

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

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra genetiky a mikrobiologie



**Studium funkcí VP2 a VP3 strukturních minoritních
proteinů myšího polyomaviru**

Vlastimil Garfield Jirásko

Praha 2006

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Jitka Forstová, CSc.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně, pod vedením vedoucí diplomové práce a s použitím citované literatury.

A handwritten signature in black ink, reading "Vlastimil Jirásko". The signature is written in a cursive style with a large, stylized initial 'V'.

Vlastimil Jirásko

Děkuji Doc. RNDr. Jitce Forstové, CSc. za neocenitelnou pomoc, rady a připomínky, které mi poskytovala během vypracování této diplomové práce.
Děkuji svým rodičům za podporu při studiu a všestrannou pomoc.
Děkuji RNDr. Jiřině Hanové, CSc. za pomoc a rady při práci s tkáňovými kulturami.
Děkuji postgraduálním studentům Pavlovi, Davidovi a Evženovi za jejich pomoc a uvedení do problematiky molekulární biologie v praxi.
Děkuji Phd Honzovi Černému za pomoc s fluorescenční mikroskopií.
Děkuji Ing. Šmelhausovi z Fyziologického ústav AVČR za imunizaci králíků.
Děkuji Dr. Korbovi z ÚMG AVČR za přečištění polyklonální králičí protilátky.
Děkuji Dr. Půtovi z PřF UK za darování myši monoklonální protilátky proti EGFP.
Děkuji pregraduálním studentům Vojtovi a Kristíně za jejich spolupráci.
Děkuji všem studentům z laboratoře 006 za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Děkuji Prckovi za podporu.

Tato práce vznikla v letech 2001-2005 v rámci grantu ministerstva zdravotnictví IGA NC/6957-3 a Centra 1M138896301 „Nová antivirotika a antineoplastika“ ID 1M0508 (podporováno MŠMT).

SEZNAM ZKRATEK:

aa	aminokyselina
atb.	antibiotika
ATP	adenozin trifosfát
BFM	bromfenolová modř
bp	páry bází
BSA	bovinní sérumalbumin
CAP	catabolite activating protein
CBBG250	Coomassie Brilliant Blue G250
CIP	telecí intestinální fosfatáza
CML	chronická myeloidní leukémie
DAB	3,3' diaminobenzidin
DMEM	„Dulbecco's Modified Eagle's Medium“
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNáza	deoxyribonukleáza
dNTP	deoxy nukleotid trifosfát
ds	dvojláknová („double stranded“)
dsDNA	dvouřetězcová DNA
DTT	dithiotreitol
EDTA	ethylendiamintetraacetát disodný
EGFP	zelený fluorescenční protein (enhance green fluorescent protein)
EGTA	kyselina ethylenglykol-bis(β -aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraoctová
EtBr	ethidium bromid
FAST	fusion-associated small transmembrane
FCS	Fetální telecí sérum
GST	gluthation-S-transferáza
HIV	human immunodeficient virus
hod., h.	hodina
HRP	horseradish peroxidase
Hsp	Heat shock protein
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalaktosid
KAc	octan draselný
kbp	tisíc párů bází
kDa	tisíc daltonů
LT	large tumor antigen
LTR	long terminal repeat
M	molární
MAP	model amphipathic peptides
min.	minuta
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
MT	midlle tumor antigen
NaAc	octan sodný
NLS	nuclear localisation signal
OD	optická denzita
ORI	počátek replikace
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	polymerázová řetězová reakce
pi	post infection (po infekci)

PTD	Protein Transduction Domain
PyV	myší polyomavirus
RCF	Relative Centrifugal Force (udává se v násobcích „g“)
RNA	ribonukleová kyselina
RNáza	ribonukleáza
RPM	otáčky za minutu (Revolutions Per Minute)
s	sekunda
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	SDS proteinová elektroforéza
SIV	simian immunodeficient virus
ss	jednovláknová („single stranded“)
ST	small tumor antigen
SV40	simian virus 40
TEMED	N,N,N',N' – Tetramethylethylenediamin
TK	Tkáňové kultury
TNF	Tumor Necrosis Factor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
VLPs	Virus-like particles
VP1	Virový protein 1 (hlavní kapsidový protein polyomaviru)
VP2/VP3	Virový protein 2/3 (minoritní kapsidový protein polyomaviru)
VP22	virový protein 22
WT	divoký typ („Wild Type“)
ŽA	živný agar
ŽB	živný bujón

Study of functions of VP2 and VP3 minor structural proteins of mouse polyomavirus

ABSTRACT:

The long-term aim of our laboratory is to solve a mechanism of genome delivery by polyomavirus virions. Polyomavirus is a small nonenveloped dsDNA virus composed of major structural protein VP1, minor structural proteins VP2/VP3 and nucleocore. 72 pentamers of VP1 proteins form capsid particles. Minor proteins are bound in the inner space of the cavity of each pentamer. Role of minor proteins in polyomavirus life cycle is not clear but they were shown to play a role in very early steps of infection. The aims of this study were: to construct recombinant plasmids for expression of PyV minor structural protein sequences in *E. coli* and to prepare polyclonal antibody against VP2/VP3 for future investigation: of interactions of minor structural proteins with host cell structures.

Plasmids carrying sequences for entire VP3 and its C terminal 35 amino acids (aa) fused with sequences encoding bacterial thioredoxin and oligohistidin were constructed. Fuse proteins Trx-Histag-VP3, Trx-Histag-C35, Trx-Histag- α helix (Trx-Histag-C17 without C terminus 18 aa) and Trx-Histag-VP2 (constructed by E. Bouřa) were produced in bacterial cells and isolated. Protein Trx-Histag-VP2 was used as an antigen for preparation of rabbit polyclonal antibody. This antibody was purified by affinity chromatography and tested by Western blot and by indirect immunofluorescent assays.

Synthetic peptide C35 (prepared at UCHOAB), that contained last 35 aa of the C terminal part of VP2/VP3, was used for investigation of its interactions with the plasma membrane of mammalian cells. It was shown, that peptide C35 is able to interact with the plasma membrane and to enter into cells by both clathrin dependent and by caveola dependent endocytosis. Peptide C35 was found to colocalise with early endosomes 15 minutes post adsorption. Internalisation of the peptide was accompanied by cytoskeleton reorganisation.

Key words: Polyomavirus, minor structural proteins, bacterial expression, Protein Transduction Domain (PTD), virus entry,

Klíčová slova: Polyomavirus, minoritní strukturní proteiny, bakteriální expresní systém, PTD, vstup viru do buněk

1. ÚVOD.....	12
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	14
2.1. Myší Polyomavirus.....	15
2.1.2 Minoritní strukturní proteiny VP2 a VP3	16
2.2. Protein Transdukční Domény	20
2.2.1. Amfipatické PTD	21
2.2.1.1. Primární amfipatické PTD	22
2.2.1.2. Sekundární amfipatické PTD	22
2.2.2. PTD bohaté na arginin	25
2.2.3. Vstup PTD do buněk.....	27
2.2.3.1. PTD nevstupují do jader buněk během prvních 5ti minut po adsorpci	27
2.2.3.2. Vstup PTD do buněk endocytózou	28
2.2.3.3. Na endocytóze nezávislý vstup.....	29
2.2.3.3.1. Hypotézy mechanismu přímé translokace proteinů membránou... 30	
2.2.3.3.2. Vstup biologicky funkčních PTD do buněk	31
2.2.3.3.3. Endosmolýza TAT PTD po endocytóze	33
2.3. Virové proteiny připomínající PTD.....	35
2.3.1. Viroporiny.....	35
2.3.1.1. 2B - Picornaviry.....	36
2.3.1.2. 6K – Togaviry.....	36
2.3.1.3. Vpu - HIV 1	36
2.3.1.4. M2 – Virus chřipky.....	38
2.3.2. FAST proteiny – Reoviridae.....	39
2.3.3. Virové strukturní proteiny	41
2.3.3.1. L2 – Papillomaviry	41
2.3.3.2. Protein γ – „Flock House virus“	42
2.4. Bakteriální expresní systémy	44
2.4.1. <i>Escherichia coli</i>	44
2.4.2. Expres z LacUV5 promotoru	45
2.4.3. T7 RNA polymeráza.....	47
2.4.4. Expres T7 RNA polymerázy v bakteriálním kmenu BL21(DE3).....	49
2.4.5. Snížení samovolné exprese	50
2.4.6. Expresní vektory pET - Novagen	51
2.4.7. Zvýšení účinnosti exprese (Novagen).....	52
3. CÍLE PRÁCE.....	54
4. MATERIÁL A METODY.....	56
4.1. Bakterie a buněčné linie použité v experimentech	57
4.1.1. Bakteriální kmeny.....	57
4.1.2. Buněčné linie	57
4.2. Použité plazmidy.....	57
4.3. Marker molekulových hmotností DNA	58
4.4. Antibiotika	58
4.5. Protilátky.....	58
4.6. Sterilizace.....	60
4.7. Práce s bakteriemi	60
4.7.1. Kultivace bakterií.....	60
4.7.2. Příprava kompetentních buněk pro elektroporaci	60
4.7.3. Skladování bakterií	61
4.7.4. Elektroporace bakterií.....	61

4.8. Práce s DNA	62
4.8.1. Agarózová elektroforéza	62
4.8.2. Izolace fragmentů DNA z agarózového gelu pomocí „InViSorb™ DNA extraction Kit“ (WESTBURG)	63
4.8.3. Izolace fragmentů DNA z agarózového gelu pomocí „NucleoSpin® Extract II Kit“ (CLONTECH)	63
4.8.4. Maxipreparace plazmidové DNA (alkalická metoda)	64
4.8.5. Minipreparace plazmidové DNA (alkalická metoda)	65
4.8.6. Minipreparace plazmidové DNA pomocí „QIAprep® Spin Miniprep Kit“ (QIAGEN)	66
4.8.7. Štěpení DNA restrikčními endonukleázami	66
4.8.8. Defosforylace vektorové DNA	67
4.8.9. Ligace	67
4.8.10. PCR	68
4.9. Práce s proteiny	68
4.9.1. Příprava lyzátů pro SDS PAGE	68
4.9.2. SDS-polyakrylamidová elektroforéza (SDS-PAAGE)	69
4.9.3. Dot blot	70
4.9.4. Western blot	70
4.9.5. Imunodetekce proteinů	71
4.10. Exprese proteinů v bakteriálním systému	72
4.10.1. Exprese fúzních proteinů v bakteriích BL21	72
4.10.2. Ověření exprese a určení rozpustnosti fúzních proteinů	72
4.10.3. Izolace proteinů afinitní chromatografií	73
4.10.3.1. Izolace frakce fúzních proteinů rozpustných v lyzačním pufru	73
4.10.3.2. Izolace proteinů nerozpustných v lyzačním pufru	74
4.10.5. Dialýza	75
4.10.6. Měření koncentrace proteinů metodou Bradfordové	75
4.11. Pasážování savčích buněk (3T6, NMuMG)	75
4.12. Fixace buněk na mikroskopických sklíčkách	76
4.13. Imunofluorescenční detekce proteinů v buňkách	76
4.14. Imunizace králíka pro získání polyklonální protilátky	77
4.15. Přístroje	77
5. VÝSLEDKY	78
5.1. Konstrukce plazmidů pro expresi sekvencí minoritních proteinů myšího polyomaviru v bakteriích	79
5.1.1. Konstrukce plazmidů pET32-VP2, pET32-VP3 a pET32-C35	79
5.1.2. Sekvenační ověření konstruktů pET32-C35	81
5.1.3. V průběhu klonování pET32-C35 byly do konstruktů zavedeny mutace	82
5.2. Produkce a izolace sekvencí minoritních strukturních proteinů VP2, VP3	85
5.2.1. Ověření produkce fúzních proteinů a určení jejich rozpustnosti	85
5.2.2. Izolace proteinů Trx-Histag-VP2 a Trx-Histag-VP3 afinitní chromatografií na kolonkách „Histrap™FF crude“	87
5.2.3. Izolace proteinů Trx-Histag-C35 a Trx-Histag- α helix na kolonkách „Histrap™HHP“	88
5.3. Příprava antigenu, imunizace a testování polyklonální protilátky proti VP2.	89
5.4. Studium interakcí minoritních proteinů nebo jejich 3' koncových částí s buňkami.	95
5.4.1. Extracelulární přidání VP2 / VP3 proteinů k buňkám	95
5.4.2. Příprava syntetického C koncového úseku VP2/VP3	96

5.3. Zkoumání interakce buněk s extracelulárně přidaným „peptidem C35“	96
5.3.1. Sledování průniku „peptidu C35“ do buněk	97
5.6.3. Vliv „peptidu C35“ na buněčný cytoskelet.....	101
6. DISKUZE	107
6.1. Minoritní proteiny myšího polyomaviru.....	108
6.2. Příprava rekombinantních plazmidů.....	110
6.3. Příprava polyklonální králičí protilátky	111
6.4. Extracelulární vliv peptidu C35 na buňku	113
7. SOUHRN	117
8. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY	120

1. ÚVOD

Výsledky zkoumání virů a dějů klíčových pro životní cyklus virů nám dovolují vytvořit léčebné přípravky přesně zacílené proti virům, které jsou účinné a přitom nepoškozují organismus.

Na druhé straně se viry mohou stát sami léčebnými prostředky. Jejich kapsidy jsou zkoumány pro možné využití v genové terapii jako dopravní prostředky schopné doručit do buňky DNA kódující gen, nebo již hotový protein. Tento transport může sloužit k nahrazení funkce poškozeného genu, či naopak umlčení genů s nežádoucími účinky, stimulace imunitního systému nebo spuštění apoptotické smrti nádorové tkáně.

Dalším velkým přínosem studia virů je objevování nových fyziologických dějů v eukariotické buňce pomocí interakcí mezi hostitelem a virem. Takto bylo již objeveno mnoho základních funkcí jako je například replikace chromozomální DNA, sestřih RNA, podstata genetického kódu, endocytóza a další.

Avšak viry nejsou jedinými prostředky odhalující děje probíhající v buňce, v posledních desetiletích byly objeveny nové agens ovlivňující buněčné pochody jako například protein transdukční domény (PTD). PTD, jsou krátké peptidy schopné vstoupit do buňky a doručit do buněk molekuly k nim připojené, jako například enzymy, DNA, lipozómy či kovové částičky. Stejně tak jsou schopné vstoupit do uměle připravených membránových váčků neobsahující žádné proteinové receptory a doručit do nich fúzní molekuly. V posledních letech se ukázalo, že tyto domény se nacházejí i ve virových proteinech.

Procesy odpovědné za vlastnosti PTD nebyly dosud dostatečně objasněny, je však zjevné, že jejich důsledným prostudováním budou objeveny nové souvislosti týkající se buněčné endocytózy a osudu proteinů v buňce po internalizaci. Nové poznatky bude možné dále aplikovat na klinický výzkum ke zlepšení systémů využívaných při genové terapii či transportu léčebných látek a cytostatik do nádorových buněk.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

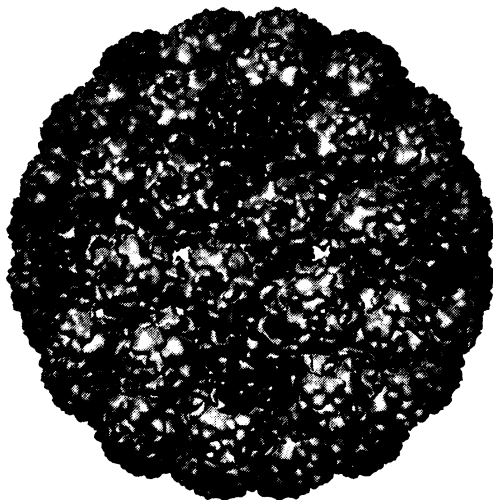
2.1. Myší Polyomavirus

Myší polyomavirus je malý neobalený DNA virus ze skupiny Polyomaviridae. Genom je tvořen kruhovou dsDNA o velikosti 5295 bp (COLE 1996) a je možné rozdělit ho na tři části, časnou, pozdní a regulační.

Časná oblast kóduje tři proteiny, malý (ST), střední (MT) a velký (LT) tumor antigen. Všechny tři proteiny mají společnou N koncovou část a liší se různou C koncovou oblastí, vzniklou alternativním sestřihem. Časné antigeny zajišťují přechod buňky do S fáze, replikaci viru a transformaci infikovaných buněk.

Pozdní oblast kóduje tři strukturální proteiny: majoritní VP1 a minoritní VP2 a VP3 proteiny. Jejich jednotlivé monocistronní molekuly mRNA vznikají ze společného RNA prekurzoru alternativním sestřihem. Nukleotidová sekvence N konce VP1 se překrývá s C koncovou oblastí VP2/VP3 v odlišném čtecím rámci. Sekvence VP2 obsahuje na C konci celý gen pro VP3 ve stejném čtecím rámci, na N konci VP2 se nachází jeho unikátní část (obr 2.3 b).

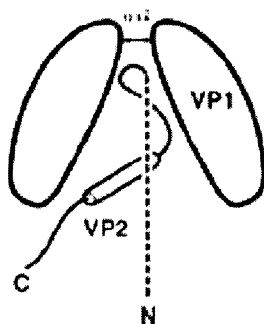
Regulační oblast se nachází na genomu mezi oběma kódujícími oblastmi, je netranskribovaná, obsahuje počátek DNA replikace a promotory transkripce pro časnou i pozdní oblast genomu.



Obr. 2.1: Struktura polyomavirové kapsidy, tmavě modře jsou znázorněny pentavalentní pentamery, světle hexavalentní pentamery (Převzato z www.cgl.ucsf.edu).

Kapsida (obr 2.1) má ikosahedrální symetrii o triangulačním čísle $T=7$ a je složena ze 72 quasiekvivalentních pentamer proteinu VP1 v jejichž centrální dutině se nachází navázaný VP2 nebo VP3 protein (obr. 2.2). Dvanáct pentamer na vrcholcích ikosahedru

je pentavalentních, zbývajících 60 pentamer je hexavalentní. VP1 je odpovědný za tvorbu kapsid (je schopen se spontánně uspořádat do pentamerů kapsomerů a pseudovirových částic). Je rovněž odpovědný za rozpoznání receptoru na povrchu buňky a za nesespecifickou interakci s DNA.



Obr. 2.2: Schématické zobrazení interakce VP2 proteinu s pentamerem VP1 (průřez pentamerem na kterém jsou znázorněny dvě molekuly VP1) (Převzato z CHEN *et al.* 1998)

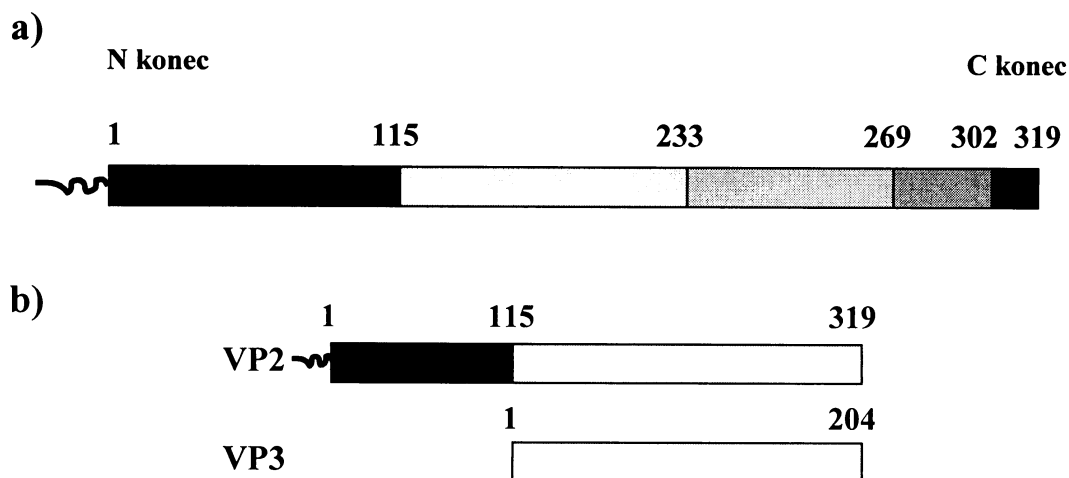
2.1.2 Minoritní strukturní proteiny VP2 a VP3

Úloha minoritních kapsidových proteinů v životním cyklu viru není objasněna, je však známo, že mají vliv na vstup viru do hostitelské buňky a transport jeho genomu do jádra. Ztráta obou minoritních proteinů je pro virus letální a ztráta jednoho z nich vede k výraznému snížení infekivity (MANNOVÁ *et al.* 2002).

Oba minoritní proteiny jsou postradatelné pro tvorbu pseudokapsid, které mohou vznikat z VP1 pentamerů za přítomnosti Ca^{2+} iontů. Pokusy o zabalení virového minichromozomu VP1 pentamerami bez přítomnosti VP2 a VP3 proteinu bylo neúspěšné i přesto, že minoritní proteiny myšího polyomaviru nemají afinitu k DNA, zatímco pseudovirové partikule skládající se z VP1 mají schopnost enkapsidovat volnou DNA. Vazba VP2/VP3 na VP1 pentamery je nezbytná pro některé posttranslační modifikace VP1, jako například fosforylace (FORSTOVÁ *et al.* 1993; LI *et al.* 1995) a ovlivňují tak konečnou podobu a vlastnosti virionů.

I přesto, že za rozpoznání receptoru je odpovědný protein VP1, jsou patrně minoritní proteiny při vstupu virionů do buněk využívány pro interakci s buňkou, možná interakci s koreceptorem. Tato hypotéza je podporována faktem, že pseudovirové částice tvořené samotným VP1 nijak nekompetují s virem (AN *et al.*

1999), kdežto částice obsahující vedle VP1 ještě minoritní protein jsou schopné inhibovat infektivitu viru (ŘÍPOVÁ 2002).



Obr. 2.3: a) Sekvence proteinu VP2. 1-115 aa – N terminální unikátní oblast VP2, 1-233 – mírně konzervativní oblast, 234-269 – vysoce variabilní oblast, 270-302 – vysoce konzervativní oblast, 303-319 – C terminální oblast s jaderným lokalizačním signálem. b) protein VP2 ve své C terminální oblasti (115-319) obsahuje celý protein VP3 ve stejném čtecím rámci.

Na N konci proteinu VP2, 1-115 aa, se nachází unikátní oblast. N konec VP2 je myristylován, tato posttranslační modifikace je vysoce konzervovaná u všech členů čeledi Polyomaviridae (SCHMIDT 1989). To ukazuje na důležitou roli této modifikace v životním cyklu viru. Pro VP3 není známa žádná posttranslační modifikace. Myristylace probíhá na glycinu v sekvenci Met-Gly-X-X-X-Ser/Thr za účasti cytoplazmatického enzymu N-myristyltransferázy. N koncový glycin je pro tuto modifikaci esenciální (RESH *et al.* 1999) a po jeho odstranění k myristylaci nedochází (KRAUZEWICZ *et al.* 1991, SAHLI *et al.* 1993). Myristylace zvyšuje hydrofobicitu proteinu, avšak není dostatečným signálem pro lokalizaci v membráně (PEITZSCH *et al.* 1993) a VP2 má při transientní expresi v savčích buňkách jadernou lokalizaci (KEČKÉŠOVÁ 2003, BOUŘA 2004).

Mutanty u nichž byl terminální glycin zaměněn za alanin měli dvacetinásobně nižší infektivitu a celkově zpžděný životní cyklus (SAHLI *et al.* 1993). Nezáleží však jen na odstranění myristylu, ale i na povaze koncové aminokyseliny. Při nahrazení glycinu glutaminem či kyselinou glutamovou nemá odstranění myristylu vliv na vstup viru do buněk, expresi časných antigenů a replikaci. Vzniklé mutace se projeví v životním cyklu viru až v pozdních fázích, kdy při tvorbě stejného množství virionů jako u wt dochází ke snížení schopnosti reinfekce sousedních buněk (MANNOVÁ *et al.* 2002). Při nahrazení glycinu histidinem, je ve virionech detekováno velmi malé

2002). Při nahrazení glycinu histidinem, je ve virionech detekováno velmi malé množství VP2, a dochází ke značnému snížení infekivity viru a účinnosti transportu jeho genomu do jádra. Tento fenotyp se podobá mutantům jejichž viriony postrádají celý VP2 nebo VP3 protein (MANNOVÁ *et al.* 2002).

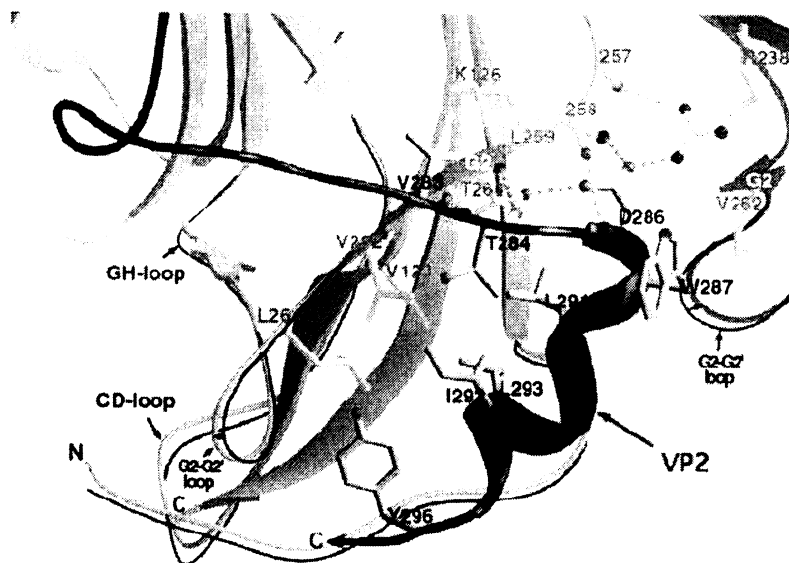
Myristylová skupina patrně není přímo nezbytná při vstupu virionu do buňky a neinteraguje s koreceptorem, jak se předpokládalo v dřívější hypotéze. Ta předpokládala, že po vazbě virionu na receptor, dojde ke konformační změně a protažení N koncové části VP2 skrz dutinu pentameru. Následná interakce myristylu s membránou by mohla usnadnit internalizaci virionu (CHEN *et al.* 1998).

Je možné, že myristyl hraje důležitou roli při formování virových částic v pozdní fázi životního cyklu, například ovlivněním konečné konformace VP1 pentamerů či ovlivněním místa sestavování virionů, jako je tomu u jiných virů. I když myristylace VP4 proteinu polioviru se při vstupu viru do buněk uplatňuje, je také důležitá pro sestavení a stabilitu virionů (MARC *et al.* 1990; ANSARDI *et al.* 1992; MOSCUFO et CHOW 1992). Vazba do specifických membránových domén je nezbytná pro formaci polioviru (MARTIN -BELMONTE *et al.* 2000). Myristylace Gag polyproteinu je nezbytná pro formaci a maturaci virionů u retrovirů C typu a lentivirů (REIN *et al.* 1986; BRYANT et RATNER 1990).

C koncová oblast 116-319 aa VP2 je totožná se sekvencí VP3 (obr 2.3 b). Tyto dva proteiny nevznikají proteolytickým štěpením, ale translací monocistronní mRNA vzniklé alternativním sestřihem společné prekurzorové RNA (BATT *et al.* 1994). Prvních 233 aminokyselin VP2 a 118 aminokyselin VP3 na N konci obsahují mírně konzervativní úsek, který směřuje do vnitřku kapsidy. Oblast 234-269 aa je tvořen vysoce variabilní sekvencí. V tomto úseku se řetězec minoritních proteinů ohýbá v horní části dutiny pentameru.

Oblast 270-302 aa je vysoce konzervativní oblast u všech příbuzných polyomavirů, obsahuje hydrofóbní α helix, který je jedinou známou sekundární strukturou minoritních proteinů myšího polyomaviru. Jelikož vnitřní dutina pentameru VP1 je také hydrofóbní, zajišťují hydrofóbní vazby interakci mezi pentamerem a minoritními proteiny.

Na C konci obou minoritních proteinů se nachází jaderný lokalizační signál (EEDGPQKKRRL). Během infekce jsou VP2 i VP3 lokalizovány v jádře. Při produkci pomocí bakulovirového expresního systému v buňkách Sf9 vykazují



Obr. 2.4: Hydrofóbní interakce a vodíkové vazby mezi VP1 a VP2. Struktura VP1 bez navázaného minoritního proteinu je zobrazena tenkými světlými čarami (po navázání VP2 či VP3 dojde k malé konformační změně). VP2 aminokyseliny popsány tmavě, VP1 aminokyseliny popsány světle (Převzato z CHEN *et al.* 1998).

cytoplazmatickou lokalizaci, VP2 na membránách v perinukleárním prostoru VP3 má lokalizaci difúzní. Při koexpresi VP2 nebo VP3 s VP1 se dostávají minoritní proteiny do jádra v komplexu s VP1 (FORSTOVÁ *et al.* 1993). Při transientní expresi samotných proteinů v savčích buňkách mají VP2 i VP3 jadernou, nebo jadernou a částečně cytoplazmatickou lokalizaci. Při společné expresi VP2 nebo VP3 s VP1 v savčích buňkách dochází k zvýšení jejich jaderné lokalizace (KEČKĚŠOVÁ 2003, BOUŘA 2004).

To ukazuje na vzájemný vliv a kooperaci strukturálních proteinů při jejich transportu do jádra.

Py2a	-SGEvlkfyq Aqvvvsh	QRvt Pd	WMLPLi LGLYGdiTP-
BKV	-SGEFIEkti APGGAn	QRt APq	WMLPLLLGLYGtvTP-
JCV	-SGEFIErsi APGGAn	QRs APq	WMLPLLLGLYGtvTP-
SV40	-SGEFIEkfeAPGGAn	QRt APq	WMLPLLLGLYGsvTP-
Avian	-tGqt IEqqtp PGGAm	QRhAnd	WMLPLi LGLYGdlTP-
Bovis	-Sa EyvEkygAPGG Ae	QRvAPd	WMLPLLLGLYGdlTP-
Konsenzus	-SGEFIE---APGGA-	QR-AP-	WMLPLLLGLYG--TP-

Tab. 2.1: Vysoce konzervativní oblast v sekvenci VP2/VP3. Aminokyselinová sekvence 264-301.

2.2. Protein Transdukční Domény

Protein transdukční domény (PTD) jsou krátké peptidy schopné překonat cytoplazmatickou bariéru a vstoupit do buněk. Pokud jsou k připojeny molekuly (enzymy, nabitě molekuly, kovové částice či lipozómy) jsou PTD domény schopny je transportovat do buněk také. Proto jsou PTD intenzivně zkoumány pro jejich možné využití jako vakcinačních vektorů, ale také jako prostředků pro odhalení nových biologických procesů v buňce či vlivu patogenů na hostitelé.

PTD se dělí do dvou základních skupin, jsou to za prvé sekvence bohaté na arginin a za druhé amfipatické molekuly. Dále ještě existuje skupina nezařazených peptidů.

Peptidy bohaté na arginin

Penetratin	RQIKIWFQNRRMKWKK 16aa	(DEROSSI <i>et al.</i> 1994)
Tat(48–60)	GRKKRRQRRRPPQ 13aa	(VIVES <i>et al.</i> 1997)
Transportan	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL 27aa	(POOGA <i>et al.</i> 1998)
VP22	DAATATRGRSAASRPTERPRAPARSASRPRRPVD 34aa	(ELLIOTT <i>et al.</i> 1997)
TatP59W	Ac-GRKKRRQRRRPWQ-NH2 13aa	(THORÉN <i>et al.</i> 2005)
TatLysP59W	Ac-GKKKKKQKKKPWQ-NH2 13aa	(THORÉN <i>et al.</i> 2005)
Arg9	RRRRRRRRR 9aa	(WENDER <i>et al.</i> 2000)
Arg7	RRRRRRRc 7aa	(ROTHBARD <i>et al.</i> 2000)
R7W	Ac-RRRRRRRW-NH2 8aa	(THORÉN <i>et al.</i> 2005)

Amfipatické peptidy (primární a sekundární)

MAP	KLALKLALKALKAALKLA 18aa	(OEHLKE <i>et al.</i> 1998)
KALA	WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKACEA 30aa	(WYMAN <i>et al.</i> 1997)
ppTG20	GLFRALLRLLRSLWRLLLRA 20aa	(RITTNER <i>et al.</i> 2002)
Trimer (VRLPPP) ₃	18aa	(FERNANDEZ-CARNEADO <i>et al.</i> 2004)
P1	MGLGLHLLVLAAALQGAWSQPKKKRKV 27aa	(CHALOIN <i>et al.</i> 1999)

MPG	GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV 27aa	(MORRIS <i>et al.</i> 1997)
Pep-1	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV 21aa	(MORRIS <i>et al.</i> 2000)
Ostatní PTD		
hCT(9–32)	LGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAP 24aa	(SCHMIDT <i>et al.</i> 2000)
hCT(9-32)-br	LGTYTQDFNK+FHTFPQTAIGVGAP-NH2 +AFGVGPDEVKRKKKP-NH2 39aa	(FOERG <i>et al.</i> 2005)
VT5	DPKGDPKGVTVTVTVTGKGDPKPD 26aa	(OEHLKE <i>et al.</i> 1997)
pVEC	LLIILRRRIRKQAHAAHSK 18aa	(ELMQUIST <i>et al.</i> (2001)
pISL	RVIRVWFQNKRCCKDKK 16aa	(KILK <i>et al.</i> 2001)
PrPC (1–28)	MANLGYWLLALFVTMWTDVGLCKKRPKP 28aa	(LUNDBERG <i>et al.</i> (2002)
SAP	VRLPPPVRLLPPPVRLLPPP 18aa	(FOERG <i>et al.</i> 2005)

Tab. 1.2: Sekvence popsaných protein transdukčních domén.

2.2.1. Amfipatické PTD

Amfipatie znamená přítomnost hydrofóbní a hydrofilní oblasti na jedné molekule. Amfipatické molekuly se rozdělují na primární a sekundární. Primární amfipatie, též nazývaná segmentační, se vyznačuje hydrofilním úsekem na jednom konci peptidu a hydrofóbním na druhém konci (CHAOLIN *et al.* 1999).

Sekundární amfipatie je charakteristická vytvořením hydrofilních a hydrofóbních oblastí v molekule až po zaujmutí vyšší struktury. Nejčastějšími zástupci molekul se sekundární amfipatií jsou α helixy, jejichž aminokyselinové zbytky vytvářejí na jedné straně helixu hydrofilní a na druhé straně hydrofóbní povrch (obr. 2.6) (LANGEL *et al.* 2002). Tyto aminokyselinové zbytky nevytvářejí v primární sekvenci proteinu žádné hydrofilní či hydrofóbní domény.

2.2.1.1. Primární amfipatické PTD

Mezi primární amfipatické PTD patří synteticky připravené molekuly „SP“ a „FP“. „SP“ obsahuje hydrofóbní oblast lehkého řetězce imunoglobulinu *Caiman crocodylus*, „FP“ obsahuje hydrofóbní segment o 17 aminokyselinách z membránového proteinu HIV gp41. Obě sekvence jsou fúzované s hydrofilním jaderným lokalizačním signálem (nls) velkého T antigenu viru SV40 (HEITZ *et al.* 2001).

SP – MGLGLHLLVLAAALQGA **WSQP** **PKKKRKV**

FP – GALFLGFLGAAGSTMGA **WSQP** **PKKKRKV**

Obr. 2.5: Zástupci PTD s primární amfipatickou strukturou. První oblast, úsek značící hydrofóbní aminokyseliny, třetí oblast, hydrofilní úsek (nls velkého T antigenu SV40). (Převzato z MARCELO *et al.* 2004)

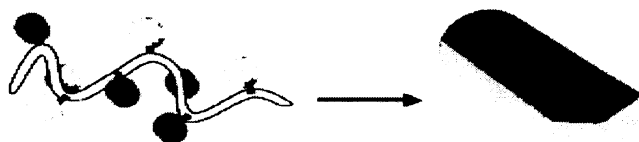
„SP“ byly buňkami fibroblastů rychle internalizovány a vstupovaly do jádra. Byly použity pro transport porfirinů a kovalentně vázaných oligonukleotidů. Silné elektrostatické interakce s jedno- i dvouvláknovou DNA byly využity k transportu oligonukleotidů do buněk srdečního svalu (CHALOIN *et al.* 1998). Tento proces, pozorován na živých buňkách pomocí fluorescenčně označených PTD, byl nezávislý na endocytóze, probíhal úspěšně i při 4°C. „SP“ se při 10 µM koncentraci choval cytotoxicky. Změny membránového potenciálu a pH gradientu naznačují, že peptid pravděpodobně vytváří póry v cytoplazmatické membráně (CHALOIN *et al.* 2001).

„FP“ vykazuje vysokou účinnost při transportu DNA kódující luciferázu, β-galaktosidázu nebo při transportu iRNA. Transport je nezávislý na endocytóze a probíhá i v přítomnosti inhibitorů endocytózy; cytochalasinu B, bafilomycinu A a chloroquinu na živých buňkách s různými fluorescenčními značkami. Při substituci druhého lysinu za serin v nsl dojde ke změně jaderného transportu na cytoplazmatický (SIMEONI *et al.* 2003). „FP“ není cytotoxický ani při koncentracích 100 µM (MORRIS *et al.* 1997). To v porovnání s „SP“ vylučuje přímé spojení cytotoxicity se strukturou primárně amfipatických molekul.

2.2.1.2. Sekundární amfipatické PTD

Mezi molekuly se sekundární amfipaticitou patří MAP („model amphipathic peptides“) odvozené od sekvence KLALKLALKALKKAALKLA-NH₂. Tyto peptidy

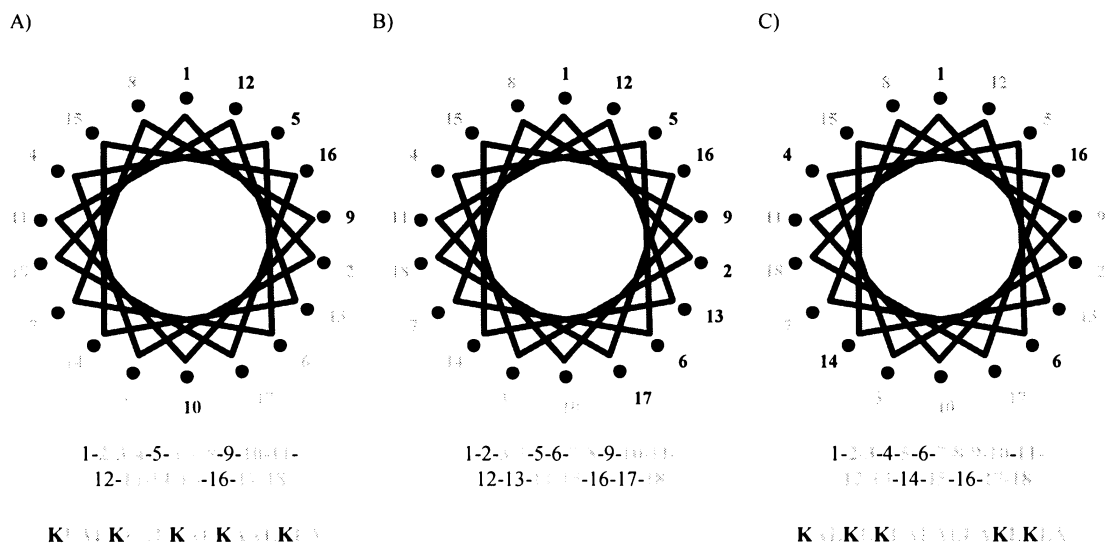
tvorí amfipatické α helixy a vstupují do buněk. Peptidy odvozené od podobné sekvence KALKLKLALALLAKLKLA-NH₂ nevytváří na helixu hydrofóbní a hydrofilní domény (obr. 2.7) a nevstupují do buněk (OEHLKE *et al.* 1996). MAP jsou schopné dopravit do buněk krátké, kladně nebo záporně nabitě peptidy nebo DNA (OEHLKE *et al.* 1998). Molekuly některých MAP se váží na membránu a rozrušují ji.



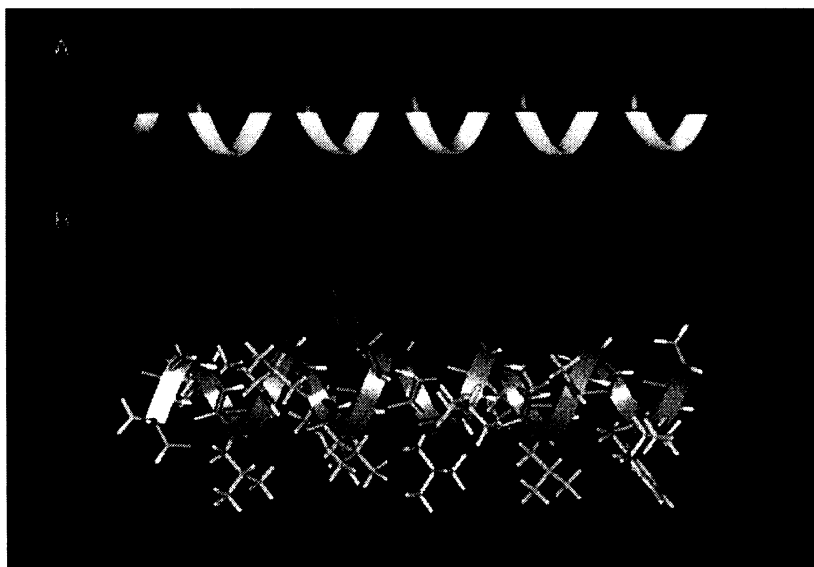
Obr. 2.6: Schématické znázornění vzniku sekundární amfipatie u α helixu (Převzato z DESHAYES *et al.* 2005)

Peptid KALA (WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKACEA) destabilizuje membrány a má DNA vazebnou aktivitu. Proto u něj jako u prvního byla pozorována schopnost transfekce buněk (WYMAN *et al.* 1997). Příbuzný peptid GALA (WEAALAEALAEALAEHLAEALAEALEALAA) nemá DNA vazebnou schopnost, je však schopen destabilizace membrán v závislosti na pH a dokáže tak cíleně narušovat membránu endozómů (SUBBARAO *et al.* 1987). Schopnost transfekce mají i další peptidy: pTG20 (GLFEALLELLESLWELLLEA) (RITTNER *et al.* 2002), Ac-(LARL)₃(LLRAL)₃-NH₂ (46) a KLLKLLLKLWKKLLK-LLK (Hel 11-7) (NIIDOME *et al.* 1999).

