

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

UNIVERZITA KARLOVA  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
KATEDRA GENETIKY A MIKROBIOLOGIE



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Studium polyomavirů: Příprava a  
charakterizace virových izolátů a studium role  
buněčného cytoskeletu v pohybu polyomavirů  
od cytoplazmy k buněčnému jádru.**

Irena Moserová

Praha 2007

**Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Jitka Forstová, CSs.**

Prohlašuji, že jsem práci vypracovala samostatně, jen s použitím citované literatury a pod vedením vedoucí diplomové práce.

*Irena Moserová*  
Irena Moserová

Děkuji Doc. RNDr. Jitce Forstové, CSc. za neocenitelnou pomoc, rady a připomínky, které mi poskytovala během vypracování této diplomové práce.

Děkuji RNDr. Jiřině Hanové, CSc. za pomoc a rady při práci s tkáňovými kulturami.

Děkuji RNDr. Jitce Štokrové, CSc. a Vojtěchu Žilovi za zhotovení elektronmikroskopických snímků prezentovaných v této diplomové práci.

Děkuji všem studentům a pracovníkům z laboratoří 006 a 004 za veškerou pomoc a vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Děkuji své rodině za podporu a vytvoření pevného zázemí, které mi umožnilo nerušeně studovat a za trpělivost během psaní diplomové práce.

Study of polyomavirus: Preparation and characterisation of virus isolates and studies of the role of cellular cytoskeleton in virus trafficking to the cell nucleus.

ABSTRACT:

The mouse polyomavirus (MPyV) is a small tumorigenic DNA virus. Its genome encodes six gene products, three early antigens (large, middle and small T antigen) and three structural proteins (major capsid protein VP1 and minor capsid proteins VP2 and VP3). We have identified the nucleotide sequence of regulatory region of mouse polyomavirus strain P16 and compared this sequence with the published sequence of MPyV strain A2. In the regulatory region of strain P16, various mutations were found, the 44 nt long insertion in enhancer region, which plays an important role in regulation of transcription and replication, 1 nt deletion, 1 nt insertion, and 7 nucleotide long substitution. We have identified several cellular factors (PEA3, PEA1, PEA2, EF-C, PEB1) that bind to the polyomavirus enhancers. In this work we studied the endocytic transport of MPyV. It is known, that the disruption of microtubules by nocodazole treatment reversibly inhibits viral infection (80% inhibition). Although the intact tubulin is necessary for virion delivery into the nucleus, when microtubules were disrupted in our experiments, some virions were still delivered into the perinuclear area. In the presence of actin disrupting drugs (cytochalasin D and latrunculin A) we observed stronger signal of MPyV 3 hours p.i. in the cytoplasm in comparison to mock-treated cells. Disruption of actin microfilaments influences the stability of microtubules. We were also interested in determination of the cell compartment into which the virus localises in the presence of cytoskeletal drugs. In the presence of nocodazole, we observed partial colocalisation of VP1 protein with caveolin-1.

We have observed partial colocalisation VP1 protein with caveolin-1 and in the presence of nocodazole.

In the last part the construction of recombinant baculovirus for expression of VP1 and VP3 proteins of human BK polyomavirus was prepared.

Key words: polyomavirus, regulatory region, virus trafficking, microtubules, actin microfilaments, recombinant baculovirus

Klíčová slova: polyomavirus, regulační oblast, pohyb virionů, mikrotubuly, aktinová mikrofilamenta, rekombinantní bakulovirus

# Obsah

<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>11</b>
<b>2. LITERÁRNÍ PŘEHLED</b> .....	<b>13</b>
2.1 Klasifikace polyomavirů.....	14
2.2 Biologické vlastnosti polyomavirů.....	14
2.3 Myší polyomavirus (MPyV).....	15
2.3.1 Kmeny myšího polyomaviru.....	15
2.3.2 Struktura virionu.....	15
2.3.3 Organizace genomu.....	16
2.3.4 Replikační cyklus myšího polyomaviru.....	19
2.3.4.1 Vstup virionů do buňky.....	19
2.3.4.2 Expresce časných genů.....	21
2.3.4.3 Velký T antigen.....	21
2.3.4.4 Střední T antigen.....	23
2.3.4.5 Malý T antigen.....	23
2.3.4.6 Replikace virové DNA.....	23
2.3.4.7 Expresce pozdních genů.....	24
2.3.4.8 Hlavní kapsidový protein VP1.....	24
2.3.4.9 Minoritní kapsidové proteiny VP2 a VP3.....	25
2.3.4.10 Morfogeneze virionů.....	26
2.4 Lidský BK virus (BKV).....	27
2.4.1 Přenos BK viru.....	27
2.4.2 Latence a reaktivace.....	27
2.4.3 Infekce.....	28
2.4.4 Nádorový potenciál BKV.....	28
2.5 Buněčný cytoskelet.....	29
2.5.1 Mikrofilamenta.....	29
2.5.2 Intermidiární filamenta.....	31
2.5.3 Mikrotubuly.....	33
2.5.3.1 Kineziny a dyneiny.....	34
2.5.4 Látky ovlivňující dynamiku cytoskeletu.....	34
2.5.5 Interakce virionů s cytoskeletem.....	36
2.5.5.1 Adsorpce viru na buněčný povrch.....	36
2.5.5.2 Internalizace virionů.....	37
2.5.5.3 Transport viru do jádra pomocí buněčného cytoskeletu.....	39
2.5.5.4 Využití cytoskeletu při replikaci virového genomu.....	40
2.5.5.5 Role cytoskeletu při skládání virionů.....	42
2.5.5.6 Uvolnění virionů z buňky.....	43
<b>3. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE</b> .....	<b>45</b>
<b>4. MATERIÁL A METODY</b> .....	<b>48</b>
4.1 Přístroje.....	49
4.2 Materiál.....	50
4.2.1 Chemikálie.....	50
4.2.2 Roztoky.....	52
4.2.3 Média a roztoky pro tkáňové kultury.....	54
4.2.4 Antibiotika.....	55
4.2.5 Enzymy.....	55
4.2.6 Pufry.....	55
4.2.7 Markery molekulových vah.....	56
4.2.8 Protilátky.....	57
4.2.9 Primery pro PCR reakci.....	58

4.2.10 Použité buňky, viry, bakteriální kmeny a plazmidy .....	59
<b>4.3 Metody .....</b>	<b>60</b>
4.3.1 Sterilizace .....	60
4.3.2 Práce s tkáňovými kulturami .....	60
4.3.2.1 Pasážování savčích buněk .....	60
4.3.2.2 Pasážování hmyzích buněk .....	61
4.3.2.3 Synchronizace savčích buněk před infekcí .....	61
4.3.2.4 Infekce savčích buněk virem .....	61
4.3.2.5 Infekce hmyzích buněk virem .....	62
4.3.2.6 Fixace hmyzích buněk .....	62
4.3.2.7 Transfekce hmyzích buněk .....	63
4.3.2.8 Izolace kapsid z hmyzích buněk .....	63
4.3.2.9 Fixace savčích buněk .....	64
4.3.2.10 Nepřímá imunofluorescence .....	64
4.3.3 Plaková zkouška .....	64
4.3.3.1 Infekce buněk plakovým izolátem .....	65
4.3.4 Izolace myšího polyomaviru .....	65
4.3.4.1 Centrifugace přes sacharózový polštář .....	66
4.3.4.2 Izopyknická centrifugace v rovnovážném CsCl gradientu .....	67
4.3.4.3 Dialýza .....	67
4.3.4.4 Hemaglutinační test .....	68
4.3.4.5 Titrace viru .....	69
4.3.5 Studium vlivu cytoskeletárních inhibitorů na pohyb virionů .....	69
4.3.6 Práce s bakteriálními kmeny .....	70
4.3.6.1 Kultivace bakterií .....	70
4.3.6.2 Příprava kompetentních buněk .....	70
4.3.6.3 Elektroporace plazmidové DNA do kompetentních buněk .....	71
(DOWER <i>et al.</i> , 1988) .....	71
4.3.6.4 Příprava kompetentních buněk DH10Bac pro heat-shock .....	71
4.3.6.5 Transformace bakterií metodou heat-shock .....	72
4.3.6.6 Izolace bacmidové DNA .....	72
4.3.6.7 Příprava konzerv z buněk E.coli .....	73
4.3.7 Práce s DNA .....	73
4.3.7.1 Horizontální agarózová elektroforéza .....	73
4.3.7.2 Maxiizolace plazmidové DNA – alkalická metoda .....	73
4.3.7.3 Odstranění RNA ze vzorku DNA .....	74
4.3.7.4 Miniizolace plazmidové DNA – alkalická metoda .....	75
4.3.7.5 Izolace fragmentů DNA z agarózového gelu kitem .....	75
4.3.7.6 Štěpení DNA restrikčními endonukleázami .....	76
4.3.7.7 Amplifikace DNA polymerázovou řetězovou reakcí – PCR .....	76
4.3.7.8 Defosforylace vektorové DNA .....	77
4.3.7.9 Ligace .....	77
4.3.8 Práce s proteiny .....	77
4.3.8.1 Příprava lyzátů z infikovaných hmyzích buněk .....	77
4.3.8.2 SDS polyakrylamidová elektroforéza (SDS – PAGE) .....	78
4.3.8.3 Dot - blot .....	78
4.3.8.4 Western blot .....	78
4.3.8.5 Imunodetekce proteinů imobilizovaných na membráně .....	79
4.3.9 Elektronová mikroskopie .....	79
4.3.9.1 Negativní barvení .....	79
<b>5. VÝSLEDKY .....</b>	<b>80</b>
5.1 Příprava a charakterizace virových izolátů .....	81
5.1.1 Příprava virových plaků z kmenů A2 a P16 a jejich následné pomnožení .....	81
5.1.2 Vliv buněčné linie na výtěžek viru P16 .....	82
5.1.3 Izolace polyomaviru P16 .....	84
5.1.4 Izolace DNA a sekvenace regulační oblasti genomu polyomaviru kmene P16 a porovnání se známou sekvencí regulační oblasti A2 .....	86
5.2 Sledování vlivu cytoskeletárních inhibitorů na pohyb virionů buňkou .....	90

5.2.1	Funkce aktinového a tubulinového cytoskeletu v pohybu virionů od buněčné membrány k buněčnému jádru .....	90
5.2.1.1	Vliv rozrušení tubulinu nocodazolem na virovou infekci. ....	90
5.2.1.2	Vliv rozrušení aktinových filament cytochalazinem D a latrunculinem A na pohyb virionů od buněčné membrány k jádru.....	93
5.2.1.3	Struktura cytoskeletu po odmytí aktin rozrušujících látek .....	97
5.2.2	Sledování lokalizace viru v přítomnosti cytoskelet rozrušujících látek .....	100
5.3	<i>Příprava kapsidových struktur BK polyomaviru složených z hlavního strukturního proteinu VP1 a minoritního proteinu VP3</i> .....	109
<b>6.</b>	<b>DISKUZE .....</b>	<b>118</b>
6.1	<i>Příprava virových plaků z kmenů A2 a P16 a jejich následné pomnožení</i> .....	119
6.2	<i>Sledování vlivu cytoskeletárních inhibitorů na pohyb virionů buňkou</i> .....	123
6.3	<i>Příprava kapsidových struktur BK polyomaviru složených z hlavního strukturního proteinu VP1 a minoritního proteinu VP3</i> .....	126
<b>7.</b>	<b>SOUHRN .....</b>	<b>128</b>
<b>8.</b>	<b>SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY .....</b>	<b>131</b>



## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AP1	„activator protein 1“
bp	páry bází
BSA	hovězí sérový albumin
BFM	bromfenolová modř
CEV	„cell-associated enveloped virus“
CsCl	chlorid cesný
Da	Dalton
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EEV	„extracellular enveloped virus“
ER	endoplazmatické retikulum
GDP	guanozindisfosfát
DTP	guanozintrifosfát
h, hod	hodina
h.p.i.	hodin po infekci
IEV	„intracellular enveloped virus“
IMV	„intracellular mature virus“
LT	velký T antigen
LP	„large plaques“
Min	minuta
M.O.I.	multiplicita infekce
MpyV	myší polyomavirus
MT	střední T antigen
MTOC	organizační centrum mikrotubulů
PBS	Phosphate Buffered Saline
PEA1	„polyomavirus enhancer A binding protein 1“
PFU	„plaque forming unit“
PML	„promyelocytic leukemia nuclear bodies“
RPM	otáčky za minutu
SP	„small plaques“
ST	malý T antigen
SV 40	„simian“ virus 40
VP1,2, 3	kapsidové proteiny polyomaviru

VV virus vakcínie  
YY „YinYang“

## **1. ÚVOD**

Polyomaviry jsou malé DNA viry rozšířené u savců po celém světě, jsou dobře adaptované na hostitelský organizmus. Je pravděpodobné, že v průběhu doby docházelo ke koevoluci mezi polyomaviry a jejich hostiteli.

Polyomaviry jsou důležitým modelovým organizmem. Od svého objevení v roce 1953 jsou intenzivně studovány, počáteční studium se zabývalo onkogenním potenciálem těchto virů. Tyto studie přispěly k porozumění onkogenů a tumor-supresorových genů, vedly k identifikaci nádorového supresorového proteinu p53. Pomohly také objasnit vliv virů na regulaci buněčného cyklu. Polyomaviry, vzhledem k jejich malé velikosti byly prvními živočišnými viry, u kterých byla stanovena sekvence celého genomu. K hlavním objevům učiněným díky polyomavirům patří například struktura nadšroubovice DNA, identifikace eukaryotních počátků replikace, objev alternativního sestřihu, získání poznatků o fungování regulace transkripce a identifikace jaderného lokalizačního signálu.

V naší laboratoři se zabýváme studiem mechanismů jednotlivých kroků infekce myším polyomavirem. Dále studiem endocytické dráhy využívané tímto virem při jeho cestě od plazmatické membrány k buněčnému jádru. Tento transport je realizován různými buněčnými kompartmenty, k jejichž pohybu slouží cytoskelet.

## **2. LITERÁRNÍ PŘEHLED**

## 2.1 Klasifikace polyomavirů

Polyomaviry tvoří čeleď *Polyomaviridae*. Původně byly polyomaviry klasifikovány jako podčeleď *Polyomavirinae* a spolu s podčeledí *Papillomavirinae* tvořily čeleď *Papovaviridae*. Název čeledi byl tvořen počátečními písmeny skupin virů zahrnutých do této čeledi: králičí papillomavirus (PA), polyomavirus (PO), virus SV 40 původně nazývaný vakualizující virus (VA). Polyomaviry se liší od papillomavirů velikostí kapsidy (průměr 45 nm oproti 55 nm) i velikostí genomu (5 kbp oproti 8 kbp). Po prozkoumání jejich způsobu replikace byly papillomaviry a polyomaviry zařazeny do samostatných čeledí.

V současné době je známo více než 10 zástupců polyomavirů, které infikují různé druhy živočichů, včetně ptáků, hlodavců, králíků a primátů. Mezi nejvíce studované patří myší polyomavirus (MPyV), virus SV40 a lidské polyomaviry – BK virus a JC virus. MPyV byl objeven v roce 1953 jako agens odpovědné za vznik nádorů slinných žláz u myší. Pojmenován byl na základě schopnosti vyvolávat nádory na různých místech (*poly* = řecky mnoho, *oma* = řecky nádor) (GROSS, 1953). Virus SV40 byl objeven v 60. letech 20. století, jako kontaminace tkáňové kultury ledvinových buněk (Makkak rhesus), která se používala pro produkci poliovirových vakcín (EDDY *et al.*, 1962). Lidské polyomaviry BKV a JCV byly objeveny v roce 1971, infikují člověka v dětství a jsou přítomny kosmopolitně v celé lidské populaci. BKV byl izolován z moči pacientů vystavených imunosupresivní léčbě po transplantaci ledvin (GARDNER *et al.*, 1971) a JCV z mozkové tkáně pacienta s progresivní multifokální leukoencefalopatií (PADGETT *et al.*, 1971).

## 2.2 Biologické vlastnosti polyomavirů

Polyomaviry jsou schopné infikovat široké spektrum savčích buněk, infekce může proběhnout buď produktivně nebo neproduktivně. Při infekci permisivních buněk, např. myších buněk, myším polyomavirem dochází k produktivní (lytické) infekci, při které se virus v buňkách pomnoží a buňky v konečné fázi infekce lyzují. V nepermisivních buňkách, např. v buňkách křečka infikovaných polyomavirem, dochází k neproduktivní (abortivní) infekci, během které polyomavirus nemůže dokončit svůj replikační cyklus. Při neproduktivní infekci je možné v buňkách detekovat expresi časných antigenů, která může vést k transformaci buňky.

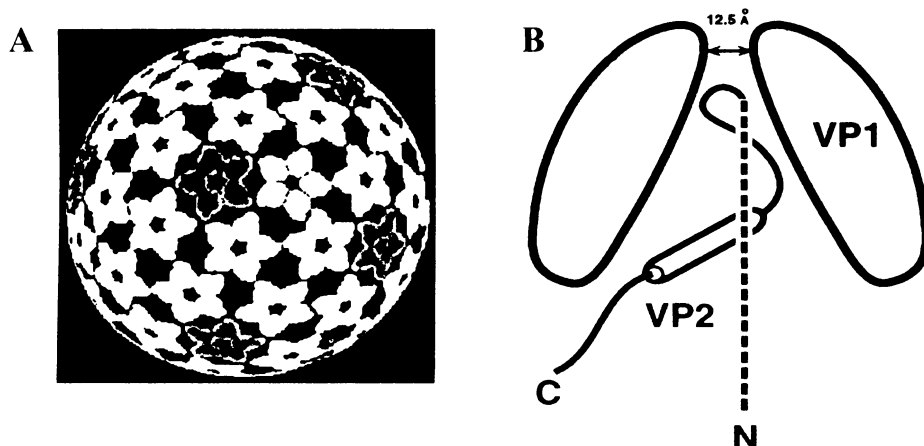
## 2.3 Myší polyomavirus (MPyV)

### 2.3.1 Kmeny myšího polyomaviru

Existuje několik kmenů myšího polyomaviru: A2, A3, P16, „Crawford small-plaque“, Kilham, BG a další. Kompletní nukleotidová sekvence není známa u kmenu Kilham. Kmeny myšího polyomaviru můžeme rozdělit do dvou skupin podle toho, jaké vytvářejí plaky. Do první skupiny patří kmeny, které vytvářejí velké plaky (LP = large plaques). Tyto kmeny mají v 91. pozici VP1 proteinu kyselinu glutamovou. Kmeny vytvářející malé plaky (SP = small plaques) mají v 91. pozici glycin. Nejznámější zástupci LP jsou A2 a A3, do skupiny SP se řadí např. „Crawford small-plaque“, který je podobný viru P16. LP kmeny přispívají ke vzniku nádorů s větší frekvencí než SP kmeny (FREUND *et al.*, 1991).

### 2.3.2 Struktura virionu

Viriony polyomavirů jsou neobalené, mají ikosahedrální symetrii a průměr 45 nm. Kapsida myšího polyomaviru (PyV) je tvořena třemi strukturálními proteiny VP1, VP2 a VP3. Uvnitř kapsidy se nachází „nucleocore“ tvořené genomem polyomaviru asociovaným s buněčnými histony H2A, H2B, H3 a H4 (chybí H1) a VP1 proteinem (COLE, 1996). Polyomavirová kapsida obsahuje 360 molekul hlavního kapsidového proteinu VP1, který je uspořádaný do 72 pentamerů kapsomer. V každé se nachází jedna molekula proteinu VP2 nebo VP3 (LIDDINGTON *et al.*, 1991). Při izolaci viru můžeme získat tři druhy virových částic: 1) Infekční virové částice obsahují molekulu DNA asociovanou s buněčnými histony, tento komplex je nazýván virový minichromozom. Histon H1 se podílí na formování minichromozomu (VARSHAVSKY *et al.*, 1976), ale během morfogeneze virionů je patrně vytěsněn. 2) Prázdné kapsidy tvořeny pouze třemi kapsidovými proteiny VP1, VP2 a VP3. 3) Pseudoviriony obsahující fragmenty enkapsidované buněčné DNA o průměrné délce 2-2,5 kbp (YELTON a APOSHIAN, 1972). Pokud je virus pasážován s vysokou multiplicitou, dochází k výskytu virionů s defektními genomy, ve kterých se nacházejí delece, duplikace nebo přestavby. Tyto defektní genomy mohou být také enkapsidovány, pokud je splněn velikostní limit nutný pro enkapsidaci.



**Obr. 2.1:** Struktura virionu myšího polyomaviru.

A - Schématické znázornění kapsidy tvořené pentamerami proteinu VP1. Modře jsou znázorněny pentavalentní a bíle hexavalentní pentamery (převzato z SALUNKE *et al.*, 1986).

B - Znázornění struktury pentameru VP1 s proteinem VP2 v centrální dutině. Přerušované je vyznačena unikátní N-koncová část proteinu VP2. N- a C- konec proteinu směřuje dovnitř virionu. (převzato z CHEN *et al.*, 1998).

### 2.3.3 Organizace genomu

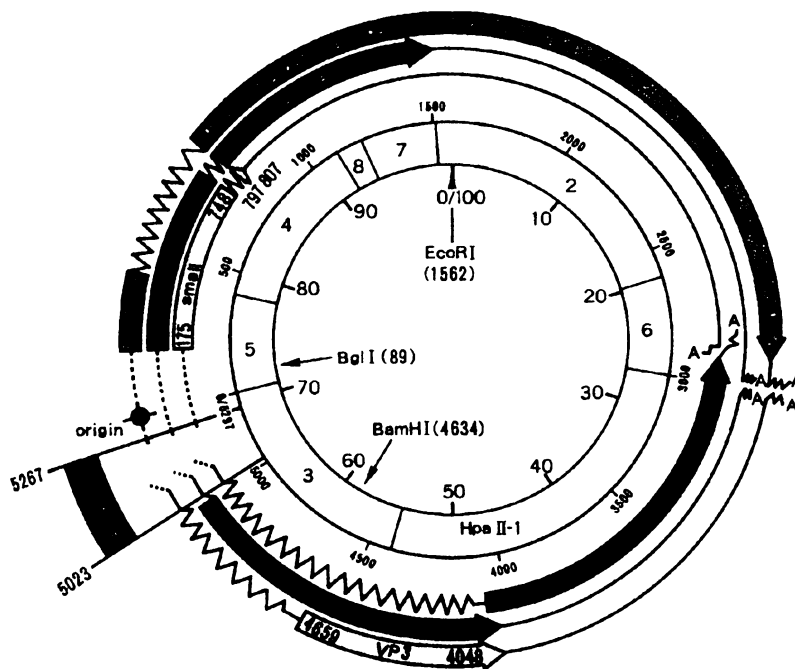
Genom myšího polyomaviru je tvořen kruhovou ds DNA o velikosti 5295 bp (COLE, 1996) a lze ho rozdělit na časnou, pozdní a regulační oblast. Časná oblast genomu je exprimována v časných fázích infekce a pokračuje i v pozdních stádiích. Pozdní oblast genomu je exprimována až po zahájení replikace virového genomu, i když nízká hladina exprese je přítomna i v časných fázích infekce. Transkripce běží dvěma směry z iniciačních míst blízko počátku replikace, přičemž časná a pozdní mRNA jsou transkribovány z opačných řetězců.

Časná oblast genomu kóduje T (tumor) antigeny, velký (LT), střední (MT) a malý (ST) T antigen. Časná mRNA kódující T antigeny jsou produkovány alternativním sestřihem ze společné pre-mRNA. Všechny tři T antigeny mají společnou N-koncovou sekvenci a odlišnou C-koncovou oblast.

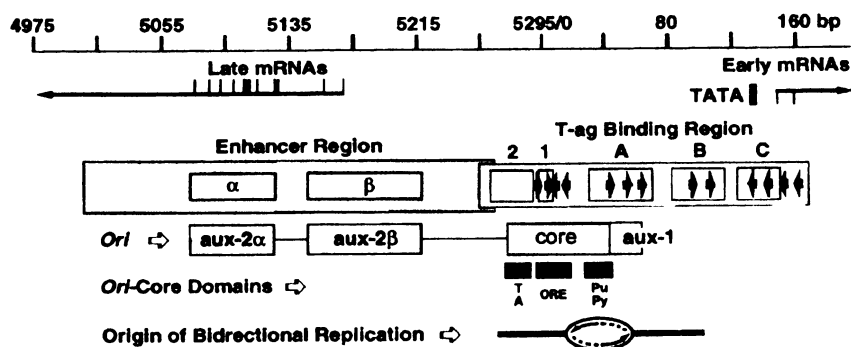
Pozdní oblast genomu kóduje tři kapsidové proteiny – VP1, VP2 a VP3. Pozdní mRNA vznikají opět alternativním sestřihem ze společné pre-mRNA. Sekvence minoritních kapsidových proteinů VP2 a VP3 se překrývá, celá sekvence VP3 je obsažena v C-koncové části proteinu VP2, oba geny jsou čteny ve stejném čtecím



rámci. Oblast kódující N-konec VP1 se překrývá s C-koncovou oblastí VP2 a VP3. Translace VP1 probíhá ale z jiného čtecího rámce než VP2 a VP3 (COLE, 1996).

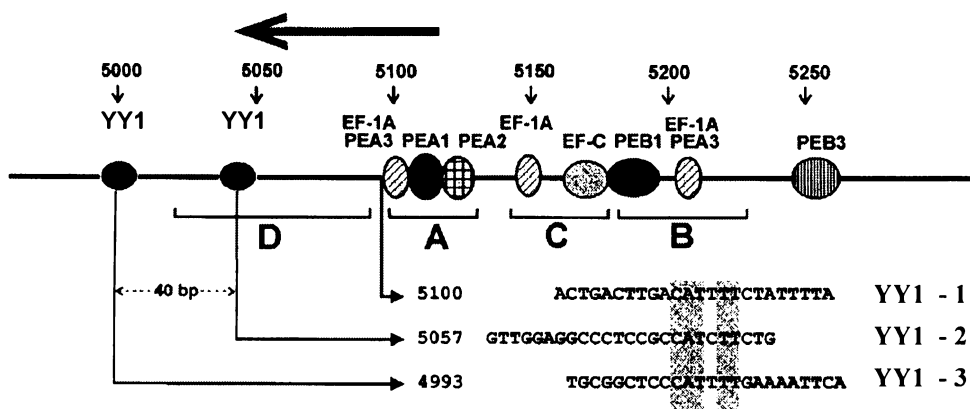


**Obr. 2.2:** Mapa genomu myšního polyomaviru. Oblasti kódující virové proteiny jsou vyznačeny barevně (převzato z COLE, 1996).



**Obr. 2.3: Regulační oblast MPyV DNA.** Ukázány jsou „core“ počátku replikace DNA, umístění auxiliálních sekvencí (aux), které jsou požadovány pro účinnou replikaci. Tyto oblasti se překrývají se sekvencemi enhanceru ( $\alpha$ ,  $\beta$ ). V oblasti „core“ počátku replikace se nacházejí oblasti obsahující sekvence bohaté na TA, palindromatická oblast, která slouží jako „origin recognition element“ (ORE), a oblast bohatá na puriny a pyrimidiny, kde je iniciována replikace DNA. Vazebné oblasti LT antigenu označují plné šipky. Dále jsou znázorněna místa iniciace časně i pozdní transkripce (převzato z COLE a CONZEN 2001).

Regulační oblast se nachází mezi časnou a pozdní genovou oblastí a je tvořena promotory a enhancery časné i pozdní transkripce a počátkem replikace ORI. Na obr. 2.3 je znázorněno uspořádání regulační oblasti s vyznačenými sekvencemi důležitými pro zahájení a regulaci replikace, enhancerovými elementy, promotorem časné transkripce s TATA boxem (pozdní promotor TATA box postrádá). Uvedena jsou též vazebná místa pro LT antigen a místa zahájení časné i pozdní transkripce. Enhancer se skládá ze čtyř elementů D, A, C a B (v některé literatuře je tato oblast rozdělena do dvou oblastí **a** a **b** nebo  $\alpha$  a  $\beta$ , obr.2.3), které mohou fungovat nezávisle (KASTAN *et al.*, 1991; SAMBROOK *et al.*, 1968). Aktivita těchto enhancerových elementů je závislá na typu buněk. Je známo, že virové varianty, které rostou buď v diferencovaných nebo naopak v nediferencovaných karcinomových buňkách se odlišují právě mutacemi v některé z těchto oblastí. Na obrázku 2.4 jsou uvedeny některé buněčné transkripční faktory, které se váží na sekvence enhanceru.



**Obr. 2.4:** Struktura regulační oblasti viru A2. Enhancer se skládá ze čtyř domén D, A, C, B. V sekvenci jsou vyznačena tři vazebná místa pro transkripční regulátory a protein vázající jadernou matrix YY1. (upraveno podle MARTELLI *et al.*, 1996).

Transkripce je regulována buněčnými transkripčními faktory (PEA1/AP1, PEA3), které bývají indukovány, pokud jsou buňky stimulovány sérem. PEA1 („polyomavirus enhancer A binding protein 1“) se váže do místa 5139-5145, kde rozpoznává sekvenci TGATCTAA. Je to patrně stejný faktor nalezený v HeLa

buňkách pod názvem „activator protein 1“ (AP1). AP1 aktivuje také např. lidský metallothionein a enhancery viru SV40 (OSTAPCHUK *et al.*, 1986). PEA2 se váže k nukleotidům 5147-5154 kmene A3 a 5122-5129 A2 v sousedství PEA1 vazebného místa. Další polyomavírový faktor PEB1 se váže k enhanceru b a také mezi 5180 a 5220 kmene A3 a 5155-5195 kmene A2 (HARIHARAN *et al.*, 1989, 1991; KRYSZKE *et al.*, 1987).

Další buněčné proteiny se vážou k elementu C regulační oblasti polyomaviru: EF-C („enhancer binding factor to polyomavirus element C“), EBP20 („enhancer binding protein 20“). MARTELLI *et al.* (1996) zjistili, že v regulační oblasti genomu se nacházejí také dvě silná a jedno slabší vazebné místo pro pleiotropní transkripční regulátor a protein vázající jadernou matrix YY1.

### **2.3.4 Replikační cyklus myšího polyomaviru**

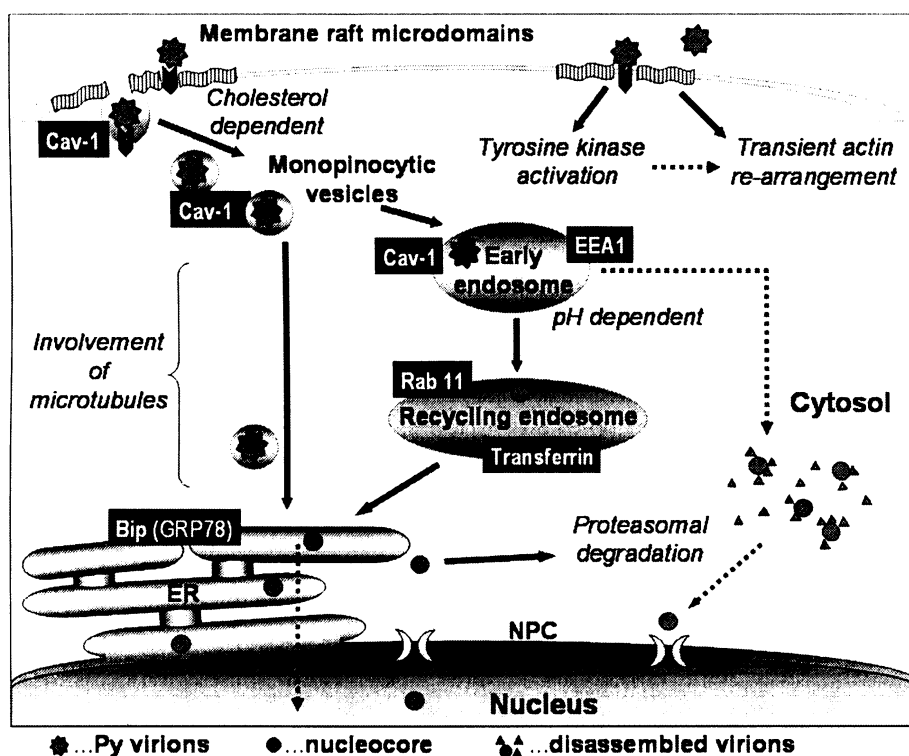
V permisivních buňkách proběhne lytický cyklus polyomaviru přibližně za 48 hodin. Osm hodin po infekci je možné detekovat časné proteiny, 20 hodin po infekci začíná replikace virové DNA a 24 hodin po infekci začíná syntéza pozdních proteinů.

#### **2.3.4.1 Vstup virionů do buňky**

Viry z čeledi *Polyomaviridae* využívají ke vstupu do buňky různé endocytické dráhy. Nejlépe je popsána endocytická dráha, kterou využívá virus SV40. Jako struktury, na které se SV40 váže na povrchu hostitelské buňky, byly nejprve popsány molekuly MHC I (BREAU *et al.*, 1992). Později TSAI *et al.* (2003) identifikovali jako receptor gangliosid GM1 (obr. 2.6). SV40 vstupuje do buněk prostřednictvím caveol (ANDERSON *et al.*, 1996; PELKMANS *et al.*, 2001), pokračuje do kaveozómu (organela s neutrálním pH a bohatá na caveolin-1) a poté je transportován do endoplazmatického retikula (NORKIN *et al.*, 2002). Lidský JC virus vstupuje do buňky klatrinem zprostředkovanou endocytózou (PHO *et al.*, 2000). Pro funkčnost této dráhy je důležité relativně kyselé pH časných endozomů, které zapříčiní konformační změny virových proteinů a napomůže rozvolnění virionů, případně jejich uvolnění do cytosolu. Produktivní infekce buněk JC virem je citlivá ke zvyšujícímu se pH endozomů (ASHOK a ATWOOD 2003). Další lidský polyomavirus BK vstupuje do buněk prostřednictvím caveol. Jako receptory

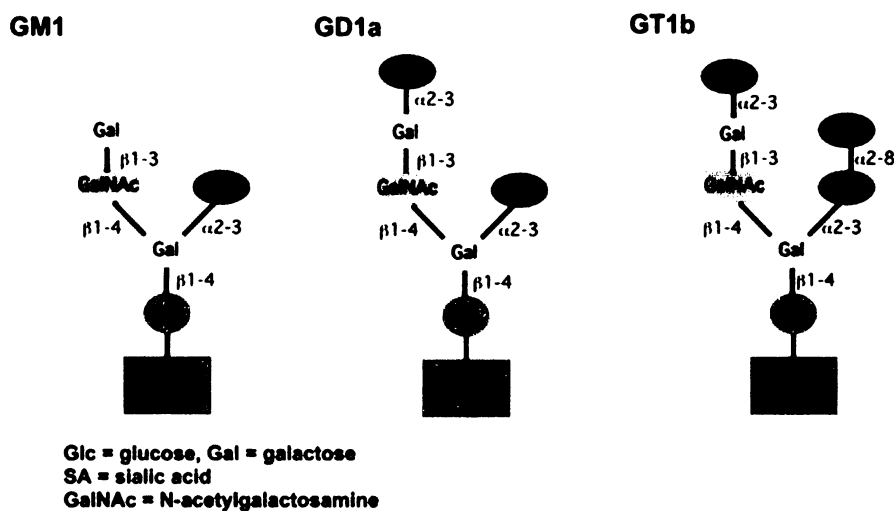
pro BK virus byly identifikovány gangliosidy GD1b a GT1b (SINIBALDI *et al.*, 1990; DUGAN *et al.*, 2005). Překvapivě je účinnost infekce podobně jako u JC viru závislá na kyselém pH endozomů (EASH *et al.*, 2004).

Myší polyomavirus se váže na povrchu buněk na kyselinu sialovou. Jako receptory pro vstup MPyV do buňky byly rovněž identifikovány gangliosidy GD1 a GT1b (TSAI *et al.*, 2003) (obr.2.6). MPyV vstupuje do buněk v monopinocytických váčcích. Na některých z nich byl identifikován kaveolin-1 (RICHTEROVÁ *et al.*, 2001). Virus byl dále pozorován v časných endozomech, charakterizovaných proteinem EEA1 (early endosomes antigen), dále v recyklujících endozomech (MANNOVÁ a FORSTOVÁ, 2003) a v endoplazmatickém retikulu (obr. 2.5). Způsob vstupu viru do jádra není znám, podobně jako místo rozvolnění virionů.



**Obr. 2.5:** Schéma pohybu myšího polyomaviru od cytoplazmatické membrány do jádra (převzato z LIEBL *et al.*, 2006).

Viriony jsou internalizovány přes lipidové rafty do monopinocytických váčků (často pozitivní na kaveolin-1). Tyto váčky fúzí s časnými endozomy, kyselá pH endozomů je nezbytné pro virovou infekci. Adsorpce viru je doprovázena signalizací přes protein tyrosin kinázu (Holländerová, 2004) a s přechodnou reorganizací aktinové sítě. Virus dále postupuje do recyklujících endozomů, což bylo prokázáno kolokalizací mezi PyV VP1 a Rab11 GTPázou. Důležitá kolokalizace s Bip markerem byla prokázána dříve (MANNOVÁ *et al.*, 2003) a potvrdila, že virus je transportován do ER. Černé šipky – experimentálně prokázáno, tečkované šipky - možné alternativní dráhy, NPC = komplex jaderného póru.



**Obr. 2.6:** Struktura gangliosidů sloužících jako receptory pro vstup MPyV nebo viru SV40 do buňky. (Převzato z TSAI *et al.*, 2003)

#### 2.3.4.2 Exprese časných genů

Po vstupu virové DNA do buněčného jádra začíná transkripce časné oblasti genomu. Syntéza časných i pozdních mRNA je katalyzována RNA polymerázou II. Syntéza časných antigenů začíná 6-8 h (LT) a 16-18 h (MT, ST) po infekci (CHEN a FLUCK, 2001).

#### 2.3.4.3 Velký T antigen

Velké T antigeny všech polyomavirů jsou multifunkční proteiny s enzymatickými aktivitami a jsou schopné interagovat s mnoha buněčnými proteiny. LT je posttranslačně modifikován O-glykosylací, acylací, adenylací, poly(ADP)-ribosylací, N-koncovou acylací a fosforylací. LT obsahuje dvě oblasti fosforylačních míst. 95 % z celkového množství LT je lokalizováno v jádře.

LT je jediným virovým proteinem požadovaným pro replikaci virové DNA. Váže se k pentamerní sekvenci GAGGC, v počátku virové replikace, kde se za přítomnosti ATP uspořádává do dvou hexamerů, které mají ATPázovou a helikázovou aktivitu (MARTON *et al.*, 1995). Nespecificky váže ssDNA a dsDNA, ale jen s velmi nízkou afinitou. LT tvoří komplexy s proteiny nezbytnými pro DNA replikaci, interaguje s  $\alpha$ -primázou a replikačním proteinem A (RPA) (DORNREITER *et al.*, 1990). LT váže DNA topoizomerázu I, čímž zabraňuje rozvíjení DNA mimo místo

replikace (HALMER *et al.*, 1998). LT také interaguje s proteiny účastnícími se regulace buněčného cyklu – s onkosupresorovým proteinem Rb. Na rozdíl od LT SV40 LT myšího polyomaviru neinteraguje s proteinem p53, proto není schopen buňky transformovat, ale pouze je immortalizovat (DILWORTH, 1990).

Na N-konci má LT J doménu, která je homologní s J doménou chaperonu DnaJ *Escherichia coli*. J doména obsahuje tzv. HDP motiv, díky kterému interaguje s Hsc 70. Funkcí chaperonů obsahujících J doménu je interakce se členy rodiny DnaK chaperonů a modulace jejich aktivity. Savčím homologem bakteriálních DnaK proteinů je protein Hsc 70. DnaJ chaperony stimulují ATPázovou aktivitu svých DnaK partnerů a tím i uvolnění neuspořádaných proteinů z tohoto chaperonu. DnaK chaperony mají význam při metabolismu proteinů za stresových i nestresových podmínek. Účastní se sbalování proteinů, membránové translokace, degradace špatně sbalených proteinů a regulačních procesů (HARTL, 1996). Polyomaviry mají tedy vlastní chaperony – T antigeny, které se podílejí na deregulaci buňky během virové infekce. Zprostředkovávají interakci mezi proteinem Hsc 70 a komplexem buněčných proteinů. Hydrolýzou ATP vzniká energie, která je využita ke konformační změně proteinů v komplexu. Takto dochází k rozpadu např. komplexu pRb-E2F, čímž je z komplexu vyvážen represor pRb a uvolněn transkripční faktor E2F a může být zahájena transkripce genů závislých na E2F důležitých pro replikaci viru. (BRODSKY a PIPAS, 1998).



**Obr. 2.7:** Chaperonový model rozpadu komplexu pRb-E2F. Po navázání J domény LT, za spolupráce s Hsc70, na komplex pRb-E2F dochází k hydrolýze ATP a následně k rozpadu celého multiproteinového komplexu (Převzato z Sullivan and Pipas, 2002).

#### **2.3.4.4 Střední T antigen**

Střední T antigen (MT) je kódován pouze myším a dalšími hlodavčími polyomaviry. MT myšího polyomaviru je lokalizován v plazmatické membráně (ITO *et al.*, 1997), kde je zakotven C-koncovou hydrofóbní doménou (CARMICHAEL *et al.*, 1982). Na plazmatické membráně a také na vnitrobuněčných membránách je MT asociován s c-Src (COURTNEIDGE a SMITH, 1983), fosfatidyl inositol-3 kinázou (AUGER *et al.*, 1992), Shc proteinem (CAMPBELL *et al.*, 1994) a fosfatázou 2A (WALTER *et al.*, 1990). MT je hlavním onkogenem myšího polyomaviru. Mimikuje aktivovaný receptor pro růstové faktory, aktivuje c-src a spouští dráhu signální transdukce.

#### **2.3.4.5 Malý T antigen**

Malý T antigen (ST) polyomavirů je lokalizován v jádře i v cytoplasmě (ELLMAN *et al.*, 1984). Asociuje s regulační i katalytickou podjednotkou protein fosfatázy 2A (PALLAS *et al.*, 1990). Komplex PP2A je schopný aktivovat c-fos promotor, ale ne c-jun kinázu (PALLAS *et al.*, 1990). U viru SV40 způsobuje vazba ST s PP2A posun podjednotky B, což má za následek inhibici fosfatové aktivity (YANG *et al.*, 1991) a ovlivnění MAP kinázové dráhy. Inaktivace PP2A postupně způsobí aktivaci mitogenem aktivované proteinkinázy a stresem aktivované proteinkinázy. ST stimuluje vstup buňky do G1 fáze buněčného cyklu. Molekula PP2A působí jako nádorový supresor, nahrazení jedné z podjednotek PP2A (PR61/B $\gamma$ ) malým T antigenem viru SV40 přispívá k buněčné transformaci (JANSSENS *et al.*, 2005).

#### **2.3.4.6 Replikace virové DNA**

Genom myšího polyomaviru obsahuje jen jeden počátek virové DNA replikace (ORI), ze kterého probíhá replikace oběma směry semidiskontinuálním způsobem. Polyomavirus využívá replikační aparát buňky. Replikace virového genomu je indukována LT. V přítomnosti ATP se LT antigen naváže jako dva hexamery do počátku virové replikace (HUANG *et al.*, 1998). Tyto hexamery asociují s proteiny zajišťujícími replikaci buněčné DNA. Replikační vidlice se setkávají v místě protilehlém iniciačnímu místu, terminační místo replikace chybí.

