

Súhlasím so zapožičiavaním svojej diplomovej práce na študijné účely a prosím, aby bola vedená presná evidencia čitateľov. Prevzané údaje je čitateľ povinný riadne citovať.

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra genetiky a mikrobiologie



Štúdium dopravy genómu myšieho polyomavírusu
do jadra bunky

Kristína Schenková

Praha 2006

Vedúci diplomovej práce: Doc. RNDr. Jitka Forstová, CSc.

Prehlasujem, že som túto prácu vypracovala samostatne, pod vedením vedúcej diplomovej práce a s použitím citovanej literatúry.

Kristína Schenková

Kristína Schenková

Na tomto mieste by som rada poďakovala všetkým, ktorí akýmkoľvek spôsobom prispeli k dokončeniu tejto práce.

Ďakujem Doc. RNDr. Jitke Forstovej, Csc. za neoceniteľú pomoc, rady a pripomienky, ktoré mi poskytovala po celý čas vypracovávania tejto diplomovej práce.

Ďakujem RNDr. Jirine Hanovej, Csc. za pomoc s tkanivovými kultúrami a za nikdy nekončiacu ochotu pomôcť a poradiť.

I would like to thank to Mgr. Sandra Huerfano for useful advices on mammalian cells transfections.

Ďakujem Doc. Mgr. Janovi Černému, Ph.D., za poskytnutie prístrešia počas rekonštrukcie nášho laboratória.

Ďakujem Míle, Vlastovi, Vojtovi, Davidovi a Evženovi za to, že mi nedovolili zanedbávať ani spoločenskú stránku života :o)

Ďakujem všetkým kolegom z 006, predovšetkým však Marianne, za konzultácie problematiky a za morálnu podporu v najťažších chvíľach dokončovania práce.

Ďakujem svojim najbližším za podporu počas štúdia, toleranciu a morálnu a finančnú pomoc.

Ďakujem Ondrovi za nekonečnú trpezlivosť, pochopenie a podporu, bez ktorej by som to asi vzdala už na samom začiatku.

Predkladaná diplomová práca vznikla v rokoch 2003 – 2006 za podpory grantov Centrum „Funkčná organizácia bunky“ (LC545) a Centrum „Nová antivirotika a antineoplastika“ 1M138896301.

Studies of delivery of the mouse polyomavirus genome into the cell nucleus

ABSTRACT:

The long-lasting aim of our laboratory is the study of mouse polyomavirus life cycle (mPyV, small non – enveloped ds DNA virus). One part of our research is focused on events concerning the entry of mPyV into the host cell and its transport to the nucleus. Endocytic pathway misused by mPyV is not fully understood. It involves internalization of virions by smooth monopinocytic vesicles and entry into early endosomes. Further, after 1,5 – 3 h post infection, virus can be observed in recycling endosomes and endoplasmic reticulum. It is not clear where uncoating of mPyV takes place and how the virus genome is delivered into the nucleus.

The aims of this study were the following:

- Using plasmids, which encode dominant – negative mutant (DN mt) of caveolin-1 and Rab11 (marker of recycling endosomes), to determine the involvement of caveolin-1 and recycling endosomes respectively, in the productive pathway of mPyV
- To examine the role of proteasomes in productive infection
- Using the confocal microscopy to detect the time course of presence of VP1 (major capsid protein of mPyV) signal in the proximity of cell nucleus during mPyV infection

We found out, that overexpression of caveolin – 1 DN mt does not inhibit PyV infection. This supports our previous observations that mPyV can enter the cell in caveolae independent manner. Overexpression of Rab11 DN mt decreased mPyV infectivity. This indicates that recycling endosomes may be involved in mPyV productive infection. Using reversible proteasomal inhibitor MG-132, we observed the involvement of functional ubiquitin – proteasomal pathway in the early stage of mPyV life cycle: - Proteasomal inhibition caused a decrease of productive infection and this inhibition was dose dependent. - Inhibition effect was observed in the first 4 hours post infection, when mPyV entered host cells and traveled towards the nucleus. In contrast, proteasomal inhibition had no effect on the later stages of mPyV life cycle, which indicates that ubiquitin – proteasomal pathway is not involved in the early transcription. Surprisingly, inhibition effect of MG-132 could be overcome by higher multiplicity of infection.

While vast majority of virions reach perinuclear space approximately 3 hours post infection (signal of VP1 can be seen in endoplasmic reticulum or in recycling endosomes), we detected signal of VP1 in the close proximity of the nuclear membrane and also in the nucleus very soon after infection (1 hour). These results suggest, that a subpopulation of PyV can exploit a quick, alternative pathway for its trafficking towards the cell nucleus.

Key words: polyomavirus, virus entry, caveolae independent endocytosis, recycling endosomes, ubiquitin – proteasomal degradation, nuclear entry

Kľúčové slová: polyomavírus, vstup vírusu do buniek, endocytóza nezávislá na kaveolách, recyklujúce endozómy, ubiquitín – proteazomálna degradácia, vstup vírusu do jadra

Zoznam skratiek

5HT _{2A} R	receptor pre 5-hydroxytryptamín 2A
19S RP	regulačný komplex 26S proteazómu
20S CP	proteolytické jadro 26S proteazómu
26S	proteazóm, holoenzým
ARF	ADP ribozylačný faktor
ATP	adenozín trifosfát
bp	páry báz
BFB	brómfenolová modrá
BKV	BK vírus
BMK	bunková línia „baby mouse kidney cells“
BSA	bovínny sérum albumín
cav-1 DN mt	dominantne negatívna mutanta kaveolínu-1
cav-1 WT	divoký typ kaveolínu-1
Cbl	„Casitas B-lineage lymphoma“
CFTR	„cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“
Cer	ceramid
COPI	„coatomer protein complex I“
CT-L	chymotrypsínová aktivita proteazómu
DAPI	4', 6'-diamidino – 2 fenylyndol
DMEM	„Dulbecco's Modified Eagle's Medium“
DMSO	dimetyl sulfoxid
ds DNA	dvojreťazcová deoxyribonukleová kyselina
E1	ubiquitín – aktivujúci enzým
E2	ubiquitín – konjugačný enzým / ubiquitín – prenášajúci enzým
E3	ubiquitín – proteín ligáza
E6-AP	proteín asociovaný s onkoproteínom E6
E6	onkoproteín, skorý papilomavírusový proteín
EDTA	kyselina ethyléndiaminotetraoctová
EEA1	„early endosome antigen 1“
EGFR	receptor pre epidermálny rastový faktor, „Epidermal growth factor receptor“

Zoznam skratiek

EM	elektrónová mikroskopia
eps15	„Epidermal growth factor receptor pathway substrate 15“
ER	endoplazmatické retikulum
ERAD	degradácia asociovaná s endoplazmatickým retikulom
EtBr	etídium bromid
FBS	fetálne bovinne sérum
GA	Golgiho aparát
Gal	galaktóza
GalCer	galaktozyl ceramid
GalNAc	N-acetylgalaktozamín
Glc	glukóza
GFP	zelený fluorescenčný proteín
h	hodina
HAU	hemaglutinačné jednotky
HECT	doména homologická s C- koncom proteínu E6-AP
IRES	„Internal ribosomal entry site“
JCV	JC vírus
kDa	kilodalton
LT	veľký T antigén
MAP kinázy	mitogénom aktivované proteínové kinázy
M β CD	metyl- β -cyklodextrín
MDa	megadalton
MHC gp I	glykoproteíny hlavného histokompatibilného komplexu I. triedy
min	minúta
M.O.I.	multiplicita infekcie
mPyV	myší polyomavírus
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
MT	stredný T antigén
NeuNAc	kyselina sialová, „N-acetylneuraminic acid“
NIH 3T3	stabilná bunková línia myších fibroblastov
NIH 3T6	stabilná bunková línia myších fibroblastov
NLS	jadrový lokalizačný signál
NMuMG	<u>N</u> ormal <u>M</u> urine <u>M</u> ammary <u>G</u> land cells
NPC	komplex jadrových pórov

Zoznam skratiek

OD	optická denzita
ORI	začiatok replikácie
PBS	„Phosphate Buffered Saline“
p.f.u	„plaque forming units“
PGPH	post-glutamyl peptid hydrolytická aktivita proteazómu
PI(4,5)P ₂	fosfatidylinositol 4,5 – bisfosfát
Rab11 DN mt	dominantne negatívna mutanta Rab11
Rab11S25N	dominantne negatívna mutanta Rab11
RE	recyklujúce endozómy
rpm	otáčky za minútu
ST	malý T antigén
SV40	simian virus 40
T	triangulačné číslo
TAE	tris-acetátový pufor
TBE	tris-borátový pufor
T antigén	tumor antigén
TK	tkanivové kultúry
T-L	trypsínová aktivita proteazómu
Tris	Tris-(hydroxymetyl)-aminometán
Ub	ubiquitín
VP1	vírusový kapsidový proteín 1 (majoritný kapsidový proteín polyomavírusov)
VP2	vírusový kapsidový proteín 2 (minoritný kapsidový proteín polyomavírusov)
VP3	vírusový kapsidový proteín 3 (minoritný kapsidový proteín polyomavírusov)
VLPs	kapsidám podobné častice (virus like particles)
vpu	„virus particle unit“
WGA	aglutinín z pšeničných klíčkov (wheat – germ agglutinin)
WME	„whole mouse embryo“
WT	divoký typ (wild type)

Obsah

1. Úvod	12
2. Literárny prehľad	15
2.1. Charakteristika myšieho polyomavírusu.....	15
2.1.1. Organizácia genómu mPyV.....	15
2.1.2. Produktívna infekcia mPyV.....	15
2.1.3. Najvýznamnejší zástupcovia čeľade <i>Polyomaviridae</i>	16
2.2. Vstup polyomavírusov do bunky.....	16
2.2.1.1. Receptory polyomavírusov.....	16
2.2.1.2. Od cytoplazmatickej membrány k jadru.....	23
2.3. Ubiquitín – proteazomálny systém.....	32
2.3.1. Ubiquitín.....	32
2.3.2. Enzýmy podieľajúce sa na ubiquitinylnácii proteínov.....	32
2.3.3. Štruktúra a funkcia proteazómu.....	35
2.3.4. Degradácia asociovaná s endoplazmatickým retikulom (ERAD).....	37
2.3.5. Vírusy a ubiquitín – proteazomálny systém.....	39
2.3.5.1. Interakcie vybraných druhov vírusov so zložkami ubiquitín – proteazomálneho systému.....	39
2.3.5.1.1. E6 degraduje p53 pomocou bunkového proteínu E6- AP.....	39
2.3.5.1.2. Degradácia MHC gp I prostredníctvom ERAD je sprostredkovaná niektorými vírusmi.....	40
2.3.5.1.3. Tat proteín vírusu HIV-1 interaguje s proteazómom a bráni tak degradácii svojich proteínov.....	40
2.3.5.1.4. Ubiquitín, ubiquitín - ligázy a pučanie obalených vírusov z bunky.....	41
2.3.5.2. Virióny vstupujúce do bunky interagujú s ubiquitín – proteazomálnym systémom po opustení endozómu.....	42
2.3.5.2.1. Proteazóm ako podmienka infekcie.....	42
2.3.5.2.2. Proteazóm ako prekážka.....	43
2.4. Proteazomálne inhibítory.....	44
3. Materiál a metódy	46
3.1. Materiál.....	46
3.1.1. Bunkové línie a transfekované bunky.....	46
3.1.2. Vírus.....	46
3.1.3. Bakteriálne kmene.....	47
3.1.4. Vektory.....	47
3.1.5. Proteazomálne inhibítory.....	48
3.1.6. Protilátky a fluorescenčné farbivá.....	48
3.1.6.1. Primárne protilátky.....	48
3.1.6.2. Sekundárne protilátky.....	49

3.1.6.3. Fluorescenčné farbivá.....	50
3.1.7. Markery molekulových hmotností.....	50
3.1.8. Antibiotiká.....	50
3.1.9. Zloženie najčastejšie používaných roztokov.....	51
3.1.10. Použité prístroje.....	52
3.2. Metódy.....	52
3.2.1. Sterilizácia	52
3.2.2. Tkanivové kultúry.....	53
3.2.2.1. Pasážovanie cicavčích buniek 3T6 a NMuMG.....	53
3.2.2.2. Synchronizácia cicavčích buniek pred infekciou.....	53
3.2.2.3. Infekcia cicavčích buniek vírusom.....	54
3.2.2.4. Transfekcia cicavčích buniek.....	54
3.2.2.5. Selektácia buniek po transfekcii.....	55
3.2.2.6. Príprava konzerv z cicavčích buniek.....	55
3.2.2.7. Fixácia cicavčích buniek na mikroskopických sklíčkach.....	56
3.2.2.8. Imunofluorescenčná detekcia proteínov v bunkách.....	56
3.2.3. Izolácia myšieho polyomavírusu.....	57
3.2.3.1. Pomnoženie myšieho polyomavírusu.....	57
3.2.3.2. Izokinetická centrifugácia cez vrstvu 10% sacharózy.....	58
3.2.3.3. Izopyknická centrifugácia v rovnovážnom CsCl gradiente.....	58
3.2.3.4. Dialýza.....	59
3.2.3.5. Hemaglutinačný test.....	59
3.2.3.6. Titrácia vírusu.....	60
3.2.4. Inhibičné pokusy.....	61
3.2.4.1. Štúdium vplyvu proteazomálnych inhibítorov na infektivitu myšieho polyomavírusu.....	61
3.2.4.2. Stanovenie cytotoxicity proteazomálneho inhibítora MG132.....	61
3.2.5. Práca s baktériami.....	62
3.2.5.1. Príprava kompetentných buniek na elektroporáciu.....	62
3.2.5.2. Elektroporácia baktérií.....	63
3.2.5.3. Kultivácia baktérií.....	64
3.2.5.4. Kultivácia baktérií pre izoláciu pomocou kitu „EndoFree Plasmid Maxi Kit QUIAGEN® “	64
3.2.5.5. Skladovanie baktérií.....	64
3.2.6. Práca s DNA.....	65
3.2.6.1. Izolácia plazmidovej DNA alkalickou metódou	65
3.2.6.2. Deproteinácia DNA upraveným fenolom a chloroformom.....	66
3.2.6.3. Odstránenie RNA zo vzorky DNA.....	66
3.2.6.4. Zrážanie DNA etanolom.....	66
3.2.6.5. Štiepenie DNA restriktívnymi enzýmami	67
3.2.6.7. Izolácia plazmidovej DNA pomocou kitu „EndoFree Plasmid Maxi Kit QUIAGEN® “	68
3.2.6.8. Meranie koncentrácie DNA.....	69
3.2.6.9. Agarózová elektroforéza.....	69

4. Výsledky	70
4.1. Izolácia myšieho polyomavírusu.....	70
4.2. Príprava buniek exprimujúcich kaveolín-1 dominantne negatívnu mutantu (cav-1 DN mt).....	72
4.3. Vplyv expresie génu pre kaveolín-1 dominantne negatívnu mutantu na efektivitu infekcie myšieho polyomavírusu.....	75
4.4. Vplyv expresie génu pre Rab11 dominantne negatívnu mutantu (Rab11S25N, Rab11 DN mt) na efektivitu infekcie.....	78
4.5. Vplyv inhibície proteazómu na efektivitu infekcie polyomavírusu.....	82
4.5.1. Vplyv vzrastajúcej koncentrácie reverzibilného proteazomálneho inhibítora MG-132 na efektivitu infekcie mPyV.....	82
4.5.2. Stanovenie cytotoxicity MG-132.....	84
4.5.3. Vplyv multiplicity infekcie na mieru inhibície produktívnej infekcie proteazomálnym inhibítorm.....	84
4.5.4. Vplyv inhibície proteazómu na infekciu mPyV v intervale skorej transkripcie a zahájenia replikácie.....	88
4.6. Možnosť existencie alternatívnej dráhy vstupu mPyV.....	90
5. Diskusia	94
5.1. Izolácia vírusu.....	94
5.2. Účasť kaveolínu-1 pri infekcii.....	94
5.3. Účasť recyklujúcich endozómov pri produktívnej infekcii.....	98
5.4. Spôsob dopravy genómu mPyV do jadra - účasť ubiquitín-proteazomálnej degradačnej dráhy pri infekcii mPyV?.....	99
5.5. Možnosť existencie alternatívnej dráhy vstupu mPyV.....	103
6. Súhrn	105
7. Zoznam citovanej literatúry	106

1. Úvod

Po prichytení viriónov na bunkový receptor musí vírus vstúpiť do hostiteľskej bunky, aby mohla začať jeho replikácia. Množstvo vírusových čeľadí využíva na svoj vstup rovnaké endocytické dráhy ako sú tie, ktorými bunky prijímajú špecifické makromolekuly a pre väčšinu vírusov je endocytóza hlavným mechanizmom vstupu do buniek. To nie je prekvapivé vzhľadom k mnohým výhodám, ktoré endocytóza ponúka. Mnoho vírusov vyžaduje nízke pH endozómov nutné pre konformačné zmeny kapsidy, ktoré potom spúšťajú napr. fúziu, penetráciu alebo odbalenie viriónu. Endozómy takisto ponúkajú pohodlný a rýchly prepravný systém z plazmatickej membrány cez preplnenú cytoplazmu. Navyše, hlavne pre vírusy, ktoré sa replikujú v jadre, predstavujú endozómy spôsob, ako dopraviť virióny do jeho blízkosti (SIECZKARSKI a WHITTAKER, 2002b).