Při vstupu do buněk dochází k akumulaci peptidu ve váčcích. Mutace omezující schopnost destabilizace membrán nezbytné pro uvolnění z endocytotických váčků sníží účinnost trasfekce (NIIDOME *et al.* 1997). Transfekce pomocí některých peptidů (pTG20) probíhá i *in vivo* (RITTNER *et al.* 2002).



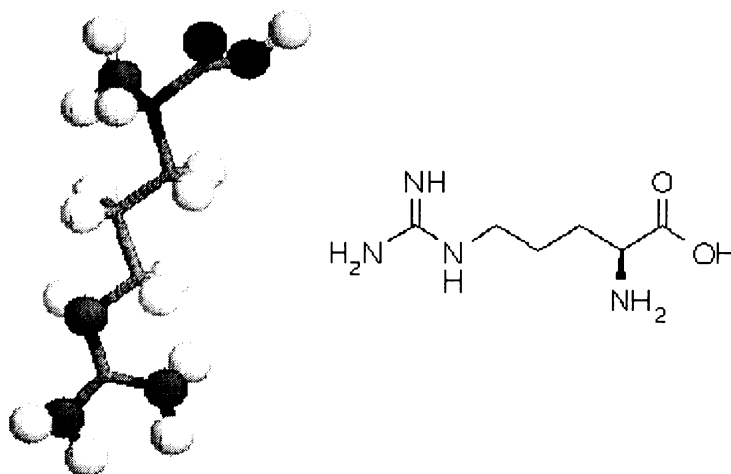
Obr. 2.7: Rozmístění 18 aminokyselin v helixu (průmět helixu podél jeho osy). Šedě jsou znázorněny hydrofóbní aa, černě hydrofilní aa. Číselná sekvence určuje pořadí aa v peptidu, diagram znázorňuje umístění hydrofóbní a hydrofilní oblasti v prostoru. A) hydrofilní oblast zabírá 100° výseč a odpovídá sekvenci KLALKLALKALKKAALKLA, B) hydrofóbní oblast zabírá výseč 180°, C) sekvence peptidu KALKLKLALALLAKLKLA, helix postrádá oddělené hydrofóbní a hydrofilní oblasti, není amfipatický.



Obr. 2.8: Amfipatický peptid GLFRALLRLLRSLWRLLLRA, hydrofóbní část je ve spodní polovině, hydrofilní v horní polovině. (Převzato z RITTNER *et al.* 2002).

2.2.2. PTD bohaté na arginin

Druhou základní skupinou jsou peptidy se sekvencí bohatou na arginin. Důležitá charakteristikou těchto peptidů je jejich kladný náboj, ale také přítomnost guanidinových skupin a jejich vzájemná poloha (WENDER *et al.* 2000). Při nahrazení argininu molekulou lysinu či citrulinu dochází k inhibici transdukce. Samotný kladný náboj nezajišťuje vlastnosti těchto PTD bohatých na arginin. Oligoarginin skládající se z 8 aminokyselin je účinným PTD, ovšem polymer skládající se pouze z 6 nebo naopak z 16 podjednotek tyto vlastnosti již ztrácí (ROTHBARD *et al.* 2000).

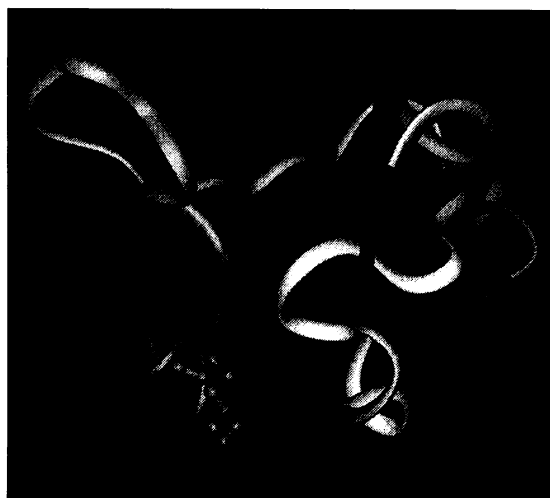


Obr. 2.9: arginin – kyslík tmavě šedá, vodík bílá, dusík světle šedá (Převzato z IMGT Marie-Paule page).

Sekundární struktura zřejmě neovlivňuje vlastnosti těchto peptidů. Inzercí prolinu doprostřed sekvence α helixu penetratinu, které způsobí rozrušení jeho struktury, nedochází k ovlivnění internalizace, stejně tak nahrazení všech aminokyselin jejich D-enantiomery (DEROSSO *et al.* 1996).

TAT protein (obr 2.10) je „trans-aktivační transkripční aktivátor“ viru HIV 1 skládající se z 86 aminokyselin. TAT má schopnost vstupovat do jader různých buněk v závislosti na jeho koncentraci a na čase (MANN *et al.* 1991). Obsahuje krátkou oblast odpovědnou za jadernou lokalizaci (SIOMI *et al.* 1990) a vazbu na RNA (WEEKS *et al.* 1990). Samotná tato oblast TAT (48-60) je postačující pro internalizaci buňkami a mutace uvnitř této sekvence značně snižuje účinnost vstupu (VIVES *et al.* 1997). Tato

oblast se nepřekrývá se sekvencí kódující amfipatický α helix, který tudíž u TAT není využíván pro internalizaci (LORET *et al.* 1991).



Obr. 2.10: Struktura molekuly TAT (Převzato z www.sissa.it/cm/bc/research)

Penetratin je 16 aminokyselinový peptid odvozený z třetího α helixu (43-57) proteinu antennapedia z *Drosophily*, který slouží v ontogenetickém vývoji jako homeoprotein. Antennapedia protein se skládá ze tří helixů, třetí α helix je od zbytku sekvence oddělen β listem a je zodpovědný za rozpoznávání DNA sekvence (GEHRING *et al.* 1994). Celý protein je internalizován savčími neurony kde se dostává do jádra a mění morfologii neuronů (JOLIOT *et al.* 1991). Ve fázi dospělosti u *Drosophil* je protein antennapedia stále exprimován, ale s odlišnou a zatím dosud neznámou funkcí (DEROSSO *et al.* 1994).

VP22 je hlavní protein obalového tegumentu viru herpes simplex 1 (HSV – 1). VP22 produkovaný v buňkách se nalézá v cytoplazmě v podobě vláken, kolokalizující s mikrotubuly, avšak v sousedních buňkách, kam penetruje, má jadernou lokalizaci a váže se na chromatin (ELLIOTT *et al.* 1997).

Transportan je chimerická molekula odvozena od N koncové sekvence galaninu navázaného přes lysin na mastoparan, peptid vosího toxinu, který interaguje s membránou. Transportan je internalizován buňkami, kde se váže na membránové struktury a v jádře pravděpodobně na jadérko (POOGA *et al.* 1998)

Mnoho dalších proteinů bohatých na arginin, jako jsou deriváty virových proteinů vážící DNA (Rev HIV, γ protein „Flock house“ viru), proteiny obsahující motiv

leucinového zipu nebo deriváty kvasinkových transkripčních faktorů, se jeví jako potencionální PTD.

2.2.3. Vstup PTD do buněk

Základní problematikou PTD se stalo odhalení mechanismu jejich vstupu. Po prvních pokusech se zdálo, že tyto domény mají schopnost vstoupit do buněk novým a zatím neznámým způsobem. Do roku 2002 se věřilo, že vstup zkoumaných PTD a jejich fúzních variant je na endocytóze zcela nezávislý.

Při fluorescenčních pokusech se vstup jevil nezávislý na teplotě, ATP či přítomnosti inhibitorů endocytózy (DEROSSI *et al.* 1996, VIVES *et al.* 1997, FUTAKI *et al.* 2001). Při porovnání vstupu peptidu TAT (48-60) tvořeným D-enantiomery nebyl pozorován rozdíl v účinnosti vstupu (BRUGIDOU *et al.* 1995, WENDER *et al.* 2000), u D-enantiomeru oligoargininu byla účinnost dokonce vyšší (ELMQUIST *et al.* 2001). To vedlo k hypotéze, že vstup je zcela nezávislý na receptoru. Dále byla pozorována velmi rychlá dynamika vstupu, po pěti minutách byl peptid lokalizován v jádře (DEROSSI *et al.* 1996).

Dosavadní pokusy ukazují, že PTD vstupují na endocytóze závislou (KOPELHUS *et al.* 2002) i nezávislou (SILHOL *et al.* 2002) cestou. Vstup pomocí endocytózy je pravděpodobně hlavním způsobem internalizace mnoha peptidů považovaných za PTD, schopnost vstupu na endocytóze nezávislým způsobem je patrně využíván jen některými „opravdovými“ PTD.

2.2.3.1. PTD nevstupují do jader buněk během prvních 5ti minut po adsorpci

V roce 2003 skupina Bernarda Lebleu (RICHARD *et al.* 2003) dokázala, že rychlý vstup PTD (TAT(48-60), VP22, oktamer lysinu nebo oktamer argininu) do jader buněk je pouhým artefaktem vzniklým během fixace buněk. PTD fúzované s GFP během vstupu v živých buňkách kolokalizovali s transferinem, markerem klatrinové endocytózy. Po vyčerpání ATP účinky azidu a deoxyglukózy či při nízké teplotě došlo k inhibici vstupu. Kinetika vstupu odpovídá endocytóze a PTD se nacházejí v cytoplazmatických váčcích. Naopak po fixaci buněk byly PTD ve stejném čase nalezeny v jádrech a to i po inkubaci na ledu či po vyčerpání buněčných zásob ATP.

Nebyla patrná žádná lokalizace s transferinem (LEBLEU *et al.* 2003). K tomuto jevu patrně dochází díky silnému kladnému náboji. U některých PTD (např. hCT) však nebyl pozorován rozdílný signál u fixovaných a živých buněk (PICHON *et al.* 1999).

Pokusy vyhodnocující úspěšnost vstupu PTD do buněk pomocí průtokové cytometrie, byly také zkresleny artefakty. Po odmývání PTD z buněk pomocí pufru zůstane PTD, díky silnému kladnému náboji, navázan na membráně. Tento signál z povrchu membrány je poté vyhodnocen jako intracelulární signál. Pro přesný výsledek je nutné ošetřit buňky pomocí tripsinu, aby došlo k odstranění PTD z povrchu membrány.

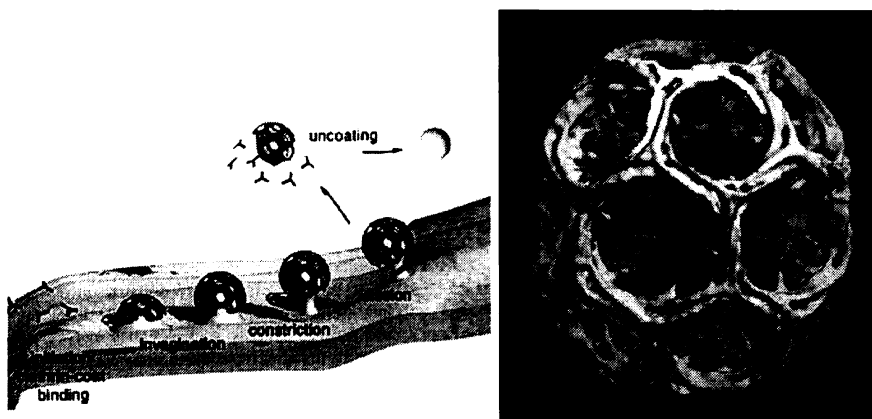
Takto provedené pokusy vyvrátili dřívější výsledky o vstupu PTD bohatých na arginin do buněk za nízkých teplot, bez přítomnosti ATP nebo po krátkém časovém intervalu (5 min.), výsledný signál odpovídá kinetice endocytózy (RICHARD *et al.* 2003).

2.2.3.2. Vstup PTD do buněk endocytózou

Typickými představiteli PTD vstupující pomocí endocytózy jsou peptidy bohaté na arginin, které využívají většinu ze známých endocytotických drah (MELLMAN *et al.* 1996). Při vstupu TAT pomocí endocytózy jsou využívány buněčné receptory jako například CD26 (GUTHEIL *et al.* 1994), CXCR4 (XIA *et al.* 2000), heparan sulfátové proteoglykany (TYAGI *et al.* 2001), a LRP (low-density lipoprotein receptor-related protein) (LIU *et al.* 2000).

V buňkách CHO (buněčná linie z vaječnicků křečků) a HeLa (imortalizované buňky pocházející z cervikálního karcinomu) byla při vstupu TAT pozorována kolokalizace s transferinem a docházelo k zastavení internalizace při použití inhibitorů klatrinové endocytózy (POTOCKY *et al.* 2003, RICHARD *et al.* 2005).

V buňkách Namalwa (B lymfocytární buněčná linie z Burkittova lymfomu), byla pozorována internalizace pomocí makropinocytózy (KAPLAN *et al.* 2005). Při makropinocytóze TAT HeLa buňkami dochází k internalizaci i volného, 70kDa velkého dextranu z extracelulární vodné fáze. Makropinocytózou byl internalizován i oligoarginin v HeLa buňkách (NAKASE *et al.* 2004). Tuto cestu využívají PTD fúzované s proteiny většími než 30 kDa (WADIA *et al.* 2004).



Obr. 2.11: Modelace struktury klartinových váčků (Převzato z www.the-else-gazette.org)

HeLa buňky internalizují TAT-GFP i pomocí kaveol. PTD kolokalizují s kaveolinem 1, kinetika vstupu je pomalá (3 $\mu\text{m}/\text{h}$) a závislá na raftech (FITTIPALDI *et al.* 2003, CONSOLE *et al.* 2003).

Vstup ve váčcích vysvětluje internalizaci PTD fúzovaných s velkými molekulami.

Byl také pozorován vstup PTD bohatých na arginin nezávislý na endocytóze. Existují však rozdílné názory na spotřebu energie, zda se jedná o jev závislý na vnitrobuněčném ATP (MITCHEL *et al.* 2000), nebo zda je vstup na ATP nezávislý a pouze při změně teploty dojde ke změně lokalizace v buňce (THORÉN *et al.* 2003).

Penetratin vstupuje také na endocytóze nezávislou cestou. Ta je však inhibována nízkou teplotou i nedostatkem ATP v buňkách, pokud dojde k substituci lysinů za argininy, zůstane penetratin navázaný na vnější membráně. TAT využívá neendocytotickou dráhu, je však závislý na zásobě ATP v buňce, ale probíhá i při 4°C (THORÉN *et al.* 2003).

2.2.3.3. Na endocytóze nezávislý vstup

Princip internalizace nezávislé na endocytóze dosud nebyl objasněn. Stávající hypotézy vycházejí z afinity PTD k lipidovým membránám a jejich interakce s uměle připravenými váčky.

PTD jako R7W, TAT 59W, TAT LysP59W po při přidání k lipidovým váčkům způsobí fúzi jednotlivých váčků bez vylití jejich obsahu, to znamená, že nevytvářejí v membránách póry. Penetratin iniciuje agregaci váčků (THORÉN *et al.* 2005). Při přidání penetratinu fúzovaného s fluorescenční značkou k váčkům, byl pozorován

oboustranný transport PTD dovnitř a ven z váček a to i přes několik vrstev membrán (THORÉN *et al.* 2000), to ukazuje, že některé PTD mohou transportovat fúzované molekuly přes membránu bez pomoci buněčných proteinů.

Změna konformace může vést ke změnám vlastností molekuly, například k agregaci jednotlivých peptidů do větších komplexů, které mohou být přímo odpovědné za translokaci přes membránu či tvorbu pórů a rozrušení membrán. Destabilizace membrán je závislá na koncentraci PTD (WAGNER *et al.* 2004), při nízké koncentraci nedojde k permeabilizaci membrán patrně proto, že se netvoří větší komplexy.

Při navázání PTD na lipidickou vrstvu může docházet k změně konformace. Penetratin po navázání změní svoji strukturu z „random coil“ na α helix či β list (MAGZOUB *et al.* 2000), v roztoku SDS (imitující fosfolipidické prostředí) zaujímá penetratin přednostně helixovou strukturu, na rozhraní vodné a lipidické fáze spíše strukturu β listu (BELLET-AMALRIC *et al.* 2000). Transportan má ve vodném prostředí strukturu „random coil“, v SDS zaujímá strukturu α helix (LINDBERG *et GRASLUND* 2001).

Ukázalo se, že amfipatické molekuly se strukturou β listu jsou schopné translokace přes membrány (OEHLKE *et al.* 1997). PTD, které v lipidovém prostředí zaujímají strukturu α helixů, často tvoří na membránách póry (GAZIT *et al.* 1998, ZEMEL *et al.* 2003). Konformační změny indukující následnou transdukcí proteinu přes membránu mohou být zapříčiněny také například změnou pH v endozómech.

Žádné konformační změny nebyly pozorovány u oligoargininu, který interaguje s lipidy patrně elektrostaticky (GONCALVES *et al.* 2005).

2.2.3.3.1. Hypotézy mechanismu přímé translokace proteinů membránou

Mechanismus přímé translokace PTD přes buněčnou membránu vychází ze třech základních hypotéz: invertované micely, kobercový model a formace pórů.

Invertované micely (obr. 2.12 a) byly pozorovány u penetratinu pomocí NMR (DEROSSI *et al.* 1996). PTD se naváže na membránu aminokyselinami s kladným nábojem, hydrofóbní aminokyseliny interagují s lipidy za vzniku micel integrovaných do lipidové dvojvrstvy. Při opětovném vzniku lipidové dvojvrstvy z micel dojde k uvolnění PTD do buňky nebo zpět do extracelulárního prostoru. Mechanismus

invertovaných micel nevysvětluje vstup PTD obsahující jen kladně nabitě aminokyseliny bez hydrofóbních aminokyselin jako je oligoarginin. Dále také nevysvětluje vstup PTD fúzovaných s molekulami o velké molekulové hmotnosti.

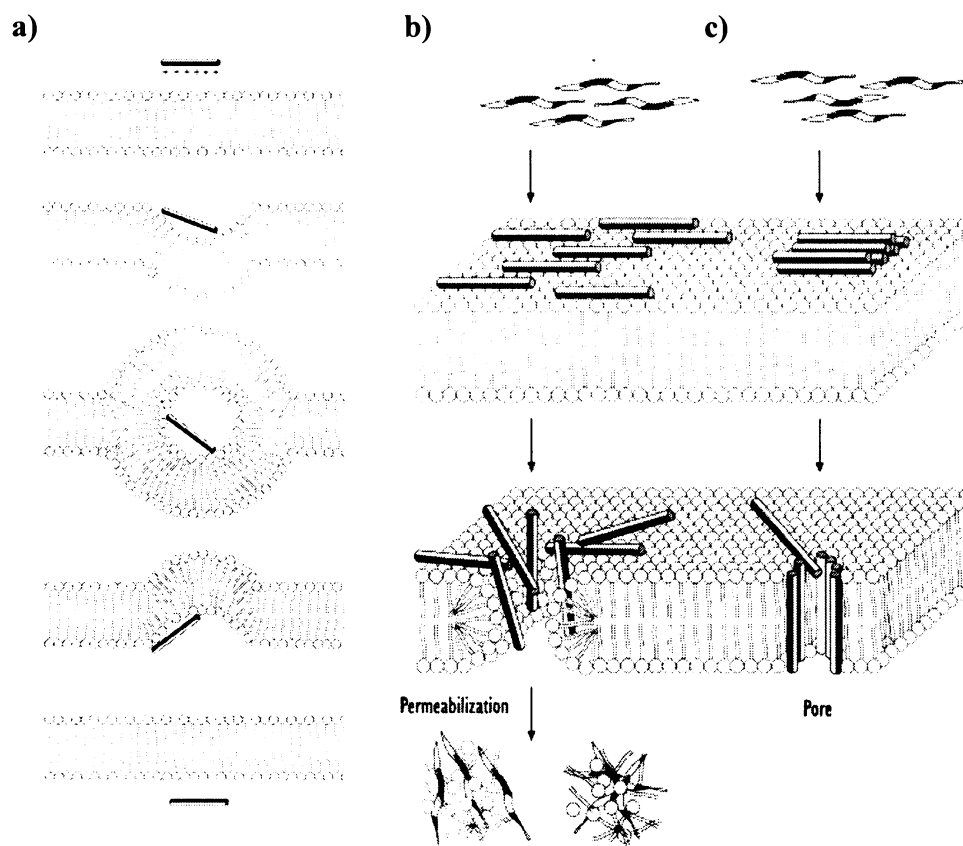
Kobercový model (obr. 2.12 b) vychází z modelu interakce antimikrobiálního peptidu dermaseptinu (34 aa dlouhý peptid izolovaný z kůže obojživelníků) s membránou (POUNY *et al.* 1992). PTD se naváže na membránu pomocí aminokyselin s kladným nábojem, po změně konformace v oblasti bazických aminokyselin dojde k rotaci a zanoření hydrofóbních aminokyselin do membrány a vzniku malých ruptur. Posledním modelem je tvorba pórů (obr. 2.12 c) v membráně (GAZIT *et al.* 1994).

Kobercový model vysvětluje cytotoxicitu PTD, která se objevuje jen při vysokých koncentracích peptidu. Tvorba pórů odpovídá cytotoxicitě lineárně závislé na koncentraci peptidu (OEHLKE *et al.* 1998). Rozbití membrán je těsně spjaté s hydrofobicitou peptidu (PONTUS *et al.* 2003). Poslední dva jmenované modely vyžadují k transdukcii proteinů do buněk jejich denaturaci. TAT-dihydrofolát reduktáza byla internalizována do buněk. Při přidání analogu kyseliny listové – methotrexátu, který se pevně váže na enzym a zabraňuje jeho denaturaci, je vstup inhibován (BONIFACI *et al.* 1995).

Mechanismus translokace proteinů přes lipidickou dvojvrstvu může být využíván jak na plazmatické membráně tak ve vnitřních buněčných kompartmentech, jako jsou třeba endocytotické váčky, Golgiho aparát či endoplazmatické retikulum.

2.2.3.3.2. Vstup biologicky funkčních PTD do buněk

Některé pokusy se vstupem PDT jasně ukazují na jejich zvláštní schopnost transportovat do buněk fúzní molekuly přes membránovou bariéru. Takovým příkladem jsou fluorescenčně značené molekuly „SP“ nebo „FP“, u nichž byl vstup do buněk při 4°C (CHALOIN *et al.* 2001), nebo v přítomnosti inhibitorů endocytózy pozorován na živých buňkách.



Obr. 2.12: a) model invertovaných micel, b) kobercový model, c) formace pórů. (Převzato z ELMQUIST *et al.* 2003)

Na druhé straně, nejsou zcela všechny pokusy s PTD transportujícími enzymy do jádra buňky či do cytoplazmy zcela průkazné. Může docházet k vzniku artefaktů. Jsou tři základní alternativní vysvětlení nahrazující hypotézu přímé proteinové transdukce přes plazmatickou membránu a doručení enzymu do jádra. První je možnost působení proteinu na plazmatické membráně pomocí signální transdukce receptorů, druhá možnost je působení enzymů ve váčcích endosekretorických drah a třetí je endosmolýza (LUNDBERG *et al.* 2003).

Jako první PTD byla objevena molekula TAT HIV 1. Po přidání tohoto virového proteinu do extracelulárního prostoru buněk, které nesou provirovou DNA HIV 1 ve své chromozomální DNA, dojde k aktivaci genů ležících za LTR (GREEN et LOEWENSTEIN 1988). První hypotézy předpokládali, že TAT se translokuje přímo přes cytoplazmatickou membránu a je transportován do jádra, kde aktivuje transkripci z LTR. Nedávné pokusy ukázaly, že se pravděpodobně nejedná o přímou translokaci na membráně, ale o uvolnění části molekul TAT z kyselých endozómů (endosmolýza), nebo se jedná o interakci molekul TAT s receptory přímo na membráně.

TAT aktivuje na plazmatické membráně povrchové receptory, které dále aktivují proteiny signální kaskády, například protein kinázu C (PKC)- α , ϵ nebo ζ (CONANT *et al.* 1996, BORGATTI *et al.* 1998). K aktivaci LTR proto může docházet i z povrchu buňky bez internalizace TAT.

Xia *et al.* (2001) ukázali internalizaci fúzního proteinu TAT(48-60)- β -glukuronidázy a transport biologicky funkčního enzymu do cytoplazmy. β -glukuronidáza je enzym hydrolyzující O-glykosylovou vazbu a primárně se nachází v lyzozómech, dále pak v endoplazmatickém retikulu, Golgiho aparátu a v extracelulárním prostoru. Po navázání fúzního proteinu na buňkou může dojít k internalizaci do endozómů a lyzozómů klasickou endocytotickou cestou. Enzym pak může působit v lyzozómech a nemusí být translokován do cytoplazmy.

Nagahara *et al.* (1998) ukázali, že Cre rekombináza fúzovaná s PTD translokuje do buňky a zprostředkovává rekombinaci v jádře. Cre rekombináza pochází z bakteriofága P1, rozeznává 34 bazí dlouhé úseky loxP a je schopna odstranit reportérový gen fúzovaný s loxP úseky. Pro zprostředkování rekombinace enzymem je potřeba jen jeho malé množství, které se může dostat do jádra pomocí endosmolýzy po endocytóze, jevu podobného transfekci buněk s použitím DNA a polyethyleniminu (CHESNOY *et al.* HUANG 2000). Komplex DNA-polykationt je adherován na povrch buňky a po endocytóze dochází k tvorbě agregátů které mohou destabilizovat endozómy.

Později bylo však dokázáno, že PTD pouze zvyšují účinnost transportu Cre rekombinázy do jádra. I samotná Cre rekombináza, po přidání do média, je transportována do jádra, kde katalyzuje rekombinaci DNA (WILL *et al.* 2002). K zvýšení účinnosti transportu dochází i po fúzi Cre rekombinázy s oligohistidinem nebo nls T antigenu SV40 (LINE *et al.* 2004).

2.2.3.3.3. Endosmolýza TAT PTD po endocytóze

Při vstupu TAT endocytózou do buněk Jurkat (lidská buněčná linie odvozená od leukemických buněk) je TAT 3 hod. po adsorbci lokalizován v časných endozómech a 5 až 6 hod. po adsorbci se peptid nachází v pozdních endozómech. TAT nevstupuje do Golgiho aparátu, ale je směřován k degradaci. Extracelulárně přidaný TAT, schopný aktivovat geny za LTR promotorem, se uvolňuje z endozómů do cytozolu a poté se transportuje do jádra díky své nls sekvenci (VENDEVILLE *et al.* 2004).

Aktivace reportérových genů ležící za LTR sekvencí TAT proteinem přidaným do média je blokována přidáním nokodazolu, činidla rozbíjejícího mikrotubuly a inhibujícího transport z časných do pozdních endozómů ve většině typů buněk (MALLARD *et al.* 1998). Při buněčné expresi TAT způsobuje nokodazol naopak zvýšení aktivace z LTR promotoru. Nokodazol rozrušuje mikrotubuly, které TAT svou interakcí zadržují, nejsou však již potřebné k jeho transportu.

Neutralizace endozomálního pH inhibuje translokaci TAT do cytozolu. Z izolovaných endozómů obsahující TAT se tento peptid postupně uvolňuje. Po 2 hod. dojde k vylití 30% peptidu. Nízké pH je pro tento proces nezbytné. Při translokaci přes endozomální membránu se nejedná pouze o interakci PTD s lipidovou dvojvrstvou, ale je zde využíván i buněčný chaperon protein Hsp90 (RATTS *et al.*, 2003). Při jeho inhibici novobiocinem dojde ke značnému snížení translokace (o 70%). Při translokaci TAT nedochází k rupturám endozomální membrány, protože nedochází k vylití 10 kDa velkého dextranu z endozómů po inkubaci s TAT (VENDEVILLE *et al.* 2004).

Jiné PTD mohou využívat rozdílné endocytotické cesty, oligoarginin využívá retrogradní dráhu do endoplazmatického retikula, citlivou k brefeldinu A (FISCHER *et al.* 2004).

Byl pozorován transport a lokalizace PTD (TAT, oligoarginin a penetratin) značených fluorescenční značkou v jádře (POTOCKY *et al.* 2003). Signál fúzního proteinu TAT-GFP se však hromadil kolem jaderné membrány a nebyl pozorován uvnitř jádra. GFP je protein se stabilní konformací, který je v neutrálním pH stabilní při 50°C nebo i v roztoku s 8 molární močovinou. Při jeho denaturaci dochází snadno k zpětné renaturaci. Na druhé straně je GFP citlivé k denaturaci teplem, SDS nebo močovinou v kyselém pH (ALKAABI *et al.* 2005). Při denaturaci během translokace GFP z kyselých endozómů může proto dojít k nevratné ztrátě konformace. Během transdukce z kyselých endozómů může dojít k denaturaci fúzovaného proteinu, což by snížilo signál fluorescence (FITTIPALDI *et al.* 2003). Z těchto důvodů by mohla být výsledná internalizace biologicky funkčních proteinů pomocí PTD značně nižší než se předpokládalo.

2.3. Virové proteiny připomínající PTD

V posledních letech byla objevena široká škála virových proteinů, které svoji sekvencí a strukturou připomínají protein transdukční domény. Virové peptidy připomínající PTD jsou krátké hydrofóbní či amfipatické helixy, jimiž interagují s membránami. Interakce těchto proteinů má však odlišný charakter než „klasické“ fúzení domény obalených virů jako jsou obalové proteiny Sendai viru či viru chřipky.

Tyto virové proteiny se mohou zařadit do tří základních skupin: viroporiny - nestrukturní proteiny, které vytvářejí v membránách póry a mění jejich propustnost, FAST proteiny, schopné fúzovat membránové váčky a strukturní minoritní proteiny narušující integritu membrán při vstupu viru.

2.3.1. Viroporiny

Viroporiny jsou nestrukturní proteiny, které se většinou nenacházejí ve virionech. Často nejsou nezbytné pro vstup viru do buňky, replikaci genomu či morfogenezi virionů. Viroporiny však zvyšují celkový výtěžek viru při infekci. Mohou pomáhat při uvolňování viru z buňky a prohlubují cytopatický efekt. Jsou to malé peptidy skládající se z 60 – 120 aminokyselin, obsahují hydrofóbní transmembránovou doménu a často i bazickou subdoménu, která v kombinaci s hydrofóbním úsekem působí jako detergent. Dále se u těchto peptidů často objevuje amfipatický α helix, se schopností oligomerizace a tvorby pórů (PINTO *et al.* 1997, AGIRRE *et al.* 2002, MELTON *et al.* 2002, GRICE *et al.* 1997). Některé aromatické aminokyselinové zbytky viroporinů jsou schopné interakce s lipidovou dvojvrstvou (SANZ *et al.* 2003).

Viroporiny destabilizují membrány a zvyšují jejich propustnost pro malé ionty a organické molekuly. Tím v pozdní fázi infekce narušují buněčnou strukturu a usnadňují šíření virionů z buňky. Zvýšená propustnost membrán v pozdní fázi infekce byla prokázána u širokého spektra virů: picornaviry, flaviviry, rhabdoviry a togaviry. Jako viroporiny byly identifikovány například protein 2B u picornavirů, protein 6K u alfavirů, Vpu u HIV 1 nebo M2 u viru chřipky.

2.3.1.1. 2B - Picornaviry

Protein 2B se skládá ze 100 aa a vzniká postupným vyštěpením z proteinového prekurzoru. Obsahuje dvě hydrofóbní oblasti, jedna má charakter amfipatického α helixu (32VTSTITEKLLKLNLIKIISSLVIITG55) a druhá slouží jako transmembránová kotva (61TTTVLATLALLGCDASPWQL81). Protein má membránovou lokalizaci a v buňce inhibuje transportu membránových integrálních proteinů a proteinů určených k sekreci (DOEDENS *et al.* 1995). Dále také inhibuje apoptózu indukovanou pomocí TNF (Tumor Necrosis Factor) (NEZNANOV *et al.* 2001).

Homodimery a homotetramery proteinu 2B (CUCONATI *et al.* 1998, DE JONG *et al.* 2002) tvoří póry o průměru 6 Å. Těmito póry projde molekula o velikosti 1 kDa (AGIRRE *et al.* 2002). Prekurzor viroporinu 2B, protein 2BC, má při narušování membrán ještě vyšší účinnost. Protein 2C, tuto schopnost nemá (ALDABE *et al.* 1996, BARCO *et al.* 1998).

2.3.1.2. 6K – Togaviry

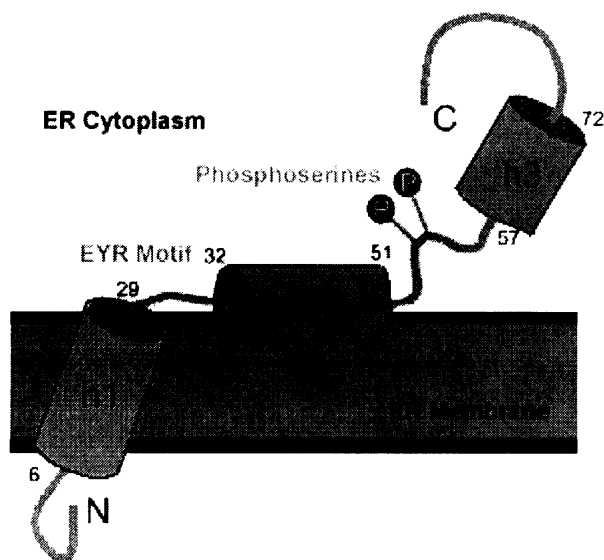
Togavirový protein 6K je dlouhý 60 aa obsahuje silně hydrofóbní transmembránovou doménu (MELTON *et al.* 2002) a je posttranslačně acylován (STRAUSS *et al.* 1994). Protein 6K vzniká vyštěpením z proteinového prekurzoru a nenachází se ve virionu (LUSA *et al.* 1991).

Podílí se na dopravě virových proteinů v buňce a zesiluje permeabilizaci membrán (SANZ *et al.* 2001, LILJESTROM *et al.* 1991). Jeho samotná exprese v savčích buňkách působí permeabilizaci membrán. V uměle připravených lipidových dvojvrstvách tvoří kanály selektivní pro ionty (MELTON *et al.* 2002). Protein 6K není nezbytný pro vstup virionů do buňky či formaci virionů (SANZ *et al.* 2003), ale jeho nepřítomnost snižuje výtěžek virové infekce (YAO *et al.* 1996).

2.3.1.3. Vpu - HIV 1

Vpu je transmembránový fosfoprotein, translatovaný z bicistronní mRNA, ze které se také překládá obalový glykoprotein. Vpu je unikátní pro HIV1, u HIV 2 ani u SIV se

tento protein nenachází. U SIV se nachází v obalovém glykoproteinu „vpu podobná“ doména. Vpu funguje jako pomocný protein, který zvyšuje účinnost uvolňování virionů, morfogenezi virionů, snižuje tvorbu syncytií a iniciuje degradaci CD4 molekul v endoplazmatickém retikulu.



Obr. 2.13: Schéma sekundární struktury Vpu a umístění helixů. (Převzato z *users.ox.ac.uk*)

Vpu se skládá z 81 aminokyselin, které vytvářejí tři α helixy (obr. 2.13), z toho jeden má amfipatický charakter. Vpu se nachází ve vnitřních membránách buňky. Na N konci se nachází transmembránová doména odpovědná za zvýšenou účinnost uvolňování virionů z infikovaných buněk (SCHUBERT *et al.* 1996). C koncová cytoplazmatická část je odpovědná za specifickou vazbu na nově syntetizované CD4 molekuly (CHEN *et al.* 1993), ke kterým pomocí buněčného proteinu h- β TrCP (MARGOTTIN *et al.* 1998) připojí molekuly ubiquitinu a směřuje je k degradaci.

Vpu iniciuje degradaci i molekul MHC I (KERKAU *et al.* 1997). Při produkci v savčích i bakteriálních buňkách se Vpu formuje do pentamerů vytvářející póry, jenž způsobují propustnost membrán. Tyto iontové kanály tvoří Vpu také v rovinných lipidických dvojvrstvách (EWART *et al.* 1996).

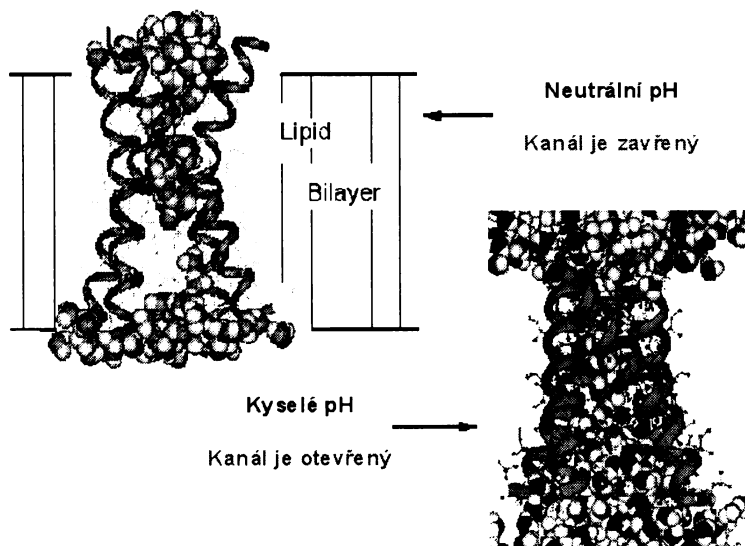
Synteticky připravený amfipatický α helix proteinu Vpu se samovolně uspořádává do struktur vytvářející póry v membránách (obr. 2.14) (SCHUBERT *et al.* 1996).



Obr. 2.14: Jednotlivé helixy (bíle) se sestavují do pentamtru tvořícího pór. Serinové zbytky (světle šedá) směřují do vnitřku póru, zatímco tryptofany (tmavě šedá) směřují do vnějšího prostoru. (Převzato z *users.ox.ac.uk*)

2.3.1.4. M2 – Virus chřipky

M2 je translatován z malé bicistronní mRNA, která kóduje ještě matrixový protein M1. Protein M2 se nachází ve virionu, skládá se z 96 aminokyselin, 23 N koncových aa se nachází v extracelulárním prostoru, 54 C koncových aa v cytoplazmatickém prostoru a 19 aminokyselin tvoří transmembránovou doménu (LAMB *et al.* 1997).



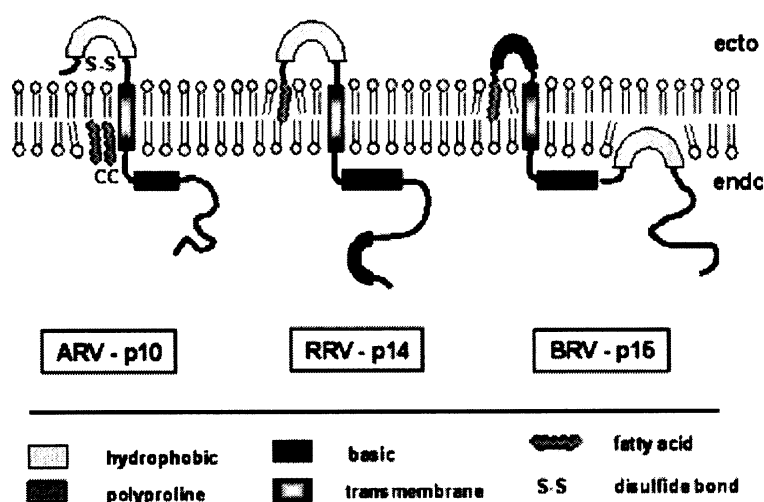
Obr. 2.15: Znázornění kanálu v membráně - (Převzato z www.research.ibm.com/ionchannel).

Protein tvoří póry z homotetramerů ovládané pomocí pH (obr. 2.15). Při neutrálním pH je pór uzavřený pomocí histidinů v pozici 37, které působí jako stérické zábrany. Při poklesu pH pod 5,8 a protonaci histidinů dojde k otevření kanálu.

2.3.2. FAST proteiny – Reoviridae

FAST („fusion-associated small transmembrane“) proteiny je skupina nestrukturních malých proteinů, které se nepodílí na vstupu viru do buněk a nenacházejí se ve virionu. Tyto proteiny jsou odpovědné za tvorbu syncytií. To je nezvyklý jev pro neobalené viry a unikátní vlastnost čeledi reoviridae. Fast jsou nejmenší známé proteiny schopné navodit buněčné fúze za fyziologických podmínek.