#### 2.3.4.7 Exprese pozdních genů

Slabá transkripce pozdní části genomu je detekovatelná i před zahájením replikace, ale po zahájení replikace virové DNA mnohonásobně vzroste. Transkripce pozdní oblasti probíhá na opačném vlákne než transkripce časné oblasti. Molekuly pre-mRNA jsou různě dlouhé, protože nedochází k účinné terminaci transkripce na konci pozdní oblasti a dochází tak ke vzniku gigantických RNA molekul velikosti násobků celého polyomavirového genomu (ACHESON, 1978). Alternativním sestřihem vznikají tři typy monocistronických mRNA: 16S mRNA kódující VP1 protein, 18S mRNA kódující VP3 a 19S mRNA kódující VP2.

#### 2.3.4.8 Hlavní kapsidový protein VP1

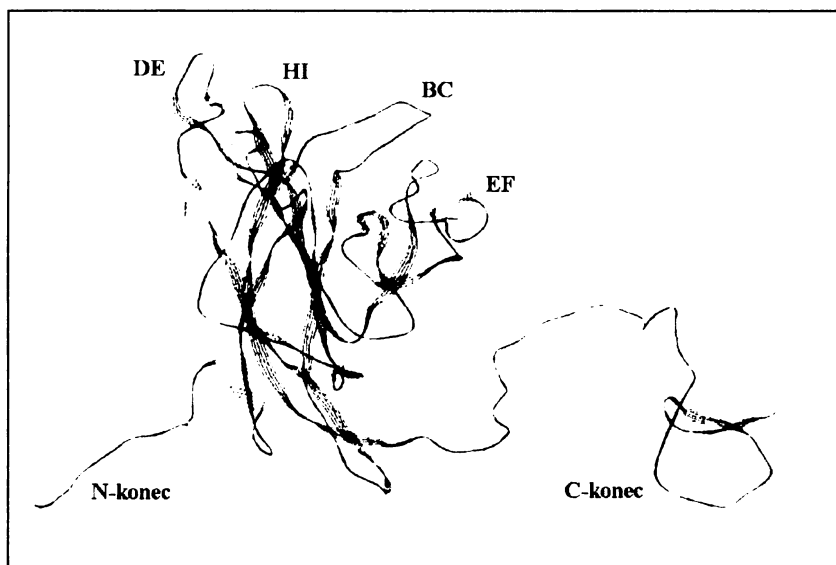
Protein VP1 je hlavním strukturním proteinem polyomavirové kapsidy. Spolu s histony a virovou DNA je přítomný i v „nucleocore“.

Na základě terciární struktury lze VP1 molekulu rozdělit na tři základní části: N-koncovou, střední a C-koncovou oblast (obr.2.8). Prvních 15 aminokyselin N-koncové oblasti je orientováno dovnitř dutiny pentameru, pod sousední monomer VP1 proteinu, kde pravděpodobně interagují s nucleoproteinovým jádrem. V N-koncové oblasti VP1 proteinu se vyskytuje jaderný lokalizační signál a DNA-vazebné místo. DNA vazebná doména proteinu VP1 je tvořena prvními pěti aminokyselinami a DNA váže nespecificky (CHANG *et al.*, 1993). Střední oblast je tvořena  $\alpha$ -helixy a  $\beta$ -listy, které jsou spojeny šesti smyčkami – BC, DE, HI, EF, FG a G2. Smyčky BC, DE a HI jsou orientovány ven z virionu, smyčka EF je orientována na boční stranu monomeru. C-koncová oblast je tvořena  $\alpha$ -helixem, C-inzertem a C-smyčkou. Účastní se vazby sousední VP1 molekuly a také se uplatňuje ve vazbě mezi jednotlivými kapsomerami (RAYMENT *et al.*, 1982; STEHLE *et al.*, 1996; LEPŠÍK 1999).

Protein VP1 může být posttranslačně modifikován fosforylací, acetylací, hydroxylací, sulfonylací a metylací (BOLEN *et al.*, 1981). Nejlépe je prostudován význam fosforylace. Fosforylace threoninu 155 je důležitá pro morfogenezi virionů a fosforylace threoninu 62 hraje roli při adsorpci a vazbě virionu na receptor (LI a GARCEA, 1994). Acetylace lyzinů se nachází na N-konci VP1 tam, kde je lokalizován jaderný lokalizační signál a DNA vazebná doména. Acetylace pravděpodobně reguluje funkci těchto domén (BOLEN *et al.*, 1981). Hydroxylace



prolinů ovlivňuje transport VP1 z cytoplazmy do jádra. Sulfonylace tyrozinu ovlivňuje celkový náboj proteinu a jeho terciární strukturu (CONSIGLI *et al.*, 1986).



**Obr. 2.8:** Terciární struktura proteinu VP1.

Protein VP1 je schopen se *in vitro* v přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  spontánně uspořádat do struktur podobných kapsidám (MONTROSS *et al.*, 1991). Bylo prokázáno, že k tvorbě těchto struktur není nutná přítomnost proteinů VP2 a VP3 a není nutná ani posttranslační modifikace proteinu VP1 (SALUNKE *et al.*, 1986). Dále bylo zjištěno, že protein VP1 vytváří struktury podobné kapsidám i při expresi v buňkách *Saccharomyces cerevisiae* (PALKOVÁ *et al.*, 2000a), nebo *in vitro*, z izolovaných pentamer.

#### **2.3.4.9 Minoritní kapsidové proteiny VP2 a VP3**

Oba minoritní proteiny jsou součástí virové kapsidy. V centrální dutině VP1 pentameru se nachází vždy jedna molekula proteinu VP2 nebo VP3. Za interakci VP2 nebo VP3 proteinů s VP1 proteinem je zodpovědná C-koncová oblast, která je společná oběma minoritním proteinům (aminokyseliny 140-181) (BAROUCH a HARRISON, 1994). Protein VP2 je na svém N-konci myristylován (STREULI a GRIFFIN, 1987). Posttranslační modifikace u proteinu VP3 nejsou známy.

Na přítomnosti minoritních proteinů závisí infektivita viru. Ztráta jednoho z proteinů vede k dramatickému snížení infekivity, ale ztráta obou proteinů je pro

virus osudná (MANNOVÁ *et al.*, 2002). Oba proteiny mají vlastní jaderný lokalizační signál, ale do jádra jsou transportovány v komplexu s proteinem VP1 (FORSTOVÁ *et al.*, 1993; BAROUCH a HARRISON, 1994). V různých expresních systémech bylo zjištěno, že pro účinné cílení proteinů VP2 a VP3 do jádra je nutná koexprese proteinu VP1 (STAMATOS *et al.*, 1987; FORSTOVÁ *et al.*, 1993).

Oba minoritní proteiny VP2 a VP3 a myristylace proteinu VP2 u příbuzného lidského viru JC je esenciální pro životní cyklus viru (GASPAROVIC *et al.*, 2006). U viru SV40 bylo zjištěno, že jen minoritní protein VP3 (ne VP2) je důležitý pro skládání infekčních virionů (GHARAKHANIAN *et al.*, 2003). Minoritní strukturní proteiny polyomavirů primátů JC a BK a SV40 mají na rozdíl od myšího polyomaviru delší C-konec. Tento konec jim udílí schopnost interagovat nespecificky s DNA (CLEVER *et al.*, 1993, DEAN *et al.*, 1995). Této C-koncové doměně proteinů VP2 a VP3 se také přisuzuje schopnost cílit protein VP1 do specifických (PML = promyelocytic leukemia nuclear bodies) domén v buněčném jádře. Strukturní proteiny JC viru se akumulují v jádře v blízkosti PML tělísek, kde probíhá morfogeneze virionu (SHISHIDO-HARA *et al.*, 2004).

#### **2.3.4.10 Morfogeneze virionů**

Kapsidové proteiny jsou syntetizovány v cytoplazmě a poté jsou transportovány do jádra hostitelské buňky. Komplexy proteinů VP1/VP2 a VP1/VP3 formované v cytoplazmě se po translokaci do jádra mohou účastnit virové morfogeneze. Podle jedné teorie, VP1 pentamery s minoritním proteinem mohou kondenzovat kolem virového minichromozomu, kam jsou pravděpodobně naváděny minoritními proteiny (GRIFFITH *et al.*, 1992). V průběhu tohoto procesu zřejmě dochází k vytěsnění histonu H1, který se ve virionech nenachází. Na závěr celého procesu nastane patrně konformační změna, při které dojde k vytvoření stabilního zralého virionu (YUEN a CONSIGLI, 1983). Z infikovaných buněk byly v průběhu morfogeneze izolovány různé prekurzory virionů. Nukleoproteinové komplexy 75S a 90S byly identifikovány jako chromatinové struktury obsahující virovou DNA, dále byly izolovány komplexy 200S představující nezralé viriony a komplexy 240S odpovídající maturovaným virionům. Histony H2A, H2B, H3 a H4 se nacházely ve všech izolovaných nukleoproteinových komplexech, ale histon H1 se vyskytoval jen v komplexech 90S, ve kterých se zřejmě podílí na tvorbě minichromozómu.

Při morfogenezi viru SV40 byla v regulační oblasti genomu nalezena tzv. *ses* sekvence (SV40 encapsidation sequence), která je důležitá pro účinnou enkapsidaci. Tato sekvence je rozpoznávána buněčným transkripčním faktorem Sp1 a předpokládá se, že Sp1 zprostředkovává vazbu pentamerů SV40 na sekvenci *ses*, za vzniku iniciačního centra pro formování virionu (OPPENHEIM *et al.*, 1992). Tato hypotéza předpokládá, že je formování virionu zahájeno pouze z jednoho určitého místa virového minichromozómu (GORDON-SHAAG *et al.*, 1998, 2002). U myšího polyomaviru zatím žádná podobná sekvence nebyla identifikována.

## **2.4 Lidský BK virus (BKV)**

Lidský BK virus je přítomný v 85% populace jako perzistentní infekce ledvin. Primární infekce nastává v dětství (3-4 roky), probíhá bez příznaků a jen zřídka způsobuje klinické onemocnění, i když v některých případech se může objevit respirační onemocnění nebo onemocnění močových cest.

### **2.4.1 Přenos BK viru**

Pro přenos BK viru existuje několik hypotéz. Nejpravděpodobnější možností přenosu je přenos dýchacími cestami a aerosolem (DORRIES, 1998). Další možností je sexuální přenos, BKV byl detekován v 57% vzorků genitální tkáně a u 95% vzorků spermatu (MONINI *et al.*, 1996). Možný je též přenos přes placentu z matky na plod (PIETRAPAOLLO *et al.*, 1998). BOFILL-MAS *et al.* (2001) prokázali vysokou frekvenci výskytu lidských polyomavirů (BKV, JCV) v městských odpadních vodách, což naznačuje, že lidé jsou vystaveni vysoké koncentraci těchto virů. Další cesty přenosu mohou být krví nebo transplantovanými orgány.

### **2.4.2 Latence a reaktivace**

BK virus perzistuje v ledvinách, mozku a periferní krvi (DORRIES *et al.*, 1994). K aktivaci viru dochází u pacientů s oslabenou imunitou, např. u pacientů s HIV, nebo u pacientů po transplantaci, kterým jsou podávány imunosupresivní léky. Oslabení imunitního systému může vést k fatální reaktivaci viru vedoucí k zvýšené

virové replikaci a přítomnosti viru v moči, což bylo pozorováno u těhotných žen, pacientů s cukrovkou a starších lidí (REPLOEG *et al.*, 2001).

### **2.4.3 Infekce**

BKV byl poprvé izolován z moči pacienta po transplantaci ledvin (GARDNER *et al.*, 1971). V ledvinách také dochází nečastěji k aktivaci BK viru. BKV byl identifikován u pacientů s onemocněním ledvin, močového měchýře a po transplantaci kostní dřeně (APPERLEY *et al.*, 1987). Tento virus je také spojován s případy nemocí jako je zánět sítnice (HEDQUIST *et al.*, 1999), nefritida, zápal plic (SANDLER *et al.*, 1997) a encefalitida (VOLTZ *et al.*, 1997). SANDLER *et al.* (1997) popsali spojitost mezi virem BK a fatální pneumonií u osmiměsíčního dítěte po tansplantaci kostní dřeně.

### **2.4.4 Nádorový potenciál BKV**

Nebylo zatím prokázáno, zda BK virus přispívá k vytváření lidských nádorů. Nicméně DNA BK viru byla detekována v mozkových nádorech (DORRIES *et al.*, 1987), nádorech ledvin a močových cest (MONINI *et al.*, 1995), kostí (DE MATTEI *et al.*, 1995), slinivky (CORALLINI *et al.*, 1987) a dalších.

LT antigen BK viru interaguje s onkosupresorovým proteinem p53 a inhibuje jeho úlohu v odpovědi na poškození DNA (HARRIS *et al.*, 1998a). Váže se také na pRb onkosupresor (DYSON *et al.*, 1990; HARRIS *et al.*, 1998b).



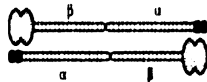
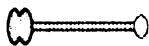



## 2.5 Buněčný cytoskelet

Cytoskelet - cytoplazmatický systém vláken hraje důležitou roli při udržování tvaru buňky, zvyšuje mechanickou pevnost cytoplazmatické membrány, je nezbytný při pohybu buňky a podél sítě jeho vláken jsou transportovány organely a další složky cytozolu buňky. Cytoskelet je vystavěn ze tří typů proteinových vláken – mikrofilament (Ø 8-9 nm), mikrotubulů (Ø 24 nm) a intermediárních filament (Ø 10 nm). Cytoskeletární filamenta jsou sestavena z proteinových podjednotek, které drží pohromadě na základě nekovalentních interakcí. Tato filamenta tvoří oporu plazmatické i jaderné membrány a uspořádává obsah buňky (LODISH *et al.*, 2003). Buňky využívají dva základní pohybové mechanismy: a) polymeraci a depolymeraci mikrofilament a mikrotubulů, tento mechanismus funguje především při změnách tvaru buňky, b) mechanismus založený na speciální skupině proteinů – motorových proteinech. Tyto proteiny využívají energii z rozštěpení ATP k mechanickému pohybu (k chůzi nebo klouzání podél mikrofilament nebo mikrotubulů) a mohou také transportovat organely a membránové váčky nebo umožňují pohyb cytoskeletárních vláken vůči sobě (COULOMBE *et al.*, 2000).

### 2.5.1 Mikrofilamenta

Aktinová vlákna se nacházejí ve všech eukaryotních buňkách a jsou důležitá pro pohyb buňky. Mikrofilamenta jsou tvořena dvěma formami aktinu: vlákny polymerního (F-„filamentous“) aktinu a monomerem (G-„globular“) aktinu. Aktinová vlákna nejsou neměnnou strukturou, mikrofilamenta neustále zkracují a prodlužují svou délku. Svazky (stresová vlákna) a sítě neustále vznikají a zanikají, což je důležité pro tvar a pohyb buněk (POLLARD *et al.*, 2001). Mikrofilamenta jsou organizována do sítí a svazků pomocí aktin vazebných proteinů (WINDER a AYSCOUGH, 2005). Ve svazcích jsou aktinová vlákna těsně paralelně svázána fascinovými spojkami, v sítích se obvykle křížují v pravém úhlu, pospojovaná filaminem. Mnoho těchto proteinů (tab. 2.1) patří do „*calponin homology-domain superfamily*“ (CH-domain rodiny). Každý z těchto proteinů má dvojici aktin vazebných domén, jejichž sekvence je homologní k sekvenci calponinu (svalový protein). Aktin vazebné sekvence jsou oddělené „coiled-coil“ (zavinuté vinutí) nebo  $\beta$ -listem imunoglobulinového motivu (STRADAL *et al.*, 1998). Aktinová kortikální síť určuje tvar a mechanické vlastnosti plazmatické membrány.

Na rozdíl od cytoplazmatického aktinu je role jaderného aktinu stále nejasná. Jedna z jeho možných funkcí je zprostředkování transportu RNA. Aktin asociuje s malými ribonukleoproteiny (snRNP), které hrají hlavní roli při tvorbě mRNA. Další jeho důležitá role je v exportu retrovirové RNA a buněčných proteinů z jádra. Aktin formuje komplexy různorodých jaderných nukleoproteinů (hnRNP), které váží a doprovázejí mRNA z místa transkripce do cytoplazmy. Jaderný aktin a aktinu příbuzné proteiny mají spojitost přestavbou chromatinu a v histon acetylázovém komplexu, což naznačuje roli jaderného aktinu v přestavbě chromatinu (BETTINGER *et al.*, 2004).

<b>protein</b>	<b>MW</b>	<b>lokalizace</b>	<b>organizace</b>
<b>CH-domain rodina</b>			
Fimbrin	68000	mikroklky výstelky střeva, aktinová vlákna kvasinek	
$\alpha$ -aktinin	102000	filopodia, lamelipodia, stresová vlákna	
spektrin	$\alpha$ : 280000 $\beta$ : 246000-275000	kortikální síť kortikální síť	
dystrophin	427000	svalová kortikální síť	
filamin	280000	filopodia, pseudopodia, stresová vlákna	
<b>další proteiny</b>			
fascin	55000	filopodia, lamelipodia, stresová vlákna, mikroklky střevní výstelky	
villin	92000	mikroklky střevní výstelky	



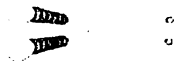
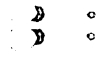

**Tab. 2.1:** K aktinu se vážající proteiny. Modře: aktin-vazebná doména, červeně: calmodulin-like  $\text{Ca}^{2+}$  doména, purpurově:  $\alpha$ -helikální opakování, zeleně:  $\beta$  list, oranžově: další domény (Převzato z LODISH *et al.*, 2003).

Aktinová filamenta rostou rychleji na plus-konci než na minus-konci. Plus-konec mikrofilament se prodlužuje 5-10 rychleji než minus-konec. Aktinové monomery v cytozolu nesou ATP, které je hydrolyzováno na ADP krátce po zapojení monomerů do rostoucího aktinového vlákna. Molekuly ADP zůstávají zachyceny uvnitř aktinového vlákna bez možnosti výměny za ATP, dokud se aktinové

monomery, které je nesou, neoddělí od vlákna a nedostanou se zpět do monomerní formy (COOPER a SCHAFER 2000).

### 2.5.1.1 Myoziny

Myoziny jsou složeny z jednoho nebo dvou těžkých řetězců a jednoho nebo více lehkých řetězců (KRENDEL a MOOSEKER, 2005). Těžký řetězec obsahuje N-koncovou doménu, která váže aktinová vlákna a hydrolyzuje ATP, ve spojení s „neck“ doménou vzniká energie potřebná pro pohyb podél aktinových vláken – směrem od minus-konce k plus-konci vláken. Výjimkou je myozin VI, který zprostředkovává pohyb váčků k minus-konci vláken (KRENDEL a MOOSEKER, 2005). V buňkách existuje několik dalších typů myozinů, myoziny I, V a VI, které zajišťují intracelulární transport váčků podél aktinových vláken (TUXWORTH *et al.*, 2000). Myozin XI je odpovědný za cytoplazmatické proudění. Zástupci rodiny myozinů II jsou i v nesvalových buňkách. Myozin II tvoří s aktinem kontraktilní struktury.

Typ	struktura	aktivita
I		vazba membrán, endocytických váčků
II		posouvání vláken (klouzání)
V		transport váčků
VI		endocytóza
XI		cytoplazmatické proudění

**Tab. 2.2:** Přehled motorových proteinů - myozinů. (Převzato z LODISH *et al.*, 2003).

### 2.5.2 Intermidiární filamenta

Intermediární filamenta jsou velmi pevná a jejich hlavní funkcí je překonat mechanický stres, ke kterému dochází při natažení buněk (COULOMBE *et al.*, 2000). Intermidiární filamenta jsou ze všech tří typů cytoskeletárních vláken jediná,

kteřá snášejí působení koncentrovaných roztoků solí a silných neiontových detergentů. Intermediární filamta se nacházejí ve všech buňkách mnohobuněčných organizmů (s výjimkou rostlinných buněk a hub). Nejčastěji tvoří cytoplazmatickou síť, která obklopuje jádro. Od jádra dosahují až k perifirii buňky, kde jsou zakotvena do plazmatické membrány v místech mezibuněčných spojů. Intermediární filamta se nacházejí i v buněčném jádře, kde pod jadernou lamínou leží síť filament – jaderná lamina. Jaderná lamina podpírá a zesiluje jadernou membránu všech eukaryontních buněk (COULOMBRE *et al.*, 2002). Intermediární filamta jsou na rozdíl od aktinu a tubulinu tvořena mnoha proteiny (STUURMAN *et al.*, 1998; COULOMBRE *et al.*, 2002; HELFAND *et al.*, 2004). Tyto proteiny se liší molekulovou hmotností i sekvencí, jejich společným znakem je přítomnost vysokého počtu  $\alpha$ -helixů. Proteiny tvořící intermediární filamta můžeme na základě jejich sekvence a molekulové hmotnosti rozdělit do 4 skupin (tab. 2.3).

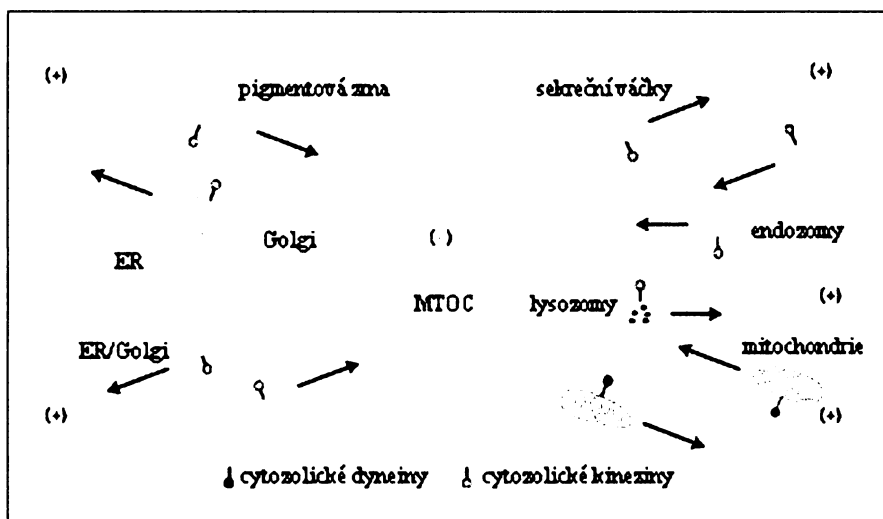
Protein intermediárních filament	Molekulová hmotnost (kDa)	Distribuce v tkáních
<b>JADERNÁ LAMINA</b>		
Lamin A	70	jádro
Lamin B	67	jádro
Lamin C	67	jádro
<b>KERATINY</b>		
Kyselé keratiny	40-57	epitely
Zásadité keratiny	53-67	epitely
<b>TYP III</b>		
Vimentin	57	tkáňe
mezodermálního původu		
Desmin	53	svaly
GFAP (glial fibrillary acidic protein)	50	gliální buňky a astrocyty
periferin	57	neurony
<b>NEUROFILAMENTA</b>		
Lehká neurofilamenta	62	neurony
Střední neurofilamenta	102	neurony
Těžká neurofilamenta	110	neurony
Internexin	66	vyvíjející se centrální nervový systém

**Tab. 2.3:** Proteiny intermediárních filament savců (Převzato z LODISH *et al.*, 2003).



### 2.5.3 Mikrotubuly

Hlavní funkcí cytoplazmatických mikrotubulů je určování pozice membránových buněčných organel a řízení transportu uvnitř buňky, transport váčků a organel (obr.2.9). Mikrotubuly se účastní buněčných pohybů – zajišťují rozchod chromozomů při mitóze, transport váčků v cytoplazmě, pohyby bičíků a řasinek.



**Obr.2.9:** Model buněčného transportu zprostředkovaného motory kineziny a dyneiny. Mikrotubuly vybíhají z MTOC a jsou orientovány svým (+) koncem k periférii buňky. Kinezinem zprostředkovaný anterográdní transport (červeně) transportuje mitochondrie, lysozomy, váčky do endoplazmatického retikula (ER) nebo na okraj buňky. Cytoplasmickým dyneinem zprostředkovaný retrográdní transport (zeleně) transportuje mitochondrie, části ER a endozomy do centra buňky. (Převzato z LODISH *et al.*, 2003).

Mikrotubuly jsou tvořeny z molekul  $\alpha$  a  $\beta$ -tubulinu, spojených pevnými nekovalentními vazbami. Podobně jako u mikrofilament je možné u mikrotubulů rozlišit plus-konec ( $\beta$ -tubulin) a minus-konec ( $\alpha$ -tubulin). Na plus-konci probíhá rychleji polymerace a na minus-konci depolymerace. Polymerace mikrotubulů začíná v buňce v organizačním centru mikrotubulů (MTOC), v živočišných buňkách je takovým centrem centromera. Centromera se obvykle nachází poblíž jádra, směrem k centromere jsou orientovány minus-konce mikrotubulů.

Tubulinové dimery nesou molekulu GTP, ta je hydrolyzována na GDP (stále pevně vázané). Tubulinové molekuly s pevně navázaným GTP se efektivně uspořádávají do stěny mikrotubulu, zatímco molekuly s navázaným GDP mají odlišnou konformaci a vazby mezi nimi jsou slabší, což vede ke zkracování mikrotubulu

(DESAI a MITCHISON, 1997). Stabilita, polymerace i depolymerace mikrotubulů jsou regulovány MAP (microtubule associated proteins).

### 2.5.3.1 Kineziny a dyneiny

Transport podél mikrotubulů zajišťují motorové proteiny z rodin kinezinů a dyneinů (tab. 2.4) (VALE 1987; WOHLKE *et al.*, 2000, AKHMANOVA a HOOGENRAAD, 2005). Kineziny se pohybují směrem k plus-konci mikrotubulu (anterográdní transport), zatímco dyneiny k minus-konci (retrográdní transport). Oba typy motorů transportují přes svůj receptor navázaný náklad, při čemž využívají energii z hydrolyzy molekuly ATP (HIROKAWA 1998).

třída		náklad	směr pohybu
Cytosolické motorové proteiny	Kineziny (I,KIFIA, KIFIB)	Váčky/organely cytozolu	( + )
	Cytosolický dynein	Váčky/organely cytozolu	( - )
	Kinezin II	Váčky/organely cytozolu	( + )
	Kinezin BimC (bipolar)	Mikrotubuly	( + )
Mitotické motorové proteiny	Chromokineziny	Chromozomy	( + )
	MCAK	Kinetochory	( + )
	CENP-E	Kinetochory	( + )
	Kinezin Ncd	Mikrotubuly	( - )
	Cytosolický dynein	Kinetochory, centromery	( - )
Axonemální motorové proteiny	Dyneiny	Mikrotubuly v řasinkách a bičících	( - )

**Tab. 2.4:** Molekulové motorové proteiny pohánějící vnitrobuněčný transport. V posledním sloupci je směr pohybu motorových proteinů buď směrem k (+) konci nebo k (-) konci mikrotubulů (Převzato z LODISH *et al.*, 2003).

### 2.5.4 Látky ovlivňující dynamiku cytoskeletu

Látky rozrušující strukturu a funkci aktinových mikrofilament nebo mikrotubulů mohou sloužit pro studium interakce viru s cytoskeletem hostitelské buňky. Tyto látky mohou mít také vedlejší účinky, rozsáhlá přestavba cytoskeletu je doprovázena aktivací některých signálních drah.

**Latrunculin A** je toxin vázající aktin, který je produkován různými druhy mořských hub. Tato látka inhibuje polymerizaci aktinu *in vivo* (SPECTOR *et al.*, 1999), váže se na G-aktin. Struktura Latrunculinu A (volného i navázaného na aktin) byla určena pomocí krystalografie (MORTON *et al.*, 2000, AYSCOUGH *et al.*, 1997). Studie potvrdila, že vazebné místo pro Latrunculin se nachází v blízkosti nukleotid-vazebného místa.

**Cytochalazin D (Zygosporin A)** je účinný inhibitor polymerizace aktinu, váže se na plus-konec F-aktinu (URBANIK a WARE, 1989). Je to toxin získávaný z hub. Tato látka rozrušuje aktinová mikrofilamenta a aktivuje dráhu závislou na p53 způsobující zadržení buňky v G1/S fázi (RUBTSOVA *et al.*, 1998). Extracelulární aktivace buňky tímto inhibitorem spouští proti-apoptotickou signální dráhu (AILENBERG a SILVERMAN, 2002). Cytochalaziny mají i další inhibiční vliv na kontrakci hladkého svalstva (SAITO *et al.*, 1996) a na inzulin-stimulovaný transport glukózy (TSAKIRIDIS *et al.*, 1994).

**Jasplakinolid** je široce užívaný při studiu transportu virionů. Tato látka udržuje aktinovou síť (F-aktin) v přirozených podmínkách (podobně jako taxol udržuje mikrotubuly) v nedynamickém stavu. Jasplakinolid je cyklický peptid získávaný z mořských hub. Biochemické studie ukázaly, že tato látka váže a stabilizuje F-aktin *in vitro* (BUBB, 1994), ale *in vivo* nejdříve rozruší aktinová vlákna a podporuje polymeraci aktinu do amorfních struktur (BUBB, 1999). Částečná reorganizace aktinových vláken změní buněčnou architekturu (SENDAROWICZ *et al.*, 1995) a v některých buňkách může aktivovat signální dráhu vedoucí k apoptóze (WHITE *et al.*, 2001).

**Nocodazol** inhibuje polymerizaci volných molekul tubulinu při vazbě na argininový zbytek podjednotky  $\beta$ -tubulinu (VASQUEZ *et al.*, 1997) a stimuluje vnitřní GTPázovou aktivitu tubulinu (MEJILLANO *et al.*, 1996). Nocodazol rozrušuje centrum organizace mikrotubulů (MTOC) a zadržuje buňky v G<sub>2</sub>/M fázi buněčného cyklu (JORDAN *et al.*, 1992). Tento inhibitor také aktivuje c-Jun stresem se aktivující protein kinázu (WANG *et al.*, 1998), která je spojena se signalizací apoptózy. Dalším vedlejším vlivem Nocodazolu je fragmentace Golgiho aparátu (STORRIE *et al.*, 1998).

**Taxol (paclitaxel)** se váže na N-koncovou oblast  $\beta$ -tubulinu. Podporuje uspořádání mikrotubulů, které odolává jejich depolymerizaci a tak zabraňuje dělení buňky a udržuje buňku v G<sub>2</sub> fázi buněčného cyklu (JORDAN *et al.*, 1998).

**Colcemid (Demecolcine)** způsobuje depolymerizaci mikrotubulů a udržuje buňky v metafázi. Colcemid je široce užíván k synchronizaci buněk.

### **2.5.5 Interakce virionů s cytoskeletem**

Aktinový a mikrotubulární cytoskelet hrají důležitou roli v životním cyklu všech virů. Uplatňuje se během internalizace, transportu viru do místa jeho replikace, transkripci, replikaci, skládání virionů, transportu virového potomstva z buňky nebo při šíření mezi buňkami (CUDMORE *et al.*, 1997, SODEIK 2000, SMITH a HELENIUS 2004). Viry jejichž replikace probíhá v buněčném jádře musí překonat dráhu od buněčného povrchu k jaderné membráně. Dráha začíná navázáním virionu na buněčný povrch a internalizací. Viriony jsou často transportovány uvnitř endocytických organel (SMITH a HELENIUS 2004). Některé viry využívají pro transport z jádra do cytoplazmy sekreční dráhy přes endoplazmatické retikulum (ER), Golgiho aparát (GA) nebo vezikulární transport. Na buněčné periferii bývá transport viru k jádru zprostředkováván především aktinovým systémem. Mnoho virových proteinů interaguje s aktin vazebnými proteiny nebo přímo s aktinem (CUDMORE *et al.*, 1997, PLOUBIDOU a WAY 2001, SMITH a ENQUIST 2002, DÖHNER a SODEIK 2004, SMITH a HELENIUS 2004). Infekční částice některých virů (retroviry, picornaviry a herpesviry) často obsahují aktin (CUDMORE *et al.*, 1997, PLOUBIDOU a WAY 2001). V další fázi transportu mohou viry využívat pohyb ve váčcích podél mikrotubulů nebo se pohybují podél mikrotubulů jako cytozolické virové komplexy. (SMITH a ENQUIST, 2002, DÖHNER *et al.*, 2005).

#### **2.5.5.1 Adsorpce viru na buněčný povrch**

Prvním krokem při vstupu viru do buňky je adsorpce na plazmatickou membránu. Navázání viru na receptor vyvolá konformační změnu receptoru, virionu nebo obou. Konformační změna zahájí internalizaci viru, např. endocytózou nebo fúzí (SIECZKARSKI a WHITTAKER, 2004; SMITH a HELENIUS, 2004). Vrstva F-aktinu ležící pod plazmatickou membránou – aktinový kortex je důležitá pro udržení tvaru buňky a pro buněčný pohyb (MITCHINSON a CRAMER, 1996).

Existuje několik způsobů, jak viry využívají cytoskelet a reagují s ním. Některé retroviry - HIV-1, HTLV-1 (human T-cell leukemia virus type 1) putují na povrchu

buňky směrem od konce filopodií (obr. 2.11(1)), za účelem internalizace u báze filopodií nebo se pohybují podél plazmatické membrány k oblasti obsahující klathrin (LEHMANN *et al.*, 2005). Buněčné „surfování“ vyžaduje dynamický aktin, myozin II a interakci virus-receptor. Během „surfování“ po membráně je virus pravděpodobně propojen cytozolicou doménou přes receptor s aktinovým vláknem uvnitř filopodia. Toto vlákno může být nataženo směrem k bázi filopodia od myozinu II, který je připojen k aktinovému kortexu (JAY, 2000). Aktinová vlákna postupně polymerují ve špičce filopodia, což je důležité k udržení jeho délky. „Surfování“ může sloužit k transportu viru do oblasti plazmatické membrány, kde je možná jeho internalizace.

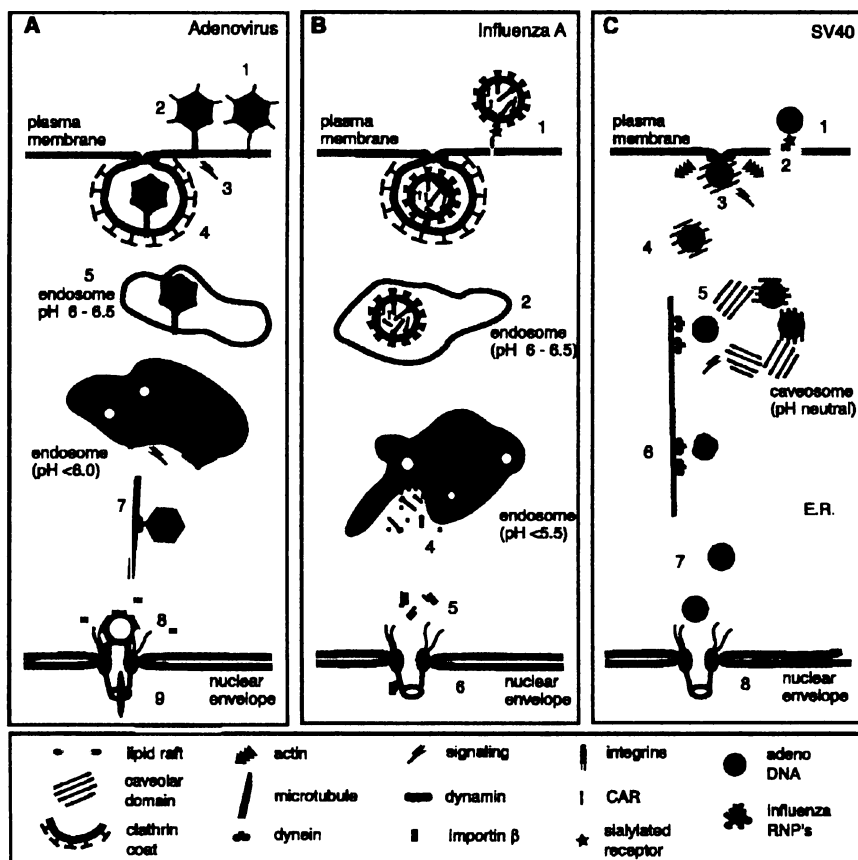
#### **2.5.5.2 Internalizace virionů**

Po navázání na povrch buňky čelí virus dvěma překážkám: plazmatické membráně a aktinovému kortexu. Různé viry využívají různé endocytické dráhy k transportu do cytoplazmy. Například Semliki Forest virus, virus chřipky a adenovirus vstupují klathrinem zprostředkovanou endocytózou (obr. 2.10 A, B), zatímco virus SV40 (obr. 2.10 C), další polyomaviry a některé picornaviry vstupují do buňky prostřednictvím caveol (obr. 2.11(3)) (SMITH a HELENIUS, 2004). Pozoruhodná je role aktinu při formování caveolárních a klathrinových váčků. Kortikální aktinová vlákna mohou sloužit jako „lešení“, které organizuje laterální pohyblivost caveol a klathrinových váčků. Dále slouží i při přenosu váčků přes aktinový kortex plazmatické membrány. Depolymerace aktinu podobně zvyšuje laterální pohyb klathrinových váčků v rovině plazmatické membrány (YARAR *et al.*, 2005).

Virus HIV, virus spalniček a herpes simplex virus, mohou přímo fúzovat s plazmatickou membránou (obr. 2.11(4)) a následně si musí sami najít svou cestu aktinovým kortexem (DÖHNER a SODEIK, 2004; SMITH a HELENIUS, 2004). Zřejmě využívají lokální destabilizace aktinové sítě.

V neinfikovaných buňkách je endocytóza a exocytóza doprovázena lokální aktinovou dynamikou, která může způsobit otevření kanálů pro průchod váčků plazmatickou membránou nebo poskytnout dráhy k jejich průchodu (APODACA, 2001; GINER *et al.*, 2005). Aktinový kortex proto není jen bariérou pro endocytózu, ale funguje i jako „lešení“ - moduluje invaginaci a rozrušení plazmatické membrány a může aktivně přispívat k transportu váčků (APODACA, 2001; YARAR *et al.*, 2005). Transport váčků z plazmatické membrány směrem k časným endozomům

může katalyzovat myozin VI, což dokazuje jeho kolokalizace s endocytickými váčky (BUSS *et al.*, 2004).



**Obr.2.10:** Vstup a transport adenoviru, viru chřipky a SV40 do buňky. (Převzato z SMITH a HELENIUS, 2004).

Vstup adenoviru 2 a některých retrovirů je blokován, pokud jsou aktinová vlákna stabilizována jasplakinolidem nebo destabilizována cytochalazinem D, což naznačuje nutnost dynamických aktinových vláken pro jejich vstup (MEIER *et al.*, 2002). Podobně u viru HIV bylo zjištěno, že účinnost infekce klesá pokud je inhibován Arp2/3 komplex zodpovědný za polymeraci aktinu (KOMANO *et al.*, 2004).

Viry mohou interferovat s buněčnými signálními dráhami a tak vyvolat přestavbu aktinu, která podporuje infekci. Například SV40 vyvolává fosforylaci tyrozinu způsobující depolymeraci aktinových stresových vláken. Dále inhibuje některé kinázové dráhy vedoucí k destabilizaci aktinového kortexu a tím následně k zvýšení účinnosti infekce viru SV40 (PELKMANS *et al.*, 2005).

### 2.5.5.3 Transport viru do jádra pomocí buněčného cytoskeletu

Po překonání aktinového kortexu (buď uvnitř váčků nebo samotnými viriony) může dojít k „přeskoku“ z aktinových mikrofilament na mikrotubuly a virus pokračuje v transportu do centra buňky. To může být způsobeno současnou nebo postupnou vazbou myozinu a dyneinu (RADTKE *et al.*, 2006). LIEBL *et al.* (manuscript v preparaci) pozorovali, že transport virionů myšího polyomaviru podél mikrotubulů probíhá ve stejném časovém intervalu, jako pohyb virionů aktinovými oblastmi. Je tedy možné, že mikrotubuly a mikrofilamenta jsou v transportu zapojeny současně a záleží na tom, který motor je k dispozici

Po internalizaci je virus transportován buď do cytozolu nebo do nukleoplazmy. Některé viry potřebují k účinnému transportu virových částic umístěných uvnitř endozomů směrem k jádru mikrotubuly a dynein. (obr. 2.9(5)) (SMITH a ENQUIST, 2002, DÖHNER *et al.*, 2005).

Adenoviry stimulují dyneinem zprostředkovaný transport během vstupu do buněk přechodnou aktivací protein kinázy A a p38/MAPK dráhy (SUOMALAINEN *et al.*, 2001). Adenovirus C, psí parvovirus, některé retroviry a virus chřipky jsou transportovány uvnitř váčků, ale opouští je buď na periferii buňky nebo později v blízkosti MTOC (SUOMALAINEN *et al.*, 1999, LAKADAMYALI *et al.*, 2003). Transport adeno-asociovaných virů je stejně jako u předchozích virů závislý na mikrotubulech (SEISENBERGER *et al.*, 2001).

Herpes simplex virus a virus HIV vstupují do buněk fúzí s plazmatickou membránou, vstupující částice využívají dynein a dynaktin (DÖHNER *et al.*, 2002, MCDONALD *et al.*, 2002). Zatímco DNA forma genomu HIV-1 a HTLV-1 je do jádra transportován nejprve aktinem, další pohyb může být však zprostředkován i pomocí mikrotubulů s využitím dyneinu (FACKLER a KRÄUSSLICH, 2006).

Virus vakcínie (VV) vytváří dva druhy virionů: IMV („intracellular mature virus“) a EEV („extracellular enveloped virus“). „Core“ VV se pohybuje po mikrotubulech. Během prvních 20 minut po vstupu VV je uvnitř „core“ transkribována mRNA, po uvolnění z „core“ je transportována podél mikrotubulů. Infekce wt (wild type) virem vakcínie indukuje v časně fázi infekce zakulacování buněk, které souvisí se smršťováním mikrotubulů a intermediárních filament z okraje buňky, čímž se mitochondrie a pozdní endozomy dostávají do blízkosti jádra (SCHEPIS *et al.*, 2006).