Nedávne výskumy ukazujú, že vírusy využívajú všetky endocytické dráhy bunky. Endocytické dráhy využívané vstupujúcimi vírusmi zahŕňajú klatrínom sprostredkovanú endocytózu, vstup cez kaveoly, makropinocytózu a novú, doteraz ešte nedostatočne charakterizovanú endocytózu nezávislú na klatríne ani na kaveolách. Zdá sa, že mnoho vírusov nevyužíva na svoj vstup len jednu endocytickú dráhu. Napríklad o víruse chrípky sa dlho predpokladalo, že vstupuje do bunky výlučne klatrínom sprostredkovanou endocytózou, nedávno sa však zistilo, že takisto môže využívať endocytickú dráhu nezávislú na klatríne a na kaveolách (SIECZKARSKI a WHITTAKER, 2002a). Podobne, blízky príbuzný mPyV, opičí vírus SV40 je do bunky endocytovaný jednak cez kaveoly, ale využíva aj endocytózu, ktorá je nezávislá na klatríne a na kaveolách.

Ako bolo spomenuté vyššie, vírusy nevyužívajú endocytózu len na vstup do bunky, ale endozómy tiež slúžia ako rýchly prepravný systém do blízkosti jadra pre tie vírusy, ktoré sa tu replikujú. Replikácia v jadre poskytuje vírusom mnoho výhod, ako napr. prístup k bunkovému replikačnému a transkripčnému aparátu. Na druhej strane však jadrový obal predstavuje pre vstupujúci vírus významnú bariéru. Spôsob dopravy viriónu, resp. genetickej informácie vírusu do jadra sa u rôznych vírusov odlišuje. Napr. kapsidy vírusu chrípky a adenovírusov sú pred transportom DNA do jadra rozvoľnené, zatiaľ čo onkogénne retrovírusy musia čakať na mitózu bunky, pretože nemôžu vstupovať do jadra v interfáze (WHITTAKER *et al.*, 2000).

Dlhodobým výskumným cieľom v našom laboratóriu je štúdium životného cyklu mPyV. Aj keď bol mPyV objavený už v roku 1953 (GROSS 1953) a v súčasnosti je o jeho životnom cykle mnohé známe, nad udalosťami zahŕňajúcimi vstup vírusu do bunky, jeho putovanie k jadru, miesto a spôsob rozvoľnenia viriónu, visí stále ešte mnoho otáznikov. Súčasťou výskumu v našom laboratóriu je aj poznávanie mechanizmov vstupu viriónov mPyV do hostiteľskej bunky, interakcie viriónov s bunkovými štruktúrami a spôsob dopravy genómu mPyV do jadra bunky. Endocytická dráha, ktorá je zneužívaná mPyV nie je celkom preskúmaná. Zistilo sa, že mPyV vstupuje do bunky buď endocytózou sprostredkovanou kaveolami, alebo novou, doteraz málo preskúmanou dráhou nezávislou na kaveolách a na klatrínom sprostredkovanej endocytóze. Po internalizácii fúzuje monopinocytický váčok nesúci mPyV so skorými endozómami. V neskorších časoch po internalizácii bol pomocou konfokálnej mikroskopie pozorovaný mPyV v recyklujúcich endozómoch a endoplazmatickom retikule, avšak to, či sú recyklujúce endozómy nutné pre infekciu mPyV zostáva stále otázkou. Miesto rozvoľnenia viriónu a spôsob dopravy genómu PyV do jadra nie sú zatiaľ dostatočne objasnené. Aj napriek vysokej multiplicitate infekcie (100 a viac pfu/bunku) iba malá časť viriónov doručí svoj genóm do jadra hostiteľskej bunky. Väčšina vírusovej DNA sa spolu s kapsidovým proteínom VP1 sťahuje z perinukleárnej oblasti naspäť do cytosolu, kde je pravdepodobne degradovaná (MANNOVÁ a FORSTOVÁ 2003). Predpokladá sa, že „úspešné“ virióny by mohli vstupovať do bunky alternatívnou cestou.

Preto ciele mojej diplomovej práce boli:

- 1. Zistiť, aký vplyv má expresia génu pre dominantne-negatívnu mutantu kaveolínu-1 na infektivitu mPyV.**
- 2. Pomocou tranzientnej expresie génu pre dominantne-negatívnu mutantu Rab11 zistiť, či sa recyklujúce endozómy zúčastňujú na produktívnej infekcii mPyV.**
- 3. Zistiť, ako ovplyvňuje ubiquitinylácia a ubiquitín – proteazomálny systém transport PyV z povrchu bunky do jadra. Prispieť k poznaniu, či mPyV využíva**

zložky tohoto degradačného systému pri svojom vstupe, alebo či tu ubiquitín – proteazomálny systém funguje jednoducho ako obrana bunky.

4. Zistiť, či sa malá subpopulácia viriónov môže dostávať k jadrovej membráne alternatívnou cestou, rýchlejšie ako väčšina viriónov.

2. Literárny prehľad

2.1. Charakteristika myšieho polyomavírusu

Myší polyomavírus (mPyV) je malý neobalený ds DNA vírus. Jeho genómom je jedna dvojreťazcová molekula kovalentne uzatvorenej DNA, ktorá sa v kapside nachádza v komplexe s bunkovými histónmi H2A, H2B, H3 a H4. Kapsida má veľkosť 45 nm, ikosahedrálnu symetriu ($T = 7$) a je zložená zo 72 pentamérov majoritného kapsidového proteínu VP1. S každým pentamérom je asociovaná jedna molekula minoritného kapsidového proteínu VP2 alebo VP3.

2.1.1. Organizácia genómu mPyV

Genóm mPyV je veľký 5 297 bp a je rozdelený na skorú a neskorú oblasť. Skorá oblasť genómu kóduje tri vírusové regulačné proteíny – T (tumor) antigény: veľký T – antigén (LT, large), stredný T – antigén (MT, middle) a malý T – antigén (ST, small). Transkripcia a translácia skorej oblasti genómu začína po vstupe vírusu do jadra a pokračuje aj po zahájení replikácie DNA. Neskorá oblasť genómu kóduje kapsidové proteíny VP1, VP2 a VP3 a je výrazne transkribovaná až po zahájení replikácie genómu. Genóm polyomavírusu obsahuje jediný začiatok DNA replikácie, ktorý spolu s príslušnými promótorami a enhancerami transkripcie tvoria regulačnú netranslatovanú oblasť. Transkripcia je zahájená obojsmerne z iniciačných miest blízko ORI a mRNA sú prepisované z opačných reťazcov genómu.

2.1.2. Produktívna infekcia mPyV

Po prichytení vírusu na špecifický receptor penetruje virión do bunky a migruje do jadra, kde je genóm mPyV replikovaný a transkribovaný. Tu dochádza k transkripcii a expresii

T antigénov, ktoré pripravujú bunku pre replikáciu vírusovej DNA stimuláciou produkcie replikačných enzýmov. Syntéza LT začína 6 - 8h po infekcii a syntéza MT a ST 16 - 18h po infekcii (CHEN a FLUCK 2001). Produktívna infekcia pokračuje replikáciou vírusovej DNA, expresiou štruktúrnych proteínov, morfogenezou nových vírusových častíc a uvoľnením vírusového potomstva. Replikačný cyklus končí smrťou bunky.

2.1.3. Najvýznamnejší zástupcovia čeľade *Polyomaviridae*

Medzi najviac študované a najlepšie charakterizované polyomavírusy patria okrem mPyV dva ľudské polyomavírusy – JC vírus a BK vírus a jeden opičí – SV40 (simian vacuolating virus).

2.2.1. Vstup polyomavírusov do bunky

Vírusy vyvinuli mnoho stratégií, ako vstúpiť do bunky a úspešne sa replikovať, začínajúc väzbou na bunkový povrch, penetráciou do bunky, odbalením genómu a zahájením replikácie. Väzba polyomavírusov na povrch hostiteľskej bunky je sprostredkovaná väzbou na receptor, následne je virión endocytovaný a genetická informácia je dopravená do jadra.

2.2.1.1. Receptory polyomavírusov

Za interakciu medzi viriónom a bunkovým receptorom je zodpovedný majoritný kapsidový proteín VP1. V otázke receptoru, zodpovedného za vstup jednotlivých polyomavírusov do bunky, je ešte mnoho nejasností. Niektoré práce popisujú ako receptor špecifický povrchový proteín, iní autori zase identifikovali gangliozid ako receptor zodpovedný za vstup vírusu. Prítomnosť sialovej kyseliny na receptore sa však

ukázala byť nevyhnutnou pre produktívnu infekciu JCV, BKV a mPyV. Vzhľadom k tomu, že polyomavírusy sú schopné interagovať s mnohými molekulami na bunkovom povrchu, je možné, že na svoj vstup do buniek rôzneho typu využívajú rôzne receptory a koreceptory. V tabuľke č. 2.1. je uvedený prehľad povrchových molekúl, ktoré boli identifikované ako molekuly podieľajúce sa na vstupe vybraných druhov polyomavírusov do bunky.

vírus	sialová kyselina	proteínová zložka	gangliozid
JCV	koncová α 2-6 – spojená sialová kyselina	5-HT _{2A} R	GT1b
BKV	koncová α 2-6 – spojená sialová kyselina	neznáma	gangliosidy typu II
SV40	nie je nutná	MHC gp I	GM1
mPyV	α 2-3 – spojená sialová kyselina α 2-6 – spojená sialová kyselina	α 4 β 1 integrín	GD1a, GT1b

Tab. č. 2.1.: Bunkové povrchové molekuly využívané pri vstupe vírusu do bunky (upravené podľa GEE *et al.* 2006).

JC vírus (JCV)

Ako štruktúra priamo zodpovedná za vstup JCV do bunky bola identifikovaná α (2,6)-sialová kyselina (SA, NeuNAc, N-acetylneuraminic acid). Hemaglutinácia, väzba vírusu na povrch buniek a infekcia ľudských gliových buniek bola inhibovaná enzymatickým odstránením oboch α (2,3)- a α (2,6)-sialových kyselín, zatiaľ čo α (2,3) – špecifická neuraminidáza nemala na tieto deje žiadny efekt (LIU *et al.* 1998). Distribúcia α (2,6)-sialovej kyseliny koreluje so známym tropizmom infekcie JCV (oligodendrocyty, astrocyty, B – lymfocyty, obličkové bunky a pľúcny parenchým) a zdôrazňuje významnú úlohu tohto typu sialovej kyseliny pri interakcii JCV s hostiteľom (EASH *et al.* 2004).

LIU *et al.* (1998) popísali, že ako receptor pre vstup JCV by mohli slúžiť N-glykoproteíny obsahujúce koncovú α (2,6)-sialovú kyselinu. Neskôr bol v tom istom laboratóriu ako receptor identifikovaný serotonínový receptor 5HT_{2A}R. V prípade, že

tieto bunky boli vystavené účinku inhibítorov, ktoré pôsobia ako antagonisti serotonínového receptora 5HT_{2A}R, infekcia gliových buniek bola inhibovaná. Infekcii gliových buniek podobne zabraňujú aj protilátky proti tomuto receptoru. Navrhovaný model vstupu JCV do bunky predpokladá najprv interakciu JCV s glykoproteínom obsahujúcim $\alpha(2,6)$ - sialovú kyselinu a potom interakciu s 5HT_{2A}R receptorom, ktorá vedie k efektívnej a rýchlej internalizácii vírusu (ELPHICK *et al.* 2004).

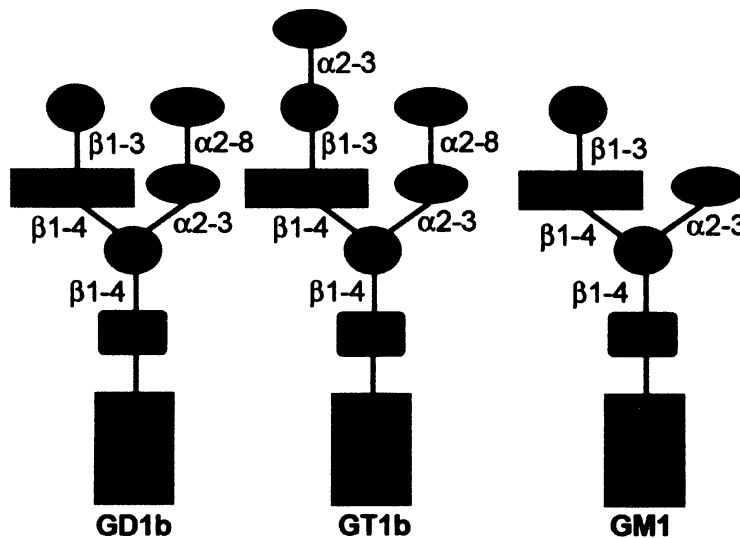
Na druhej strane však KOMAGOME *et al.* (2002) použitím JCV VLPs („virus – like particles“) zistili, že VLPs sú schopné viazať sa nielen na N-glykoproteíny, ale aj na gangliozidy GM3, GD2, GD3, GD1a, GD1b, GT1b, GQ1b a GalCer. Aj v tomto prípade je za väzbu viriónu zodpovedná sialová kyselina. V prípade, že bol pred infekciou k vírusu JCV pridaný gangliozid GT1b, bola pozorovaná inhibícia infekcie. Gangliozidy by mohli preto tiež slúžiť ako receptory pre vstup JCV do buniek.