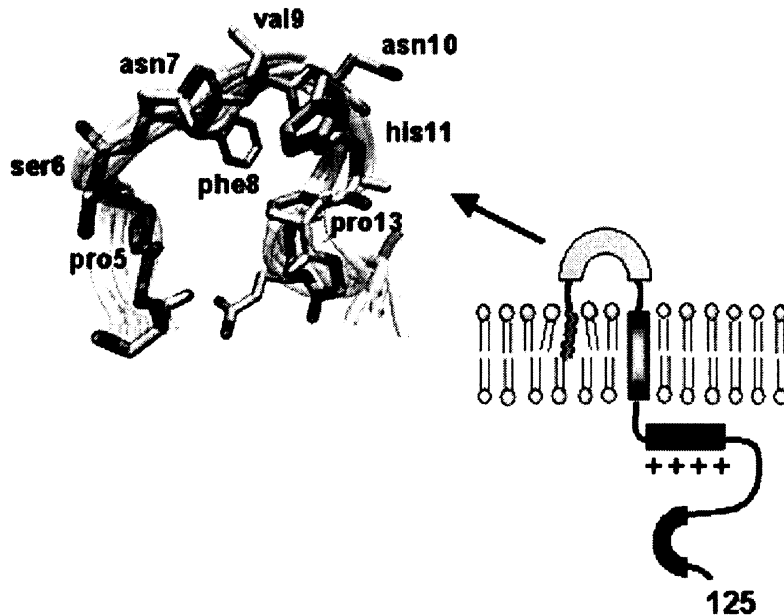
FAST proteiny jsou transmembránové proteiny typu III (Nexo/Ccyt) dlouhé 90-140 aminokyselin (CORCORAN *et al.* 2004a) a jsou překládány z polycistronní mRNA. Jednotlivé FAST proteiny nejsou sekvenčně homologní a jejich podobnost vyplývá ze strukturních motivů. Obsahují hydrofóbní oblasti, kde dochází k acylaci, a často také polybazickou oblast. N koncová doména obsahuje hydrofóbní smyčku nebo na prolin bohatou smyčku, a často je i myristylován. Tato doména je odpovědná za fúzi (SHMULEVITZ *et al.* 2004).



Obr. 2.16: Struktura tří zástupců FAST proteinů (Převzato z *microbiology.medicine.dal.ca*).

FAST proteiny byly objeveny u různých zástupců reovirů jako například p10 (protein o velikosti 10 kDa) u ARV („avian reovirus“) a NBV („Nelson bay reovirus“),

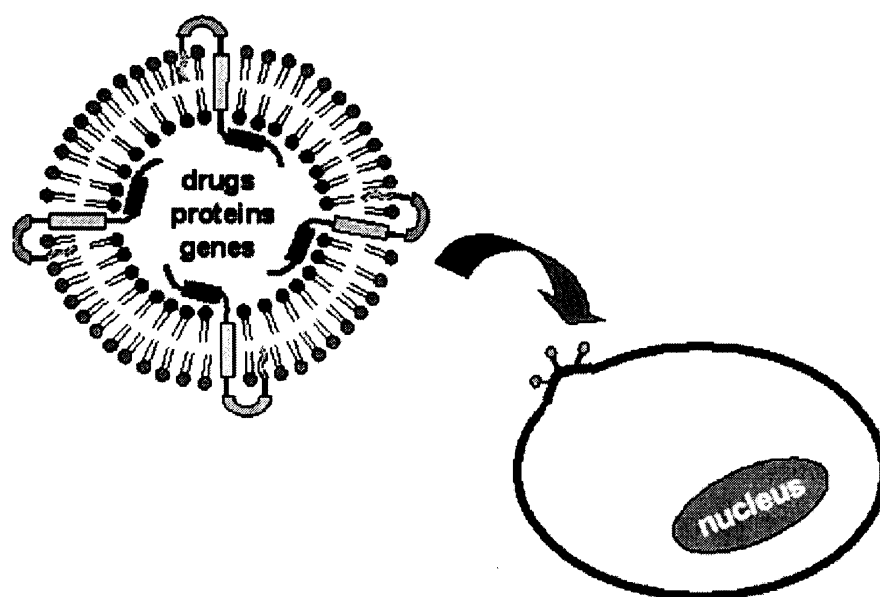
p14 u RRV („reptile reovirus“) a p15 u BRV („bovine reovirus“) (obr. 2.16). Fúzní domény jednotlivých proteinů se od sebe mírně liší, zatímco p14 obsahuje na N konci myristylovou skupinu nezbytnou pro fúzi membrán, p10 není na N konci myristylován a extracelulární doména obsahuje disulfidický můstek. N koncová doména je ve vodném prostředí neuspořádaná, stabilita pravidelné struktury (obr. 2.17) se zvyšuje s hydrofobicitou vnějšího prostředí (CORCORAN *et al.* 2004b).



Obr. 2.17: Detail N koncové fúzní domény proteinu p14 plazího reoviru (Převzato z *microbiology.medicine.dal.ca*).

V pozdější fázi infekce jsou FAST proteiny zodpovědné za fúzi infikované buňky s okolními buňkami a tvorbu syncytií (DAWE *et al.* 2002). FAST proteiny nevytvářejí v lipidických dvojvrstvách póry a při fúzi buněk nedochází ke změně propustnosti membrán. Po fúzi buněk dochází k změně propustnosti membrán a k vylití buněčného obsahu, to je však způsobeno apoptotickou odpovědí buňky. Inhibitor kaspáz zamezuje vylití buněčného obsahu a degradaci DNA fúzovaných buněk, neovlivňuje však tvorbu syncytií. (SALSMAN *et al.* 2005).

FAST proteiny jsou sami o sobě postačující k fúzi buněk a nevyžadují žádný buněčný pomocný faktor, jak dokazují pokusy fúzí navozených proteinem p14 u lipidových váčků (obr. 2.18) (TOP *et al.* 2005).



Obr. 2.18: Lipidické váčky obsahující FAST proteiny jsou schopné fúze s buněčnou membránou (Převzato z *microbiology.medicine.dal.ca*).

V průběhu infekce reovirem i transfekce samotným p10 dochází k 90% degradaci tohoto proteinu během 30 min. Degradace je závislá na proteazomu. Zbylá frakce proteinu se nachází na plazmatické membráně, kam je transportována přes endoplazmatické retikulum a Golgiho aparát, a kde zprostředkuje fúzi buněk. Signální sekvence pro degradaci je 40-ti aminokyselinová doména odpovědná za fúzi. Při její delecii se zvýší životnost proteinu, dojde však zároveň k inhibici fúze (SHMULEVITZ *et al.* 2004).

2.3.3. Virové strukturní proteiny

Minoritní a malé strukturní kapsidové proteiny podílí se na vstupu viru do buňky, díky své interakci s membránami.

2.3.3.1. L2 – Papillomaviry

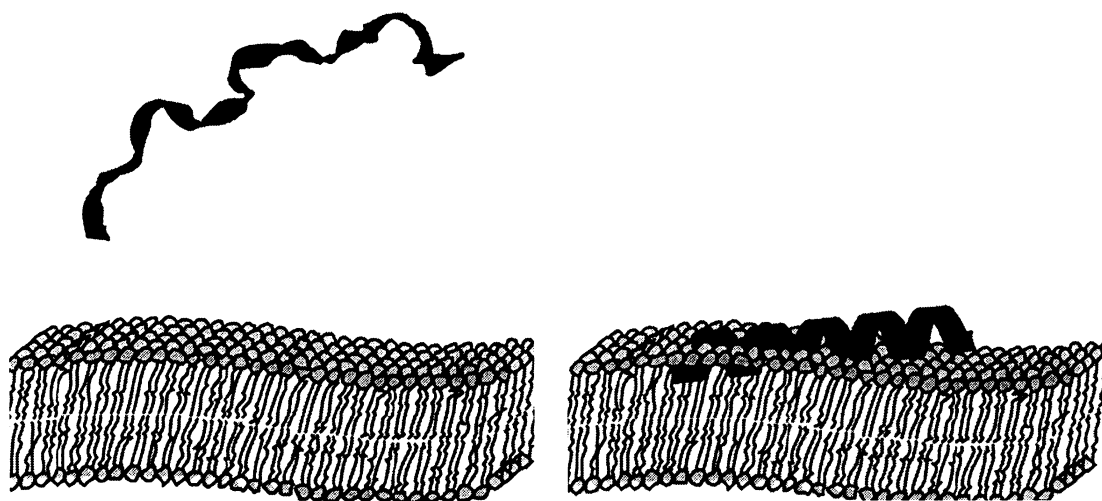
Papillomaviry jsou malé neobalené DNA viry, jejichž kapsida se skládá z hlavního proteinu L1, zodpovědného za rozpoznání receptoru a vstup viru přes klatrinové váčky do buněk, a z minoritního proteinu L2. Tento protein se nepodílí na časných fázích vstupu viru do buněk, je však nezbytný pro uvolnění virového genomu z endozomálních váček

a jeho dopravy do jádra (DAY *et al.* 2004). Virus s kapsidou obsahující pouze L1 protein zůstává v endozomálních váčcích.

Za rozrušení membrán váčků je odpovědný úsek 23 aminokyselin na C konci L2. Tento amfipatický úsek obsahuje hydrofóbní oblast spojenou s hydrofilní polybazickou částí (KAMPER *et al.* 2006) a svojí sekvencí připomíná peptid „dhvar5“ (LLLFLKKRKKRKY), derivát histatinu 5, lidského antimikrobiálního peptidu nalezeného v lidských slinách (DEN HERTOOG *et al.* 2004). Rozrušení membrán je závislé na pH. Na transportu genomu do jádra se podílí spolu s L2 buněčný protein Hsc70, který interaguje s jeho C koncovým úsekem. Pro lyzi membrán je nezbytný jak hydrofóbní tak hydrofilní úsek. Samotný protein produkovaný v savčích buňkách má membránovou lokalizaci (KAMPER *et al.* 2006).

2.3.3.2. Protein γ – „Flock House virus“

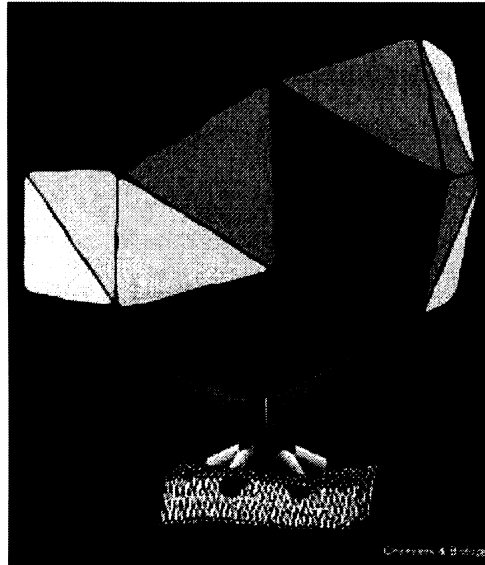
„Flock House virus“ je ssRNA virus. Neobalená kapsida se skládá z jednoho genového produktu, který je na C konci autokatalyticky štěpen. Vzniká 44 aa dlouhý protein γ , který zůstává nekovalentně navázán na kapsidu. (SCHNEEMANN *et al.* 1992; ZLOTNICK *et al.* 1994). Odštěpení peptidu je pro životní cyklus viru nezbytné. Při delecí místa štěpení vznikají morfologicky stejnocenné, avšak neinfekční viriony.



Obr. 2.19: Schématické znázornění interakce proteinu γ s lipidovou dvojvrstvou. Tato interakce zvyšuje stabilitu helixové struktury proteinu γ . (Převzato z BONG *et al.* 2000).

Vyštěpený segment se skládá z N koncového amfipatického helixu (21 aa), který interaguje s dalšími N koncovými helixy za vzniku homooligomerů, a C koncové

oblasti bez sekundární struktury interagující s RNA. Obě oblasti jsou odděleny prolin-glycin-prolinovou sekvencí vytvářející v peptidu ostrý zlom.



Obr. 2.20: Uvolnění svazku pentamer proteinů γ z virové kapsidy a jejich zanoření do membrány (Převzato z BONG *et al.* 1999).

N konec je přístupný z vnějšího prostředí a váže se na membrány. Při interakci s lipidovou dvojvrstvou (obr. 2.20) dochází ke změně její struktury (JANSHOFF *et al.* 1999) a zvýšení její propustnosti pro hydrofilní molekuly (BONG *et al.* 1999). Peptid se zanořuje svou hydrofóbní polovinou do membrány, zatímco hydrofilní část zůstává vystavena vodnému prostředí (obr. 2.19) (BONG *et al.* 2000).

2.4. Bakteriální expresní systémy

Bakteriální expresní systémy jsou často využívány v molekulární biologii pro jejich mnohé přednosti. Jejich největší výhody spočívají ve vysokých výtěžcích transgeních proteinů (30 mg/l bakteriální kultury) při velmi rychlém růstu bakteriální kultury a nízkých nákladech. Další výhody jsou jednoduchost technologie a podrobná znalost bakteriálních systémů.

Nevýhodou je absence posttranslačních úprav jako je například glykosylace a acetylace. To často vede k tvorbě neaktivních nebo funkčně omezených forem eukaryotických proteinů. Další komplikací při produkci proteinů může být ukládání transgeních produktů do inkluzních tělísek. Izolace proteinů z této formy probíhá pomocí denaturace močovinou či guanidinem a následná redenaturace může snížit výtěžek nebo produkt zcela zničit.

2.4.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli je nejpoužívanější bakteriální expresní systém, protože u tohoto modelového organismu je podrobně popsán chromozom, fyziologie a bakteriofágy jež jej napadají. *E. coli* je gram negativní tyčkovitá bakterie o rozměrech 1 - 1,5 μm \times 2,0 - 6,0 μm s fakultativně anaerobním metabolismem. Roste na běžných živných půdách, na nichž tvoří malé a pravidelné kolonie, které mají hladký okraj. V tekutých půdách vytváří zákal. Je tolerantní k teplotě, roste v rozmezí 10 - 46 °C s optimem 37 °C. Je typickým představitelem střevní mikroflóry obratlovců, kde je užitečným komenzálem. Za určitých okolností může být nebezpečným patogenem.

Divoký typ *E. coli* byl pro lepší výtěžnost a lehčí práci mutován. Typickými mutacemi jsou například „endA1“ mutace, delece endonukleázy I zajišťující zkvalitnění izolace plazmidové DNA. „RecA1“ mutace zabraňuje rekombinaci mezi plazmidovou a chromozomální DNA (KHACHATOURIANS *et al.* 1975).

Pro produkci proteinů v bakteriích se používá kmen BL21, který je odvozen od kmene *E. coli* B – [F– dcm ompT hsdS(rB – mB –)]. Tento kmen je mutován v genech pro „Lon“ a „OmpT“ proteázy a tak je zabráněno degradaci rekombinantních proteinů (GRODBERG *et al.* 1988).

Kmen BL21(DE3) obsahuje integrovanou lysogení formu bakteriofága λ , v jehož genu pro integrázu je vložen gen kódující RNA polymerázu bakteriofága T7, jehož exprese je řízena lacUV5 promotorem. Pro produkci proteinů se využívají pET a pCAL vektory, které obsahují promotory pro T7 polymerázu.

2.4.2. Expresa z LacUV5 promotoru

Ovládání transkripce v bakteriích z lacUV5 promotoru vychází z modelu lac operonové kontroly objevené F. Jacobem a J. Monodem. Enzymy využívané pro zpracování laktózy; β -galaktozidáza, permeáza a acetyláza, tvoří jeden operon (lac operon) a jsou přepisovány pouze v případě, že laktóza je jediným zdrojem energie pro bakterie. V nepřítomnosti laktózy, nebo v přítomnosti laktózy spolu s glukózou v médiu, je transkripce těchto genů blokována.

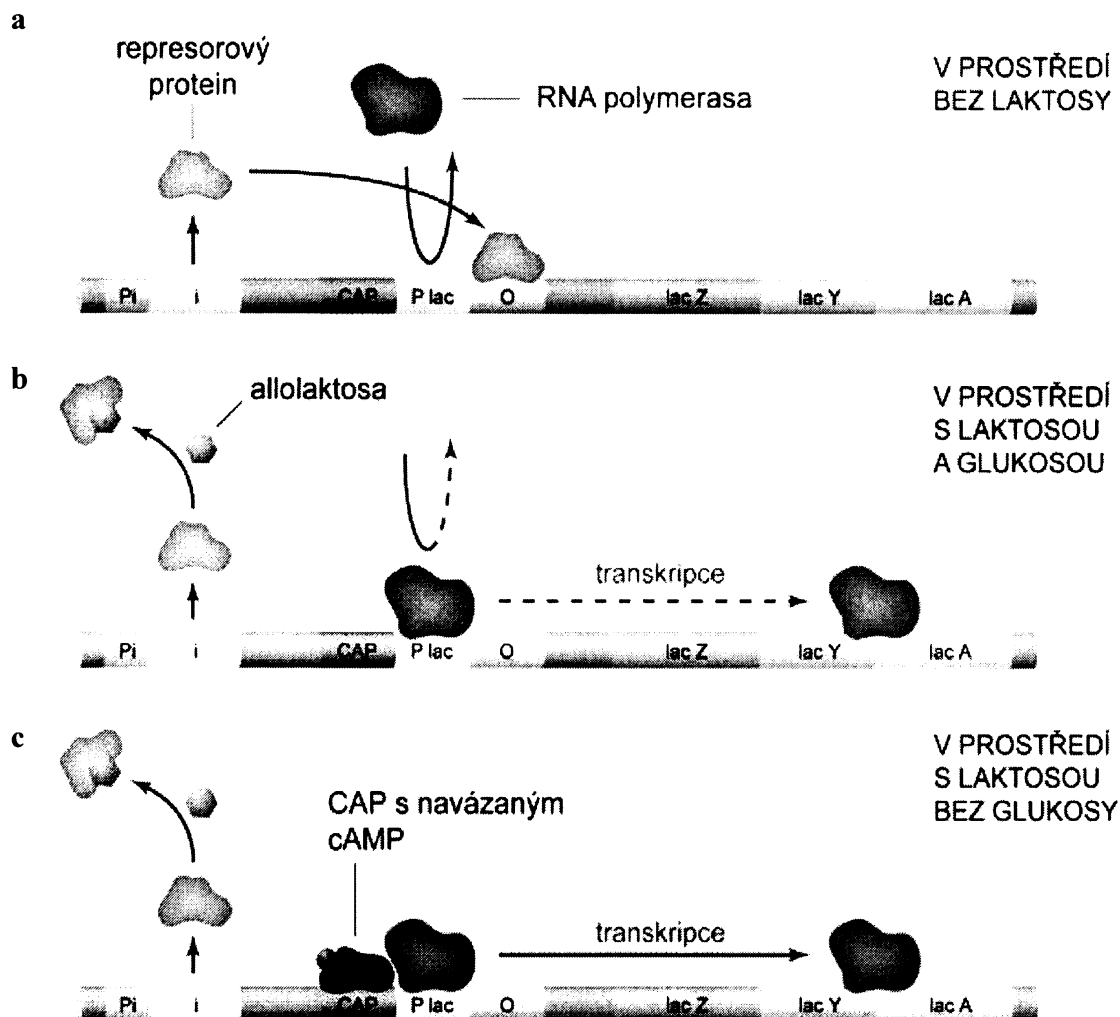
Lac operon je přepisován bakteriální RNA polymerázou z lacUV5 promotoru (obr. 2.21). Mezi promotorem a operonem se nacházejí lac operátory s vazebným místem pro lacI represor. Na druhé straně promotoru (5'konci) se nachází vazebné místo pro CAP aktivátor („catabolite activating protein“).

LacI represorový protein, jenž se váže na operátor a brání transkripci operonu z lacUV5 promotoru, je permanentně přepisován z promotoru p_i. V přítomnosti laktózy v médiu se na molekulu lacI represoru naváže allolaktóza (izomer vzniklý při transferázové reakci během transportu laktózy do buňky). Ta působí jako allosterický inhibitor a změní konformaci represoru (obr. 2.22). Molekula represoru ztratí afinitu k operátorové sekvenci a přestane vázat DNA a blokovat transkripci operonu z lacUV5 promotoru.

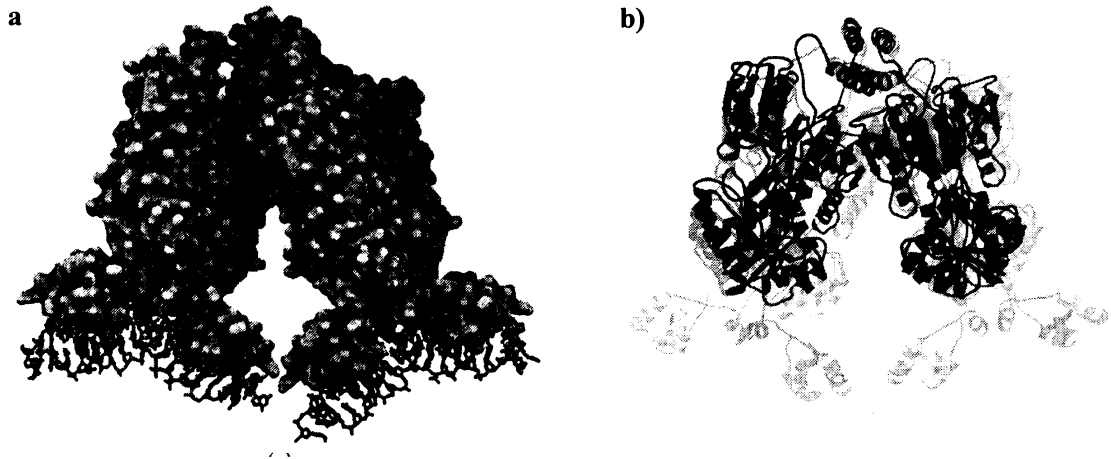
Pro efektivní transkripci lac operonu je nezbytná vazba aktivátorové molekuly CAP před lacUV5 promotor, která stabilizuje vazbu buněčné polymerázy k lacUV5 promotoru. CAP má afinitu k DNA pouze v přítomnosti cAMP, svého allosterického aktivátoru. K produkci cAMP dojde pouze v případě nepřítomnosti glukózy a metabolismu alternativních zdrojů, například glycerolu. Tento jev se nazývá katabolická represe nebo také glukózový efekt.

V nepřítomnosti glukózy a přítomnosti laktózy, tzn. nahromadění cAMP a allolaktózy, dojde k vazbě aktivátoru na DNA, disociaci represoru a tím k nasednutí RNA polymerázy. Následuje transkripce z lac UV5 promotoru a exprese enzymů. Pro

expresi T7 polymerázy v bakteriálních expresních systémech je využíván upravený L8-UV5 promotor (viz kap. 2.4.4).



Obr. 2.21: a) V prostředí s glukózou bez laktózy, se represor váže na operátor a CAP se neváže před promotor, transkripce neprobíhá b) v prostředí s glukózou a laktózou, represor s allolaktózou se neváže na operátor a CAP se neváže před promotor, pouze bazální transkripce c) v prostředí bez glukózy s laktózou, represor s allolaktózou se neváže na operátor a CAP s navázaným cAMP se váže před promotor, silná transkripce
 pi – promotor genu pro represorový protein, i – gen pro represorový protein, cap – vazebné místo pro CAP, P_{lac} – lac UV5 promotor, O – lac operátor, lacZ – gen pro β-galaktózidázu, lacY – gen pro permeázu, lacA – gen pro acetylázu. (VOET *et* VOET: Biochemie 1995)



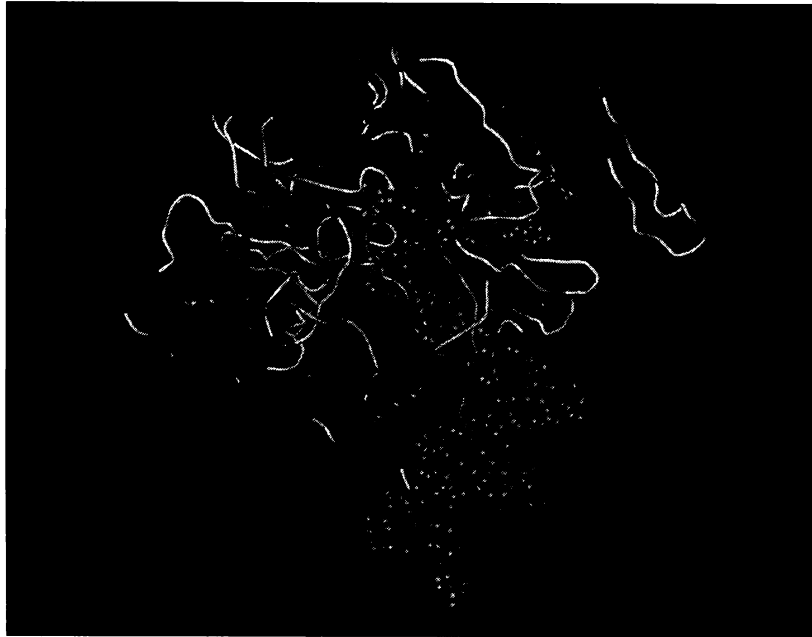
Obr. 2.22: a) Struktura lacI represoru navázaného na DNA, b) Struktura lacI represoru s afinitou k DNA je zde znázorněna matnými barvami, represor po navázání IPTG a změně konformace je znázorněn tmavými barvami. Ztráta afinity lacI represoru k DNA po navázání IPTG je způsobena konformační změnou DNA vazebných domén (LEHNINGER, Principles of Biochemistry, 2000).

2.4.3. T7 RNA polymeráza

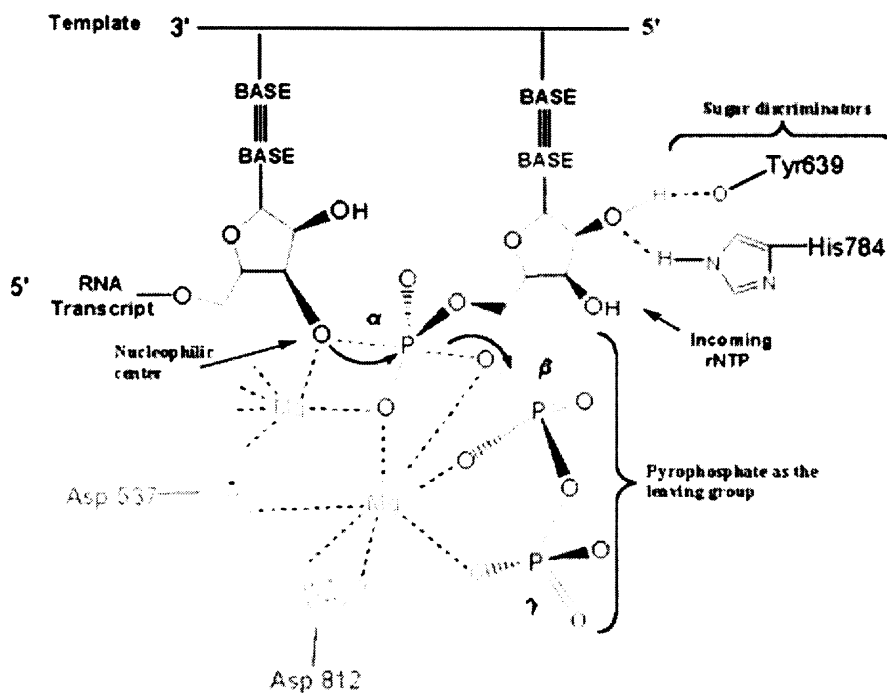
T7 DNA-dependentní RNA polymeráza je 99 kDa velký monomerní enzym, který je využíván pro vysokou specifitu ke svému promotoru (obr. 2.22). Byl izolován z bakteriofága T7. Globulární struktura polymerázy je bohatá na α helixové motivy a je rozdělena na dvě části; na N terminální a na polymerázovou.

N terminální doména je zodpovědná za rozpoznání promotoru a vazbu na nascentní RNA pomocí „ β -vlásky“ a „smyčky rozpoznávající AT-bohatou sekvenci“. „ β -vlásky“ také zajišťuje denaturaci promotoru (MULLER *et al.* 1998).

Polymerázová doména ve tvaru U se stejně jako jiné polymerázy I. třídy podobá otevřené pravé ruce, je rozdělena na tři domény; dlaň, palec a prsty. „Palec“ je vysoce flexibilní a stabilizuje ternární komplex (BONNER *et al.* 1994). „Dlaň“ tvoří třemi β -řetězci dno žlábků (STEITZ *et al.* 1994) a obsahuje dva aspartáty, které interagují s Mg^{++} ionty (obr. 2.24) (BONNER *et al.* 1992). Dále je tato doména zodpovědná za specifické rozpoznání cukerné podjednotky nukleotidu (GAO *et al.* 1997). „Prsty“ se váží pomocí „specifické smyčky“ na velký žlábek a rozpoznávají promotor (SOUSA *et al.* 1995). Uprostřed žlábků je aktivní polymerázové místo na kterém se podílí všechny domény.



Obr. 2.23: Struktura iniciačního komplexu T7 RNA polymerázy a DNA (Převzato z Bioinfo Bank - gibk26.bse.kyutech.ac.jp)



Obr. 2.24: Schéma mechanismu reakce T7 polymerázy. Aspartáty 537 a 812 váží Mg^{++} ionty, tyrosin 639 a histidin 784 váží podjednotku cukru. (Převzato ze STEITZ 1998)

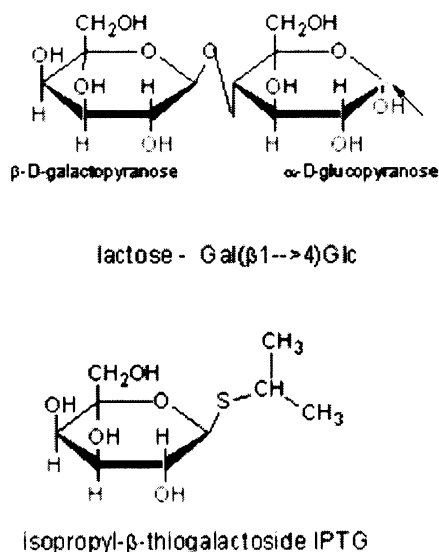
„Smyčka rozpoznávající AT-bohatou sekvenci“, „ β -vlásenka“ a „specifická smyčka“ jsou naprosto unikátní pro T7 polymerázu a zaručují jedinečnou a vysoce specifickou vazbu k T7 promotoru bez nutnosti pomocných proteinů. Druhým důvodem

proč je tato polymeráza široce využívána v metodách molekulární biologie je její vyšší afinita k nukleotidům než je tomu u hostitelské polymerázy. Proto dochází v kompetici o nukleotidy v buňce k převážení rovnováhy ve prospěch transkripce pomocí T7 polymerázy a zvýšení výtěžků heterologních proteinů.

2.4.4. Exprese T7 RNA polymerázy v bakteriálním kmenu BL21(DE3)

Bakteriální kmen BL21(DE3) je hostitelem pro lysogenního fága λ . Lytický cyklus je znemožněn vložením genu pro T7 RNA polymerázu do genu pro integrázu, takže λ fág není schopen se sám vyštěpit či začlenit do bakteriálního chromozomu bez pomocného fága.

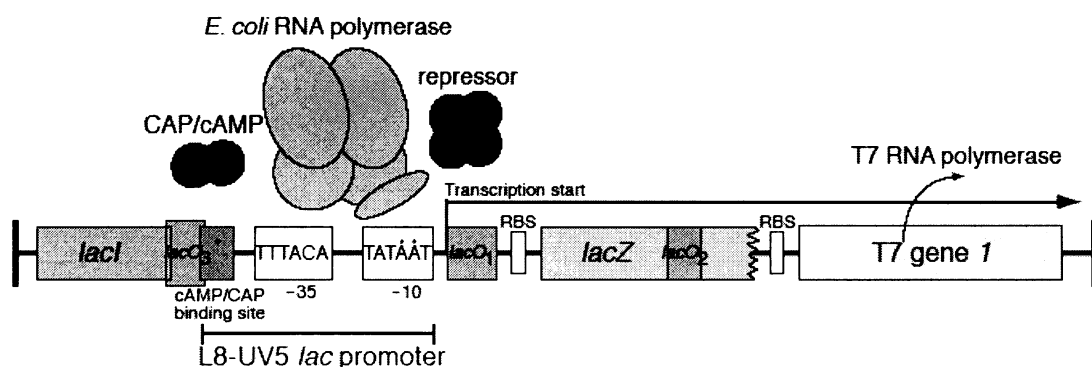
Do λ fága je vložena kazeta obsahující gen pro lacI represorový protein spolu se svým pi promotorem, L8-UV5 lac promotor spolu s lac operátory a CAP vazebným místem a lac operon, do kterého je vložen gen pro T7 RNA polymerázu.



Obr. 2.25: Porovnání struktury laktózy a IPTG (isopropyl β -D-thiogalaktosidu) (Převzato z VOET *et* VOET: Biochemie 1995).

L8-UV5 lac promotor (obr. 2.26), odvozený od LacUV5 promotoru, byl mutován na třech místech, dvě bodové mutace jsou v oblasti -10 a zesilují vazbu bakteriální RNA polymerázy na promotor. Třetí bodová mutace je v oblasti vazebného místa pro CAP/cAMP a snižuje jeho afinitu k CAP/cAMP.

Pokud jsou bakterie kultivovány v mediu bez laktózy, dochází k permanentní expresi *lacI* represoru, který nasedá na operátorové sekvence a blokuje transkripci T7 RNA polymerázy. Po přidání laktózy nebo jejího analogu isopropyl β -D-thiogalaktosidu (IPTG) (obr. 2.25) je represor allostericky inaktivován. Díky bodovým mutacím v L8-UV5 promotoru je transkripce téměř nezávislá na katabolické represi a dochází k expresi T7 RNA polymerázy bez potřeby navázání CAP/cAMP (NOVY et MORRIS 2001).



Obr. 2.26: Kazeta pro expresi T7 RNA polymerázy pomocí λ fága-DE3. *LacI* – represor L8-UV5 *lac* promotoru, *lacO1* – hlavní operátor, *lacO2*, *lacO3* – vedlejší operátory, RBS – ribozom vážící sekvence, T7 gen 1 – gen kódující T7 RNA polymerázu, L8-UV5 *lac* promotor – LacUV5 promotor se třemi bodovými mutacemi (znázorněny dvěma zelenými a jednou červenou tečkou), *LacZ* - N-terminální úsek β -galactosidázy nazývaný α -peptid (může sloužit jako detekční marker s proteinem *LacZ* Δ M15 pro složení funkční β -galactosidázy). (Převzato z NOVY et MORRIS 2001)

2.4.5. Snížení samovolné exprese

Neindukovaná bazální exprese toxických heterologních proteinů může vést k lyzi hostitelských bakterií, nebo nežádoucím mutacím v oblasti genu pro takovýto protein. Pro omezení této transkripce T7 RNA polymerázy z L8-UV5 *lac* promotoru a následné produkce heterologního proteinu je možné použít kmen BL21(DE3)pLysS (KELLEY *et al.* 1995). Tento kmen exprimuje z plazmidové DNA T7 lyzozym regulovaný T7 promotorem. Při „protékání“ L8-UV5 *lac* promotoru a expresi T7 RNA polymerázy, dojde k přepisu T7 lyzozymu. Ten se váže na otevřený iniciační komplex T7 RNA polymerázy a destabilizuje ho, čímž zabraňuje transkripci genu toxického proteinu.



Tímto dochází zároveň k mírné inhibici transkripce během produkce proteinu po indukci IPTG a snížení výtěžku.

Dalším způsobem jak zabránit bazální expresi je použití kmene BL21 bez integrovaného λ fága (DE3) obsahujícího T7 RNA polymerázu. Polymeráza se do tohoto systému nedodává indukcí IPTG, ale infekcí pomocí modifikovaného bakteriofága λ CE6 nesoucí gen pro T7 RNA polymerázu (SAMBROOK *et al.* 1989). Tento fág je upraven, takže po infekci nedochází k lyzi bakterií.

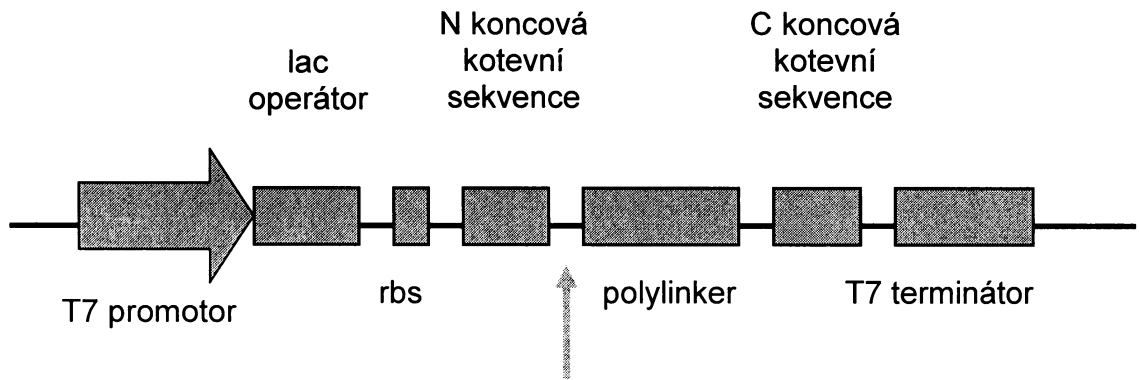
Jednoduchý způsob, jak omezit protékání promotoru, je přidání 1% glukózy do LB media (GROSSMAN *et al.* 1998), čímž se omezí aktivační vliv CAP/cAMP komplexu na L8-UV5 lac promotor.

2.4.6. Expresní vektory pET - Novagen

Produkce transgeního proteinu je řízena velice silným promotorem bakteriofága T7, který původně řídil expresi genu $\phi 10$. Proti bazální expresi přes tento promotor, způsobené minimálním přepisem T7 RNA polymerázy z L8-UV5 lac promotoru, je za promotorem často umístěn lac operátor. Lac operátor v nepřítomnosti laktosy či IPTG váže lacI represor a zabraňuje tak bazální transkripci.

Rbs („ribosome binding site“) je sekvence nezbytná k nasednutí ribozómu na mRNA a iniciace translace. Za rbs sekvencí následuje iniciační kodon.

V N terminální i v C terminální oblasti mohou být kotevní sekvence sloužící k snadné detekci fúzních proteinů či jejich izolaci a přečištění. Mezi takové „kotvy“ používané pET expresními systémy patří například T7•Tag sekvence (odvozená od N koncových 11 aa proteinu 10 T7 fága) sloužící k detekci pomocí monoklonální protilátky nebo k izolaci pomocí protilátky navázané na agarózové kuličky (MOFFAT *et al.* 1986, ROSENBERG *et al.* 1987). HSV•Tag® sekvence



Obr. 1.27: Struktura expresní kazety pET vektorů

(odvozená od 11 aa glykoproteinu D Herpes Simplex viru) slouží k vysoce citlivé detekci pomocí myši monoklonální protilátky IgG1 na Western blotu. GSTTM Tag (glutathione-S-transferáza) slouží k jednoduchému a rychlému přečištění pomocí imobilizovaných glutathionových paramagnetických částic (SMITH *et al.* 1988).

Nus•TagTM (odvozený od 495 aa NuSA proteinu z *E. coli*) nebo Trx•TagTM (odvozený od 109 AA thioredoxinu *E. coli*) slouží k přečištění pomocí monoklonálních protilátek navázaných na agarózové kuličky, zároveň značně zvyšují rozpustnost fúzních proteinů exprimovaných v *E. coli* a omezují jejich ukládání do inkluzních tělísek (LAVALLIE *et al.* 1993, HARRISON *et al.* 2000).

HisTag obsahuje sekvenci šesti histidinů sloužících k izolaci fúzních proteinů pomocí afinitní chromatografie nikelnatými ionty. Sekvence polylinkeru obsahuje oblast se štěpnými místy restričních endonukleáz a slouží k vkládání DNA fragmentu.

Oblasti polylinkeru a kotevních sekvencí bývají odděleny štěpnými místy pro proteázy, pomocí nichž je možné oddělit produkovaný protein od kotevní sekvence. Mezi běžně používané proteázy patří enterokináza, thrombin nebo 3C proteáza lidského rhinoviru (LONG *et al.* 1989, COLLINS-RACIE *et al.* 1995).

T7 terminátor slouží k ukončení přepisu T7 RNA polymerázy.

2.4.7. Zvýšení účinnosti exprese (Novagen)

Pro zvýšení účinnosti exprese heterologních eukaryotických genů se používají bakteriální kmeny BL21 CodonPlus. Ty obsahují kopie tRNA genů s kodony, které na rozdíl od eukaryotických buněk nejsou v bakteriích *E. coli* frekventované a jejichž

nedostatek často omezuje výtěžnost proteinu. Tyto tRNA geny jsou na plazmidech s rezistencí pro chloramfenikol nebo streptavidin (NOVY *et al.* 2001).

BL21-CodonPlus-RIL obsahují další kopie genů pro tRNA: arginin (AGA a AGG), isoleucin (AUA), a leucin (CUA). Bakterie CodonPlus-RIL jsou vhodné pro zesílení translace proteinů, jež jsou kódovány geny se sekvencemi bohatými na AT oblasti.

BL21-CodonPlus-RP obsahují další kopie genů pro tRNA: arginin (AGA a AGG) a prolin(CCC). Bakterie CodonPlus-RP jsou vhodné pro zesílení translace proteinů, jež jsou kódovány geny se sekvencemi bohatými na GC oblasti.

BL21-CodonPlus-RIPL obsahují další kopie genů pro tRNA: arginin (AGA a AGG), isoleucin (AUA), a leucin (CUA) stejně tak i pro prolin(CCC). Bakterie CodonPlus-RIPL jsou vhodné pro zesílení translace proteinů, jež jsou kódovány geny se sekvencemi bohatými jak na AT tak na GC oblasti.

3. CÍLE PRÁCE

Výzkum zabývající se vstupem myšího polyomaviru do buňky ukázal, že ačkoliv samotný hlavní kapsidový protein je odpovědný za tvorbu kapsid, má afinitu k DNA, rozpoznává receptor a plně dostačuje pro internalizaci virionů do buňky, viriony postrádající minoritní proteiny nejsou prakticky infekční. To naznačuje důležitost minoritních proteinů v životním cyklu viru.