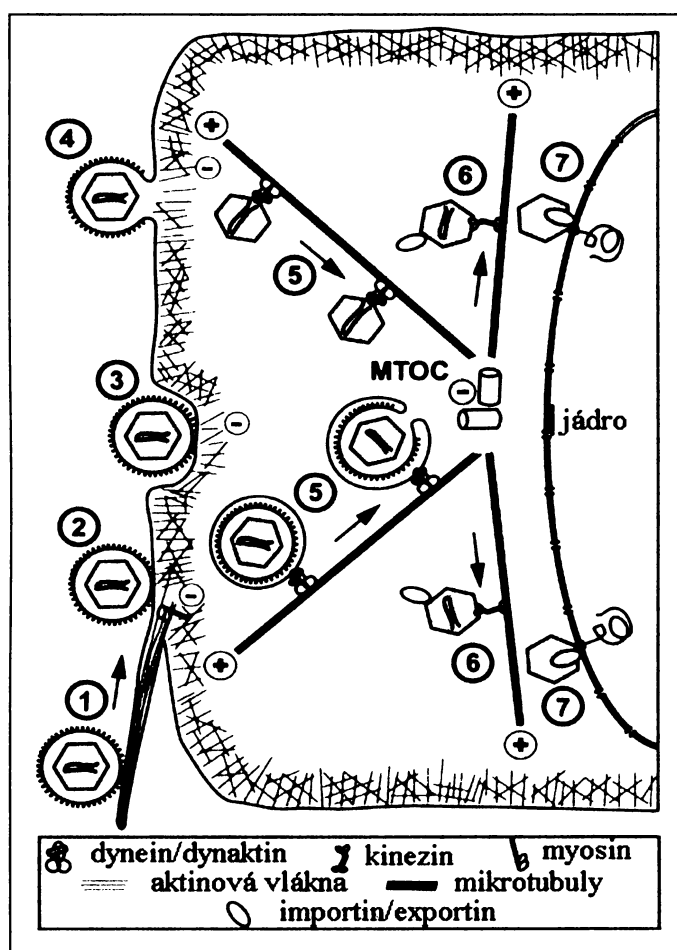
Některé IMV částice viru vakcínie se pohybují do blízkosti MTOC, kde splývají s membránou trans-Golgi aparátu nebo s časnými endozomy (SMITH *et al.*, 2003). Pohyb IMV vyžaduje mikrotubuly a VV protein A27L (což dokazuje inhibiční účinek nocodazolu nebo colchicinu a také efekt represe genu A27L). Protein A27L je multifunkční, je připojen k povrchu IMV a zajišťuje např. adsorpci VV na buněčný povrch a fúzi viru s buňkou. Akumulace IMV v blízkosti MTOC byla inhibována overexpresí p50/dynamitinu, který rozrušuje funkčnost dynein-dynaktinu (PLOUBIDOU *et al.*, 2000). Motorový protein dynein přenáší váčky a viriony k MTOC (obr. 2.11(5)). Rozrušení dynaktinu snižuje účinnost transportu viru vakcínie stejně jako u herpes simplex viru, adenoviru, směrem k MTOC (SUOMALAINEN *et al.*, 1999; PLOUBIDOU *et al.*, 2000; DÖHNER *et al.*, 2002). Důležitou roli v transportu viru představuje přechod viru z mikrotubulů jdoucích z MTOC na jaderný pór. Toto propojení je zprostředkováno dyneinem a jadernými importními a exportními faktory (obr. 2.11(6)). Nedávné studie ukázaly, že jaderný exportní faktor CRM1 je potřebný pro transport adenoviru z MTOC k jádru (STRUNZE *et al.*, 2005). Kineziny mohou katalyzovat mikrotubulární transport z MTOC k jádru. Zajímavé je, že CRM1 interaguje s proteinem RanBP2 (BERNAD *et al.*, 2004), který postupně váže kinezin-1 (CAI *et al.*, 2001). Cílem tohoto transportního mechanismu může být dosažení jaderného póru nebo místa replikace v cytozolu, následné „vybalení“ genomu a uvolnění do nukleoplazmy nebo do cytozolu. (obr. 2.11(7)) (WHITTAKER, 2003; GREBER a FORNEROD, 2004).

#### **2.5.5.4 Využití cytoskeletu při replikaci virového genomu**

Hlavním cílem vstupu virů do buněk je vytvoření virového potomstva. Po dosažení místa replikace (cytozolu nebo nukleoplazmy), je virový genom replikován a balen do nově syntetizovaných virových částic (obr. 2.12(1)). Replikační aparát hostitelské buňky je virem často využíván k transkripci, sestřihu, exportu mRNA a přestavbě chromatinu. Jaderný aktin může být součástí nukleoskeletonu a jaderné laminy (BETTINGER *et al.*, 2004; PEDERSON a AEBI, 2005). Motorový protein myozin I a jiné aktin vazebné proteiny jsou zapojeny v jaderné transkripci (PHILIMONENKO *et al.*, 2004). Jaderný aktin-myozinový systém může zprostředkovávat pohyb ND10 jaderných tělísek. Tento proces je modifikován mnoha viry, které se replikují v jádře (MURATANI *et al.*, 2002; SIMPSON-HOLLEY *et al.*, 2005; EVERETT, 2006).



Během replikace viru v cytoplasmě, mohou viry rovněž interagovat s cytoskeletem. mRNA viru vakcinie kolokalizuje s mikrotubuly, které jsou potřebné pro virovou genovou expresi (MALLARDO *et al.*, 2001, SCHRAMM a LOCKER, 2005). RNA genom lidského viru parainfluenza typu 3 je replikován a transkribován v asociaci s ribonukleoproteiny vázanými na aktinové vlákne. Depolymerace aktinu inhibuje syntézu virové RNA (GUPTA *et al.*, 1998). Nově nasyntetizované mRNA viru chřipky jsou asociovány s virovými nukleokapsidovými proteiny, které mohou vázat aktinová vlákna a tím regulovat jaderný import a export a udržovat ribonukleoproteinový komplex v cytozolu pro účinnější translaci proteinů.



**Obr.2.11:** Vstup virionů do buňky. Interakce některých rodin virů s cytoskeletem. O žádném z virů není známo, že by využíval všechny znázorněné mechanismy, ale může využívat různé strategie. Hypotetický virus je navázaný na plazmatickou membránu a pohybuje se podél filopodií (1) směrem k oblasti s vysokou endocytickou aktivitou (2), kde dochází k endocytóze (3). Případně může virus fúzovat s plazmatickou membránou (4). Po překonání aktinového kortexu buď jako součást endocytického váčku nebo je samotný virion transportován dyneinem/dynaktinem podél mikrotubulů směrem k MTOC (5). Od MTOC jsou viriony transportovány do jádra (6). Po navázání na jaderný pór, dojde k uvolnění virového genomu (7). (Převzato z RADTKE *et al.*, 2006).

### 2.5.5.5 Role cytoskeletu při skládání virionů

Po replikaci genomu a syntéze virových proteinů dochází k transportu virových částí do místa, kde dochází ke složení virových částic, přičemž jsou odlišnosti mezi jednotlivými skupinami virů. Po jaderné replikaci, může být virový genom transportován jaderným pórem jako u viru chřipky nebo HIV, nebo je genom balen v jadernou částici, jako v případě herpesviru, adenoviru a bakuloviru (WHITTAKER a HELENIUS, 1998, WHITTAKER, 2003, DÖHNER a SODEIK, 2004). V nedávných studiích bylo zjištěno, že virové potomstvo herpes simplex viru může být s pomocí jaderného aktinu aktivně transportováno k jaderné membráně za účelem vypuštění (FOREST *et al.*, 2005).

Export genomové RNA do cytozolu vyžaduje jaderný aktin (KIMURA *et al.*, 2000; HOFMANN *et al.*, 2001). RNA viru HIV obsahuje „Rev-responsible element“ a kolokalizuje s jaderným exportním faktorem CRM1 a Ran GTPázou na aktinových vláknech. Export RNA je snížen v přítomnosti látky rozrušující aktin – latrunculinu B. Po exportu do cytozolu je syntetizován virový protein gag, který připevní virovou RNA k aktinovým vláknům v blízkosti MTOC (POOLE *et al.*, 2005), čímž iniciuje další krok cesty viru.

Virové membránové proteiny a glykoproteiny jsou syntetizovány na ribozómech endoplazmatického retikula a transportovány směrem k Golgiho aparátu umístěného poblíž MTOC (obr. 2.12(4)) a dále do cílových oblastí virové morfogeneze.

Viry mají různé strategie pro skládání částic, to může probíhat v cytozolu, jádře, ER, Golgiho aparátu, tran-Golgiho aparátu, u plazmatické membrány nebo v endozomech (obr. 2.12(5)). (SMITH a ENQUIST, 2002, PELCHEN-MATTHEWS *et al.*, 2004).

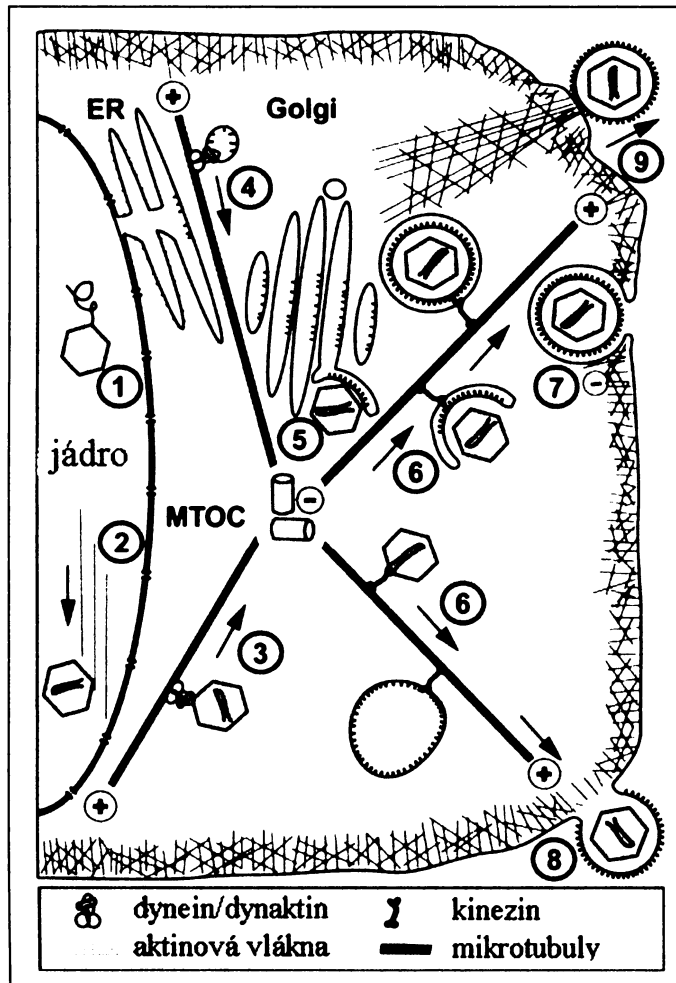
Částice IMV (intracellular mature virus) postupují směrem k MTOC (obr. 2.12(3)), pro tuto pozdní část cesty využívají dyneiny (PLOUBIDOU *et al.*, 2000). Kineziny mohou naopak transportovat nově nasyntetizované viriony EEV (extracellular enveloped virus) nebo sekreční váčky, které obsahují virové membránové proteiny nebo kompletní viriony k plazmatické membráně (RIETDORF *et al.*, 2001; JOUVENET *et al.*, 2004). Protein A36R viru vakcínie interaguje přímo s lehkým řetězcem kinezinu-1 (RIETDORF *et al.*, 2001; WARD a MOSS, 2004). Virus vakcínie s chybějícím A36R zprostředkovává transport podél mikrotubulů k okraji buňky se sníženou účinností (HERRERO-MARTINEZ *et al.*, 2005). Z toho plyne,

že virus vakcínie musí kódovat ještě jiný receptor pro plus-koncový transport podél mikrotubulů. Nejvhodnějším kandidátem se zdá být protein F12L (van EIJL *et al.*, 2002; SMITH *et al.*, 2005). Další objevené virové proteiny schopné interakce s kineziny zahrnují gag-polyprotein retrovirů a některé proteiny viru herpes simplex (TANG *et al.*, 1999; DIEFENBACH *et al.*, 2002; KOSHIZUKA *et al.*, 2005).

#### **2.5.5.6 Uvolnění virionů z buňky**

Kompletně složené viriony opouští buňku exocytózou nebo vypučením z plazmatické membrány (obr. 2.12 (7,8)), nebo po lyzi buňky a rozpadu plazmatické membrány a uvolnění virového potomstva. Poslední možnost je využívána adenoviry a jinými neobalenými viry a pravděpodobně nastává u všech virů indukujících buněčnou smrt (GAROFF *et al.*, 1998). Při opouštění buňky (např. při pučení) viriony opět překonávají aktinový kortex, který je pod plazmatickou membránou. Mechanismus rozrušení aktinové sítě při pučení částic HIV-1 viru zatím není znám. Nově vzniklé infekční virové částice HIV-1 obsahují části cytoskeletu, např.: aktin, aktin vazebné proteiny (ezrin/radexin/moesin) a cofilin (OTT *et al.*, 2000). Použití látek rozrušujících aktin (cytochalazin D, latrunculin B) vedlo k snížení uvolnění viru na 50 % (SASAKI *et al.*, 1995).

K šíření z buňky do okolních buněk využívá virus vakcínie aktinový cytoskelet neobvyklým způsobem. Částice IEV („intracellular enveloped virus“) putují nejprve k povrchu buněk po mikrotubulech a fúzíjí s plazmatickou membránou, zůstávají s ní propojeny a jsou charakterizovány jako CEV („cell-associated enveloped virus“) (SMITH *et al.*, 2003). Následně CEV aktivují rodinu Src kináz (NEWSOME *et al.*, 2004), které fosforylují tyrozinový zbytek virového membránového proteinu A36R (FRISCHKNECHT *et al.*, 1999). To vyvolá signál, následkem čehož dochází k uvolnění kinezinu-1 z proteinu A36R a dojde k zahájení polymerace aktinu, zahrnující aktin-jaderný komplex Arp2/3 (MOREAU *et al.*, 2002; NEWSOME *et al.*, 2004). Tento komplex indukuje polymeraci aktinu (obr. 2.12(9)) a umožňuje CEV pohyb ven z infikovaných buněk (SMITH *et al.*, 2003). V tomto procesu se uplatňují i aktinové „kometky“, které jsou iniciovány rodinami Src a Abl kináz. Tyto „kometky“ jsou zodpovědné za uvolnění a šíření CEV z buňky (REEVES *et al.*, 2005).



**obr. 2.12:** Skládání virionů a jejich uvolnění z buňky. Nově nasyntetizované kapsidy (1) jsou transportovány uvnitř jádra podél jaderného aktinu (2). Neobalené virové částice jsou transportovány pomocí motorového proteinu – dyneinu směrem k MTOC (3). Virové membránové proteiny jsou translatovány v membráně ER a transportovány podél mikrotubulů z ER do Golgiho aparátu (4), kde mohou vypučit (5). Viriony jsou transportovány podél mikrotubulů směrem k plazmatické membráně, pomocí kinezinu (6). Buď dosáhnou aktinového kortexu a opustí buňku exocytózou (7) nebo vypučí z plazmatické membrány (8). Z hostitelské buňky může být virus poháněn směrem k sousední buňce pomocí dynamické aktinové „kometky“ (9).

### **3. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE**

V naší laboratoři se zabýváme studiem mechanismů jednotlivých kroků infekce myším polyomavirem. Přitom se stále potýkáme s problémem kvality připravovaných virových preparátů. Pro studium jsme dosud používali kmen A2 a virus jsme pomnožovali na stabilní buněčné linii myších fibroblastů (3T6). Infektivita získávaných preparátů byla relativně nízká (vysoký poměr hemaglutinačních jednotek na infekční titr) a navíc klesala v průběhu purifikace i skladování. Ve snaze získat pro další práci virový izolát, který by dával vyšší výtěžky na dostupných buněčných liniích, bylo prvním cílem diplomové práce:

- 1. a) Připravit virové plaky jednak z tradičně v naší laboratoři používaného kmenu A2 ale také z izolátu P16, který získala naše laboratoř z Velké Britanie**
- b) Pomnožit viry z jednotlivých plaků a porovnat infekčnost A2 a P16 izolátů.**
- c) Zjistit sekvenci regulační oblasti genomu viru P16 a porovnat ji se známou sekvencí regulační oblasti A2**

Myší polyomavirus vstupuje do buněk endocytickou dráhou, k transportu využívá různé buněčné kompartmenty. K transportu v buněčných kompartmentech myší polyomavirus využívá cytoskelet. Již dříve bylo zjištěno, že při rozrušení mikrotubulární sítě (nocodazolem) dochází k úplné inhibici virové infekce. Inhibice je reverzibilní a po odstranění tubulin rozrušujícího agens se infektivita viru vrátí na stejnou hodnotu (LIEBL *et al.*, manuscript v preparaci). Z toho vyplývá, že myší polyomavirus využívá pro dopravu genomů do buněčného jádra mikrotubulární síť. V přítomnosti látek rozrušujících aktinová mikrofilamenta se sníží účinnost infekce asi na 50 %. Inhibice je rovněž reverzibilní. Po odstranění rozrušujících látek (na rozdíl od situace u tubulinového cytoskeletu) je účinnost infekce výrazně vyšší než v kontrolních buňkách, které nebyly v době pohybu viru k buněčnému jádru transientní depolymerizaci aktinu vystaveny. Druhým úkolem této práce bylo:

- 2. Dále studovat funkce aktinového a tubulinového cytoskeletu v pohybu virionů od buněčné membrány k buněčnému jádru a pokusit se identifikovat kompartment(y), ve kterých se myší polyomavirus nachází v přítomnosti cytoskelet rozrušujících látek.**

V současné době začínáme v naší laboratoři studovat také lidský polyomavirus BK. Tento virus, podobně jako ostatní polyomaviry primátů, má s myším polyomavirem řadu podobností ale také odlišností. Např. minoritní strukturní proteiny VP2 a VP3 mají ve srovnání s proteiny myšího polyomaviru delší C-konec, který jim udílí schopnost interagovat nespecificky s DNA. Této C- koncové doméně VP2 a VP3 viru JC se přisuzuje také schopnost dovést hlavní strukturní protein VP1 do specifických (PML) domén v buněčném jádře. Abychom mohli studovat rozdíly v pohybu buňkou a ve funkcích a vlastnostech proteinů BK viru a MPyV, musíme napřed získat protilátky proti jednotlivým virovým proteinům. Proto jsme se rozhodli připravit strukturní proteiny a umělé virové částice v bakulovirovém expresním systému a produkty využít mimo jiné pro přípravu monoklonálních protilátek. Já jsem navíc k úkolům své diplomové práce přidala úkol třetí:

- 3. a) Konstruovat rekombinantní plazmid a izolovat bakulovirus pro expresi proteinů VP1 a VP3 polyomaviru BK.**
- b) Z hmyzích buněk infikovaných rekombinantním bakulovirem izolovat a charakterizovat kapsidy složené z obou produkovaných proteinů.**

## **4. MATERIÁL A METODY**



## 4.1 Přístroje

Aparatura pro SDS-PAGE (Hoefler)

Aparatura pro western blotting (Biorad)

Centrifuga GS-15R, rotor S4180 (Beckman)

Centrifuga Megafuge 1.0R (Heraeus Sepatech)

Centrifuga Microfuge Lite Centrifuge (Beckman)

CO<sub>2</sub> termostat (Forma Scientific)

Elektroforéza E-C Apparatus corporation (Hoefler)

Elektronový mikroskop JEOL JEM 1200EX

Elektroporátor Gene Pulser Apparatus (Biorad)

Fluorescenční mikroskop BX-60 (Olympus)

Fluorescenční mikroskop Olympus IX 81

Invertovaný mikroskop Olympus CK 40

Konfokální mikroskop LCS SP2 Laser scanning confocal microscope (Leica)

Kultivační přístroje (Labnet, Lab Therm)

Lupa s bočním osvětlením (Olympus)

Mikrocentrifuga Beckman Mikrofuge Centrifuge, rotor F241,5

PCR aparatura MiniCycler<sup>TM</sup> (MJ Research)

Sonikátor Soniprep 150 (Schoeller Pharmacia Praha)

Sonikátor UP50H (Schoeller Pharmacia Praha)

Sonikátor Branson 5 (Cole-Parmer Instrument Company)

Spektrofotometr Spekol 11 (Carl Zeiss-Jena)

Termostat TCH 100 (laboratorní přístroje Praha)

Třepačka (Labnet)

Ultracentrifuga L5-50B, rotory SW28, SW41 (Beckman)

UV transiluminátor (Biolum)

Vortex-Genie 2 (Scientific Industries)

## 4.2 Materiál

### 4.2.1 Chemikálie

<b>Chemikálie</b>	<u>Výrobce</u>
Agaróza pro elektroforézu	Sigma, Serva
Akrylamid	Serva
Amonium persulfát	Serva
Ampicilin	Léčiva
Antibiotika pro TK	KRD
Baktopepton	Imuna
Bovinní sérový albumin (BSA)	Sigma
Bromfenolová modř (BFM)	Lachema
Cesium chlorid CsCl	Serva
Dihydrogenfosforečnan draselný	Lachema
Disodná sůl kyseliny diethyltetraoctové (EDTA)	Sigma
dNTP	Sigma
Dithiotreitol (DTT)	Roche
Ethanol	Lachema
Ethidium bromid (EtBr)	Lachema
Fenol	Lachema
Fetální telecí sérum (FCS)	Sigma
Glycerol	Lachema
Glycin	Serva
Glukóza	Serva
Glutathion	Sigma
Hydrogenfosforečnan disodný (dodekahydrát)	Lachema
Hydroxid sodný	Lachema
Chlorid draselný	Lachema
Chlorid sodný	Sigma
Chlorid hořečnatý	Lachema
Chlorid vápenatý	Sigma
Chloroform	Lachema
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktosid (IPTG)	Fermentas



Izopropanol	Lachema
Kyselina boritá	Serva
Kyselina fosforečná	Lachema
Kyselina chloristá	Lachema
Kyselina chlorovodíková	Lachema
Kyselina octová	Lachema
Kyselina p-kumarová	Sigma
Kvasničný autolyzát	Imuna
L-glutamin	Sigma
Luminol	Serva
$\beta$ -merkaptoethanol	Serva
Methanol	Lachema
Octan draselný (KAc)	Lachema
Octan hořečnatý (MgAc)	Lachema
Octan sodný (NaAc)	Lachema
Polyethylenglykol (PEG)	Serva
Síran hořečnatý	Lachema
Dodecylsulfát sodný	Sigma
N,N,N',N' – Tetramethylethylenediamin (TEMED)	Sigma
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Sigma
Triton X-100	Sigma
Živný agar (ŽA č. 2)	Imuna
Živný bujón (ŽB č. 2)	Imuna

## 4.2.2 Roztoky

**BFM:** 50% glycerol

0,13 M EDTA-NaOH (pH 8.0)

0,12% brom-fenolová modř

**Blotovací pufr:** 25 mM Tris

195 mM glycin

20% methanol

**B pufr:** 10 mM Tris (pH 7.4)

150 mM NaCl

0,01 mM CaCl<sub>2</sub>

**Elektroforetický pufr (10x):** 250 mM Tris

1,92 mM glycin

1% SDS

**Eluční pufr:** 20 mM redukovaný glutathion

100 mM Tris-HCl (pH 8.0)

120 mM NaCl

**Extrační pufr:** 10 mM Tris pH 8.0

5 mM EDTA

0.5% SDS

**Lyzační pufr:** 0.03 M Tris pH 7.5

0.01 M MgAc

1% NP-40

**PBS (10x) (0,5 l):** 40,9 g NaCl

1 g KCl

17,9 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O

1,22 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

**TBE pufr** (Tris – borátový – EDTA): 40 mM Tris-HCl (pH 8.0)  
2 mM EDTA-NaOH (pH 8.0)  
90 mM kyselina boritá

**TE pufr:** 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)  
1 mM EDTA-NaOH (pH 8.0)

**„SDS loading pufr“ (5x):** 5% SDS  
50 mM Tris-HCl (pH 6.8)  
50% glycerol  
25%  $\beta$ -merkaptoethanol  
0,005% bromfenolová modř

**SOC médium:** 2% baktopepton  
0.5% kvasničný autolyzát  
10 mM NaCl  
2.5 mM KCl  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 mM MgSO<sub>4</sub>  
20mM glukóza

MgCl<sub>2</sub> a MgSO<sub>4</sub> byly sterilizovány samostatně a k médiu přidávány až před použitím.

**Upravený fenol:** Destilovaný pufrovaný 1 M Tris-HCl (pH 8,0), s přidáním 0,1% 8- hydroxychinolinu

**Upravený chloroform:** chloroform s izoamylalkoholem (24:1 – w/v)

**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

**Roztok III:** 60 ml 5 M octanu draselného

11,5 ml ledové kyseliny octové

28,5 ml destilované vody

**Roztok pro spodní gel pro PAGE:** 4 ml 30% akrylamidu

1 ml 1M Tris-HCl (pH 8.8)

120  $\mu$ l 10% SDS

3,25 ml demineralizované vody

40  $\mu$ l 10% amonium persulfát

8,5  $\mu$ l TEMED

**Roztok pro horní gel pro PAGE:** 0,5 ml 30% akrylamidu

0,375 ml 1M Tris-HCl (pH 6.8)

30  $\mu$ l 10% SDS

2,11 ml demineralizované vody

20  $\mu$ l 10% amonium persulfát

5  $\mu$ l TEMED

**2% fosfowolframová kyselina** (pH=7,0) (Fluka)

#### **4.2.3 Média a roztoky pro tkáňové kultury**

**DMEM médium se sérem:** DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)(Sigma)

10% fetální bovinní sérum (Sigma)

2 mM L–glutamin (Gibco)

1/100 objemu směsi antibiotik pro TK (Sigma)

**DMEM medium bez séra:** DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)(Sigma)

2 mM L–glutamin (Gibco)

**Hmyzí médium se sérem:** TNM-FH insect medium (Sigma)

10% fetální bovinní albumin (Sigma)

1/100 objemu směsi antibiotik pro TK (Sigma)

**Hmyzí médium bez séra:** TNM-FH insect medium (Sigma)

**Versen** (Sevac)

**Trypsin** (Sigma)

#### 4.2.4 Antibiotika

**Ampicilin (Léčiva):** používán v konečné koncentraci 100 $\mu$ g/ml

**Gentamycin (Gibco):** používán v konečné koncentraci 7 $\mu$ g/ml

**Kanamycin (Sigma):** používán v konečné koncentraci 50 $\mu$ g/ml

**Tetracyklin (Sigma):** používán v konečné koncentraci 10 $\mu$ g/ml

**Směs antibiotik pro tkáňové kultury:** Ampicilin (Léčiva) je používán v konečné koncentraci 100 $\mu$ g/ml. Směs antibiotik pro tkáňové kultury: používaný 100x koncentrovaný roztok obsahuje na 1 ml – 10 000 jednotek penicilinu, 10 mg streptomycinu, 25 mg amphotericinu B.

#### 4.2.5 Enzymy

Alkalická fosfatáza (CIAP) (Boehringer Mannheim)

DNA Polymeráza (Fermentas)

**Ribonukleáza A (RNáza A), (Sigma) – koncentrace 10mg/ml**

T4 DNA Ligáza (Fermentas)

Restrikční endonukleázy (RE), (Fermentas): Nde I

Nhe I

Pst I

Sma I

Xba I

#### 4.2.6 Pufry

Pufir pro DNA polymerázu (Fermentas): 20 mM Tris – HCl (pH 7.8)

10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

10 mM KCl

1% Triton X-100

0.1 mg/ml BSA

Pufir pro T4 DNA ligázu (Fermentas): 40 mM Tris – HCl (pH 7.8)

10 mM MgCl<sub>2</sub>

10 mM DTT

5 mM ATP

Pufr O<sup>+</sup> (Fermentas): 50 mM Tris – HCl (pH 7.5)

10 mM MgCl<sub>2</sub>

100 mM NaCl

0,1 mg/ml BSA

Pufr Y<sup>+</sup>/TANGO (Fermentas): 33 mM Tris – HCl (pH 7.9)

10 mM octan hořečnatý

66 mM octan draselný

0,1 mg/ml BSA

Pufr pro CIAP (Boehringer Mannheim): 10 mM Tris – HCl (pH 8.3)

1 mM MgCl<sub>2</sub>

1 mM ZnCl<sub>2</sub>

#### **4.2.7 Markery molekulových vah**

**DNA marker λ DNA/Pst I:** DNA fága λ štěpená restriční endonukleázou Pst I.

Velikosti fragmentů po štěpení Pst I (bp): 11501\*, 5077, 4749, 4507, 2838, 2556\*, 2459, 2443, 2140, 1986, 1700, 1159, 1093, 805, 514, 468, 448, 339, 264, 247.

Kohezivní konce o přesahu 12 bází fragmentů 11501 a 2556 (označených \*) mohou asociovat a vytvářet další fragment o velikosti 14057 bp.

#### **SDS – PAGE marker molekulových vah (Sigma):**

α<sub>2</sub> – makroglobulin (187,3 kDa)

β – galaktosidáza (116,1 kDa)

Lactoferrin (100,6 kDa)

Pyruvátkináza (70,3 kDa)

Fumaráza (60,4 kDa)

Laktátdehydrogenáza (37,3 kDa)

Triózofosfátizomeráza (33,3 kDa)



## 4.2.8 Protilátky

### Primární protilátky:

**Anti-PyVP1-A1:** myší monoklonální protilátka proti VP1 (neředěná) (Morávková 2001)

**Anti-VP1 sérum:** králičí sérum proti VP1 částicím izolovaných z hmyzích buněk po infekci rekombinantním bakulovirem (ředění 1:1000) (D.Liebl, PhD, vyrobeno v Ústavu molekulární genetiky AV ČR, Praha)

**Anti-BiP (GRP94):** krysí monoklonální protilátka proti proteinu endoplazmatického retikula GRP94 (ředění 1:100) (Alexis)

**Anti-EEA1:** kozí polyklonální protilátka proti EEA1 (ředění 1:100) (Santa Cruz Biotechnology)

**Anti- $\alpha$ tubulin:** myší monoklonální protilátka proti  $\alpha$  tubulinu (ředění 1:200) (Exbio)

**Anti-kaveolin-1:** králičí monoklonální protilátka proti kaveolinu-1 (ředění 1:200) (Santa Cruz Biotechnology)

**Anti-LAMP-2:** krysí monoklonální protilátka proti LAMP2 (ředění 1:50) (Developmental Studies Hybridoma Bank, The University of Iowa)

**Anti-Rab11:** králičí monoklonální protilátka proti Rab11 (ředění 1:300) (Zymed 71-5300)

**Anti-Ubiquitin:** myší monoklonální protilátka proti ubiquitinu (ředění 1:100) (Santa Cruz Biotechnology)

**Anti-C1 a C4:** krysí monoklonální protilátka proti společné oblasti (common region) časných antigenů myšího polyomaviru (neředěná, používaná jako směs v poměru 1:1) (S. Dilworth, Imperial College School of Medicine, London)

**Anti LT4:** krysí monoklonální protilátka proti antigenu LT (ředění 1:5) (S. Dilworth, Imperial College School of Medicine, London)

**Anti-SV40 VP2/3:** králičí protilátka proti proteinům VP2/VP3 BK viru (ředění 1:1000) (poskytnuto A.Oppenheim)

**Anti-VP1:** králičí polyklonální protilátka proti VP1 (ředění 1:250) (vyrobena v naší laboratoři)

**Phalloidin** konjugovaný s rhodaminem (ředění 1:800)

### **Sekundární protilátky:**

- Oslí polyklonální protilátka proti myším imunoglobulinům Alexa fluor 488 nm (ředění 1:1000) (Molecular Probes)
- Oslí imunoglobuliny namířené proti krysím imunoglobulinům Alexa fluor 488 (ředěna 1:1000) (Molecular Probes)
- Kozí polyklonální protilátka proti králičím imunoglobulinům Alexa fluor 488 nm (ředění 1:2000) (Molecular Probes)
- Kuřecí polyklonální protilátka proti králičím imunoglobulinům Alexa fluor 488 nm (ředění 1:1000) (Molecular Probes)
- Kozí polyklonální protilátka proti myším imunoglobulinům Alexa fluor 546 nm (ředění 1:1000) (Molecular Probes)
- Kozí polyklonální protilátka proti krysím imunoglobulinům Alexa fluor 546 nm (ředění 1:1000) (Molecular Probes)
- Oslí polyklonální protilátka proti kozím imunoglobulinům Alexa fluor 546 nm (ředění 1:1000) (Molecular Probes)
- Oslí polyklonální protilátka proti krysím imunoglobulinům Alexa fluor 594 nm (ředění 1:1000) (Molecular Probes)
- Kozí polyklonální protilátka proti králičím imunoglobulinům Alexa fluor 594 nm (ředění 1:1000) (Molecular Probes)
- Oslí protilátka proti králičím imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou (ředění 1:1000) (Amersham, 87136)

### **4.2.9 Primery pro PCR reakci**

**VP3BKVSmaI:**5' GTGGCA CCCGGG ATGGCTTTGGAATTGTTTAACC 3'

Kurzívou je vyznačeno restrikční místo pro *SmaI*, tučně komplementární sekvence k amplifikovanému genu

**Pfb Dual-VP2B:**5' GAGGGC GCTAGC TTAAGTTCTAGAACTTCTACTCC 3'

Kurzívou je vyznačeno restrikční místo pro *NheI*, tučně komplementární sekvence k amplifikovanému genu

Primery pro amplifikaci regulační oblasti polyomaviru:

**REG-LTer:** 5' GCTCAGAACTCTATCCATG 3'

(oblast 173-192 nukleotidů viru A2)

**REG-VP2:** 5' GTCAGTGCGGCTCCCAT 3'

(oblast 4985-5004 nukleotidů viru A2)

#### **4.2.10 Použité buňky, viry, bakteriální kmeny a plazmidy**

##### **Buněčné linie:**

Buněčná linie NIH 3T6 – stabilní linie myších fibroblastů, senzitivní a permisivní pro myší polyomavirus (Prof.Griffin, Royal Postgraduate School, London)

Buněčná linie NMuMG (Normal Murine Mammary Gland Cells) – myší buňky epitelu prsní žlázy, senzitivní a permisivní pro myší polyomavirus (Monique Berrebi, CNRS, Francie)

Buněčná linie WOP – myší embryonální fibroblasty 3T3 transformované velkým T antigenem polyomaviru

Primární buňky WME (whole mouse embryo cells) – myší embryonální buňky (linie připravená Mgr. M. Stančíkovou)

Buněčná linie Sf9 – linie hmyzích buněk odvozená z tkáně ovarií motýla *Spodoptera frugiperda* (American Type Culture Collection No. CRL-1711)

##### **Viry:**

Myší polyomavirus kmen A2 (poskytnutý B.Griffin)

Myší polyomavirus kmen P16 (poskytnutý B. Griffin)

Myší polyomavirus (prof. Amati, Universita La Sapienza, Rome)

##### **Bakteriální kmeny:**

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ : supE44,  $\Delta$ lacU169 ( $\Phi$ 80 lac Z $\Delta$ M15), hsdR17, racA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1

*Escherichia coli* DH10Bac: F- mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) f80lacZDM15 lacX74 deoR recA1 end A1 araD139 (ara,leu)7697 ga/U ga/K -rpsL nupG/bMON14272/pMON7124

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

## **Plazmidy:**

- PFastBacDual-VP1: Bakulovirový transferový vektor určený pro Bac-toBac systém. Selektce pomocí *amp<sup>r</sup>* a *gen<sup>r</sup>*. (Invitrogen)
- pBluescript II KS (+)-BK: Plazmid s vloženým genomem BK viru. Selektce pomocí *amp<sup>r</sup>*. (poskytnuto K. Dorries)
- pMJG: plazmid obsahující polyomavirový genom (KRAUCEWITZ *et al.*, 1990)

## **4.3 Metody**

### **4.3.1 Sterilizace**

Veškeré roztoky, špičky k mikropipetám a mikrozkušavky byly sterilizovány v autoklávu (30 minut, 120 kPa, 127°C).

Roztoky, které nemohly být sterilizovány v autoklávu, byly sterilizovány filtrací přes sterilní filtr (0,22 µm).

Umělohmotné centrifugační zkumavky byly sterilizovány 24 hodin parami kyseliny peroctové.

Chemické sklo bylo sterilizováno horkým vzduchem při 160°C 3 hodiny.

Pinzety, mikrobiologické kličky a hokejky byly sterilizovány žíháním nebo vypáleny po namočení do ethanolu.

### **4.3.2 Práce s tkáňovými kulturami**

Savčí buňky byly kultivovány v CO<sub>2</sub> termostatu (Forma Scientific) při 37°C a 5% CO<sub>2</sub>. Hmyzí buňky byly kultivovány v termostatu Termobox LBT 165 při 28°C.

#### **4.3.2.1 Pasážování savčích buněk**

- Z konfluentně narostlé misky (6 cm) bylo odsáto médium DMEM se sérem.
- Buňky byly opláchnuty 5 ml roztoku versenu a inkubovány v 0,5 ml 0,25% trypsinu v PBS v termostatu dokud se neuvolnily do média (maximální doby inkubace byla 10 minut).
- Poté bylo k buňkám přidáno 5,5 ml DMEM média s 10% sérem a buňky byly důkladně resuspendovány.

- Suspenze byla po 1 ml rozdělena na 6 Petriho misek a objem na každé misce byl doplněn do 6 ml DMEM médiem s 10% sérem. Pokud byly buňky kultivovány v 24 jamkové destičce na krycích mikroskopických sklíčkách, tak bylo dáno na sklíčka 60  $\mu$ l suspenze a objem doplněn 1 ml DMEM média s 10% sérem.
- Buňky byly inkubovány při 37°C v CO<sub>2</sub> inkubátoru.

#### **4.3.2.2 Pasážování hmyzích buněk**

(SUMMERS et al. 1987)

- Konfluentně narostlé buňky na Petriho misce ( $\varnothing$ 6 cm) byly seškrabány gumovým škrabátkem a buněčná suspenze byla převedena do 50 ml centrifugační zkumavky.
- K buňkám bylo přidáno TNM-FH hmyzí médium s 10% sérem tak, aby poměr buněčné suspenze a čerstvého média byl 1:4.
- Vzniklá suspenze byla dobře promíchána a po 6 ml rozdělena na 4 Petriho misky ( $\varnothing$ 6 cm).
- Buňky byly kultivovány při 28°C.

#### **4.3.2.3 Synchronizace savčích buněk před infekcí**

(CHEN a FLUCK 2001)

- Buňky byly synchronizovány do G0 fáze buněčného cyklu 20–24 hodinovou inkubací v DMEM médiu bez séra při 37°C v CO<sub>2</sub> inkubátoru.
- Po uplynutí této doby byly buňky připraveny pro infekci.

#### **4.3.2.4 Infekce savčích buněk virem**

(TÜRLER a BEARD 1985)

- Virové inokulum bylo 3x po minutě sonikováno ve stolním sonikátoru Branson 5 (Cole – Parmer Instrument Company).
- Z buněk narostlých do 50% konfluence bylo odsáto DMEM médium a buňky byly opláchnuty bezsérovým DMEM médiem.
- Na Petriho misku (9 cm) byl přidán 1 ml bezsérového DMEM média, na mikroskopické sklíčko v 24 jamkové destičce bylo přidáno 200  $\mu$ l DMEM

média bez séra. Bylo přidáno takové množství virového inokula, aby bylo dosaženo požadované multiplicity infekce.

- Buňky byly inkubovány v CO<sub>2</sub> termostatu 1 – 1,5 hodiny.
- Po uplynutí dané doby bylo k buňkám přidáno DMEM médium s 10% sérem. Doba infekce byla počítána od chvíle přidání virového inokula.
- Buňky byly inkubovány při 37°C v CO<sub>2</sub> inkubátoru.

#### **4.3.2.5 Infekce hmyzích buněk virem**

(SUMMERS *et al.*, 1987)

- Buňky byly pasážovány v poměru 1:2 do bezsérového média.
- Po přichycení buněk na povrch Petriho misky (nejdříve za 30 minut) bylo odsáto médium a přidáno virové inokulum (10 PFU na buňku). Buňky byly za stálého kolébání inkubovány 1 hodinu při laboratorní teplotě.
- Po uplynutí této doby bylo k buňkám přidáno TNM-FH hmyzí médium s 10% sérem.
- Poté byly buňky inkubovány 3-4 dny při 28°C pro rozšíření infekce, infikované buňky byly seškrabány do 50 ml zkumavky a centrifugovány 10 minut při 2000 rpm a 4°C.
- Sediment buněk byl promyt roztokem PBS a uskladněn při -20°C pro další použití.

#### **4.3.2.6 Fixace hmyzích buněk**

- Z buněk narostlých na sklíčku ve 24 jamkových miskách bylo odsáto médium a byly opláchnuty roztokem PBS.
- Poté byl k buňkám přidán roztok methanol/acetone v poměru 1:1. Roztok byl na buňkách ponechán po dobu 4 min a poté byl odsát a zbytky byly usušeny od zbytků roztoku.
- Zafixované buňky byly vysyceny minimálně 30 min v roztoku 0,25% želatiny a 0,25% roztoku BSA v PBS.

#### 4.3.2.7 Transfekce hmyzích buněk

- Buňky byly pasážovány na Petriho misky ( $\varnothing$ 6 cm), po přichycení buněk na povrch misky bylo médium odsáto a byly přidány 2 ml čerstvého TNM-FH hmyzího média s 10% sérem.
- Byla připravena transfekční směs obsahující 10  $\mu$ l bakulovirové DNA, 950  $\mu$ l roztoku HEBS a 50  $\mu$ l 2,5 M  $\text{CaCl}_2$ . Směs byla promíchána a inkubována 30 minut při laboratorní teplotě.
- Připravená směs byla po kapkách přidána k buňkám, které byly následně inkubovány 4 hodiny při 28°C.
- Poté bylo médium z buněk odsáto a buňky byly opláchnuty 5 ml TNM-FH hmyzího média s 10% sérem. Nakonec k nim bylo přidáno 5 ml TNM-FH hmyzího média s 10% sérem a byly inkubovány 4-6 dní při 28°C.
- Médium z buněk bylo použito k získání rekombinantního bakuloviru.

#### 4.3.2.8 Izolace kapsid z hmyzích buněk

- Buňky infikované rekombinantním bakulovirem nesoucí gen pro strukturní proteiny VP1 a VP3 lidského BK viru byly přeneseny do 50 ml zkumavky a centrifugovány 10 minut při 2000 rpm při 4°C (Centrifuga GS-15R, rotor S4180).
- Sediment byl propláchnut roztokem PBS a resuspendován v B pufru. Suspenze buněk byla sonikována 3x30s.
- Poté byla suspenze centrifugována 10 min při 4800 rpm a 4°C (Centrifuga GS-15R, rotor S4180).
- Supernatant byl centrifugován přes 10% sacharózový polštář v B pufru 3 hodiny při 35000 rpm při 4°C (rotor SW 41). Sediment byl resuspendován v B pufru a sonikován 3x30s.
- Suspenze byla centrifugována v CsCl gradientu 20h při 35000 rpm a 18°C (Rotor SW41).
- Po rozdělení gradientu byl změřen refraktometrický index a na jeho základě byly frakce pospojovány do 2 výsledných frakcí. CsCl byl odstraněn dialýzou proti B pufru.
- Frakce byly zahuštěny přes 10% sacharózový polštář.
- Sediment byl resuspendován v B pufru.

#### 4.3.2.9 Fixace savčích buněk

- Z buněk narostlých v 24 jamkové destičce na mikroskopických sklíčkách bylo odsáto médium a byly opláchnuty roztokem PBS.
- Buňky byly fixovány 30 minut 3% paraformaldehydem v PBS při laboratorní teplotě za mírného kývání.
- Poté byly buňky permeabilizovány 5 minut v 0,5% roztoku Tritonu X-100 v PBS a 3x10 minut opláchnuty roztokem PBS.

