk by mohlo ukazovat na schopnost viru vakcinie aktivovat metabolismus hostitelské buňky pomocí které dočasně zvýhodňuje infikované buňky a udrží je déle při životě, což vakcinii umožní delší čas pro rozmnožení.

Kromě toho že by mitochondriální masa mohla být ovlivněna virem vakcinie, je také možné, že virus vakcinie mění obsah kardiolipinu nebo složení jiných lipidů v mitochondriálních membránách, čímž pádem by při stejném množství mitochondrií v infikovaných i neinfikovaných buňkách, vykazovaly infikované buňky vyšší fluorescenci. Fluorochrom NAO se váže na kardiolipin obsažený ve vnitřní mitochondriální membráně (Petit et al., 1992).

Další možností proč infikované buňky vykazují vyšší fluorescenci je, že by některé z membrán jež obklopují vakciniové viriony obsahovaly kardiolipin či jiné látky reagující s použitými fluorochromy.

Všechny uvedené možnosti by bylo potřeba ověřit pomocí fluorescenční mikroskopie - kolokalizací s charakteristickými markery a jejich kvantifikací.

## **6.4. Stanovení mitochondriálního membránového potenciálu ( $\Delta\Psi_m$ )**

Data získaná stanovením  $\Delta\Psi_m$  buněčných linií HeLa G a BSC-40, jež byly vystaveny působení různých mitochondriálních inhibitorů - antimycinu A, oligomycinu a FCCP, ukázala rozdíly mezi oběma buněčnými liniemi v závislosti na ATP pocházejícím z různých metabolických drah. Stejně tak tomu bylo i u předešlých studií (Pedersen, 1978; Vrbacký et al., 2003; Kalbáčová et al., 2003). FCCP jsem použil jako kontrolu energizace mitochondrií a pro průkaz závislosti akumulace TMRE na  $\Delta\Psi_m$ . Oligomycin a antimycin A jsem použil ke stanovení převažujícího energetického metabolismu a jeho příspěvku k udržování  $\Delta\Psi_m$ .

Neinfikované buňky HeLa G udržovaly svůj mitochondriální potenciál pomocí ATP syntetizovaného z větší části glykolýzou spíše než oxidační fosforylací. Inhibicí komplexu III dýchacího řetězce antimycinem A došlo k poklesu  $\Delta\Psi_m$  vyjádřeného fluorescencí potenciometrického barviva TMRE o 37 % a inhibicí  $F_0F_1$ ATPázy vnitřní mitochondriální membrány oligomycinem došlo k nárůstu  $\Delta\Psi_m$  o 33 %. Nicméně ATP produkované oxidační fosforylací využívaly buňky HeLa G také.

Naproti tomu neinfikované buňky BSC-40 prokazovaly velmi vysokou závislost na produkci ATP oxidační fosforylací, jež hrála hlavní roli v udržení jejich  $\Delta\Psi_m$ . Inhibicí komplexu III dýchacího řetězce antimycinem A došlo k poklesu  $\Delta\Psi_m$  vyjádřeného fluorescencí TMRE o 92 % a inhibicí  $F_0F_1$ ATPázy vnitřní mitochondriální membrány pomocí oligomycinu došlo k nárůstu  $\Delta\Psi_m$  vyjádřeného fluorescencí TMRE o 175 %, což na závislost ATP z oxidační fosforylace ukazuje. Závislost buněk BSC-40 na ATP syntetizovaném oxidační fosforylací prokázaly také výsledky předchozích studií (Pedersen, 1978; Vrbacký et al., 2003; Kalbáčová et al., 2003).

Infikované buňky HeLa G využívaly k udržení mitochondriálního membránového potenciálu v 6 hod i 24 hod po infekci ATP pocházející z větší části z glykolýzy než z oxidační fosforylace. Pro porovnání k infikovaným buňkám jsem použil buňky mock-infikované, které po 6 hod využívaly také z větší části glykolýzu a z menší oxidační fosforylací, 24 hod po infekci u nich příspěvek oxidační fosforylace vzrůstal.

Infikované buňky BSC-40 využívaly 6 hod po infekci ATP pocházející z větší části z oxidační fosforylace, stejně tomu bylo po 6 hod i u buněk mock-infikovaných. 24 hod po infekci využívaly buňky BSC-40 stále převážně oxidační fosforylací, zatímco u mock-infikovaných buněk po 24 hod vzrůstal příspěvek glykolýzy.

Data získaná pouze z infikované populace buněk (určené díky fluorescenci EGFP) umožnila spolehlivější určení  $\Delta\Psi_m$  infikovaných buněk oproti výsledkům naměřeným na celkové populaci obsahující infikované i neinfikované buňky.