Viriony, které úspěšně doručí genom do jádra, se od neúspěšných mohou lišit interakcí minoritních proteinů s membránou na povrchu či uvnitř buňky (t.j. schopností interagovat např. s koreceptorem nebo schopností uvolnit se z endozomálních kompartmentů) nebo také schopností rozvolnit svou strukturu tak, aby byl genom přístupný pro expresi ("uncoating"). Jedna z hypotéz, kterou sledujeme je, že v procesu internalizace a/nebo pohybu viru k buněčnému jádru hraje roli C koncová část minoritních proteinů. Tato konzervativní oblast vyskytující se u všech známých polyomavirů je zanořena do centrální dutiny pentamerů hlavního strukturního proteinu VP1. Nicméně, interakce virionů s receptorem, nebo kyselé pH endozómů by mohlo způsobit konformační změny při kterých by se tato část minoritních proteinů mohla uvolnit pro specifické interakce. Svojí sekvencí připomíná C konec VP2/VP3 proteinů primární amfipatické PTD.

Pro ověření této hypotézy by bylo žádoucí zjistit zdali C koncová sekvence minoritních proteinů má schopnost interagovat s membránami, vstupovat do arteficiálních váčků či rozrušovat integritu membrán. Proto konkrétní cíle méj diplomové práce byly:

1. Konstrukce rekombinantních plazmidů pro produkci proteinu VP3 a jeho C koncové oblasti v bakteriích *E.coli*:

- i) protein VP3 fúzovaný s doménou bakteriálního thioredoxinu, pro zvýšení rozpustnosti produktu, a oligohistidinem, pro izolaci produktu afinitní chromatografií.
- ii) peptid obsahující posledních 35 aminokyselin C konce proteinu VP3 fúzovaný s doménou bakteriálního thioredoxinu a oligohistidinem.

2. Produkce heterologních proteinů v bakteriích *E. coli* a jejich purifikace

3. Příprava králičí polyklonální protilátky proti celému úseku VP2 a VP3

- i) produkce a purifikace fúzního proteinu VP2 s doménou bakteriálního thioredoxinu a oligohistidinovou sekvencí
- ii) imunizace králíka purifikovaným antigenem
- iii) purifikace a testování připravené polyklonální protilátky

4. MATERIÁL A METODY

4.1. Bakterie a buněčné linie použité v experimentech

4.1.1. Bakteriální kmeny

Escherichia coli DH5 α : supE44, Δ lacU169 (Φ 80 lac Z Δ M15), hsdR17, racA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1

Escherichia coli XL1-Blue: supE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA46, thi, relA1, lac-

Escherichia coli BL21 (DE3): *E. coli* B kmen - F⁻ dcm ompT hsdS(rB - mB -) gal λ (DE3)

Použité kmeny byly získány ze sbírky Katedry genetiky a mikrobiologie, PřF UK.

4.1.2. Buněčné linie

NIH 3T6 – stabilní buněčná linie myších fibroblastů (Prof. Griffin, Royal Postgraduate School London)

NMuMG - myší buňky epitelu prsní žlázy, senzitivní a permissivní pro polyomavirus (Monique Berrebi, CNRS, Francie)

4.2. Použité plazmidy

pMJ Δ G Bakteriální plazmid pMJ1 (2266bp) nesoucí celý genom myšího polyomaviru (5292bp). Kruhový polyomavirový genom byl otevřen v unikátním restrikčním místě EcoRI (pozice 1560 na mapě polyomavirového genomu) a vložený do unikátního restrikčního místa EcoRI na plazmidu pMJ1 (KRAUZEWICZ *et al.* 1990).

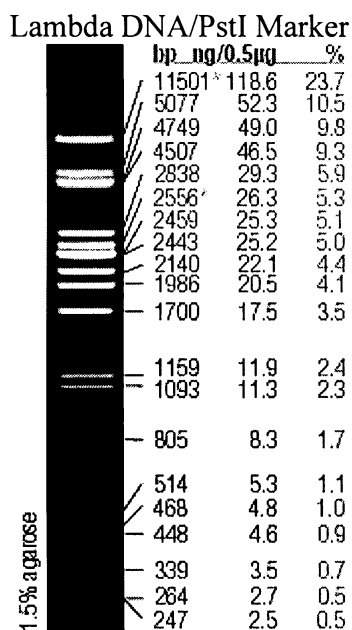
pET-32b Plazmid pro expresi v bakteriální linii BL21, obsahující Histag pro izolaci pomocí kolony s Ni⁺⁺ ionty a 107 AA bakteriálního thioredoxinu pro zvýšení rozpustnosti fúzního proteinu a omezení tvorby inkluzních tělísek. (Novagen)

4.3. Marker molekulových hmotností DNA

DNA fága λ (Fermentas) štěpená enzymem PstI (obr. 3.1), fragmenty o velikosti (bp):

11501*, 5077, 4749, 4507, 2838, 2556*, 2459, 2443, 2140, 1986, 1700, 1159, 1093, 805, 514, 468, 448, 339, 264, 247, 216, 211, 200, 164, 150, 94, 87, 72, 15

-kohesivní konce o přesahu 12 bazí fragmentů 11501 a 2556 (zde označených *) mohou asociovat a vytvářet další fragment o velikosti 14057 bp.



Obr. 4.1: λ DNA/PstI, 1.5% agaróza, 0.5µg/proužek, 8cm dlouhý gel, 1xTBE, 12V/cm (převzato z www.fermentas.com)

4.4. Antibiotika

Ampicilin (Léčiva): používán v konečné koncentraci 50-100 µg/ ml

Směs antibiotik pro TK (Sigma): užívaný 100x koncentrovaný roztok obsahuje na 1ml: 10 000 jednotek penicilin, 10 mg streptomycin, 25 mg amphotericin B

4.5. Protilátky

Primární protilátky:

- α PyVP1-A: myší monoklonální protilátka proti VP1, izotyp IgG1 (ředění 1:5 až 1:50) (Forstová *et al.* 1993)

- α PyVP2,3 2C8: myší monoklonální protilátka proti společné oblasti VP2 a VP3, izotyp IgG1 (ředění 1:10) (Forstová *et al.* 1993)
- CON 1: myší monoklonální protilátka proti lehkému řetězci klatrinu (ředění 1:150) (abcam)
- TU01: myší monoklonální protilátka proti α tubulinu (ředění 1:150) (EXBIO)
- myší monoklonální protilátka proti GFP (ředění 1:3) (zapůjčeno Dr. Půtou, PřF UK v Praze)
- α EEA1: kozí polyklonální protilátka proti markeru časných endozómů (ředění 1:200) (Santa Cruz Biotechnology)
- α LAMP-2: myší monoklonální protilátka proti markeru lyzozomů (ředění 1:200) (abcam)
- α VP2/3-VGJ: králičí polyklonální protilátka proti VP2/3 (ředění 1:1000)

Fluorescenčně značené sekundární protilátky:

- kozí proti myším imunoglobulinům Alexa fluor 546nm (ředění 1:1000) (Molecular probes)
- oslí proti myším imunoglobulinům Alexa fluor 488nm (ředění 1:1000) (Molecular probes)
- kuřecí proti králičím imunoglobulinům Alexa fluor 488 nm (ředění 1:1000) (Molecular probes)
- kozí proti králičím imunoglobulinům Alexa fluor 546 nm (ředění 1:1000) (Molecular probes)
- oslí proti kozím imunoglobulinům Alexa fluor 546 nm (ředění 1:1000) (Molecular probes)

Peroxidázou značené sekundární protilátky:

- polyklonální kozí protilátka proti myším IgG – HRP konjugovaná s peroxidázou, (ředění 1:250) (Sevac)
- polyklonální kozí protilátka proti králičím IgG – HRP konjugovaná s peroxidázou, (ředění 1:250) (Sevac)

4.6 Sterilizace

Veškeré roztoky, špičky k mikropipetám a mikrozkušavky byly sterilizovány (30 minut, 120 kPa, 127 °C) v autoklávu. Roztoky, které nemohly být sterilizovány v autoklávu (zásobní roztoky antibiotik), byly sterilizovány filtrací (filtry 0,2 µm). Umělohmotné centrifugační zkumavky byly sterilizovány 24 hodin parami kyseliny peroctové. Chemické sklo bylo sterilizováno horkým vzduchem při 180°C/ 2 hodiny. Pinzety, mikrobiologické klíčky a hokejky byly sterilizovány žiháním nebo vypáleny po namočení do etanolu.

4.7. Práce s bakteriemi

4.7.1. Kultivace bakterií

Bakterie byly kultivovány na pevném agaru (ŽA) nebo v tekutém médiu (ŽB), při 37°C přes noc v termostatu nebo třepačce. Pokud bakterie obsahovaly plazmid s rezistencí na antibiotika, byla přidána selekční antibiotika.

Média:

4% živný agar č. 2 (ŽA, Imuna)

2% živný bujón č. 2 (ŽB, Imuna)

4.7.2. Příprava kompetentních buněk pro elektroporaci

(DOWER *et al.* 1988)

Bakterie *Escherichia coli* byly zaočkovány do 10 ml TPN média a aerobně kultivovány přes noc při 37°C. Ráno bylo 10 ml inokula zaočkováno do 500 ml TPN média a inkubováno za stejných podmínek. Po dosažení optické denzity 0,5 – 1,0 (560 nm, šířka kyvety 1cm) byly bakterie centrifugovány 15 min/4 300 RPM při 4°C (centrifuga Megafuge 1.0). Bakteriální pelet byl resuspendován v 500 ml vychlazené (4°C) demineralizované vody a centrifugován za stejných podmínek. Stejným způsobem byl pelet promyt 250 ml demineralizované vody a 10 ml 10% glycerolu.

Nakonec byl pelet rozpuštěn v 1 ml 10% glycerolu. Tato suspenze byla rozdělena do mikrozkušavek po 60 μ l aliqotech a skladována při -80°C.

Materiál:

TPN médium: 0,5% kvasničný autolyzát (Imuna)
2% pepton pro bakteriologii (Imuna)
0,5% NaCl
10% glycerol v demineralizované vodě

4.7.3. Skladování bakterií

(SAMBROOK *et al.* 1989)

Bakterie na Petriho miskách, zabezpečené proti vyschnutí, byly krátkodobě skladovány při 4°C. Pro dlouhodobé skladování byly čerstvě narostlé bakterie v živném bujónu smíchány se sterilním glycerolem o výsledné koncentraci 30% a skladovány v -80 °C.

Materiál:

glycerol
ŽB č. 2 (Imuna)

4.7.4. Elektroporace bakterií

(DOWER *et al.* 1988)

Kompetentní buňky a DNA byly rozmrazeny v ledové lázni. K 60 μ l kompetentních bakterií byl přidán 1-3 μ l DNA v TE pufru nebo demineralizované vodě. Po promíchání byla směs inkubována 1 minutu v ledové lázni. Pak byla suspenze převedena do vychlazené elektroporační kyvety (vzdálenost elektrod 2 mm). Na elektroporátoru byl aplikován puls s nastavenými hodnotami 25 μ F, 2,5 kV, 200 Ω . Optimální délka pulsu byla 4,5 ms. K bakteriím v kyvetě byl následně přidán 1 ml SOC média, suspenze byla převedena do mikrozkušavky a aerobně kultivována 1 h při 37°C. Buňky byly vysety na živný agar s příslušným antibiotikem a kultivovány přes noc při 37°C.

Materiál:**SOC médium:** 2% pepton pro bakteriologii (Imuna)

0,5% kvasničný autolyzát (Imuna)

20 mM glukóza

10 mM NaCl

2,5 mM KCl

10 mM MgCl₂10 mM MgSO₄MgCl₂ a MgSO₄ je nutno sterilizovat odděleně a s médiem smíchat před použitím.

Živný agar s ampicilinem: 4% ŽA č.2 (Imuna)

50 µg/ ml ampicilin (Krka)

50 µg/ ml kanamycin (Léčiva)

4.8. Práce s DNA**4.8.1. Agarózová elektroforéza**(SAMBROOK *et al.* 1989)

0,8-3% agarózový gel byl připraven rozvařením odpovídajícího množství agarózy v adekvátním množství pufru TBE. Po ochlazení na cca 50°C byl přidán EtBr (10 µl / 30 ml agarózového gelu). Tento roztok byl nalit do hranolu s hřebenem. Po utužení agarózy (cca 20 min) byl hranol vložen do elektroforetické nádoby a přelit 0,5×c TBE puftrem. Poté byl vytažen hřeben a do jamek nanесeny vzorky smíchané s brom-fenolovou modří (BFM) (2 µl BFM na 10 µl vzorku). Elektroforetická nádoba byla připojena ke zdroji stejnosměrného proudu o napětí zvoleném tak, aby intenzita elektrického pole mezi elektrodami byla 5V/ cm. Poté co BFM dosáhla cca 0,5 cm od konce gelu, byl tento prohlédnut na UV transiluminátoru.

Materiál:**TBE:** 40 mM Tris-HCl (pH 8,0)

2 mM EDTA-NaOH (pH 8,0)

90 mM kyselina boritá (v případě TAE - kyselina octová)

BFM: 50% glycerol

0,13 M EDTA-NaOH (pH 8,0)

0,12% brom-fenolová modř

EtBr (Serva): 10 mg EtBr/ ml destilované vody (10 000x koncentrovaný zásobní roztok)

Agaróza pro elektroforézu (Serva, Sigma)

4.8.2. Izolace fragmentů DNA z agarózového gelu pomocí „InViSorb™ DNA extraction Kit“ (WESTBURG)

Po rozdělení DNA v agarózovém gelu byl pro izolaci fragmentu DNA z gelu použit „InViSorb™ DNA extraction Kit“. Pro centrifugování byla použita „Microfuge®R centrifuge BECKMAN“.

Pracovní postup byl dodržen podle manuálu přiloženého výrobcem (WESTBURG): Část gelu obsahující fragment DNA byla vyříznuta a rozpuštěna v 500 µl roztoku „Gel Solubiliser“ při 60°C. Pak bylo přidáno 7 µl „InViSorb 50™ Carrier Suspension“, krátce vortexováno a výsledná suspenze byla inkubována 5 minut na ledu. Suspenze byla krátce centrifugována při 10 000 RPM na mikrocentrifuze a pelet byl resuspendován v 1 ml „Wash Buffer“ (promývací proces byl zopakován třikrát). Po posledním promytí byl pelet sušen 5 minut při 60°C a resuspendován ve 40 µl „Elution Buffer“ předehřátého na 60°C. Suspenze byla inkubována 3 minuty při 60°C a centrifugována 2 minuty při 13 000 RPM na mikrocentrifuze. Supernatant byl odebrán a uskladněn v -20°C.

Materiál: „Wash Buffer“ (105 ml destilované vody 180 ml 98% etanolu 15 ml „Wash Buffer Concentrate“), „Gel Solubilizer“, „InViSorb 50™ Carrier Suspension“, „Elution Buffer“

4.8.3. Izolace fragmentů DNA z agarózového gelu pomocí „NucleoSpin® Extract II Kit“ (CLONTECH)

„NucleoSpin® Extract II kit“ byl použit pro izolaci DNA z agarózového gelu po elektroforetickém rozdělení, nebo pro přečištění DNA po PCR reakci, restričním štěpení či ligaci při potřebě maximálního výtěžku. Pro centrifugování byla použita „Microfuge®R centrifuge BECKMAN“.

Pracovní postup byl dodržen podle manuálu přiloženého výrobcem (CLONTECH): Část gelu obsahující fragment DNA byla vyříznuta a rozpuštěna v roztoku „NT buffer“ (200 µl pufru na 100 mg agarózového gelu, pro gely s vyšší koncentrací agarózy než 2% bylo použito dvojnásobné množství pufru) při 50°C. Rozpuštěná směs byla přenesena do „NucleoSpin® Extract II“ kolonky a centrifugována 1 min. při 11 000

RPM. Po té bylo přidáno 600 µl „NT3 buffer“ a kolonka byla znovu centrifugována 1 min. při 11 000 RPM. Pro odstranění zbytkového etanolu z „NT3 buffer“ byla kolonka centrifugována 2 min. při 11 000 RPM. Po té bylo přidáno 15-50 µl „NE buffer“ a kolonka s „NE buffer“ se nechala inkubovat při pokojové teplotě 1-2 min. Centrifugací 2 min. při 11 000 RPM byla uvolněna DNA do čisté mikrozkušavky.

Pracovní postup při přečištění DNA z roztoku: Roztok s DNA byl smíchán s dvojnásobným množstvím „NT buffer“. Pokud objem roztoku s DNA byl menší než 50 µl, byl naředěn demineralizovanou vodou či TE pufrům do 50 µl. Směs s „NT buffer“ byla přenesena do „NucleoSpin® Extract II“ kolonky. Následující postup byl shodný jako při izolaci DNA z gelu.

Materiál: „NT buffer“, „NT3 buffer“ (1ml „NT3 buffer concentrate“ + 4ml etanolu), „NE buffer (elution buffer)“, „NucleoSpin® Extract II“ kolonky

4.8.4. Maxipreparace plazmidové DNA (alkalická metoda)

(BIRNBOIM *et* DOLY 1979)

Bakterie s plazmidem byly zaočkovány do 100-500 ml živného bujónu s příslušným antibiotikem a aerobně kultivovány přes noc při 37°C. Kultura byla centrifugována 10 min/ 4 300 RPM (GS-15R Centrifuge BECKMAN), sediment byl resuspendován ve 100 ml roztoku STE. Bakteriální suspenze byla opět centrifugována 10 min/ 4 300 RPM (GS-15R Centrifuge BECKMAN), pelet byl resuspendován ve 10 ml roztoku I. K suspenzi bylo přidáno 20 ml čerstvě připraveného roztoku II, suspenze byla jemně promíchána a inkubována 10 minut při pokojové teplotě. K bakteriální suspenzi bylo přidáno 15 ml vychlazeného (0°C) roztoku III, směs byla protřepána a inkubována 15 min při 0°C. Sraženina byla odstraněna centrifugací 15 min/ 4 300 RPM při 4°C (GS-15R Centrifuge BECKMAN). Supernatant byl přefiltrován přes čtyři vrstvy gázy. Dále bylo k supernatantu přidáno 0,7 objemu izopropanolu a směs byla inkubována 15 minut při laboratorní teplotě. Suspenze byla centrifugována 30 min/ 4 300 RPM (GS-15R Centrifuge BECKMAN) při laboratorní teplotě. Pelet byl promyt 80% etanolem, vysušen při laboratorní teplotě a resuspendován v 300 µl TE pufru. Bylo přidáno 30 µl RNáza A (10mg/ml) a roztok byl inkubován 30 minut při laboratorní teplotě. Dále byly odstraněny proteiny smícháním roztoku DNA s fenolem v poměru

1:1. Směs byla centrifugována 5 min/ 13 000 RPM (Microfuge®R centrifuge BECKMAN). Vodní fáze byla odebrána a smíchána se stejným objemem směsi fenol-chloroform (1:1). Směs byla opět centrifugována 5 min/ 13 000 RPM (Microfuge®R centrifuge BECKMAN). Dokud se na rozhraní vodné fáze se směsí fenol-chloroform vyskytovala viditelná vrstva proteinů, byl tento krok opakován. Nakonec byla vodní fáze smíchána s chloroformem v poměru 1:1 a centrifugována 5 min/ 13 000 RPM (Microfuge®R centrifuge BECKMAN). K horní fázi bylo přidáno 0,1 objemu 3 M octanu sodného (pH 5,2) a 3 objemy vychlazeného 98% etanolu. DNA byla srážena minimálně 2 hod/ -20°C. Sraženina byla centrifugována 30 min/ 15 300 RPM při 4°C (Microfuge®R centrifuge BECKMAN). Sediment byl promyt 70% etanolem, vysušen a rozpuštěn v 0,5 ml TE pufru. DNA byla skladována při -20°C.

Materiál:

Živný bujón s ampicilinem: 2,5% živný bujón č. 2 (Imuna)

50-100 µg/ ml ampicilin (Krka)

RNáza A (10mg/ml) (Sigma)

3 M octan sodný (pH 5,2)

Fenol: destilovaný, pufrovaný 1M Tris-HCl (pH 8,0), s přidáním 0,1% 8-hydroxychinolinu

Chloroform: chloroform upravený isoamylalkoholem (24:1)

98% etanol, 70% etanol

TE pufr: 10 mM Tris-HCl (pH 8,0)

1 mM EDTA-NaOH (pH 8,0)

Roztok STE: 0,1 M NaCl

10 mM Tris-HCl (pH 8,0)

1 mM EDTA (pH 8,0)

Roztok I: 25 mM Tris-HCl (pH 8,0)

10 mM EDTA-NaOH (pH 8,0)

50 mM glukóza

Roztok II: 0,2 M NaOH

1% SDS (Sigma)

Roztok III: 60 ml 5 M octanu draselného

11,5 ml ledové kyseliny octové

28,5 ml destilované vody

4.8.5. Minipreparace plazmidové DNA (alkalická metoda)

Postup odpovídal metodě maxipreparace plazmidové DNA, s tím rozdílem, že bylo zaočkován pouze 1 ml živného bujónu s příslušným antibiotikem, objem přidávaných roztoků byl adekvátně zmenšen a inkubační časy byly zkráceny na 5 minut (pouze

inkubace s RNázou A trvala 15 minut). Precipitovaná DNA byla rozpuštěna v 10 μ l TE pufu.

4.8.6. Minipreparace plazmidové DNA pomocí „QIAprep® Spin Miniprep Kit“ (QIAGEN)

Bakterie s plazmidem byly zaočkovány do 10 ml živného bujónu s příslušným antibiotikem a aerobně kultivovány přes noc při 37°C. Kultura byla centrifugována 5 min/ 4 300 RPM (GS-15R Centrifuge BECKMAN), sediment byl resuspendován v 250 μ l „P1 Buffer“, k suspenzi bylo přidáno 250 μ l „P2 Buffer“. Suspenze byla jemně promíchána překlápěním mikrozkušavky. Bylo přidáno 350 μ l „N3 Buffer“ a jemně promícháno. Suspenze byla centrifugována 10 min/13 000 RPM (od tohoto kroku byla používána Microfuge®R centrifuge BECKMAN). Supernatant byl přendán do „QIAprep“ kolonky a centrifugován 1min/13 000 RPM . Kolonka byla promyta přidáním 750 μ l „PE Buffer“ a centrifugací 1min/13 000 RPM. Pro odstranění zbytkového etanolu byla kolonka centrifugována 3min/13 000 RPM. Kolonka byla přendána do sterilní mikrozkušavky a DNA byla uvolněna inkubací s 50 μ l „EB Buffer“ 1 min. a centrifugací 3min/13 000 RPM. DNA byla skladována při -20°C.

Materiál: „P1 Buffer“ („P1 Buffer“ + „Rnase A“), „P2 Buffer“, „N3 Buffer“, „PE Buffer“, „EB Buffer“, „QIAprep“ kolonky

4.8.7. Štěpení DNA restrikčními endonukleázami

(SAMBROOK *et al.* 1989)

Restrikční směs:

0,5-2 μ g plazmidové DNA

2 μ l 10 \times koncentrovaného restrikčního pufu

5-10U každého použitého restrikčního enzymu

doplněno demineralizovanou vodou do 20 μ l

Směs byla inkubována 1 hodinu nebo přes noc v optimální reakční teplotě.

Materiál:

Pufry (Fermentas)

Restrikční endonukleázy (Fermentas)

4.8.8. Defosforylace vektorové DNA

Defosforylace 5'konců linearizovaného plazmidu probíhala 1 h při 37°C. Reakce byla zastavena přidáním 0,5 M EDTA (pH 8,0, koncentrace v roztoku 5 mM) a 10 min při 75°C inkubací. Roztok byl přečištěn směsí fenol-chloroform. DNA byla precipitována 98% etanolem a rozpuštěna v TE pufru (viz. metoda Maxipreparace plazmidové DNA).

Reakční směs:

1 µg linearizované vektorové DNA

5 µl 10x koncentrovaného CIP pufru

0,2 jednotky CIP

doplněno demineralizovanou vodou do objemu 50 µl

Materiál:

Alkalická fosfatáza – CIP (Boehringer Mannheim)

CIAP pufr: 10 mM Tris-HCl (pH 8,3)

1 mM Mg Cl₂

1 mM ZnCl₂

Fenol: destilovaný, pufovaný 1M Tris-HCl (pH 8,0), s přidáním 0,1% 8-hydroxychinolinu

Chloroform: chloroform upravený isoamylalkoholem (24:1)

98% etanol, 70% etanol, 3 M octan sodný

TE pufr: 10 mM Tris-HCl (pH 8,0)

1 mM EDTA-NaOH (pH 8,0)

4.8.9. Ligace

(SAMBROOK *et al.* 1989)

Ligační směs: DNA vektoru (100 ng) a vkládaného fragmentu (100 ng) 1µl 10× koncentrovaného ligačního pufru pro T4 DNA ligázu 0,5-5U T4 DNA ligázy doplněno demineralizovanou vodou do 10µl Reakční směs byla inkubována 12-24 hodin při

16°C. Ligace byla ukončena zahřáním na 65°C po dobu 10 minut. Takto připravená ligační směs byla použita k elektroporaci.

Materiál: T4 DNA ligáza: 1 U/ μ l (Fermentas)
Ligační pufr pro T4 DNA ligázu : 50 mM Tris-HCl (pH 7,8)
10 mM MgCl₂
10 mM DTT
0,5 mM ATP

4.8.10. PCR

PCR program:

- a) denaturace DNA 94°C / 1 min
vazba primerů 45-60°C / 1 min
polymerace DNA 72°C / 1 min
- b) opakování bodu a) 34x
- c) polymerace DNA 72°C / 10 min

Reakční směs:

5,0 μ l 10x koncentrovaného TermoPol Buffer (BioLabs)
1,5 μ l 50 mM MgCl₂
1,0 μ l 10 mM dNTP
1,0 μ l linearizované DNA (10 ng / μ l)
1,0 μ l „upstream“ primeru (0,3 nM / μ l)
1,0 μ l „downstream“ primeru (0,3 nM / μ l)
0,5 μ l Vent polymerázy (cca 3 jednotky) (BioLabs)
39,0 μ l demineralizované vody

4.9. Práce s proteiny

4.9.1. Příprava lyzátů pro SDS PAGE

40 μ l bakteriální kultury narostlé do optické density 0,6 bylo smícháno s 10 μ l 5x koncentrovaného Laemliho pufru (složení viz kapitola 3.9.2). Vzorek byl povařen 5 min a nanášen na gel.

4.9.2. SDS-polyakrylamidová elektroforéza (SDS-PAAGE)

(SAMBROOK *et al.*, 1989)

Skla pro elektroforézu byla důkladně omytá (čistící prášek + voda, denaturovaný líh, demineralizovaná voda). Suchá skla byla potřena PLOT-koncentrátem (SERVA) (ředěn acetonem v poměru 1:24). Skla byla umístěna do nalévací aparatury a byl vyznačen spodek zubů hřebenu. Mezi skla byl nalit spodní gel 0,5 cm pod okraj zubů hřebenu. Gel byl převrstven demineralizovanou vodou, nebo 0,1% SDS, či isobutanolem a ponechán 20-30 minut aby polymerizoval. Poté byla voda odstraněna a byl nalit horní gel. Ihned po nalití byl do aparatury vsunut hřeben. Gel polymerizoval 15-20 minut. Hřeben byl odstraněn (před odstraněním byla na sklo označena umístění jamek hřebenu), skla byla přenesena do elektroforetické aparatury a byl nalit 1x elektroforetický pufr. Jamky byly propláchnuty elektroforetickým pufrem. Byly naneseny vzorky smíchané s jednu pětinou objemu Laemliho pufru (5x koncentrovaném) a marker molekulových vah. Elektroforéza probíhala 20 min při napětí 80V/cm pro zaostření vzorků a 1,5 až 2,5 hod při 120V/cm.

Materiál:

PLOT-koncentrátem (SERVA)

Elektroforetický pufr (10x): 250 mM Tris
1,92 mM glycin
1% SDS

Laemliho pufr 5 x koncentrovaný: 5% SDS

50 mM Tris-HCl (pH 6.8)
50% glycerol
25% β -merkptoethanol
0,005% bromfenolová modř

Roztok pro 10 ml 10% gelu (spodní gel): 3,3 ml 30% akrylamidu
3,73 ml 1M Tris-HCl (pH 8.8)
100 μ l 10% SDS
2,8 ml demineralizované vody
100 μ l 10% amonium persulfát
10 μ l TEMED

Roztok pro 10 ml 12% gelu (spodní gel): 4 ml 30% akrylamidu
1 ml 1M Tris-HCl (pH 8.8)
120 μ l 10% SDS
3,25 ml demineralizované vody
100 μ l 10% amonium persulfát
10 μ l TEMED

Roztok pro 10 ml 15% gelu (spodní gel): 5 ml 30% akrylamidu
3,73 ml 1M Tris-HCl (pH 8.8)
100 μ l 10% SDS
1,1 ml demineralizované vody
100 μ l 10% amonium persulfát
10 μ l TEMED

Roztok pro 3 ml 5% gelu (horní gel): 0,5 ml 30% akrylamidu
0,375 ml 1M Tris-HCl (pH 6.8)
30 μ l 10% SDS
2,11 ml demineralizované vody
20 μ l 10% amonium persulfát
5 μ l TEMED

Proteinový marker (kDa):

180 – α_2 -Makroglobulin, 116 – β -Galaktozidáza, 90 – Laktoferin, 58 – Pyruvát Kináza,
48 – Fumaráza, 36 – Laktát dehydrogenáza 27 – Triózafosfatát Izomeráza (Sigma)
229 – Myosin, 120 – Fosforyláza B, 87 – BSA, 50 – Ovalbumin, 33 – Anhydráza, 26 –
Inhibitor tripsinu, 17,9 – Lyzozym (Genetica)

4.9.3. Dot blot

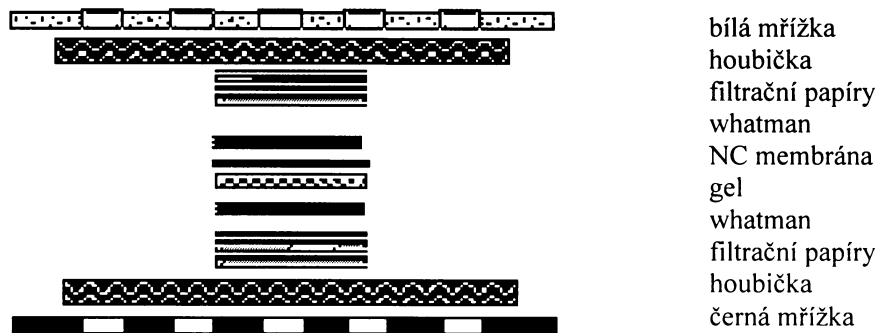
(SAMBROOK *et al.*, 1989)

Lyzát buněk byl nanesen na suchou nitrocelulózovou membránu. Po zaschnutí byla membrána použita k imunologické detekci.

4.9.4. Western blot

(SAMBROOK *et al.* 1989)

Gel byl inkubován v blotovacím pufru. Byl sestaven blotovací sendvič (obr. 4.2). Bílá mřížka byla na straně anody, černá mřížka na straně katody. Přenos probíhal v blotovacím pufru 3 hodiny při 250 mA. Po skončení blotování byla membrána vložena minimálně na 30 minut do odtučněného 5% mléka v PBS pro vysycení volných vazebních míst na membráně. Vzorky na membráně byly imunologicky detekovány.



Obr. 4.2: Návody k virologickému praktiku: Španielová, Liebl - 2003

Materiál:

Blotovací pufr: 25 mM Tris
195 mM glycin
20% methanol

4.9.5 Imunodetekce proteinů

(SAMBROOK *et al.*, 1989)

Membrána byla inkubována 30 minut v odtučněném 5% mléce v PBS a opláchnuta v PBS. Poté se membrána inkubovala 1 hodinu s primární protilátkou naředěnou v 5% odtučněném mléce. Membrána byla 3x 10 minut promývána v PBS. Poté se membrána inkubovala 30 minut se sekundární protilátkou naředěnou v 5% mléce. Po odmytí nespecifických interakcí sekundární protilátky 3x 10 minut v PBS byla membrána přelita roztokem LUMINOLU (30 sec), dána do fólie a byl přiložen RTG film. Doba expozice byla v rozmezí 15 sec. – 5 min. Poté byl film vyvolán a ustálen.

Alternativně byla membrána inkubována ve vyvíjecím roztoku DAB, který byl po zviditelnění analyzovaného proteinu odmyt vodou.

Materiál:

PBS: 8 g NaCl
0,2 g KCl
1,44 g Na₂HPO₄
0,24 g KH₂HPO₄
doplněno demineralizovanou vodou do 1l, pH upraveno na 7,4
Odtučněné mléko, RTG film (Forma)
LUMINOL (ECL Western Blotting Detection Reagens, Amersham)
Vyvíjecí roztok: 10 ml PBS
100 µl 0,3% CoCl₂

3 mg DAB (Aldrich Chemical Corporation)
7 μ l 30% H₂O₂ (Chemické závody Sokolov)

Negativní vývojka (FOMA)
Ustalovač (FOMA)

4.10. Expres proteinů v bakteriálním systému

4.10.1. Expres fúzních proteinů v bakteriích BL21

Bakterie BL21 obsahující expresní plazmid byly zaočkovány do LB media s příslušným antibiotikem a kultivovány přes noc při 37°C. Druhý den, bylo narostlou bakteriální kulturou zaočkováno 500 ml LB media s příslušným antibiotikem. Při dosažení optické density 0,6 při 560 nm, bylo přidáno IPTG do konečné koncentrace 1 mM. Bakteriální kultura byla inkubována s IPTG 3 hod. při 37°C nebo 12 hod. při 28°C. Kultura byla centrifugována, resuspendována v 20 ml lyzačního pufru a sonikována 1 hod. na ledě.

Materiál:

IPTG: rozpuštěné v demi vodě (1000x koncentrované) (Fermentas)

LB médium: 1% trypton
0,5% kvasničný autolyzát
180 mM NaCl

Lyzační pufr : 1xPBS
1M NaCl
4 mM β -merkaptoetanol (β ME)
2 mM Imidazol

4.10.2. Ověření exprese a určení rozpustnosti fúzních proteinů

Bylo odebráno 5 ml bakteriální kultury po inkubaci s IPTG, centrifugováno 5min./4 300 RPM. Pelet byl resuspendován v PBS a sonikován 5 min. na ledě. 1 ml sonikované směsi byl centrifugován 40 min/13 000 RPM. Supernatant byl odebrán a pelet byl resuspendován v 1 ml PBS. Bakteriální lyzát po sonikaci, frakce obsahující proteiny rozpustné ve vodné fázi (supernatant) a frakce obsahující proteiny nerozpustné ve

vodné fázi (resuspendovaný pelet) byly testovány pomocí SDS PAGE elektroforézy a metodou Western Blot na přítomnost fúzních proteinů.

Materiál:

IPTG

LB médium

4.10.3 Izolace proteinů afinitní chromatografií

„Histrap“ kolonky (GE Healthcare) pro afinitní chromatografii obsahující nikelnaté ionty byly promyty vodou a pufrem E. Pro potřebu regenerace nikelnatých iontů byl použit roztok obsahující 0,1 M Ni²⁺. Na kolonku byl nanesen bakteriální lyzát (rychlost průtoku přes kolonku byla 0,5 - 1 ml/min.). Při použití „Histrap TMHP“ kolonek byl lyzát filtrován přes 0.22 µm filtr. Pro „HistrapTMFF crude“ kolonky byl použit nefiltrovaný lyzát.

4.10.3.1. Isolace frakce fúzních proteinů rozpustných v lyzačním pufru

Pro odmytí nespecificky navázaných proteinů byla kolonka promyta 10 ml pufru F1. Protein navázaný pomocí „Histag“ sekvence byl eluován pomocí pufru F2, protein byl odebírán ve frakcích po 700 µl. Jednotlivé frakce byly testovány pomocí SDS PAGE elektroforézy. Frakce obsahující daný protein byly spojeny a dialyzovány do PBS.

Materiál:

Lyzační pufr : 1xPBS

1M NaCl

4 mM β-merkaptoetanol (βME)

2 mM Imidazol

Pufr E: 1xPBS

0.5 M NaCl

2 mM βME

1 mM Imidazol

Pufr F1: 1xPBS

0.5 M NaCl

2 mM βME

60 mM Imidazol

pH to 8.0

Pufr F2: 1xPBS
0.5 M NaCl
2 mM β ME
0.6 M Imidazol
pH to 8.0
HistrapTMHP kolonka (GE Healthcare)

4.10.3.2. Izolace proteinů nerozpustných v lyzačním pufru

Sonikovaný bakteriální lyzát byl centrifugován 40 min/20 000 RCF (rotor SW28 BECKMAN - 12 000 RPM). Byl odebrán pelet, obsahující inkluzní tělíska, resuspendován v 20 ml β TETUN a opět centrifugován 40 min/20 000 RCF. Tento krok byl opakován třikrát. Pelet z posledního kroku byl resuspendován v 20 ml β TUN a nanášen na „HistrapTMFF crude“ kolonku. Pro odmytí nespecificky navázaných proteinů byla kolonka promyta 10 ml roztoku „A“. Protein navázaný pomocí „Histag“ sekvence byl eluován roztokem „B“, protein byl odebírán ve frakcích po 700 μ l. Jednotlivé frakce byly testovány pomocí SDS PAGE elektroforézy. Frakce obsahující daný protein byly spojeny.

Materiál:

β TETUN: 5 mM β ME
50 mM Tris-HCl pH 7,5
10 mM EDTA
1% Triton
2 M močovina
200 mM NaCl

β TUN: 1% β -merkaptoetanol
50 mM Tris-HCl pH 7,5
8 M močovina
150 mM NaCl

Roztok „A“: pufr F1 (1xPBS, 0.5 M NaCl, 2 mM β ME, 60 mM imidazol)
8 M močovina
pH to 8.0

Roztok „B“: pufr F2 (1xPBS, 0.5 M NaCl, 2 mM β ME, 0.6 M imidazol)
8M močovina
pH to 8.0

Pufr F2: 1xPBS
0.5 M NaCl
2 mM β ME
0.6 M Imidazol
pH to 8.0
HistrapTMFF crude kolonka (GE Healthcare)

4.10.5. Dialýza

Dialyzační membrána byla 10 minut povařena. Do membrány opatřené svorkami bylo nanášeno cca 5 ml vzorku (spojených frakcí). Dialýza probíhala ve 100-200 násobném objemu dialyzačního pufru ve dvou krocích (tj. s jednou výměnou pufru) přes noc při 4°C za stálého míchání.

Materiál:

Dialyzační pufr: 10 mM Tris (pH 7,4)

150 mM NaCl

0,01 mM CaCl₂

-alternativně lze použít 10 mM Tris (pH 7,4)

Dialyzační membrány (Sevapor 21 mm, průměr pórů 2,5 nm) (Serva)

4.10.6. Měření koncentrace proteinů metodou Bradfordové

Byla připravena ředící řada v rozmezí koncentrací 0-1 mg BSA/ml. 2 µl z každé koncentrace a 2 µl vzorku byly nanášeny na mikrotitrační destičku. Bylo přidáno 100 µl činidla a byla měřena absorbance při 595 nm.

Materiál:

Činidlo Bradfordové: 100 mg Coomassie Brilliant Blue G250 bylo rozpuštěno přes noc v 50 ml 96% ethanolu, druhý den bylo přidáno 100 ml H₃PO₄ a doplněno demineralizovanou vodou do 1000 ml. Roztok byl přefiltrován na 0,22 µm filtru.

4.11. Pasážování savčích buněk (3T6, NMuMG)

Z misky s konfluentní buněčnou vrstvou bylo odsáto médium. Buňky byly opláchnuty Versenovým roztokem a inkubovány v 0,25% trypsinu ve Versenově roztoku. Po uvolnění z povrchu misky byly buňky resuspendovány v médiu se sérem a rozděleny na šest (3T6), nebo čtyři (NMuMG) misky, nebo na mikroskopická sklíčka.

Materiál:

médium se sérem: DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium) (Sigma)

10% FCS (Fetal calf serum) (Sigma)

1% glutamin (Sigma)

Versenův roztok (Sevac)

trypsin (Sigma)

PBS (Sevac)
Petriho misky (TPP, Biotech)
mikroskopická sklíčka

4.12. Fixace buněk na mikroskopických sklíčkách

Buňky na mikroskopických sklíčkách byly opláchnuty PBS a 15 minut fixovány 3% roztokem paraformaldehydu. Pak byly buňky 10 minut permeabilizovány 0,5% Tritonem X100 a 3×10 minut kolébány v PBS.

Materiál:

3% paraformaldehydu (Serva) v PBS (rozpuštěn zahřáním na 97°C připravován čerstvý, nebo skladován při 4°C.)
0,5% Triton X100: 0,5% Triton X100 (Serva) v PBS
PBS (Sevac)

4.13. Imunofluorescenční detekce proteinů v buňkách

Buňky fixované na mikroskopických sklíčkách byly vysyceny kolébáním v 1 ml PBS s 0,25% BSA a 0,25% želatinou při pokojové teplotě. Po 30 minutách byl roztok odsát a bylo přidáno 0,2 ml primární protilátky naředěné v PBS s BSA a želatinou. Po 1 hodině byla sklíčka s buňkami 3× 10 minut promývána 1ml PBS. Na 35 minut bylo přidáno 0,2ml roztoku sekundární protilátky v PBS s 0,25% BSA a 0,25% želatinou. Sklíčka s buňkami byla 4× 10 minut promývána 1ml PBS. Sklíčka byla přiložena plochou s narostlými buňkami na kapku glycerolu na podložním mikroskopickém sklíčku. Preparáty byly prohlíženy ve fluorescenčním mikroskopu Olympus BX 60 nebo konfokálním mikroskopu Leica TCS. a skladovány při -20°C.