BK vírus (BKV)

BKV, podobne ako JCV, rozpoznáva na povrchu hostiteľskej bunky kyselinu sialovú (SEGANTI *et al.* 1981, SINIBALDI *et al.* 1987, 1990) a viaže sa na ňu prostredníctvom majoritného kapsidového proteínu VP1 (TOUZE *et al.* 2001, HALE *et al.* 2002).

Aj v prípade identifikácie receptora BKV zostáva veľa nejasností. Na jednej strane sa zdá, že určitú úlohu pri vstupe BKV by mohli mať gangliozidy. LOW *et al.* (2006) zistili, že BKV interaguje s gangliozidmi GD1b a GT1b (Obr. č. 2.1.). Tieto gangliozidy obsahujú spoločný motív dvoch sialových kyselín spojených navzájom $\alpha(2,8)$ väzbou, čo sa zdá byť dôležitou podmienkou väzby viriónu. Pridanie GD1b a GT1b k bunkovej línii pôvodne necitlivej k BKV umožnilo vírusu vstupovať do buniek, čo sa prejavilo expresiou TAg.

Iná práca popisuje, že BKV rozpoznáva na povrchu bunky N-glykoproteíny obsahujúce $\alpha(2,3)$ – sialovú kyselinu, zatiaľ čo glykoproteíny s naviazanou $\alpha(2,6)$ – sialovou kyselinou, O-glykoproteíny alebo glykolipidy nie. N-glykoproteíny sa ukázali byť dostatočnými receptormi na sprostredkovanie infekcie, ale experimenty nevyklúčujú ani úlohu gangliozidov pri infekcii BKV (DUGAN *et al.* 2005).



Obr. č. 2.1.: Štruktúra gangliozidov GD1b, GT1b a GM1.

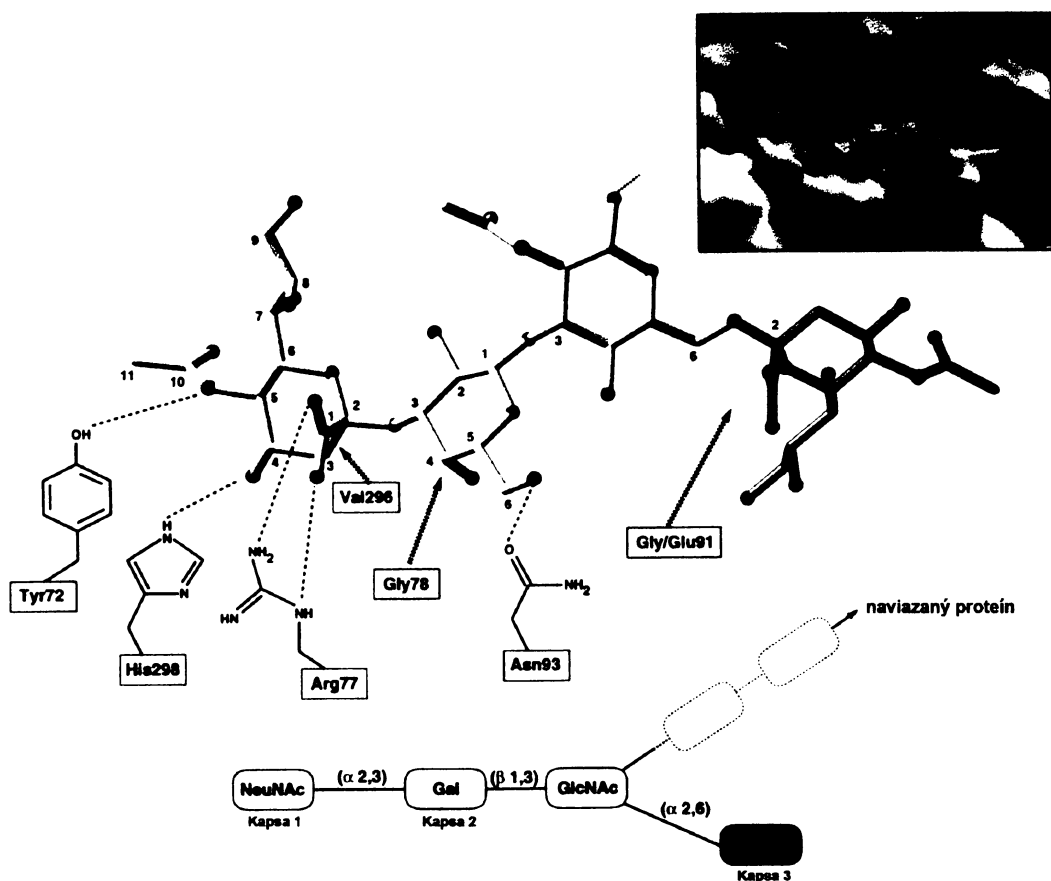
Gangliozidy sú glykolipidy, ktoré obsahujú hydrofóbny ceramid a hydrofilnú karbohydrátovú skupinu. Cer - ceramid, Glc - glukóza, Gal - galaktóza, SA - sialová kyselina, GalNAc - N-acetylgalaktozamín (LOW *et al.* 2006).

Simian Vacuolating virus (SV40)

Vírus SV40 sa na povrchu hostiteľskej bunky viaže na molekuly MHC gp I (BREAU *et al.* 1992) a protilátky proti tomuto komplexu blokujú jeho infekciu (ATWOOD a NORKIN 1989). Hoci MHC gp I molekuly sprostredkovávajú väzbu SV40 na plazmatickú membránu, zdá sa, že sa nepodieľajú na internalizácii SV40, pretože nie sú spolu s vírusom endocytované. Tieto výsledky poukazujú na možnosť existencie koreceptoru, ktorý je za vstup SV40 zodpovedný (ANDERSON *et al.* 1998). Iná práca ukázala, že aj v prípade SV40 existuje gangliozid vystupujúci ako funkčný receptor – a to konkrétne GM1 (Obr. č. 2.1.) (TSAI *et al.* 2003).

Myší polyomavírus (mPyV)

Aj v prípade myšieho PyV je nutnou zložkou receptora sialová kyselina, ktorá sa nachádza naviazaná na povrchu bunkových glykoproteínov a glykolipidov. Všetky polyomavírusové kmene rozpoznávajú sialové kyseliny typu NeuNAc - (α 2,3) - Gal - (β 1,3) - GalNAc, niektoré kmene rozpoznávajú ešte aj rozvetvené disialylové štruktúry obsahujúce α (2,3) - a α (2,6) - sialové kyseliny. Ani jeden z polyomavírusových kmeňov nerozpoznáva priamy reťazec s koncovou α (2,6) naviazanou sialovou kyselinou (FRIED *et al.* 1981, CAHAN *et al.* 1983).



Obr. č. 2.2.: Interakcia medzi VP1 a receptorom, zakončeným kyselinou sialovou.

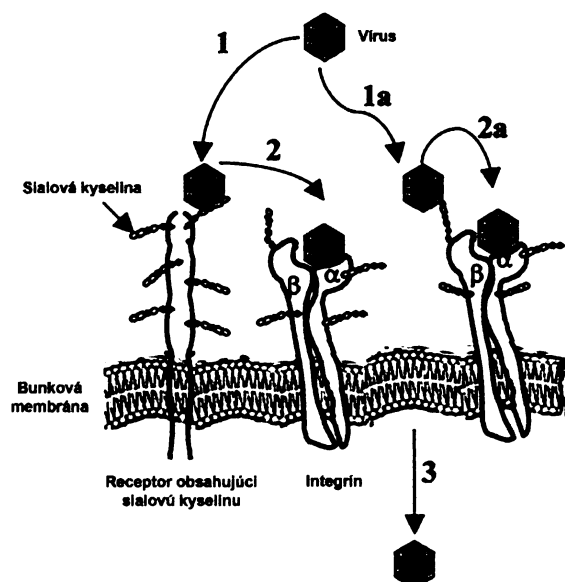
Oligosacharidový receptor je zobrazený ako „ball-and-stick“ model, priamy α (2,3) - reťazec je vyznačený svetlejším odtieňom, vetvený α (2,6) reťazec tmavším odtieňom. Prerušované čiary znázorňujú vodíkové mostíky medzi VP1 a receptorom, šípky znázorňujú hydrofóbne väzby. Malý obrázok znázorňuje povrch pentaméru v komplexe s vetveným oligosacharidom. NeuNAc - sialová kyselina, Gal - galaktóza, GlcNAc - N-acetylgalaktózamín (BAUER *et al.* 1999).

Receptor je špecificky rozpoznávaný majoritným kapsidovým proteínom VP1, konkrétne sa sialová kyselina viaže do plytkej ryhy tvorenej niekoľkými slučkami na vonkajšom okraji VP1 (Obr. č. 2.2.) (STEHLE *et al.* 1994, STEHLE a HARRISON 1996). Malé zmeny v aminokyselinových zvyškoch VP1, ktoré sa nachádzajú vnútri väzobnej kapsy, výrazne ovplyvňujú schopnosť väzby rôznych typov sialových kyselín (STEHLE a HARRISON 1996, 1997), čo má silný efekt na patogenitu vírusu (FREUND *et al.* 1991).

Hoci je známe, že sialová kyselina je nevyhnutná pre vstup mPyV, o tom, či je naviazaná na povrchu proteínu alebo lipidu, sa stále vedú diskusie.

Po väzbe viriónu na bunkový povrch dochádza k zvýšeniu hladiny intracelulárnej *c-myc* a *c-fos* mRNA. Táto skutočnosť privádza autorov k hypotéze, že vírusový receptor by mohol mať niektoré vlastnosti charakteristické pre receptory rastových faktorov (ZULLO *et al.* 1987).

Kapsidové proteíny VP1 a VP2 obsahujú vo svojej sekvencii niekoľko motívov charakteristických pre ligandy integrínov. Bolo popísané, že integrín $\alpha 4\beta 1$ sa ako jediný z nich zúčastňuje na infekcii mPyV (CARUSO *et al.* 2003a) a pravdepodobne funguje ako koreceptor (Obr. č. 2.3., CARUSO *et al.* 2003b).

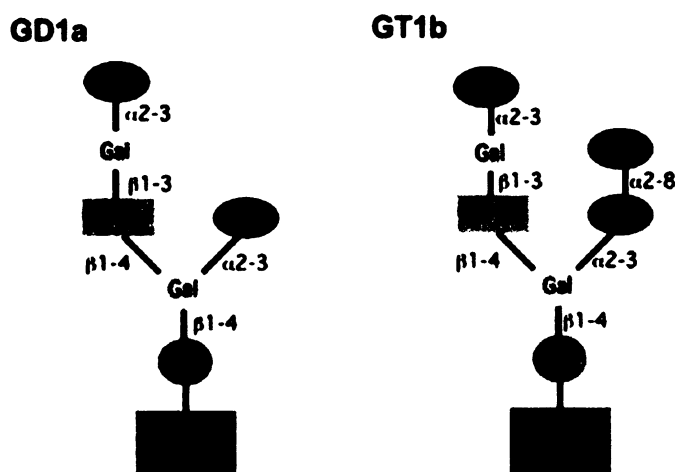


Obr. č. 2.3.: Navrhovaný model interakcie mPyV s hosťiteľskou bunkou.

Keďže integrín $\alpha 4\beta 1$ sám môže byť sialylovaný, pri infekcii by mohol mať dvojitú funkciu (CARUSO *et al.* 2003b).

Úloha glykoproteínov pri vstupe mPyV nie je celkom jasná. Pôsobenie proteázy na plazmatickú membránu nemalo vplyv na väzbu a vstup mPyV do buniek (prípadne mPyV VLPs) (SMITH *et al.* 2003, TSAI *et al.* 2003), na druhej strane však použitie špecifických inhibítorov N-glykosylácie znížilo infektivitu až o 90% (CHEN a BENJAMIN 1997).

Nedávno boli ako funkčné receptory mPyV identifikované gangliozidy GD1a a GT1b (Obr. č. 2.4., TSAI *et al.* 2003). Sialové kyseliny, na povrchu buniek neschopných syntézy príslušných gangliozidov, a preto rezistentných k infekcii, vírus viažu, ale neumožňujú jeho produktívny vstup. Pridanie gangliozidov GD1a a GT1b k týmto bunkám nemá vplyv na celkové množstvo naviazaného vírusu, napriek tomu ale obnovuje infektivitu (GILBERT a BENJAMIN 2005, GILBERT *et al.* 2005).



Obr. č. 2.4.: Štruktúra gangliozidov GD1a a GT1b.

Glc - glukóza, Gal - galaktóza, SA - sialová kyselina, GalNAc - N-acetylgalaktózamín (TSAI *et al.* 2003).

2.2.1.2. Od cytoplazmatickej membrány k jadru

JC vírus

JCV, po prichytení sa na bunkový receptor, vstupuje do bunky klatrínom sprostredkovanou endocytózou (PHO *et al.* 2000). Väzba JCV na gliové bunky indukuje signál, ktorý je nutný pre vstup vírusu. Tento signál spúšťa fosforyláciu alebo aktiváciu MAP kináz ERK1 a ERK2. Na vstupe sa takisto podieľa proteín eps15 (Epidermal growth factor receptor pathway substrate 15, zložka endocytickej dráhy sprostredkovanej klatrínom) (QUERBES *et al.* 2004). Po vstupe do endozómov je vírus vystavený kyslému prostrediu, ktoré spôsobuje konformačné zmeny vírusových proteínov a rozvoľňovanie viriónu (MELLMAN *et al.* 1986). Zabránenie acidifikácie endozómov má za následok pokles infekivity JCV (ASHOK a ATWOOD 2003). Po tom, čo je JCV dopravený do vnútra bunky, využíva cytoskeletálnu sieť mikrotubulov, mikrofilamentov a intermediálnych filamentov pri transporte do jadra (ASHOK a ATWOOD 2003). JCV VLPs sú transportované do jadra cez komplex jadrových pórov. Na N – konci kapsidového proteínu VP1 sa nachádza jadrový lokalizačný signál (NLS), ktorý je exponovaný na povrchu vírusových častíc skladajúcich sa výlučne z VP1 proteínu. Na tento jadrový lokalizačný signál sa viažu bunkové importíny α a β a tento komplex je celý transportovaný do jadra (QU *et al.* 2004).

BK vírus

BKV vstupuje do buniek endocytózou, ktorá je sprostredkovaná kaveolami. Infekcia BKV je citlivá k zvýšeniu pH v intracelulárnych kyslých bunkových kompartmentoch (EASH *et al.* 2004). Počas skorej fázy infekcie vyžaduje vírus prítomnosť intaktnej siete mikrotubulov, ale jeho infekivita nie je závislá na aktínovom cytoskelete (EASH a ATWOOD 2005). Predtým, než sa BKV dostane do jadra, prechádza cez endoplazmatické retikulum (LOW *et al.* 2006).