Nicméně data získaná z měření buněk BSC-40 rigorózně hodnotit nejdou, protože procento živých buněk bylo v době měření téměř zanedbatelné (téměř ve všech případech pod 5 % z celkových 10 000 měřených buněk), což bylo zapříčiněno zřejmě chybným sklízením buněk z 24-jamkové destičky, kdy buňky poumíraly patrně kvůli jejich příliš agresivnímu odpipetování. Nicméně kdyby výsledky nebyly získány na základě tak malých počtů buněk, interpretovaly by se nejspíš podobným způsobem jako výsledky mnou naměřené. Celý pokus však bude potřeba zopakovat a soustředit se na způsob sklízení buněk, aby počty živých buněk nebyly tak nízké.

## 7. Závěr

Hlavním cílem celé diplomové práce bylo vytvoření rekombinantního viru vakcinie exprimujícího zelený fluorescenční protein (EGFP) pod vakciniovým časným/pozdním promotorem p7.5 (WR-EGFP). Jeho naklonování a selekce přede mne postavila mnohá úskalí, kdy jsem se několikrát musel vracet o různý počet kroků zpět, což někdy znamenalo i měsíce práce. Nicméně vytvoření rekombinantního viru vakcinie exprimujícího EGFP se mi nakonec podařilo.

Zelená fluorescence EGFP mi umožnila studovat procesy odehrávající se pouze v infikované populaci buněk a odlišit změny odehrávající se v těchto buňkách v průběhu infekce od procesů odehrávajících se v neinfikovaných buňkách.

Průtokovou cytometrií jsem stanovil rozdíly ve fluorescenci mitochondriální masy infikovaných a neinfikovaných buněčných linií HeLa G a BSC-40 a stanovením mitochondriálního membránového potenciálu buněčných linií HeLa G a BSC-40 (infikovaných i neinfikovaných), při použití různých mitochondriálních inhibitorů, jsem určil rozdíly v závislosti těchto buněčných linií na ATP z odlišných metabolických drah (glykolýzy, resp. oxidační fosforylace).

## 8. Seznam použité literatury

**Baumann C. T. & Reyes J. C.** (1999) Tracking components of the transcription apparatus in living cells. *Methods* 19, 353–361.

**Benz R. & McLaughlin S.** (1983) The molecular mechanism of action of the proton ionophore FCCP (carbonylcyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone). *Biophysical Journal* 41, 381–398.

**Blasco R. & Moss B.** (1991) Extracellular vaccinia virus formation and cell-to-cell virus transmission are prevented by deletion of the gene encoding the 37 000-Dalton outer envelope protein. *Journal of Virology* 65, 5910–5920.

**Blasco R. & B. Moss.** (1992) Role of cell-associated enveloped vaccinia virus in cell-to-cell spread. *Journal of Virology* 66, 4170–4179.

**Blasco R. & Moss B.** (1995) Selection of recombinant vaccinia viruses on the basis of plaque formation. *Gene*, 158,157–162.

**Bunting J. R., Phan T. V., Kamali E. & Dowben R. M.** (1989) Fluorescent cationic probes of mitochondria. Metrics and mechanism of interaction. *Biophysical Journal* 56, 979–993.

**Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W. W., & Prasher D. C.** (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, 802–805.

**Chen L. B.** (1988) Mitochondrial membrane potential in living cells. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 4, 155–181.

**Collins T. J., Lipp P., Berridge M. J., Li W. & Bootman M. D.** (2000) Inositol 1,4,5-trisphosphate-induced  $\text{Ca}^{2+}$  release is inhibited by mitochondrial depolarization. *The Biochemical Journal* 347, 593–600.

**Darzynkiewicz Z., Traganos F., Staiano-Coico L., Kapuscinski J. & Melamed M. R.** (1982) Interaction of rhodamine 123 with living cells studied by flow cytometry. *Cancer Research* 42, 799–806.

**Dominguez J., Lorenzo M. D. & Blasco R.** (1998) Green fluorescent protein expressed by a recombinant vaccinia virus permits early detection of infected cells by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods* 220, 115-121.

**Doms R. W., Blumenthal R. & Moss B.** (1990) Fusion of intra- and extracellular forms of vaccinia virus with the cell membrane. *Journal of Virology* 64, 4884–4892.

**Earl P. L., Cooper N., Watt S., Moss B. & Carroll M. W.** (1998) Preparation of cell cultures and vaccinia virus stocks, p. 16.16.1-16.16.3. in F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl (ed.), *Current protocols in molecular biology*, vol. 2. John Wiley and Sons, New York, N.Y.