Materiál:

PBS s BSA a želatinou: PBS (Sevac)
0,25% BSA (Sigma)
0,25% želatina (Sigma)
glycerol (Lachema)

4.14. Imunizace králíka pro získání polyklonální protilátky

Antigen, získaný po izolaci na „Histrap“ kolonce, byl nanesen na polyakrylamidový gel (10 %) a aparatura byla zapojen na 120 V. Protein byl z gelu vyříznut a jednotlivé kousky gelu obsahující protein byly rozdrceny ve hmoždíři pomocí tekutého dusíku. Směs polyakrylamidu a antigenu byla rozmíchána v PBS.

Imunizace dvou králíků byla provedena Dr. Šmelhausem z Fyziologického ústav Akademie Věd. V průběhu imunizace bylo odebíráno sérum pro kontrolu protilátky.

4.15. Přístroje

Aparatura pro SDS-PAGE (Hofer)

Aparatura pro western blotting (BioRad)

Centrifuga Beckman Centrifuge GS-15R, rotor S4180

Centrifuga Megafuge 1.0R (Heraeus Sepatech)

CO₂ termostat (Forma Scientific)

Elektroforéza E-C Apparatus corporation (Hofer)

Elektroporátor Gene pulser Apparatus (Biorad)

Fluorescenční mikroskop BX-60 (Olympus)

Fluorescenční mikroskop Olympus IX 81 (Olympus IX81, Illumination System MT20

Olympus, Cell^R Imaging Software)

Kamera Hitachi HV-C20

Konfokální mikroskop Leica TCS-sp

Kultivační přístroje (Labnet, Lab Therm)

Mikrocentrifuga Beckman Mikrofuge Centrifuge, rotor F241,5

PCR aparatura MiniCycler™ (MJ Research)

Sonikátor Branson 5 (Cole-Parmer Instrument Company)

Sonikátor IP65 (El-Medica s.r.o.)

Spektrofotometr Spekol 11 (Carl Zeiss - Jena)

Termostat TCH 100 (laboratorní přístroje Praha)

Třepačky (Labnet, Lab Therm)

Ultracentrifuga L5-50B, rotory: SW 41, NVT 90 (Beckman)

UV transiluminátor (BioLum)

Vortex - Genie 2 (Scientific Industries)

5. VÝSLEDKY

5.1. Konstrukce plazmidů pro expresi sekvencí minoritních proteinů myšího polyomaviru v bakteriích

Pro studium interakcí minoritních kapsidových proteinů myšího polyomaviru se strukturami hostitelské buňky bylo třeba nejprve zkonstruovat vhodné plazmidy. Byly zkonstruovány plazmidy nesoucí geny polyomavirových minoritních kapsidových proteinů fúzovaných s genem kódujícím bakteriální thioredoxinu (zvýšení solubility fúzních proteinů) a Histag sekvencí (kotevní sekvence pro purifikaci pomocí „Histrap“ kolonek) pro produkci v bakteriích.

5.1.1. Konstrukce plazmidů pET32-VP2, pET32-VP3 a pET32-C35

Plazmid pET32-VP2 byl zkonstruován Mgr Evženem Bouřou a poskytnut k dalším pokusům.

Plazmid pET32-VP3 a pET32-C35 byly získány vložением příslušného fragmentu do plazmidu pET-32b tak, aby sekvence PyV minoritních proteinů byly ve stejném čtecím rámci jako sekvence thioredoxinu a Histag kotvy (obr. 5.1). Gen VP3 a 3' konec genu pro VP3 (105 bp) byl amplifikován metodou PCR. Jako templát byl použit plazmid nesoucí genom PyV - pMJΔG (3.3).

Primery použité pro amplifikaci genu VP3 (tučně jsou označeny restriční místa v primerech):

- 1) VP3 HindIII (**KLMALIPW** – aminokyselinová sekvence kódovaná primerem)
CAGAC **AAG CTT** ATG GCG TTG ATA CCA TGG – kurzívou start kodon genu VP3
- 2) VP(2+3) XhoI (**KKRRL*** - hvězdička vyznačuje stop kodon)
CAGAC **GAA TTC** TTA GAG ACG CCG CTT TTT – kurzívou - stop kodon
Klonovaná sekvence kódovala gen proteinu VP3 (204 aa) „MALIPW.....KKRRL“.

Primery použité pro amplifikaci C konce genu VP3 (tučně jsou označeny restriční místa v primerech):

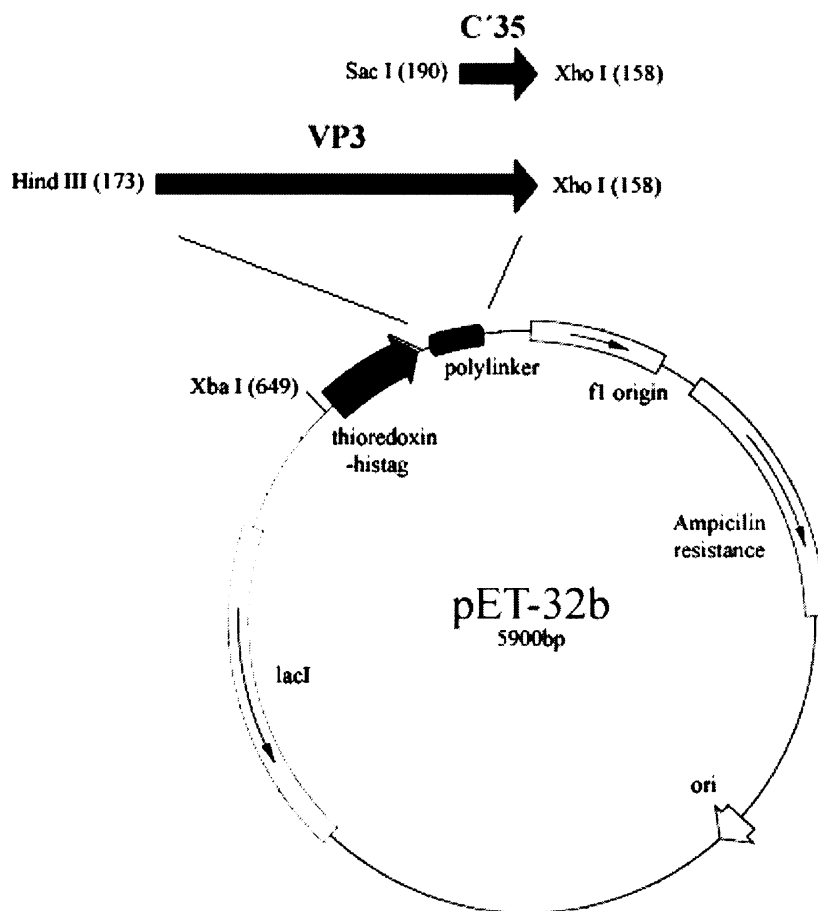
- 1) C35 VP3 SacI/1 (**SSPDWMLP**)

CAG ACG AGC TCC CCT GAC TGG ATG CTT CCT – kurzívou - první aa
 C koncové sekvence

2) VP(2+3) XhoI/2 (KKRRL*)

CAGAC GAA TTC TTA GAG ACG CCG CTT TTT – kurzívou - stop kodon

Klonovaná sekvence kódovala C koncovou oblast genu VP3 (35 aa)
 „PDWMLP.....KKRRL“.



Sekvence polylinkeru:

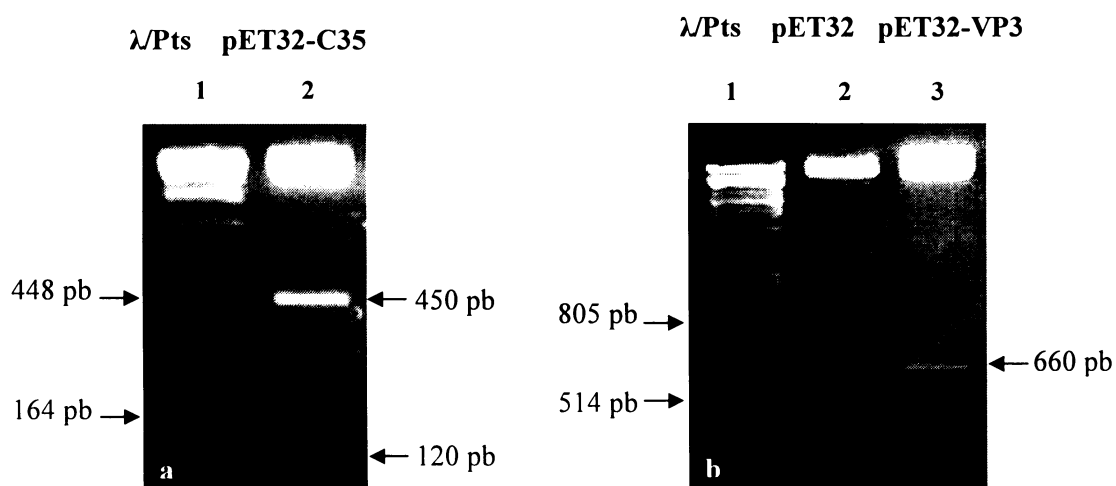
NcoI EcoRV BamHI EcoRI SacI SalI
 GCC-ATG-GCG-ATA-TCG-GAT-CCG-AAT-TCG-AGC-TCC-GTC-GAC-
 Ala – Met – Ala – Ile – Ser – Asp – Pro – Asn – Ser – Ser – Ser – Val – Asp –

HindIII Not I Xho I
 AAG-CTT-GCG-GCC-GCA-CTC-GAG-
 Lys – Leu – Ala – Ala – Ala – Leu – Glu

Obr. 5.1: Schematické zobrazení konstrukce plazmidu pET32-VP3/C35, (detailní mapa plazmidu a uspořádání jeho MCS na www.plantsignal.cn/intranet/protocol%20and%20other/vector/pET32.pdf)

PCR fragment genu VP3 byl štěpen enzymy HindIII a XhoI. PCR fragment C koncové oblasti genu VP3 byl štěpen enzymy SacI a XhoI. Fragmenty byly ligovány do rozštěpeného a defosforylovaného vektoru pET32b, který byl štěpen stejnými restričními enzymy jako příslušné fragmenty. Do bakteriálního kmene DH5 α byly ligační směsi vneseny elektroporací. Plazmidy získaných transformantů byly analyzovány restričními enzymy (obr. 5.2) a sekvence plazmidu pET32-C35 byla ověřena sekvenací.

Ověřené monokolonie byly použity k izolaci plazmidové DNA. Izolovaná DNA byla použita pro elektroporaci bakteriálního kmene BL21 pro produkci proteinů.



Obr. 5.2: Restriční ověření plazmidů izolovaných z monokolonií, a) λ /Pst + pET32-C35 (3% agarózový gel), b) λ /Pst + pET32b + pET32-VP3 (1,5% agarózový gel). Jako marker byla použita DNA bakteriofága λ štěpená restriktázou PstI.

konstrukt	restriční enzymy	fragменты
pET32-C35	XhoI-XbaI-BamHI	120 + 450 + 5480
pET32-VP3	HindIII-XhoI	660 + 5900

Tab. 5.1: použité restriční enzymy a vzniklé fragменты.

5.1.2. Sekvenační ověření konstruktu pET32-C35

Nukleotidová sekvence pET32-C35. Kurzívou je vyznačena sekvence kódující bakteriální thioredoxin, tučně s podtržením je vyznačena sekvence kódující „Histag“, tučně je vyznačena sekvence kódující 35 aminokyselin C koncové oblasti proteinu

VP2/3. Mezi sekvencemi kódující „Histag“ a C koncovou oblast VP2/3 se nachází spojovací sekvence 20 aa kódovaných plazmidovou DNA.

*ATGAGCGATAAAATTATTCACCTGACTGACGACAGTTTTGACACGGATGTACTCAAAGCG
GACGGGGCGATCCTCGTCGATTCTGGGCAGAGTGGTGCGGTCCGTGCAAAATGATCG
CCCCGATTCTGGATGAAATCGCTGACGAATATCAGGGCAAACCTGACCGTTGCAAACTGA
ACATCGATCAAAACCCCTGGCAGTGCGCCGAAATATGGCATCCGTGGTATCCCGACTCTG
CTGCTGTTCAAAAACGGTGAAGTGGCGGCAACC AAAAGTGGGTGCACTGTCTAAAGGTCA
GTTGAAAGAGTTCCTCGACGCTAACCTGGCCGTTCTGGTTCTGGCCATATGCACCAT
CATCATCATCATTCTTCTGGTCTGGTGCCACGCGTTCTGCCATGGCGATATCGGA
TCCGAATTCGAGCTCACCTGACTGGATGCTTCCTTTAATTCTAGGGCTGTACGG
TGATATCACACCTACTTGGGCAACAGTCATAGAGGAAGATGGCCCCCAAAGA
AAAAGCGGCGTCTCTAA*

Tab. 5.2: Sekvenační ověření konstruktů pET32-C35 – nukleotidová sekvence (kurzivou sekvence thioredoxinu, tučně s podtržením Histag sekvence, tučně 35 aa C konce VP2/3)

Aminokyselinová sekvence pET32-C35. Kurzivou je vyznačena kotevní sekvence peptidu odvozeného od bakteriálního thioredoxinu, tučně s podtržením je vyznačena sekvence histag, tučně je vyznačena sekvence 35 aminokyselin C koncové oblasti proteinu VP2/3. Fúzní protein má molekulovou hmotnost 19,16 kDa.

*MSDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAEWCGPCKMIAPILDEIADEYQGKLTVAKLNID
QNPGSAPKYGIRGIPTLLLFKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLAGSGSGHMH~~HHHHH~~
HSSGLVPRGSAMAISDPNSSSPDWMLPLILGLYGDITPTWATVIEEDGPQKKRRL**

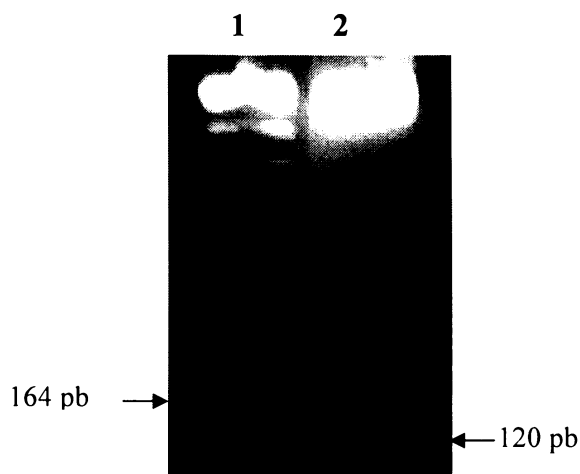
Tab. 5.3: Sekvenační ověření konstruktů pET32-C35 – aminokyselinová sekvence. (THIOREDOXIN – **HISTAG** - C35)

5.1.3. V průběhu klonování pET32-C35 byly do konstruktů zavedeny mutace

Do konstruktů pET32-C35 byly v průběhu klonování zavedeny inserční mutace způsobující posun čtecího rámce, tím došlo k vzniku stop kodonu před nsI sekvencí a došlo k delecí N koncového polybazického traktu, zachována byla sekvence 17 aa kódující hydrofóbní α helix. Tento konstrukt byl pojmenován pET32- α helix. V dalších pokusech (například „pulldown assay“) může být tento konstrukt použit jako negativní kontrola k proteinu Trx-Histag-C35.

Pokud budou zjištěny nové funkce pro C koncový úsek proteinu VP3 bude možné pomocí tohoto konstruktů zjistit jakou úlohu v těchto vlastnostech má samotný α helix a jakou roli hraje celý nepoškozený C konec s amfipatickým charakterem.

λ Pts pET32- α helix



Obr. 5.3: Restrikční ověření plazmidu izolovaného z monoklonie: λ Pst + pET32- α helix. 3% agarózový gel. Jako marker byla použita DNA bakteriofága λ štěpená restriktaázou PstI

konstrukt	restrikční enzymy	fragменты
pET32- α helix	SacI-XhoI	120 + 5900

Tab. 5.4: použité restrikční enzymy a vzniklé fragменты.

Nukleotidová sekvence pET32- α helix. Kurzívou je vyznačena sekvence kódující bakteriální thioredoxin, tučně s podtržením je vyznačena sekvence kódující „Histag“ tučně jsou vyznačeny nukleotidy vnesené inzerční mutací v oblasti kódující C koncovou část genu VP3 (T-478-, A-488-, C-510) a nově vzniklý stop kodon:

*ATGAGCGATAAANNTATTCACCTGACTGACGACAGTTTTGACACGGATGTA*CTCAAAGCG
GACGGGGCGATCCTCGTCGATTCTGGGCAGAGTGGTGCGGTCCGTGCAAAATGATCG
*CCCCGATTCTGGATGAAATCGCTGACGAATATCAGGGCAA*ACTGACCGTTGCAAACTGA
*ACATCGATCAA*ACCCTGGCACTGCGCCGAAATATGGCATCCGTGGTATCCCGACTCTG
*CTGCTGTTCAA*AAACGGTGAAGTGGCGGCAACCAAAGTGGGTGCACTGTCTAAAGGTCA
*GTTGAAAGAGTTCTCGACGCTA*ANCTGGCCGGTTCTGGTTCTGGCCATATG**CACCAT**
CATCATCATCATTCTTCTGGTCTGGTGCCACGCGTTCTGCCATGGCGATATCGGA
TCCGAATTCGAGCTCACCTGACTGGATGCTTCTTTAATTCTAGGGCTGTACGGTGA
TATCACACCCTACTTGGGCCAACAGTCNTAGAGGAAGANGGCCCCCCAAAAGAAA
AAGCGGCGTTCTCTAACCTCGAGNTAG

Tab. 5.5: Sekvenační ověření konstruktu pET32- α helix – nukleotidová sekvence (kurzívou sekvence thioredoxinu, tučně s podtržením Histag sekvence, tučně tři nukleotidy zavedené do sekvence inzerčními mutacemi, tučně také nově vzniklý stop kodon)

Nukleotidová sekvence 33 bází ve kterých vznikly inzerční mutace a stop kodon (vyznačeny tučně) a jejich translace ve všech čtecích rámcích (1-3). Aminokyselinové

sekvence C konce proteinu VP3 původně z prvního čtecího rámce jež byly mutacemi přesunuty do druhého a třetího čtecího rámce jsou vyznačeny tučně:

3) L G P **T V A E E C G**
 2) **T W A** N S X R G R X
 1) Y L G Q Q S * R K X A
TACTTGGGCCAACAGTCNTAGAGGAAGANGGCC

Tab. 5.6: Oblast inzerčních mutací na plazmidu pET32- α helix. Aminokyselinová sekvence všech čtecích rámců s nukleotidovou sekvencí (aminokyselinová sekvence 1., 2. a 3. čtecího rámce – sekvence C konce proteinu VP3, jež zde byla posunuta z 1. čtecího rámce do 2. a 3. je znázorněna tučně, nukleotidová sekvence – tučně jsou zvýrazněny vložené nukleotidy a nově vzniklý stop kodon).

Aminokyselinová sekvence pET32- α helix. Kurzívou je vyznačena kotevní sekvence peptidu odvozeného od bakteriálního thioredoxinu, tučně s podtržením je vyznačena sekvence histag, tučně je vyznačena sekvence 17 aminokyselin C koncové oblasti proteinu VP2/3 kódující α helix. Za 17 aa polyomavirového α helixu je 6 aa, které nově vznikly změnou čtecího rámce po zavedení první mutace (T-478). Fúzní protein má molekulovou hmotnost 17,49 kDa.

*MSDKXIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAEWCGPCKMIAPILDEIADEYQGKLTVAKLNID
 QNPGTAPKYGIRGIPTLLLFKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDAXLAGSGSGHMHHHHHH
HSSGLVPRGSAMAISDPNSSSPDWMLPLILGLYGDITPYLGQQS**

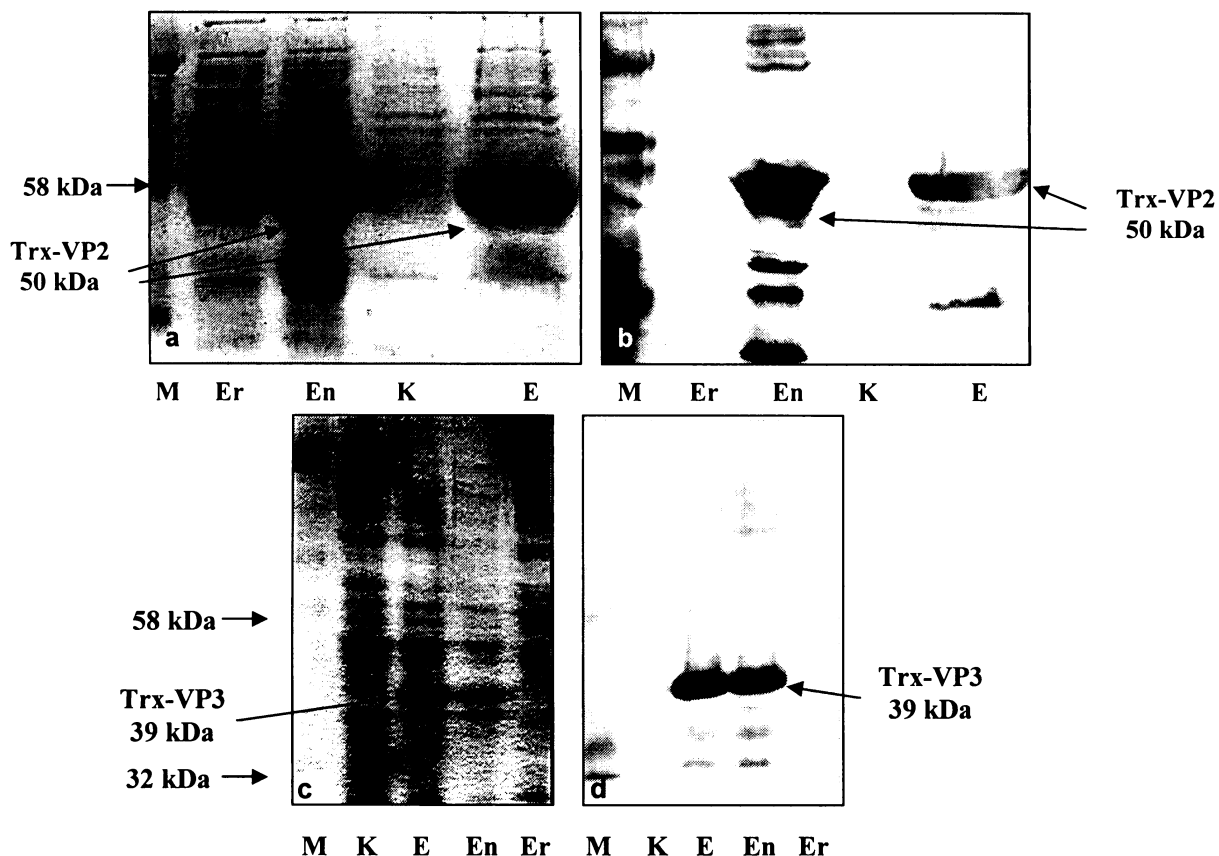
Tab. 5.7: Sekvenační ověření konstruktů pET32- α helix – aminokyselinová sekvence. (*THIOREDOXIN* – HISTAG - α helix)

5.2. Produkce a izolace sekvencí minoritních strukturních proteinů VP2, VP3

5.2.1. Ověření produkce fúzních proteinů a určení jejich rozpustnosti

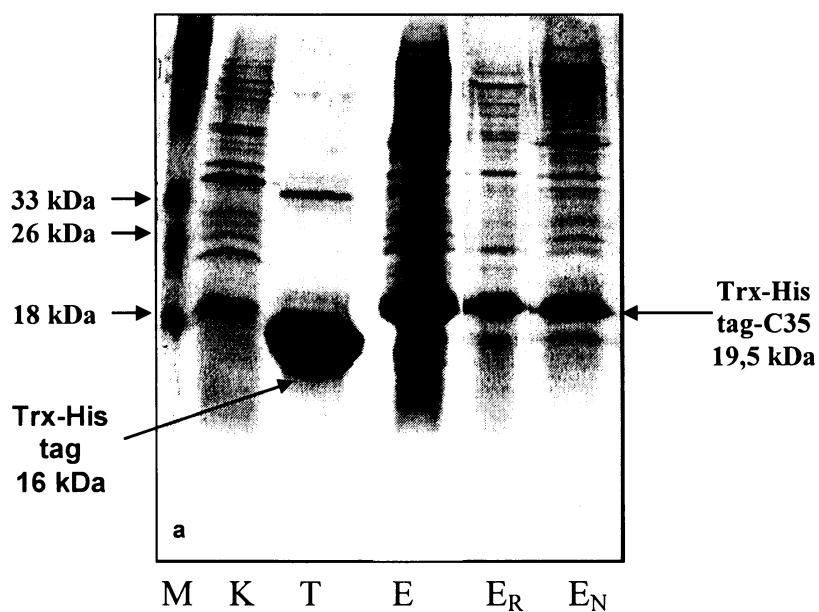
Bakterie BL21 obsahující plazmid pET32-VP2, pET32-VP3, pET32-C35 a pET32- α helix byly kultivovány v LB mediu do dosažení optické denzity 0,5 – 0,7 při 560 nm. Po té byla indukována exprese heterologních proteinů pomocí 1 mM IPTG a bakterie byly inkubovány při 28°C přes noc. Sonikované bakteriální lyzáty byly centrifugovány, aby se oddělily rozpustné a nerozpustné frakce proteinů. Rozpustné i nerozpustné frakce byly analyzovány na SDS PAGE (obr 5.4 a 5.5). Na obr. 5.4 jsou vidět elektroforegramy produkce fúzních proteinů obsahujících celé sekvence VP2 (a, b) a VP3 (c, d). Z obrázku je zřejmé, že fúzní varianty proteinů VP2 a VP3 byly nerozpustné a patrně se ukládaly do inkluzních tělísek. V nerozpustných frakcích, podobně jako v celkových lyzátech byly produkovány fúzní proteiny nejsilnějšími proužky. Z imunanalýzy (obr. 5.4. b) je patrné, že kromě plné délky fúzního proteinu Trx-Histag-VP2 jsou v lyzátu přítomny i kratší produkty reagující s protilátkou proti VP2/3, patrně degradační produkty.

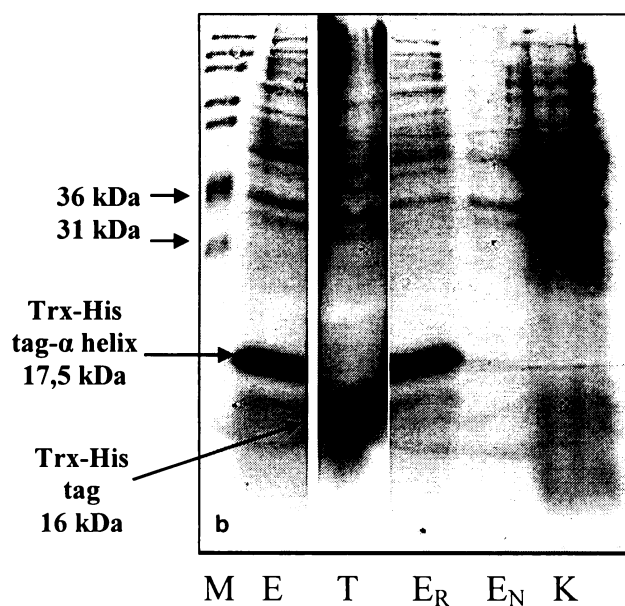
Na obr.5.5 je vidět elektroforegram produkce fúzních proteinů Trx-Histag-C35 a Trx-Histag- α helix. Na rozdíl od celých sekvencí VP2 nebo VP3, fúzní protein s posledními 35 C koncovými aminokyselinami byl částečně rozpustný, a fúzní protein Trx-Histag- α helix, postrádající koncové bazické aminokyseliny (nsl) byl zcela rozpustný. Ani jedna ze dvou monoklonálních protilátek proti společné části VP2 a VP3, které máme k dispozici nerozpoznávala posledních 35 aminokyselin proteinů. Proto nejsou v obr. 5.5 uvedeny imunodetekce metodou Western blot. Výtěžky heterologních proteinů byly v průměru kolem 30 mg na litr bakteriální kultury.



Obr. 5.4: Ověření produkce proteinu Trx-Histag-VP2, 50 kDa (a, b) a proteinu Trx-Histag-VP3, 39 kDa (c, d). 10% akrylamidový gel barvený commassie blue (a, c). Western blot značený primární myší monoklonální protilátkou (2C8) proti společné části proteinů VP2 a VP3 a sekundární kozí protilátkou konjugovanou s peroxidázou proti myším IgG (b, d).

M - marker molekulových vah, E - lyzát bakterií exprimujících heterologní protein, Er - rozpustná frakce bakteriálního lyzátu (E), En - nerozpustná frakce bakteriálního lyzátu (E), K - kontrola - bakteriální lyzát neexprimující gen pro thioredoxin a s ním fúzované sekvence





Obr. 5.5: Ověření produkce proteinu Trx-Histag-C35, 19 kDa (a) a proteinu Trx-Histag- α helix, 17,5 kDa (b). 15 % akrylamidový gel barvený commassie blue.

M - marker molekulových vah, E -lyzát bakterií exprimujících heterologní protein Er - rozpustná frakce bakteriálního lyzátu (E), En - nerozpustná frakce bakteriálního lyzátu (E), T - lyzát bakteriální kultury produkující thioredoxin s Histag, K - kontrola - bakteriální lyzát neexprimující gen pro thioredoxin a s ním fúzované sekvence

5.2.2. Izolace proteinů Trx-Histag-VP2 a Trx-Histag-VP3 afinitní chromatografií na kolonkách „HistrapTMFF crude“

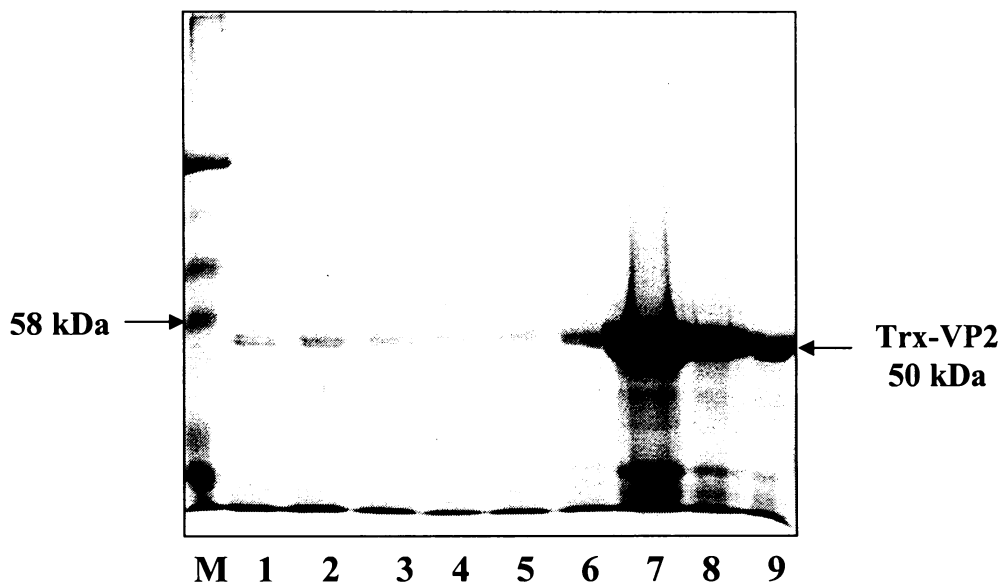
Pro izolaci nerozpustných proteinů Trx-Histag-VP2 a Trx-Histag-VP3 byl použit protokol pro izolaci proteinů z inkluzních tělísek (kap. 4.11.3.2.). Sediment sonikovaného bakteriálního lyzátu připraveného z 300 ml bakteriální kultury byl několikrát promyt roztokem obsahujícím 2M močovinu (pufr β TETUN), promytý sediment byl rozpuštěn ve 20 ml 8M močoviny (pufr β TUN, kap. 4.11.4) a nanesen na kolonku „HistrapTMFF crude“.

Frakce byly eluovány jak je popsáno v metodách (kap. 4.11.3.). Eluované frakce byly testovány pomocí SDS PAGE. Na obr. 5.6 je ukázán eluční profil fúzního proteinu Trx-Histag-VP2. Část Trx-Histag-VP2 se sice uvolnila do frakcí eluovaných vodným roztokem 0,5 M imidazolu - pufr F2 (obr. 5.6 1-5) (slabý dvouproužek charakteristický pro dvě izoformy VP2), nicméně převážná část proteinu musela být z kolonky eluována do pufru obsahující 0,5 M imidazol s 8 M močovinou - pufr B (obr. 5.6 6-9). Podobným způsobem byl získán i protein Trx-Histag-VP3 (eluční profil neuveden).

Při dialýze frakcí proteinů Trx-Histag-VP2 nebo Trx-Histag-VP3 eluovaných 0,5 M imidazolem do pufru PBS došlo k jejich úplnému vysrážení. Přečištěný Trx-Histag-VP2 v pufru B byl aplikován na SDS PAGE a použit pro přípravu antigenu k imunizaci králíků.

Frakce proteinů Trx-Histag-VP2 a Trx-Histag-VP3 v roztoku 8 M močoviny byly spolu smíchány v různých poměrech a postupně dialyzovány v roztocích PBS s klesající koncentrací močoviny (6 M, 4M a 2M močovina) . Nejlepší výtěžky byly získány pokud byl poměr Trx-Histag-VP2 : Trx-Histag-VP3 roven 3 : 1. Tímto způsobem jsme získali roztok smíchaných fúzních proteinů Trx-Histag-VP2 a Trx-Histag-VP3 o koncentraci 50 µg/ml.

Tento roztok byl použit pro zkoumání vlivu minoritních proteinů na plazmatickou membránu savčích buněk(kap. 5.4.1.).



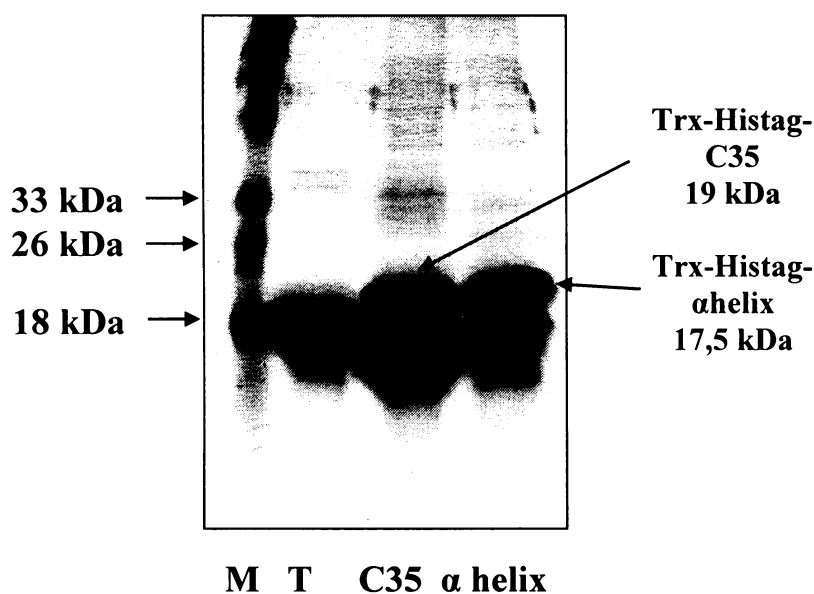
Obr. 5.6: Izolace Trx-Histag-VP2 chromatografií na kolonce HistrapTMFF crude. Frakce 1-5 byly eluovány 0,5M imidazolem (pufr F2) („rozpuštné frakce“), frakce 6-9 eluovány roztokem 0,5M imidazol + 8 močovina (Pufr B) („nerozpuštné frakce“) SDS-PAGE barvená Commassie Blue, 10% akrylamidový gel.

5.2.3. Izolace proteinů Trx-Histag-C35 a Trx-Histag- α helix na kolonkách „HistrapTMHP“

Pro izolaci proteinů Trx-Histag-C35 a Trx-Histag- α helix byl použit protokol pro izolaci rozpustných proteinů (kap. 4.11.3.1.) Rozpustná frakce sonikovaného

bakteriálního lyzátu (20ml) byla nanesena na kolonku. Frakce eluované puřrem F2 (0,5M imidazol) obsahující čiřtěný fúzní protein (testováno na SDS-PAGE) byly spojeny a dialyzovány proti PBS. SDS PAGE dialyzovaných spojených frakcí obarvená Commassie blue je na obr. 5.7. Pro srovnání je ukázán téř stejným způsobem purifikovaný Thioredoxin-Histag.

Z elektroforegramu vyplývá, že jednokrokovou afinitní chromatografií jsou požadované produkty výrazně nabohaceny, avřak stále jeřtě kontaminovány malými množstvími bakteriálních proteinů. Zatímco thioredoxin-Histag dáva jediný prevalentní prouřek, u obou fúzních proteinů obsahujících C koncové sekvence VP3 se nacházejí 3 výrazné prouřky, z nichř v obou případech ten s nejniřší mobilitou odpovídá požadovanému produktu. Zbylé dva prouřky jsou patrně degradační produkty. Konečné preparáty obsahovaly proteiny o koncentraci přibližně 1mg/ml.



Obr.5.7: Izolace proteinů Trx-Histag-C35 a Trx-Histag- α helix na kolonce HistrapTMHP, SDS-PAGE, barvená Commassie Blue, 15% gel.

M) – marker molekulových vah, T) kontrolní, stejným způsobem purifikovaný protein thioredoxin-Histag, C35) – protein Trx-Histag-C35, α helix) – protein Trx-Histag- α helix.

5.3. Příprava antigenu, imunizace a testování polyklonální protilátky proti VP2.

Pro přípravu protilátky proti VP2 jsme použily jako antigen fúzní protein s bakteriálním thioredoxinem. Získaná protilátka by tedy měla být naměřena i proti bakteriálnímu thioredoxinu, což by nemělo být na závalu pro studie v systémech

eukaryotních buněk. Antigen Trx-Histag-VP2 byl po eluci na kolonce nanesen na sérii polyakrylamidových gelů a po SDS elektroforéze byl vždy proužek gelu obsahující fúzní protein vyříznut. Jednotlivé proužky gelu obsahující protein byly zmrazeny tekutým dusíkem a rozdrceny v třecí misce. Na elektroforézy bylo celkem nanesen 90 mg proteinu (měřeno dle Bredfordové). Antigen byl získán v celkovém množství 73 g gelu (tzn., že v 1g gelu byl asi 1 mg antigenu). Rozdrcený polyakrylamidový gel s antigenem byl rozmíchán v PBS. Vlastní imunizace 3 králíků byla provedena na Ústavu fyziologie AVČR, Ing. Šmelhausem. Směs antigenu a polyakrylamidu byla vnesena do králíků podkožním vpichem. Bylo podáno šest dávek s časovým odstupem 7 dní. První dávka byla ztrojnásobena tj. 15 mg proteinu, další dávky byly po 5 mg proteinu v 6 ml PBS. V průběhu imunizace bylo odebíráno sérum pro kontrolu protilátky. Jeden králík uhynul po druhé imunizaci.

Sérum dvou králíků bylo testováno po druhé, třetí a čtvrté imunizaci metodou dot blot. Sérum jednoho králíka dávalo v tomto testu velmi slabý signál. Dot blot provedený se sérem druhého králíka po druhé imunizaci je uveden na obr.5.8. Pro kontrolu byla použita též monoklonální protilátka proti VP2 (obr. 5.8a). Z analýzy je patrné, že sérum reagovalo jak s lyzátem buněk Sf9 obsahující protein VP2 a bakteriálním lyzátem obsahující protein Trx-Histag-VP3, tak i s negativní kontrolou - lyzátem bakterií, které nenesly expresní vektor.

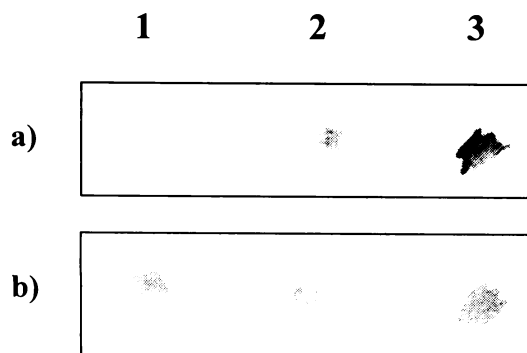
Po třetí imunizaci (obr. 5.9b) se obraz dot blot analýzy výrazně nezměnil a po čtvrté imunizaci (obr. 5.9.) byly reakce séra při analýze metodou dot blot silnější s lyzátem bakterií produkujících sekvence VP2 i s lyzátem hmyzích buněk obsahujícím VP2. Reakce s purifikovaným Trx-Histag-VP2 proteinem (obr 5.9. číslo 4) byla naopak slabá, možná proto, že se většina proteinu aplikovaného v 8M močovíně na membránu nezachytila.

Po 6 týdnech imunizace byl králík usmrcen a 40 ml séra bylo získáno odběrem ze srdce (provedeno Ing. Šmelhausem). Z poloviny séra byly izolovány imunoglobuliny afinitní chromatografií na kolonce se Sepharosou A (provedeno Dr. Korbem v Ústavu molekulární genetiky AVČR). Polyklonální protilátka byla dále vysycena od nespecifických interakcí inkubací na fixovaných neinfikovaných myších fibroblastech (po 7 dní, při 4°C každý den byla protilátka přenesena na misku s novými fixovanými buňkami).