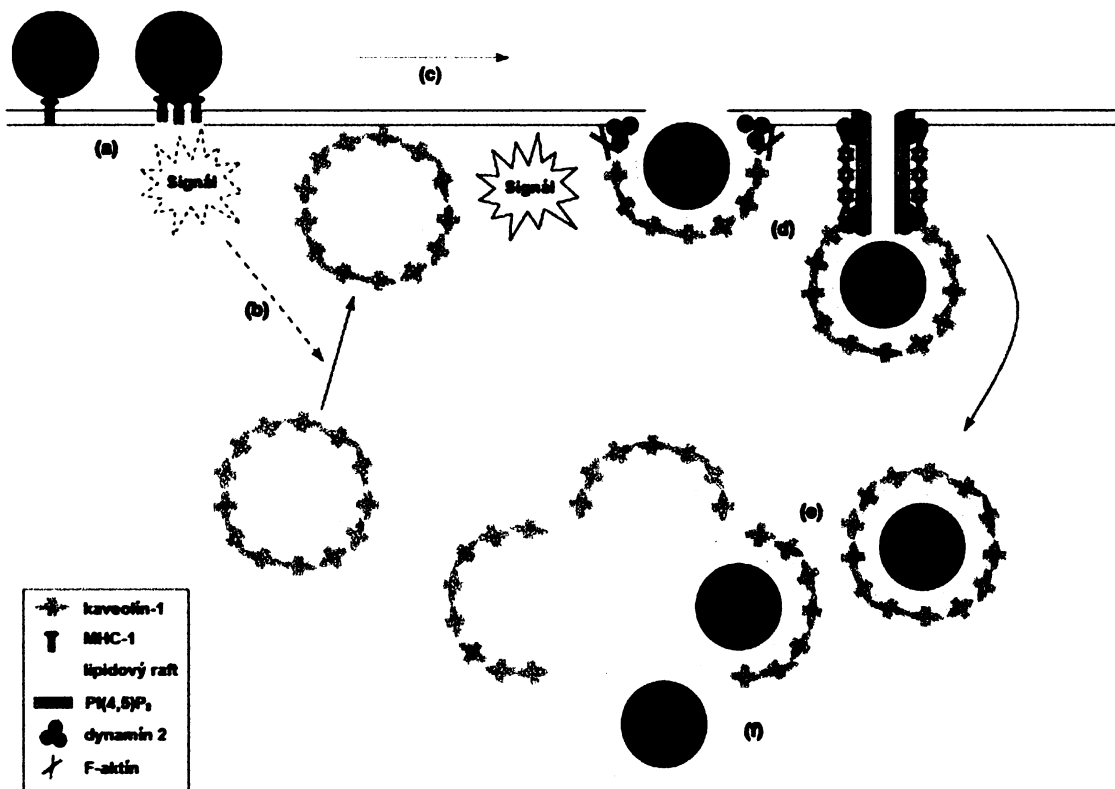
Pôsobenie genisteínu na bunky výrazne inhibuje infekciu, čo naznačuje potrebu tyrozín fosforylačného signálu. To, či k tomuto signálu dôjde pri väzbe vírusu alebo pri tvrobe kaveol zostáva otázkou (PETROGIANNIS-HALLOTIS *et al.* 2001).

SV40

SV40 bol prvý vírus, u ktorého sa dokázalo, že do bunky vstupuje kaveolami (Obr. č. 2.5.) (ANDERSON *et al.* 1996, STANG *et al.* 1997). Kaveoly sú malé invaginácie plazmatickej membrány fľaškovitého tvaru (ANDERSON 1993) obsahujúce charakteristický transmembránový proteín kaveolín (ROTHBERG *et al.* 1990). Kaveolín viaže cholesterol (MURATA *et al.* 1995) a táto väzba v membránových mikrodoménach bohatých na glykosfingolipidy je dôležitá pre tvorbu a funkciu kaveol (PARTON a SIMONS 1995).

Potom, ako sa SV40 naviaže na receptor, pohybuje sa laterálne pozdĺž plazmatickej membrány, pokiaľ nie je zachytený v stacionárnej kaveole (PELKMANS *et al.* 2001). SV40 sám indukuje internalizáciu do kaveol tým, že aktivuje tyrozínové kinázy, ktoré fosforylujú proteíny v kaveole (PELKMANS *et al.* 2002). Internalizácia SV40 je inhibovaná tyrozín – kinázovým inhibítorom genisteínom, ktorý spôsobuje, že SV40 sa zastavuje v „ústach“ kaveoly (DANGORIA *et al.* 1996, CHEN a NORKIN 1999). Súčasne dochádza k rozpadu aktínových vlákien a aktín je smerovaný k ešte neinternalizovaným kaveolám obsahujúcim vírus, kde polymerizuje za vzniku aktínových „chvostov“, vybiehajúcich z kaveol. Nutná je tiež dočasná prítomnosť dynamínu II a lokálna produkcia fosfatidylinositol 4,5 – bisfosfátu (PELKMANS *et al.* 2002). Vírusová infekcia je takisto závislá na prítomnosti cholesterolu. V prítomnosti inhibítorov, ktoré odčerpávajú cholesterol je inhibovaná jednak tvorba kaveol a takisto aj infekčivita SV40 (ANDERSON *et al.* 1996).

Kaveolínový váčok obsahujúci vírus sa potom odškrtí od membrány a putuje hlbšie do cytoplazmy, kde pravdepodobne membránovou fúziou splynie s kaveozómom. Kaveozóm je membránová cytoplazmatická organela s neutrálnym pH, bohatá na kaveolín-1, odlišná od kompartmentov klasickej endocytickej a sekrečnej dráhy. Po niekoľkých hodinách od vstupu SV40 do kaveozómu sa kaveozómy stávajú dynamickejšie a začínajú sa vytvárať tubulárne štruktúry obsahujúce vírus, avšak už bez kaveolínu. Po oddelení od kaveozómu cestujú tieto váčky pozdĺž mikrotubulov do hladkého endoplazmatického retikula (ER), kde sa vírus hromadí (PELKMANS *et al.* 2001). V ER bolo pozorované aj čiastočné rozvolňenie kapsidy (NORKIN *et al.* 2002).



Obr. č. 2.5.: Kaveolami sprostredkovaná endocytóza SV40.

a) Po mnohonásobnej väzbe SV40 na receptor sa vírus pohybuje do lipidových raftov, kde dochádza k indukcii signálu. b) Tento predpokladaný signál spôsobí obohatenie membrány o kaveolín – 1 pozitívne väčky, v ktorých je SV40 zachytený. c) Aktivácia tyrozínovej kinázy spôsobuje depolymerizáciu kortikálneho aktínu a vznik aktínových „chvostov“. d) Internalizácia kaveoly je spôsobená lokálnou produkciou fosfatidylinositol 4,5-bisfosfátu, vznikom aktínových koncov a nahromadením dynamínu 2. e) V cytosole fúzuje kaveola s kaveozómom. f) SV40 je triedený do váčkov zbavených kaveolínu-1, ktoré cestujú do hladkého ER (PELKMANŠ a HELENIUS 2003).

Obzvlášť pozoruhodným znakom vstupu SV40 je fakt, že vírus obchádza lyzozómy a Golgiho aparát (PELKMANŠ *et al.* 2001, NORKIN a KUKSIN 2005).

Ukázalo sa, že SV40 je transportovaný do ER cez intermediárny kompartment obsahujúci β -COP proteín. β -COP je komponenta COPI obalených váčkov, ktoré sprostredkovávajú retrográdny transport z Golgiho aparátu (GA) do ER (NORKIN *et al.* 2002). Transport SV40 a infekcia je takisto inhibovaná brefeldínom A (inhibuje ARF1 GTPázu, ktorá reguluje vznik COPI obalených váčkov na cisternách GA), dominantne negatívnou mutantou Arf1 a protilátkou proti β -COP (NORKIN *et al.* 2002, RICHARDS *et al.* 2002). Navyše β -COP kolokalizuje s intracelulárnym kaveolínom-1,

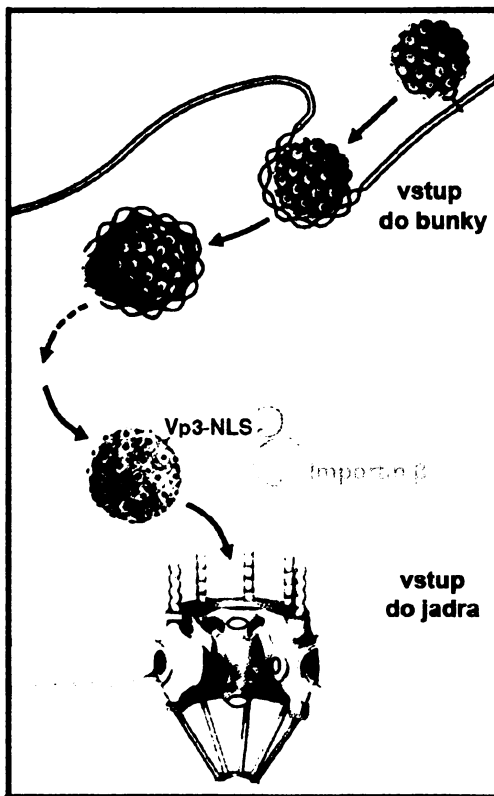
čo podľa autorov podporuje hypotézu, že tento β -COP obsahujúci kompartment by mohol byť kaveozóm (NORKIN *et al.* 2002).

Na druhej strane však PELKMANS *et al.* (2001) tvrdia, že transport z kaveozómu do ER je sprostredkovaný COPI obalenými váčkami.

Posledné výskumy poukazujú na existenciu alternatívnej cesty nezávislej na kaveolíne-1. Internalizácia viriónov je na rozdiel od dráhy sprostredkovanej kaveolami rýchla, závislá na aktivácii tyrozínových kináz a prítomnosti cholesterolu, ale nezávislá na klatríne, dynamíne II a ARF6. Vírus je internalizovaný v malých váčkoch a transportovaný do membránových štruktúr s neutrálnym pH, podobných kaveozómom, ktoré však neobsahujú kaveolín-1. Vírus je potom smerovaný do ER za účasti mikrotubulov. Aj v tomto prípade vírus obchádza klasické endocytické organely (DAMM *et al.* 2005).

Presný mechanizmus, ako sa genóm SV40 dostáva do jadra, nie je známy. Elektrónovou mikroskopiou boli virióny detekované v perinukleárnom priestore dvojitej jadrovej membrány a takisto v jadre (tu boli pozorované virióny obalené membránou), pravdepodobne v dôsledku fúzie fosfolipidových membrán (MAUL *et al.* 1978, KARTENBECK *et al.* 1989). Druhou možnosťou, ako by sa SV40 mohol dostávať do jadra, je vstup cez komplex jadrových pórov (NPC, nuclear pore complex). Po mikroinjekcii viriónov do buniek spolu s protilátkami proti nukleoporínu, alebo s WGA (wheat – germ agglutinin, viaže sa na nukleoporín) došlo k úplnému zablokovaniu akumulácie vírusových proteínov v nukleoplazme a takisto bola inhibovaná expresia LT. Navyše vírusové častice a VP1 boli pomocou elektrónovej mikroskopie a imuno-EM viditeľné okolo NPC (CLEVER *et al.* 1991, YAMADA a KASAMATSU 1993).

Takisto otázka, či SV40 vstupuje do jadra vo forme intaktných viriónov zostáva stále nezodpovedaná a je predmetom intenzívneho štúdia. Virióny SV40 sú veľké cca 50nm a veľkosť jadrového póru je odhadovaná na maximálne 28 nm (PANTÉ a AEBI 1994), takže pri prechode pórom by muselo dôjsť ku konformačnej zmene. Kapsidové proteíny obsahujú NLS, ktorý je vo virióne orientovaný do vnútra kapsidy (obr. č. 2.6.) (LIDDINGTON *et al.* 1991). Konformačná zmena by mohla tento NLS odkryť (GREBER a KASAMATSU 1996).



Obr. č. 2.6.: Hypotéza vstupu SV40 do jadra cez NPC. V cytoplazme dochádza k štruktúrnym zmenám viriónu SV40, ktoré spôsobia vystavenie jadrového lokalizačného signálu proteínu VP3. Ten je rozpoznávaný importínom α a importínom β , ktoré transportujú VP3 s vírusovou DNA cez NPC do jadra (upravené podľa LI *et al.* 2003).

Jednou z hypotéz je, že štruktúrne proteíny SV40 (najmä VP3) hrajú dôležitú úlohu pri vstupe vírusového genómu cez NPC do jadra, pravdepodobne zostávajú asociované s vírusovou DNA. Nielen protilátky proti VP1 ale aj protilátky proti VP3 prítomné v cytoplazme počas infekcie kvantitatívne inhibovali expresiu LT antigénu, ako aj protilátka proti VP3 injikovaná do jadra. Takisto sa ukázalo, že nahá DNA alebo DNA v komplexe s histónmi nevstupuje efektívne do jadra bunky (NAKNANISHI *et al.* 1996). Na jadrový lokalizačný signál VP3 sa viažu importíny α a β , ktoré by mohli transportovať VP3 spolu s vírusovou DNA do jadra (NAKNANISHI *et al.* 2002).

mPyV

V otázke vstupu myšieho polyomavírusu do buniek zostáva takisto stále veľa nezodpovedaných otázok. Polyomavírus je internalizovaný do bunky v hladkých monopinocytických váčkoch (GRIFFITH a CONSIGLI 1984), ktoré fúzujú s periférnymi endozómami často obsahujúcimi caveolín-1. Po naviazaní vírusu na

povrch bunky dochádza k akumulácii kaveolínu v tých častiach membrány, kde vírus vstupuje do bunky a VP1 je kaveolínom sprevádzaný na svojej ceste do jadra. Metyl- β -cyklodextrín (M β CD) je látka, ktorá vyvážuje cholesterol z membrán a tým rozrušuje lipidové rafty a interferuje s internalizáciou závislou na kaveolách. Jej prítomnosť v médiu inhibuje PyV infekciu myších fibroblastov 3T6 a epiteliálnych buniek NMuMG. To naznačuje dôležitosť prítomnosti cholesterolu počas endocytózy mPyV a podporuje hypotézu vstupu mPyV cez lipidové rafty bohaté na cholesterol (RICHTEROVÁ *et al.* 2001). Tieto pozorovania sú totožné aj v prípade infekcie krysích buniek C6 obohatených o GD1a (tieto bunky ho normálne neexprimujú) (GILBERT a BENJAMIN 2004). Iné štúdie, ktoré využívajú odlišné bunkové línie (BMK – baby mouse kidney cells a NIH 3T3 – myšie fibroblasty) prišli k záveru, že vstup PyV je na kaveolách nezávislý (GILBERT a BENJAMIN 2000, GILBERT *et al.* 2003). Tieto kontroverzné výsledky sú pravdepodobne zapríčinené odlišnými kmeňmi mPyV a bunkovými líniami použitými v experimentoch.

Nedávne pozorovania ukazujú, že mPyV, podobne ako SV40, môže vstupovať do bunky aj inou, alternatívnou dráhou, ktorá je nezávislá na kaveolíne a na klatrínom sprostredkovanej endocytóze. mPyV vstupuje do buniek línie Jurkat (neexprimujú kaveolín) monopinocytickými váčkami, ktoré sú morfológicky podobné kaveolám (LIEBL *et al.* 2006).