#### 4.3.2.10 Nepřímá imunofluorescence

(FORSTOVÁ *et al.*, 1993)

- Zafixované buňky byly inkubovány minimálně 30 min v roztoku 0,25% BSA, 0,25% želatina v PBS.
- K vysyceným buňkám byla přidána primární protilátka naředěná v PBS a buňky byly inkubovány 1 – 1,5 hod při laboratorní teplotě za mírného kývání.
- Buňky byly 3x 10 min promyty roztokem PBS.
- Poté byla k buňkám na 30 min přidána sekundární protilátka naředěná v PBS.
- Buňky byly opět promývány 3x10 min roztokem PBS.
- Sklíčka byla položena buňkami do kapky glycerolu na podložním skle. Preparáty byly pozorovány fluorescenčním mikroskopem BX-60 (Olympus) nebo konfokálním mikroskopem LCS SP2 Laser scanning confocal microscope (Leica).

#### 4.3.3 Plaková zkouška

- Buňky byly pasážovány na Petriho misky (6 cm) tak, aby byly 30-40% konfluentní.
- Po uplynutí 24 hodin bylo DMEM médium se sérem odsáto, buňky byly opláchnuty DMEM médiem bez séra a bylo přidáno 2 ml virového inokula na Petriho misku v různém ředění ( $10^{-2}$ - $10^{-7}$ ).
- Buňky byly inkubovány 1 hodinu při 37°C v CO<sub>2</sub> inkubátoru. Poté bylo k buňkám přidáno 5 ml DMEM s 10% sérem.



- Po uplynutí 15 hodin bylo médium odsáto a k buňkám bylo přidáno 5 ml sterilní 0,9% Sea Plaque agarózy v DMEM médiu s 10% sérem.
- Po ztuhnutí agarózy byly buňky inkubovány 6-10 dní v CO<sub>2</sub> termostatu při 37°C.
- Poté byly plaky obarveny roztokem 1% neutrální červení v DMEM médiu s 5% sérem a inkubovány přes noc v CO<sub>2</sub> termostatu.
- Médium s neutrální červení bylo odsáto a buňky byly inkubovány 1-2 hodiny v termostatu při 37°C.
- Poté byly plaky označeny ze spodu Petriho misky pod lupou a agaróza nad nimi (s virem) vypíchnuta sterilní špičkou a přenesena do mikroskopu s 0,5 ml DMEM média bez séra. Tyto plaky byly uskladněny při -72°C.

#### **4.3.3.1 Infekce buněk plakovým izolátem**

- Pro infekci 1 Petriho misky (Ø6cm) buněk (30-40% konfluentně narostlé) těmito plaky byl použit celý objem (po důkladné homogenizaci) získaný z plakové zkoušky (0,5 ml).
- Buňky byly inkubovány v CO<sub>2</sub> termostatu 1 – 1,5 hodiny.
- Po uplynutí dané doby bylo k buňkám přidáno DMEM médium s 10% sérem. Doba infekce byla počítána od chvíle přidání virového inokula.
- Buňky byly inkubovány při 37°C v CO<sub>2</sub> inkubátoru.

#### **4.3.4 Izolace myšího polyomaviru** (TÜRLER a BEARD 1985)

- Buňky WME byly pasážovány v poměru 1:15 a infikovány myším polyomavirem s nízkou multiplicitou infekce, M.O.I. = 0,1 pfu/buňku.
- Po 6 dnech bylo od buněk odsáto médium, uchováno při 4°C a k buňkám bylo přidáno čerstvé DMEM médium s 5% sérem.
- Po uplynutí 11 dnů po infekci byly buňky i s médiem 3x zmrazeny a rozmrazeny, po posledním rozmražení byly buňky z misek seškrabány gumovým škrabátkem a centrifugovány, společně s médiem sebraným 6. den po infekci, 40 min při 4800 rpm a 4°C (Beckman Centrifuge GS-15R).
- Supernatant byl uschován při 4°C.

- Pelet byl resuspendován v 10 mM Tris-HCl (pH=7,4), vzniklá suspenze byla homogenizována v Potter Elvehjem homogenizátoru chlazeném na ledu.
- Ke vzniklé směsi byl přidán inhibitor proteáz aprotinin (2 µg/ml) a neuraminidáza (0,01 U/ml) a směs byla inkubována přes noc při laboratorní teplotě za stálého kývání.
- Suspenze byla centrifugována 40 min při 4800 rpm a 4°C (Beckman Centrifuge GS-15R).
- Supernatant byl přidán k předchozímu a uskladněn při 4°C.
- Pelet byl resuspendován v 10mM Tris-HCl (pH=9) a inkubován 4 hod při laboratorní teplotě za stálého kývání.
- Vzniklá suspenze byla centrifugována 40 min při 4800 rpm a 4°C (Beckman Centrifuge GS-15R).
- Supernatant byl spojen s předchozími a uskladněn při 4°C.

#### **4.3.4.1 Centrifugace přes sacharózový polštář**

Tato metoda slouží k odstranění kontaminujících proteinů, ale zároveň k zahuštění vzorku (při centrifugaci se viriony i pseudokapsidy koncentrují na dno centrifugační zkumavky).

##### Zahuštění virionů z média:

- Supernatanty obsahující viriony (viz předchozí kapitola) byly v ultracentrifugačních zkumavkách podvrstveny 2-3 ml 10% sacharózy v B pufu.
- Zkumavky byly dány do centrifugačních kyvet a vyváženy B pufrem.
- Centrifugace probíhala 3 hod při 25000 rpm a 4°C (ultracentrifuga Beckman, rotor SW28).
- Sediment byl resuspendován v B pufu.

##### Zahuštění virionů nebo proteinů:

- Vzorek obsahující virové kapsidy v B pufu byl umístěn do centrifugačních zkumavek a podvrstven 1,5 ml 10% sacharózy v B pufu.
- Zkumavky byly přemístěny do centrifugačních kyvet a vyváženy B pufrem.
- Centrifugace probíhala 3 hod při 35000 a 4°C (ultracentrifuga Beckman, rotor SW41).
- Získaný sediment byl resuspendován v B pufu.

#### 4.3.4.2 Izopyknická centrifugace v rovnovážném CsCl gradientu

(TÜRLER a BARD, 1985)

Tato metoda umožňuje separaci virionů a pseudokapsid na základě jejich vznášivé hustoty v CsCl gradientu.

- Sediment získaný centrifugací přes sacharózový polštář byl resuspendován v B pufru.
- V centrifugační zkumavce bylo smícháno 7,9 g vzorku v B pufru s 3,79 g CsCl (výsledná hustota vzorku  $1,3 \text{ g/cm}^3$ ).
- Po rozpuštění CsCl byl změřen refraktometrický index směsi, který se měl pohybovat v rozmezí  $1,363 - 1,366$  ( $\sim 1,33 \text{ g/cm}^3$  – vznášivá hustota virionů).
- Směs byla převrstvena parafinovým olejem, zkumavky byly dány do centrifugačních kyvet a vyváženy.
- Centrifugace probíhala 20 hod při 35000 rpm a  $18^\circ\text{C}$  (rotor SW41).
- Vzniklý gradient byl rozdělen pomocí peristaltické pumpy a u jednotlivých frakcí byl změřen refraktometrický index, na jehož základě byly frakce pospojovány.
- CsCl byl odstraněn dialýzou proti pufru B.

#### 4.3.4.3 Dialýza

Tato metoda slouží k odstranění nízkomolekulárních látek (CsCl, sacharóza, aj.), tyto látky procházejí semipermeabilní membránou z prostředí o vyšší koncentraci roztoku do prostředí méně koncentrovaného. Uvnitř dialyzační membrány jsou zadržovány vysokomolekulární látky (proteiny, DNA).

- Dialyzační membrána o vhodném průměru byla 10 min povařena v destilované vodě.
- Vzorek byl přenesen do membrány a z obou stran uzavřen dialyzačními svorkami.
- Dialýza probíhala ve 100 – 200 násobném objemu pufru B přes noc při  $4^\circ\text{C}$  za stálého míchání. Pufr byl během dialýzy jednou vyměněn.
- Poté byl vzorek zahuštěn centrifugací přes sacharózový polštář.

#### 4.3.4.4 Hemaglutinační test

(TÜRLER a BEARD 1985)

Hemaglutinační test umožňuje stanovit přibližnou koncentraci virových částic pomocí aglutinace erytrocytů. Je využívána schopnost virových částic interagovat s kyselinou sialovou na povrchu morčecích erytrocytů. Neaglutinované erytrocyty se usadí na dně ve formě husté nahromadění, aglutinované krvinky pokryjí celé dno rovnoměrně. Hemaglutinační titr je uváděn v hemaglutinačních jednotkách (HAU = haemagglutination units) a odpovídá nejvyššímu ředění viru, které ještě aglutinuje erytrocyty. 1 HAU odpovídá u A2 kmene polyomaviru asi  $1 \times 10^7$  částic (infekčních i neinfekčních).

- Morčecí krev byla centrifugována 20 min při 2600 rpm a 4°C (Beckman Centrifuge GS-15R). a poté 3x promyta roztokem 0,2% BSA a PBS.
- Promíchaná suspenze erytrocytů (30 µl) byla nanášena do heparinované kapiláry. Kapilára byla na jednom konci zatavena a centrifugována 5 min při 2500 rpm v rotoru pro hematokryt (MPW 300).
- Hematokryt byl odečten jako procentuální vyjádření výšky sloupce PBS k výšce sloupce erytrocytů.
- Suspenze erytrocytů byla naředěna na používanou koncentraci 0,4% v 0,2% BSA v PBS.
- Do všech jamek mikrotitrační destičky s kulatým dnem bylo nanášeno 50 µl 0,2% BSA v PBS.
- Do prvního sloupce bylo přidáno 50 µl naředěné virové suspenze ( 5 µl virové suspenze a 45 µl pufru B). Objem byl promíchán a z jamky bylo odebráno 50 µl, které byly přepipetovány do následující jamky.
- Tento postup byl opakován až k poslední jamce. Takto byla vytvořena ředící řada.
- Nakonec bylo do všech jamek přidáno 50 µl 0,4% suspenze morčecích erytrocytů.
- Mikrotitrační destička byla skladována při 4°C.
- Hemaglutinace byla odečtena po 6 hodinách.

#### 4.3.4.5 Titrace viru

- Virové inokulum o neznámé titru bylo naředěno ( $10^{-2}$ - $10^{-5}$ ) do DMEM média bez séra.
- Buňky narostlé na mikroskopických sklíčkách byly infikovány sérií naředěných virových inokul (kapitola 4.3.2.4)
- Po uplynutí 24 hod po infekci byly fixovány (kapitola 4.3.2.9) a testovány na přítomnost LT antigenu (kapitola 4.3.2.10).
- Pozitivní buňky byly spočítány a byl určen infekční titr viru.

#### 4.3.5 Studium vlivu cytoskeletárních inhibitorů na pohyb virionů

- Buňky narostlé na mikroskopických sklíčkách byly synchronizovány 20-24 hod v médiu bez séra.
- Poté byly k buňkám přidány látky rozrušující cytoskelet: nocodazol (10  $\mu$ M), cytochalazin D (5  $\mu$ M) a latrunculin A (2,5  $\mu$ M).
- Po 1 hod byly látky rozrušující cytoskelet odstraněny a buňky byly infikovány, myším polyomavirem (s multiplicitou infekce 100 pfu/b) v přítomnosti látky rozrušující cytoskelet naředěném v bezsérovém médiu.
- Po hodinové inkubaci bylo bezsérové médium s látkami rozrušujícími cytoskelet i s virem odstraněno a k buňkám byla přidána látka rozrušující cytoskelet naředěná v médiu s 10% sérem.
- Buňky byly inkubovány 3 hod, poté byly fixovány (4.3.2.9) a pozorovány pomocí konfokální mikroskopie.

##### Postup pro sledování cytoskeletu po odmytí látek rozrušujících cytoskelet:

- Buňky narostlé na mikroskopických sklíčkách byly 20-24 hod synchronizovány, poté byla k buňkám přidána látka rozrušující cytoskelet (cytochalazin D, latrunculin A).
- Po uplynutí jedné hodiny byla tato látka odstraněna, buňky byly infikovány s multiplicitou infekce 100 pfu/b (4.3.2.4) v přítomnosti látky rozrušující cytoskelet a inkubovány 1 hod.
- Poté bylo médium odstraněno a buňky byly 2 hod inkubovány v médiu s 10% sérem v přítomnosti látky rozrušující cytoskelet.

- Po odstranění agens byly buňky inkubovány buď 1 nebo 2 hod v médiu s 10% sérem a poté fixovány (kap. 4.3.2.9) barveny pomocí nepřímé imunofluorescence (kap. 4.3.2.10) a pozorovány konfokálním mikroskopem.

## 4.3.6 Práce s bakteriálními kmeny

### 4.3.6.1 Kultivace bakterií

- Bakterie byly kultivovány aerobně v tekutém médiu (ŽB č.2) v třepačce při 37°C nebo na pevném agaru (ŽA č.2) v termostatu při 37°C přes noc.
- Pro selekci bakterií transformovaných plazmidem byla do média přidána selekční antibiotika.

### 4.3.6.2 Příprava kompetentních buněk

(DOWER *et al.*, 1988)

- Bakterie byly zaočkovány do TPN média a kultivovány aerobně přes noc v třepačce při 37°C.
- Suspenze byla naředěna TPN médiem tak, aby výsledná OD<sub>560</sub> v 500 ml byla 0,1. Suspenze byla aerobně kultivována a průběžně byla měřena hodnota OD<sub>560</sub> dokud nedosáhla hodnoty 0,5 – 0,7.
- Suspenze byla centrifugována 10 min při 4°C při 4300 rpm (Beckman Centrifuge GS-15R, rotor S4180). Pelet byl resuspendován v 50 ml demineralizované vody vychlazené na 4°C.
- Suspenze byla centrifugována 10 min při 4°C při 4300 rpm (Beckman Centrifuge GS-15R, rotor S4180). Pelet byl resuspendován v 250 ml demineralizované vody vychlazené na 4°C.
- Suspenze byla centrifugována 10 min při 4°C při 4300 rpm (Beckman Centrifuge GS-15R, rotor S4180). Pelet byl resuspendován ve 20 ml 10% glycerolu vychlazeného na 4°C.
- Suspenze byla centrifugována 10 min při 4°C při 4300 rpm (Beckman Centrifuge GS-15R, rotor S4180). Pelet byl resuspendován v 10 ml 10% glycerolu.
- Suspenze byla centrifugována 10 min při 4°C při 4300 rpm (Beckman Centrifuge GS-15R, rotor S4180).

- Pelet byl resuspendován v 1 ml 10% glycerolu a buňky byly po 100  $\mu$ l rozpipetovány do mikrozkuvek, zmraženy v tekutém dusíku a uchovávány při  $-72^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.3.6.3 Elektroporace plazmidové DNA do kompetentních buněk**

**(DOWER *et al.*, 1988)**

- Kompetentní buňky byly opatrně rozmrazeny při  $0^{\circ}\text{C}$ .
- Byla připravena směs z 50  $\mu$ l kompetentních buněk a 1  $\mu$ l DNA, tato směs byla promíchána převedena do elektroporační kyvety vychlazené na  $0^{\circ}\text{C}$ .
- Na elektroporátoru (Gene Pulser Apparatus) byly nastaveny hodnoty: 25  $\mu$ F, 2.5 kV a 200  $\Omega$ .
- Elektroporační kyveta byla umístěna do elektroporátoru a byl aplikován elektrický puls. Optimální délka pulsu byla 4-5 ms.
- Ihned po aplikaci pulsu byl k bakteriím přidán 1 ml SOC média.
- Suspenze byla přenesena do sterilní baňky a aerobně kultivována 1 hodinu při  $37^{\circ}\text{C}$ .
- Bakterie byly vysety na misku s pevným médiem a antibiotiky a kultivovány přes noc při  $37^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.3.6.4 Příprava kompetentních buněk DH10Bac pro heat-shock**

- Bakterie byly zaočkovány do 5 ml ŽB č. 2 obsahujícího tetracyklin (10  $\mu$ g/ml) a kanamycin (50  $\mu$ g/ml) a kultivovány aerobně přes noc v třepačce při  $37^{\circ}\text{C}$ .
- Z narostlého inokula byly 4 ml převedeny do 400 ml ŽB č. 2 s antibiotiky a suspenze byla kultivována za stálého třepání při  $37^{\circ}\text{C}$ , dokud kultura nedosáhla optické hustoty  $\text{OD}_{600}$  0,4.
- Bakterie byly centrifugovány 10 min při 4700 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$  (Centrifuga GS-15R, rotor S4180).
- Bakterie byly dvakrát promyty 10 ml vychlazeného 50 mM  $\text{CaCl}_2$ , při druhém promývání byly ponechány 30 min na ledu.
- Poté byly bakterie resuspendovány ve 2 ml vychlazeného 50 mM  $\text{CaCl}_2$  s 15-20% glycerolem.

- Buňky byly rozpipetovány po 400-600  $\mu\text{l}$  do předchlazených mikroskopických zkumavek a uchovávány při  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.3.6.5 Transformace bakterií metodou heat-shock

- Kompetentní buňky byly před transformací inkubovány minimálně 2 hodiny na ledu.
- V 15 ml zkumavce bylo smícháno 200  $\mu\text{l}$  kompetentních buněk a 5-10  $\mu\text{l}$  plazmidu. Směs byla inkubována 30 min na ledu.
- Poté byla směs inkubována přesně 45s ve vodní lázni při  $42^{\circ}\text{C}$  a následně 2 min chlazená na ledu.
- K směsi byl přidán 1 ml SOC média a buňky byly inkubovány 1-3 hod při  $37^{\circ}\text{C}$  za stálého třepání.
- Bakterie byly vysety na misku s pevným médiem s antibiotiky, X-gal, IPTG a kultivovány 48 hod při  $37^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.3.6.6 Izolace bacmidové DNA

- Bakterie byly zaočkovány do 5 ml tekutého média (ŽB č. 2) a kultivovány aerobně přes noc při  $37^{\circ}\text{C}$ .
- Z narostlé kultury bylo 1,5 ml centrifugováno 2 min při 15000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$  (Microcentrifuga Beckman Mikrofuge Centrifuge, rotor F241,5).
- Pelet byl resuspendován v 567  $\mu\text{l}$  TE pufru. Poté bylo přidáno 30  $\mu\text{l}$  10% SDS a 6  $\mu\text{l}$  proteinázy K (10mg/ml), směs byla inkubována 1 hod při  $37^{\circ}\text{C}$ .
- K směsi bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  5 M NaCl a směs byla inkubována 10 min při  $65^{\circ}\text{C}$ .
- Poté byl přidán 1x objem upraveného chloroformu, směs byla opatrně promíchána a centrifugována 4 min při 13000 rpm (Microcentrifuga Beckman Mikrofuge Centrifuge, rotor F241,5). Vrchní fáze byla odebrána. Tento krok byl proveden dvakrát.
- K odebrané fázi bylo přidáno 0,6 objemu izopropanolu a směs byla opatrně promíchána.
- Vysrážená DNA byla namotána na kličku, opláchnuta 80% ethanolem a rozpuštěna v 50-100  $\mu\text{l}$  TE pufru.
- Získaná DNA byla uchována při  $4^{\circ}\text{C}$ .



#### 4.3.6.7 Příprava konzerv z buněk E.coli

(SAMBROOK, 1989)

- Bakterie byly zaočkovány do tekutého média (ŽB č. 2) a aerobně kultivovány přes noc při 37°C.
- K bakteriím v mikrozkuhavce byl přidán 40% glycerol tak, aby jeho výsledná koncentrace byla 15-20%.
- Takto připravené konzervy byly skladovány při -72°C.

#### 4.3.7 Práce s DNA

##### 4.3.7.1 Horizontální agarózová elektroforéza

(SAMBROOK *et al.*, 1989)

- 1% agarózový gel byl připraven z 0,25 g agarózy a 25 ml 0,5x koncentrovaného TBE pufru krátkým povařením.
- Po ochlazení na přibližně 50°C bylo přidáno 12,5 µl ethidiumbromidu (1µg/ml).
- Roztok byl nalit do plexisklového bločku, jehož dvě strany byly tvořeny lepící páskou. Přibližně 1 cm od kraje byl umístěn hřeben.
- Po ztuhnutí gelu byla odstraněna lepící páska a hřeben, gel i s bločkem byl vložen do elektroforetické vaničky a přelit 0,5x TBE puftrem.
- Vzorky připravené smícháním s BFM byly naneseny do jamek vzniklých po vyjmutí hřebenu.
- Aparatura byla připojena ke zdroji napětí, velikost napětí byla nastavena na 60-70 V (5V/cm).
- Doba potřebná k rozdělení DNA byla asi 60 minut.
- Gel byl prohlížen UV transluminátorem.

##### 4.3.7.2 Maxiizolace plazmidové DNA – alkalická metoda

(BIRNBOIM a DOLY, 1989)

- 500 ml bakteriální kultury, která byla kultivována přes noc při 37°C v ŽB č. 2, bylo centrifugováno 10 min při 4000 rpm (Beckman Centrifuge GS-15R, rotor S4180).

- Sediment byl resuspendován v 20 ml roztoku I. Poté bylo přidáno 40 ml čerstvě připraveného roztoku II, směs byla opatrně promíchána otáčením zkumavky a inkubována 5-10 min při laboratorní teplotě.
- K směsi bylo přidáno 30 ml roztoku III, směs byla opatrně promíchána otáčením zkumavky a inkubována 20 min na ledu.
- Směs byla centrifugována 30 min při 4300 rpm a 4°C (Beckman Centrifuge GS-15R, rotor S4180).
- Supernatant byl přefiltrován přes 4 vrstvy gázy.
- K supernatantu bylo přidáno 0,7 objemu izopropanolu, směs byla promíchána a inkubována 10 min při 4°C.
- Směs byla centrifugována 30 min při 4300 rpm a 4°C (Beckman Centrifuge GS-15R, rotor S4180).
- Sediment byl promyt 80% ethanolem, vysušen při laboratorní teplotě a rozpuštěn v 300 µl TE pufru.
- Roztok byl extrahován 1x1 objemem upraveného fenolu, 1 objemem směsi upravený fenol/chloroform, dokud nezmizela mezifáze tvořená vysráženými zbytky proteinů a nakonec 1x1 objemem upraveného chloroformu.
- K roztoku byl přidán 0,1 objem 3 M NaAc a 2,5 objemu 96% ethanolu, který byl vychlazen při -20°C. Roztok byl inkubován 20-30 min při -72°C.
- Vysrážená DNA byla sedimentována 10 min při 15300 rpm při 4°C (Mikrocentrifuga Beckman Mikrofuge Centrifuge, rotor F241,5).
- Sediment byl promyt 80% ethanolem, vysušen při laboratorní teplotě a resuspendován v 100 µl TE pufru.

#### 4.3.7.3 Odstranění RNA ze vzorku DNA

(SAMBROOK *et al.*, 1989)

- Ke vzorku DNA bylo přidáno 0,1 objemu RNázy A (1mg/ml) a vzorek byl inkubován 1 hod při laboratorní teplotě.
- Roztok byl extrahován 1x1 objemem upraveného fenolu, 1 objemem směsi upravený fenol/chloroform, dokud nezmizela mezifáze tvořená vysráženými zbytky proteinů a nakonec 1x1 objemem upraveného chloroformu.
- K roztoku byl přidán 0,1 objem 3 M NaAc a 2,5 objemu 96% ethanolu, který byl vychlazen při -20°C. Roztok byl inkubován 20-30 min při -72°C.

- Vysrážená DNA byla sedimentována 10 min při 15300 rpm při 4°C (Mikrocentrifuga Beckman Mikrofuge Centrifuge, rotor F241,5).
- Sediment byl promyt 80 % ethanolem, vysušen při laboratorní teplotě a resuspendován ve 100 µl TE pufru.

#### 4.3.7.4 Miniizolace plazmidové DNA – alkalická metoda

- Jednotlivé kolonie byly zaočkovány do 700 µl ŽB č. 2 s ampicilínem a kultivovány přes noc při 37°C.
- Buňky byly centrifugovány 1 min při 15300 rpm (Mikrocentrifuga Beckman Mikrofuge Centrifuge, rotor F241,5).
- Pelet byl resuspendován v 250 µl roztoku I, dále bylo přidáno 250 µl roztoku II a poté 200 µl roztoku III.
- Promíchaná směs byla centrifugována 5 min při 15300 rpm (Mikrocentrifuga Beckman Mikrofuge Centrifuge, rotor F241,5).
- K supernatantu bylo přidáno 500 µl 100% izopropanolu.
- Směs byla centrifugována 10 min při 15300 rpm (Mikrocentrifuga Beckman Mikrofuge Centrifuge, rotor F241,5).
- Sediment byl propláchnut 80% ethanolem a resuspendován v 15-25 µl TE pufru s RNázou A (10mg/ml).

#### 4.3.7.5 Izolace fragmentů DNA z agarózového gelu kitem

DNA byla rozdělena v agarózovém gelu.

Pro izolaci byl použit „NucleoSpin Extrakt II“ (Macherey-Nagel).

Postup probíhal podle přiloženého manuálu:

- Část gelu s DNA byla vyříznuta a převedena do mikrozkušavky.
- Do mikrozkušavky bylo přidáno 200µl/100mg NT pufru a mikrozkušavka byla inkubována 5-10 min ve vodní lázni při 50°C.
- Směs byla přenesena do mikrozkušavky „NucleoSpin Extrakt II“ a směs byla centrifugována 1 min při 15300 rpm (Mikrocentrifuga Beckman Mikrofuge Centrifuge, rotor F241,5).
- Do mikrozkušavky bylo přidáno 600 µl NT3 pufru a směs byla centrifugována 1 min 15300 rpm. Pro odstranění zbytku NT3 pufru byla celá

směs centrifugována ještě 2 min při 15300rpm (Mikrocentrifuga Beckman Mikrofuge Centrifuge, rotor F241,5).

- Po odstranění NT3 pufru byla DNA eluována 30-50  $\mu$ l „Elution Buffer“ přehřátého na 60°C. A centrifugována 1 min při 15300 rpm (Mikrocentrifuga Beckman Mikrofuge Centrifuge, rotor F241,5).
- Supernatant obsahující DNA byl přenesen do nové mikrozkušavky.

#### 4.3.7.6 Štěpení DNA restrikčními endonukleázami

(SAMBROOK *et al.*, 1989)

- Byla připravena restrikční směs:
  - DNA
  - Restrikční endonukleáza
  - Restrikční pufr (výsledná koncentrace 1x koncentrovaný)
  - Demineralizovaná voda
- Směs byla inkubována přes noc v optimálních restrikčních podmínkách.
- Naštěpená DNA byla izolována z gelu kitem „NucleoSpin Extrakt II“ (kapitola 4.3.7.5).

#### 4.3.7.7 Amplifikace DNA polymerázovou řetězovou reakcí – PCR

- Program PCR:
  1. 94°C 3 min (denaturace DNA)
  2. 94°C 40 s (denaturace DNA)
  3. X°C 50 s (vazba primerů)
  4. 72°C 1 min (polymerace)
  5. 72°C 7 min (polymerace)Program byl nastaven na 30 cyklů.
- Reakční směs:
  - 5  $\mu$ l 10x koncentrovaného pufru pro DNA polymerázu
  - 1,5  $\mu$ l primeru 1 (10  $\mu$ M)
  - 1,5  $\mu$ l primeru 2 (10  $\mu$ M)
  - 1  $\mu$ l dNTP (10  $\mu$ M)
  - 1  $\mu$ l DNA
  - 0,5  $\mu$ l DNA polymerázy

39,5 µl demineralizované vody

#### **4.3.7.8 Defosforylace vektorové DNA**

(SAMBROOK, 1989)

- K 50 µl štěpené vektorové DNA bylo přidáno 10 µl pufru pro alkalickou fosfatázu, 38 µl demi vody a 2 µl alkalické fosfatázy.
- Reakční směs byla inkubována 30 min při 37°C, poté byly přidány opět 2 µl alkalické fosfatázy a směs byla inkubována 30 min při 37°C.
- Fosfatáza byla inaktivována 10 µl 10% SDS, 1 µl 0,5M EDTA (pH 8.0) a 1 µl proteinázy K (10 mg/ml) a inkubací 30 min při 55°C.
- DNA byla přečištěna extrakcí fenolem a chloroformem a srážena ethanolem.
- Poté byla DNA rozpuštěna v 30-50 µl TE pufru.

#### **4.3.7.9 Ligace**

(SAMBROOK *et al.*, 1989)

- Ligační směs byla připravena z linearizovaného plazmidu a fragmentu tak, aby byl fragment oproti vektoru v dvojnásobném množství.
- K ligační směsi byla přidána T4 DNA ligáza a ligační pufr pro T4 DNA ligázu (Výsledná koncentrace 1x koncentrovaný). Takto připravená ligační směs byla inkubována přes noc při laboratorní teplotě.
- Ligovaná DNA byla použita k elektroporaci.

### **4.3.8 Práce s proteiny**

#### **4.3.8.1 Příprava lyzátů z infikovaných hmyzích buněk**

- Sediment hmyzích buněk Sf9 infikovaných rekombinantním bakulovirem byl resuspendován v 60 – 100 µl RIPA pufru.
- Buněčná suspenze byla inkubována 20 min na ledu a poté byla centrifugována 10 min při 4800 rpm při 4°C (Centrifuga GS-15R, rotor S4180).
- Supernatant byl použit pro imunologickou detekci.

#### 4.3.8.2 SDS polyakrylamidová elektroforéza (SDS – PAGE)

(SAMBROOK *et al.*, 1989)

- Skla pro elektroforézu byla důkladně umyta a usušena. Byla sestavena aparatura.
- Mezi skla byl nalit spodní gel 0,5 cm pod okraj zubů hřebenu a převrstven demineralizovanou vodou.
- Po ztuhnutí gelu (přibližně 30 min) byla voda odstraněna, byl nalit horní zaostřovací gel a ihned vsunut hřeben.
- Vzorky byly smíchány s 5x koncentrovaným loading puffrem v poměru 4:1, 5 min povařeny ve vodní lázni.
- Vzorky (10 – 20  $\mu$ l) smíchané s SDS loading puffrem byly společně s markerem molekulových vah naneseny do jamek.
- Elektroforéza probíhala nejprve při napětí 80V/cm, po zkoncentrování vzorků na rozhraní horního a spodního gelu při 120V/cm dokud vzorky nedoputovaly ke spodnímu okraji gelu.

#### 4.3.8.3 Dot - blot

(SAMBROOK *et al.*, 1989)

- Lyzát buněk byl nanesen na nitrocelulózovou membránu (3–5  $\mu$ l). Membrána byla po zachnutí použita k imunologické detekci.

#### 4.3.8.4 Western blot

(SAMBROOK *et al.*, 1989)

- Nitrocelulózová membrána, Whattman a filtrační papíry byly namočeny do blotovacího puffru. Byl sestaven blotovací sendvič: černá mřížka, houbička, filtrační papíry, Whattman, gel, nitrocelulózová membrána, Whattman, filtrační papíry, houbička, bílá mřížka.
- Přenos probíhal 3 hod při 250 mA.
- Po ukončení blotování byla membrána vložena do odtučněného 5% mléka v PBS, aby se vysytila.
- Vzorky proteinů byly imunologicky detekovány.

#### **4.3.8.5 Imunodetekce proteinů imobilizovaných na membráně**

(SAMBROOK *et al.*, 1989)

- Membrána byla 30 minut inkubována v 5% odtučněném mléce v PBS.
- Poté byla membrána opláchnuta v PBS a inkubována 1 – 1,5 hod s primární protilátkou naředěnou v 5% odtučněném mléce v PBS.
- Membrána byla 3x 10 min promyta v PBS a inkubována 30 min se sekundární protilátkou konjugovanou s peroxidázou naředěnou v 5% odtučněném mléce v PBS.
- Membrána byla 3x 10 min promyta v PBS.
- Poté byla membrána přelita roztokem Luminolu, vložena do průhledné fólie a byl přiložen RTG film. Doba expozice se pohybovala mezi 1 – 30 min.
- Film byl vyvolán ve vývojce a následně v ustalovači.

#### **4.3.9 Elektronová mikroskopie**

Elektronmikroskopické experimenty prezentované v této diplomové práci provedli

RNDr. J. Štokrová, CSs. a Mgr. Vojtěch Žíla.

##### **4.3.9.1 Negativní barvení**

- Na 5  $\mu$ l kapku vzorku byla položena síťka s parlodionovou a pouhlikovanou membránou. Vzorek byl nechán 5-10 min adsorbovat
- Síťky byly dvakrát promyty 30 sec na 100  $\mu$ l kapkách 2% fosfowolframové kyseliny (na obou kapkách 1 min).
- Barvivo bylo opatrně odsáto filtračním papírem a síťky jsme nechány zaschnout.

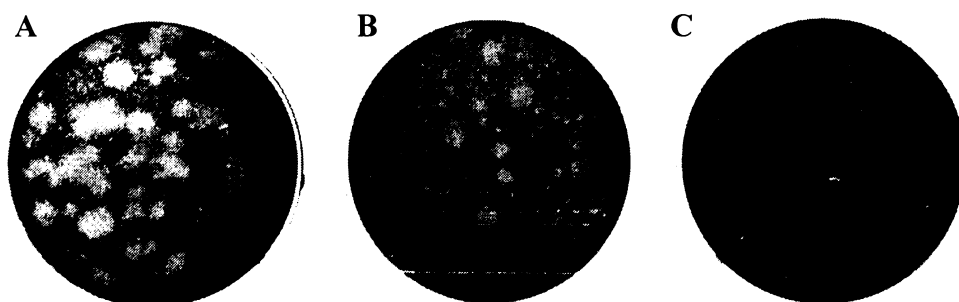
## **5. VÝSLEDKY**



## 5.1 Příprava a charakterizace virových izolátů

### 5.1.1 Příprava virových plaků z kmenů A2 a P16 a jejich následné pomnožení

Plakové izoláty byly připraveny podle kapitoly 4.3.3. Pozorovali jsme, že kmen viru P16 vytváří větší plaky než kmen A2. U získaných virových plaků byl stanoven infekční titer (kap. 4.3.4.5.). Pro pomnožení plakových izolátů byly použity myší embryonální buňky WME. Každým virovým plakem (tj. 0,5 ml bezsérového média s vypíchnutým plakem, po důkladné homogenizaci) byla infikována jedna Petriho miska (Ø 6cm). Po pomnožení viru v buňkách byl izolován virus z jednotlivých plaků. Izoláty byly purifikovány přes sacharózový polštář (kapitola 4.3.4.1). Virový izolát byl použit pro stanovení infekčního titru metodou *in situ* fluorescence (měřením počtu infikovaných pozitivních na LT antigen) buněk narostlých na sklíčku). V tabulkách jsou uvedeny hodnoty infekčního titru (pfu/ml) a výtěžků viru z jednoho plakového izolátu získaného z jedné Petriho misky (Ø 6cm).



**Obr. 5.1:** Snímky misek s plaky. A-plaky viru P16, B-plaky viru A2, C-negativní kontrola

Hodnoty výtěžků získaných z jednotlivých plakových izolátů se pohybují v poměrně širokém rozmezí. Velký rozptyl hodnot byl způsoben různou velikostí plaků. Z tabulky 5.1 je zjevné, že kmen P16 dává na primární linii buněk odvozených z celých myších embryí vyšší výtěžky. V průměru byla výtěžnost P16 viru více než 30krát vyšší než viru A2. Virus P16 z plaku, který dal nejlepší výtěžek byl použit k inokulacím pro následující pokusy.

<b>A2</b>	Výtěžek z 1 misky	<b>P16</b>	Výtěžek z 1 misky
1	$1,4 \times 10^6$	1	$4,8 \times 10^6$
2	$1,4 \times 10^6$	2	$1 \times 10^7$
3	$4 \times 10^4$	3	$2,3 \times 10^7$
4	$5,2 \times 10^5$	4	$5,2 \times 10^6$
5	$1 \times 10^6$	5	$1,8 \times 10^7$
6	$1 \times 10^6$	6	$4,6 \times 10^7$
7	$1,4 \times 10^7$	7	$1,8 \times 10^8$
8	$9,6 \times 10^6$	8	$9 \times 10^8$
9	$8 \times 10^7$	9	$2,6 \times 10^9$
10	$9,6 \times 10^6$	10	$6 \times 10^8$
Průměrný výtěžek	$1,2 \times 10^7$	Průměrný výtěžek	$4,4 \times 10^8$

**Tab. 5.1:** Výtěžky z jednotlivých plaků. V první tabulce jsou uvedeny hodnoty pro virový kmen A2, v druhé tabulce pro kmen P16. V druhém sloupci jsou vyjádřeny hodnoty výtěžku viru z jedné Petriho misky.

### 5.1.2 Vliv buněčné linie na výtěžek viru P16

Protože pro přípravu primárních buněk WME je zapotřebí vždy obětovat myši a jejich embrya, máme snahu používat pro izolaci polyomaviru stabilní buněčné linie. Zajímalo nás, jaký je vliv použitých buněčných linií na výtěžek viru P16.

Pro porovnání vlivu buněčné linie na výtěžek viru byly vybrány stabilní buněčné linie 3T6 fibroblastů a epiteliálních buněk odvozených od prsní žlázy myši - NMuMG. Výtěžky jsme srovnávali s výtěžky získanými z primárních buněk WME. Buňky (Petriho miska (Ø 6cm)) byly infikovány (kap. 4.3.2.4) s multiplicitou 0,1 pfu/buňku a inkubovány, dokud nebyly virem usmrceny (5-7 dní). Izoláty byly purifikovány přes sacharózový polštář (kapitola 4.3.4.1) a změřen infekční titr *in situ* fluorescencí, jak je uvedeno v kapitole 4.3.4.5.

Výtěžky byly dle očekávání nejlepší v primární WME linii, v 3T6 fibroblastech byly výtěžky přibližně o jeden řád nižší a v NMuMG linii cca 30 krát nižší, než v buňkách WME (tab. 5.2).

Buňky	výtěžek P16 viru z 1 misky (pfu)	výtěžek P16 viru z 1 misky (pfu)
WME	$5,2 \times 10^7$	$1,8 \times 10^7$
3T6	$1,3 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$
NMuMG	$4,1 \times 10^5$	$3,6 \times 10^5$

**Tab. 5.2:** Vliv buněčné linie na výtěžek viru

Přestože výtěžky v 3T6 fibroblastech jsou nižší než v WME buňkách, rozhodli jsme se v dalších pokusech pomnožovat virus, z praktických i etických důvodů na této stabilní linii

Dále nás zajímalo, kolik virových částic P16 viru připadá na jednu infekční částici, neboli vztah hemaglutinačních jednotek (HAU) a pfu u viru získaného z 3T6 fibroblastů. V tabulce 5.3 jsou uvedeny hodnoty z nezávislých izolací virů P16 a pro srovnání A2, vždy ze 3 misek (podle kap.4.3.4.). Pro měření hemaglutinace a infekčního titru byla použita frakce z CsCl gradientu, ve které byl „peak“ virionů (frakce 2, v rozmezí refraktometrických indexů 1,363-1,366, podobně jako je uvedeno v následující kapitole 5.1.3).

P16	infekční titr	hemaglutinační titr	infekční titr/ hemaglutinační titr
1.	$3,4 \times 10^7$	$3,3 \times 10^9$	1:100
2.	$5,6 \times 10^6$	$7,8 \times 10^7$	1: 14
3.	$6,0 \times 10^7$	$1,6 \times 10^9$	1: 26

A2	infekční titr	hemaglutinační titr	infekční titr/ hemaglutinační titr
1.	$6 \times 10^6$	$8,1 \times 10^8$	1:135
2.	$6 \times 10^6$	$6,3 \times 10^9$	1:1050
3.	$4 \times 10^6$	$6,3 \times 10^9$	1:1575

**Tab 5.3:** Vztah mezi infekčním titrem a počtem virových částic (hemaglutinačním titrem). Hemaglutinační titr byl počítán z empirického vztahu mezi hemaglutinačními jednotkami a počtem virových (infekčních i neinfekčních) částic (viz kap.4.3.4.4).

Z tabulky 5.3 vyplývá, že mezi virovými částicemi námi dosud používaného viru A2 pomnožovaného na 3T6 linii je výrazně více neinfekčních (defektních virových) částic než u kmene P16.

### 5.1.3 Izolace polyomaviru P16

Myší fibroblasty 3T6 (20 misek) byly infikovány myším P16 polyomavirem získaným z plakového izolátu. Virus byl purifikován podle kapitoly 4.3.4, centrifugován přes sacharózový polštář a v CsCl gradientu. V tabulce 5.4 jsou uvedeny naměřené hodnoty refraktometrického indexu jednotlivých frakcí získaných rozebráním CsCl gradientu.

Č.frakce	Refraktometrický index	Č. frakce	Refraktometrický index
1.1	<i>1,376</i>	2.1	<i>1,376</i>
1.2	<i>1,376</i>	2.2	<i>1,375</i>
1.3	<i>1,3735</i>	2.3	<i>1,372</i>
1.4	<i>1,3715</i>	2.4	<i>1,370</i>
1.5	<i>1,370</i>	2.5	<i>1,369</i>
1.6	<i>1,368</i>	2.6	<i>1,368</i>
1.7	<b><u>1,3665</u></b>	2.7	<b><u>1,366</u></b>
1.8	<b><u>1,365</u></b>	2.8	<b><u>1,3655</u></b>
1.9	<b><u>1,365</u></b>	2.9	<b><u>1,3645</u></b>
1.10	<b><u>1,365</u></b>	2.10	<b><u>1,3645</u></b>
1.11	<b><u>1,365</u></b>	2.11	<b><u>1,364</u></b>
1.12	<b><u>1,364</u></b>	2.12	<b><u>1,363</u></b>
1.13	<b><u>1,3635</u></b>	2.13	<b><u>1,362</u></b>
1.14	<b><u>1,362</u></b>	2.14	<b><u>1,361</u></b>
1.15	<b><u>1,362</u></b>	2.15	<b><u>1,361</u></b>
1.16	<b><u>1,361</u></b>	2.16	<b><u>1,360</u></b>
1.17	<b><u>1,360</u></b>	2.17	<b><u>1,359</u></b>
1.18	<i>1,358</i>	2.18	<i>1,358</i>
1.19	<i>1,357</i>	2.19	<i>1,357</i>
1.20	<i>1,357</i>	2.20	<i>1,357</i>

**Tab. 5.4:** Hodnoty refraktometrických indexů jednotlivých frakcí gradientu. Různé styly písma označují rozdělení do frakcí: F1-kurzíva, F2-tučně podtrženo, F3-tučně.