Vysycená králičí protilátka byla dále testována v různém ředění s použitím intaktních a rozvolněných virionů myšího polyomaviru spolu s negativní kontrolou

(kapsidy tvořené pouze proteinem VP1) a pozitivní kontrolou (lyzát hmyzích buněk produkujících VP2) metodou dot blot (obr. 5.10.A). Rozvolněné viriony byly získány 30ti minutovou inkubací virionů s 10 mM DTT a 10 mM EGTA. Za těchto podmínek se kapsidy virionů rozpadnou na kapsomery a "nucleocore". Předpokládali jsme totiž, že v intaktních virionech nebudou epitopy minoritních proteinů protilátkám přístupné, zatímco po rozpadu virionů na kapsomery by se některé z epitopů mohly uvolnit. Jak je vidět na obr. 5.10.A, testovaná protilátka, ale i kontrolní monoklonální protilátka proti VP2 reagovaly nejen s frakcí rozvolněných virionů ale i s frakcí domněle intaktních virionů. Protilátka dle očekávání reagovala s lyzátem buněk Sf9 obsahující protein VP2. Ve vysokých koncentracích (1:10, 1:100) protilátka reagovala slabě s negativní kontrolou - částicemi obsahujícími pouze VP1, avšak při vyšším ředění protilátky (1:500, 1:1000) nespecifická reakce zmizela. Western blot na obr. 5.10.B ukazuje, že interakce s lyzátem hmyzích buněk produkujících protein VP2 je při 500ti násobném zředění vysoce specifická pro VP2 antigen. Protilátka byla dále testována metodou nepřímé imunofluorescence, na myších fibroblastech 3T6 fixovaných 48 hodin po infekci polyomavirem (obr. 5.11). Z obrázku konfokálních řezů je vidět, že testovaná protilátka proti VP2/3 barví specificky jádro infikované buňky (kromě jádérka). Je rovněž vidět rozdílná lokalizace VP1 a VP2.

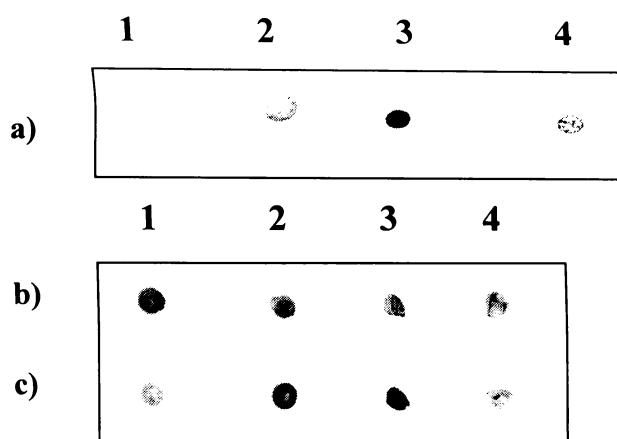
Na obr. 5.11.d , kde jsou 2 infikované buňky a řada neinfikovaných buněk (jádra všech jsou označena modře DAPI), je vidět že testovaná protilátka je specifická pro infikované buňky (kromě DAPI, červeně značen protein VP1, zeleně VP2/3).



Obr. 5.8: Kontrola séra po druhé imunizaci.

1) - Negativní kontrola - lyzát bakterií bez expresního plazmidu, 2) - Bakteriální lyzát produkující – Trx-Histag-VP3, 3) - lyzát hmyzích buněk Sf9 infikovaných rekombinantním bakulovirem nesoucím gen pro VP2

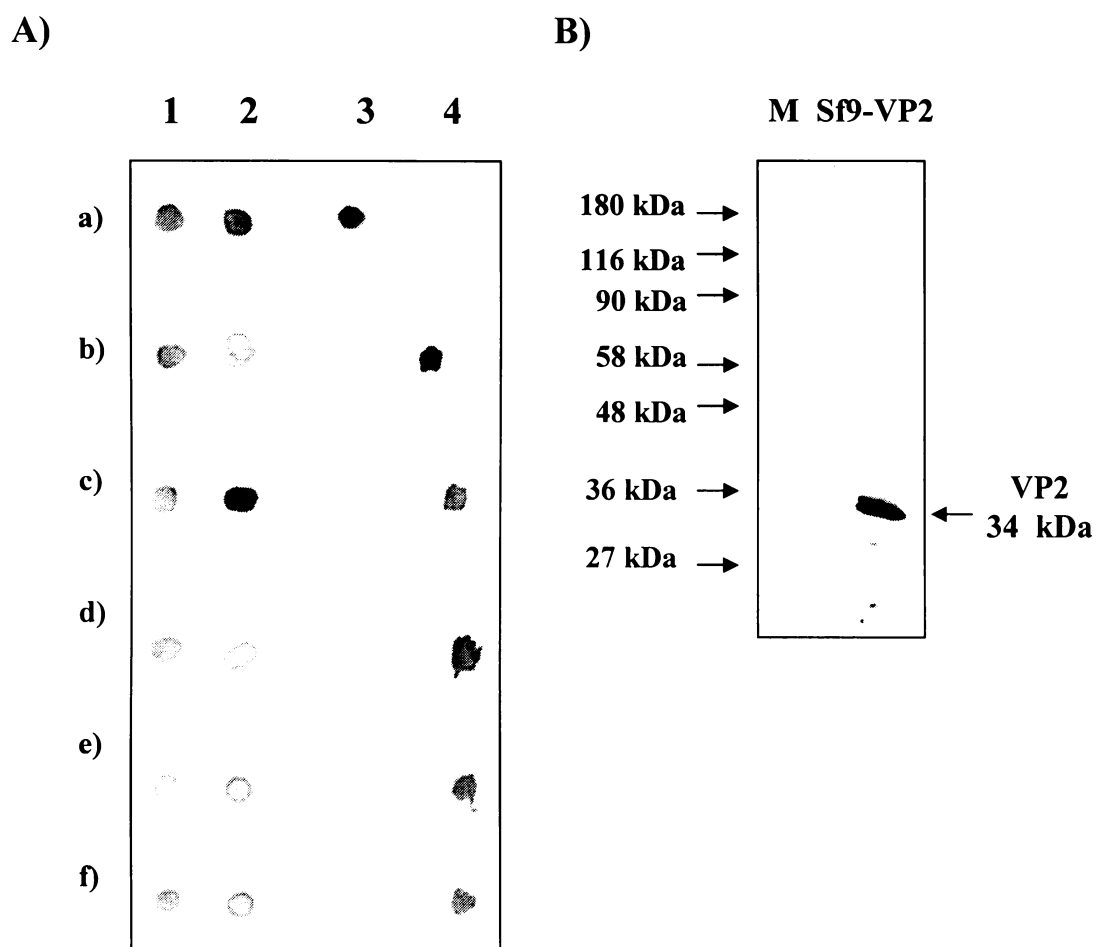
Dot blot vyvolaný a) myší monoklonální protilátkou proti VP2 (2C8) a kozí protilátkou konjugovanou s peroxidázou proti myším IgG, b) sérem po druhé imunizaci a sekundární kozí protilátkou konjugovanou s peroxidázou proti králičím IgG.



Obr. 5.9: Kontrola séra po třetí a čtvrté imunizaci.

1) - Negativní kontrola - lyzát bakterií bez expresního plazmidu, 2) - Bakteriální lyzát produkující – Trx-Histag-VP3, 3) - lyzát hmyzích buněk Sf9 infikovaných rekombinantním bakulovirem nesoucím gen pro VP2, 4) Trx-Histag-VP2 purifikovaný afinitní chromatografií

Dot blot vyvolaný a) myší monoklonální protilátkou proti VP2 (2C8) a kozí protilátkou konjugovanou s peroxidázou proti myším IgG, b) sérem po třetí imunizaci a sekundární kozí protilátkou konjugovanou s peroxidázou proti králičím IgG, c) sérem po čtvrté imunizaci a sekundární kozí protilátkou konjugovanou s peroxidázou proti králičím IgG.



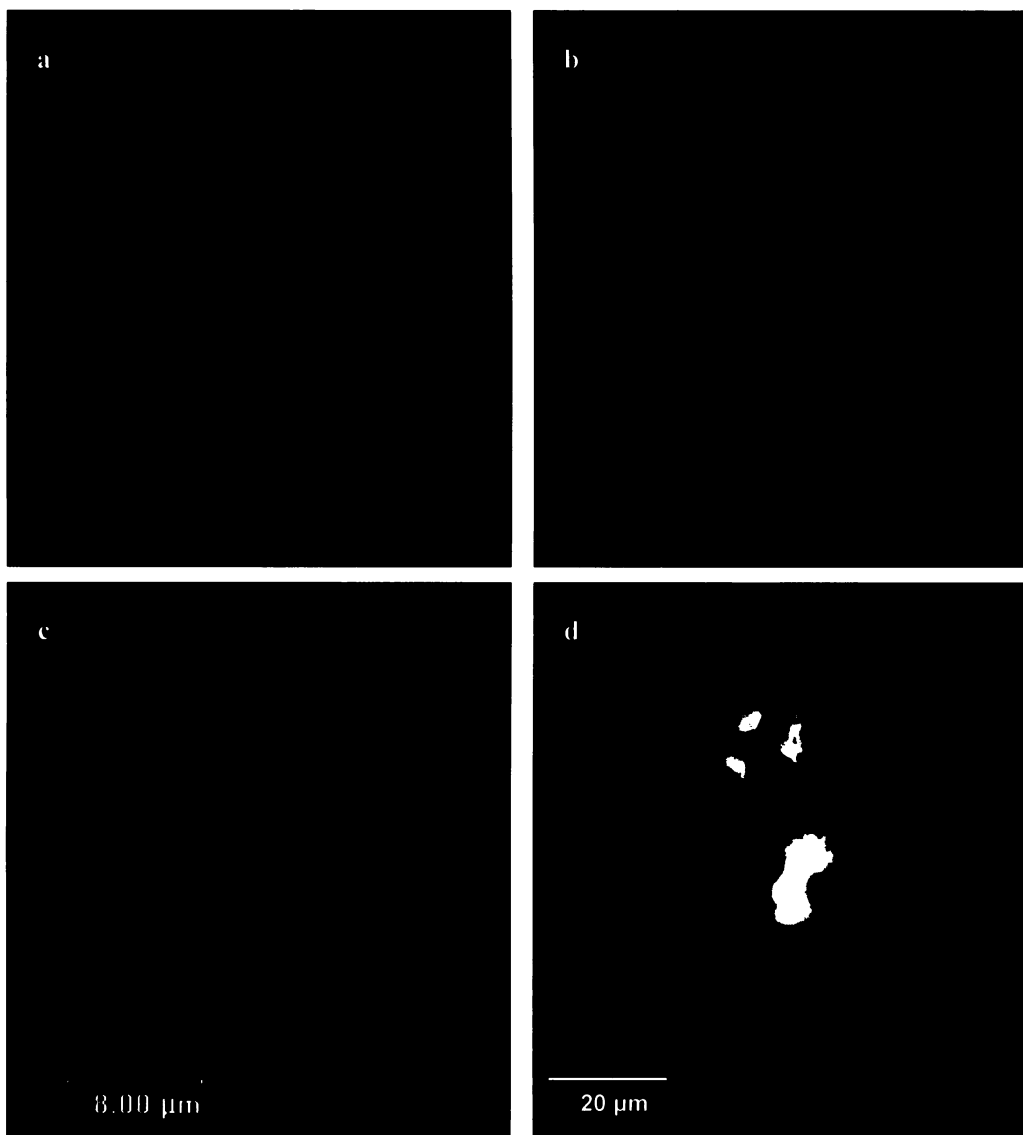
Obr. 5.10: A) Kontrola králičí polyklonální protilátky čištěné na kolonce se Sepharosou A. Dot blot vyvolaný DAB

1) – Myší polyomavirus , 2) - Virus s kapsidou rozvolněnou DTT a EGTA –, 3) – Kapsidám podobné částice složené pouze z proteinu VP1, 4) - lyzát hmyzích buněk Sf9 infikovaných rekombinantním bakulovirem pro expresi proteinu VP2

vyvoláno: primární protilátkou a) myší monoklonální proti VP1 (α VP1), b) myší monoklonální proti VP2 (2C8), c- f) testovanou králičí polyklonální protilátkou proti VP2/VP3 ředěnou c - 1:10, d - 1:100, e - 1:500 a f- 1:1000

a sekundární protilátkou konjugovanou s peroxidázou a, b) kozí proti myším IgG; c-f) kozí proti králičím IgG

B) Western blot lyzátu hmyzích buněk Sf9 infikovaných bakulovirem nesoucím gen pro VP2
M) – marker molekulových vah, Sf9-VP2) lyzát hmyzích buněk Sf9 infikovaných bakulovirem nesoucím gen pro VP2. – inkubováno s 500x ředěnou čištěnou polyklonální protilátkou proti VP2 a sekundární kozí protilátkou konjugovanou s peroxidázou proti králičím IgG.



Obr. 5.11: Testování připravené polyklonální protilátky proti VP2/V3 metodou nepřímé imunofluorescence buněk. a-c) Buňky 3T6 infikované myším polyomavirem, fixované 48 hodin pi, vybraný konfokální řez získaný konfokálním mikroskopem Leica TSC
a) protein VP1 (červeně) vyvoláno myší monoklonální protilátkou proti VP1 a sekundární kozí protilátkou Alexa Fluor 546 proti myším IgG,
b) VP2/VP3 (zeleně) vyvolané testovanou králičí protilátkou (ředěnou 1000x) a sekundární kuřecí protilátkou Alexa Fluor 488 proti králičím IgG.
c) obraz složený z a) + b). Měřítko: 8 μm
d) Dvě buňky infikované polyomavirem na pozadí neinfikovaných buněk, fixované 48 hodin pi, vyvoláno stejnými protilátkami jako v a-c + DAPI proti DNA (modře). Fotografováno na fluorescenčním mikroskopu Olympus BX 60. Měřítko: 20 μm

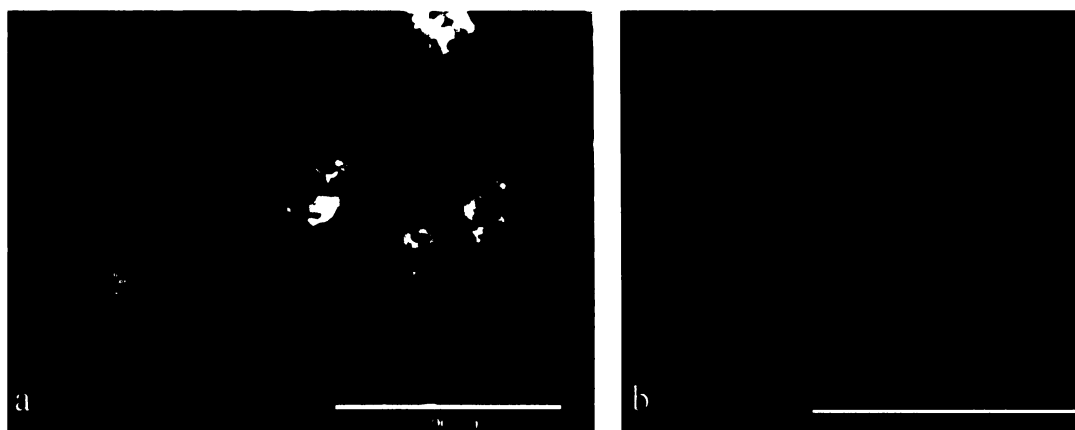
5.4. Studium interakcí minoritních proteinů nebo jejich 3'koncových částí s buňkami.

V souběžných pokusech exprese genů pro VP2 a VP3 v savčích buňkách prováděných v naší laboratoři byl pozorován silný cytotoxický účinek VP2 i VP3 na buňky v nichž jsou minoritní proteiny produkovány. Zajímalo nás, zdali cytotoxický efekt není způsoben interakcí těchto proteinů s buněčnými membránami. Jak již bylo uvedeno v literárním přehledu, virus potřebuje minoritní strukturní proteiny již ve velmi časně fázi infekce během cesty virionů od buněčné membrány k buněčnému jádru a je možné, že změnou konformace po interakci VP1 na membráně, nebo v kyselém prostředí endozómu by mohla být část minoritních proteinů uvolněna z virionu pro specifické interakce se strukturami membrán. Proto jsme chtěli zjistit zdali minoritní proteiny budou mít afinitu k buněčným membránám také pokud budou přidány z vnějšího prostředí.

5.4.1. Extracelulární přidání VP2 / VP3 proteinů k buňkám

Pro zkoumání vlivu minoritních proteinů na cytoplazmatickou membránu bylo nezbytné použít rozpustnou frakci těchto proteinů.

Frakce obsahující solubilizovanou směs proteinů Trx-Histag-VP2 a Trx-Histag-VP3 (viz kap. 5.2.2) byla přidána k buňkám 3T6 v koncentraci 20 µg/ml kultivačního media a buňky byly inkubovány 4 hodiny. Poté byly buňky fixovány a barveny protilátkou proti proteinům VP2/3. Propidium iodidem byla označena jejich jádra. Z obrázku 5.12.a je zřejmé, že přidané proteiny v mediu agregovaly do velkých shluků. Proto takto připravené proteiny nebyly použitelné pro zkoumání jejich interakce s cytoplazmatickou membránou a vlivu na buňku. Na obr. 5.12.b je konfokální řez buňkou po 4h inkubaci se samotným thioredoxinem (Trx-Histag) přidaným do media v koncentraci 10 µg /ml media. Je vidět , že samotný bakteriální thioredoxin má afinitu k buněčné membráně, i když do buněk nevstupuje.



Obr. 5.12: a) Roztok rozpustné frakce Trx-Histag-VP2 a Trx-Histag-VP3 (viz kap. 5.2.2.) koncentrace 20 μg proteinu /ml media) přidán k buňkám 3T6. Buňky byly fixovány 4 hodiny po přidání proteinů a barveny propidium iodidem proti DNA (červeně) a myší monoklonální protilátkou proti VP2/3 (zeleně) a oslí sekundární protilátkou Alexa Fluor 488 proti myším IgG. měřítko: 100 μm

b) Izolovaný bakteriální thioredoxin Trx-Histag přidán k buňkám 3T6. Buňky fixovány 4 hodiny po přidání a barveny DAPI proti DNA (modře), králičí polyklonální protilátkou proti thioredoxinu (zeleně) (naše polyklonální protilátka proti VP2/3 značí vedle VP2/3 proteinů také bakteriální thioredoxin) následovanou kuřecí sekundární protilátkou Alexa Fluor 488 proti králičím IgG; myší monoklonální protilátkou proti LAMP 2 - lyzozómům (červeně) následovanou kozí sekundární protilátkou Alexa Fluor 546 proti myší IgG. měřítko: 20 μm

5.4.2. Příprava syntetického C koncového úseku VP2/VP3

Vzhledem k velké tendenci fúzních proteinů složených z thioredoxinu a sekvencí minoritních proteinů tvořit agregáty a také proto, že samotný thioredoxin se adsorbuje na buněčné membrány, snažili jsme se pro další pokusy získat C koncovou sekvenci minoritních proteinů dobře rozpustnou ve vodném roztoku bez jiných přídavných sekvencí. Proto jsme nechali připravit posledních 35 aminokyselin společné části VP2 a VP3, které jsou konzervovány u všech známých polyomavirů a proto by v mechanismu vstupu mohli hrát důležitou roli, chemickou syntézou. Peptid C35 (9mg) připravený v Ústavu organické chemie a biochemie AVČR byl dobře rozpustný v DMSO a obsahoval sekvenci α helixu (tučně) i trakt bazických aminokyselin (kurzívou):

PDWMLPLILGLYGDITPTWATVIEEDGPQKKRRL

5.3. Zkoumání interakce buněk s extracelulárně přidaným „peptidem C35“.

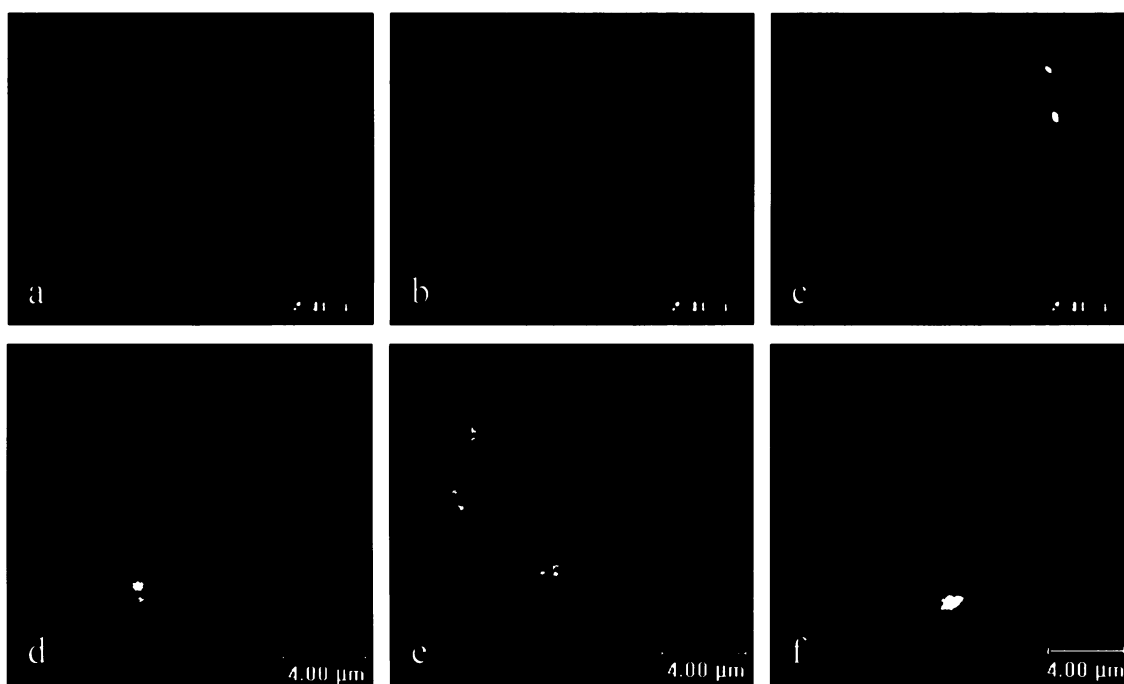
Účinky peptidu C35 na buňky byly zkoumány pomocí metody nepřímé imunofluorescence a konfokální a fluorescenční mikroskopie. K buňkám byl přidán

extracelulárně peptid C35 o koncentraci 10 mg/ml bezsérového media, buňky byly inkubovány 45 min na ledu . Poté byl roztok odstraněn a buňky promyty PBS a inkubovány v kompletním médiu při 37°C a 5% atmosféře CO₂ po různé časové intervaly (5 minut až 5hodin). Poté byly buňky fixovány a barveny protilátkami proti buněčným markerům a peptidu C35.

5.3.1. Sledování průniku „peptidu C35“ do buněk

Zajímalo nás, zdali se C koncový úsek minoritních proteinů bez thioredoxinu bude vázat na buněčné membrány, případně jimi pronikat do buněk tak jak bylo pozorováno u PTD domén. Jako buněčný marker klatrinové endocytózy byl vybrán lehký řetězec klatrinu. Fibroblasty buněčná linie 3T6 byly fixovány po 5 minutách inkubace s peptidem C35 a barveny protilátkou Con1 proti lehkému klatrinovému řetězci (červeně). Peptid C35 byl vizualizován (zeleně) námi připravenou polyklonální protilátkou proti VP2, která rozpoznávala i tento krátký C koncový epitop. Už v čase 5 minut po adsorpci byla vidět kolokalizace části populace molekul s klatrinovým markerem, což naznačovalo, že by tento peptid mohl být internalizován klatrinovou endocytózou. Kromě žlutě zbarvených bodů kolokalizace (obr. 5.13.) bylo vidět též zeleně zbarvený peptid, nejspíše na buněčném povrchu.

Protože jsme v dřívějších studiích pozorovali, že polyomavirus je internalizován monocytickými váčky obsahujícími kaveolin 1, zajímalo nás, zdali se peptid bude nacházet také v membránových doménách nebo váčcích bohatých na kaveolin. K tomuto účelu byla použita buněčná linie epiteliálních buněk NMuNG exprimující kaveolin 1 fúzovaný s EGFP. Buňky byly fixovány 5 a 15 minut po adsorpci peptidu C35 a barveny protilátkou proti VP2/3 (červeně) a zelený signál EGFP-kaveolinu 1 byl zesílen protilátkou proti EGFP (obr. 5.14). Na obr. 5.14 a-ch je vidět výrazná kolokalizace peptidu s kaveolinem 1 15 minut po adsorpci, zatímco 5 minut po adsorpci, (kdy byla vidět kolokalizace s klatrinem) peptid C35 s kaveolinem 1 nekolokalizuje (obr. 5.14 i -k). Pro ověření, zda peptid skutečně vstupuje do buněk, byl použit marker časných endozómů (EEA1), do kterých směřuje náklad jak klatrinových váček tak i kaveolových váček. Byly použity buňky 3T6. Obr. 5.15 ukazuje, že 15 minut po adsorpci je část molekul peptidu internalizována v endozomálních kompartmentech obsahujících marker časných endozómů EEA1.



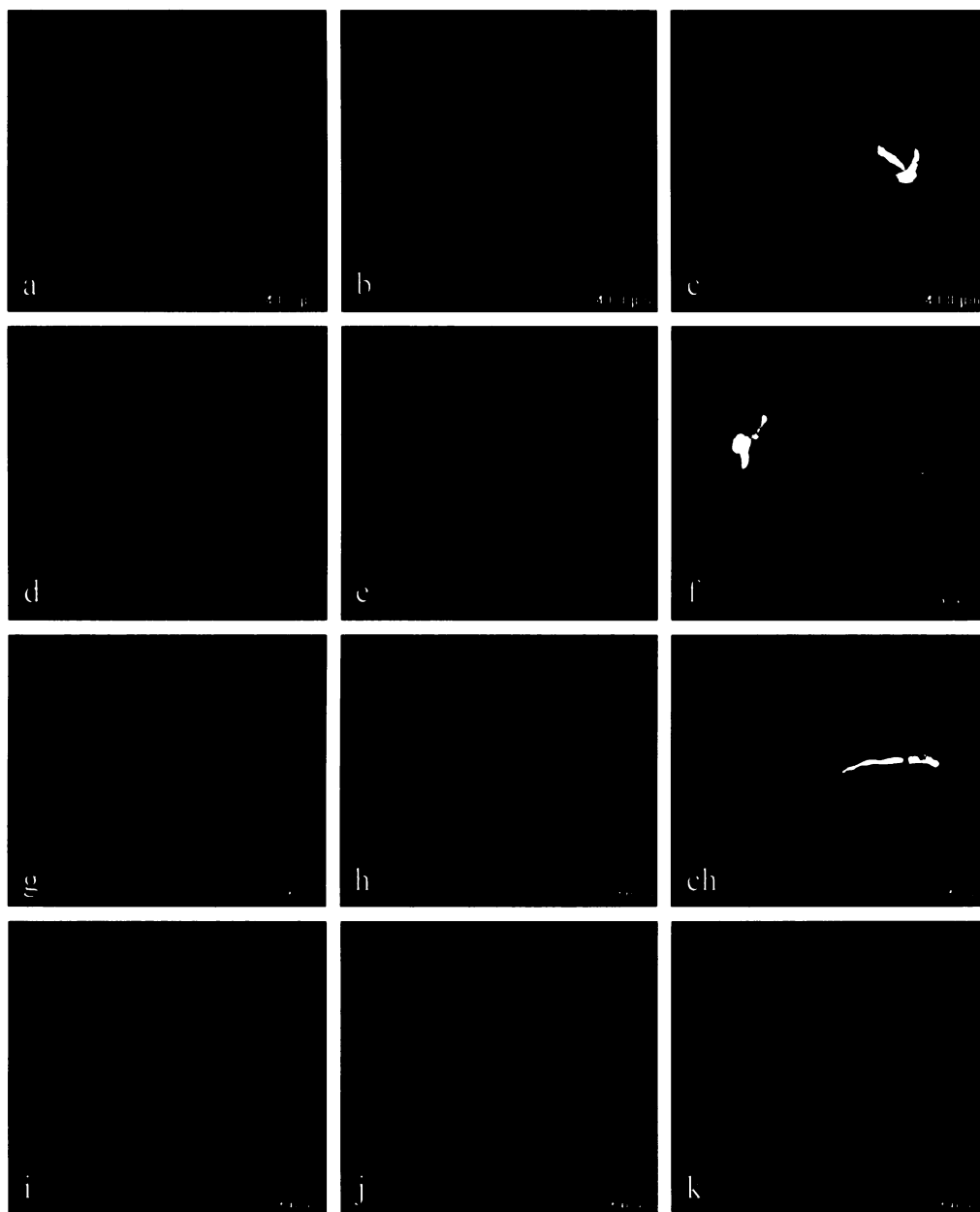
Obr. 5.13: Kolokalizace peptidu C35 s klatrinem v myších fibroblastech 3T6. Buňky byly fixovány po 5ti minutové inkubaci s peptidem C35 (koncentrace 10 μg / ml media) a barveny myší monoklonální protilátkou Con 1 – proti lehkému řetězci klatrinu (červeně) a sekundární kozí protilátkou Alexa Fluor 546 proti myším IgG; králičí polyklonální protilátkou proti VP2/VP3 – proti peptidu C35 (zeleně) a sekundární kuřecí protilátkou Alexa Fluor 488 proti králičím IgG; DAPI proti DNA (modře). Snímky byly vyfoceny konfokálním mikroskopem Leica TSC.

a, b - jednotlivé kanály obrazu „c“

c-f - vybrané konfokální řezy složených kanálů různých buněk

Část molekul peptidu C35 kolokalizuje s lehkým řetězcem klatrinu, část molekul zůstává patrně na membráně bez žlutého signálu kolokalizace.

Měřítko: 4 μm



Obr. 5.14: Kolokalizace peptidu C35 s kaveolinem 1 v myších epiteliálních buňkách NMuNG exprimující kaveolin 1 fúzovaný s EGFP. Buňky byly fixovány po 5ti a 15ti minutové inkubaci s peptidem C35 (koncentrace 10 $\mu\text{g} / \text{ml}$ media) a barveny králičí polyklonální protilátkou proti VP2/VP3 – proti peptidu C35 (červeně) a sekundární kozí protilátkou Alexa Fluor 546 proti králičím IgG; EGFP bylo po fixaci přibarveno myší monoklonální protilátkou proti EGFP (zeleně) a sekundární oslí protilátkou Alexa Fluor 488 proti myším IgG; DAPI proti DNA (modře). Snímky byly vyfoceny konfokálním mikroskopem Leica TSC.

a-ch – buňky fixované po 15ti minutové inkubaci s peptidem C35

i-k - buňky fixované po 5ti minutové inkubaci s peptidem C35

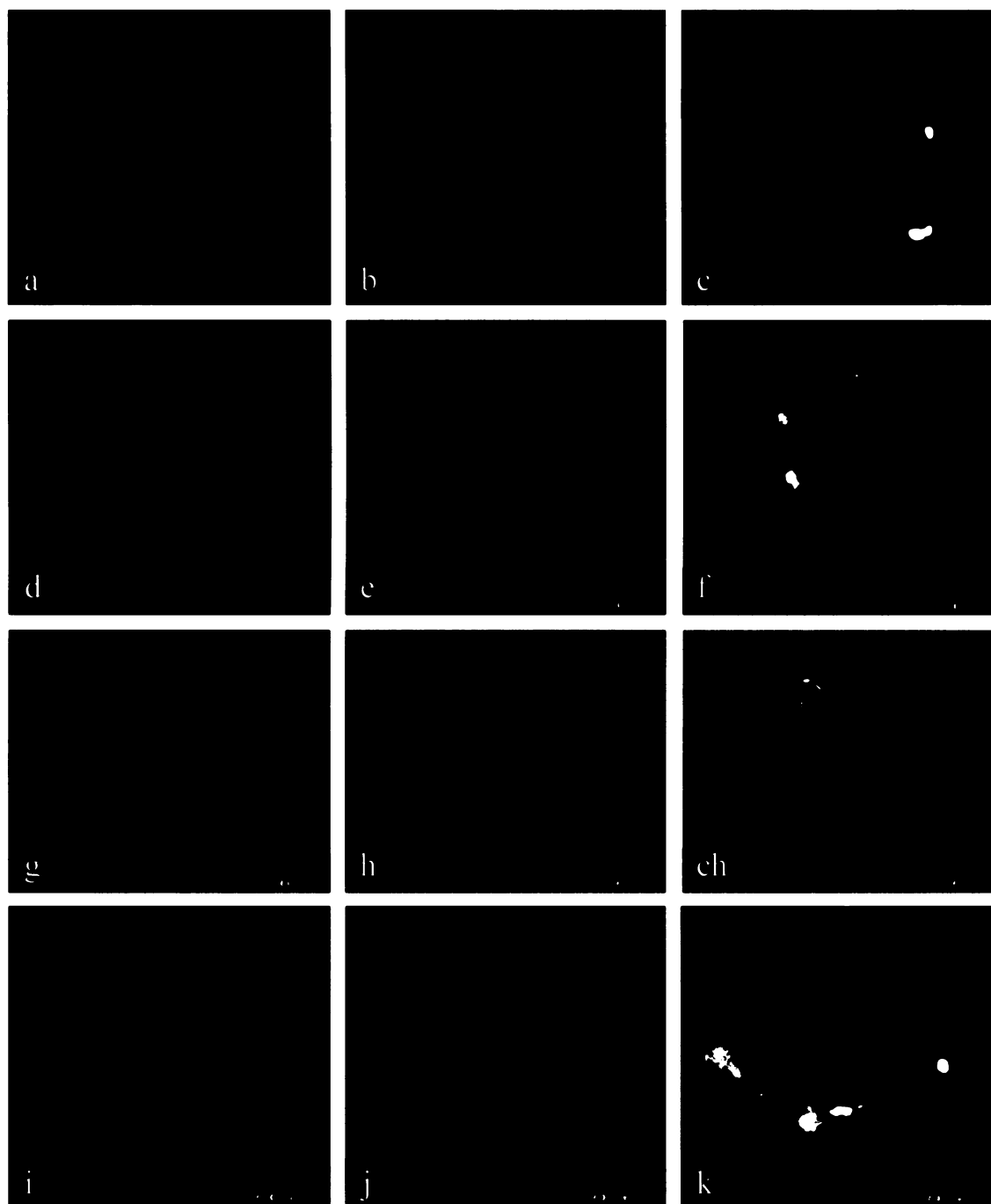
a, d, g, i – signál červeného kanálu - peptid C35

b, e, h, j - signál zeleného kanálu - kaveolinu 1 - EGFP

c, f, ch, k - vybrané konfokální řezy složených kanálů různých buněk

Peptid C35 kolokalizuje s kaveolinem 1 po 15 minutách, po krátké 5ti minutové inkubaci nebyla vidět žádná kolokalizace peptidu s kaveolinem 1 - EGFP

Měřítko: 4 μm



Obr. 5.15: Kolokalizace peptidu C35 s časnými endozómy v myších fibroblastech 3T6. Buňky byly fixovány po 15ti minutové inkubaci s peptidem C35 (koncentrace 10 μg / ml media) a barveny kozí polyklonální protilátkou proti EEA1, markeru časných endozómů (červeně) a sekundární oslí protilátkou Alexa Fluor 546 proti kozím IgG; králičí polyklonální protilátkou proti VP2/VP3 – proti peptidu C35 (zeleně) a sekundární kuřecí protilátkou Alexa Fluor 488 proti králičím IgG; DAPI proti DNA (modře). Snímky byly vyfoceny konfokálním mikroskopem Leica TSC.

a, d, g, i - signál červeného kanálu - časné endozómy

b, e, h, j - signál zeleného kanálu - peptid C35

c, f, ch, k - vybrané konfokální řezy složených kanálů různých buněk

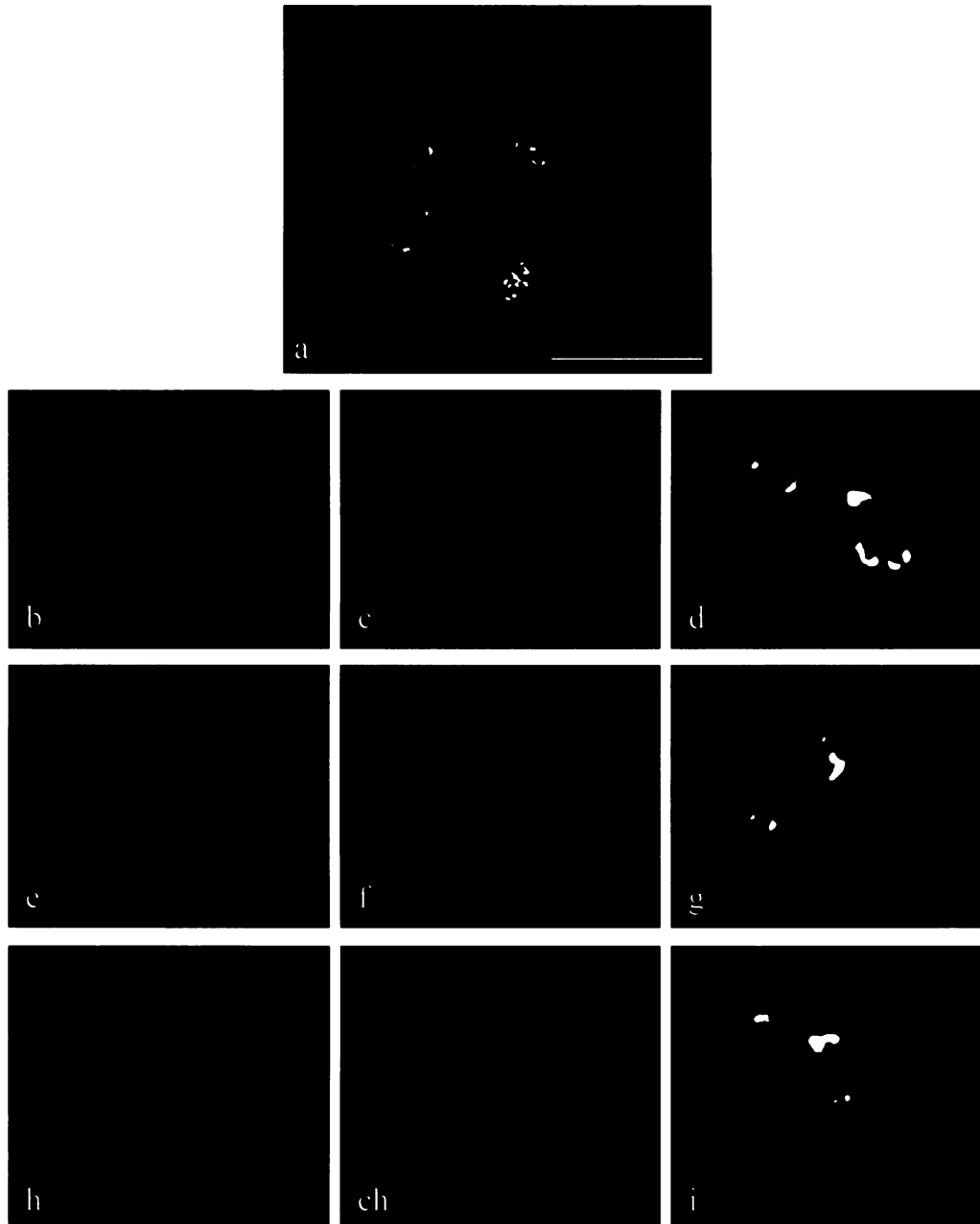
Peptid C35 kolokalizuje s časnými endozómy po 15ti minutové inkubaci buněk s peptidem.

Měřítko: 4 μm

5.6.3. Vliv „peptidu C35“ na buněčný cytoskelet

Jako další buněčné markery byly použity aktin a α tubulin v buněčné linii 3T6. 15 minut po adsorpci byla pozorována u obou cytoskeletárních proteinů částečná reorganizace cytoskeletárních vláken a tvorba prstencovitých a kulovitých útvarů, které kolokalizovaly s peptidem C35 patrně internalizovaným v endozomálních kompartmentech (obr. 5.16, 5.18, 5.19, 5.20). Shluky depolymerizovaného tubulinu byly pozorovány i v okolí jádra (obr. 5.19).

Po extracelulárním přidání peptidu C35 došlo už po hodině k úhynu buněk. U buněk, které přežili v čase 1 hod po adsorpci a déle došlo k obnovení struktury depolymerizovaných cytoskeletárních proteinů a vymizel vnitrobuněčný signál peptidu C35 kolokalizující s tubulinem a aktinem. Po jedné až pěti hodinách byl zaznamenán pouze signál nepravidelných shluků peptidu C35, který nekolokalizoval s aktinem ani tubulinem. Bude zapotřebí více buněčných markerů aby se zjistilo, zdali tento materiál je agregovaný výhradně na povrchu buněk nebo zdali se jedná o agregáty nacházející se i v buňce. (obr. 5.18).