Po internalizácii fúzuje monopinocytický váčok nesúci mPyV so skorými endozómami (pozitívnymi na prítomnosť EEA1), ktoré patria medzi kompartmenty klasickej klatrínovej dráhy. Infekcia je, podobne ako u BK vírusu, závislá na kyslom prostredí endozómov, ako ukázali pokusy s inhibítormi NH₄Cl (zvyšuje pH) a bafilomicínom A (zabraňuje okysleniu endozómov) na bunkových línách 3T6 a NMuMG. Kyslé prostredie v endozómoch by mohlo spúšťať konformačné zmeny v kapside nasledované jej čiastočným rozvoľnením. V prípade, že dochádza k zabráneniu okysleniu endozómov, vírus je stále schopný vstupovať do skorých endozómov, ale dochádza tu k jeho zadržaniu (LIEBL *et al.* 2006). Na druhej strane však podľa GILBERTOVEJ a BENJAMINA (2000) mPyV nevyžaduje prítomnosť kyslých kompartmentov a zvýšenie pH v endozómoch nemá žiadny vplyv na infekciu (použité bunkové línie: BMK a NIH 3T3).

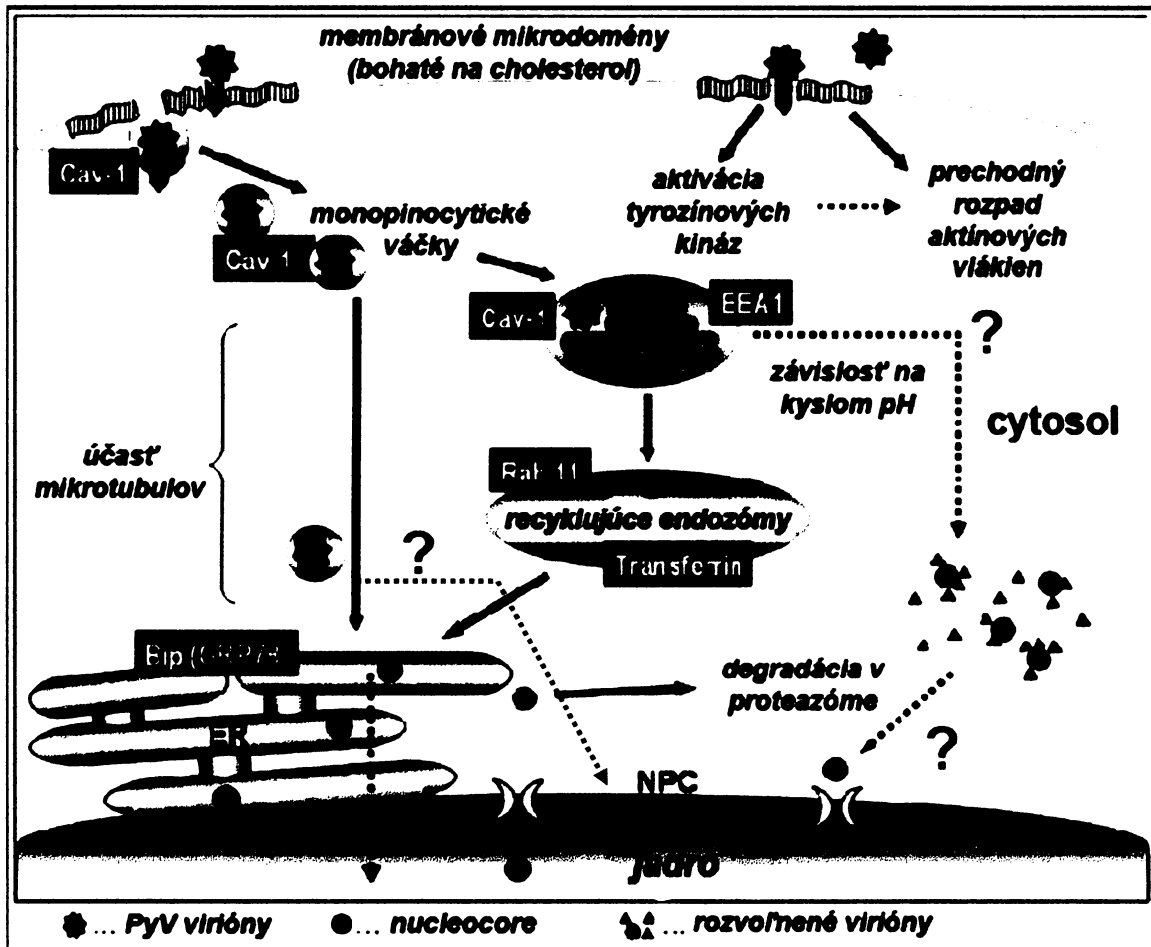
Neskôr po infekcii vstupuje mPyV do recyklujúcich endozómov (MANNOVÁ a FORSTOVÁ 2003, LIEBL *et al.* 2006) a zhruba 3 h po infekcii bol vírus pozorovaný v ER. Spôsob, akým sa mPyV dostáva z recyklujúcich endozómov do ER zostáva zatiaľ neznámy. Na rozdiel od SV40, mPyV infekcia nie je inhibovaná brefeldínom A a mPyV iba veľmi vzácné kolokalizuje s β -COP proteínom COPI obalených váčkov. Navyše, nikdy nebola pozorovaná interakcia mPyV s Golgiho aparátom, preto sa zdá, že tento kompartment vstupujúci vírus obchádza. Vylúčený bol aj vstup cez neskoré endozómy a lyzozómy (MANNOVÁ a FORSTOVÁ 2003).

Na mPyV infekcii sa zúčastňuje aj cytoskelet bunky. Zdá sa, že podobne ako u SV40, hrá aktín úlohu v skorej fáze infekcie, zatiaľ čo mikrotubuly sa zúčastňujú neskorších fáz vstupu mPyV. Po internalizácii sa váčky obsahujúce virión pohybujú pozdĺž mikrofilamentov, dochádza k prechodnému rozpadu aktínových vlákien a zdá sa, že mikrofilamenty vedú VP1 do blízkosti ER. Aktínová sieť sa obnoví, keď sa väčšina signálu VP1 objaví v blízkosti jadra (RICHTEROVÁ *et al.* 2001). Pokusy s rôznymi typmi cytoskeletálnych inhibítorov ukázali, že prechodné rozrušenie aktínových filamentov zvyšuje efektivitu infekcie mPyV, zatiaľ čo stabilizácia aktínových filamentov infekcii zabraňuje. Infekcia mPyV by teda mohla byť závislá na aktínových filamentoch v dynamickej fáze. Na druhej strane sa nedá vylúčiť ani možnosť, že aktín hrá aktívnu úlohu pri invázii vírusu a to tak, že zvädza váčky s viriónmi na degradačnú dráhu. Aktínové zväzky by mohli fungovať ako ochranná stena filamentov, ktorá smeruje váčky s viriónmi do kompartmentov, kde sú odsúdené na degradáciu. Rozrušenie mikrotubulov inhibuje infekčivitu, ich stabilizácia infekčivitu zvyšuje. Intaktné mikrotubuly by mohol mPyV využívať na transport vírusových častíc do blízkosti jadra (KRAUZEWICZ *et al.* 2000, GILBERT *et al.* 2003).

Podobne ako v prípade SV40, detailný spôsob dopravy mPyV DNA do jadra a miesto rozvoľnenia kapsidy nie sú známe. Staršie práce uvádzajú, že v monopinocytických váčkoch, v ktorých mPyV putuje cytoplazmou, dochádza k čiastočnému rozvoľneniu štruktúry viriónu (COLE a CONZEN, 2001). Monopinocytické váčky s čiastočne rozvoľnenými viriónmi pravdepodobne fúzujú s jadrovou membránou a tak sa mPyV dostáva do jadra (GRIFFITH *et al.* 1988). Na druhej strane však boli v jadre pozorované

aj nerozvoľnené vírusové častice (MATTERN *et al.* 1966, HUMMLER *et al.* 1970, MACKAY a CONSIGLI 1976).

In situ hybridizácia so sondou špecifickou voči DNA mPyV ukázala, že aj napriek vysokej multiplicitate infekcie (100 a viac pfu/bunku) iba malá časť viriónov doručí svoj genóm do jadra hostiteľskej bunky. Väčšina vírusovej DNA sa spolu s kapsidovým proteínom VP1 sťahuje z blízkosti jadra naspäť do cytosolu, kde je pravdepodobne degradovaná (MANNOVÁ a FORSTOVÁ 2003). Na obr. č. 2.7. sú znázornené experimentálne dokázané dráhy vstupu mPyV a navrhované možné alternatívne dráhy.



Obr. č. 2.7.: Schéma transportných dráh používaných mPyV na ceste do jadra. Virióny sú internalizované do bunky v hladkých monopinocytických váčkoch, často bohatých na kaveolín-1. K internalizácii dochádza v oblasti lipidových mikrodomén. Váčky obsahujúce virióny potom fúzujú so skorými endozómami. Infekcia je závislá na kyslom prostredí endozómov. Vstup vírusu je sprevádzaný aktiváciou tyrozínových kináz a prechodným rozpadom aktínových vlákien. Zo skorých endozómov sa virióny dostávajú do recyklujúcich endozómov a môžu byť transportované do ER. Monopinocytický váчок, nesúci virión, môže tiež priamo fúzovať s ER. Experimentálne dokázané dráhy sú vyznačené plnou šípkou.

Možné alternatívne cesty sú vyznačené prerušovanou šípkou s otáznikom:

- 1) Úspešné virióny by mohli po konformačnej zmene spôsobenej kyslým pH uniknúť z endozómu do cytosolu
- 2) Monopinocytický váчок nesúci mPyV by priamo mohol fúzovať s jadernou membránou
- 3) Iba malá časť viriónov doručí svoj genóm do jadra hostiteľskej bunky. Väčšina vírusovej DNA je spolu s kapsidovým proteínom VP1 pravdepodobne degradovaná

(upravené podľa LIEBL *et al.* 2006)

2.3. Ubiquitín – proteazomálny systém

Ešte v osemdesiatych rokoch dvadsiateho storočia bola degradácia proteínov nepreskúmanou oblasťou molekulárnej biológie. Tento dej bol považovaný za nešpecifický a konečný jav. Dnes sa vie, že degradácia bunkových proteínov je vysoko špecializovaný a dobre organizovaný proces, podieľajúci sa na odstraňovaní chybných a nadbytočných proteínov z cytosolu, endoplazmatického retikula a jadra. Takisto je v dnešnej dobe zrejmé, že ubiquitinylácia a zložky s ubiquitínom spojenej proteazomálnej degradačnej dráhy majú úlohu v mnohých základných bunkových procesoch, napríklad pri signálnej transdukcii a znižovaní množstva bunkových povrchových receptorov, pri opravách DNA a onkogenéze, v bunkovom cykle a pri delení, pri vytváraní antigénov, ktoré sú prezentované na povrchu bunky prostredníctvom MHC gp I, pri apoptóze atď.

2.3.1. Ubiquitín

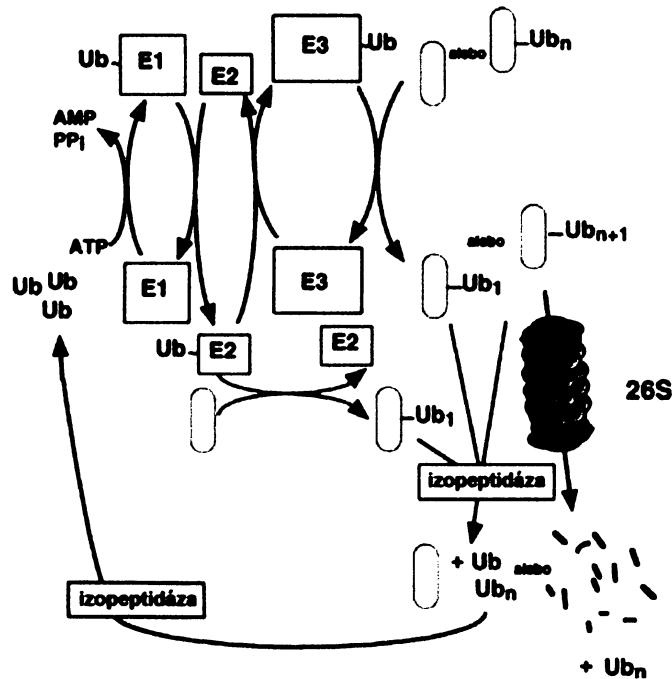
Ubiquitín (Ub, obr. č. 2.9.) je globulárny termostabilný proteín pozostávajúci zo 76 aminokyselín a s molekulovou hmotnosťou 8,6 kDa. Vyskytuje sa iba u eukaryotických organizmov a je vysoko konzervovaný – kvasinkový a ľudský ubiquitín sa líšia navzájom iba v 3 aminokyselinách.

V bunkách sa nachádza buď ako voľný Ub alebo v komplexe s ďalšími proteínmi. Jednou z úloh Ub je sprostredkovať degradáciu nesprávne zložených, chybných alebo nadbytočných proteínov v bunke. Slúži ako značka - naviaže sa na proteín určený na degradáciu a ten je potom rozpoznávaný proteazómom, kde je degradovaný.

2.3.2. Enzýmy podieľajúce sa na ubiquitinylácii proteínov

Degradácia proteínu ubiquitín – proteazomálnou cestou prebieha v dvoch samostatných za sebou nasledujúcich krokoch:

- 1) označenie substrátu reťazcom Ub pomocou troch enzýmov: E1, E2, E3
- 2) degradácia označeného substrátu 26S proteazómom (Obr. č. 2.8.)



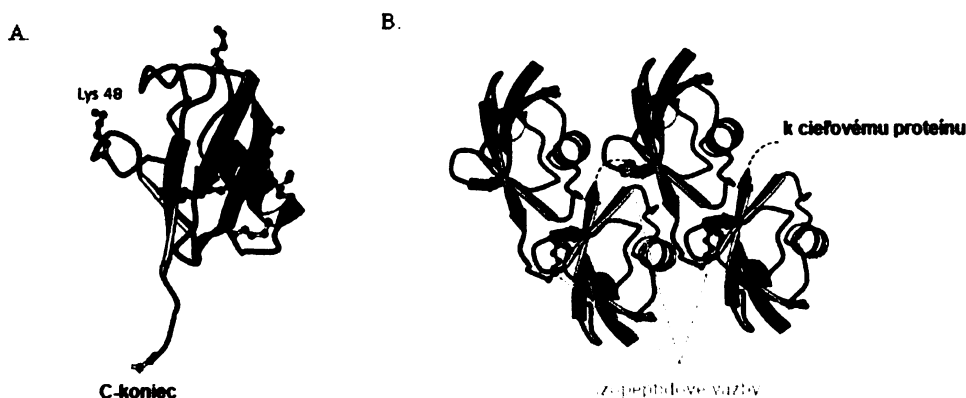
Obr. č. 2.8.: Schéma ubiquitín – proteazomálnej degradácie.

Konjugácia Ub k proteínu, ktorý je určený na degradáciu, pomocou enzýmov E1, E2 a E3. Ubiquitinylovaný substrát je potom degradovaný v 26S proteazóme. Sivý ovál - substrát degradácie, ~ - tiol esterová väzba, Ub - ubiquitín, Ub_n - ubiquitínový reťazec, E1- ubiquitín – aktivujúci enzým, E2 - ubiquitín – konjugačný enzým, E3 - ubiquitín – proteín ligáza (BONIFACINO a WEISMANN 1998).