Na základě hodnot refraktometrických indexů byly CsCl frakce spojeny do 3 frakcí:

- F1: 1.1-1.6, 2.1.-2.6
- F2: 1.7.-1.13, 2.7.-2.12
- F3: 1.14.-1.17, 2.13.-2.17

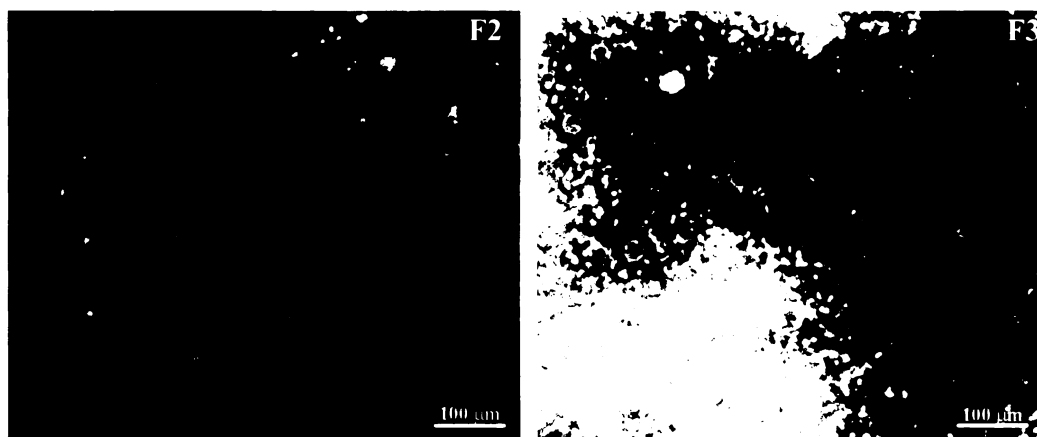
V F2 frakci by se měly nacházet plně infekční viriony, v F3 frakci prázdné kapsidy. Spojené frakce byly dialyzovány proti B pufru (kap. 4.3.4.3) a zahuštěny přes sacharózový polštář (kap. 4.3.4.1). U každé frakce byl určen hemaglutinační titr (kap. 4.3.4.4), infekční titr (kap. 4.3.4.5.) a kvalita izolace byla ověřena pomocí elektronové mikroskopie (obr. 5.2) Získané hodnoty jsou uvedeny v tabulce 5.5.

frakce	hemaglutinační titr		infekční titr pfu/ml
F1	640 HAU	$6,4 \times 10^9$	$6,4 \times 10^8$
F2	327680 HAU	$3,3 \times 10^{12}$	$3,2 \times 10^{11}$
F3	409600 HAU	$4,1 \times 10^{12}$	$4 \times 10^{10}$

**Tab. 5.5:** Hemaglutinační titr a infekční titr získaných frakcí

Elektronmikroskopický obrázek virových frakcí (a také údaje titrů v tabulce 5.5) ukazuje, že v CsCl gradientu nebyly účinně odděleny plné virové částice od prázdných. Pro dokonalou purifikaci virionů by bylo nutné zařadit ještě sacharózový a poté další CsCl gradient.

Získaný virus byl použit pro izolaci polyomavirové DNA, která byla využita pro zjištění sekvence regulační oblasti genomu viru P16 a také pro všechny pokusy v kapitole 5.2.

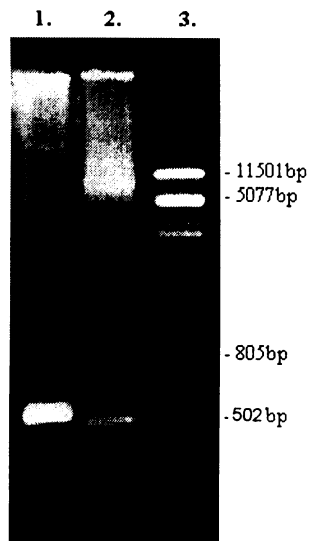


**Obr. 5.2:** Vzorek polyomaviru po izolaci v CsCl gradientu a zahuštění přes sacharózový polštář. Ve frakci F2 se vyskytují plné viriony (bílé) i prázdné (černé). Ve frakci F2 i F3 se vyskytovalo hodně rozpadlého materiálu. Elektronová mikroskopie, negativní barvení (provedeno V. Žílou).

#### **5.1.4 Izolace DNA a sekvenace regulační oblasti genomu polyomaviru kmene P16 a porovnání se známou sekvencí regulační oblasti A2**

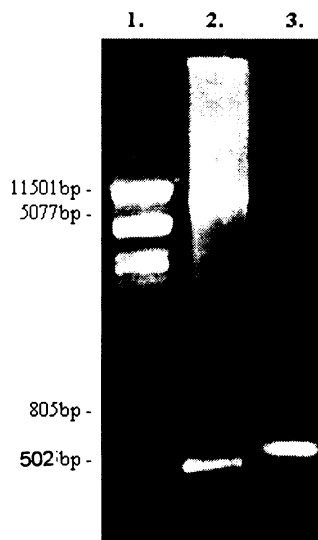
K izolovanému viru ( $1 \times 10^{11}$  v 800  $\mu$ l) byl přidán 1  $\mu$ l proteinázy K (1mg/ml) a směs byla inkubována 1 hodinu při 37 °C. Poté byl roztok přečištěn extrakcí 1x1 objemem upraveného fenolu, 1 objemem směsi upraveného fenol/chloroformu, dokud nezmizela mezifáze tvořená vysráženými zbytky proteinů a nakonec 1x1 objemem upraveného fenolu. Získaná DNA byla srážena etanolem a poté byla rozpuštěna v 30  $\mu$ l sterilní demi vody.

DNA byla použita jako předloha pro amplifikaci metodou PCR (kap. 4.3.7.7) s primery REG-LTcr a REG-VP2. Hybridizační teplota primerů byla 56 °C. PCR fragment regulační oblasti byl ověřen elektroforeticky (obr. 5.3) a následně izolován z gelu (kap. 4.3.7.5). Kvalita DNA po izolaci z gelu byla opět ověřena elektroforeticky (obr. 5.4). Pro kontrolu byla provedena PCR i s použitím plasmidu pMJG, ve kterém je vložen celý genom polyomaviru kmen A2 a získaný PCR produkt byl rovněž analyzován elektroforeticky. Z obrázků 5.3 a 5.4 je patrné, že získaná regulační oblast viru P16 je větší než regulační oblast získaná PCR plasmidu pMJG, který má v sobě vložený genom kmene A2.



**Obr.5.3:** Elektroforéza získaného PCR fragmentu

1. PCR fragment regulační oblasti genomu polyomaviru P16
2. Pozitivní kontrola: PCR regulační oblasti s použitím templátu pMJG s genomem kmene A2
3. Marker  $\lambda$  DNA/Pst I



**Obr. 5.4:** Elektroforéza PCR fragmentu regulační oblasti P16 genomu po izolaci z gelu.

1. Marker  $\lambda$  DNA/Pst I
2. Pozitivní kontrola: PCR produkt regulační oblasti získaný na templátu pMJG
3. Izolovaný PCR fragment s regulační oblastí genomu polyomaviru P16.

Po elektroforetickém ověření PCR fragmentu regulační oblasti byla připravena směs pro sekvenaci: 1 µl PCR fragmentu regulační oblasti DNA, 3,2 µl primeru (1. reakce: REG/VP2, 2. reakce: REG-LT), 9,8 µl demi vody. Pro sekvenaci byl použit „BigDye Terminator® v3.1 Cycle Sequencing Kit“. (provedeno v Laboratoři sekvenace DNA, UK Praha).

Získaná sekvence regulační oblasti P16 byla porovnána s již známou sekvencí viru A2 (obr. 5.5). Je patrné, že se obě sekvence liší. Ve srovnání s regulačními sekvencemi viru A2 bylo v regulační oblasti viru P16 zjištěno 7 nukleotidových substitucí, delece 1 nukleotidu a inserce 1 nukleotidu o 35 nukleotidů dále. Největší změnou je 44 nukleotidová inserce mezi nukleotidy 5154 a 5155 (počítáno v genomu A2). Tento inzert se nachází v oblasti enhanceru, který hraje roli jak v regulaci transkripce tak v regulaci replikace. Při prozkoumávání sekvencí bylo zjištěno, že dvěma substitucemi (v poloze 5104 a 5109 A2 genomu) ztratil genom viru P16 jedno z vazebných míst pro PEA1. Naopak, v inzertované 44ti nukleotidové sekvenci se objevuje navíc proti genomu kmenu A2 další vazebné místo pro transkripční faktor PEA3.



```

P16  GTCAGTGC GGCTCCCATTTT GAAAATTCACCTACTTGATCAGCTTCAGAAGATGGCGGAG 5048
A2   GTCAGTGC GGCTCCCATTTT GAAAATTCACCTACTTGATCAGCTTCAGAAGATGGCGGAG 5034
*****

P16  GGCCTCCAACACAGTAATTTTCCTCCC GACTCTTAAAATAGAAAATGTCAAGTCAGTTAA 5108
A2   GGCCTCCAACACAGTAATTTTCCTCCC GACTCTTAAAATAGAAAATGTCAAGTCAGTTAA 5094
*****

P16  GCAGGAAGTCACTAGCTGACCGGAGCTGGCCGTGAGTCAGTTAAGCAGGAAGTCACTAGC 5168
A2   GCAGGAAGTGACTAACTGACCGGAGCTGGCCGTG----- 5154
*****

P16  TGNCCGCAGCTGGCCGTGCNACATCCTCTTTTAAATTAGTTGCTAGGCAACTGGCCTC 5228
A2   -----CGACATCCTCTTTTAAATTAGTTGCTAGGCAACTGGCCTC 5196
*****

P16  GTTTTGCAAGAGGAAGCAAAAAGCCTCTCCACCCAGGCCTAGAATGTTT 5288
A2   GTTTTGCAAGAGGAAGCAAAAAGCCTCTCCACCCAGGCCTAGAATGTTT 5256
*****

P16  CCACCCACTCATTACTATGACAACAGCTGTTTTTTTTTAGTATTA GCAGAGGCCGGGGGC 9
A2   CCACCCAATCATTACTATGACAACAGCTGTTTTTTTTTAGTATTAAGCAGAGGCCGGGGGC 19
*****

P16  CCCTGGCCTCCGCTTACTCTTGGAGAAAAGGAGAGAGGCCTTG TAGAGGCTTCCAGAGG 70
A2   CCCTGGCCTCCGCTTACTCTGGAGAAAAGGAGAGGCATTG TAGAGGCTTCCAGAGG 78
*****

P16  CAACTTGTCAAAACAGGACTGGCGCCTTGGAGGCGCTGTGGGGCCACCCAAATTGATATA 130
A2   CAACTTGTCAAAACAGGACTGGCGCCTTGGAGGCGCTGTGGGGCCACCCAAATTGATATA 138
*****

P16  ATTAAGCCCAACCGCCTCTTCCCGCCTCATTTTCAGCCTCACCACCATCATGGATAGAGT 190
A2   ATTAAGCCCAACCGCCTCTTCCCGCCTCATTTTCAGCCTCACCACCATCATGGATAGAGT 198
*****

P16  TCTGAGC 250
A2   TCTGAGC 205
*****

```

44 nt inzerce  
7 substituci

PEA3 = AGGAAG  
PEA1 = TGAATAA  
PEA2 = GACCGCA  
EF-C = GTTGCTAGGCAAC  
PEB1 =

**Obr. 5.5:** Porovnání získané sekvence regulační oblasti genomu viru P16 se známou sekvencí regulační oblasti A2. Hvězdičky označují shodné nukleotidy v regulačních oblastech obou virů. Pomlčky označují chybějící nukleotidy. Barevně jsou označeny vazebné sekvence pro transkripční faktory.

## **5.2 Sledování vlivu cytoskeletárních inhibitorů na pohyb virionů buňkou**

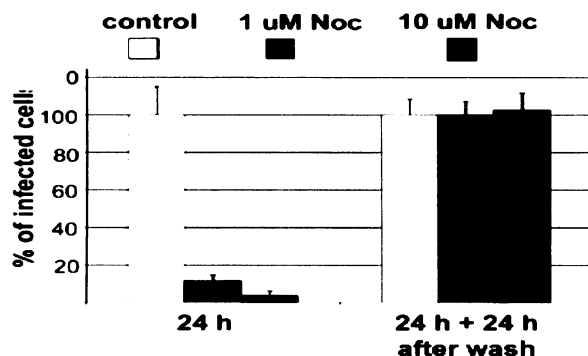
### **5.2.1 Funkce aktinového a tubulinového cytoskeletu v pohybu virionů od buněčné membrány k buněčnému jádru**

#### **5.2.1.1 Vliv rozrušení tubulinu nocodazolem na virovou infekci.**

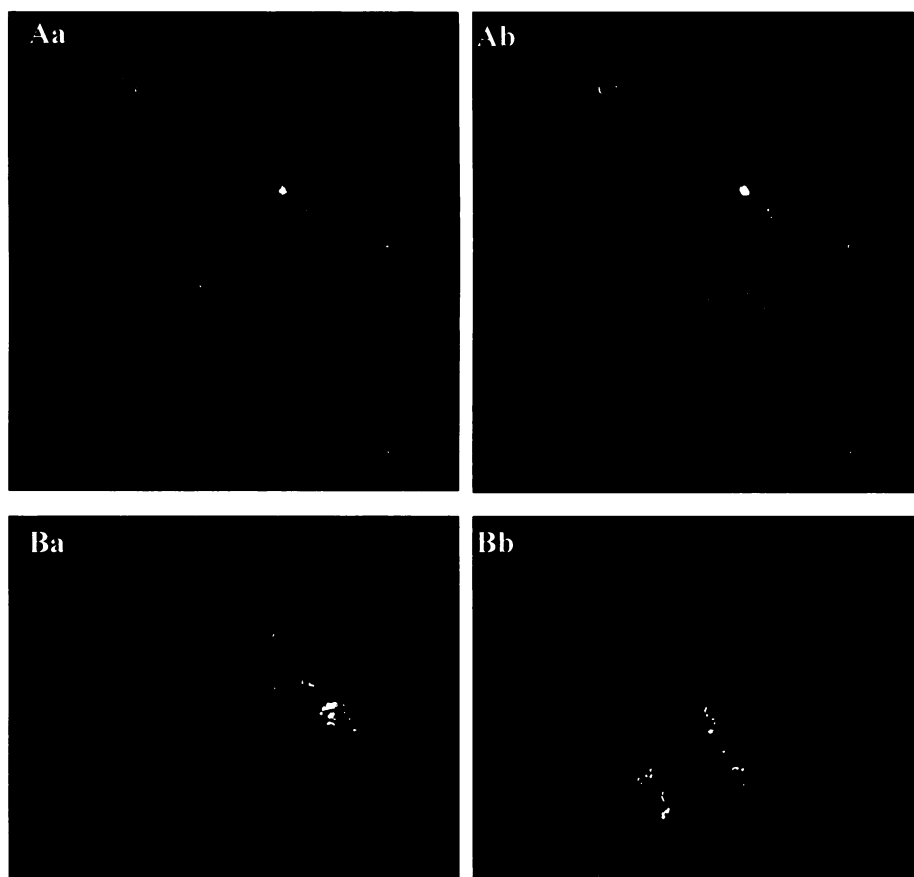
Již dříve bylo v naší laboratoři zjištěno, že nocodazol, látka rozrušující mikrotubuly, prakticky zcela inhibuje virovou infekci. Inhibice je reverzibilní. Po odmytí nocodazolu, znovuvytvoření mikrotubulů proběhne infekce, jejíž účinnost (počet infikovaných buněk) dosáhne stejné hodnoty jako v kontrolních buňkách, ke kterým nebyl nocodazol přidán (LIEBL 2005).

Pomocí fluorescenční a konfokální mikroskopie byl sledován vliv nocodazolu (10  $\mu$ M) na strukturu mikrotubulů a pohyb virionů v myších fibroblastech 3T6. Zajímalo nás, jaký bude osud vstupujících virionů v buňkách s rozrušeným tubulinem, zda se virus dostane do blízkosti buněčného jádra. Infikované buňky jsme fixovali 3 hod po adsorpci. (Nocodazol byl k buňkám přidán 1 hod před adsorpcí viru, která probíhala 1 hod a poté byly buňky s virem inkubovány v přítomnosti nocodazolu v mediu další 3 hodiny). Z minulých pokusů (RICHTEROVÁ *et al.*, 2001) víme, že většina vstupujících virových částic se v normálních buňkách (neošetřených nocodazolem) dostává během tří hodin do perinukleárního prostoru. Z obrázku 5.7 je patrné, že se virus překvapivě dostává do perinukleárního prostoru nejen v kontrolních ale i v buňkách s rozrušenými mikrotubuly. Tento pohyb tedy virus patrně vykonává pomocí aktinového cytoskeletu.

Zajímalo nás také, zda rozrušení tubulinového cytoskeletu výrazně neovlivní uspořádání aktinových filament. Obr. 5.8 dokumentuje, že nedošlo k viditelnému narušení mikrofilament v buňkách s depolymerizovaným tubulinem. Zároveň je opět na obrázcích vidět, že virus se dostává do blízkosti buněčného jádra bez tubulinových vláken. Přitom (viz graf na obr. 5.6) tento pohyb v nepřítomnosti funkčního tubulinového cytoskeletu nevede k produktivní infekci.

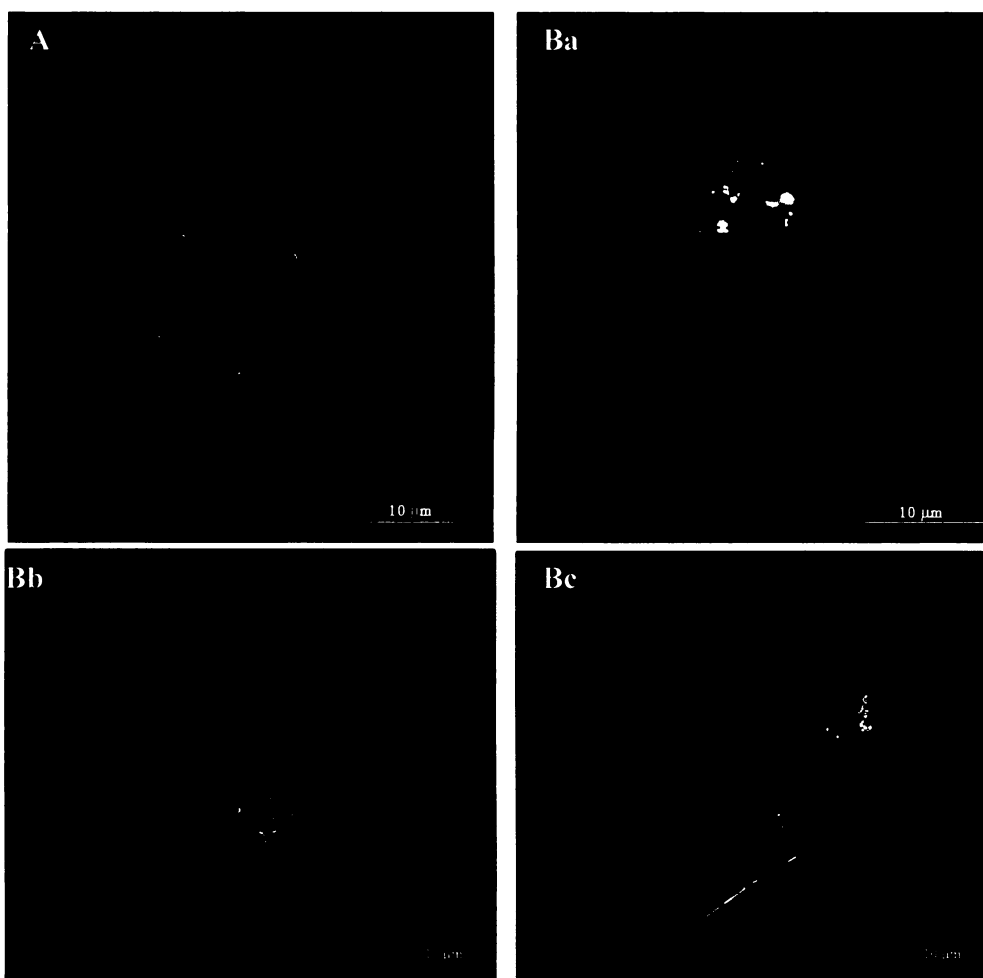


**Obr. 5.6: Reverzibilní inhibice virové infekce v přítomnosti nocodazolu.** Buňky infikované v přítomnosti nocodazolu (1 μM, 10 μM) byly po uplynutí inkubace fixovány a poté byl metodou *in situ* fluorescence stanoven počet buněk pozitivních na LT antigen. Účinnost infekce byla stanovena z počtu buněk pozitivních na LT antigen a porovnána s kontrolními buňkami inkubovanými bez inhibitoru (100%). V paralelním vzorku byl nocodazol odmyt a buňky byly inkubovány zbyvajícím časem do fixace a barvení. Ukázalo se, že infektivita v přítomnosti nocodazolu je reverzibilně inhibována (převzato z LIEBL 2005).



**Obr. 5.7: Porovnání lokalizace viru v kontrolních buňkách a v buňkách s rozrušenými mikrotubuly.** Tubulin (červená) a VP1 (zelená) bez použití nocodazolu (Aa,Ab) a v přítomnosti nocodazolu (Ba,Bb). 3T6 fibroblasty 3 hod po infekci myším polyomavirem. Snímky řezů jedné buňky (A) a dvou různých buněk (B) pořízené pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus IX 81.

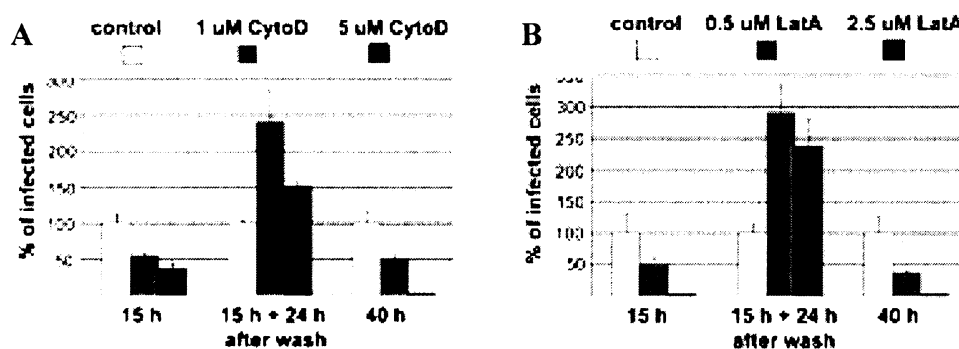
Protilátky: směs myší polyklonální protilátky proti VP1 a myší monoklonální protilátka proti α tubulinu; sekundární protilátka Alexa Fluor 488 kozí proti králičím IgG (zelená) a Alexa Fluor 546 kozí proti myším IgG (červená); značení jader DAPI (modrá).



**Obr. 5.8: Kontrola aktinových filament v buňkách s tubulinem rozrušeným nocodazolem. Aktin (červená) a VP1 (zelená) bez použití nocodazolu (A) a v přítomnosti nocodazolu (Ba,b,c). 3T6 fibroblasty 3 hod po infekci myším polyomavirem. Snímky řezů různých buněk pořízené pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus IX 81. Protilátky: myší monoklonální protilátka proti VP1; sekundární protilátka: Alexa Fluor 488-králičí proti myším IgG (zelená), phalloidin značený rhodaminem (červená); značení jader DAPI (modrá).**

### 5.2.1.2 Vliv rozrušení aktinových filament cytochalazinem D a latrunculinem A na pohyb virionů od buněčné membrány k jádru.

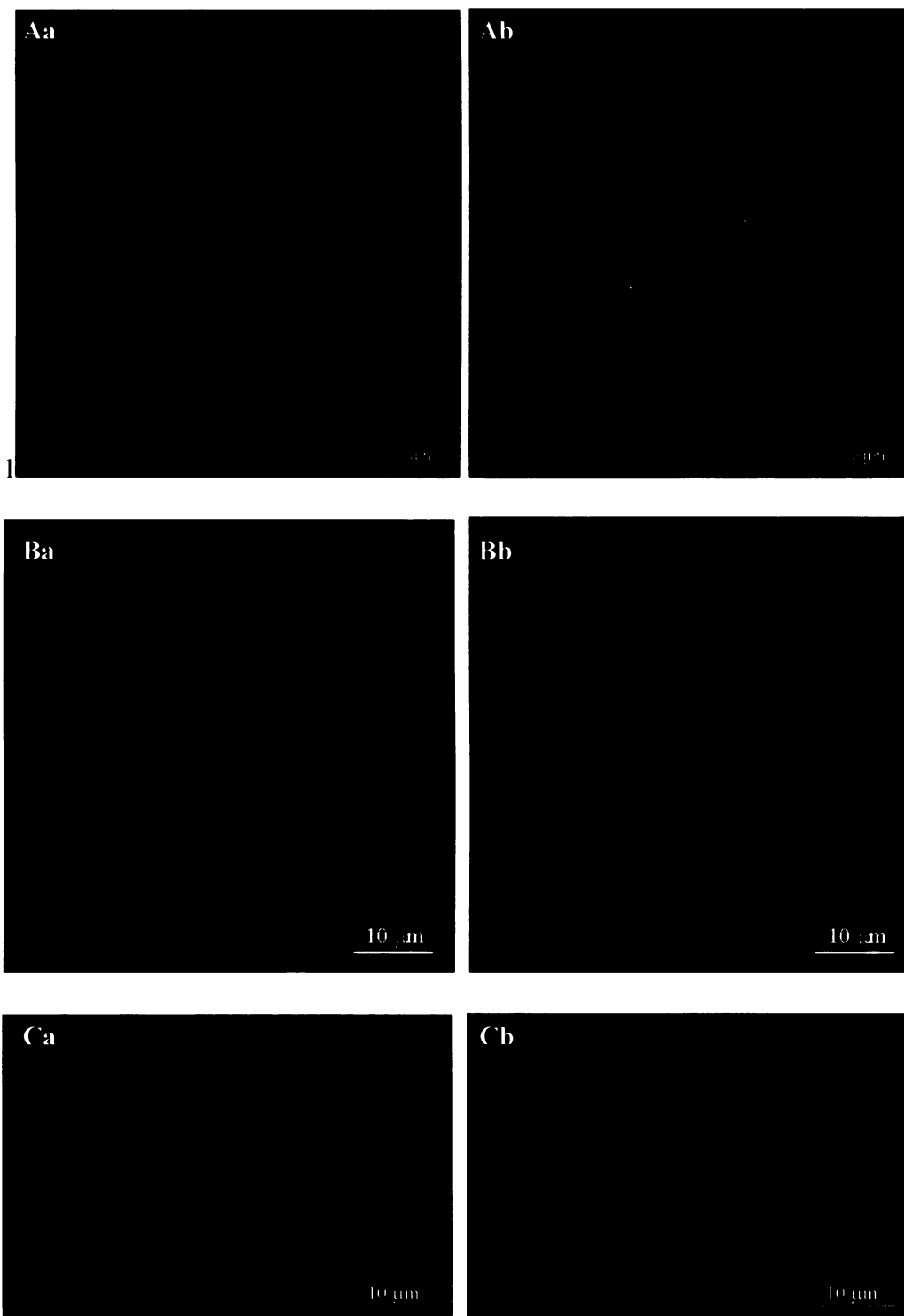
Přítomnost aktin polymerizujících agens sice sníží účinnost infekce polyomaviru, avšak výrazně méně než bylo pozorováno při rozrušení mikrotubulů. I v buňkách s rozrušeným aktinem je částečná inhibice infekce reverzibilní. Po odstranění aktin rozrušující látky se aktinový cytoskelet obnoví a infekce proběhne s účinností, která je výrazně vyšší než v kontrolních buňkách, ve kterých nebyl aktin transientně rozrušen (viz obr. 5.9 grafy A, B). (LIEBL 2005). Zajímalo nás a) jaká bude lokalizace viru v buňkách s rozrušeným aktinem a b) jak ovlivní rozrušení aktinových filament tubulinový cytoskelet.



**Obr. 5.9: Vliv transientní depolymerace aktinu na účinnost virové infekce.** Buňky infikované v přítomnosti cytochalazinu D (1 μM, 5 μM) (A) a latrunculinu A (0,5 μM, 2,5 μM) (B) byly po uplynutí inkubace fixovány a poté byl metodou *in situ* fluorescence stanoven počet buněk pozitivních na LT antigen. Účinnost infekce byla stanovena z počtu buněk pozitivních na LT antigen a porovnána s kontrolními buňkami inkubovanými bez inhibitoru (100%). V paralelním vzorku byl cytochalazin D a latrunculin A odmyt a buňky byly inkubovány zbývajícím časem do fixace a barvení. (Převzato LIEBL 2005).

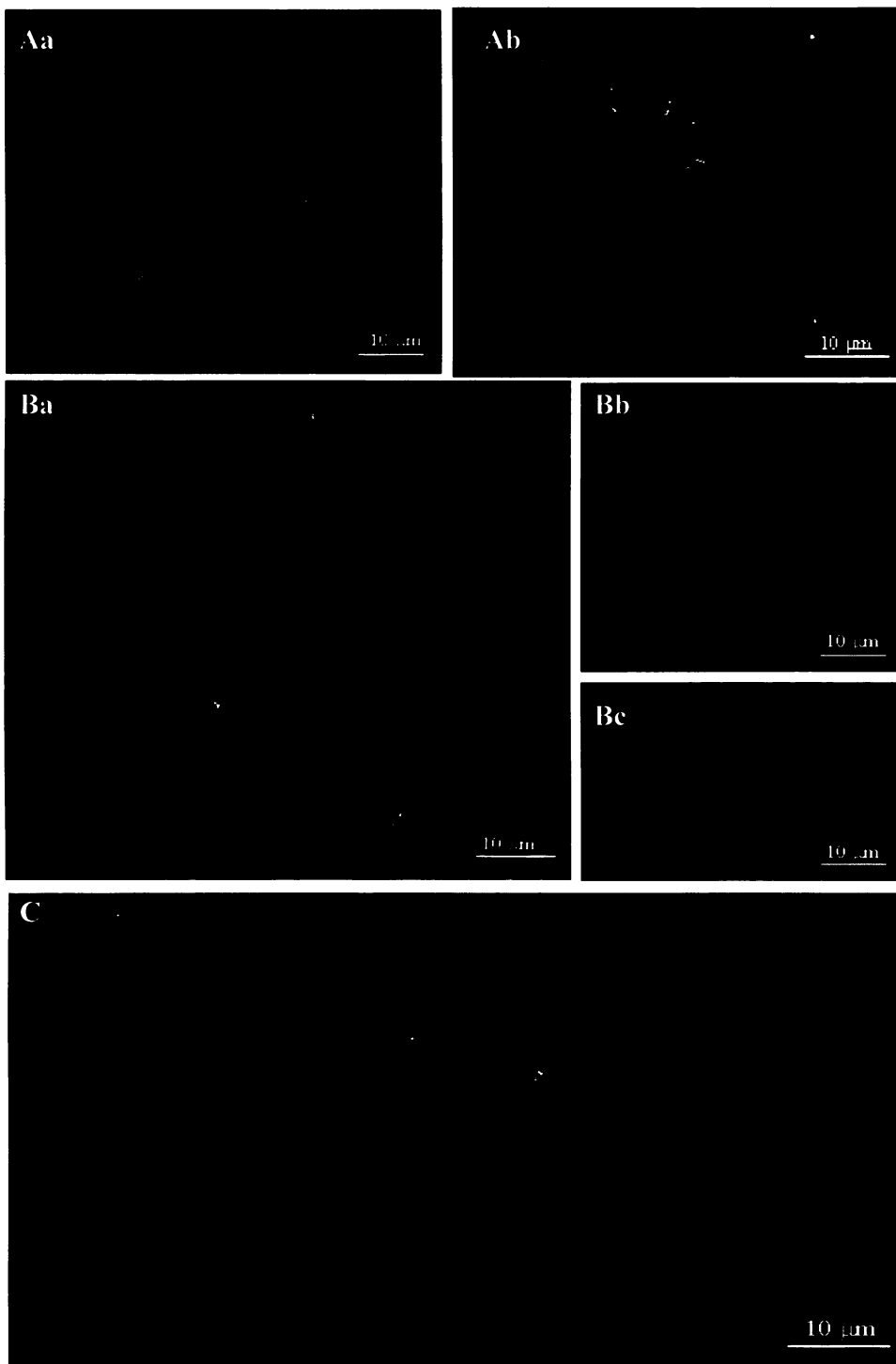
Konfokální mikroskopií byl studován vliv latrunculinu A (2,5 μM) a cytochalazinu D (5 μM) na pohyb virionů myšimi fibroblasty 3T6. Čas fixace buněk byl zvolen stejný jako v předchozí kapitole, tj. 3 hod po adsorpci viru, aktin rozrušující agens bylo přidáno k buňkám vždy 1 hod před adsorpcí viru. Obr. 5.10 ukazuje, že aktinové svazky byly v přítomnosti jak cytochalazinu D tak i

latrunculinu A rozrušeny a buňky změnilly tvar. Většina virionů se v těchto buňkách během 3 hodin do blízkosti jádra nedostala a zůstala na periferii buňky (obr. 5.10). Přesto infekce viru není při rozrušeném aktinu zcela inhibována (viz grafy obr. 5.9). To je velmi zajímavé zjištění, které poskytuje více interpretací. Z výsledků nicméně vyplývá, že mikrotubuly jsou bezpodmínečně nutné pro **produktivní** pohyb virionů buňkou. Z předchozích pokusů naší laboratoře víme (MANNOVÁ a FORSTOVÁ, 2003), že i při vysoké multiplicitě infekce pouze málo virionů dopraví genom do buněčného jádra. Tyto viriony mohou snadno uniknout pozornosti při konfokální mikroskopii. Vzhledem k tomu, že přítomnost aktin rozrušujících agens, i když ne zcela, přece inhibovala virovou infekci, chtěli jsme zjistit, zdali tyto látky neměly výrazný vliv i na stav tubulinového cytoskeletu. Obrázek 5.11 ukazuje, že v buňkách vystavených vlivu látek rozrušujících aktin cytochalazinu D (obr. 5.11 B) a latrunculinu A (obr. 5.11 C), došlo k drastickým změnám v uspořádání tubulinového cytoskeletu. I zde je vidět, že v buňkách, které nebyly vystaveny vlivu cytochalazinu D nebo latrunculinu A (obr. 5.11 A) se nachází virus ve větší blízkosti jádra, než v buňkách s rozrušeným aktinem.



**Obr. 5.10: Vliv aktin rozrušujících agens cytochalazinu D a latrunculinu A na pohyb viru buňkou. Aktin (červená) a VP1 (zelená) bez použití aktin-rozrušující látky (Aa,b), aktin v přítomnosti cytochalazinu D (Ba,b) a latrunculinu A (Ca,b). 3T6 fibroblasty 3 hod po infekci myším polyomavirem. Snímky řezů stejné buňky (a,b) pořízené pomocí konfokálního mikroskopu.**

Protilátky: myší monoklonální protilátka proti VP1; sekundární protilátka Alexa Fluor 488-králičí proti myším IgG (zelená), phalloidin značený rhodaminem (červená); značení jader DAPI (modrá).



**Obr. 5.11: Kontrola mikrotubulů v buňkách s rozrušeným aktinovým cytoskeletem. Tubulin (červená) a VP1 (zelená) bez použití aktin-rozrušujících látek (A,B,C), tubulin v přítomnosti cytochalazinu D (Ba,Bb,Bc) a latrunculinu A (C). 3T6 fibroblasty 3hod po infekci myším polyomavirem. Snímky řezů různých buněk pořízené pomocí konfokálního mikroskopu.**

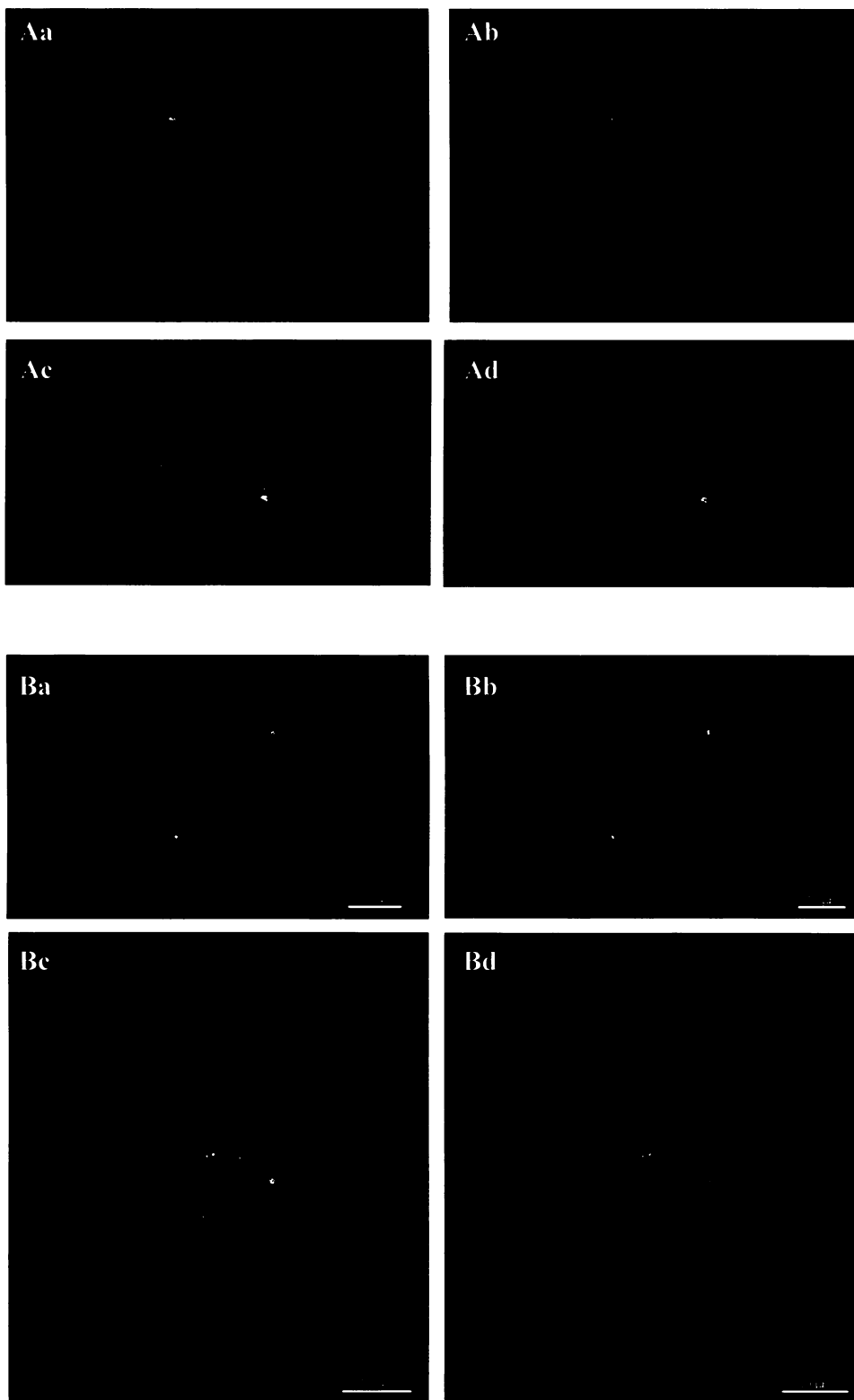
Protilátky: směs myší polyklonální protilátky proti VP1 a myší monoklonální protilátka proti  $\alpha$  tubulinu; sekundární protilátka Alexa Fluor 488 kozí proti králíčím IgG (zelená) a Alexa Fluor 546 kozí proti myším IgG (červená); značení jader DAPI (modrá).



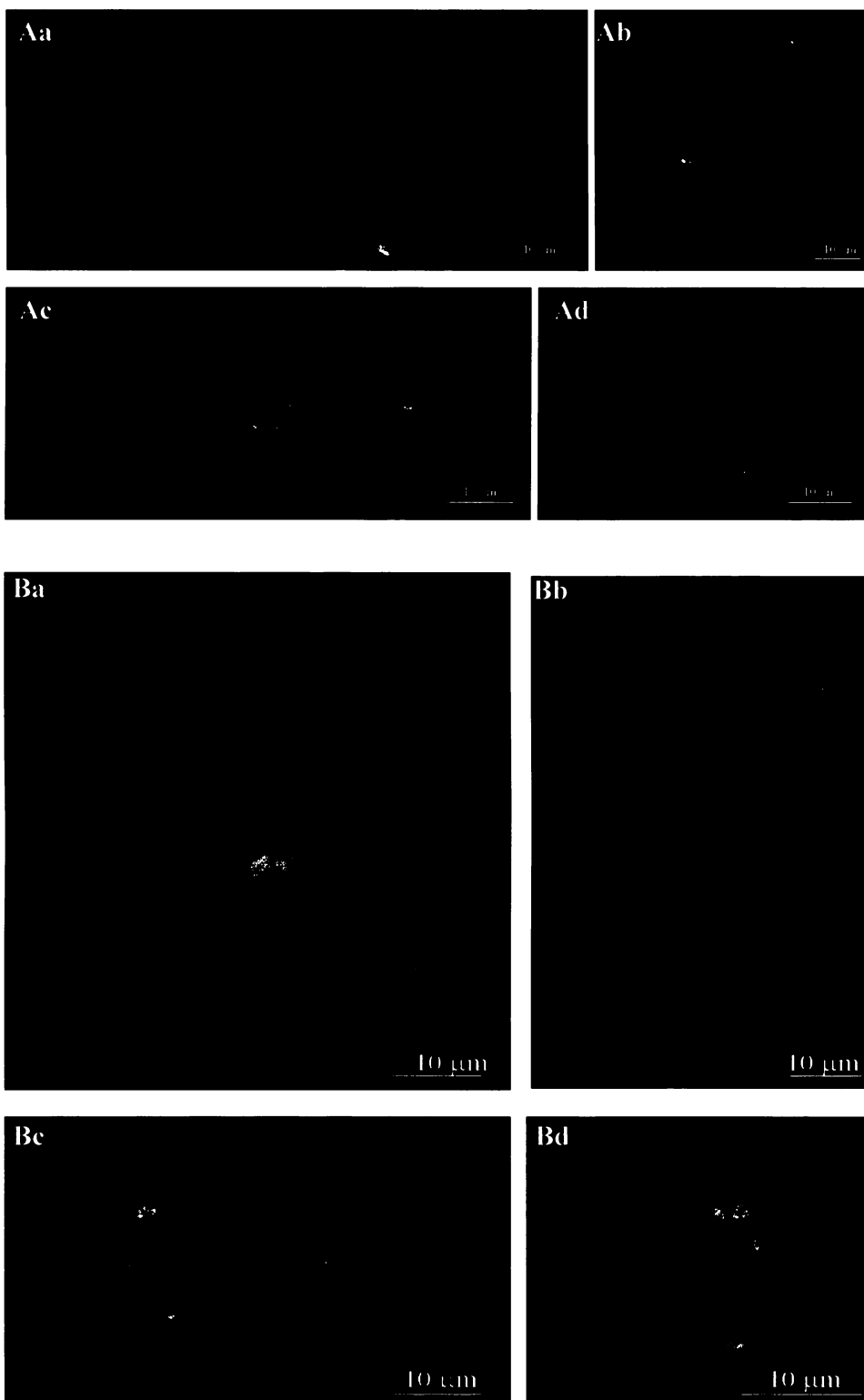
### 5.2.1.3 Struktura cytoskeletu po odmytí aktin rozrušujících látek

Zajímalo mě, jak rychle jsou aktinová mikrofilamenta a mikrotubuly po odmytí látek rozrušujících aktin schopny obnovit svou původní strukturu a funkci a také, jak se změní lokalizace virionů. Buňky narostlé na mikroskopických sklíčkách byly 20-24 hod synchronizovány, poté byla k buňkám přidána látka rozrušující cytoskelet (cytochalazin D, latrunculin A). Po uplynutí jedné hodiny byla tato látka odstraněna, buňky byly infikovány s multiplicitou infekce 100 pfu/b (4.3.2.4) v přítomnosti látky rozrušující cytoskelet a inkubovány 1 hod. Poté bylo médium odstraněno a buňky byly 2 hod inkubovány v médiu se sérem v přítomnosti látky rozrušující cytoskelet. Po odstranění agens byly buňky inkubovány buď 1 nebo 2 hod v médiu s 10% sérem a poté fixovány (kap. 4.3.2.9), barveny protilátkami a analyzovány konfokální mikroskopií.