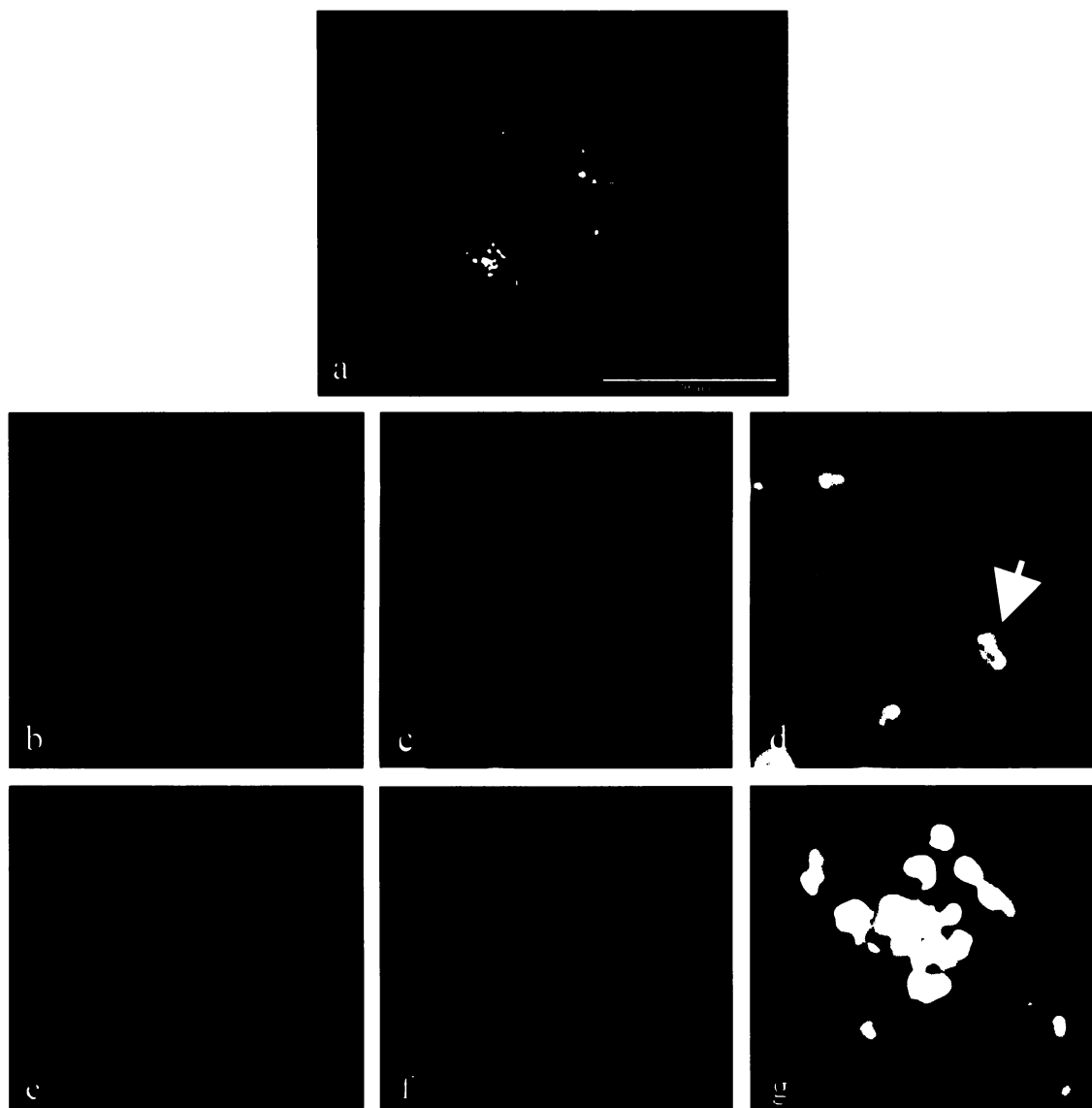


Obr. 5.16: Kolokalizace peptidu C35 s aktinem v myších fibroblastech 3T6. Buňky byly fixovány po 15ti minutové inkubaci s peptidem C35 (koncentrace 10 μg / ml media) a barveny králičí polyklonální protilátkou proti VP2/VP3 – proti peptidu C35 (zeleně) a sekundární kuřecí protilátkou Alexa Fluor 488 proti králičím IgG; faloidinem proti aktinu (červeně); DAPI proti DNA (modře). Snímky byly vyfoceny mikroskopem Olympus.

- a - složený obraz celé buňky
- b-i - vybrané detaily v buňce
- b, e, h - signál červeného kanálu - aktin
- c, f, ch - signál zeleného kanálu - peptid C35
- d, g, i - složené obrazy vybraných detailů

Po 15 minutách dochází k částečné přestavbě aktinu, který vytváří kulovité a prstencovité shluky kolokalizující s peptidem C35

Měřítko; 20 μm

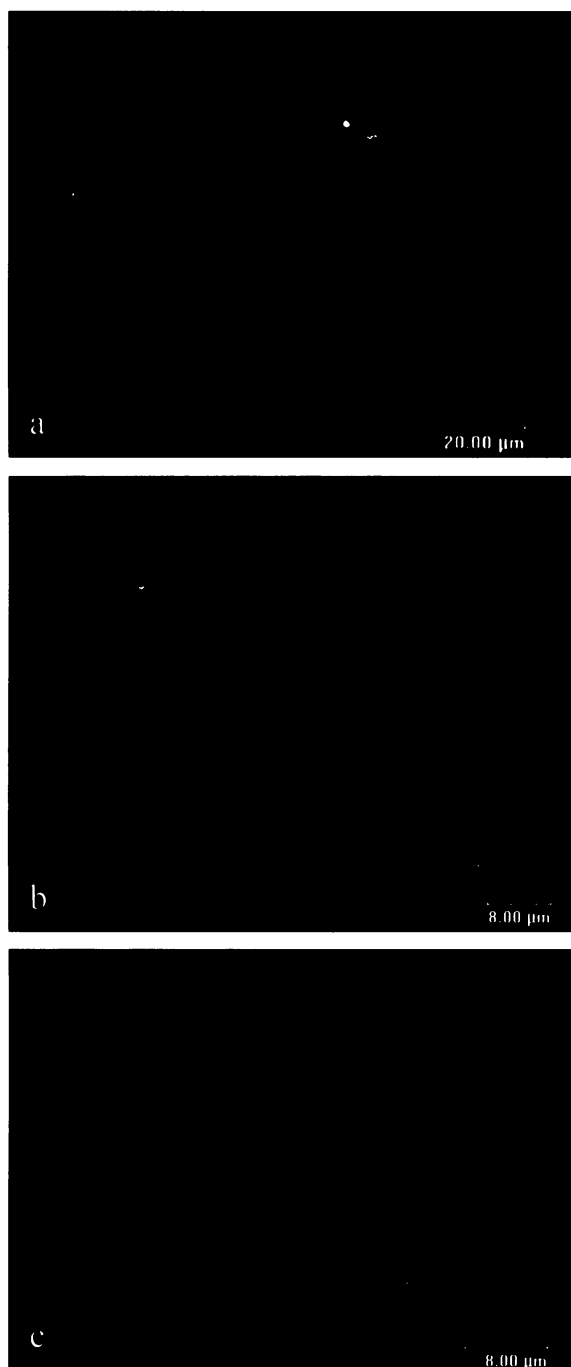


Obr. 5.17: Kolokalizace peptidu C35 s aktinem v myších fibroblastech 3T6. Buňky byly fixovány po 15ti minutové inkubaci s peptidem C35 (koncentrace 10 μg / ml media) a barveny králičí polyklonální protilátkou proti VP2/VP3 – proti peptidu C35 (zeleně) a sekundární kuřecí protilátkou Alexa Fluor 488 proti králičím IgG; faloidinem proti aktinu (červeně); DAPI proti DNA (modře). Snímky byly vyfoceny mikroskopem Olympus.

- a - složený obraz celé buňky
- b-g - vybrané detaily v buňce
- b, e - signál červeného kanálu - aktin
- c, f, - signál zeleného kanálu - peptid C35
- d, g - složené obrazy vybraných detailů

Vedle hlavního fenotypu, depolymerizovaných shluků aktinu kolokalizujících s peptidem C35, je vidět agregát peptidu C35 (označen šipkou na obr. D) v blízkosti aktinového vlákna, bez kolokalizace s depolymerizovaným aktinem.

Měřítko: 20 μm

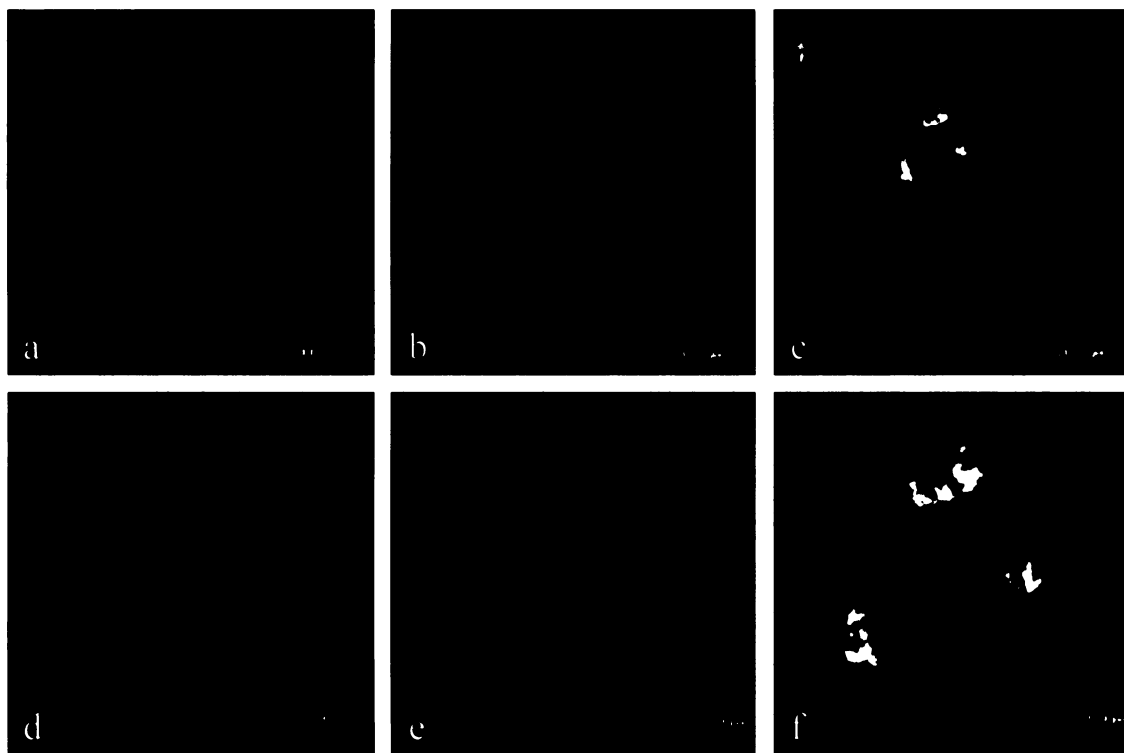


Obr. 5.18: Kolokalizace peptidu C35 s aktinem v myších fibroblastech 3T6. Buňky byly fixovány po 1, 2, a 5ti hodinové inkubaci s peptidem C35 (koncentrace 10 μg / ml media) a barveny králičí polyklonální protilátkou proti VP2/VP3 – proti peptidu C35 (zeleně) a sekundární kuřecí protilátkou Alexa Fluor 488 proti králičím IgG; faloidinem proti aktinu (červeně); DAPI proti DNA (modře). Snímky byly vyfoceny na konfokálním mikroskopu Leica TSC.

- a - 1 hodinu po přidání
- b - 2 hodinu po přidání
- c - 5 hodinu po přidání

Po 1 hodině dochází k vymizení přestavěného aktinu zpět do vláken, kulovité a prstencovité intracelulární agregáty peptidu C35 z buněk vymizí, zůstávají větší agregáty peptidu nekolokalizující s aktinem.

Měřítko: 20 μm



Obr. 5.19: Kolokalizace peptidu C35 s α tubulinem v myších fibroblastech 3T6. Buňky byly fixovány po 15ti minutové inkubaci s peptidem C35 (koncentrace 10 μg / ml media) a barveny králičí polyklonální protilátkou proti VP2/VP3 – proti peptidu C35 (zeleně) a sekundární kuřecí protilátkou Alexa Fluor 488 proti králičím IgG; myší monoklonální protilátkou TU01 proti α tubulinu (červeně) a sekundární kozí protilátkou Alexa Fluor 546 proti myším IgG; DAPI proti DNA (modře). Snímky byly vyfoceny na konfokálním mikroskopu Leica TSC.

a-c – celá buňka

d-e – vybraný detail buňky

a, d – signál červeného kanálu - tubulin

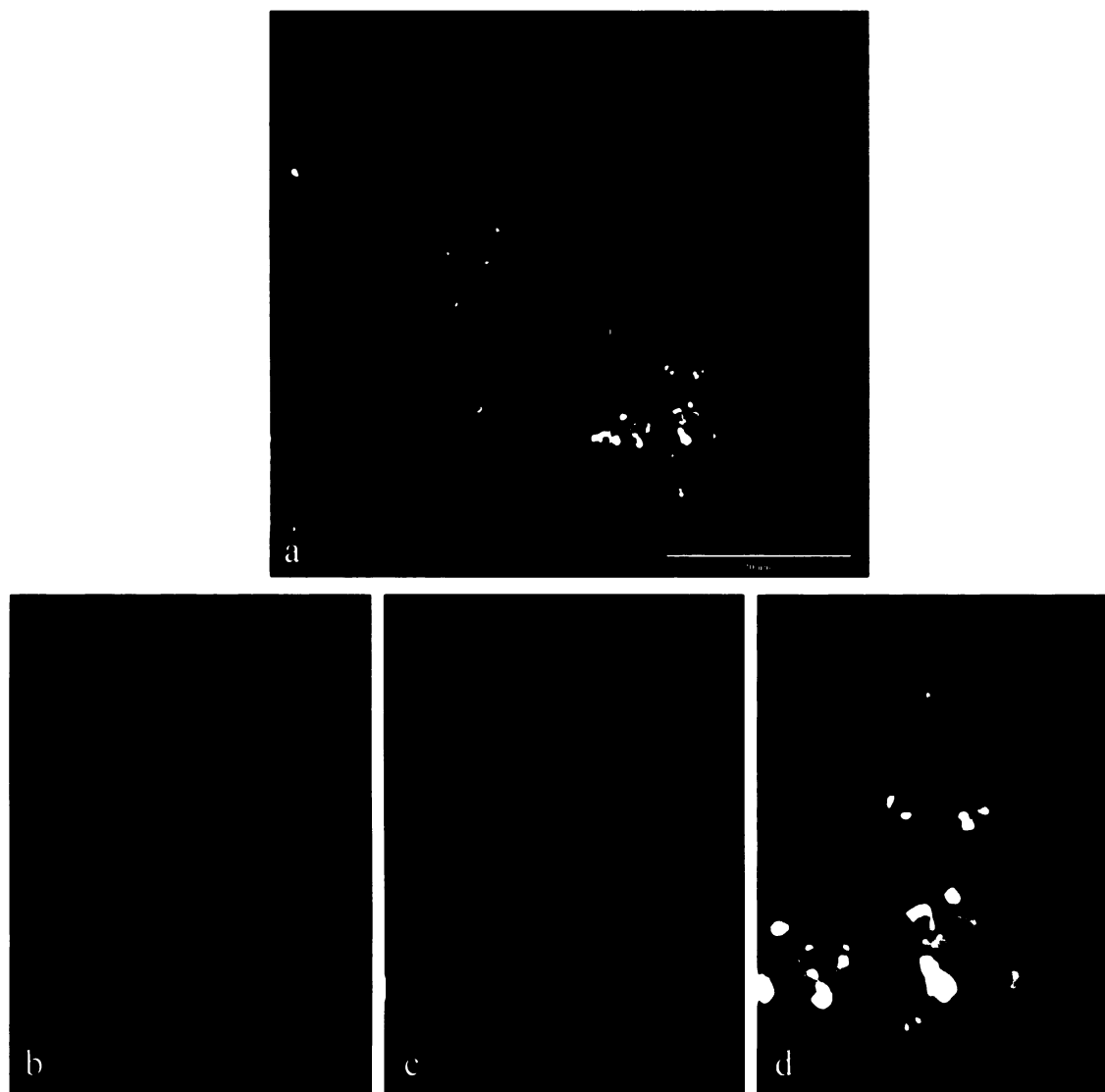
b, e – signál zeleného kanálu - peptid C35

c – složený obraz jednotlivých kanálů celé buňky

f – složený obraz jednotlivých kanálů vybraného detailu buňky

Po 15 minutách dochází k přestavbě tubulinu, který vytváří agregáty v cytoplazmě a v blízkém okolí jádra, část reorganizovaného tubulinu kolokalizuje s peptidem C35

Měřítko: 20 μm



Obr. 5.20: Kolokalizace peptidu C35 s α tubulinem v myších fibroblastech 3T6. Buňky byly fixovány po 15ti minutové inkubaci s peptidem C35 (koncentrace 10 μg / ml media) a barveny králičí polyklonální protilátkou proti VP2/VP3 – proti peptidu C35 (zeleně) a sekundární kuřecí protilátkou Alexa Fluor 488 proti králičím IgG; myší monoklonální protilátkou TU01 proti α tubulinu (červeně) a sekundární kozí protilátkou Alexa Fluor 546 proti myším IgG; DAPI proti DNA (modře). Snímky byly vyfoceny na konfokálním mikroskopu Leica TSC.

a – složený obraz jednotlivých kanálů - celá buňky

b-d – vybraný detail buňky

b – signál červeného kanálu - tubulin

c – signál zeleného kanálu - peptid C35

d – složený obraz jednotlivých kanálů vybraného detailu buňky

Po 15 minutách v buňkách, kde nedochází k vysoké depolymerizaci tubulinu se nacházejí jednotlivé prstencovité a kulovité shluky peptidu C35 kolokalizující s tubulinem.

Měřítko: 20 μm

6. DISKUZE

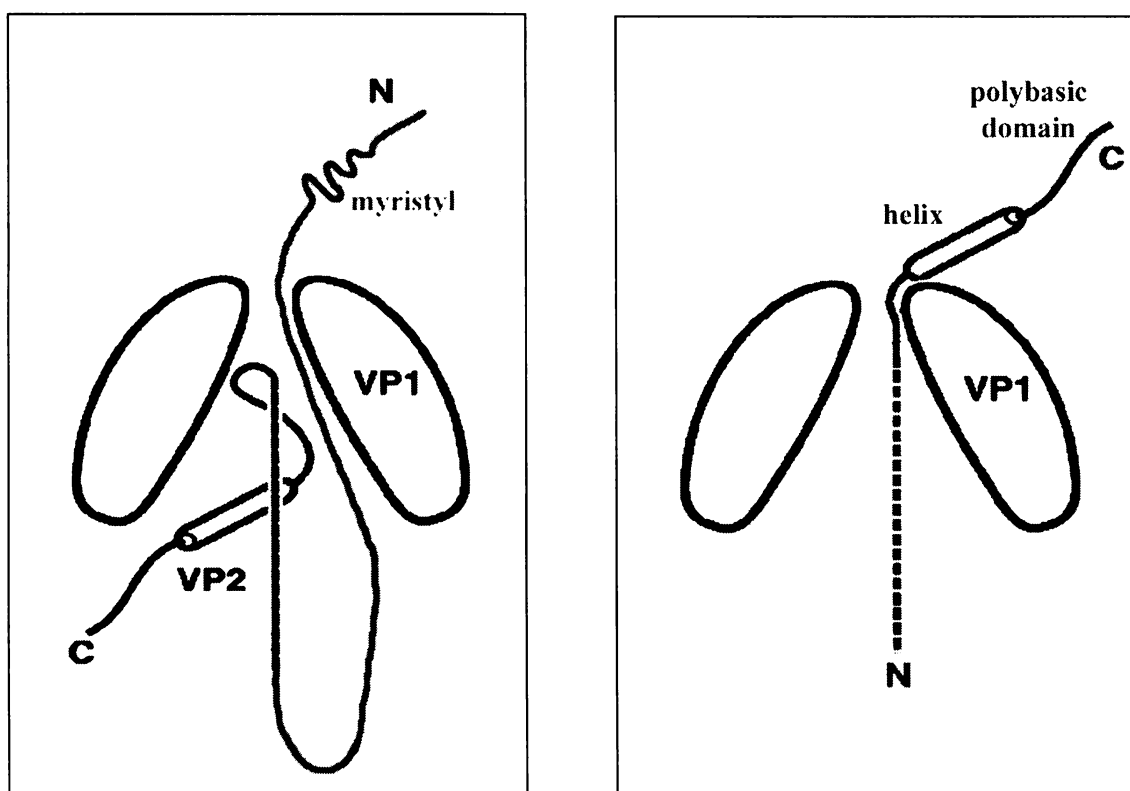
6.1. Minoritní proteiny myšího polyomaviru

Tato diplomová práce je součástí dlouhodobého výzkumu naší laboratoře zabývající se molekulárními mechanismy jednotlivých fází infekce myším polyomavirem, v poslední době zvláště způsobem vstupu virionů do buněk. V předešlých pokusech se ukázalo, že většina viru je po internalizaci sváděna přes časné endozómy do endoplazmatického retikula a odtud navedena na degradační dráhu. Zároveň bylo pozorováno, že při vyšší multiplicitě infekce, většina virionů není schopna doručit genom do jádra. Úspěšná je pouze malá část virionů a ta patrně vstupuje do buňky odlišnou cestou, než zbývající viriony odsouzené k degradaci. Jedním z faktorů ovlivňujících vstup viru do buněk jsou minoritní proteiny. Viriony postrádající proteiny VP2 a VP3 nedoručí svůj genom do jádra a i viriony obsahující pouze jeden z minoritních proteinů mají infektivitu sniženou o jeden až dva řády (Mannová *et al.* 2002).

Vstup pseudovirových partikulí (VLP) obsahující pouze protein VP1 také ukazuje na důležitost minoritních proteinů v procesu transportu genomu do jádra. VLP obsahující jen VP1 protein jsou schopné zabalit DNA kódující reportérový gen, doručit ho do jádra savčí buňky a zajistit tím jeho expresi. Doprava reportérového genu k expresi je však o několik řádů méně účinná než zajištění časné exprese viriony. Nepřítomnost minoritních proteinů může být při nejmenším částečně odpovědná za malou účinnost dopravy heterologní DNA

VLP obsahující pouze protein VP1 nepůsobí jako kompetitivní inhibitor virové infekce a smíchají-li se s virem před jeho adsorpcí v několika řádovém přebytku (AN *et al.* 1999). Přidání VLP obsahující VP1 spolu s VP2 infekci polyomaviru částečně inhibuje (ŘÍPOVÁ 2002). To znamená že VP1/VP2 částice, narozdíl od částic tvořených samotným VP1, kompetují s virem o vazebné místo. Jelikož za vazbu na sialovou kyselinu receptoru je odpovědný protein VP1 mohlo by se jednat o následnou interakci s koreceptorem. Za tuto vazbu by mohly být zodpovědné minoritní proteiny. Vazba buněčného receptoru na molekulu VP1 vyvolá změnu konformace, která navodí i změnu konformace molekul minoritních proteinů navázaných ve vnitřní dutině kapsomer (CAVALDESI *et al.* 2004). Atraktivní teorie je, že by tato konformační změna mohla vést k vysunutí N koncové části VP2 z vnitřní dutiny pentameru VP1, kde by mohla hydrofóbní myristylová skupina interagovat s membránou.

Avšak mutanty viru u kterých nebyl VP2 myristylován vstupovaly do buněk stejně účinně jako virus divokého typu a ani časná transkripce ani replikace nebyly v prvním infekčním cyklu opožděny. (MANOVÁ *et al.* 2002). Myristylace je vysoce konzervativní posttranslační úprava u všech členů čeledi polyomaviridae. Následující sekvence v N koncové oblasti obou minoritních proteinů je málo konzervativní. Proto je pravděpodobné, že pokud by došlo k vytržení N koncové části VP2, myristylová skupina by zde hrála klíčovou roli. Vzhledem k tomu, že viriony postrádající molekulu VP3 ve své kapsidě, i když obsahovaly nepoškozený VP2 protein s myristylovou skupinou mají rovněž značně sníženou infektivitu (MANOVÁ *et al.* 2002).



Obr. 6.1: Schéma hypotetického vytržení N nebo C konce molekuly VP2 z pentameru VP1.

Sekvenčí, která je důležitá pro interakce virionů, by mohl být spíše společný C konec obou proteinů. C koncová sekvence obsahuje vysoce konzervativní hydrofóbní oblast společnou širokému spektru zástupců čeledi polyomaviridae a slouží k ukotvení VP2 a VP3 do vnitřní dutiny VP1 kapsomery (CHEN *et al.* 1998). C koncových 35 aminokyselin vytvářejících na svém N konci silně hydrofóbní α helix a obsahujících na C konci sekvenci několika bazických aminokyselin, které slouží jako jaderný

lokalizační signál, připomíná svojí sekvencí primární amfipatické PTD, které mají schopnost vázat se na membrány, procházet jimi a případně je rozrušovat. Další možnost je, že se minoritní proteiny neuplatňují na buněčném povrchu, ale v některém kompartmentu po internalizaci viru.

Lze si představit, že v průběhu internalizace virionů by mohl amfipatický úsek narušit membránu endozómů, aby se částečně rozvolněný virion uvolnil do cytozolu a unikl tak před degradací, jako tomu je například u kapsidových proteinů γ „Flock house“ viru (BONG *et al.* 1999) nebo u L2 proteinu (SAPP *et al.* 2006) lidského papillomaviru, které usnadní uvolnění virionů z endocytotických váček. Nebo by C koncové úseky minoritních proteinů mohly zprostředkovat fúzi membránových váček s dalšími kompartmenty buňky, jako je tomu například u FAST proteinů reovirů (DAWE *et al.* 2002, SHMULEVITZ *et al.* 2004).

Dále by se tyto domény mohly vázat na povrch buňky a tato vazba by mohla ovlivnit další osud virionu. Bazický úsek by se mohl vázat na záporně nabitě skupiny fosfolipidů nebo záporně nabitě skupiny biopolymerů extracelulárního matrixu, jako je třeba heparansulfát. Tyto interakce byly doloženy u PTD obsahující polybazické sekvence: TAT, oligoarginin. PTD se také váže na specifické buněčné receptory (VENDEVILLE *et al.* 2004). Oba druhy vazeb zprostředkují internalizaci PTD do buněk pomocí endocytózy. Podobné interakce by mohly být virem využity pro vazbu na koreceptor, který by mohl měnit průběh endocytózy virionu.

6.2. Příprava rekombinantních plazmidů

Pro zkoumání vlivu minoritních proteinů na buňku byly připraveny rekombinantní plazmidy pET-32b nesoucí geny pro VP3 a jeho C terminální oblast pro expresi v bakteriích. Byly zhotoveny tyto konstrukty: Trx-Histag-VP3, Trx-Histag-C35 a Trx-Histag- α helix.

První klonování konstruktu Trx-Histag-C35 neproběhlo úspěšně. Sekvenování ukázalo, že v průběhu klonování došlo ke třem inzerčním mutacím v úseku 105 pb vloženého fragmentu, které posunuly čtecí rámec a vytvořili terminační kodon. Zkrácený produkt jsme nazvali Trx-Histag- α helix. V tomto produktu chyběl polybazický úsek jaderného lokalizačního signálu. Ke vzniku těchto mutací mohlo dojít v procesu PCR, i když pro amplifikaci byla použita „Vent“ polymeráza, jež má

exonukleázovou aktivitou v 3'-5' směru (tzv. korekturní aktivitu) a vznik mutací je přibližně 1 chyba na 20 tisíc bází.

Další možností je, že mutace byly zavedeny hostitelskými bakteriemi. Bakterie mohou modifikovat vloženou DNA ze dvou důvodů, mohou se zbavovat úseků s nevhodnou sekundární strukturou (například větších vlásenkových smyček). Další možnost je, že dochází k nescifické transkripci na náhodné sekvenci plazmidu připomínající promotorové místo hostitelské polymerázy a dochází k minimální expresi peptidů. Amfipatické peptidy obsahující hydrofóbní doménu napojenou na hydrofilní úsek mohou narušovat buněčnou membránu a být toxické pro hostitelskou buňku. Bylo ukázáno (KEČKEŠOVÁ 2003, BOUŘA 2004), že exprese genu VP3 je pro savčí buňky toxická. Vzhledem k tomu, že výskyt mutací nebyl pozorován u klonování celého genu pro VP3 do stejného plazmidu, jednalo se spíše o první uvedenou příčinu.

Sekvence minoritních proteinů se nakonec podařilo do plazmidu pET32b naklonovat a úspěšně v bakteriích produkovat. Protein Trx-Histag-VP3 však byl zcela nerozpustný, protein Trx-Histag-C35 se při izolaci nacházel v rozpustné i nerozpustné frakci, protein Trx-Histag- α helix byl zcela rozpustný. To ukazuje, že za nerozpustnost ve vodné fázi není zodpovědný pouze hydrofóbní úsek, ale za snížení rozpustnosti je pravděpodobně odpovědná kombinace hydrofóbní a bazické části.

Na elektroforegramu izolovaných proteinů (obr. 5.7) je vidět, že proužek náležící Trx-Histag- α helix je umístěn výše než Trx-Histag-C35 a jeví se jako větší, i když protein Trx-Histag-C35 je o 1,5 kDa větší. Různá mobilita v polyakrylamidovém gelu je často způsobena rozdílným zasolením vzorků, avšak oba fúzní produkty byly dialyzovány proti stejnému pufru (PBS). Další možností je, že došlo k takzvanému „úsměv“ efektu („smile effect“), kdy krajní vzorky na gelu se pohybují pomaleji než vzorky uprostřed a tak pruh na gelu vytvořený jednotlivými proužky proteinů o stejné velikosti není rovný nýbrž zahnutý ve tvaru úsměvu. Tím může dojít k jevu, kdy proužek o menší velikosti na kraji gelu je výše než větší proužek uprostřed gelu.

6.3. Příprava polyklonální králičí protilátky

Pro přípravu polyklonální protilátky byl jako antigen použit protein Trx-Histag-VP2. Králik byl imunizován šesti dávkami denaturovaného proteinu v SDS polyakrylamidu. Odebrané sérum bylo testováno na specifitu protilátky.

Sérum po druhé až čtvrté imunizaci obsahující polyklonální protilátku reagovalo při kontrolních dot blotech jak s lyzátem buněk Sf9 obsahujícím protein VP2, s bakteriálním lyzátem obsahujícím protein Trx-Histag-VP3, tak s kontrolním lyzátem bakterií, které nenesly expresní plazmid.

Reakce séra s bakteriálním lyzátem byla způsobena typem antigenu a jeho původem. Polyklonální protilátka je specifická jednak proti VP2/VP3 proteinům, ale také proti bakteriálnímu thioredoxinu, který nebyl z fúzního antigenu odštěpen. Dalším důvodem reakce protilátky s bakteriálním lyzátem je, že jedнокroková izolace pomocí histag kotvy není schopna zcela oddělit fúzní protein od hostitelských proteinů vážících se nespecificky na „Histrap“ kolonku. Pro získání proteinu o vysoké čistotě je nezbytné izolovaný protein dále přečistit, například pomocí kationtové výměny. Jelikož hostitelský organismus ze kterého byl antigen izolován byly prokaryotické bakterie a protilátka je produkována pro imunofluorescenční pokusy zkoumající lokalizaci viru v eukaryotické savčí buňce, nebyla absolutní čistota antigenu zcela nezbytná.

Při vysokých koncentracích mělo sérum nespecifickou afinitu k proteinům lyzátu savčích buněk. Ta byla odstraněna přečištěním séra na kolonce s proteinem A a získáním frakce obsahující pouze Ig. Nespecificky se vážící Ig byly vytěsněny na fixovaných neinfikovaných myších fibroblastech. Při použití ředění 1:500 až 1:1000 byla protilátka specifická pouze proti minoritním proteinům.

Při testování interakce králičí polyklonální protilátky s viriony metodou dot blot reagovala protilátka jak s frakcí virionů, jejichž kapsidy byly rozvolněné na kapsomery (které by měly mít alespoň některé epitopy minoritních proteinů přístupné pro protilátku), tak i s domněle intaktními viriony. Při nanesení viru na nitrocelulóзовou membránu dojde k navázání a interakci membrány s hlavním kapsidovým proteinem VP1. To patrně zapříčiní konformační změny virionu a jeho rozvolnění (David Liebl ústní sdělení), tím dojde k zpřístupnění vnitřních minoritních proteinů pro protilátku. Druhou možností je, že v použitém preparátu virionů byla subfrakce virionů částečně rozpadlých. Vzhledem k tomu, že protilátka při ředění 1:500 a 1:1000 nereagovala s VLP obsahující pouze VP1 protein nejednalo se o “cross” reakci s VP1.

Na obrázku z imunofluorescenční mikroskopie buňky fibroblastu infikované myším polyomavirem po 48 hodinách můžeme vidět signály proteinů VP1 a VP2/VP3 s rozdílnou distribucí. Na okraji jádra v okolí jaderné laminy je vidět především signál VP1 bez signálu VP2/VP3, v těchto místech dochází k hromadění sestavených virionů, které jsou označeny protilátkou proti VP1, avšak epitopy minoritních proteinů jsou před

protilátkou schovány uvnitř kapsidy. Ve středu jádra je signál především proteinů VP2/VP3 a pouze slabý signál VP1. Ve středu jádra se nacházejí převážně formující se viriony, jejichž minoritní proteiny jsou přístupné pro protilátku. Slabý signál VP1 je patrně zapříčiněn vazbou hlavního kapsidového proteinu na buněčné proteiny, které maskují epitopy pro použitou protilátku.

6.4. Extracelulární vliv peptidu C35 na buňku

Peptid C35 připravený chemickou syntézou byl přidán do média k myším fibroblastům a pomocí nepřímé imunofluorescence byla pozorována jeho interakce s buňkami. Těmito pokusy jsme získali předběžné výsledky, díky kterým se budeme moci v dalších experimentech přesněji zaměřit na tuto problematiku. Mimo jiné bude nezbytné výsledky této diplomové práce porovnat s účinky jiných, kontrolních syntetických peptidů na savčí buňku. A také připravit peptid C35 fúzovaný s EGFP pro pozorování lokalizace tohoto peptidu v živých buňkách.

Po 5 minutách inkubace peptid částečně kolokalizoval s lehkým řetězcem klatrinu, markerem klatrinové endocytózy, a po 15 minutách byla vidět kolokalizace s kaveolinem 1, markerem endocytózy zprostředkované kaveolami. To ukazuje na fakt, že peptid po navázání na buněčný povrch vstupuje do buněk endocytózou.

Je otázkou zda se peptid navazuje na určitou molekulu proteinu nebo membránového lipidu, která může sloužit myšímu polyomaviru jako koreceptor. To by potvrdilo hypotézu s vytrčením C koncové sekvence centrální dutinou pentameru VP1. Tato teorie se bude muset potvrdit dalšími pokusy, například imunoprecipitací či „pulldown“ pokusem s připravenými konstrukty Trx-Histag-C35 nebo Trx-Histag- α helix, nebo pokusy sledujícími nepřímou imunofluorescencí kolokalizaci s jednotlivými markery na povrchu buňky. Objevení tohoto koreceptoru by vedlo k dalšímu objasnění vstupu virionů myšího polyomaviru do buňky.

Jelikož peptid je pravděpodobně internalizován různými typy endocytózy, je možné, že k navázání na buněčný povrch používá také více druhů povrchových molekul, podobně jako TAT (VENDEVILLE *et al.* 2004). Při překonání membránové bariéry může peptid C35 využívat jak procesy spojené s internalizací virionů (endocytóza pomocí kaveol), tak procesy, jež jsou vlastností peptidu C35 a nejsou při internalizaci virionů využívány (klatrinová endocytóza).

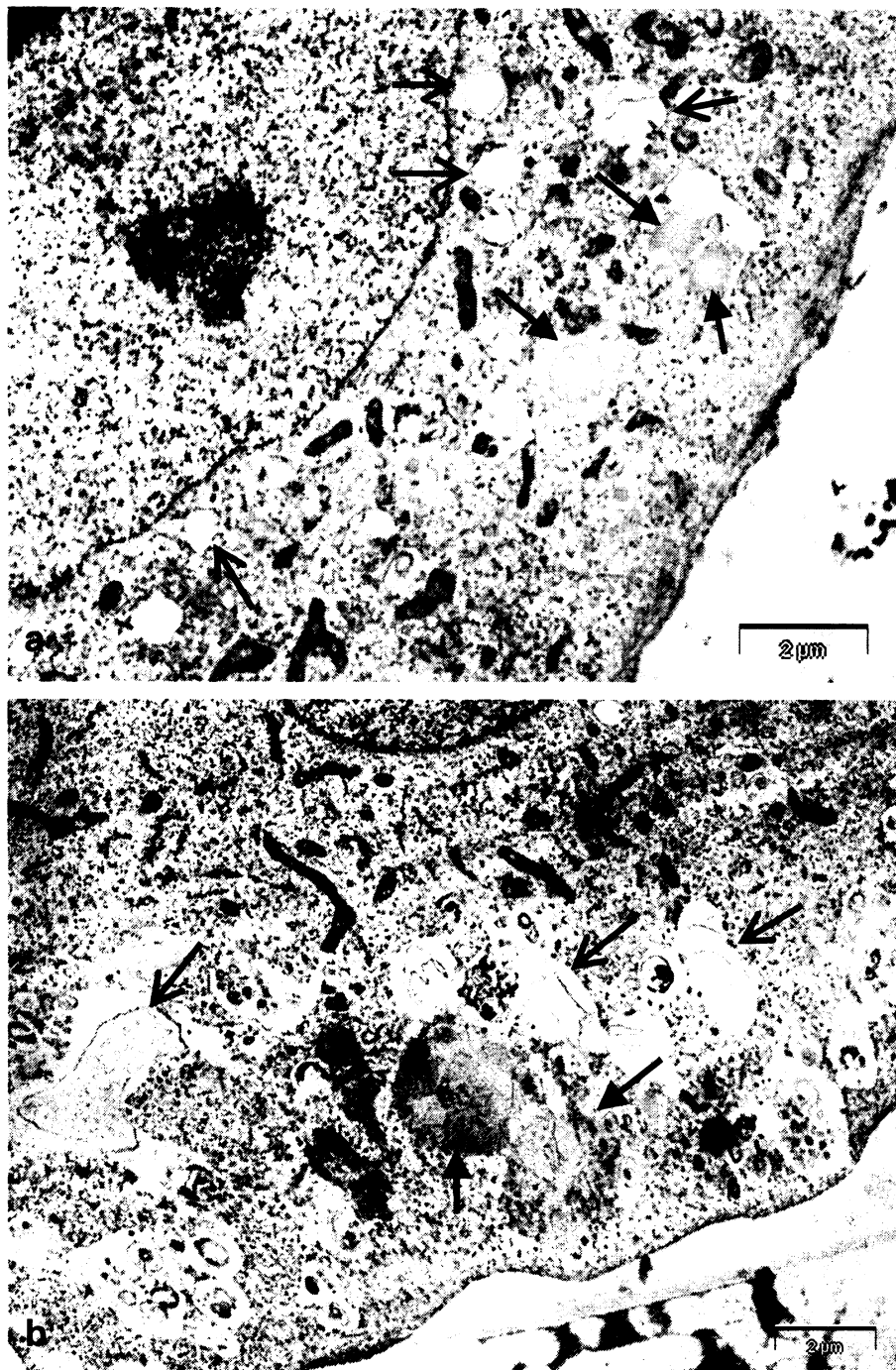
Po 15 minutách byla pozorována kolokalizace peptidu s markerem časných endozómů - EEA1. Vstup do časných endozómů je součástí jak klatrinové tak i endocytotické cesty využívající kaveoly, proto byl tento jev očekáván. Určitá frakce proteinu však v tomto čase nekolokalizovala s EEA1. Signál této frakce napovídal, že by mohlo jít o část molekul peptidu nacházejícího se na povrchu buňky, v podobě agregátů příliš velkých pro endocytózu.

Do časných endozómů vstupuje také celý polyomavirus. Jedna z hypotéz předpokládá, že virus by mohl utéci degračním procesu rozrušením endozomálních kompartmentů a uniknutím do cytozolu. Za rozrušení membrány by byly zodpovědné patrně kapsidové proteiny a změna jejich konformace indukovaná kyselým pH. Naše laboratoř ukázala, že infekce polyomavirem je závislá na nízkém pH endozómů (LIEBL *et al.* 2006). Předběžné pokusy (monitorování fluorescenčního barviva unikajícího z lipidických váček po narušení membrány) interakce peptidu C 35 s lipozómy ukázaly, že peptid C35 je schopný v nízkém pH vytvářet póry v membránách (FIŠER nepublikované výsledky).

K tvorbě pórů je nezbytná oligomerizace peptidu, která může být při vstupu viru značně omezena ukotvením jednotlivých molekul minoritních proteinů ve VP1 pentamerech, které zabraňují přiblížení a oligomerizaci minoritních proteinů. Je však možné, že jednotlivé molekuly minoritních proteinů ukotvené ve VP1 pentamerech interagují s membránou a narušují tak její stabilitu aniž by tvořili póry, virus by se poté mohl uvolnit z endozomálních váček podobně jako je tomu u lidského papillomaviru (SAPP *et al.* 2006).

Nízké pH v endozómech může kapsidu, s pozměněnou konformací po vazbě na receptor, narušit a může dojít k rozvolnění kapsidy. Minoritní proteiny uvolněné z virionů by se na membráně mohli formovat do pórů a vytvořit tak ruptury, kterými by rozvolněné viriony mohly přejít do cytozolu a poté být transportovány pomocí jaderných pórů do jádra.