Na ubiquitinylácii sa podieľajú tri skupiny enzýmov: ubiquitín – aktivujúci enzým (E1), ubiquitín – konjugačný enzým / ubiquitín – prenášajúci enzým (E2) a ubiquitín – proteín ligáza (E3). E1 aktivuje Ub v reakcii vyžadujúcej ATP, za vzniku vysoko energetického thiol esteru E1-S~Ub (HAAS *et al.* 1982) a táto aktivovaná thiolová skupina je potom prenesená na E2. E2 enzým prenesie aktivovanú Ub skupinu z E1 na substrát, ktorý je špecificky naviazaný na E3. Prenos Ub z E1 na E3 vyžaduje vznik ďalšieho vysoko energetického thiol esteru E2-S~Ub (HERSHKO *et al.* 1983). V prípade tých E3, ktoré obsahujú doménu HECT (doména homologická s C- koncom proteínu E6-AP, kde E6-

AP, E6-asociovaný proteín, je bunková ubiquitín – ligáza spôsobujúca degradáciu p53 v prítomnosti papilomavírusového onkoproteínu E6), je Ub najprv prenesený na cysteínový zvyšok E3 za vzniku tretieho thiol – esterového intermediátu E3-S~Ub, a potom je prenesený na substrát, ktorý je naviazaný na E3 ligáze. Existujú aj také E3, ktoré obsahujú motív RING finger a tie katalyzujú priamy prenos Ub z E2 na substrát (zhrnuté v GLICKMAN a CIECHANOVER 2002).

Ub je spojený s proteínom kovalentnou izopeptidickou väzbou medzi Gly na C-konci Ub (obr. č. 2.9.A) a postranným reťazcom Lys (ϵ -NH₂ skupina) na proteíne (HERSHKO *et al.* 1980). V niektorých prípadoch môže byť Ub pripojený na voľný α -NH₂ koniec substrátu (BREITSCHOPF *et al.* 1998). Proteín je označený na degradáciu v 26S proteazóme vytvorením polyubiquitínového reťazca. K Ub, ktorý je naviazaný na proteín, sú na ϵ -NH₂ skupinu vnútorného Lys (väčšinou je to K48) pripojené ďalšie molekuly Ub pomocou svojich C-koncov (Gly-76). Monoubiquitinylácia proteínu alebo naviazanie po jednom Ub zvyšku na viac Lys nie je dostatočný signál na rozpoznanie proteínu proteazómom (zhrnuté v BONIFACINO a WEISSMANN 1998, GLICKMAN a CIECHANOVER 2002). Zdá sa, že minimálna a postačujúca dĺžka polyubiquitínového reťazca sú štyri molekuly Ub (DEVERAUX *et al.* 1994, 1995, obr. č. 2.9.B).

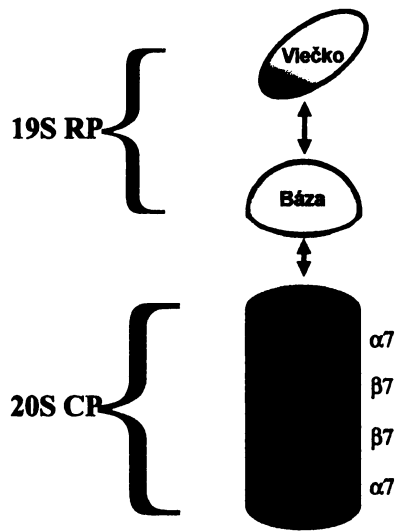


Obr. č. 2.9. A) Ubiquitín. Na obrázku sú znázornené lyzínové zvyšky, vrátane Lys48, na ktorý sa viažu ďalšie molekuly Ub. C-koncom je Ub naviazaný na proteín. B) Tetra ubiquitín. Štyri molekuly sú pospájané navzájom izopeptidickou väzbou a ak sú naviazané na proteín, slúžia ako signál na degradáciu (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>).

2.3.3. Štruktúra a funkcia proteazómu

Proteazóm degraduje regulačné alebo krátko žijúce proteíny nachádzajúce sa v cytoplazme, v jadre alebo v ER a takisto sa podieľa na pomalej degradácii dlho žijúcich proteínov, o ktorých sa kedysi predpokladalo, že sú degradované v lyzozómoch (ROCK *et al.* 1994). Ubiquitín-proteazomálny spôsob degradácie patrí medzi najviac konzervované regulačné dráhy v bunke a proteazóm je pravdepodobne esenciálna zložka eukaryotických buniek. Väčšina podjednotiek proteazómu vykazuje viac ako 40% zhodu a ATPázy regulačných podjednotiek dokonca až 70-80% zhodu medzi kvasinkovým a ľudským proteazómom. Štruktúra a podjednotkové zloženie proteazómov rôznych druhov je takmer identická (zhrnuté v GLICKMAN a CIECHANOVER 2002).

Eukaryotický proteazóm 26S (Obr. č. 2.10.) je multikatalytická proteáza, má veľkosť ~2,5MDa a pozostáva z 32 rôznych podjednotiek. Funkčne sa delí na proteolytické jadro 20S CP (core particle), ktoré má katalytickú aktivitu a na oboch koncoch sa nachádzajúce 19S RP (regulatory particle), ktoré majú regulačnú funkciu.



Obr. č. 2.10.: Štruktúra proteazómu.

19S RP – regulačná podjednotka, 20S CP – katalytická podjednotka (GLICKMAN a CIECHANOVER 2002).

19S regulačný komplex pozostáva z viečka a z bázy (GLICKMAN *et al.* 1998), ktorá sa viaže na 20S CP a vytvára 26S holoenzým. Viečko rozpoznáva ubiquitinylovaný proteín a báza, ktorá obsahuje šesť ATP-áz, substrát rozbaľuje a súka ho do proteazómu (BRAUN *et al.* 1999).

Proteolytická aktivita proteazómu je sústredená v 20S CP (BOTCHLER *et al.* 1999). Trojrozmerná štruktúra tejto multiproteázy purifikovanej z kvasiniek bola stanovená pomocou rentgenovej kryštalografie (GROLL *et al.* 1997). 20S CP má súdkovitú štruktúru s dutinou uprostred a je zložené zo štyroch kruhov podjednotiek - dvoch rovnakých vonkajších α -kruhov a dvoch rovnakých vnútorných β -kruhov. α aj β kruhy sú zložené zo siedmich odlišných podjednotiek - štruktúra 20S CP je teda $\alpha_{1-7}\beta_{1-7}\beta_{1-7}\alpha_{1-7}$. N-koncové časti α podjednotiek 20S proteazómu uzatvárajú vchod do 20S CP (GROLL *et al.* 2000). Tento vchod sa otvorí, ak 20S CP asociuje s 19S RP za vzniku 26S proteazómu (FERREL *et al.* 2000).

Katalytické miesta sa nachádzajú na β -podjednotkách a sú obrátené do vnútornej dutiny kanálu (GROLL *et al.* 1997, LOEWE *et al.* 1995). U eukaryotických organizmov majú tri zo siedmich β -podjednotiek proteázové aktívne miesta (tj. každý proteazóm má šesť aktívnych miest). Jednotlivé podjednotky štiepia peptidové väzby za zvyškami veľkých hydrofóbných aminokyselín, podobne ako chymotrypsín, ďalej za bázičými zvyškami analogicky k trypsínu a po kyslých aminokyselinových zvyškoch (WILK a ORLOWSKI 1983). Z tohto dôvodu sú tieto proteazómové aktivity pomenované ako chymotrypsínová (CT-L), trypsínová (T-L) alebo post-glutamyl peptid hydrolytická (PGPH) aktivita (CARDOZO 1993). Štúdie kvasinkového proteazómu ukázali, že za PGPH aktivitu je zodpovedná $\beta 1$ podjednotka (HILT *et al.* 1993, ENENKEL *et al.* 1994), za CT-L aktivitu $\beta 5$ podjednotka a za T-L aktivitu $\beta 2$ podjednotka (DICK *et al.* 1998, HEINEMEYER *et al.* 1993, SALZMANN *et al.* 1999). Podobne u cicavčieho proteazómu podjednotka X (cicavčí homológ kvasinkovému $\beta 5$) je zodpovedná za CT-L aktivitu, podjednotka Y (homológ $\beta 1$) za PGPH aktivitu a podjednotka Z (homológ $\beta 2$) za T-L aktivitu (ORLOWSKI a WILK 2000). Ako katalytický nukleofil proteolýzy slúži hydroxylová skupina N-koncových aminokyselinových zvyškov Thr na β -podjednotkách (SEEMÜLLER *et al.* 1996, LÖWE *et al.* 1995, GROLL *et al.* 1997, FENTEANY *et al.* 1995).

Proteazóm degraduje proteíny na krátke peptidy. Po uvoľnení do cytoplazmy sú tieto peptidy hydrolyzované cytoplazmatickými proteázami. Ubiquitín je po degradácii substrátu recyklovaný späť do ubiquitín-proteazomálnej dráhy. Ubiquitinylácia proteínov je reverzibilný proces, v cytoplazme boli nájdené aj deubiquitinylačné enzýmy (zhrnuté v HOCHSTRASSER 1996, WILKINSON 1997).

2.3.4. Degradácia asociovaná s endoplazmatickým retikulom (ERAD)

Endoplazmatické retikulum má schopnosť kontrolovať kvalitu proteínov, ktoré sa v ňom nachádzajú. Proteíny ER, ktoré sú nesprávne nasyntetizované alebo zaujali nesprávnu terciárnu štruktúru, prípadne tie proteíny, ktoré sa stali nadbytočnými v niektorej z fáz bunkového cyklu, sú translokované naspäť do cytosolu, kde sa nachádzajú komponenty ubiquitín - proteazomálneho systému a degradované proteazómom.

Jedna z prvých spojitostí medzi ubiquitínovým systémom a degradáciou proteínov z ER bolo zistenie, že proteazomálne inhibítory patriace do skupiny peptidových aldehydov a lactacystín zabraňujú degradácii normálneho a mutovaného CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) (JENSEN *et al.* 1995, WARD *et al.* 1995).

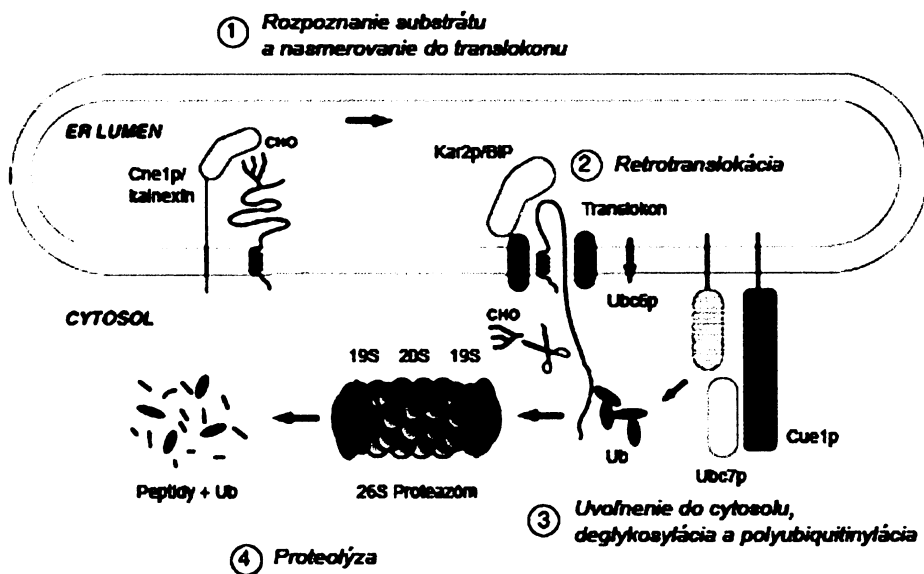
Na obrázku č. 2.11. je dráha, ktorou sú degradované proteíny z ER.

1.) Rozpoznanie substrátu a jeho nasmerovanie do translokony

Proteíny určené na degradáciu sú rozpoznávané chaperónmi nachádzajúcimi sa v lumen ER. O chaperónoch podieľajúcich sa na správnom zložení proteínov, napr. Kar2p/BiP a Cne1p/kalnexín (zhrnuté v GETHING a SAMBROOK 1992, HAMMOD a HELENIUS 1995) bolo zistené, že tieto chaperóny sú potrebné aj na cielenie určitých substrátov do ubiquitín – proteazomálnej dráhy (McCRACKEN a BRODSKY 1996, PLEMPER *et al.* 1997).

2.) Retrotranslokácia

Na retrotranslokácii proteínov sa podieľajú podjednotky komplexu Sec61p – to bolo ukázané napr. v prípade ťažkého reťazca MHC gp I (WIERTZ *et al.* 1996b) a neglykosylovaného prepro- α -faktoru (PILON *et al.* 1997). Niektoré substráty (napr. karboxypeptidáza Y) môžu byť exportované cez Sec63p (proteínový komplex



Obr. č. 2.11. Degradácia proteínov endoplazmatického retikula.

Kar2p/BiP, Cne1p/kalnexín - proteíny ER, Ub - ubiquitín, Ubc6p, Ubc7p - ubiquitín-konjugáčn énymy, Cue1p - asociácia Ubc7p s membránou ER (upravené podľa BONIFACINO a WEISSMAN 1998).

tvoriaci translokón v membráne endoplazmatického retikula, PLEMPER *et al.* 1997). Je pravdepodobné, že rozbalený proteín je za pomoci cytosolických chaperónov (napr. Hsp70) vytiahnutý do cytosolu (YANG *et al.* 1993).

3.) Uvoľnenie do cytosolu, deglykosylácia a polyubiquitinylácia

Polypeptid je po retrotranslokácii glykoproteínov buď uvoľnený do cytosolu – napr. luminálne proteíny (neglykosylovaný kvasinkový prepro- α -faktor, McCracken a Brodsky 1996), alebo transmembránové proteíny (napr. ťažký reťazec MHC gp I Wiertz *et al.* 1996a, 1996b), alebo zostáva naviazaný na cytosolickej strane membrány ER (Hiller *et al.* 1996). Po retrotranslokácii glykoproteínov sú N-oligosacharidy odstránené N-glykanázou (Suzuki *et al.* 1994). Proteíny retrotranslokované do cytosolu podliehajú polyubiquitinylácii nutnej na degradáciu v proteazóme (Ward *et al.* 1995, Hiller *et al.* 1996). Na polyubiquitinylácii substrátu sa podieľajú ubiquitín-konjugáčn énymy Ubc6p alebo Ubc7p (Biederer *et al.* 1996, Hiller *et al.* 1996). Ubc6p je zakotvený v membráne ER

svojim karboxylovým koncom a jeho katalytická doména je obrátená do cytosolu (SOMMER a JENTSCH 1993, YANG *et al.* 1997). Takto má prístup k retrotranslokovaným proteínom, ktoré hneď ubiquitinyluje. Ubc7p je s membránou ER asociovaný pomocou ďalšieho proteínu Cue1p (BIEDERER *et al.* 1997).

4.) Degradácia v proteazóme

Proteazómy sa nachádzajú hlavne v cytosole (PALMER *et al.* 1996), ale bola dokázaná aj prítomnosť proteazómov naviazaných na membráne ER (RIVETT *et al.* 1992, PALMER *et al.* 1996). Proteazómy naviazané na membráne teda môžu priamo degradovať proteíny hneď ako sa vynoria z translokonu. Polyubiquitinylovaný substrát sa viaže na proteazóm a je degradovaný na peptidy, ktoré sú hydrolyzované cytosolickými exopeptidázami.