Ukázky infikovaných buněk „zotavujících se“ po působení aktin rozrušujících látek jsou na obr. 5.12. a 5.13. Z obrázků je patrné, že 1 hod po odmytí agens nestačila na plnou obnovu aktinového ani tubulinového cytoskeletu, přičemž následky působení latrunculinu A jsou více patrné než cytochalazinu D. Po dvou hodinách je však jak aktinový tak i tubulinový cytoskelet obnoven a je možné pozorovat virus blíže buněčného jádra (obr. 5.12 Ac, Ad, Bc, Bd, a obr. 5.13 Ac, Ad, Bc, Bd). Struktura neporušeného tubulinu (obr. 5.7 A, 5.11 A) a aktinu (obr. 5.8 A, 5.10 A) je ukázána v předchozích kapitolách 5.2.1.1. a 5.2.1.2.



**Obr. 5.12: Obnova aktinového cytoskeletu po odmytí aktin rozrušujících látek.** Aktin (červená) a VP1 (zelená) po působení cytochalazinu D (A:a,b,c,d) a latrunculinu A (B:a,b,c,d). Buňky 1 hod (a,b) a 2 hod po odmytí látek rozrušujících aktin (c,d). V řádku jsou snímky řezů stejné buňky pořízené pomocí konfokálního mikroskopu. Protilátky: myší monoklonální protilátka proti VP1; sekundární protilátka: Alexa Fluor 488-králičí proti myším IgG (zelená), phalloidin značený rhodaminem (červená); značení jader DAPI (modrá).



**Obr. 5.13: Obnova tubulinového cytoskeletu po odmytí aktin rozrušujících látek. Tubulin (červená) a VP1 (zelená) po působení cytochalazinu D (A:a,b,c,d) a latrunculinu A (B:a,b,c,d). Buňky 1 hod (a,b) a 2 hod po odmytí látek rozrušujících aktin (c,d). V řádku jsou snímky řezů stejné buňky pořízené pomocí konfokálního mikroskopu.**

Protilátky: směs králičí polyklonální protilátky proti VP1 a myší monoklonální protilátky proti  $\alpha$  tubulinu; sekundární protilátka Alexa Fluor 488 kozí proti králičím IgG (zelená) a Alexa Fluor 546 kozí proti myším IgG (červená); značení jader DAPI (modrá).

### 5.2.2 Sledování lokalizace viru v přítomnosti cytoskelet rozrušujících látek

Viriony myšího polyomaviru vstupují do buněk přes membránové mikrodomény, pokračují v monopinocytických váčcích do časných endozomů, kde je možné je zastihnout 20-340 minut po adsorpci. Později (3hod po infekci) se nachází v perinukleárním prostoru, kde částečně kolokalizuje s recyklujícími endozomy, částečně s endoplazmatickým retikulem (ER). Jeho genom dosud neznámým způsobem vstupuje do jádra.

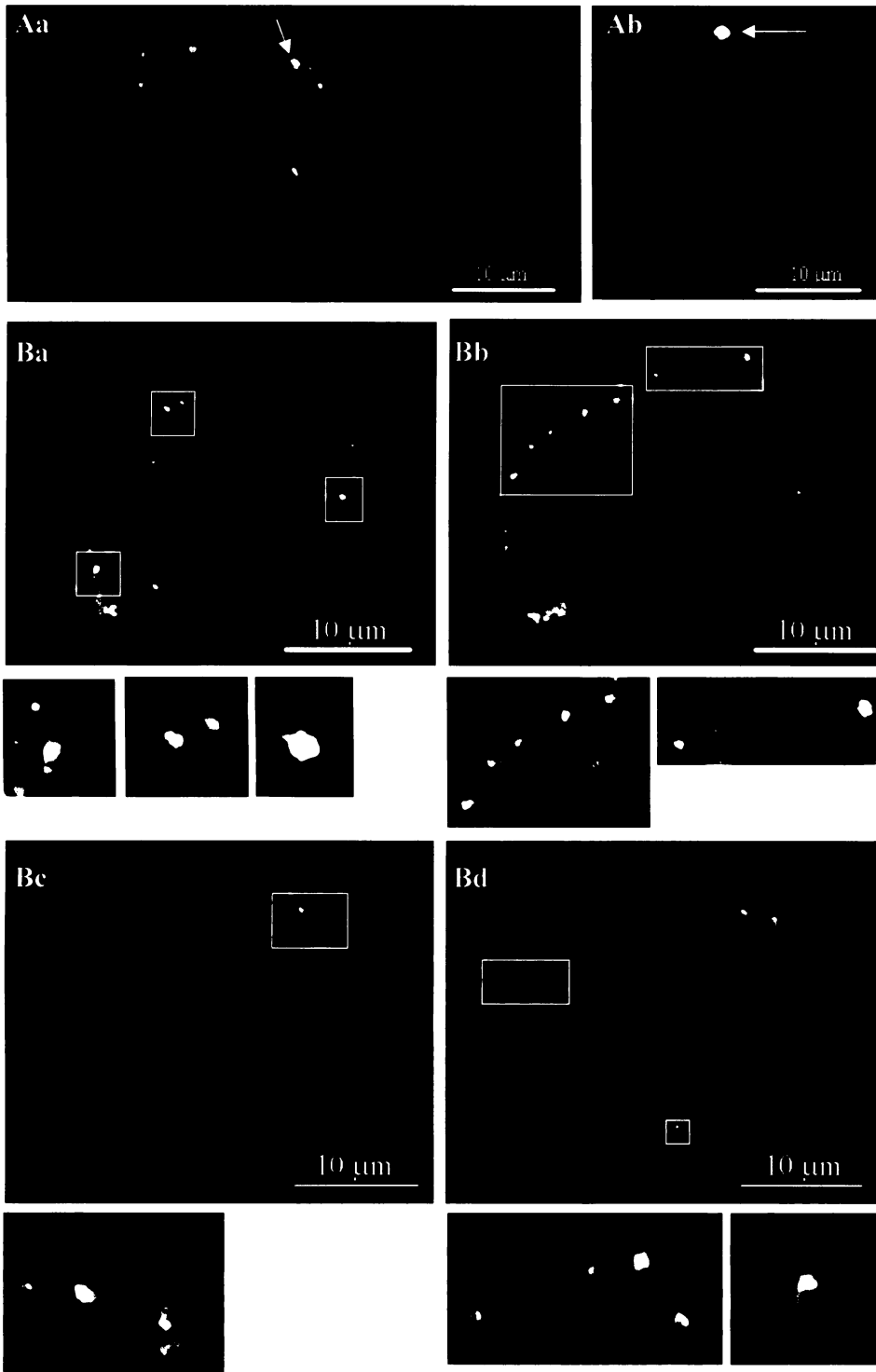
Snažili jsme se identifikovat kompartmenty, ve kterých se myší polyomavirus nachází 3 h.p.i. po rozrušení cytoskeletu nocodazolem, cytochalazinem D nebo latrunculinem A. Nejprve jsme se zaměřili na kolokalizaci s **kaveolinem-1**.

Kaveolin-1 je protein lokalizovaný na cytoplazmatické membráně v tzv. raftech (membránových mikrodoménách), ze kterých se tvoří invaginace, zvané kaveoly. Kaveolin se dále nachází ve váčcích odvozených od kaveol, které pak fúzí s dalšími buněčnými endozomy. Kaveolin je možno identifikovat i na časných a recyklujících endozomech nebo na velkých endozomech nazývaných kaveozomy. Některé z monopinocytických váčků, do kterých se internalizuje myší polyomavirus jsou pozitivní na kaveolin a v mnohých buňkách provázely kaveolin-1 virus až do perinukleárního prostoru (RICHTEROVÁ et al 2001).

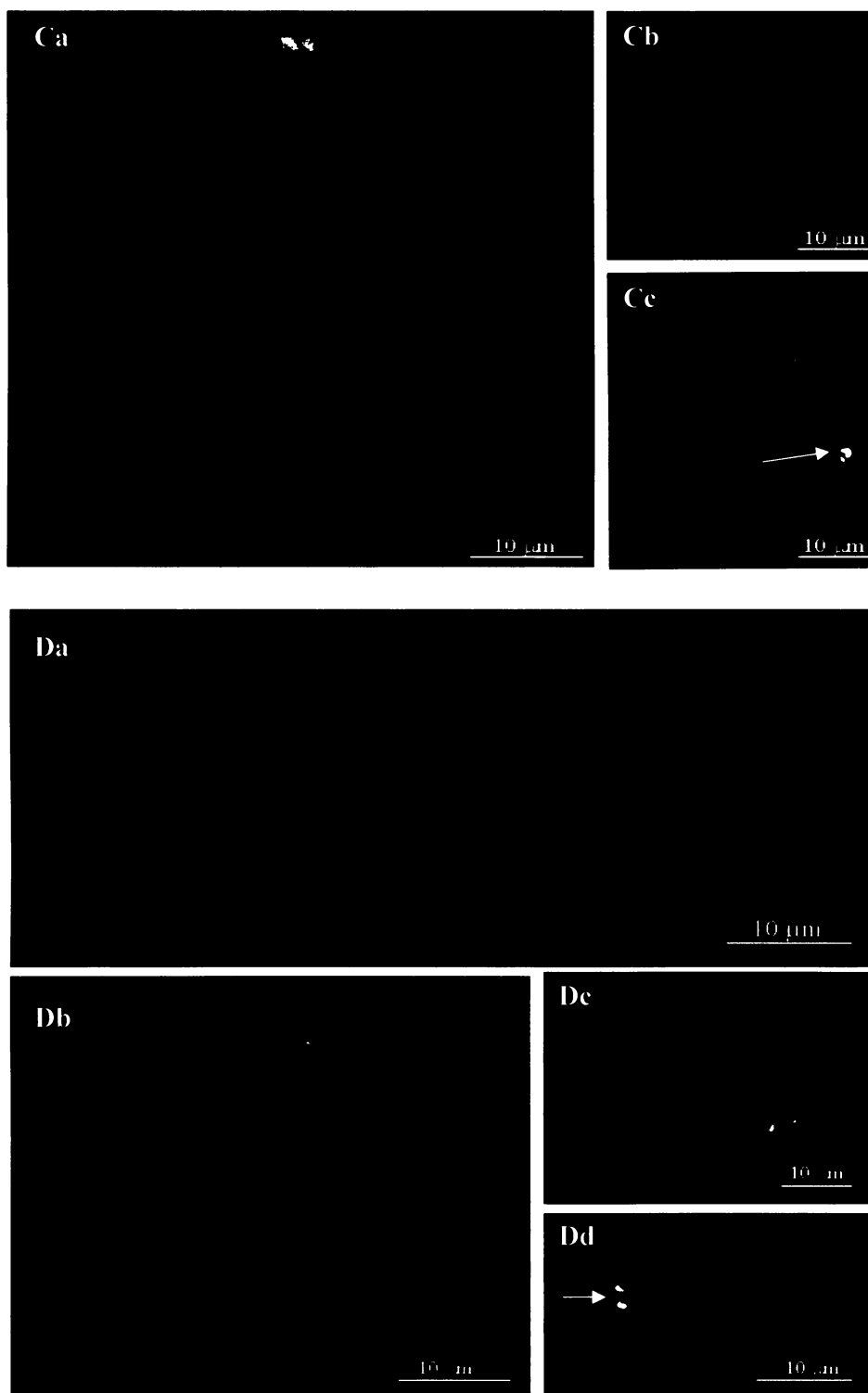
V přítomnosti nocodazolu se viriony (jak už bylo uvedeno v předchozích kapitolách) dostaly až k jádru. Obr. 5.14 ukazuje, že i kaveolinový signál se v buňkách s rozrušenými mikrotubuly nachází v hojné míře v perinukleárním prostoru, kde je možno pozorovat i částečnou kolokalizaci kaveolinu-1 a VP1 (obr. 5.14 B, bílé šipky a obdelníky).

Při použití látek rozrušujících aktin cytochalazinu D (obr. 5.14 C) a latrunculinu A (obr. 5.14 D) byl kaveolin přítomen více v periferní oblasti buněk a na cytoplazmatické membráně. Zajímavé je, že ani tam nebyla pozorována ve větší míře jeho kolokalizace s VP1. Virus se nacházel většinou ve formě shluků rovněž na periférii buněk nebo i v těsné blízkosti membrány ale až na ojedinělé případy (obr. 5.14 Cd, Db, bílé šipky), mimo signál kaveolinu.

Kaveolin-1, VP1, DAPI



## Kaveolin-1, VP1, DAPI



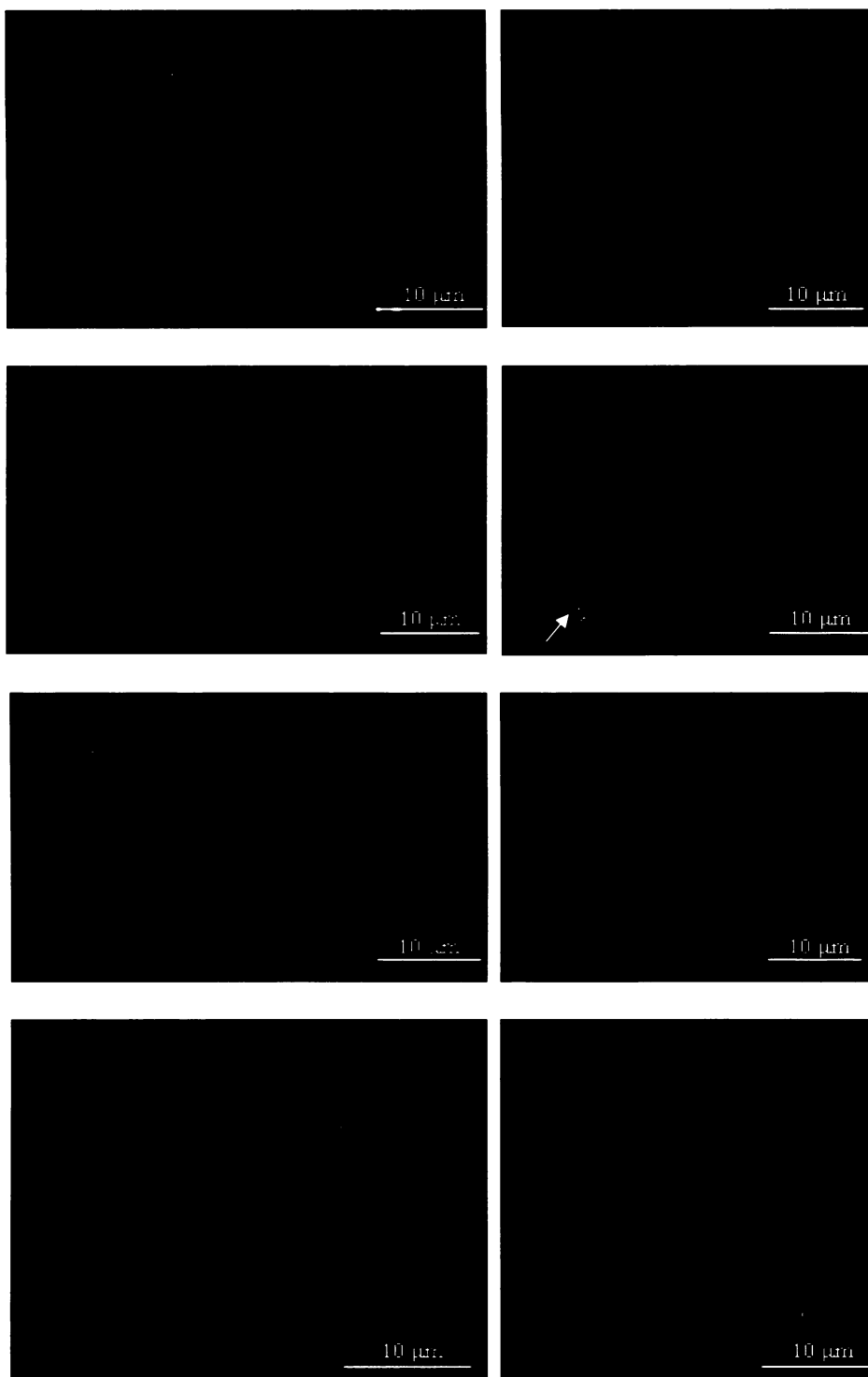
**Obr. 5.14: Lokalizace kaveolinu a viru v buňkách s rozrušeným tubulínem (B) nebo aktinem (C,D). Kaveolin (červená) a VP1 (zelená) bez použití látek rozrušujících cytoskelet (A), v přítomnosti nocodazolu (B), cytochalazinu D (C), latrunculinu A (D). Kolokalizace jsou označeny bílými šipkami nebo obdelníky. Snímky řezů různých buněk (A,C,D) a stejných buněk (Ba,b,c; Bd,e,f) pořízené pomocí konfokálního mikroskopu. Protilátky: směs myší monoklonální protilátky proti VP1 a králičí protilátky proti caveolinu; sekundární protilátka Alexa Fluor 488 oslí proti myším IgG (zelená) a Alexa Fluor 594 kozí proti králičím IgG (červená); značení jader DAPI (modrá).**

Dále se náš zájem soustředil na **časné endosomy**. V buňkách s rozrušeným cytoskeletem jsme testovali kolokalizaci viru s proteinem EEA1. Protein EEA1 („early endosomal antigen 1“) je jeden z efektorových proteinů Rab-5 GTPázy. EEA1 je prostřednictvím Rab-5 GTP vázán do membrány časného endozomu a je využíván jako spolehlivý marker časných endosomů.

Tři hodiny po infekci se v kontrolních buňkách virus v časných endozomech již nevyskytuje (obr. 5.15 A). Stopy kolokalizace viru jsou vidět v přítomnosti látky rozrušující tubulin nocodazolu (obr. 5.15 Bb, bílá šipka). U buněk po působení látek rozrušujících aktin cytochalazinu D (obr. 5.15 C) a latrunculinu A (obr. 5.15 D), ačkoliv se virus nachází na buněčné periferii, s časnými endozomy nekolokalizuje.

Dalším vyšetřovaným kompartmentem byly **recyklující endozomy** s markerem Rab11. Komplex **Rab11 GTPázy** a několika Rab11 asociujících proteinů má klíčovou roli v třídění proteinů při výstupu z recyklujících endozomů. U kontrolních buněk (obr. 5.16 A), které nebyly pod vlivem látek rozrušujících cytoskelet, je vidět v blízkosti buněčného jádra občasná kolokalizace s Rab11 (v souladu s našimi dřívějšími pokusy). I v buňkách s rozrušeným tubulinem, v přítomnosti nocodazolu (obr. 5.16 B) je možno občasnou kolokalizaci Rab 11 a VP1 najít. V přítomnosti cytochalazinu D (obr. 5.16 C) a latrunculinu A (obr. 5.16 D) je zjevné, že distribuce Rab11 GTPázy a s ní spojených endozomů je značně narušena. Rab11 se vyskytuje ve shlucích, často vzdálena od buněčného jádra. Kolokalizace s VP1 pozorována nebyla.

## Časné endozomy (EEA1), VP1, DAPI

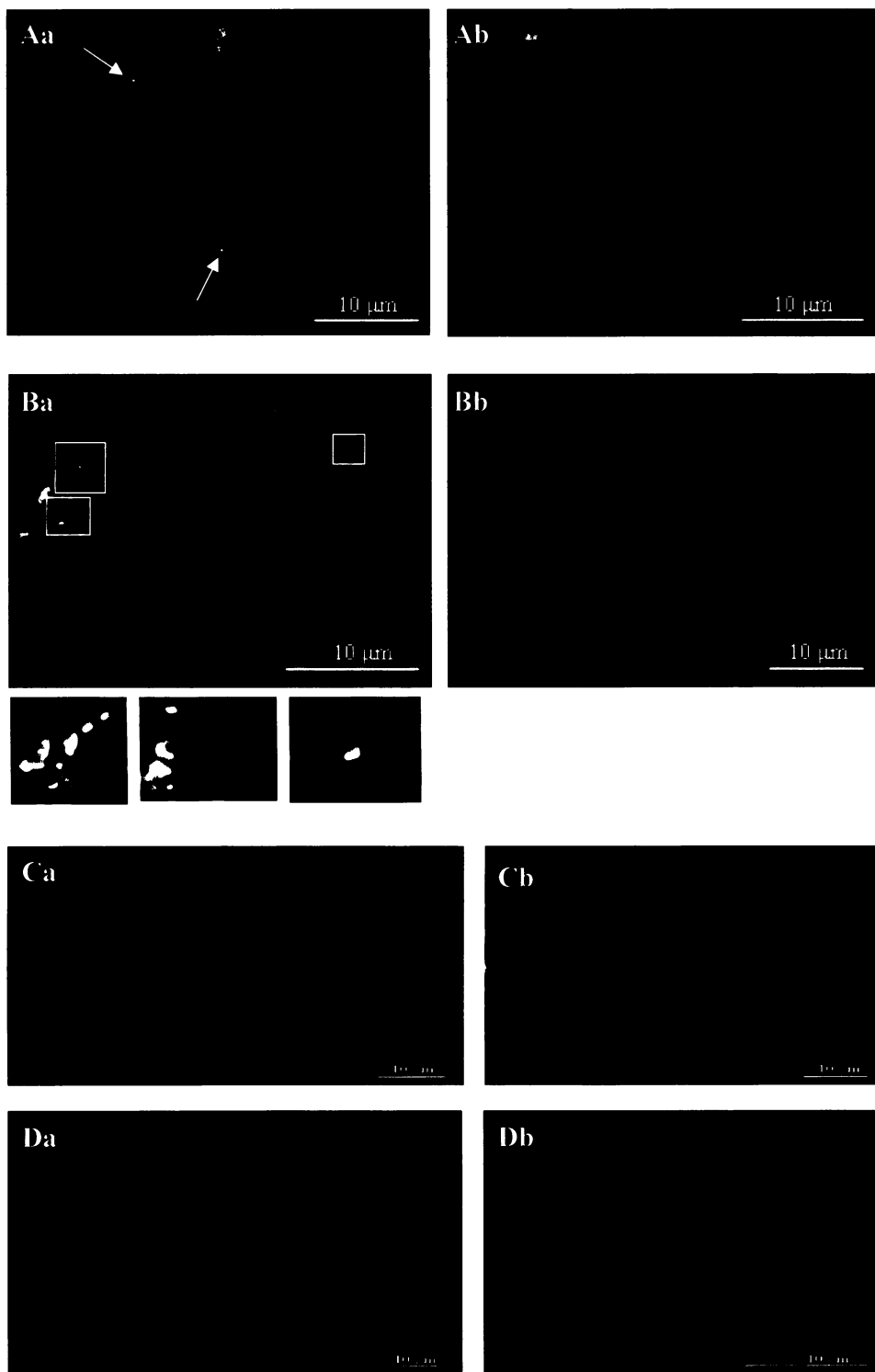


**obr. 5.15: Lokalizace časných endozomů (EEA1) a viru v buňkách s rozrušeným tubulínem (B) nebo aktinem (C,D).** Časné endozomy EEA1 (červená) a VP1 (zelená) bez vlivu látek rozrušujících cytoskelet (A), v přítomnosti nocodazolu (B), cytochalazinu D (C) a latrunculinu A (D). Kolokalizace je označena bílou šipkou. Snímky řezů různých buněk pořízené pomocí konfokálního mikroskopu.

Protilátky: směs myší monoklonální protilátky proti VP1 a kozí protilátky proti EEA1; sekundární protilátka Alexa Fluor 488 oslí proti myším IgG (zelená) a Alexa Fluor 546 oslí proti kozím IgG (červená); značení jader DAPI (modrá).



Recyklující endozomy (Rab11), VP1, DAPI



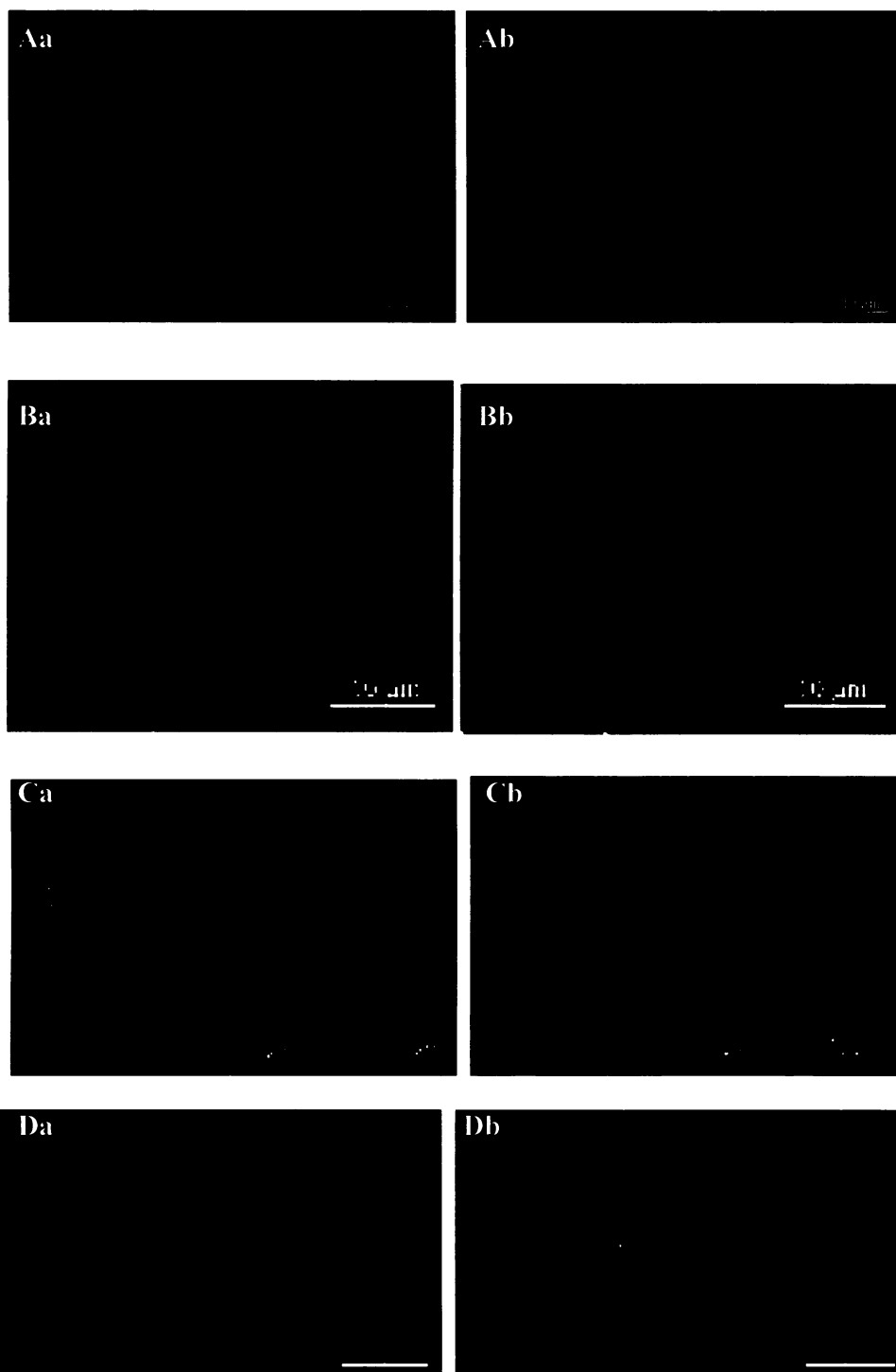
**Obr. 5.16: Lokalizace recyklujících endozomů (Rab11) a viru v buňkách s rozrušeným tubulínem (B) nebo aktinem (C,D).** Recyklující endozomy Rab11 (červená) a VP1 (zelená) bez vlivu látek rozrušujících cytoskelet (A), v přítomnosti nocodazolu (B), cytochalazinu D (C) a latrunculinu A (D). Kolokalizace jsou označeny bílými šipkami. Snímky řezů různých buněk pořízené pomocí konfokálního mikroskopu. Protilátky: směs myší monoklonální protilátky proti VP1 a králičí protilátky proti Rab11; sekundární protilátka Alexa Fluor 488 oslí proti myším IgG (zelená) a Alexa Fluor 594 kozí proti králičím IgG (červená); značení jader DAPI (modrá).

Vzhledem k tomu, že se nám zatím nepodařilo najít kompartmenty na periferii buňky, ve kterých se polyomavirus nachází v buňkách s rozrušeným cytoskeletem, vyšetřovali jsme i kompartmenty, ve kterých v normálních buňkách viriony pozorovány nebyly – pozdní endozomy a lysozomy analýzou kolokalizace VP1 s proteinem LAMP2 (**Lysosome associated membrane protein**). LAMP2 se nachází v lumen i v membránách lysozomů a pozdních endozomů. Tři hodiny po infekci nebyla dle očekávání pozorována žádná kolokalizace ani u kontrolních buněk (obr. 5.17 A) ani u buněk po použití látek rozrušujících cytoskelet: nocodazolu (obr. 5.17 B), cytochalazinu D (obr. 5.17 C) a latrunculinu A (obr. 5.17 D).

Dále jsme zjišťovali, zda nejsou viriony v přítomnosti látek rozrušujících cytoskelet degradovány v **proteazomech**. Analyzovali jsme kolokalizaci VP1 proteinu s ubiquitinem (marker proteazomové degradační dráhy). Tři hodiny po infekci jsme u kontrolních buněk kolokalizaci viru s ubiquitinem nepozorovali ani v těchto pokusech (obr. 5.18 A) ani v pokusech dřívějších (MANNOVÁ a FORSTOVÁ 2003). I když v pozdějších časech po infekci 8 hodin a více, kolokalizace VP1 s ubiquitinem pozorována byla. Překvapivě v přítomnosti aktin rozrušujících látek jsme pozorovali, že větší shluky VP1 signálu na periferii buněk s ubiquitinem kolokalizují již 3 hod po infekci (obr. 5.18 C, D).

Z důvodu časového omezení této práce a také nedostupnosti kvalitních protilátek proti dalším buněčným markerům bude další pokračování analýzy prováděno již mimo rámec diplomové práce.

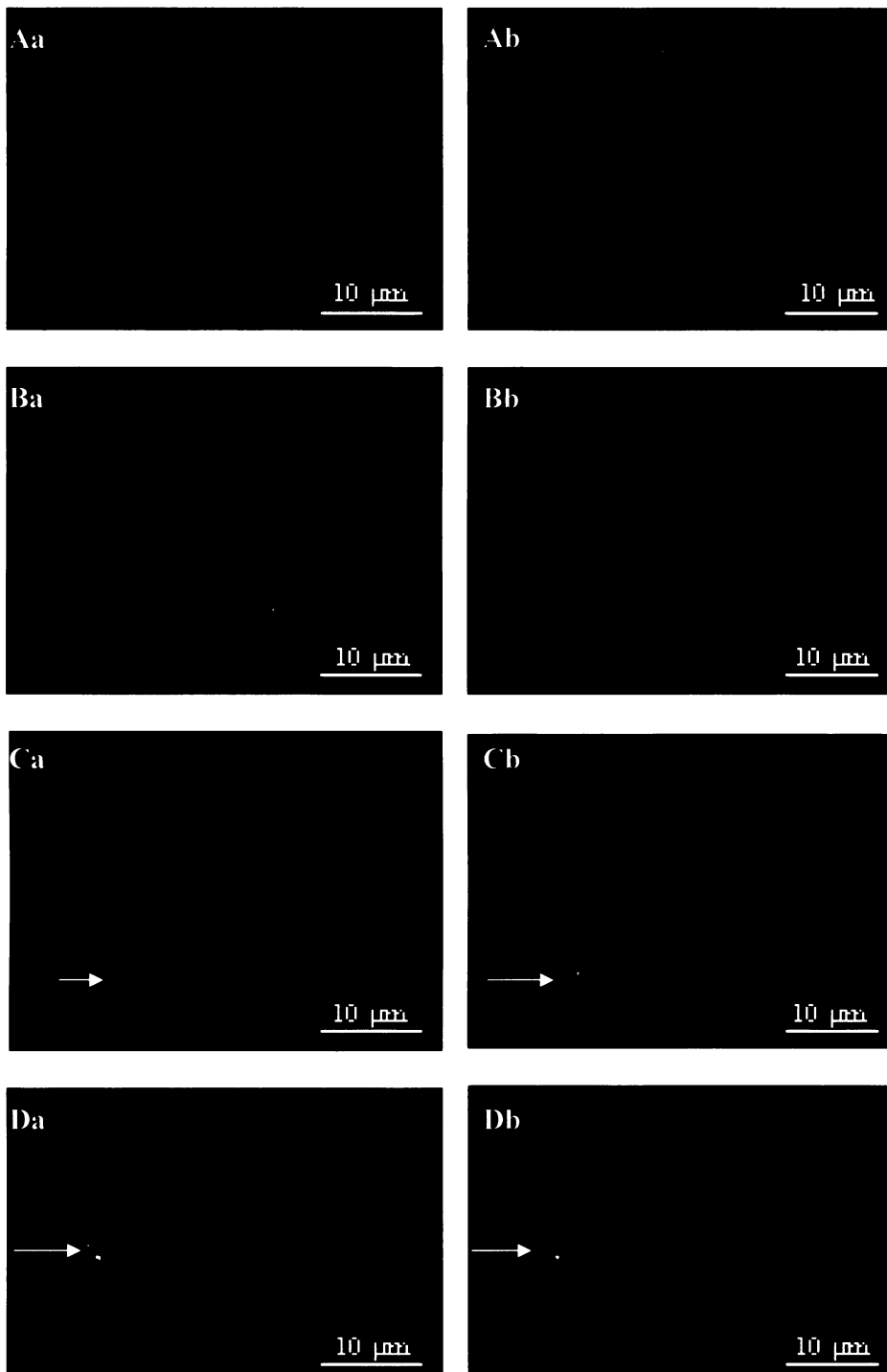
Pozdní endozomy a lysozomy (LAMP2), VP1, DAPI



**Obr. 5.17: Lokalizace pozdních endozomů a lysozomů (LAMP2) a viru v buňkách s rozrušeným tubulínem (B) nebo aktinem (C,D).** Pozdní endozomy a lysozomy LAMP2 (červená) a VP1 (zelená) bez vlivu látek rozrušujících cytoskelet (A), v přítomnosti nocodazolu (B), cytochalazinu D (C) a latrunculinu A (D). Snímky řezů stejných buněk (v řádcích) pořízené pomocí konfokálního mikroskopu.

Protilátky: směs myši monoklonální protilátky proti VP1 a krysí protilátky proti LAMP2; sekundární protilátka Alexa Fluor 488 oslí proti myším IgG (zelená) a Alexa Fluor 594 oslí proti krysím IgG (červená); značení jader DAPI (modrá).

Proteazomy (ubiquitin), VP1, DAPI



**Obr. 5.18: Lokalizace protezomů (ubiquitin) a viru v buňkách s rozrušeným tubulínem (B) nebo aktinem (C,D).** Proteazomy s ubiquitinem (červená) a VP1 (zelená) bez vlivu látek rozrušujících cytoskelet (A), v přítomnosti nocodazolu (B), cytochalazinu D (C) a latrunculinu A (D). Kolokalizace jsou označeny bílými šipkami. Snímky řezů stejných buněk (v řádcích) pořízené pomocí konfokálního mikroskopu.

Protilátky: směs králičí polyklonální protilátky proti VP1 a myší monoklonální protilátky proti ubiquitinu; sekundární protilátka Alexa Fluor 488 kozí proti králičím IgG (zelená) a Alexa Fluor 546 kozí proti myším IgG (červená); zančení jader DAPI (modrá).

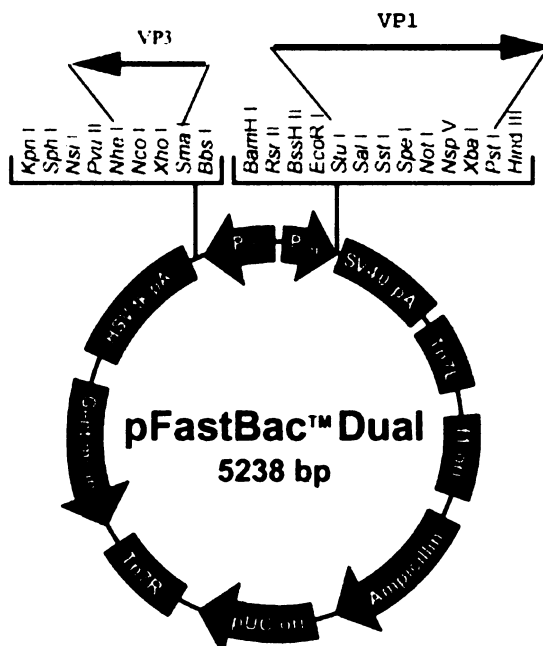
### **5.3 Příprava kapsidových struktur BK polyomaviru složených z hlavního strukturního proteinu VP1 a minoritního proteinu VP3**

Pro přípravu BK-VP1-VP3 kapsid byl použit Bac-to-Bac expresní systém, který je účinnou a rychlou metodou pro konstrukci rekombinantního bakuloviru. Tento systém je založen na místně specifické transpozici do bacmidu. Bacmid je bakulovirový kyvadlový vektor o velikosti 136 kb, který nese rezistenci k některému z antibiotik a také segment DNA kódující LacZ $\alpha$  peptid. Pro identifikaci rekombinantního bacmidu stačí, aby byl v médiu přítomný chromogenní substrát např. X-gal a indukční činidlo IPTG. Po úspěšné transpozici dojde k přerušení sekvence LacZ $\alpha$  a kolonie obsahující rekombinantní bacmid jsou bílé, zatímco ostatní jsou modré.

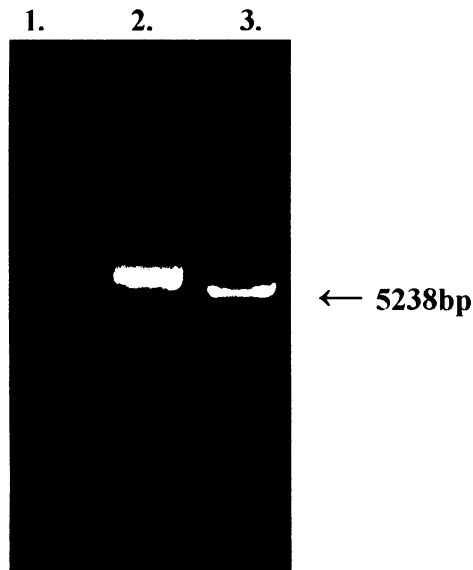
Vybraný vektor pFastBac s vneseným genem je vpraven metodou „heat-shock“ do kompetentních buněk DH10Bac. Tyto buňky v sobě nesou bacmid a pomocný plazmid kódující transponázu, která je odpovědná za transpozici mezi mini-Tn7 elementy a mini-attTn7 cílových místech bacmidu.

Pro produkci BK-VP1-VP3 kapsid byl použit vektor pFastBacDual. Tento plazmid nese gen pro ampicilinovou a gentamicinovou rezistenci, dva promotory: p10 promotor a polyhedrinový promotor. Pod polyhedrinový promotor byl už dříve pomocí restričních endonukleáz Stu I a Pst I zaklonován gen pro hlavní strukturní protein VP1 lidského BK polyomaviru (BOHÁČOVÁ 2005). Gen pro strukturní protein VP3 byl vkládán pod p10 promotor. Schéma konstrukce je uvedeno na obr. 5.19.

Vektor pFastBacDual-VP1 byl štěpen restričními endonukleázami Sma I a Nhe I (obr. 5.20). Plazmid byl poté defosforylován alkalickou fosfatázou a izolován z gelu. Takto připravený plazmid byl použit pro klonování VP3 fragmentu.

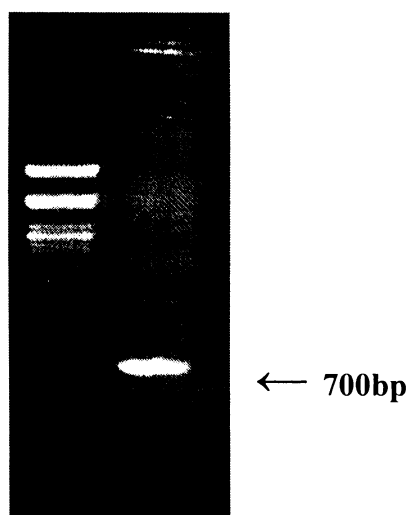


**Obr. 5.19:** Schéma konstrukce plazmidu pFastBacDual-VP1-VP3. VP1 byl vložen pod polyhedrinový promotor přes *Stu* I a *Pst* I místa (Mgr. V.Boháčová). VP3 vkládán pod promotor *p10* přes *Sma* I a *Nhe* I místa.



**Obr. 5.20:** Elektroforéza vektoru pFastBacDual.  
 1. Marker  $\lambda$  DNA/*Pst* I  
 2. pFastBacDual neštěpený  
 3. pFastBacDual štěpený *Sma* I a *Nhe* I

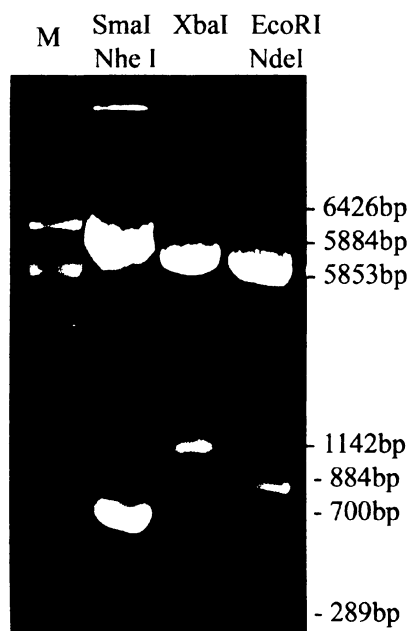
Gen VP3 BK viru byl amplifikován metodou PCR s primery VP3 BKV a VP2B (kap. 4.3.7.7). Hybridizační teplota primerů byla 60 °C. Jako templát byl použit plazmid pBlueskript II KS(+)-BK. PCR fragment o velikosti 700bp nesoucí VP3 gen BK viru byl štěpen restričními endonukleázami Sma I a NheI a izolován z gelu (obr. 5.21).



**Obr. 5.21:** Elektroforéza amplifikovaného fragmentu VP3 BK viru štěpeného Sma I a Nhe I a izolovaného z gelu. Použitý marker  $\lambda$  DNA/Pst I.