**Earl P. L., Americo J. L. & Moss B.** (2003) Development and use of a vaccinia virus neutralization assay based on flow cytometric detection of green fluorescent protein. *Journal of Virology* 77, 10684–10688.

**Esposito J. J. & Fenner F.** (2001) Poxviruses. in *Fields virology* 4th ed., vol. 2. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa., 2885-2921. Edited by D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman and S. E. Straus.

**Farkas D.L., Wei M. D., Febroriello P., Carson J. H. & Loew L.M.** (1989) Simultaneous imaging of cell and mitochondrial membrane potentials. *Biophysical Journal* 56, 1053-69.

**Galbraith D. W., Anderson M. T. & Herzenberg L. A.** (1999) Flow cytometric analysis and FACS sorting of cells based on GFP accumulation. *Methods in Cell Bioogy* 58, 315–341.

**Geada M. M., Galindo I., Lorenzo M. M., Perdiguero B. & Blasco R.** (2001) Movements of vaccinia virus intracellular enveloped virions with GFP tagged to the F13L envelope protein. *Journal of General Virology* 82, 2747–2760.

**Goebel S. J., Johnson G. P., Perkus M. E., Davis S. W., Winslow J. P. & Paoletti E.** (1990) The complete DNA sequence of vaccinia virus. *Virology* 179, 247–266.

**Heim R., Cubitt A. B. & Tsien, R. Y.** (1995) Improved green fluorescence. *Nature* 373, 663–664.

**Henderson D. A. & Moss B.** (1999) Smallpox and Vaccinia. in *Vaccines* 3rd ed. Plotkin S. A. and Orenstein W. A., Philadelphia, Pennsylvania - W. B. Saunders.

**Hollinshead M., Vanderplasschen A., Smith G. L. & Vaux D. J.** (1999) Vaccinia virus intracellular mature virions contain only one lipid membrane. *Journal of Virology* 73, 1503–1517.

**Hollinshead M., Rodger G., van Eijl H., Hollinshead R., Law M., Vaux D. T. & Smith G. L.** (2001) Vaccinia virus utilizes microtubules for movement to the cell surface. *Journal of Cell Biology* 154, 389–402.

**Huygelen C.** (1996) Jenner's cowpox vaccine in light of current vaccinology. *Verhandelingen - Koninklijke Academie voor Geneeskunde van België* 58, 479-536.

**Jacobson J., Duchon M. R. & Heales S.J.** (2002) Intracellular distribution of the fluorescent dye nonyl acridine orange responds to the mitochondrial membrane potential: implications for assays of cardiolipin and mitochondrial mass. *Journal of neurochemistry* 82, 224–233.

**Kalbáčová M., Vrbacký M., Humlová Z. & Mělková Z.** (2002) Protooncogene Bcl-2 induces apoptosis in several cell lines. *Folia Biologica (Praha)* 48, 15–27.

**Kalbáčová M., Vrbacký M., Drahota Z. & Mělková Z.** (2003) Comparison of the effect of mitochondrial inhibitors on mitochondrial membrane potential in two different cell lines using flow cytometry and spectrofluorometry. *Cytometry* 52A, 110–116.

**Keij J. F., Bell-Prince C. & Steinkamp J. A.** (2000) Staining of mitochondrial membranes with 10-nonyl acridine orange, MitoFluor Green, and MitoTracker Green is affected by mitochondrial membrane potential altering drugs. *Cytometry* 39, 203–210.

**Lee S. B., Rodríguez D., Rodríguez J. R. & Esteban M.** (1997) The apoptosis pathway triggered by the interferon-induced protein kinase PKR requires the third basic domain, initiates upstream of Bcl-2, and involves ICE-like proteases. *Virology* 231, 81–88.

**Linnett P. E. & Beechey R. B.** (1979) Inhibitors of the ATP synthetase system. *Methods in Enzymology* 55, 472–518.

**Locker J. K., Kuehn A., Schleich S., Rutter G., Hohenberg H., Wepf R. & Griffiths G.** (2000) Entry of the two infectious forms of vaccinia virus at the plasma membrane is signaling-dependent for the IMV but not the EEV. *Molecular Biology of The Cell* 11, 2497–2511.

**Mackett M., Smith G. L. & Moss B.** (1982) Vaccinia virus: a selectable eukaryotic cloning and expression vector. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 79, 7415–7419.

**Mackett M., Smith G. L. & Moss B.** (1984) General method for production and selection of infectious vaccinia virus recombinants expressing foreign genes. *Journal of Virology* 49, 857–864.