2.3.5. Vírusy a ubiquitín – proteazomálny systém

2.3.5.1. Interakcie vybraných druhov vírusov so zložkami ubiquitín – proteazomálneho systému

Vírusy rôznym spôsobom interagujú s jednotlivými zložkami degradačných dráh a využívajú ich za účelom úspešného rozmnoženia a rozšírenia sa.

2.2.5.1.1. E6 degraduje p53 pomocou bunkového proteínu E6-AP

E6 proteín kódovaný ľudskými papilomavírusmi HPV - 16 a HPV - 18 je schopný viazať bunkový proteín E6 – AP a tento komplex je následne schopný vyvážovať bunkový protoonkogén p53 (WERNESSE *et al.* 1990) a stimulovať jeho degradáciu prostredníctvom ubiquitín-proteazomálneho systému. E6-AP tu funguje ako E3 (SCHEFFNER *et al.* 1990, 1993). Degradáciou p53 tak papilomavírusový proteín E6 zabraňuje vstupu bunky do apoptózy.

2.2.5.1.2. Degradácia MHC gp I prostredníctvom ERAD je sprostredkovaná niektorými vírusmi

Niektoré vírusy, napr. ľudský cytomegalovírus – HCMV (JONES *et al.* 1995) alebo vírus ľudskej T leukémie – HTLV-1 (JOHNSON *et al.* 2001) sa vyhýbajú detekcii imunitným systémom inhibíciou vystavenia MHC gp I s vírus špecifickými peptidmi na povrch bunky. HCMV kóduje dva endoplazmatické transmembránové proteíny US11 a US2, ktoré spôsobujú degradáciu molekúl ťažkého reťazca MHC gp I krátko po tom, ako sú nasyntetizované (JONES *et al.* 1995) a to tak, že asociujú s ťažkými reťazcami MHC gp I a spôsobujú ich dislokáciu do cytosolu. US11/US2 – dependentná degradácia MHC I ťažkých reťazcov pripomína degradáciu nesprávne nasyntetizovaných alebo zložených proteínov endoplazmatického retikula. V bunkách exprimujúcich US11 alebo US2 sú ťažké reťazce MHC gp I po syntéze zavedené do membrány endoplazmatického retikula, glykosylované, ale potom cez kanál Sec61p ihneď translokované naspäť do cytosolu, kde sú N-glykanázou deglykosylované a následne degradované v proteazóme (WIERTZ *et al.* 1996a, 1996b, SHAMU *et al.* 1999).

2.2.5.1.3. Tat proteín vírusu HIV-1 interaguje s proteazómom a bráni tak degradácii svojich proteínov

Proteín Tat okrem toho, že je dôležitý pri replikácii vírusu a je aktivátor transkripcie, má zároveň inhibičný efekt na proteazómový systém a to taký, že bráni vytváraniu antigénnych vírusových peptidov a ich prezentácii na povrchu bunky prostredníctvom MHC gp I (SEEGER *et al.* 1996, POGGI *et al.* 1998). HIV-1 Tat má podobné väzbové miesta pre naviazanie α podjednotiek 20S CP proteazómu ako 11S RP (HUANG *et al.* 2002). Tat preto kompetuje s 11S RP o väzbu na 20S proteazóm, a tak blokuje aktiváciu 20S CP a otvorenie vchodu do proteazómu (SEEGER *et al.* 1997). Zistilo sa, že Tat nielen interaguje s α podjednotkami 20S CP a tým zabraňuje väzbe 11S RP, ale zároveň interakciou s β podjednotkami bráni proteolytickej aktivite proteazómu. Týmto spôsobom môže vírus HIV predchádzať degradácii vírusových proteínov a vyhnúť sa tak rozpoznaniu imunitným systémom (APCHER *et al.* 2003).

2.2.5.1.4. Ubiquitín, ubiquitín - ligázy a pučanie obalených vírusov z bunky

Výsledky mnohých prác ukazujú, že v poslednej fáze pučania retrovírusov je potrebný bunkový proteín ubiquitín (PATNAIK *et al.* 2000, SCHUBERT *et al.* 2000, STRACK *et al.* 2000). Veľké množstvo voľného Ub bolo pozorované vo vírusových časticiach RSV (Rous sarcoma virus, PUTTERMAN *et al.* 1990), HIV-1, SIV (Simian immunodeficiency virus) a Mo-MuLV (Moloney murine leukemia virus, OTT 1997). OTT *et al.* (1998) tiež ukázali, že malá časť Gag proteínu je asociovaná s kovalentne naviazaným Ub.

Ak sú bunky infikované RSV vystavené účinkom inhibítora proteazómu, efektívnosť uvoľňovania nového potomstva je výrazne znížená. Tento jav je potlačený, ak je proteín Gag fúzovaný s Ub, alebo ak v bunke dochádza k zvýšenej expresii Ub. V prítomnosti proteazómového inhibítora sa vďaka nedostatku Ub hromadia na povrchu bunky agregáty partikulí, ktoré sú stále navzájom spojené membránou. Tieto pozorovania potvrdzujú hypotézu, že v tomto prípade Ub neslúži na označenie proteínu Gag na degradáciu, ale že Ub má nejakú úlohu pri pučaní viriónov (PATNAIK *et al.* 2000). Negatívny vplyv inhibície proteazómu na uvoľňovanie vírusového potomstva bol pozorovaný aj v bunkách infikovaných HIV-1 a SIV (SCHUBERT *et al.* 2000, STRACK *et al.* 2000).

Monoubiquitinylácia polyproteínu Gag je závislá na prítomnosti tzv. L – domény (late). Tá interaguje s bunkovou ubiquitín ligázou, ktorá v novom virióne ubiquitinyluje Gag (OTT *et al.* 1998, 2002, PATNAIK *et al.* 2000, SCHUBERT *et al.* 2000, STRACK *et al.* 2000).

Rhabdovírusy sa v prítomnosti proteazómového inhibítora správajú podobne ako retrovírusy: účinnosť uvoľňovania nových virónov vírusu vezikulárnej stomatitídy (VSV) a vírusu besnoty (Rabies virus, čeľaď *Rhabdoviridae*) bola 10 až 20 krát nižšia oproti kontrole (HARTY *et al.* 2001), čo predstavuje oveľa väčšiu inhibíciu, ako v prípade retrovírusov (PATNAIK *et al.* 2000, SCHUBERT *et al.* 2000). Takisto VSV využíva bunkovú E3 ligázu na ubiquitinyláciu matrixového proteínu M (HARTY *et al.* 2001).

2.3.5.2. Virióny vstupujúce do bunky interagujú s ubiquitín – proteazomálnym systémom po opustení endozómu

Niektoré vírusy, ktoré sa počas transportu bunkou dostávajú do endozómov, interagujú po ich opustení s cytoplazmatickými proteázami. Na jednej strane môže ubiquitín – proteazomálny systém predstavovať prekážku pre vstupujúci virión a inhibícia proteazómu tak infektivitu zvyšuje. Na druhej strane však existujú vírusy, ktoré pri svojej produktívnej infekcii využívajú degradačný systém bunky a inhibícia proteazómu preto ich infektivitu znižuje. V nasledujúcich odstavcoch budú popísaní dvaja zástupcovia čeľade *Parvoviridae*, ktorí pri infekcii hostiteľskej bunky interagujú s ubiquitín – proteazomálnym systémom úplne odlišným spôsobom.

2.3.5.2.1. Proteazóm ako podmienka infekcie

MVM (Minute virus of mice, čeľad' *Parvoviridae*) je malý, neobalený vírus s ikosahedrálnou symetriou, ktorý sa replikuje v jadre aktívne sa deliacich buniek. Vstupuje do bunky receptorom sprostredkovanou endocytózou a na svoj vstup využíva sialovú kyselinu naviazanú na povrchu glykoproteínov (COTMORE a TATTERSALL 1987). Použitím špecifických inhibítorov bafilomicínu A a chlorochínu, ktoré zabraňujú acidifikácii endozómov bolo zistené, že podobne ako u mPyV, je aj infekcia MVM závislá na kyslom prostredí endozómov a že MVM takisto využíva mikrotubuly a mikrofilamenty pri pohybe bunkou. Zo skorých endozómov sa MVM dostáva do neskorých endozómov (ROS *et al.* 2002). Potom je vírus pravdepodobne uvoľnený z endozomálneho kompartmentu do cytosolu a virióny smerujú do jadra mechanizmom, ktorý je málo objasnený. Virióny iného parvovírusu, CPV (Canine parvovirus, čeľad' *Parvoviridae*), sú po uvoľnení z endozómu stále intaktné, pretože protilátky, ktoré rozpoznávajú nerozvoľnené kapsidy po aplikácii mikroinjekciou do cytosolu boli schopné inhibovať infekciu (VIHINEN-RANTA *et al.* 2000). Jednou z hypotéz je, že k rozvoľneniu viriónu by mohlo dôjsť v cytosole počas transportu k jadru, alebo až v samotnom jadre. Proteazóm by mohol predstavovať jeden z bunkových faktorov, ktoré

by sa mohli na tomto deji zúčastniť. Túto hypotézu podporujú zistenia, že proteazomálne inhibítory MG-132, epoxomicín a lactacystín pridané do bunkovej kultúry výrazne znižujú akumuláciu vírusovej DNA v jadre a táto inhibícia je závislá na zvyšujúcej sa koncentrácii inhibítora. Takisto je inhibovaná syntéza štruktúrnych proteínov. Jedna z možností je, že MVM by mohol interagovať s bunkovým proteazómom pravdepodobne v dobe, keď unikne z endozómu (ROS *et al.* 2002). Ďalšie pokusy ukázali, že hoci sa počas infekcie MVM virióny postupne hromadia v perinukleárnej oblasti, v bunkovej kultúre, ktorá bola ošetrovaná proteazomálnym inhibítorm MG-132, nie sú virióny schopné penetrovať do jadra a stále zostávajú nerozvoľnené v perinukleárnej oblasti. Po odstránení inhibítora z média sa schopnosť MVM translokovať do jadra obnoví a je zahájená vírusová replikácia. Tieto výsledky naznačujú, že ubiquitín – proteazomálny systém je nutný pre translokáciu MVM do jadra (ROS a KEMPF 2004).

2.3.5.2.2. Proteazóm ako prekážka

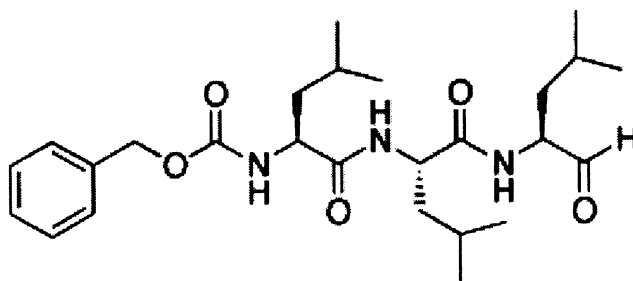
AAV (Adeno-associated virus, čeľaď *Parvoviridae*) rozpoznáva na povrchu hostiteľskej bunky heparan sulfát (SUMMERFORD a SAMULSKI 1998). Ako koreceptory pre jeho vstup slúžia ľudský receptor 1 pre fibroblastový rastový faktor (QING *et al.* 1999) a integrín $\alpha_v\beta_5$ (SUMMERFORD *et al.* 1999). AAV vstupuje do bunky klatrínom sprostredkovanou endocytózou a produktívna infekcia je závislá na kyslom prostredí endozómu (BARTLETT *et al.* 2000). Zo skorých endozómov sa AAV dostáva do neskorých endozómov. Ďalej bolo popísané, že významná časť viriónov AAV je degradovaná v proteazóme. Avšak v prípade, že boli do bunkovej kultúry pridané proteazomálne inhibítory, bolo pozorované výrazné zvýšenie účinnosti infekcie AAV a nárast akumulácie AAV genómu v jadre (DOUAR *et al.* 2001). V cytoplazme infikovaných buniek boli detekované ubiquitinylované kapsidy AAV a zdá sa, že ubiquitinylácia kapsíd je hlavná prekážka ovplyvňujúca účinnosť dopravy vírusu do jadra (DUAN *et al.* 2000).

2.4. Proteazomálne inhibítory

Väčšina inhibítorov ubiquitín – proteazomálnej dráhy dostupných v súčasnej dobe nepôsobí na zložky, ktoré sa zúčastňujú na rozpoznaní a ubiquitinylácii substrátu, ale priamo sa viažu a inhibujú 20S proteazóm. Delia sa do dvoch skupín: syntetické analógy a prírodné produkty. V nasledujúcom odstavci budú popísané iba peptidové aldehydy (patriace medzi syntetické analógy) pretože MG-132, ktorý do tejto skupiny patrí bol použitý v experimentoch v tejto diplomovej práci.

MG-132 (Carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal, Z-LLL-CHO)

Peptidové aldehydy, medzi ktoré patrí MG-132 (Obr. 2.12.), sú nízkomolekulárne inhibítory proteazómu, ktoré rýchlo prenikajú cytoplazmatickou membránou do bunky a selektívne inhibujú proteazomálnu degradačnú dráhu. Znižujú degradáciu ubiquitinylovaných proteínov v cicavčích bunkách a permeabilných kvasinkových kmeňoch v 26S proteazóme bez ovplyvnenia jeho ATPázovej aktivity. Fungujú ako analógy substrátu a primárne inhibujú CT-L aktivitu proteazómu (ROCK *et al.* 1994, LEE a GOLDBERG 1996). Inhibítory z tejto skupiny sú veľmi účinné, viažu sa do aktívneho miesta β -podjednotky a vzniká väzba medzi aldehydovou skupinou inhibítora a hydroxylovou skupinou N-koncového treonínu β -podjednotky (GROLL *et al.* 1997, KISSELEV *et al.* 1998).



Obr. č. 2.12. MG-132 (MYUNG *et al.* 2001).

Životaschopnosť a rast buniek väčšinou nie sú ovplyvnené po dobu 10 – 20 hodín prítomnosti inhibítora v bunkovej kultúre (ROCK *et al.* 1994, LEE a GOLDBERG 1996). Peptidové aldehydy sú reverzibilné inhibítory, schopnosť proteazómov degradovať peptidy je úplne obnovená 1h po odstránení inhibítora z média (PALOMBELLA *et al.* 1994, ROCK *et al.* 1994, LEE a GOLDBERG 1996). Nevýhodou peptidových aldehydov je, že inhibujú takisto aj určité lyzozomálne cysteínové proteázy a calpaíny. Peptidové aldehydy blokujú z 90% degradáciu nesprávne nasyntetizovaných a krátko žijúcich proteínov, ktoré tvoria 10-20% všetkých bunkových proteínov a takisto blokujú pomalú degradáciu dlho žijúcich proteínov, o ktorých sa kedysi predpokladalo, že sú degradované v lyzozómoch (ROCK *et al.* 1994).