Ligační směs (1,5 $\mu$ l) obsahující štěpenou a defosforylovanou vektorovou DNA a amplifikovaný VP3 fragment byla vpravena elektroporací do bakteriálního kmene DH5 $\alpha$ . Po hodinové inkubaci při 37 °C byly bakterie vysety na pevné médium s ampicilínem (100  $\mu$ g/ml) a inkubovány 16h při 37 °C. Z narostlých kolonií bylo vybráno 20 transformant a z nich byly izolovány plazmidové DNA. Získané plazmidy byly štěpeny restričními endonukleázami Sma I a Nhe I pro ověření inzertu (obr. 5.21). Po rozštěpení se vektor rozdělil na dva úseky o velikosti 700 a 6426 bp. Plazmidové DNA byly pro další ověření štěpeny restričními endonukleázami Xba I nebo EcoR I v kombinaci s Nde I. Pokud byl fragment vložen správně po štěpení Xba I se vektor rozštěpil na dva úseky o velikosti 1142 a 5884 bp, a po štěpení restričními endonukleázami EcoR I a Nde I se vektor rozštěpil na 3 úseky o velikostech 289, 884 a 5853 bp (obr. 5.22). Kolonie nesoucí

plazmid s genem pro VP1 a VP3 byly pomnoženy pro maxiizolaci plazmidové DNA.



**Obr. 5.22:** Elektroforéza plazmidu pFastBacDual-VP1 nesoucího gen pro VP3 po štěpení Sma I a Nhe I, Xba I, EcoR I a Nde I. Použitý marker (M)  $\lambda$  DNA/Pst I.

Geny pro VP1 a VP3 byly z vektoru pFastBacDual-VP1-VP3 transpozicí přeneseny do bacmidu. Kompetentní bakteriální buňky DH10Bac obsahující bacmid a pomocný plazmid byly transformovány metodou „heat-shock“ plazmidem pFastBacDual-VP1-VP3. Poté byly transformované buňky vysety na misky s pevným médiem, které obsahovaly kanamycin (50 $\mu$ g/ml), gentamycin (7 $\mu$ g/ml), tetracyklin (10 $\mu$ g/ml), X-gal (100 $\mu$ g/ml) a IPTG (40 $\mu$ g/ml). Misky byly inkubovány 48-72 h při 37 °C. Na miskách vznikly během této doby modré kolonie, u kterých nedošlo k úspěšné transpozici, a bílé kolonie s úspěšnou transpozicí do LacZa. Bílé kolonie byly přeočkovány na nové misky a inkubovány dalších 16 h při 37 °C. Tím bylo ověřeno, že se skutečně jedná o bílé kolonie. Při vysoké koncentraci kolonií na misce by mohlo dojít k vyčerpání chromogenního substrátu a následně ke vzniku „falešných“ bílých kolonií.

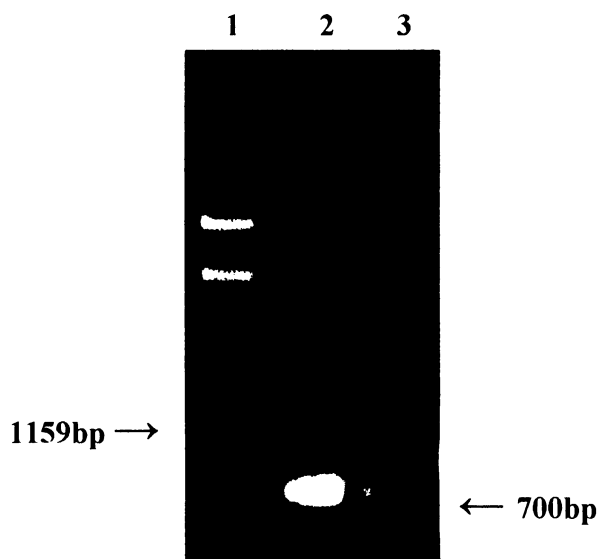
Bílá kolonie byla zaočkována do 5 ml živného bujónu s antibiotiky a inkubována za stálého třepání přes noc při 37°C. Z kultury byla izolována bacmidová DNA, která



byla elektroforeticky ověřena (obr. 5.23). Přítomnost genu pro VP3 v bacmidové DNA byla ověřena metodou PCR, jako templát byla použita bacmidová DNA (obr. 5.24).



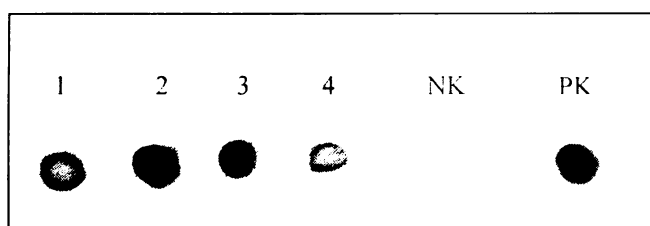
**Obr. 5.23:** Elektroforéza izolované bacmidové DNA. Použitý marker  $\lambda$  DNA/PstI.



**Obr. 5.24:** Elektroforéza ověření přítomnosti genu VP3 v bacmidové DNA.

1. Marker  $\lambda$  DNA/Pst I
2. Pozitivní kontrola: PCR genu pro VP3 BK viru s použitím templátu pBlueskript II KS(+)-BK
3. PCR genu pro VP3 BK viru s použitím bacmidové DNA jako templátu

Ověřenou bacmidovou DNA byly transfekovány hmyzí buňky Sf9. Transfekce byla provedena pomocí 2,5 M CaCl<sub>2</sub>. Po transfekci byly buňky Sf9 infikovány inokulem z transfekce. Byly připraveny lyzáty hmyzích buněk transfekovaných bacmidovou DNA. Protože protilátka proti VP3 BK není prozatím dostupná, byla provedena imunologická detekce buněčných lyzátů protilátkou proti VP2/3 viru SV40, která s VP3 BK také reaguje (obr. 5.25).



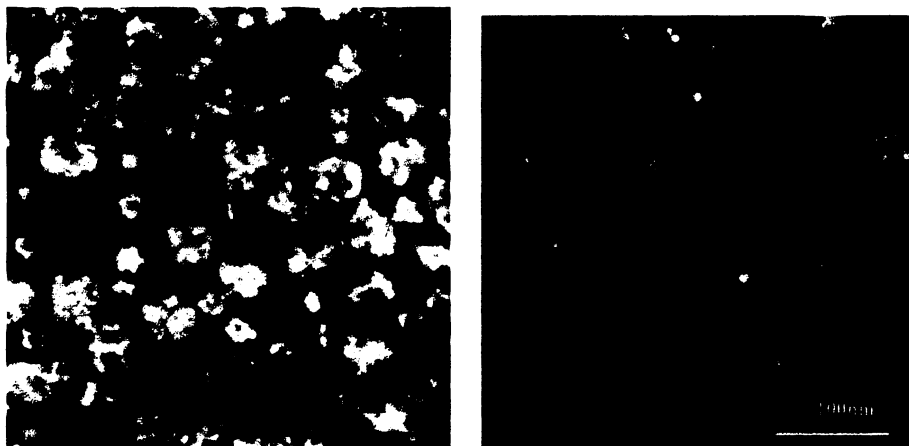
**Obr. 5.25:** Imunologická detekce proteinu VP3 BK v lyzátech hmyzích buněk Sf9. K vyvolání byla použita králičí primární protilátka proti VP2/3 SV40 a sekundární protilátka proti králičím imunoglobulinům konjugovaná s peroxidázou. 1-4: lyzáty hmyzích buněk transfekovaných bacmidovou DNA, NK: lyzát neinfikovaných hmyzích buněk, PK: VP1/2 BK kapsidy.

Pro infekci hmyzích buněk Sf9 (20 Petriho misek o průměru 10 cm) bylo připraveno inokulum bakuloviru pro produkci VP1 a VP3 polyomaviru BK. 92 h po infekci byly buňky sklizeny, propláchnuty PBS, resuspendovány v B pufru a izolovány, jak je popsáno v kapitole 4.3.2.9. V tab. 5.6 jsou uvedeny refraktometrické indexy frakcí získaných z gradientu CsCl. Podle vznášivých hustot odpovídajících refraktometrickým indexům jsme frakce pospojovali do 3 výsledných frakcí I-III. Frakce byly dialyzovány proti B pufru, zahuštěny přes sacharózový polštář. Frakce II (hodnota refraktometrického indexu 1,367-1,363, odpovídající vznášivé hustotě 1,33 g/cm<sup>3</sup>) by měla obsahovat plné kapsidy (s enkapsidovanou bakulovirovou DNA nebo fragmenty hostitelské DNA), frakce I (hodnoty refraktometrického indexu 1,362-1,360, odpovídající vznášivé hustotě 1,29 g/cm<sup>3</sup>) prázdné kapsidy a ve frakci III byly spojeny okrajové frakce (hodnoty refraktometrického indexu vyšší než 1,3675).

Č. frakce	Refraktometrický index	Č. frakce	Refraktometrický index
1.1	1,374	2.1	1,374
1.2	1,3725	2.2	1,3735
1.3	1,3705	2.3	1,371
1.4	1,3685	2.4	1,3695
1.5	<b>1,367</b>	2.5	1,3675
1.6	<b>1,365</b>	2.6	<b>1,366</b>
1.7	<b>1,365</b>	2.7	<b>1,365</b>
1.8	<b>1,3645</b>	2.8	<b>1,364</b>
1.9	<b>1,363</b>	2.9	<b>1,3635</b>
1.10	<b>1,363</b>	2.10	<b>1,363</b>
1.11	<i>1,3625</i>	2.11	<i>1,3625</i>
1.12	<i>1,362</i>	2.12	<i>1,3625</i>
1.13	<i>1,362</i>	2.13	<i>1,362</i>
1.14	<i>1,3615</i>	2.14	<i>1,3615</i>
1.15	<i>1,361</i>	2.15	<i>1,361</i>
1.16	<i>1,360</i>	2.16	<i>1,360</i>

**Tab. 5.6:** Hodnoty refraktometrických indexů po rozebrání CsCl gradientu.). Frakce I: (tučně), frakce I (kurzíva), frakce III (obyčejné písmo).

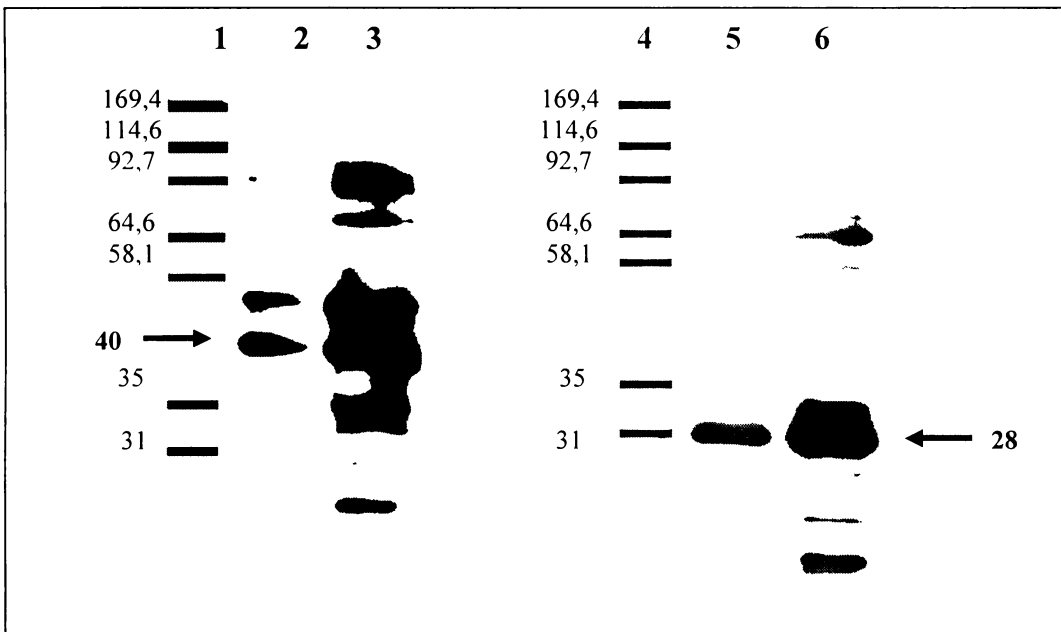
Metoda elektronové mikroskopie (negativní barvení) potvrdila ve frakci II přítomnost plných kapsid a ve frakci I přítomnost prázdných částic. V obou frakcích se nacházejí kapsidy o průměru cca 50 nm i menší částice o průměru 25 nm (obr. 5.26).



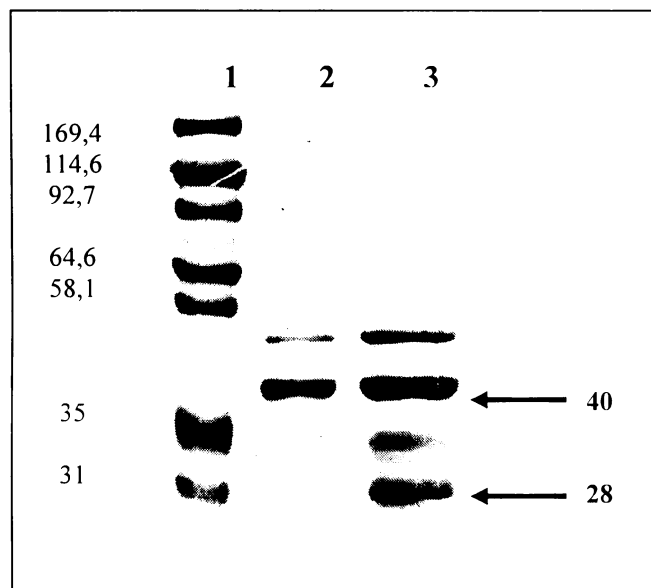
**Obr.5.26:** Elektronová mikroskopie VP1-VP3-BK kapsid. Negativní barvení. Vpravo frakce I, vlevo frakce II.

Přítomnost proteinů VP1 a VP3 BK viru byla imunologicky ověřena metodou western blot (obr. 5.27) i na gelu barveném Coomassie blue (obr.5.28).

Elektroforetická pohyblivost proteinu VP1 BK viru odpovídá velikosti 40 kDa a VP3 velikosti 28 kDa.

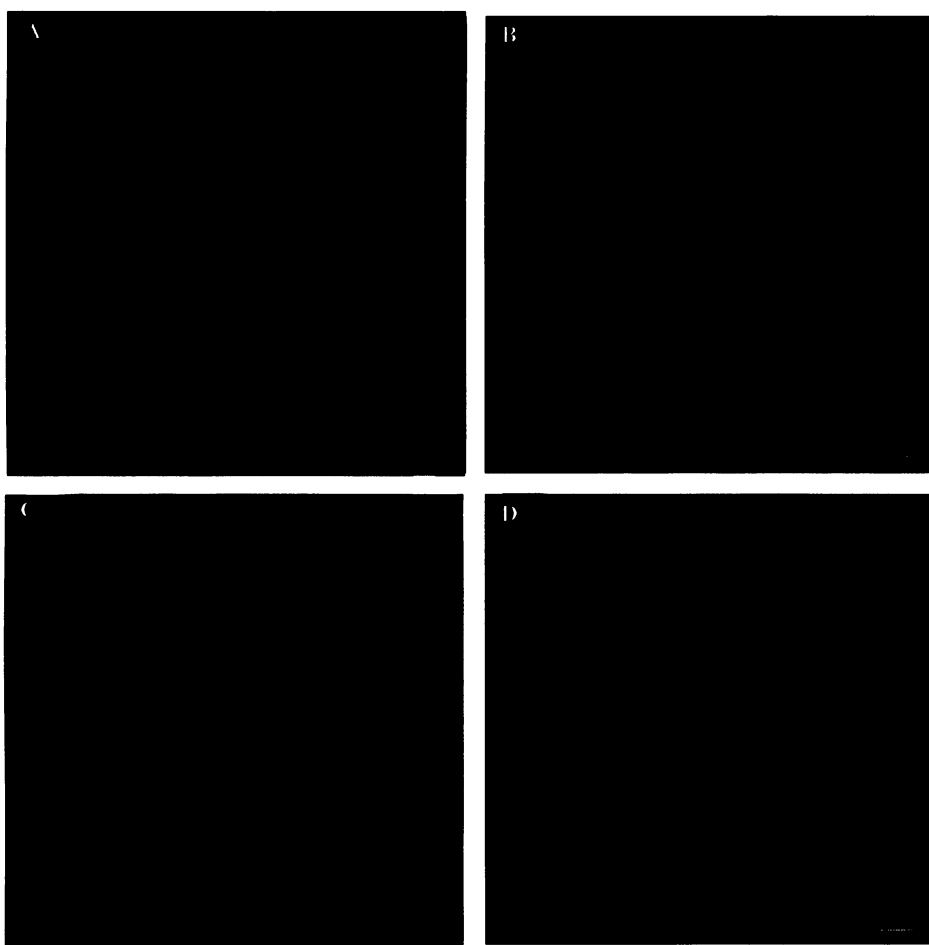


**Obr. 5.27:** Imunologická detekce proteinů VP1 a VP3 BK viru. Western blot byl vyvolán králičí primární protilátkou proti VP1 (2. a 3. dráha) nebo králičí primární protilátkou proti VP2/3 SV40 (5. a 6. dráha) a sekundární protilátkou proti králičím imunoglobulinům konjugovanou s peroxidázou. V první dráze je marker molekulových vah (kDa). V 2. a 5. dráze frakce I (prázdné částice) VP1-VP3-BK, v 3. a 6. dráze frakce II (plné částice) VP1-VP3-BK.



**Obr. 5.28:** Ověření přítomnosti VP1 a VP3 proteinů BK viru. Gel byl obarven Coomassie Brilliant Blue G250. V první dráze je marker molekulových vah (kDa), v druhé dráze **prázdné** kapsidy VP1-VP3-BK a ve třetí dráze **plné** kapsidy VP1-VP3-BK.

Produkci umělých kapsid jsme ověřovali také *in situ* fluorescencí infikovaných hmyzích buněk. Hmyzí buňky Sf9 byly infikovány inokulem bakuloviru nesoucího genu pro VP1 a VP3 BK viru. 92 hod po infekci byly buňky fixovány směsí methanol/acetone a obarveny s použitím protilátky proti proteinu VP1 a proti VP2/3 viru SV40. Z obrázku 5.29 je patrné, že buňky produkují jak VP1 tak VP3 BK a že oba produkované proteiny jsou lokalizovány v jádře hmyzích buněk.



**Obr. 5.29:** Imunofluorescence hmyzích buněk Sf9 92 h po infekci rekombinantním bakulovirem produkujícím VP1 a VP3 protein BK viru. K imunofluorescenčnímu značení byla použita primární protilátka proti VP1 BK, primární protilátka proti VP 2/3 SV40 a sekundární protilátka Alexa fluor 488 kuřecí proti králičím imunoglobulinům. A – buňky infikované rekombinantním bakulovirem produkujícím VP1 protein BK viru, anti VP1 BK, B, C – buňky infikované rekombinantním bakulovirem produkujícím VP1 a VP3 protein BK viru, B – anti VP1 BK, C – anti VP2/3 SV40, D – neinfikované buňky.

Kapsidy BK-VP1-VP3 budou sloužit pro izolaci a přípravu monoklonálních protilátek proti VP3 proteinu BK viru a také ke studiu vlastností VP3 BK viru.

## **6. DISKUZE**

## 6.1 Příprava virových plaků z kmenů A2 a P16 a jejich následné pomnožení

První část diplomové práce byla zaměřena na plakovou izolaci dvou kmenů myšího polyomaviru, standardně v laboratoři používaného kmenu A2 a kmenu P16, který jsme získali z laboratoře B. Griffinové z Londýna. Důvodem, který nás k tomu vedl byly problémy s infektivitou kmenu A2. U tohoto viru jsme dostávali v laboratoři nízké výtěžky infekčních částic na celková množství izolovaných částic.

Existuje řada možných příčin, které by mohly tento jev vysvětlovat. Jednou z možností jsou změny v genomu - mutace nebo inserce a zároveň delece. Pokud dojde k nějaké deleci v kódující oblasti a zároveň k repetici části regulační oblasti, včetně replikačního počátku, vznikají defektní částice, které mají zároveň replikační výhodu před nemutovanými infekčními viriony. Další možnou příčinou může být charakter a stav používaných buněk. Účinná replikace a transkripce viru závisí mimo jiné na přítomnosti buněčných transkripčních faktorů, které se účastní regulace těchto dějů vazbou na **enhancer regulační oblasti**. Ne v každém typu buněk může být složení a koncentrace transkripčních faktorů pro účinnou replikaci polyomaviru optimální. V některých buňkách může být také málo účinná morfogeneze virionů. To má pak za následek vysoký poměr prázdných kapsid a pseudovirionů (tj. virů, které enkapsidovaly fragmenty buněčné DNA, případně i s buněčnými histony) v preparacích. Přitom pseudoviriony mají podobnou vznášivou hustotu jako infekční viriony, takže se nedají účinně oddělit v hustotních gradientech. Je známo, že pro účinnou morfogenezi virionů jsou důležité některé posttranslační (fosforylované) formy VP1. Existují mutanty s tzv. „host range“ mutacemi, u kterých v některých buňkách vážně morfogeneze virionů. Bylo zjištěno, že příslušné mutace se nacházejí v genu pro MT antigen a ovlivňují míru aktivace protein kinázy c-SRC a tím i stav fosforylační aktivity, která pak v některých buněčných typech nestačí k účinné fosforylaci VP1 (GARCEA *et al.*, 1983; GARCEA *et al.*, 1985). Možným vysvětlením skutečnosti, že jsou viriony málo stabilní a rozpadají se během purifikace a skladování, je hypotéza, že při morfogenezi virionů existuje závěrečný krok maturace, při kterém (například proteolytickým krokem nebo naopak vytvořením určité vazby) viriony dozrají a stávají se uzavřenými a stabilními. Je možné, že v některých buňkách neproběhne účinně právě tento krok a izolované viriony jsou nestabilní.

Podle FREUND *et al.* (1990) vytváří kmen A2 velké plaky a virus P16 malé plaky. V našich plakových zkouškách provedených na primárních liniích WME jsme rozdíl ve velikosti plaků obou kmenů nepozorovali. Naopak, rozdíly ve velikosti plaků v rámci jednotlivých virových kmenů byly značné (Tento fakt se významnou měrou podílel na vysokém rozptylu získaných hodnot infekčního titru (tab. 5.1)). Důvodem odlišného pozorování může být rozdílnost buněčné linie, kterou jsme k plakové zkoušce použili. Autoři použili linii myších fibroblastů 3T3. V naší laboratoři dostupná 3T3 linie není pro polyomavirus permissivní a na linii 3T6 fibroblastů byly plaky A2 linie malé a špatně rozeznatelné (ústní sdělení, P. Mannová). Při porovnávání hodnot infekčního titru (snažili jsme se odebrat od každého viru ty největší plaky) bylo zjištěno, že virus P16 má v průměru vyšší hodnoty infekčního titru i vyšší výtěžek než kmen A2.

U kmene A2 jsme již dříve zjistili, že z linií, které máme k dispozici dává největší výtěžky viru primární linie získaná z celých myších embryí. Pro izolaci viru (i když s nižším výtěžkem) je možno použít též stabilní linie fibroblastů 3T6 nebo epiteliálních buněk NMuMG.

Při porovnávání výtěžků z těchto tří linií, byly nejvyšší hodnoty dle očekávání získány z embryonálních buněk WME. Výtěžek viru P16 byl na 3T6 fibroblastech menší přibližně o 1 řád. V naší laboratoři se pro běžné pomnožování používá buněčná linie myších fibroblastů 3T6, z etických i praktických důvodů se snažíme používání myších embryonálních buněk WME omezit.

Z těchto důvodů byla pro pomnožení viru ve větším měřítku pro následnou práci použita stabilní buněčná linie 3T6. Při srovnání množství infekčních virionů k celkovému počtu hemaglutinujících částic provedeném u viru izolovaného z linie 3T6 bylo ukázáno, že na jednu infekční virovou částici připadá nejméně o řád méně hemaglutinujících částic pro virus P16 než pro virus A2, přestože pro izolace obou virů byly použity virové izoláty z velkých plaků. Sekvence viru A2, který jsme do této doby používali, byla nedávno opět ověřována na spolupracujícím anglickém pracovišti (B. Griffinová) a nelišila se od publikované (SOEDA *et al.*, 1980). V naší laboratoři je dostupný genom kmene A2 na plazmidu pMJG a je možné kdykoliv z tohoto genomu připravit virus. Soudíme tedy, že problém špatné účinnosti infekce může být dán spíše než výraznou změnou v sekvenci stavem buněčných linií. Nicméně plánujeme v nejbližší době znovu ověření sekvence viru A2.



Zajímalo nás jak se liší genom P16 od kmene A2. Gen pro VP1 kmene P16 byl publikován (STEHLE a HARRISON 1997). Srovnáme-li sekvence genu pro VP1 u kmene A2 a P16 (obr. 6.1). Je možno pozorovat několik změn v aminokyselinovém složení, z čehož dvě takové oblasti se nacházejí v rozvolňovaných smyčkách tohoto proteinu a sice v BC a DE smyčce. To jsou právě sekvence VP1, které jsou odpovědné za interakce nejen s protilátkami, ale také s buněčnými strukturami a změny v nich by mohly mít vliv na tropizmus, replikaci a infektivitu viru. RICCI *et al.* (1992) například našli změny v tropizmu (buněčném) u polyomaviru s mutacemi v DE smyčce.

```

A2  MAPKRKSGVSKCETKCTKACPRPAPVPKLLIKGGMEVLDLVTGPDSVTEIEAFLNPRMQ 60
P16  MAPKRKSGVSKCETKCTKACPRPAPVPKLLIKGGMEVLDLVTGPDSVTEIEAFLNPRMQ 60
*****
          BC smyčka
A2  PPTPESLTEGGQYYGWSRGINLATSDT-WIPRNTLPTWSMAKSSFPCLNEDLTCDTLQM 119
P16  PPTPESLTEGGQYYGWSRGINLATSDEDSPGNNTLPTWSMAKLQLPMLNEDLTCDTLQM 120
*****
          DE smyčka          EF smyčka
A2  WEAVSVKTEVVGSGSLLDVHGFNKTHRFKHKGNSTPVEGSQYHVFAGGGEPLDLQGLVT 179
P16  WEAVSVKTEVVGSGSLLDVHGFNKPTDTVNTKGISTPVEGSQYHVFAVGGEPDLQGLVT 180
*****
          EF smyčka
A2  DARTKYKEEGVVTIKTITKKDMVNDQVLNPI SKAKLDKDGMPVEIWHDPKAKNENTRY 239
P16  DARTKYKEEGVVTIKTITKKDMVNDQVLNPI SKAKLDKDGMPVEIWHDPKAKNENTRY 240
*****
          GH smyčka          HI smyčka
A2  FGNYTGGTTAPPVLQFTNTLTTVLLDENGVGPLCKEGLYLSCVDIMGWRVTRNYVSSLE 299
P16  FGNYTGGTTAPPVLQFTNTLTTVLLDENGVGPLCKEGLYLSCVDIMGWRVTRNYDVHWH 300
*****
A2  KGLPRYFKITLRKRWVKNPYPMASLISSLFNNMLPQVQGQPMEGENTQVEEVRVYDGTEP 359
P16  RGLPRYFKITLRKRWVKNPYPMASLISSLFNNMLPQVQGQPMEGENTQVEEVRVYDGTEP 360
*****
A2  VPGDPMTRYVDRFGKTKTVFPGN 383
P16  VPGDPMTRYVDRFGKTKTVFPGN 384
*****

```

**Obr. 6.1:** Porovnání aminokyselinové sekvence genu pro VP1 kmenů P16 a A2. Hvězdičky označují shodné aminokyseliny v složení obou virů. Žlutě jsou vyznačeny změny v sekvenci P16 proti A2. Červené rámečky označují smyčky proteinu VP1.

Další oblasti, ve kterých by se mohly nacházet mutace ovlivňující výše uvedené vlastnosti viru je regulační oblast genomu, ale také, jak bylo uvedeno výše časná kódující oblast (např. gen pro MT). My jsme se v této práci zaměřili na zjištění případných rozdílů v sekvencích regulační oblasti viru P16 a A2. Z porovnání námi získané sekvence regulační oblasti viru P16 s publikovanou sekvencí A2 je patrné, že se obě sekvence liší. Největší změna - 44 nukleotidová inserce mezi nukleotidy

5154 a 5155 (počítáno v genomu A2) byla nalezena také u „Crawford-small plaque variant“ polyomaviru (ROTHWELL a FOLK 1983). Její detekce v P16 potvrdila už zjištění na elektroforetických snímcích, že regulační oblast viru P16 je delší. Inzert obsažený v regulační oblasti viru P16 by mohl být také příčinou pozorovaných rozdílů v infektivitě mezi P16 a A2 kmeny. Tento inzert se totiž nachází v oblasti enhanceru, který hraje roli jak v regulaci transkripce tak v regulaci replikace. Při prozkoumávání sekvencí bylo zjištěno, že dvěma substitucemi (v poloze 5104 a 5109 nukleotidů A2 genomu) se změnila sekvence vazebného místa pro PEA1 v regulační oblasti P16. Naopak, v inzertované 44ti nukleotidové sekvenci se objevuje navíc proti genomu kmenu A2 další vazebné místo pro transkripční faktor PEA3.

Polyomavirový enhancer aktivuje časný virový promotor *in vivo* a je požadován pro replikaci virové DNA (TANG *et al.*, 1987). Polyomavirové enhancery jsou značně redundantní. Nicméně, TANG *et al.* (1987) ukázali, že replikace a transkripce polyomavirové DNA může být výrazně ovlivněna zavedením bodových mutací do těchto enhancerových elementů. MARTIN *et al.* (1988) ukázali důležitost transkripčních faktorů PEA1, 2, 3 v aktivaci transkripce i replikace DNA. Mutace ve vazebném místě pro PEA1 redukovala transkripci i replikaci DNA a redukovala výtěžky virového potomstva. Reverzí této mutace se účinnost replikace polyomaviru vrátila k původním hodnotám. Transkripční faktor PEA3, produkt myšího genu *pea3* (lidský analog se nazývá *E1A-F* a *ETV4*) je členem *pea3* podrodiny kódované *ets* geny. Ets proteiny mají konzervovanou „helix-turn-helix“ ETS DNA vazebnou doménu. Tvoří heterokomplexy s dalšími proteiny a aktivují (případně i reprimují podle proteinového kontextu) transkripci. Ets proteiny hrají klíčovou roli v embryonálním vývoji a v buněčné diferenciaci a nádorové transformaci (SHEPHERD *et al.*, 2001). Jaký je přesně význam dalšího vazebného místa pro tento transkripční faktor není zatím zcela jasné.

Bude užitečné v budoucnu ještě zjistit zdali nejsou také změny v genech pro časně antigeny nebo minoritní strukturní proteiny v genomu kmene P16.

## 6.2 Sledování vlivu cytoskeletárních inhibitorů na pohyb virionů buňkou

Další problematikou, kterou se v naší laboratoři zabýváme je studium endocytické dráhy využívané polyomavirem při jeho cestě od plazmatické membrány k buněčnému jádru. Jedna z otázek, která nás v souvislosti s touto problematikou zajímá, je role buněčného cytoskeletu při dopravě genomu MPyV do jádra. Ke studiu funkce aktinového a tubulinového cytoskeletu v pohybu virionů od buněčné membrány k buněčnému jádru byly použity: látka rozrušující tubulin - nocodazol a látky rozrušující aktinové svazky - cytochalazin D a latrunculin A.

Již dříve bylo zjištěno, že infektivita myšího polyomaviru v přítomnosti agens rozrušujícího tubulin je zcela avšak reverzibilně inhibována (LIEBL *et al.*, manuscript v preparaci). Z toho vyplývá, že intaktní mikrotubuly jsou nutné pro transport viru k buněčnému jádru a dopravě virového genomu do jádra. Nyní jsme překvapivě zjistili, že přestože nocodazol inhibuje virovou infekci, velká část virionů docestuje v jeho přítomnosti do perinukleárního prostoru, podobně jako u kontrolních buněk (obr. 5.7). Z tohoto výsledku by se dalo naopak soudit, že virus využívá k transportu k jádru jinou dráhu než tubulinová vlákna.

V přítomnosti cytochalazinu D je infektivita viru inhibována jen asi z poloviny, v přítomnosti latrunculinu A výrazněji, avšak stále ne tak efektivně jako v přítomnosti nocodazolu. Bylo také zjištěno, že transientní depolymerace aktinu v počátcích virové infekce naopak výrazně zvyšuje účinnost virové infekce ve srovnání s kontrolními buňkami (obr. 5.9) (LIEBL *et al.*, manuscript v preparaci). Přechodné rozrušení aktinu v konečném důsledku infektivitě viru zřejmě pomáhá.

Po použití cytochalazinu D nebo latrunculinu A byl výrazně změněn tvar buňky, buňky se zakulatily, (obr. 5.10 B, C), takže bylo poměrně obtížné identifikovat oblast buňky, ve které se virus nachází. Nejčastěji se vyskytoval ve formě shluků na periférii buňky na segmentech rozrušeného aktinu. Po depolymeraci aktinu měl virus zjevně problém dostat se z buněčné periferie do blízkosti jádra. Dvě hodiny po odmytí látek rozrušujících aktin byla viditelná rekonstrukce aktinového cytoskeletu a také výrazný posun virionů směrem k jádru. To by napovídalo, že virus využívá k cestě k buněčnému jádru aktinový cytoskelet.

Jak se dají tyto (zdánlivě?) protichůdné výsledky vysvětlit?

Jedno z možných vysvětlení je, že virus potřebuje k produktivní infekci jak tubulinová vlákna tak aktin. Již dříve bylo v naší laboratoři pozorováno (RICHTEROVÁ *et al.*, 2001), že krátce po internalizaci polyomaviru dochází k částečné reorganizaci a depolymerizaci aktinu a v té době (20 min – 2 hod po adsorpci) je možno pozorovat kolokalizaci virionů (VP1) s aktinem. Poté, co je virus sveden do blízkosti jádra, je aktinový cytoskelet obnoven. Kolokalizace VP1 s tubulinem je více patrná později v perinukleárním prostoru (RICHTEROVÁ *et al.*, 2001). Je tedy možné, že v první fázi pohybu virionů je viriony využíván aktin a to v podobě aktinových „kometek“, které pomáhají pohybu a fúzím váčků s viry (shluky aktinu u pohybujících se váčků s virovými částicemi byly pozorovány v živých buňkách, DIFATO a LIEBL, nepublikované výsledky). Tubulinová vlákna by byla virem využívána v pozdější fázi pohybu buňkou.

Je možný ale také jiný výklad. Je zřejmé, že neporušený tubulinový cytoskelet je pro produktivní pohyb virionů nezbytný. Role aktinu tak jasná není. Aktinový cytoskelet by mohl sloužit jako ochranná bariéra buňky a aktinová filamenta nebo kometky by mohly svádět viriony na degradační dráhu. Jak již bylo uvedeno v kapitole výsledky, i při vysoké multiplicitě infekce pouze několik málo virionů dopraví genom do buněčného jádra. Většina virionů je svedena na degradační dráhu spojenou s endoplazmatickým retikulem (ERAD - endoplasmic reticulum associated degradation pathway) (MANNOVÁ a FORSTOVÁ 2003). Je možné, že úspěšnými viriony jsou ty, které nebyly zachyceny aktinovým cytoskeletem a podařilo se jim hned po internalizaci získat tubulinový motor a dostat se k jádru po tubulinu. Za to, že i v přítomnosti látek rozrušujících aktin byla infekce snížena, by mohla být zodpovědná skutečnost, že forma tubulinového cytoskeletu je značně ovlivněna rozrušením aktinu (obr. 5.11). K určení, která z teorií odpovídá skutečnosti bude potřeba další výzkum.

V souvislosti se získanými výsledky o struktuře buněčného cytoskeletu jsme si položili otázku, ve kterých z buněčných kompartmentů popsaných v endocytické dráze myšího polyomaviru se viriony nacházejí v přítomnosti látek rozrušujících cytoskelet. Víme, že MPyV vstupuje do buněk v monopinocytických váčcích, z nichž na mnohých byl identifikován caveolin-1 (RICHTEROVÁ *et al.*, 2001). Virus byl pozorován dále v časných endozomech, charakterizovaných proteinem EEA1, v recyklujících endozomech (MANNOVÁ a FORSTOVÁ 2003) a v endoplazmatickém retikulu.

Kaveolin-1 byl detekován i v časných endozomech (POL *et al.*, 1999; LIEBL *et al.*, 2006) i v recyklujících endozomech (GAGESCU *et al.*, 2000). Proto nás zajímalo, jak je to s kolokalisací kaveolinu a VP1 při rozrušení cytoskeletu (nocodazolem, cytochalazinem D a latrunculinem A) Tři hodiny po infekci bylo možno pozorovat občasnou kolokalizaci kaveolinu s VP1 poblíž jádra jak u kontrolních buněk tak po použití látky rozrušující tubulin-nocodazolu (obr. 5.14 B). Z toho vyplývá, že virus se patrně dostává i při rozrušeném tubulinovém cytoskeletu do perinukleárního prostoru v kompartmentech (nebo do kompartmentů) pozitivních na kaveolin. Stopa kolokalizace je viditelná i po použití látky rozrušující aktin cytochalazinu D a latrunculinu A (obr. 5.14 Cc, Dd).

Virus zadržovaný na periférii buňky v přítomnosti aktin rozrušujících látek překvapivě nekolokalizoval s markerem časných endozomů. Je možné, že právě za fúzi monopinocytických váčků nesoucích virus s časnými endozomy je odpovědný aktinový cytoskelet.

Za normální situace se subpopulace viru nachází 3 h.p.i. v endoplazmatickém retikulu a částečně též v recyklujících endozomech (MANNOVÁ a FORSTOVÁ 2003). I v buňkách s rozrušeným tubulinem byla občasná kolokalizace VP1 a Rab11 detekována. Naopak v přítomnosti látek rozrušujících aktin kolokalizace s Rab11 pozorována nebyla a na obrázcích buněk bylo možno pozorovat abnormální shluky Rab11 signálu indikující narušení endocytické dráhy, v nichž je Rab11 GTPáza zapojena. Zdá se tedy, že recyklující endozomy nejsou pro produktivní infekci důležité. Potvrzení (nebo vyvrácení) této domněnky by přinesl pokus zkoumající infektivitu polyomaviru v přítomnosti dominantně negativní mutanty Rab11 GTPázy.

Kompartiment, ve kterém se nachází virus při rozrušeném aktinu, se nám bohužel nepodařilo určit. I kolokalizace s pozdními endozomy a lysozomy byla negativní. K identifikaci struktury, ve které se viriony v buňkách s rozrušeným aktinem nacházejí bude zapotřebí vyzkoušet více buněčných markerů.

### **6.3 Příprava kapsidových struktur BK polyomaviru složených z hlavního strukturního proteinu VP1 a minoritního proteinu VP3**

Lidský BK virus je přítomný u 85 % lidské populace po celém světě v podobě perzistentní infekce ledvin. Jeho reaktivace koresponduje se sníženou imunitou. K aktivaci BK viru dochází nejčastěji v ledvinách. U imunosuprimovaných pacientů po transplantaci ledvin mohou být následky reaktivace fatální. Proto je také tomuto viru věnována pozornost.

V porovnání s ostatními polyomaviry (myší polyomavirus, SV40) není o molekulárních mechanismech BK viru zatím mnoho známo. Vzhledem k tomu, že studium tohoto viru začalo později, v porovnání s ostatními polyomaviry, nebyl zatím objasněn vztah infekce, patogeneze a imunitní reakce hostitele. V nedávné době jsme v naší laboratoři začali, ve spolupráci s virologickou laboratoří ve Würzburgu (K. Dorries), studovat také lidský polyomavirus BK. Zmíněná laboratoř se zabývá klinickým studiem BK viru a jeho detekcí v různých lidských tkáních a buňkách (DORRIES, 1998).

Abychom mohli studovat interakce BK viru s buněčnými strukturami potřebujeme nejprve připravit specifické protilátky proti jednotlivým virovým proteinům. Protilátka proti hlavnímu strukturnímu proteinu VP1 byla již připravena (M. STANČÍKOVÁ, nepublikované výsledky). Jako antigen byly využity VP1 částice připravené v hmyzích buňkách. Pokusy o izolaci minoritního proteinu VP3 z hmyzích buněk, ve kterých byl produkován samotný, bez VP1, selhaly pro špatnou rozpustnost tohoto proteinu v nativním stavu. Izolace denaturovaného proteinu VP3 po rozdělení lyzátu hmyzích buněk produkujících tento protein byla rovněž obtížná, protože v buněčném lyzátu byla přítomná řada proteinů bakulovirového původu se stejnou pohyblivostí. V této práci jsme se tedy rozhodli připravit bakulovirus, ze kterého by bylo možno produkovat virové částice obsahující protein VP1 a VP3. Po aplikaci izolovaných virových částic na SDS elektroforézu by bylo možné protein VP3 snáze izolovat. Navíc bude možné využít takových částic i pro studium funkcí VP3 proteinu.

Po konstrukci pomocného vektoru a izolaci bakuloviru byly z infikovaných hmyzích buněk izolovány virové částice. Kapsidy získané izolací v CsCl gradientu byly dvou různých velikostí (25 a 50 nm), což je v souladu s dřívějšími studii VP1 částic (LI *et al.*, 2003; BOHÁČOVÁ 2005). Přítomnost VP3 proteinu v částicích byla

ověřována metodou Western blot. Vzhledem k tomu, že protilátka proti proteinu VP3 BK není prozatím komerčně dostupná, byla produkce proteinu VP3 ověřena pomocí polyklonální protilátky proti proteinům VP2/3 viru SV40 (poskytnuté Prof. A. Oppeheim, Izrael), která vzhledem k značné (90%) homologii genomů BK viru a SV40 (NEWELL *et al.*, 1978) rozpoznává i některé epitopy VP3 u BK viru.

Na obr. 5.27 je v dráze 5 a 6 imunodetekován protein VP3 (28 kDa). V dráze 6, ve které byl vzorek lyzátu izolovaných částic frakce II se nacházejí ještě další proužky s větší pohyblivostí, což by mohly být degradáty proteinu VP3, ale také proužek odpovídající velikosti asi 60 kDa. Tento proužek se nevyskytuje ve dráze 5 u prázdných kapsid. Mohlo by jít o kontaminaci buněčným proteinem, který „cross“ reaguje s použitou primární protilátkou. Tomu by nasvědčovala i negativní fluorescence *in situ* (obr. 5.29 D), ve které se sice slabě, ale objevují svítící body. Vzhledem k tomu, že se i v levé části western blotu (kde jsou nanesené virové částice detekovány protilátkou proti proteinu VP1) nacházejí, kromě proužků s vyšší pohyblivostí než by odpovídalo proteinu VP1 (40 kDa), také proužky s nižší pohyblivostí, je možné, že se na gelu zobrazily i komplexy virových proteinů s nějakými buněčnými (nebo bakulovirovými) proteiny které ko-purifikovaly s kapsidovými strukturami, v důsledku oslabení  $\beta$  merkaptoethanolu v „loading“ pufu.

V současné době jsou již imunizovány myši proteinem VP3 pro přípravu monoklonálních protilátek.

Bude zajímavé porovnat vlastnosti proteinu VP3 BK viru s proteinem VP3 myšího polyomaviru. O minoritních proteinech polyomavirů primátů, BK, JC a SV40 je známo, že mají oproti minoritním proteinům MPyV delší C-konec. Tento konec jim udílí schopnost nespecificky interagovat s DNA (CLEVER *et al.*, 1993, DEAN *et al.*, 1995). Pro virus SV40 bylo publikováno, že protein VP3 je důležitý pro skládání virionů (GHRAKHANIAN *et al.*, 2003). U JC viru bylo publikováno, že C-koncové sekvence minoritních proteinů, které u minoritních proteinů myšího polyomaviru chybí, mají schopnost dovést protein VP1 do specifických PML domén v buněčném jádře (SHISHIDO-HARA *et al.*, 2004).