**Macouillard-Poullatier de G., Belaud-Rotureau M. A., Voisin P., Leducq N., Belloc F., Canioni P. & Diolez P.** (1998) Flow cytometric analysis of mitochondrial activity in situ: applications to acetylceramide-induced mitochondrial swelling and apoptosis. *Cytometry* 33, 333–339.



**Mannella C. A.** (1998) Conformational changes in the mitochondrial channel protein, VDAC, and their functional implications. *Journal of Structural Biology* 121, 207-218.

**Métivier D., Dallaporta B., Zamzami N., Larochette N., Susin S. A., Marzo I. & Kroemer G.** (1998) Cytofluorometric detection of mitochondrial alterations in early CD95/Fas/APO-1-triggered apoptosis of Jurkat T lymphoma cells. Comparison of seven mitochondrion-specific fluorochromes. *Immunology Letters* 61, 157–163.

**Mills C. E.** (1993) Natural mortality in NE pacific coastal hydromedusae: grazing predation, wound healing and senescence. *Bulletin of Marine Science* 53,194-203.

**Moreira M. E., Sorensen A. C., Heard K. J., Harken A. H., Banerjee A. & Cairns C. B.** (2001) Reduction in the mitochondrial energy potential by inhibition of electron transport in human vascular smooth muscle cells. *Academic Emergency Medicine* 8, 548.

**Moss B.** (2001) Poxviridae: The viruses and their replication. *Fields virology* 4th ed., vol. 2. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa., 2849-2883. Edited by D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman and S. E. Straus.

**Ormö M., Cubitt A. B., Kallio K., Gross L. A., Tsien R. Y. & Remington S. J.** (1996) Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* 273, 1392–1395.

**Pedersen P.L.** (1978) Tumor mitochondria and the bioenergetics of cancer cells. *Progress in Experimental Tumor Research* 22, 190–274.

**Petit J. M., Maftah A., Ratinaud M.H. & Julien R.** (1992) 10N-nonyl acridine orange interacts with cardiolipin and allows the quantification of this phospholipid in isolated mitochondria. *European Journal of Biochemistry* 209, 267–273.

**Prasher D. C., Eckenrode V. K., Ward W. W., Prendergast F. G. & Cormier M. J.** (1992) Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111, 229–233.

**Rietdorf J., Ploubidou A., Reckmann I., Holmstrom A., Frischknecht F., Zettl M., Zimmermann T. & Way M.** (2001) Kinesin-dependent movement on microtubules precedes actin-based motility of vaccinia virus. *Nature Cell Biology* 3, 992–1000.

**Rodriguez J. F., Rodriguez D., Rodriguez J. R., McGowan E. B. & Esteban M.** (1988) Expression of the firefly luciferase gene in vaccinia virus: a highly sensitive gene marker to follow virus dissemination in tissues of infected animals. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 85, 1667–71.

**Rodriguez J. F. & Smith G. L.** (1990) IPTG-dependent vaccinia virus: identification of a virus protein enabling virion envelopment by Golgi membrane and egress. *Nucleic Acids Research* 18, 5347–5351.

**Schlattner U., Dolder M., Wallimann T. & Tokarska-Schlattner M.** (2001) Mitochondrial creatine kinase and mitochondrial outer membrane porin show a direct interaction that is modulated by calcium. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 48027–48030.

**Skowronek P., Haferkamp O. & Rodel G.** (1992) A fluorescence-microscopic and flow-cytometric study of HeLa cells with an experimentally induced respiratory deficiency. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 187, 991–998.

**Smith G. L., Vanderplassen A. & Law M.** (2002) The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus. *Journal of General Virology* 83, 2915–2931.

**Vanderplassen A. & Smith G. L.** (1997) A novel virus binding assay using confocal microscopy: demonstration that the intracellular and extracellular vaccinia virions bind to different cellular receptors. *Journal of Virology* 71, 4032–4041.

**Vanderplassen A., Hollinshead M. & Smith G. L.** (1998) Intracellular and extracellular vaccinia virions enter cells by different mechanisms. *Journal of General Virology* 79, 877–887.

**Voet D. & Voet J. G.** (1995) *Biochemistry*. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons. 549.

**Vrbacký M., Krijt J., Drahota Z. & Mělková Z.** (2003) Inhibitory effects of Bcl-2 on mitochondrial respiration. *Physiological Research* 52(5), 545–554.

**Ward B. M. & Moss B.** (2001) Vaccinia virus intracellular movement is associated with microtubules and independent of actin tails. *Journal of Virology* 75, 11651–11663.