V čase kdy se peptid C35 nacházel v časných endozómech bylo možno pozorovat reorganizaci aktinu a tubulinu. Oba druhy cytoskeletárních molekul se soustřeďovaly v místech výskytu C35. Signál peptidu C35 vytvářel uvnitř buňky často prstence, které kolokalizovali s aktinem a tubulinem. Je otázkou, zda frakce peptidu C35 kolokalizující s cytoskeletem s ním i přímo interaguje, nebo zda se nachází v membránovém kompartmentu, který je cytoskeletem obalen. Pravděpodobnější je druhá jmenovaná varianta. Prstencovité útvary by patrně představovali protein spojený s vnitřní stranou



Obr. 6.2 a, b: Morfologie myších fibroblastů fixovaných po 5ti hodinové inkubaci s peptidem C35. Plné šipky „→“ ukazují na kulovité agregáty v cytoplasmě vzniklé v buňkách inkubovaných s peptidem C35. Tyto útvary nebyly přítomné v negativní kontrole bez přidání peptidu. Šipky „↪“ ukazují vakuolizaci buněk, tento jev je spjatý s poškozením buněk. Vybrané snímky pořízené elektronovým mikroskopem. (ŠTOKROVA, ŽÍLA nepublikované výsledky).

membrány endozómů a opisující tak tvar endozómu. Aktin spojený s endozómy by mohl být součástí buněčné obrany. Buňka by reagovala na přítomnost peptidu na plazmatické membráně, který by endocytovala a směřovala pomocí cytoskeletu

k degradaci. Podobný jev - aktinové kroužky kolem endozómů - byl v naší laboratoři pozorován při infekci buněk polyomavirem o vysoké multiplicitě infekce (D.Liebl, F. Difato, nepublikované výsledky). To, že peptid je patrně v buňce degradován, vyplývá ze zjištění, že 1 - 5 hod po adsorpci vnitrobuněčný signál peptidu mizí a zůstává pouze signál peptidu bez pravidelného tvaru s neznámou lokalizací. Tato frakce může být agregovaný protein, který se buňce nepodařilo endocytovat, či protein který byl postupně exocytován zpět na povrch. Zvýšená degradace proteinů interagujících s membránami byla pozorována i u reovirových FAST proteinů (SHMULEVITZ *et al.* 2004).

Ztráta signálu však nemusí znamenat pouze degradaci peptidu, může také dojít k vazbě na buněčné faktory, jenž zamaskují epitopy peptidu, který se tak stane pro protilátku neviditelný. Signál peptidu C35 nebyl ani po pěti hodinách pozorován v jádře, i přesto, že nese jaderný lokalizační signál minoritních proteinů PyV. To je opačný výsledek než u „SP“ proteinu (primárního amfipatického PTD), který obsahuje nls velkého T antigenu viru SV40 a po vstupu do buněk je transportován do jádra (CHALOIN *et al.* 2001). Po extracelulárním přidání peptidu k buňkám dochází k jejich smrti. Může to být způsobeno rozsáhlým poškozením membrán, jako je tomu u amfipatických PTD a FAST proteinů (SUBBARAO *et al.* 1997, SALSMAN *et al.* 2005), nebo neschopností účinně peptid degradovat, nebo také jiným spuštěním apoptotické či nekrotické smrti buňky. Buňky, které byly fotografovány na konfokálním mikroskopu, mohli být ty, které se intracelulárního peptidu zbavily degradací, nebo jej vůbec neinternalizovaly nebo jej nějakým způsobem inaktivovaly. Po pěti hodinách byla pozorována elektronovým mikroskopem silná vakuolizace buněk vystavených účinkům C35 peptidu a také kulovité útvary, které se na kontrolních buňkách nenacházely (obr. 6.2 a, b ŠTOKROVÁ, ŽÍLA nepublikované výsledky).

Další výzkum peptidu C35 by mohl v budoucnosti přinést zajímavé poznatky o vstupu myšího polyomaviru do buňky. Pokud má peptid C35 vlastnosti PTD a je schopen překonávat membránovou bariéru nejen sám ale i fúzovaný s jinými sekvencemi proteinů a dopravovat je tak do širšího spektra buněk, mohl by být využit pro dopravu terapeutických peptidů do buněk. Ve spojení s účinnou degradací by mohl být využit jako vektor pro doručení epitopů do profesionálních antigen prezentujících buněk.

7. SOUHRN

1. Byly zkonstruovány rekombinantní plazmidy pro expresi sekvencí kódujících VP3 nebo jeho C koncové části fúzované s thioredoxinem a oligohistidinem v bakteriích:

- a) plazmid pET32-VP3
- b) plazmid pET32-C35

2. Sekvenační analýzou byl charakterizován konstrukt do jehož sekvence byly v průběhu klonování zavedeny 3 inzerční mutace tak, že vzniklý produkt obsahoval pouze prvních 17 aminokyselin (chyběl C-koncový úsek bazických aminokyselin) - pET32- α helix.

3. Zkonstruované plazmidy a plazmid pET32-VP2 (připravený Mgr E. Bouřou) byly transfekovány do bakterií BL21 a fúzní proteiny byly izolovány afinitní chromatografií. Výtěžek produkce byl přibližně 30 mg/l bakteriální kultury. Při expresi se ukázalo, že:

- a) fúzní produkty Trx-Histag-VP2 a TRX-HISTAG-VP3 byly prakticky nerozpustné v použitém lyzačním pufru a museli být izolovány v pufru obsahující 8 M močovinu
- a) fúzní produkt Trx-Histag-C35 byl částečně rozpustný
- a) fúzní produkt Trx-Histag- α helix byl dobře rozpustný

4. Protein Trx-Histag-VP2 byl použit jako antigen pro přípravu polyklonální králičí protilátky proti minoritním proteinům VP2 a VP3. Imunoglobuliny byly ze séra čištěny afinitní chromatografií a vysyceny na fixovaných neinfikovaných fibroblastech. Takto získaná protilátka byla v testech metodou Western blot a nepřímé imunofluorescence rozpoznávala specificky VP2 a VP3 sekvence a bakteriální thioredoxin.

5. Při pokusech zkoumajících vliv získaných proteinů na plazmatickou membránu buňky se ukázalo, že:

- a) malé množství Trx-Histag-VP2 proteinu izolovaného z kolonek „Histrap“ tvořilo ve vodném prostředí precipitáty
- b) samotný bakteriální thioredoxin měl afinitu k buněčné membráně, i když nevstupoval do buněk.

6. C koncová oblast proteinu VP2/VP3 (posledních 35 aminokyselin - C35) byla připravena chemickou syntézou. Peptid byl rozpustný v DMSO a poté i v DMEM, médiu pro savčí buňky.

Konfokální mikroskopie ukázala, že peptid C35:

- a) se adsorbuje na povrch buněk
- b) je buňkou internalizován klatrinovou endocytózou, ale nachází se také ve strukturách bohatých na caveolin 1
- c) objevuje se 15 minut po adsorpci v časných endozómech
- d) endocytóza peptidu indukuje přestavbu aktinového a tubulinového cytoskeletu
- e) má cytotoxický efekt na savčí buňky

7. Těmito vlastnostmi připomíná peptid C35 PTD domény

8. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

- Agirre A.**, Barco A., Carrasco L., Nieva J.L. (2002). Viroporin-mediated membrane permeabilization. Pore formation by nonstructural poliovirus 2B protein. *J Biol Chem.* 277: 40434-40441
- Aldabe R.**, Barco A., Carrasco L. (1996). Membrane permeabilization by poliovirus proteins 2B and 2BC. *J Biol Chem.* 271:23134-23137
- Alkaabi K.M.**, Yafea A., Ashraf S.S. (2005). Effect of pH on thermal- and chemical-induced denaturation of GFP. *Appl Biochem Biotechnol.* 126: 149-56
- An K.**, Gillock E.T., Sweat J.A., Reeves W.M., Consigli R.A. (1999): Use of the baculovirus system to assemble polyomavirus capsid-like particles with different polyomavirus structural proteins: analysis of the recombinant assembled capsid-like particles. *J Gen Virol.* 80: 1009-1016.
- Barco A., Carrasco L.** (1998). Identification of regions of poliovirus 2BC protein that are involved in cytotoxicity. *J Virol.* 72: 3560-3570.
- Batt D.B.**, Rapp L.M., Carmichael G.G. (1994) Splice site selection in polyomavirus late pre-mRNA processing. *J Virol.* 68: 1797-1804.
- Bong D.T.**, Janshoff A., Steinem C., Ghadiri M.R. (2000) Membrane partitioning of the cleavage peptide in flock house virus. *Biophys J.* 78: 839-845
- Bong D.T.**, Steinem C., Janshoff A., Johnson J.E., Reza Ghadiri M. (1999) A highly membrane-active peptide in Flock House virus: implications for the mechanism of nodavirus infection. *Chem Biol.* 6: 473-481
- Bonifaci N.**, Sitia R., Rubartelli A. (1995). Nuclear translocation of an exogenous fusion protein containing HIV Tat requires unfolding. *AIDS* 9: 995-1000
- Bonner G.**, Lafer E.M., and Sousa R. (1994). The thumb subdomain of T7 RNA polymerase functions to stabilize the ternary complex during processivity transcription. *J. Biol. Chem.* 269: 25129-25136
- Bonner G.**, Patra D. Lafer E.M., and Sousa R. (1992). Mutations in T7 RNA polymerase that support the proposal for a common polymerase active site structure. *EMBO J.* 11: 3767-3775
- Bonner G.**, Patra D., Lafer E. M., and Sousa R. (1992). Mutations in T7 RNA polymerase that support the proposal for a common polymerase active site structure. *EMBO J.* 11: 3767-3775
- Borgatti P.**, Zauli G., Cantley L.C., and Capitani S. (1998). Extracellular HIV-1 Tat protein induces a rapid and selective activation of protein kinase C (PKC)-alpha, and -epsilon and -zeta isoforms in PC12 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 242: 332-337
- Bouřa E.** (2004): Diplomová práce, Kat. genet. a mikrobiol. Př. F. UK, Praha
- Brugidou J.**, Legrand C., Mery J., Rabie A. (1995). The retro-inverso form of a homeobox-derived short peptide is rapidly internalised by cultured neurones: a new basis for an efficient intracellular delivery system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 214: 685-693
- Bryant M. & Ratner L.** (1990). Myristoylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1. *Proc Natl Acad Sci* 87: 523-527.
- Cavaldesi M.**, Caruso M., Sthandier O., Amati P., Garcia M.I. (2004) Conformational changes of murine polyomavirus capsid proteins induced by sialic acid binding. *J Biol Chem.* 279:41573-41579
- Cole N.C.** (1996): Polyomavirinae: The Viruses and Their Replication. In: *Fields Virology* 2. Third edition, Lippincott - Raven Publishers. Philadelphia
- Collins-Racie L.A.** (1995). Production of recombinant bovine enterokinase catalytic subunit in *Escherichia coli* using the novel secretory fusion partner DsbA. *Bio/Technology* 13: 982-987

- Collins-Racie L.A.**, McColgan J.M., Grant K.L., DiBlasio-Smith E.A., McCoy J.M., LaVallie E.R. (1995). Production of recombinant bovine enterokinase catalytic subunit in *Escherichia coli* using the novel secretory fusion partner DsbA. *Biotechnology* 13: 982-987
- Conant K.**, Ma M., Nath A., Major E.O. (1996). Extracellular human immunodeficiency virus type 1 Tat protein is associated with an increase in both NF-kappa B binding and protein kinase C activity in primary human astrocytes. *J Virol.* 70: 1384-1389
- Console S.**, Marty C., Garcia-Echeverria C., Schwendener R. and Ballmer-Hofer K. (2003). Antennapedia and HIV transactivator of transcription (TAT) 'protein transduction domains' promote endocytosis of high molecular weight cargo upon binding to cell surface glycosaminoglycans. *J. Biol. Chem.* 278: 35109–35114
- Corcoran J.A.**, Duncan R. (2004) Reptilian reovirus utilizes a small type III protein with an external myristylated amino terminus to mediate cell-cell fusion. *J Virol.* 78: 4342-51
- Corcoran J.A.**, Syvitski R., Top D., Eband R.M., Eband R.F., Jakeman D., Duncan R. (2004) Myristoylation, a protruding loop, and structural plasticity are essential features of a nonenveloped virus fusion peptide motif. *J Biol Chem.* 279: 51386-51394 B)
- Cuconati A.**, Xiang W., Lahser F., Pfister T., Wimmer E. (1998). A protein linkage map of the P2 nonstructural proteins of poliovirus. *J Virol.* 72: 1297-1307
- Day, P. M.**, C. C. Baker, D. R. Lowy, and J. T. Schiller. (2004) Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 14252-14257
- Dawe S.**, Duncan R. (2002) The S4 genome segment of baboon reovirus is bicistronic and encodes a novel fusion-associated small transmembrane protein. *J Virol.* 76: 2131-2140
- De E.**, Chaloin L., Heitz A., Mery J., Molle G., Heitz F. (2001). Conformation and ion channel properties of a five-helix Bundle protein. *J Pept Sci.* 7: 41-9
- De Jong A.S.**, Schrama I.W., Willems P.H., Galama J.M., Melchers W.J., Kuppeveld F.J. (2002). Multimerization reactions of coxsackievirus proteins 2B, 2C and 2BC: a mammalian two-hybrid analysis. *J Gen Virol.* 83: 783-793
- Den Hertog, A. L.**, H. W. Wong Fong Sang, R. Kraayenhof, J. G. Bolscher, W. Van't Hof, E. C. Veerman, and A. V. Nieuw Amerongen. (2004) Interactions of histatin 5 and histatin 5-derived peptides with liposome membranes: surface effects, translocation and permeabilization. *Biochem. J.* 379: 665-672
- Derossi D.**, Calvet S., Trembleau A., Brunissen A., Chassaing G., and Prochiantz A. (1996). Cell Internalization of the Third Helix of the Antennapedia Homeodomain Is Receptor-independent. *J. Biol. Chem.* 271: 18188–18193
- Derossi D.**, Joliot A.H., Chassaing G., Prochiantz A. (1994). The 3rd helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological-membranes. *J. Biol. Chem.* 269: 10444–10450
- Doedens J.R.**, Kirkegaard K. (1995). Inhibition of cellular protein secretion by poliovirus proteins 2B and 3A. *EMBO J.* 14: 894-907
- Elliott G.**, and **O'Hare P.** (1997) Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell* 88: 223-233
- Elmqvist A.**, Lindgren M., Bartfai T., Langel U. (2001). VE-cadherin derived cell-penetrating peptide, pVEC, with carrier functions. *Exp. Cell. Res.* 269: 237–244
- Eugenia M.**, Carrasco G. and L. (2001). Human Immunodeficiency Virus Type 1 VPU Protein Affects Sindbis Virus Glycoprotein Processing and Enhances Membrane Permeabilization *Virology* 279: 201-209

- Ewart G.D.**, Sutherland T., Gage P.W., Cox G.B. (1996). The Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 forms cation-selective ion channels. *J Virol.* 70: 7108-7115
- Fischer R.**, Kohler K., Fotin-Mleczek M. and Brock R. (2004). A stepwise dissection of the intracellular fate of cationic cell-penetrating peptides. *J. Biol. Chem.* 279: 12625–12635
- Fittipaldi A.**, Ferrari A., Zoppe M., Arcangeli C., Pellegrini V., Beltram F., Giacca M. (2003). Cell membrane lipid rafts mediate caveolar endocytosis of HIV-1 Tat fusion proteins. *J Biol Chem.* 278: 34141-34149
- fledgling disease virus capsid protein VP2. *J. Virol.*, 63: 429-431
- Foerg Ch.**, Ziegler U., Fernandez-Carneado J., Giralt E., Rennert R., Beck-Sickinger A.G., and Merkle H.P. (2005). Decoding the Entry of Two Novel Cell-Penetrating Peptides in HeLa Cells: Lipid Raft-Mediated Endocytosis and Endosomal Escape. *Biochemistry* 44: 72-81
- Forstová J.**, Krauzewicz N., Wallace S., Street A.J., Dilworth S.M., Beard S., Griffin B.E. (1993): Cooperation of structural protein during late events in the life cycle of polyomavirus. *J. Virol.*, 67: 1405-1413
- Futaki S.**, Suzuki T., Ohashi W., Yagami T., Tanaka S., Ueda K., and Sugiura Y. (2001). Arginine-rich Peptides: an Abundant Source of Membrane-Permeable Peptides Having Potential as Carriers for Intracellular Protein Delivery. *J. Biol. Chem.* 276: 5836–5840
- Gao G.**, Orlova M., Georgiadis M.M., Hendrickson W.A., and Goff S.P. (1997). Confering RNA polymerase activity to a DNA polymerase: a single residue in reverse transcriptase controls substrate selectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 407-411
- Gazit E.**, La Rocca P., Sansom M.S., Shai Y. (1998). The structure and organization within the membrane of the helices composing the pore-forming domain of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin are consistent with an "umbrella-like" structure of the pore. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95: 12289-12294
- Gazit E.**, Lee W.J., Brey P.T., Shai Y. (1994). Mode of action of the antibacterial cecropin B2: a spectrofluorometric study. *Biochemistry* 33: 10681–10692
- Gehring W.J.**, Qian Y.Q., Billeter M., Furukubo-Tokunaga K., Schier A.F., Resendez-Perez D., Affolter M., Otting G., Wuthrich K. (1994). Homeodomain-DNA recognition. *Cell.* 78: 211-223
- Goncalves E.**, Kitas E. and Seelig J. (2005). Binding of oligoarginine to membrane lipids and heparan sulfate: structural and thermodynamic characterization of a cell-penetrating peptide. *Biochemistry* 44: 2692–2702
- Green M. and Loewenstein P. M.** (1988). Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell* 55: 1179–1188
- Grice A.L.**, Kerr I.D., Sansom M.S. (1997). Ion channels formed by HIV-1 Vpu: a modelling and simulation study. *FEBS Lett.* 405: 299-305
- Grodberg J.**, Dunn J.J. (1988). ompT encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J Bacteriol.* 170: 1245-1253.
- Grossman T.H.**, Kawasaki E.S., Punreddy S.R., Osburne M.S. (1998). Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability. *Gene.* 209: 95-103
- Gutheil W.G.**, Subramanyam M., Flentke G.R., Sanford D.G., Munoz E., Huber, B.T., and Bachovchin W.W. (1994). Human immunodeficiency virus 1 Tat binds to

- dipeptidyl aminopeptidase IV (CD26): a possible mechanism for Tat's immunosuppressive activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 6594–6598
- Harriso, R.G.** (2000). Expression of soluble heterologous proteins via fusion with NusA protein. *inNovations* 11: 4–7
- Heitz F., Le Grimellec C., Mery J., Divita G., Van Mau N.** (2001). Peptides: The Wave of the Future, Proceedings of the Second International and the Seventeenth American Peptide. *Symposium, San Diego* 9: 830–831
- Chaloin L., De E., Charnet P., Molle G., Heitz F.** (1998). Ionic channels formed by a primary amphipathic peptide containing a signal peptide and a nuclear localization sequence. *Biochim Biophys Acta.* 1375: 52-60
- Chaloin L., Mery J., Van Mau N., Divita G., Heitz F.** (1999). Synthesis of a template-associated peptide designed as a transmembrane ion channel former. *J Pept Sci.* 5: 381-91
- Chaloin L., Vidal P., Lory P., Mery J., Lautredou N., Divita G., Heitz F.** (1998). Design of carrier peptide-oligonucleotide conjugates with rapid membrane translocation and nuclear localization properties. *Biochem Biophys Res Commun.* 243: 601-608
- Chen M.Y., Maldarelli F., Karczewski M.K., Willey R.L., Strebel K.** (1993). Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces degradation of CD4 in vitro: the cytoplasmic domain of CD4 contributes to Vpu sensitivity. *J Virol.* 67: 3877-3884.
- Chen X. S., Stehle, T., Harrison, S.C.**(1998): Interaction of polyomavirus internal protein VP2 with major capsid protein VP1 and implications for participation of VP2 in viral entry. *EMBO*, 17: 3233-3240
- Chesnoy S., and Huang L.** (2000). Structure and function of lipid–DNA complexes for gene delivery. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29: 27–47
inNovations 13: 8-10
- Janshoff A., Bong D.T., Steinem C., Johnson J.E., Ghadiri M.R.** (1999) An animal virus-derived peptide switches membrane morphology: possible relevance to nodaviral transfection processes. *Biochemistry.* 38: 5328-5336
- Joliot A.H., Triller A., Volovitch M., Pernelle C., Prochiantz A.** (1991). alpha-2,8-Polysialic acid is the neuronal surface receptor of antennapedia homeobox peptide. *New Biol.* 3: 1121–1134
- Kamper N., Day P.M., Nowak T., Selinka H.C., Florin L., Bolscher J., Hilbig L., Schiller J.T., Sapp M.** (2006) A membrane-destabilizing peptide in capsid protein L2 is required for egress of papillomavirus genomes from endosomes. *J Virol.* 80: 759-768
- Kaplan I. M., Wadia J. S. and Dowdy S. F.** (2005). Cationic TAT peptide transduction domain enters cells by macropinocytosis. *J. Control Release* 102: 247–253
- Kečkěšová Z.** (2003): Diplomová práce, Kat. genet. a mikrobiol. Př. F. UK, Praha
- Kelley K.C., Huestis K.J., Austen D.A., Sanderson C.T., Donoghue M.A., Stickel S.K., Kawasaki E.S., Osburne M.S.** (1995). Regulation of sCD4-183 gene expression from phage-T7-based vectors in *Escherichia coli*. *Gene* 156: 33-36
- Kerkau T., Bacik I., Bennink J.R., Yewdell J.W., Hunig T., Schimpl A., Schubert U.** (1997). The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpu protein interferes with an early step in the biosynthesis of major histocompatibility complex (MHC) class I molecules. *J Exp Med.*;185: 1295-1305.
- Khachatourians G.G., Paterson M.C., Sheehy R.J., Dorp B.V., Worthy T.E.** (1975). DNA degradation in minicells of *Escherichia coli* K-12. II. Effect of recA1 and recB21 mutations on DNA degradation in minicells and detection of exonuclease V activity. *Mol Gen Genet.* 138: 179-192

- Kilk K.**, Magzoub M., Pooga M., Eriksson L.E., Langel U., Graslund A. (2001). Cellular internalization of a cargo complex with a novel peptide derived from the third helix of the islet-1 homeodomain. Comparison with the penetratin peptide. *Bioconjug Chem.* 12:911-916
- Krauzewicz N.**, Streuli C.H., Stuart-Smith N., Jones M.D., Wallace S., Griffin B.E. (1990): Myristylated Polyomavirus VP2: Role in the life cycle of the virus. *J. Virol.*, 64: 4414-4420
- Koppelhus U.**, Awasthi S.K., Zachar V., Holst H.U., Ebbesen P., Nielsen P.E. (2002). Cell-dependent differential cellular uptake of PNA, peptides, and PNA-peptide conjugates. *Antisense Nucl. Acid Drug Dev.* 12: 51–63
- Kuppeveld F.J.**, Melchers W.J., Willems P.H., Gadella T.W. Jr. (2002). Homomultimerization of the coxsackievirus 2B protein in living cells visualized by fluorescence resonance energy transfer microscopy. *J Virol.* 76: 9446-9456.
- Lama J., Carrasco L.** (1992). Expression of poliovirus nonstructural proteins in *Escherichia coli* cells. Modification of membrane permeability induced by 2B and 3A. *J Biol Chem.* 267: 15932-15937.
- Lamb R.A., Pinto L.H.** (1997). Do Vpu and Vpr of human immunodeficiency virus type 1 and NB of influenza B virus have ion channel activities in the viral life cycles *Virology.* 229: 1-11
- Langel U.** (2002). *Cell-Penetrating Peptides: Processes and Applications*, CRC Press: Boca Raton
- LaVallie E.R.**, DiBlasio E.A., Kovacic S., Grant K.L., Schendel P.F. and McCoy J.M. (1993). A thioredoxin gene fusion system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Bio/Technology* 11: 187–193
- Lehninger A.L.**, Nelson D.L., Cox M.M (2000) *Lehninger Principles of Biochemistry* (3rd edition) Worth Publishers: New York
- Li M.**, Delos S. E., Montross L., Garcea R.L. (1995): Polyomavirus VP1 phosphorylation: Coexpression with the VP2 capsid protein modulates VP1 phosphorylation in Sf9 insect cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92: 5992-5996
- Liebl D.**, Difato F., Hornikova L., Mannova P., Stokrova J., Forstova J. (2006) Mouse polyomavirus enters early endosomes, requires their acidic pH for productive infection, and meets transferrin cargo in Rab11-positive endosomes. *J Virol.* 80:4610-4622.
- Liljestrom P.**, Garoff H. (1991). Internally located cleavable signal sequences direct the formation of Semliki Forest virus membrane proteins from a polyprotein precursor. *J Virol.* 65: 147-154.
- Lin Q.**, Jo D., Gebre-Amlak K.D., Ruley H.E. (2004). Enhanced cell-permeant Cre protein for site-specific recombination in cultured cells. *BMC Biotechnol.* 4: 25-29
- Lindberg M., Graslund A.** (2001). The position of the cell penetrating peptide penetratin in SDS micelles determined by NMR. *FEBS Lett.* 497: 39–44
- Liu Y.**, Jones M., Hingtgen C.M., Bu G., Laribee N., Tanzi R.E., Moir R.D., Nath A., and He J.J. (2000). Uptake of HIV-1 Tat protein mediated by low-density lipoprotein receptor-related protein disrupts the neuronal metabolic balance of the receptor ligands. *Nat. Med.* 6: 1380–1387
- Long A.C.**, Orr D.C., Cameron J.M., Dunn B.M., Kay J. (1989). A consensus sequence for substrate hydrolysis by rhinovirus 3C proteinase. *FEBS Lett.* 258:75-78.
- Loret E.P.**, Vives E., Ho P.S., Rochat H., Van Rietschoten J., Johnson W.C. Jr. (1991). Activating region of HIV-1 Tat protein: vacuum UV circular dichroism and energy minimization. *Biochemistry.* 30: 6013-6023
- Lundberg M.**, Johansson M. (2002). Positively charged DNA-binding proteins cause apparent cell membrane translocation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291: 367–371.

- Lundberg M.**, Wikstrom S., and Johansson M. (2003). Cell Surface Adherence and Endocytosis of Protein Transduction Domains. *Molecular Therapy* 8: 1525-1528
- Lusa S.**, Garoff H. and Lueström P. (1991). Fate of the 6K membrane protein of semliki forest virus during virus assembly *Virology* 185: 843-846
- Mallard F.**, Antony C., Tenza D., Salamero J., Goud B., and Johannes L. (1998). Direct pathway from early/recycling endosomes to the Golgi apparatus revealed through the study of shiga toxin B-fragment transport. *J. Cell Biol.* 143: 973–990
- Mann D.A.**, and Frankel A.D. (1991). Endocytosis and targeting of exogenous HIV-1 Tat protein. *EMBO J.* 10: 1733–1739
- Mannová P.**, Liebl D., Krauzewicz N., Fejtová A., Štokrová J., Palková Z, Griffin B.E. and J. Forstová (2002): Analysis of mouse polyomavirus mutants with lesions in the minor capsid proteins. *J. Gen. Virol.* 83: 2309-2319
- Margottin F.**, Bour S.P., Durand H., Selig L., Benichou S., Richard V., Thomas D., Strebel K., Benarous R. (1998) A novel human WD protein, h-beta TrCp, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif. *Mol Cell.* 1:565-574.
- Martín-Belmonte F.**, Lopez-Guerrero J. A., Carrasco L. & Alonso M. A. (2000). The amino-terminal nine amino acid sequence of poliovirus capsid VP4 protein is sufficient to confer N-myristoylation and targeting to detergent-insoluble membranes. *Biochemistry* 39: 1083-1090
- Melton J.V.**, Ewart G.D., Weir R.C., Board P.G., Lee E., Gage P.W. (2002). Alphavirus 6K proteins form ion channels. *J Biol Chem.* 277: 46923-46931
- Mitchell D.J.**, Kim D.T., Steinman L., Fathman C.G., Rothbard J.B. (2000). Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic Homopolymers. *J. Pept. Res.* 56: 318–325.
- Moffatt B.A.** and Studier F.W. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189: 113–130
- Morris M.C.**, Depollier J., Mery J., Heitz F., Divita G. (2001) A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. *Nat Biotechnol.* 19:1173-1176.
- Morris M.C.**, Vidal P., Chaloin L., Heitz F., Divita G. (1997). A new peptide vector for efficient delivery of oligonucleotides into mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 25: 2730–2736.
- Muller D.K.**, Martin C.T. and Coleman J.E. (1988). Processivity of proteolytically modified forms of T7 RNA polymerase. *Biochemistry* 27: 5763-5771
- Nagahara H.**, Vocero-Akbani A.M., Snyder E.L., Ho A., Latham D.G., Lissy N.A., Becker-Hapak M., Ezhevsky S.A., and Dowdy S.F. (1998). Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells: TAT-p27^{Kip1} induces cell migration. *Nat. Med.* 4: 1449–1452
- Nakase I.**, Niwa M., Takeuchi T., Sonomura K., Kawabata N., Koike Y. (2004). Cellular uptake of arginine-rich peptides: roles for macropinocytosis and actin rearrangement. *Mol. Ther* 10: 1011–1022
- Neznanov N.**, Kondratova A., Chumakov K.M., Angres B., Zhumabayeva B., Agol V.I., Gudkov A.V. (2001). Poliovirus protein 3A inhibits tumor necrosis factor (TNF)-induced apoptosis by eliminating the TNF receptor from the cell surface. *J Virol.* 75: 10409-10420
- Niidome T.**, Ohmori N., Ichinose A., Wada A., Mihara H., Hirayama T., Aoyagi H. (1997). Binding of cationic alpha-helical peptides to plasmid DNA and their gene transfer abilities into cells. *J Biol Chem.* 272: 15307-15312.

- Niidome T.**, Takaji K., Urakawa M., Ohmori N., Wada A., Hirayama T., Aoyagi H. (199). Chain length of cationic alpha-helical peptide sufficient for gene delivery into cells. *Bioconjug Chem.* 10: 773-780.
- Novy R.**, Drott D., Yaeger K., Mierendorf R. (2001). Overcoming the codon bias of *E.coli* for enhanced protein expression. *inNovations* 12:1-3
- Novy, R.** and Morris, B. (2001). Use of glucose to control basal expression in the pET System.
- Oehlke J.**, Krause E., Wiesner B., Beyermann M., Bienert M. (1997). Extensive cellular uptake into endothelial cells of an amphipathic beta-sheet forming peptide. *FEBS Lett.* 415: 196–199
- Oehlke J.**, Scheller A., Wiesner B., Krause E., Beyermann M., Klauschenz E., Melzig M., Bienert M. (1998). Cellular uptake of an alpha-helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior nonendocytically. *Biochim. Biophys. Acta* 1414: 127–139
- Peitzsch R.M., McLaughlin S.** (1993) Binding of acylated peptides and fatty acids to phospholipid vesicles: pertinence to myristoylated proteins. *Biochemistry* 32: 10436-10443
- Pichon C.**, Monsigny M., and Roche A.C. (1999). Intracellular localization of oligonucleotides: influence of fixative protocols. *Antisense Nucleic Acid Drug DeV.* 9: 89-93
- Pinto L.H.**, Dieckmann G.R., Gandhi C.S., Papworth C.G., Braman J., Shaughnessy M.A., Lear J.D., Lamb R.A., DeGrado W.F. (1997). A functionally defined model for the M2 proton channel of influenza A virus suggests a mechanism for its ion selectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94: 11301-11306
- Pontus L.**, U. lo Langel (2003). A brief introduction to cell-penetrating peptides. *J Mol Recognit.* 16: 227-233
- Pooga M.**, Soomets U., Hallbrink M., Valkna A., Saar K., Rezaei K., Kahl U., Hao J.X., Xu X.J., Wiesenfeld-Hallin Z., Hokfelt T., Bartfai T., and Langel U. (1998). Cell penetrating PNA constructs regulate galanin receptor levels and modify pain transmission in vivo. *Nat. Biotechnol.* 16: 857–861
- Potocky T. B.**, Menon A. K. and Gellman S. H. (2003). Cytoplasmic and nuclear delivery of a TAT-derived peptide and a beta-peptide after endocytic uptake into HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 278: 50188–50194
- Pouny Y.**, Rapaport D., Mor A., Nicolas P., Shai Y. (1992). Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes. *Biochemistry* 31(49): 12416–12423.
- Ratts R.**, Zeng H., Berg E.A., Blue C., McComb M.E., Costello C.E., vander-Spek J.C., and Murphy J.R. (2003). The cytosolic entry of diphtheria toxin catalytic domain requires a host cell cytosolic translocation factor complex. *J. Cell Biol.* 160: 1139–1150
- Rein A.**, McClure M. R., Rice N. R., Luftig R. B. & Schultz A. M. (1986). Myristylation site in Pr65gag is essential for virus particle formation by Moloney murine leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci* 83: 7246-7250.
- Resh MD.**(1999): Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1999 1451:1-16
- Richard J. P.**, Melikov K., Brooks H., Prevot P., Lebleu B. and Chernomordik L. V. (2005). Cellular uptake of unconjugated TAT peptide involves clathrin-dependent endocytosis and heparan sulfate receptors. *J. Biol. Chem.* 280: 15300–15306
- Richard J.P.**, Melikov K., Vives E., Ramos C., Verbeure B., Gait M.J., Chernomordik L.V., Lebleu B. (2003). Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J Biol Chem.* 278: 585-590

- Richterova Z.**, Liebl D., Horak M., Palkova Z., Stokrova J., Hozak P., Korb J., Forstova J. (2001) Caveolae are involved in the trafficking of mouse polyomavirus virions and artificial VP1 pseudocapsids toward cell nuclei. *J Virol.* 75: 10880-10891
- Rittner K.**, Benavente A., Bompard-Sorlet A., Heitz F., Divita G., Brasseur R., Jacobs E. (2002). New basic membrane-destabilizing peptides for plasmid-based gene delivery in vitro and in vivo. *Mol Ther.* 5: 104-114.
- Rosenberg A.H.**, Lade B.N., Chui D., Lin S., Dunn J.J., and Studier F.W. (1987). Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene* 56: 125–135
- Rothbard J.B.**, Garlington S., Lin Q., Kirschberg T., Kreider E., McGrane P.L., Wender P.A., Khavari P.A. (2000). Conjugation of arginine oligomers to cyclosporin A facilitates topical delivery and inhibition of inflammation. *Nat. Med.* 6: 1253–1257
- Řípková K.** (2002) Diplomová práce, Kat. genet. a mikrobiol. Př. F. UK, Praha
- Sahli R.**, Freund R., Dubensky T., Garcea R., Bronson R., Benjamin T. (1993). Defects in entry and altered pathogenicity of polyoma virus mutant blocked in VP2 myristylation. *Virology*, 192: 142-153
- Salsman J.**, Top D., Boutilier J., Duncan R. (2005) Extensive syncytium formation mediated by the reovirus FAST proteins triggers apoptosis-induced membrane instability. *J Virol.* 79: 8090-8100
- Sambrook J.**, Fritsch E.F. and Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanz M.A.**, Carrasco L. (2001). Sindbis virus variant with a deletion in the 6K gene shows defects in glycoprotein processing and trafficking: lack of complementation by a wild-type 6K gene in trans. *J Virol.* 75: 7778-7784.
- Sanz M.A.**, Madan V., Carrasco L., Nieva J.L. (2003). Interfacial domains in Sindbis virus 6K protein. Detection and functional characterization. *J Biol Chem.* 278: 2051-2057
- Shmulevitz M.**, Corcoran J., Salsman J., Duncan R. (2004) Cell-cell fusion induced by the avian reovirus membrane fusion protein is regulated by protein degradation. *J Virol.* 78: 5996-6004.
- Schmidt M.**, Muller H., Schmidt M.F., Rott R. (1989): Myristylation of budgerigar
- Schmidt M.C.**, Rothen-Rutishauser B., Rist B., Beck-Sickinger A., Wunderli-Allenspach H., Rubas W., Sadee W., Merkle H.P. (1998). Translocation of human calcitonin in respiratory nasal epithelium is associated with self-assembly in lipid membrane. *Biochemistry.* 37: 16582-16590.
- Schneemann A.**, Zhong W., Gallagher T.M., Rueckert R.R. (1992) Maturation cleavage required for infectivity of a nodavirus. *J Virol.* 66: 6728-6734
- Schubert U.**, Bour S., Ferrer-Montiel A.V., Montal M., Maldarell F., Strebel K. (1996). The two biological activities of human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein involve two separable structural domains. *J Virol.* 70:809-819
- Schubert U.**, Ferrer-Montiel A.V., Oblatt-Montal M., Henklein P., Strebel K., Montal M. (1996). Identification of an ion channel activity of the Vpu transmembrane domain and its involvement in the regulation of virus release from HIV-1-infected cells. *FEBS Lett.* 398: 12-18.
- Silhol M.**, Tyagi M., Giacca M., Lebleu B., Vive's E. (2002). Different mechanisms for cellular internalization of the HIV-1 Tat derived cell penetrating peptide and recombinant proteins fused to Tat. *Eur. J. Biochem.* 269: 494–501
- Simeoni F.**, Morris M. C., Heitz F. and Divita G. (2003). Insight into the mechanism of the peptide-based gene delivery system MPG: implications for delivery of siRNA into mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 31: 2717–2724

- Siomi H.**, Shida H., Maki M., Hatanaka M. (1990). Effects of a highly basic region of human immunodeficiency virus Tat protein on nucleolar localization. *J Virol.* 64: 1803-1807
- Smith D.B.** and Johnson K.S. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *E. coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 67: 31–40
- Sousa R.** and Padilla, R. (1995). A mutant T7 RNA polymerase as a DNA polymerase. *EMBO J.* 14: 4609-4621
- Steitz T. A.** (1998). A mechanism for all polymerases. *Nature*, 391: 231-232
- Steitz T.A.**, Smerdon S.J., Jager J. and Joyce C. (1994). A unified polymerase mechanism for nonhomologous DNA and RNA polymerases. *Science* 266: 2025-2026
- Strauss J.H.**, Strauss E.G. (1994). The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiol Rev.* 58: 491-562
- Subbarao N.K.**, Parente R.A., Szoka F.C. Jr, Nadasdi L., Pongracz K. (1987). pH-dependent bilayer destabilization by an amphipathic peptide. *Biochemistry.* 26: 2964-2972
- Thorén E.G.**, Persson D., Lincoln P., Nordén B. (2005). Membrane destabilizing properties of cell-penetrating peptides. *Biophysical Chemistry* 114: 169–179
- Thorén P.E.G.**, Persson D., Isakson P., Goksfr M., O nfelt A., Norden B. (2003). Uptake of analogs of penetratin, Tat(48–60) and oligoarginine in live cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 307: 100–107
- Thorena E.G.**, Persson D., Karlsson M., Nordena B. (2000). The Antennapedia peptide penetratin translocates across lipid bilayers - the first direct observation. *FEBS Letters* 482: 265-268
- Top D.**, de Antueno R., Salsman J., Corcoran J., Mader J., Hoskin D., Touhami A., Jericho M.H., Duncan R. (2005) Liposome reconstitution of a minimal protein-mediated membrane fusion machine. *EMBO J.* 24:2980-2988
- Tyagi M.**, Rusnati M., Presta M., Giacca M. (2001). Internalization of HIV-1 Tat Requires Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycans. *J. Biol. Chem.* 276: 3254-3261
- Vendeville A.**, Rayne F., Bonhoure A., Bettache N., Montcourrier P., Beaumelle B. (2004). HIV-1 Tat enters T cells using coated pits before translocating from acidified endosomes and eliciting biological responses. *Mol Biol Cell.* 15: 2347-2360.
- Vives E.**, Brodin P., and Lebleu B. (1997). A Truncated HIV-1 Tat Protein Basic Domain Rapidly Translocates through the Plasma Membrane and Accumulates in the Cell Nucleus. *J. Biol. Chem.* 272: 16010–16017
- Voet D.**, Voet J.G. (1995) Biochemie. Victoria Publishing as, Praha
- Wadia J.S.**, Stan R.V., Dowdy S F. (2004). Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nat Med.* 10: 310-315
- Wagner K.**, Van Mau N., Boichot S., Kajava A. V., Krauss U., Le Grimellec C. (2004). Interactions of the human calcitonin fragment 9–32 with phospholipids: a monolayer study. *Biophys. J.* 87: 386–395
- Weeks K.M.**, Ampe C., Schultz S.C., Steitz T.A., Crothers D.M. (1990). Fragments of the HIV-1 Tat protein specifically bind TAR RNA. *Science.* 249: 1281-1285.
- Wender P.A.**, Mitchell D.J., Pattabiraman K., Pelkey E.T., Steinman L., and Rothbard J.B. (2000). The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: Peptoid molecular transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97: 13003–13008
- Will E.**, Klump H., Heffner N., Schwieger M., Schiedlmeier B., Ostertag W., Baum C., Stocking C. (2002) Unmodified Cre recombinase crosses the membrane. *Nucleic Acids Res.* 30: 59-65

- Wyman T.B.**, Nicol F., Zelphati O., Scaria P.V., Plank C., Szoka F.C. Jr. (1997). Design, synthesis, and characterization of a cationic peptide that binds to nucleic acids and permeabilizes bilayers. *Biochemistry*. 36: 3008-3017.
- Xia H.**, Mao Q., and Davidson B.L. (2001). The HIV Tat protein transduction domain improves the biodistribution of beta-glucuronidase expressed from recombinant viral vectors. *Nat. Biotechnol.* 19: 640–644.
- Xiao H.**, Neuveut C., Tiffany H.L., Benkirane M., Rich E.A., Murphy P.M., and Jeang K.T. (2000). Selective CXCR4 antagonism by tat: implications for in vivo expansion of coreceptor use by HIV-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 11466–11471
- Yao J.S.**, Strauss E.G., Strauss J.H. (1996). Interactions between PE2, E1, and 6K required for assembly of alphaviruses studied with chimeric viruses. *J Virol.* 70: 7910-7920.
- Zemel A.**, Fattal D.R., Ben-Shaul A. (2003). Energetics and selfassembly of amphipathic peptide pores in lipid membranes. *Biophys. J.* 84: 2242–2255.
- Zlotnick A.**, Reddy V.S., Dasgupta R., Schneemann A., Ray W.J. Jr, Rueckert R.R., Johnson J.E. (1994) Capsid assembly in a family of animal viruses primes an autoproteolytic maturation that depends on a single aspartic acid residue. *J Biol Chem.* 269: 13680-13684.