## **7. SOUHRN**



## **1. Snažili jsme se získat polyomavirus s vyšší účinností infekce než byl dosud v laboratoři používán**

- S použitím primárních buněk získaných z myších embryí jsme připravili plaky polyomaviru kmene A2 používaného v naší laboratoři a kmene P16 (získáno od Prof. B.Griffin, Royal Postgraduate School, Londýn).
- Z jednotlivých plaků jsme pomnožili viry a porovnali jejich účinnosti infekce. Výtěžky viru izolovaných z plaků kmene P16 byly v průměru o řád vyšší než výtěžky kmenu A2.
- V preparaci viru P16 byl poměr infekčních částic k celkovému počtu hemaglutinujících částic výrazně vyšší než u kmene A2
- Sekvenovali jsme regulační oblast genomu kmene P16 a porovnali ji se známou sekvencí regulační oblasti kmene A2. V regulační oblasti kmene P16 bylo nalezeno 7 nukleotidových substitucí, delece 1 nukleotidu a inzerce o velikosti 35 nukleotidů a inzerce o velikosti 44 nukleotidových párů v oblasti enhanceru. Těmito změnami oproti kmenu A2 došlo k zániku vazebného místa pro transkripční faktor PEA1 a ke vzniku dalšího vazebného místa pro transkripční faktor PEA3.

## **2. S využitím konfokální mikroskopie jsme studovali vliv látek rozrušujících cytoskelet na pohyb virionů myšího polyomaviru. Přitom jsme zjistili:**

- V buňkách s rozrušeným tubulinem (v přítomnosti nocodazolu) se virus dostává během 3 hod od adsorpce na buněčný povrch, podobně jako v kontrolních buňkách, do blízkosti buněčného jádra.
- V buňkách s depolymerizovaným aktinem (v přítomnosti cytochalazinu D nebo latrunculínu A) je většina viru 3 hod po infekci zadržována na periferii buňky. Dvě hodiny po odstranění aktin rozrušujících látek je aktinový cytoskelet obnoven a virus lze nalézt v perinukleárním prostoru.
- V buňkách vystavených vlivu látek rozrušujících aktin byly pozorovány závažné změny v uspořádání tubulinového cytoskeletu.
- Při pokusu identifikovat buněčné kompartmenty, ve kterých se myší polyomavirus nachází v přítomnosti látek rozrušujících cytoskelet, jsme v přítomnosti nocodazolu pozorovali, podobně jako v kontrolních buňkách, kolokalizaci malé části virionů s kaveolinem-1 a s GTPázou Rab11 (markerem recyklujících endozomů). Rozrušení aktinu způsobilo

abnormální lokalizaci kompartmentů s Rab11 GTPázou. VP1 ani v přítomnosti látek rozrušujících cytoskelet nekolokalizuje s markerem pozdních endozomů a lysozomů - LAMP2. Struktury, ve kterých se nachází většina virionů v buňkách s rozrušeným aktinem, se nepodařilo identifikovat.

- 3. Pro studium mechanismů replikace lidského BK polyomaviru jsme připravili rekombinantní bakulovirus pro expresi proteinů VP1 a VP3 polyomaviru BK. Z hmyzích buněk infikovaných tímto rekombinantním bakulovirem jsme izolovali a charakterizovali kapsidy složené z obou produkovaných proteinů. Kapsidy jsou v současné době používány pro přípravu antigenu k získání protilátky proti VP3.**

## **8. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY**

**Acheson N. H.** (1978): Polyoma gigant RNAs contain tandem repeats of the nucleotide sequence of the entire viral genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:4754-4758

**Akhmanova A., Hogenraad C. C.** (2005): Microtubule plus-end-tracking proteins: mechanisms and functions. *Curr Opin Cell Biol.* 17: 47-54

**Ailenberg M, Silverman M.** (2002): Trichostatin A-histone deacetylase inhibitor with clinical therapeutic potential-is also a selective and potent inhibitor of gelatinase A expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 298:110-115

**Anderson H. A., Chen Y., Norkin L. C.** (1996): Bound Simian Virus 40 translocates to caveolin-enriched membrane domains, and its entry is inhibited by drugs that selectively disrupt caveolae. *Molecular Biology of the Cell.* 7:1825-1834

**Apodaca G.** (2001): Endocytic traffic in polarized epithelial cells: role of the actin and microtubule cytoskeleton. *Traffic.* 2:149-159

**Apperley J. F., Rice S. J., Bishop J. A., Chia Y. C., Krausz T., Gardner S. D., Goldman J. M.**(1987): Late-onset hemorrhagic cystitis associated with urine excretion of polyomaviruses after bone marrow transplantation. *Transplantation.* 43:108-112

**Ashok A., Atwood W. J.** (2003): Contrasting roles of endosomal pH and the cytoskeleton in infection of human Glial cells by JC virus and Simian virus 40. *J. Virol* 77(2):1347-1356

**Auger K. R., Carpenter C. L., Shoelson S. E., Pivnicka-Worms H., Cantley, L. C.** (1992): Polyoma virus middle T antigen-pp60c-src complex associates with purified phosphatidylinositol 3-kinase in vitro. *J. Biol. Chem.* 267:5408-5415

**Ayscough K.R., Stryker J., Pokala N., Sanders M., Crews P., Drubin D.G.** (1997): High rates of actin filament turnover in budding yeast and roles for actin in establishment and maintenance of cell polarity revealed using the actin inhibitor latrunculin-A. *J Cell Biol.* 137:399-416

**Barouch D. H., Harrison S. C.** (1994): Interactions among the major and minor coat proteins of polyomavirus. *J Virol.* 68:3982-9

**Bernad R., van der Velde, H., Fornerod M., Pickresgill H.** (2004): Nup358/RanBP2 attaches to the nuclear pore complex via association with Nup88 and Nup214/CAN and plays a supporting role in CRM1-mediated nuclear protein export. *Mol Cell Biol.* 24:2373-2384

**Bettinger B. T., Gilbert D. M., Amberg D.C.** (2004): Actin up in the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:410-415

**Bofill-Mas S., Formiga-Cruz M., Clemente-Casares P., Calafell F., Girones R.** (2001). Potential transmission of human polyomaviruses through the gastrointestinal tract after exposure to virions or viral DNA. *J Virol* 75:10290-10299

**Boháčová V.** (2005): Diplomová práce

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

- Breau W. C., Atwood W. J., Norkin L. C.** (1992): Class I major histocompatibility proteins are essential component of the simian virus 40 receptor. *J. Virol* 66:2037-2045
- Brodsky J. M., Pipas J. M.** (1998): Polyomavirus chaperones for multiprotein complexes. *J Virol.* 72(7):5329-5334
- Bubb M. R., Senderowicz A. M., Sausville E. A., Duncan K. L., Korn E. D.** (1994): Jasplakinolide, a cytotoxic natural product, induces actin polymerization and competitively inhibits the binding of phalloidin to F-actin. *J Biol Chem.* 269:14869-14871
- Buss F., Spuddich G., Kendrick-Jones J.** (2004): Myosin VI: cellular functions and motor properties. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 20:649-676
- Cai Y., Singh B. B., Aslunkov A., Zhao H., Ferreira P. A.** (2001): The docking of kinesins, KIF5B and KIF5C, to ran.binding protein 2 (RanBP2) is mediated via a novel RanBP2 domain. *J Biol Chem.* 276: 41594-41602
- Campbell K. S., Orgis E., Burke B., Su W., Auger K. R., Druker B. J., Schaffhausen B. S., Roberts T. M., Pallas D. C.** (1994): Polyoma middle T antigen interacts with SHC via the NPTY motif in middle T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:6344-6348
- Carmichael G. G., Schaffhausen B. S., Dorsky D. I., Oliver D. B., Benjamin T. L.** (1982): Carboxyterminus of polyoma model-sized tumor antigen is required for attachment to membranes, associated protein kinase activities, and cell transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79(11):3579-3583
- Clever J., Dean D. A., Kasamatsu H.** (1993): Identification of a DNA binding domain in simian virus 40 capsid proteins Vp2 and Vp3. *J Biol Chem.* 268(28):20877-83
- Cole N.C.** (1996): Polyomavirinae: The viruses and their replication. In: *Fields Virology 2*. Third edition, Lippincot – Raven Publishers. Philadelphia.
- Consigli R. N., Griffith G. R., Marriot J. S., Ludlow J. W.** (1986): Biochemical characterisation of polyomavirus receptor interactions, p. 44-53. R.L. Crowell a K. Longberg-Holm ed., *Virus attachment and entry into cells*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Cooper J. A., Schafer D. A.** (2000): Control of actin assembly and disassembly at filament ends. *Curr Opin Cell Biol.* 12:97-103
- Corallini A., Pagnani M., Viadana P., Silini E., Mottes M., Milanesi G., Gerna G., Vettor R., Trapella G., Silvani V., Gaist G., Barbanti-Brodano G.** (1987): Association of BK virus with human brain tumors and tumors of pancreatic islets. *Int J Cancer.* 39:60-67
- Coulombe P. A., Bousquet O., Ma L., Yamada S., Wirtz D.** (2000): The ‘ins’ and ‘outs’ of intermediate filament organization. *Trend Cell Biol.* 10:420-428
- Courtneidge S. A., Smith A. E.** (1983): Polyoma virus transforming protein associates with the product of the c-src cellular gene. *Nature.* 303:435-439
- Cudmore S., Reckmann I., Way M.** (1997): Viral manipulations of the actin cytoskeleton. *Trends Microbiol* 5: 142-148

- Dean D.A., LI P. P., Lee L. M., Kasamatsu H.** (1995): Essential role of the Vp2 and Vp3 DNA-binding domain in simian virus 40 morphogenesis. *J Virol.* 69(2): 1115-1121
- Desai A., Mitchison T. J.** (1997): Microtubule polymerization dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 13:83-117
- Diefenbach R. J., Miranda-Saksena M., Diefenbach E., Holland D. J., Boadle R. A., Armati P. J., Cunningham A L.** (2002): Herpes simplex virus tegument protein US11 interacts with conventional kinesin heavy chain. *J Virol.* 76: 3282-3291
- Dilworth S. M.** (1990): Cell alterations induced by the large T-antigens of SV40 and polyomavirus. *Semin. Cancer Biol.* 1(6):407-414
- Döhner K., Sodeik B.** (2004): The role of cytoskeleton during viral infection. *Curr Top Microbiol Immunol.* 285:67-108
- Döhner K., Wolfstein A., Prank U., Echeverri C., Dujardin D., Valle R., Sodeik B.** (2002): Function of dynein and dynactin in herpes simplex virus capsid transport. *Mol Biol Cell.* 13: 2795-2809
- Döhner K., Nagel C. H., Sodeik B.** (2005): Viral stop-and-go along microtubules: taking a ride with dynein and kinesins. *Trends Microbiol* 13:320-327
- Dornreiter I., Höss A., Artur A. K., Fanning E.** (1990): SV40 T antigen binds directly to the large subunit of purified DNA polymerase  $\alpha$ . *EMBO J* 9:3329-3336
- Dorries K.** (1998): Molecular biology and pathogenesis of human polyomavirus infections. *Dev Biol Stand.* 94:71-79
- Dorries K., Loeber G., Meixenberger J.** (1987): Association of polyomavirus JC, SV40 and BK with human brain tumors. *Virology.* 160:268-270
- Dorries K., Vogel E., Guntherand S., Czub S.** (1994): Infection of human polyomavirus JC and BK in peripheral blood leukocytes from immunocompetent individuals. *Virology.* 198:59-70
- Dugan A. S., Eash S., Atwood W. J.** (2005): An N-linked glycoprotein with  $\alpha(2,3)$ -linked sialic acid is a receptor for BK virus. *J Virol.* 79:14442-14445
- Dyson N., Bernards R., Friend S. H., Gooding L. R., Hassell J. A., Major E. O., Pipas J. M., Vandyke T., Harlow E.** (1990): Large T antigens of many polyomaviruses are able to form complexes with the retinoblastoma protein. *J Virol.* 64:1353-6
- Eash S., Querbes W., Atwood W. J.** (2004): Infection of vero cells by BK virus is dependent on caveolae. *Am Soc Microb.* 78:11583-11590
- Eddy B. E., Borman G. S, Grubbs G. E., Young R. D.** (1962): Identification of the oncogenic substance in rhesus monkey kidney cell culture as simian virus 40. *Virology.* 17:65-75
- van Eijl H., Hollinshead M., Rodger G., Zhang W. H., Smith G. L.** (2002): The vaccinia virus F12L protein is associated with intracellular enveloped virus particles and is required for their egress to the cell surface. *J Gen Virol.* 83:195-207
- Ellman M., Bikel I., Figge J., Roberts T., Schlossman R., Livingston D .M.** (1984): Localization of the simian virus 40 small t antigen in the nucleus and cytoplasm of monkey and mouse cells. *J. Virol.* 50:623-628

- Everett, R. D.** (2006): Interactions between DNA viruses, ND10 and the DNA damage response. *Cell Microbiol* 8:365-74
- Fackler O. T., Kräusslich H.-G.** (2006): Interactions of human retroviruses with the host cell cytoskeleton. *Curr Opin Microb.* 9:406-415
- Forest T., Barnard S., Baiens J. D.** (2005): Active intranuclear movement of herpesvirus capsids. *Nat Cel Biol.* 7:429-431
- Forstová J., Krauzewicz N., Wallace S., Street A. J., Dilworth S. M., Beard S., Griffin B. E.** (1993): Cooperation of structural proteins during late events in the life cycle of polyomavirus. *J Virol.* 67:1405-1413
- Freund R., Garcea R. L., Sahli R., Benjamin T. L.** (1991): A single-amino-acid substitution in Polyomavirus VP1 correlates with plaque size and hemagglutination behavior. *J Virol.* 65:350-355
- Frischknecht F., Moreau V., Rottger S., Gonfloni S., Reckmann I., Superti-Fruga G., Way M.** (1999): Actin-based motility of vaccinia virus mimics receptor tyrosine kinase signalling. *Nature.* 401:926-929
- Gagescu R., Demaurex N., Parton R. G., Hunziker W., Huber L. A., Gruenberg J.** (2000): The recycling endosome of Madin-Darby canine kidney cells is a mildly acidic compartment rich in raft components. *Mol Biol Cell.* 11: 2775-2791
- Garcea R.L., Ballmer-Hofer K., Benjamin T. L.** (1985): Virion assembly defect of polyomavirus hr-t mutants under phosphorylation of major capsid protein VP1 before viral DNA encapsidation. *J Virol.* 54: 311-316
- Garcea R.L., Benjamin T. L.** (1983): Host range transforming gene of polyomavirus plays a role in virus assembly. *Proc Natl Acad Sci USA.* 80:613-617
- Gardner S. D., Field A. M., Coleman D.V., Hulme B.** (1971): New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet.* 1:1253-1260
- Garoff H., Hewson R., Opstelten D.-J. E.** (1998): Virus maturation by budding. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62:1171-1190
- Giner D., Neco P., Mdel F., Lopez I. Vinierga S., Gutierrez L. M.** (2005): Real time dynamics of the F-actin cytoskeleton duering secretion from chromaffin cells. *J Cell Sci.* 18:2871-2880
- Gordon-Shaag A., Ben-Nun-Shaul O., Kasamatsu H., Oppenheim A. B., Oppenheim A.** (1998): The SV40 capsid protein VP3 cooperates with the cellular transcription factor Sp1 in DNA-binding and in regulating viral promoter activity. *J Mol Biol.* 275(2):187-195
- Gordon-Shaag A., Ben-Nun-Shaul O., Roitman V., Yosef Y., Oppenheim A.** (2002): Cellular transcription factor Sp1 rectuits simian virus 40 capsid proteins to the viral packaging signal, ses. *J Virol.* 76(12):5915-5924
- Gharakhanian E., Munoz L.** (2003): The simian virus 40 minor structural protein Vp3, but not Vp2, is essential for infectious virion formation. *J Gen Virol.* 84: 2111-2116
- Greber U. F., Fornerod M.** (2004): Nuclear import in viral infections. *Curr Top Microbiol Immunol.* 285:109-138

- Griffith J. P., Griffith D. L., Rayment I., Murakami W. T., Caspar D. L. D. (1992):** Inside polyomavirus at 25-A resolution. *Nature*. 355:652-4
- Gross L. (1953)** A filterable agent, recovered from Ak leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice. *Proc Soc Exp Biol Med*. 83: 414-421
- Gupta S., De, Drazba J. A., Banerjee, A. K. (1998):** Involvement of actin microfilaments in the replication of human parainfluenza virus type 3. *J Virol*. 72:2655-2662
- Halmer L., Vestner B., Gruss C. (1998):** Involvement of topoisomerases in the initiation of simian virus 40 minichromosome replication. *J. Biol. Chem*. 273:34729-34798
- Hariharan N., Kelley D. E., Perry R. P. (1989):** Equipotent mouse ribosomal protein promoters have a similar architecture that includes internal sequence elements. *Genes Dev*. 3:1789-1800
- Hariharan N., Kelley D. E., Perry R. P. (1991):** Delta, a transcription factor that binds to downstream elements in several polymerase II promoters, is a functionally versatile zinc finger protein. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 88:9799-9803
- Harris K. F., Chang E., Christensen J. B., Imperiale M. J. (1998a):** BK virus as a potential cofactor in human cancer. *Dev Biol Stand*. 94:81-91
- Hartl F. U. (1996):** Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*. 381:571-580
- Helfand B. T., Chang L., Goldman R. D. (2004):** Intermediate filaments are dynamic and motile elements of cellular architecture. *J Cell Sci*. 117:133-141
- Hedquist B. G., Bratt G., Hammarin A. L., Grandien M., Nennesmo I., Sundelin B., Seregard S., (1999):** Identification of BK virus in a patient with acquired immune deficiency syndrome and bilateral atypical retinitis. *Ophthalmology*. 106:129-132
- Herrero-Martinez E. Roberts K. L., Hollinshead M., Smith G. L. (2005):** Vaccinia virus intracellular enveloped virions move to the cell periphery on microtubules in the absence of the A36R protein. *J Gen Virol*. 86:2961-2968
- Hirokawa N. (1998):** Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science*. 279 (5350):519-26
- Hofmann W., Reichart B., Ewald A., Muller E., Schmitt I., Stauber R. H., Lottspeich F. (2001):** Cofactor requirements for nuclear export of rev response element (RRE) – and constitutive transport element (CTE)-containing retroviral RNAs: an unexpected role for actin. *J Cell Biol*. 152:895-910
- Holländerová D. (2004):** Disertační práce
- Huang S. G., Weisshart K., Gilbert I., Fanning E. (1998):** Stoichiometry and mechanism of assembly of SV40 T antigen complexes with the viral origin of DNA replication and DNA polymerase alpha-primase. *Biochemistry*. 37:15345-15352
- Chang D., Cai X., Consigli R. A. (1993):** Characterization of the DNA binding properties of polyomavirus capsid proteins. *J. Virol*. 67:6327-6331
- Chen L., Fluck M. (2001):** Kinetic analysis of the steps of the polyomavirus lytic cycle. *J. Virol* 75(18):8368-8379



- Chen C., Weiss O. A., Stolz d. B., Watkins S. C., Montelaro R. C. (2004):** Differential effects of actin cytoskeleton dynamics on equine infectious anemia virus particle production. *J Virol.* 78: 882-891
- Ito Y., Brocklehurst J. R., Dulbecco R. (1977):** Virus-specific proteins in the plasma membrane of cells lytically infected or transformed by polyoma virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74:4666-4670
- Janssens V., Goris J., Van Hoof C. (2005):** PP2A: the expected tumor suppressor. *Curr Opin Genet Dev.* 15(1):34-41
- Jordan A., Hadfield J. A., Lawrence N. J., McGown A. T. (1998):** Tubulin as a target for anticancer drugs: agents which interacts with mitotic spindle. *Med Res Rev.* 18:259-296
- Jordan M. A., Thrower D., Wilson L. (1992):** Effects of vinblastine, podophylotoxin and nocodazole on mitotic spindles. Implications for the role of microtubule dynamics in mitosis. *J Cell Sci.* 102:401-416
- Jouvenet N., Monoghean P., Way M., Vileman T. (2004):** Transport of African swine fever virus from assembly sites to the plasma membrane is dependent on microtubules and conventional kinesins. *J Virol.* 78:7990-8001
- Kastan M. B., Onyakwere O., Sidransky D. (1991):** Partipacion of p53 protein in the cellular response to DNA damane. *Cancer Res.* 51:6304-6311
- Kimura T., Hashimoto I., Yamamoto A., Nikishawa M., Fujisawa J.-I. (2000):** Rev-dependent association of the intron-containing HIV-1 gag mRNA with the nuclear actin bundles and the inhibition of its nucleocytoplasmic transport by latrunculin-B. *Genes Cells.* 5:289-307
- Komano J., Myiauchi K., Matsuda Z., Yamamoto N. (2004):** Inhibiting the Arp2/3 complex limits infection of both intracellular mature vaccinia virus and primate lentiviruses. *Mol Biol Cell* 15:5197-5207
- Koshizuka T., Kawaguchi Y., Nishiyama Y. (2005):** Herpes simplex virus type 2 membrane protein UL56 associates with the kinesin motor protein KIF1A. *J Gen Virol.* 86:527-533
- Krendel M., Mooseker M. S. (2005):** Myosins: tails (and heads) functional diversity. *Physiology.* 20:239-251
- Kryszke M. H., Piette J., Yanic M. (1987):** Induction of a factor that binds to the Polyoma virus A enhancer on differentiation of embryonal carcinoma cells. *Nature* 328:254-256
- Lakadamyali M., Rust M. J., Babcock H. P., Zhuang X. (2003):** Visualizing infection of individual influenza viruses. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100:9280-9285
- Lehmann M. J., Sherer N. M., Marks C. B., Pypaert M., Mothe W. (2005):** Actin- and myosin-driven movement of viruses along filopodia precedes their entry into cells. *J Cell Biol.* 170:317-325
- Lepšík M. (1999):** Diplomová práce
- Li M., Garcea R. L. (1994):** Identification of the threonine phosphorylation sites on the polyomavirus major capsid protein VP1: relationship to the activity of middle T antigen. *J Virol.* 68:320-327

- Li M., Garcea R. L. (1994):** Identification of the threonine phosphorylation sites on the polyomavirus major capsid protein VP1: relationship to the activity of middle T antigen. *J Virol.* 68:320-327
- Li T-C, Takeda N., Kato K., Nilsson J., Xing L., Haag L., Cheng R. H., Miyamura T. (2003):** Characterization of self-assembled virus-like particles of human polyomavirus BK generated by recombinant baculoviruses. *Virology.* 311:115-124
- Liddington R. C., Yan Y., Moulai J., Sahl I. R., Benjamin T. L., Harrison S. C. (1991):** Structure of simian virus 40 at 3.8-Å resolution. *Nature.* 354:278-285
- Liebel D. (2005):** Dizertační práce
- Liebel D., Difato F., Horníková L., Mannová P., Štokrová J., Forstová J. (2006):** Mouse polyomavirus enters early endosomes, requires their acidic pH for productive infection, and meets transferring cargo in Rab11-positive endosomes. *J Virol.* 80(9):4610-4622
- Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser C. A., Krieger M., Scott M. P., Zipursky S. L., Darnell J. (2008):** Molecular cell biology. 5<sup>th</sup> edition. W. H. Freeman and Company, New York, USA
- Mallardo M., Schleich S., Krijnse Locker J. (2001):** Microtubule-dependent organization of vaccinia virus core-derived early mRNAs into distinct cytoplasmic structures. *Mol Biol Cell.* 12:3875-3891
- Mannová P., Forstová J. (2003):** Mouse polyomavirus utilizes recycling endosomes for traffic pathway independent of COPI vesicle transport. *J. Virol* 77(3):1672-1681
- Mannová P., Liebl, D., Krauzewicz N., Fejtová A., Štokrová J., Palková Z., Griffin B. E., Forstová J. (2002):** Analysis of mouse polyomavirus mutants with lesions in the minor capsid proteins. *J Gen. Virol.* 83:2309-2319
- Martelli, F., Iacobini, C., Causo, M., Felsani, A. (1996):** Characterization of two novel YY1 binding sites in the polyomavirus late promoter. *J. Virol.* 70(3):1433-1438
- Martin M. E., Piette J., Yaniv M., Tang W., Folk W. R. (1988):** Activation of the polyomavirus enhancer by activator protein 1 (AP1) homolog and two contiguous proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:5839-5843
- Marton A., Marko B., Delbecchil L., Bourgaux P. (1995):** Topoisomerase activity associated with polyomavirus large tumor antigen. *Biochim Biophys. Acta* 1261(1):59-63
- De Mattei M., Martini F., Corallini A., Gerosa M., Scotlandi K., Carinci P., Barbanti-Brodano G., Tognon M., (1995):** High incidence of BK virus large-T-antigen-coding sequence in normal human tissues and tumors of different histotypes. *Int J Cancer.* 61:756-60
- McDonald D., Vodicka M. A., Lucero G., Svitkina T. M., Borisy G. G., Emerman M., Hope T. J. (2002):** Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells. *J Cell Biol* 159:441-452

- Mitchinson T. J., Cramer L. P. (1996):** Actin-based cell motility and cell locomotion *Cell*. 84(3): 371-9
- Monini P., Rotola A., Di Luca D., De Lellis L., Chiari E., Corallini A., Cassai E. (1995):** DNA rearrangements impairing BK virus productive infection in urinary tract tumors. *Virology*. 214:273-9
- Monini P., Rotola A., De Lellis L., Corallini A., Secchiero P., Albini A., Benelli R., Parravicini C., Barbanti-Brodano G., Cassai E. (1996):** Latent BK virus infection and Kaposi's sarcoma pathogenesis. *Int J Cancer*. 66:717-22
- Montross L., Watkins S., Moreland R. B., Mamon H., Caspar D. L. D., Garcea R. L. (1991):** Nuclear assembly of polyomavirus capsids in insect cells expressing the major capsid protein VP1. *J. Virol*. 65:4991-4998
- Moreau V., Frischknecht F., Reckman I., Vincentelli R., Rabut G., Stewart D., Way M. (2002):** A complex of N-WASP and WIP integrates signaling cascades that lead to actin polymerization. *Nat Cell Biol* 2:441-448
- Muratani M., Gerlich D., Janicki S. M., Gebhard M., Elis R., Spector D. L. (2002).** Metabolic-energy-dependent movement of PML bodies within the mammalian cell nucleus. *Nat Cell Biol*. 4:106-110
- Newell N., Lai C.J., Khoury G., Kelly T. J. Jr. (1978):** Electron microscope study of the base sequence homology between simian virus 40 and human papovavirus BK. *J Virol*. 25:193-201
- Newsome T. P., Scaplehorn N., Way M. (2004):** Src mediates a switch from microtubule- to actin-based motility of vaccinia virus. *Science* 306:124-129
- Norkin L. C., Anderson H. A., Wolfrom S. A., Oppenheim A. (2002):** Caveolar endocytosis of simian virus 40 is followed by brefeldin A-sensitive transport to the endoplasmic reticulum, where the virus disassembles. *J Virol*. 76:5156-66
- Oppenheim A., Sandalon Z., Peleg A., Shaul O., Nicolis S., Ottolenghi S. (1992):** A cis-acting DNA signal for encapsidation of simian virus 40. *J Virol*. 66(9):5320-5328
- Ostapchuk P., Diffley J. F., Neuder J. T., Stillman B., Levine A. J., Hearing P. (1986):** Interaction of nuclear factor with the Polyomavirus enhancer region. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 83:8550-8554
- Ott D. E., Coren L.V., Johnson D.G. , Sowder R.C., Kim Y.D., Fisher R.J., Zhou X.Z., Lu K.P., Henderson L.E. (2000):** Actin-binding cellular proteins inside human immunodeficiency virus type 1. *Virology*. 266(1): 42-51
- Padgett, B. L., Walker, D. L., ZuRhein, G. M., Eckroade, R. J., Drasel, B. H. (1971):** Cultivation of a papova-like virus from human brain with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Lancet*. 1:1257-1260
- Palková Z., Adamec T., Liebl D., Štokrová J., Forstová J. (2000a):** Production of polyomavirus structural protein VP1 in yeast cells and its interaction with cell structures. *FEBS Letters*. 478:281-289
- Pallas D. C., Shahrik L. K., Martin B. L., Jaspers S., Miller T. B., Brautigam D. L., Roberts T. M. (1990):** Polyoma small and middle T antigens and SV40 small t antigen form stable complexes with protein phosphatase 2A. *Cell*. 60:167-176

- Pederson T., Aebi U.** (2005): Nuclear actin extends, with no contraction in sight. *Mol Biol Cell*. 16:5055-5060
- Pelchen-Mathews A., Raposo G., Marsh M.** (2004): Endosomes, exosomes and Trojan viruses. *Trends Microbiol*. 12:310-316
- Pelkmans L., Fava E., Grabner H., Hannus M., Habermann B., Krausz E., Zerial M.** (2005): Genome-wide analysis of human kinases in clathrin- and caveolae/raft-mediated endocytosis. *Nature*. 436:78-86
- Pelkmans L., Helenius A.** (2002): Endocytosis via caveolae. *Traffic*. 3:31-320
- Pelkmans L., Helenius A.** (2003): Insider information: what viruses tell us about endocytosis. *Cur Opin Cell Biol*. 5:414-422
- Pelkmans L., Püntener D., Helenius A.** (2002). Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science* 296:535-539
- Pelkmans, L., Kartenbeck J., Helenius A.** (2001): Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat Cell Biol*. 3: 473-483
- Philimonenko V. V., Zhao J., Iben S., Dingova H., Kysela K., Kahle M.** (2004): Nuclear actin and myosin I are required for RNA polymerase I transcription. *Nat Cell Biol*. 6: 1165-1172
- Pho M. T., Ashok A., Atwood W. J** (2000): JC virus enters human glial cells by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. *J. Virol*. 74:2288-2292
- Ploubidou A., Moreu V., Ashman K., Reckmann I., Gonzales C., Way M.** (2000): Vaccinia virus infection disrupts microtubule organization and centrosome function. *Embo J*. 19:3932-3944
- Pietropaolo V., Di Taranto C., Degener A. M., Jin L., Sinibaldi L., Baiocchini A., Melis M., Orsi N.** (1998): Transplacental transmission of human polyomavirus BK. *J Med Virol*. 56:372-6
- Pol A., Calvo M., Lu A., Enrich C.** (1999): The “early sorting” endocytic compartment of rat hepatocytes is involved in the intracellular pathway of caveolin-1 (VIP-21). *Hepatology*. 29:1848-1857
- Pollard T. D., Borisy G. G.** (2003): Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*. 112:453-465
- Pollard T., Blanchoin L., Mullins R.** (2001): Actin dynamics. *J Cell Sci*. 114:3-4
- Poole E., Strape P., Mok H.-P., Hicks R., Lever A. M. L.** (2005): HIV-1 Gag-RNA interaction occur at a perinuclear/centrosomal site; analysis by confocal microscopy and FRET. *Traffic*. 6:741-755
- Radtke K., Döhner K., Sodeik B.** (2006): Vrl interactions with the cytoskeleton: a hitchhiker’s guide to cell. *J Microbiol*. 8:387-400
- Rayment I., Baker T. S., Caspar D. L., Murakami W. T.** (1982): Polyoma virus capsid structure at 22.5 Å resolution. *Nature*. 295(5845):110-115
- Reeves P. M., Bommarius B., Lebeis S., McNulty S., Christensen J., Swimm A.** (2005): Disabling poxvirus pathogenesis by inhibition of Abl-family tyrosine kinases. *Nat Med*. 11:731-739

- Reploeg M. D., Storch G. A., Clifford D. B. (2001):** BK virus: A clinical review. *Clin Infect Dis*. 33:191-202
- Rietdorf J., Ploubidou A., Reckmann I., Holmstrom A., Frischknecht F, Zettl M. Zimmermann T., Way M. (2001):** Kinesin-dependent movement on microtubules precedes actin-based motility of vaccinia virus. *Nat Cell Biol*. 3:992-1000
- Richterová Z., Liebl D., Horák M., Palková Z., Štokrová J., Hozák P., Korb J., Forstová J. (2001):** Caveolae are involved in the trafficking of mouse polyomavirus virions and artificial VP1 pseudocapsids toward cell nuclei. *J Virol*. 75: 10880-10891
- Rothwell V. M., Folk W.R. (1983):** Comparison of the DNA sequence of the Crawford Small-Plaque Variant of Polyomavirus with Those of Polyomaviruses A2 and Strain 3. *J Virol*. 48:472-480
- Rubtsova S. N., Kondratov R. V., Kopnin P. B., Chumakov P. M., Kopnin B. P., Vasiliev J. M. (1998):** Disruption of actin microfilaments by cytochalasin D leads to activation of p53. *FEBS Lett*. 71:353-357
- Saito S. Y., Hori M., Ozaki H., Karaki H. (1996):** Cytochalasin D inhibits smooth muscle cells contraction by directly inhibiting contractile apparatus. *J Smooth Muscle Res*. 32:51-60
- Sasaki H., Nakamura M. Ohno T., Matsuda Y., Yuda Y., Nonomura Y. (1995):** Myosin-actin interaction plays an important role in human immunodeficiency virus type 1 release from host cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92:2026-2030
- Salunke D. M., Caspar D. L., Garcea R. L. (1986):** Self assembly of purified polyomavirus capsid protein VP1. *Cell*. 46:895-904
- Sambrook J., Westphal H., Srinivasan P. R., Dulbecco R. (1968):** The integrated state of viral DNA in SV40-transformed cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 60:11288-1295
- Sanjuan N., Porras A, Otero J. (2003):** Microtubule-dependent intracellular transport of murine polyomavirus. *Virology*. 313:105-116
- Sandler E. S., Aquino V. M., Gross-Shohet E., Hinrichs S., Krisher K.(1997):** BK papovavirus pneumonia following hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 20:163-165
- Seisenberg G., Ried M. U., Endress T., Bunning H., Hallek M., Brauchle C. (2001):** Real-time single-molecule imaging of the infection pathway of an adenovirus-associated virus. *Science*. 294:1929-1932
- Senderowicz A. M., Kaur G., Sainz E., Laing C., Inman W. D., Rodriguez J., Crews P., Malspeis L., Grever M. R., Sausville E. A. (1995):** Jaspilakinolide's inhibition of the growth of prostate carcinoma cells in vitro with disruption of the actin cytoskeleton. *J Natl Cancer Inst*. 87:46-51
- Shepherd T. G., Kockeritz L., Szraiber M. R., Muller W. J., Hassell J. A. (2001):** The *pea3* subfamily *ets* genes are required for HER2/Neu-mediated mammary oncogenesis. *Curr Biol*. 11:1739-1748
- Schepis A., Schramm B., de Haan C. A. M., Locker J. K. (2006):** Vaccinia virus-induced microtubule-dependent cellular rearrangements. *Traffic* 7:308-323

- Schramm B., Locker J. K.** (2005): Cytoplasmic organization of poxvirus DNA replication. *Traffic*. 6:839-846
- Shishido-Hara Y., Ichinose S., Higuchi K., Hara Y., Yasuj K.** (2004): Major and minor capsid proteins of human polyomavirus JC cooperatively accumulate to nuclear domain 10 for assembly into virions. *J Virol*. 78(18):9890-9903
- Sieczkarski S. B., Whittaker G. R.** (2004): Viral entry. *Curr Top Microbiol Immunol*. 285: 1-23
- Simpson-Holley M., Colgrove R. C., Nalepa G., Harper J. W., Knipe D. M.** (2005): Identification and functional evaluation of cellular and viral factors involved in the alteration of nuclear architecture during herpes simplex virus 1 infection. *J Virol* 79:12840-12851
- Sinibaldi L., Cavallo G., Goldoni P., Pietropaolo V., Viti D., Orsi N.** (1990): Extraction and purification of gangliosides from CER cells, a cell line suitable for rabies virus replication. *Microbiologica*. 13(4): 339-42
- Smith G. A., Enquist L.W.** (2002): Break ins and break outs: viral infections with the cytoskeleton of mammalian cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 18:135-161
- Smith G. A., Helenius A.** (2004): How viruses enter animal cells. *Science* 304:237-242
- Smith G. L., Murphy B. J., Law M.** (2003): Vaccinia virus motility. *Annu Rev Microbiol*. 57:323-342
- Soeda E., Arrand J. R., Smolar N., Walsh J. E., Griffin B. E.** (1980): Coding potential and regulatory signals of the polyoma virus genome. *Nature*. 283(5746):445-453
- Spector I., Braet F, Schochet N. R., Bubb M. R.** (1999): New anti-actin drugs in the study of the organization and function of the actin cytoskeleton. *Microsc Res Tech*. 47:18-37
- Stamatos N. M., Chakrabarti S., Moss B., Hare J. D.** (1987): Expression of polyomavirus virion proteins by a vaccinia virus vector: association of VP1 and VP2 with the nuclear framework. *J Virol*. 61: 516-525
- Stehle T., Gamblin S. J., Yan Y., Harrison S. C.** (1996): The structure of simian virus 40 refined at 3.1 Å resolution. *Structure*. 4:165-182
- Stehle T., Harrison S. C.** (1997): High-resolution structure of a polyomavirus VP1-oligosaccharide complex: implications for assembly and receptor binding. *EMBO J*. 16:5139-5148
- Stradal T., Kranewitter W., Winder S. J., Gimona M.** (1998): CH domain revisited *FEBS Lett*. 431(2):134-7
- Storrie B., White J., Rottger S., Stelzer E. H., Suganuma T., Nilsson T.** (1998): Recycling of golgi-resident glycosyltransferases through the ER reveals a novel pathway and provides an explanation for nocodazole-induced Golgi scattering. *J Cell Biol*. 143:1505-1521
- Streuli C.H., Griffin B.,** (1987): Myristic acid is coupled to a structural protein of polyoma virus and SV40. *Nature*. 326:619-622

- Strunze S., Trotman L. C., Boucke K., Greber U. F.** (2005): Nuclear targeting of adenovirus type 2 requires CRM1-mediated nuclear export. *Mol Biol Cell* 16:2999-3009
- Sullivan C.S., Pipas J.M.** (2002). T antigens of simian virus 40: Molecular chaperones for viral replication and tumorigenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*: 179-202
- Suomalainen M., Nakano M. Y., Boucke K., Keller S., Greber U. F.** (2001): Adenovirus-activated PKA and p38/MAPK pathways boost microtubule-mediated nuclear targeting of virus. *Embo J.* 20:1310-1319
- Suomalainen M., Nakano M. Y., Keller S., Boucke K., Stidwill R. P., Greber U. F.** (1999): Microtubule-dependent plus- and minus end-directed motilities are competing processes for nuclear targeting of adenovirus. *J Cell Biol.* 144:657-672
- Stuurman N., Heins S., Aebi U** (1998): Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions. *J Struct Biol.* 122:42-66
- Tang Y. Winkler U., Freed E. O., Torrey T.-A., Kim W., Li H., Goff S. P., Morse H. R.** (1999): Cellular motor protein KIF-4 associates with retroviral Gag. *J Virol.* 73:10508-10513
- Tang W. J., Berger S. L., Triezenberg S. L., Folk W. R.** (1987): Nucleotides in the polyomavirus enhancer that control viral transcription and DNA replication. *Mol Cell Biol.* 7:1681-1690
- Tsai B., Gilbert M. J., Stehle T., Lencer W., Benjamin T. L., Rapoport T. A.** (2003): Gangliosides are receptors for murine polyoma virus and SV40. *EMBO.* 22:4346-4355
- Tsakiridis T., Vranic M., Klip A.** (1994): Disassembly of the actin network inhibits insulin-dependent stimulation of glucose transport and prevents recruitment of glucose transporters to the plasma membrane. *J Biol Chem.* 269:2934-2942
- Tuxworth R. I., Titus M. A.** (2000): Unconventional myosins: Anchors in the membrane traffic relay. *Traffic.* 1:1-18
- Vale R. D.** (1987): Intracellular transport using microtubule-based motors. *Ann Rev Cell Biol.* 3:347-378
- Urbanik E., Waare B. R.** (1989): Actin filaments capping and cleaving activity of cytochalasins B, D, E and H. *Arch Biochem Biophys.* 269: 181-187
- Varshavsky A. J., Bakayev V. V., Chumackov P. M., Georgie G. P.** (1976): Minichromosome of simian virus 40: Presence of H1. *Nucleic Acids Res* 3:2101-2113
- Vasquez R. J., Howell B., Yvon A. M., Wadsworth P., Cassimeris L.** (1997): Nanomolar concentrations of nocodazole alter microtubule microtubule dynamic instability in vivo and in vitro. *Mol Biol Cell.* 8:973-985
- Voltz R., Jager G., Seelos K., Fuhry L., Hohlfeld R.** (1997): BK virus encephalitis in an immunocompetent patient. *Arch Neurol.* 53:101-103
- Walter G., Ruediger R., Slaughter C., Mumby M.** (1990): Association of protein phosphatase 2A with polyomavirus medium tumor antigen. *Proc Soc Exp Biol Med.* 87(7):2521-2525

- Wang T. H., Wang H. S., Ichijo H., Gianakakou, Foster J. S., fojo T., Wimalasena J.** (1998): Microtubule-interfering agents activate c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase through both Ras and apoptosis signal-regulating kinase pathways. *J Biol Chem.* 273:4928-4936
- Ward B. M., Moss B.** (204): Vaccinia virus A36R membrane protein provides a direct link between intracellular enveloped virions and the microtubule motor kinesins. *J Virol.* 78:2486-2493
- Woehlke G., Schliwa M.** (2000): Walking on two heads: the many talents of kinesin. *Natur Rev Mol Cell Biol.* 1:50-58
- White S. R., Williams P., Wojcik K. R., Sun S., Hiemstra P. S., Rabe K. F., Dorscheid D. R.** (2001): Initiation of apoptosis by actin cytoskeletal dearangement in human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 24:282-294
- Whittaker G. R.** (2003): Virus nuclear import. *Adv Drug Deliv Rev.* 55:733-747
- Whittaker G. R. Helenius A.** (1998): Nuclear import and export of viruses and virus genomes. *Virology.* 246:1-23
- Winder S. J., Ayscough K. R.** (2005): Actin binding proteins. *J Cell Sci.* 118:651-654
- Yang S. I., Lickteig R. L., Estes R., Rundell K., Walter G., Mumby M. C.** (1991): Control of protein phosphatase 2A by simian virus 40 small-t antigen. *Mol. Cell Biol.* 64:1988-1995
- Yarar D., Waterman-Storer C.M., Schmid S. L.** (2005): A dynamic actin cytoskeleton functions at multiple stages of clathrin-mediated endocytosis. *Mol Biol Cell.* 16:964-975
- Yelton D. B., Vasken Aposhian H.** (1972): Polyoma pseudovirions I. Sequence of events in primary mouse embryo cells leading to pseudovirus production. *J Virol.* 10(3): 340-346
- Yuen L. K., Consigli R. A** (1983): Generation of capsods from unstable polyoma virions. *J Virol.* 47:620-625