3. Materiál a metódy

3.1. Materiál

V tejto kapitole sa nachádza prehľad a popis bunkových línií, plazmidov, roztokov, a prístrojov používaných pri vypracovávaní diplomovej práce. Chemikálie pochádzajú vo väčšine prípadov od firmy Lachema (Brno), v prípade iného výrobcu je jeho názov uvedený v zátvorke. Na prípravu roztokov bola použitá destilovaná voda alebo voda demineralizovaná (Milli – Q Plus).

3.1.1. Bunkové línie a transfekované bunky

NIH 3T6	stabilná bunková línia myších fibroblastov, senzitívna a permisívna pre myší polyomavírus (Prof. Griffin, Royal Postgraduate School, Londýn, Veľká Británia)
NMuMG	<u>N</u> ormal <u>M</u> urine <u>M</u> ammary <u>G</u> land cells, myšie bunky epitelu prsnej žlazy, senzitívne a permisívne pre myší polyomavírus (Prof. Monique Berrebi, CNRS, Francúzsko)
WME	primárna bunková línia myších embryonálnych buniek (pripravená Mgr. M. Stančíkovou)
NMuMG - cav-1 WT	bunky pripravené RNDr. Davidom Lieblom, PhD., exprimujúce fúzny proteín kaveolín-1 – GFP (plazmid pEGFP-C2-caveolin-1 – GFP, Prof. Andre Le Bivic, IBDM, Marseille, Francúzsko)

3.1.2. Vírus

Myší polyomavírus, kmeň P16	Prof. Griffin, Royal Postgraduate School, Londýn, Veľká Británia
-----------------------------	--

3.1.3. Bakteriálne kmene

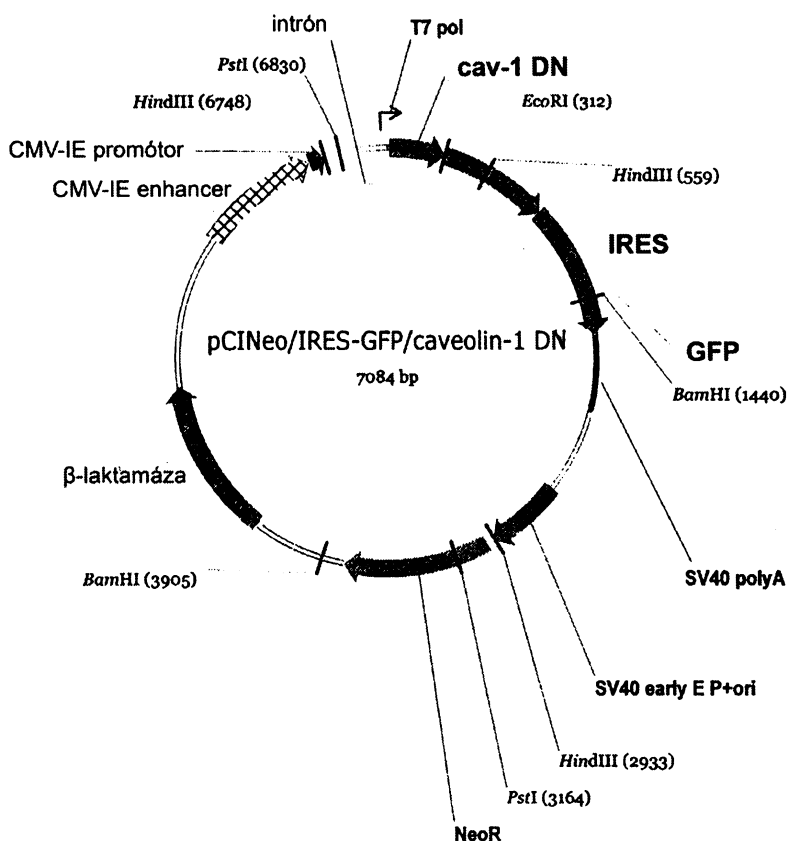
Escherichia coli, kmeň DH5 α

supE44, Δ lacU169 (Φ 80 lac Z Δ M15), hsdR17, racA1, endA1, gyrA96, zhi-1, relA1 (získaný zo zbierky Katedry genetiky a mikrobiológie, PŕF UK)

3.1.4. Vektory

pCINeo/IRES-GFP/cav-1 DN

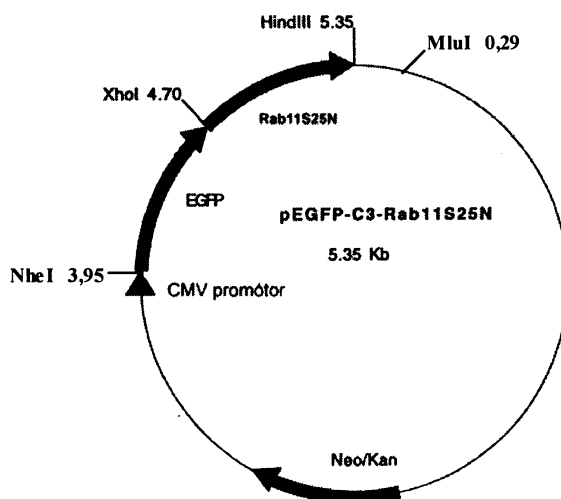
bicistronický expresný vektor pre dominantne negatívnu mutantu kaveolínu-1 (delécia aminokyselín 1 až 81, Prof. Jan Eggermont, Katholieke Universiteit, Leuven, Belgicko, Obr. č. 3.1)



Obr. č. 3.1.: pCINeo/IRES-GFP/cav-1 DN

pEGFP-C3-Rab11S25N

dominantne negatívna mutanta génu Rab11 v klonovacom vektore pEGFP-C2, táto mutanta neviaže GTP (Prof. Zerial, MPI.CBG, Dresden, Nemecko, Obr. č. 3.2)



Obr. č. 3.2. pEGFP – C3 – Rab11S25N

pEGFP-C2

klonovací vektor (Clontech)

3.1.5. Proteazomálne inhibítory

MG-132 (Carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal, Calbiochem)

3.1.6. Protilátky a fluorescenčné farbivá

3.1.6.1. Primárne protilátky

anti-CR: krysia monoklonálna protilátka namierená proti spoločnému N-koncovému úseku (common region) všetkých troch skorých antigénov mPyV (Imperial College School of Medicine, Londýn, riedená 1:5)

α PyVP1R: králičia polyklonálna protilátka proti VP1 (RNDr. D. Liebl, PhD, vyrobená na Ústave molekulárnej genetiky AV ČR, Praha, riedená 1:200)

anti-VP1 sérum: králičie sérum namierené proti VP1 (RNDr. D. Liebl, PhD, vyrobená na Ústave molekulárnej genetiky AV ČR, Praha, riedená 1:100)

α GFP: králičia polyklonálna protilátka proti celej molekule GFP, izotyp IgG (Abcam, riedená 1:500)

α NUP153: myšia monoklonálna protilátka namierená proti nukleoporínu (Abcam, riedená 1:500)

faloidín konjugovaný s rodamínom

3.1.6.2. Sekundárne protilátky

kozie imunoglobulíny namierené proti krysím imunoglobulínom Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, riedená 1:1000)

kozie imunoglobulíny namierené proti krysím imunoglobulínom Alexa Fluor 546 (Molecular Probes, riedená 1:1000)

kozie imunoglobulíny namierené proti králičím imunoglobulínom Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, riedená 1:1000)

kozie imunoglobulíny namierené proti králičím imunoglobulínom Alexa Fluor 546 (Molecular Probes, riedená 1:1000)

oslie imunoglobulíny namierené proti myším imunoglobulínom Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, riedená 1:1000)

oslie imunoglobulíny namierené proti králičím imunoglobulínom konjugované s chrenovou peroxidázou (Amersham, 87136, riedená 1:1000)

kozie imunoglobulíny namierené proti myším imunoglobulínom konjugované s chrenovou peroxidázou (BioRad, 170-6516, riedená 1:1000)

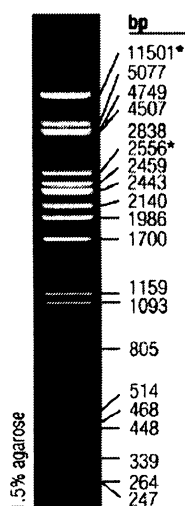
3.1.6.3. Fluorescenčné farbivá

4', 6'- diamidino – 2 fenyindol (DAPI)

propídium jodid

3.1.7. Markery molekulových hmotností

DNA marker molekulových hmotností: DNA fága λ (Fermentas) štiepená enzýmom *Pst* I – fragmenty o veľkosti (bp): 11 501*, 5077, 4749, 4507, 2838, 2556*, 2459, 2443, 2140, 1986, 1700, 1159, 1093, 805, 514, 468, 448, 339, 264, 247, 216, 211, 200, 164, 150, 94, 87, 72, 15. Kohézne konce s presahom 12 bází fragmentov 11501 a 2556 (označených *) môžu asociovať a vytvárať fragment o veľkosti 14 057 bp (Obr. č. 3.3.).



Obr.č.: 3.3. Marker molekulových hmotností Lambda DNA/*Pst*I Marker, Fermentas. 1,5% agaróza, 0,5 μ g/prúžok, gel dlhý 8 cm, 1xTAE, 12V/cm (www.fermentas.com)

3.1.8. Antibiotiká

Kanamycín (Léčiva): používaný v konečnej koncentrácii 100 μ g/ml

Geneticín (G418, Sigma): používaný v konečnej koncentrácii 400 μ g/ml

Zmes antibiotík pre tkanivové kultúry (Sigma): používaný 100x koncentrovaný roztok na 1 ml obsahuje 10 000 jednotiek penicilínu, 10 mg streptomycínu, 25 mg amphotericínu B



3.1.9. Zloženie najčastejšie používaných roztokov

PBS (Phosphate Buffered Saline), pH = 7,4 : 1,37 M NaCl

27 mM KCl

100 mM Na₂HPO₄·12H₂O

18 mM KH₂PO₄

DMEM médium so sérom: DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma)

10 % fetálne bovinné sérum (Gibco)

2 mM L-glutamín (Gibco)

1/100 objemu zmesi antibiotík pre TK

DMEM médium s 0,5% sérom: DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma)

0,5 % fetálne bovinné sérum (Gibco)

2 mM L-glutamín (Gibco)

1/100 objemu zmesi antibiotík pre TK

DMEM médium bez séra: DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma)

2 mM L-glutamín (Gibco)

1/100 objemu zmesi antibiotík pre TK

RPMI-1640 médium so sérom (Sigma):

2 mM L-glutamín (Gibco)

10 % fetálne bovinné sérum (Sigma)

Pufor B: 10 mM Tris – HCl (pH=7,4)

150 mM NaCl

0,01 mM CaCl₂

3.1.10. Použité prístroje

Amaxa Nucleofector[®] (KRD)

Centrifúga GS-15R, rotor S4180 (Beckman)

Centrifúga Megafuge 1.0R (Heraeus Sepatech)

Centrifúga Microfuge Lite Centifuge (Beckman)

CO₂ termostat (Forma Scientific)

Elektroforéza E-C Apparatus corporation (Hoefer)

Elektroporátor Gene Pulser Apparatus (BioRad)

Elektrónový mikroskop JEOL JEM 1200EX

Fluorescenčný mikroskop BX-60 (Olympus)

Invertovaný fluorescenčný mikroskop Olympus IX71

Konfokálny mikroskop LCS SP2 Laser scanning confocal microscope (Leica)

Mikrocentrifúga Beckman Mikrofuge Centrifuge, rotor F241,5 (Beckman)

Sonikátor Branson 5 (Cole-Parmer Instrument Company)

Sonikátor Soniprep 150 (Schoeller Pharmacia Praha)

Sonikátor UP50H (Schoeller Pharmacia Praha)

Spektrofotometer Helios β

Spektrofotometer Spekol 11 (Carl Zeiss-Jena)

Termostat TCH 100 (laboratórne prístroje Praha)

Trepačky (Labnet, Labtherm)

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

UV transluminátor (BioLum)

Vortex-Genie 2 (Scientific Industries)

3.2. Metódy

3.2.1. Sterilizácia

Roztoky, špičky a mikroskúmvky boli sterilizované horúcim teplom v autokláve (30 min, 120 kPa, 127°C). Roztoky, ktoré sa nemohli sterilizovať v autokláve boli sterilizované filtráciou cez 0,22 μ m filter. Chemické sklo bolo sterilizované horúcim

vzduchom pri 160°C 3 h. Umelohmotné centrifugačné skúmavky boli sterilizované parami kyseliny peroctovej 24 h. Pinzety, „hokejky“ a mikrobiologické kľučky boli sterilizované žihaním alebo vypálením po namočení do etanolu.

3.2.2. Tkanivové kultúry

Cicavčie bunky boli kultivované v CO₂ termostate (Forma Scientific) pri 37°C a 5% CO₂.

3.2.2.1. Pasážovanie cicavčích buniek 3T6 a NMuMG

Bunky boli pasážované raz za tri dni v pomere 1:6. Konfluentne narastené bunky na miske s priemerom 6 cm boli po odsatí média DMEM so sérom opláchnuté roztokom Versenu. K bunkám bol pridaný 0,25% trypsín v PBS a bunky boli inkubované v termostate, pokiaľ sa nepustili z povrchu misky. Potom bolo k bunkám pridané DMEM médium so sérom (do konečného objemu 6 ml) a bunky boli resuspendované pipetou. Bunková suspenzia bola po 1 ml rozdelená na misky s priemerom 6 cm a doplnená do konečného objemu 6 ml. V prípade, že boli bunky kultivované na mikroskopických sklíčkach v 24 jamkovej doštičke, na sklíčka sa pridalo 1 ml DMEM média so sérom a 60 µl bunkovej suspenzie.

Materiál:

DMEM médium so sérom

Roztok Versenu v PBS (Sevac)

0,25% trypsín (Sigma) v PBS

3.2.2.2. Synchronizácia cicavčích buniek pred infekciou

(CHEN a FLUCK 2001)

Bunky boli synchronizované do G0 fázy bunkového cyklu inkubáciou v DMEM médiu s 0,5 % sérom. Synchronizácia prebiehala 20 – 24 h.

Materiál:

DMEM médium s 0,5 % sérom

3.2.2.3. Infekcia cicavčích buniek vírusom

(TÚRLER a BEARD 1985)

Vírusové inokulum bolo 3x po dobu 1 min sonikované v stolnom sonikátore Bransonic 5, medzitým bolo chladené na ľade. Bunky pripravené na infekciu boli narastené do 50% konfluencie a synchronizované. DMEM médium s 0,5% sérom bolo odsaté a bunky boli opláchnuté DMEM médium bez séra.

V prípade pomnožovania vírusu bol na misku s priemerom 10 cm pridaný 1 ml DMEM média bez séra a vírusové inokulum (vhodne nariadené tak, aby bola dosiahnutá požadovaná nízka multiplicita infekcie). Adsorpcia prebiehala 1 – 1,5 h v termostate pri 37°C za občasného kývania. Potom bolo k bunkám pridané DMEM médium so sérom.

V ostatných prípadoch, kedy boli infikované bunky na mikroskopických sklíčkach v 24 jamkovej doštičke, prebiehala adsorpcia na ľade. Po opláchnutí buniek studeným DMEM médium boli bunky cca 10 min chladené na ľade, potom bolo k bunkám pridané 200 µl DMEM média bez séra s vírusovým inokulum a adsorpcia vírusu prebiehala za mierneho kývania na kývačke po dobu 30 min na ľade. Po skončení infekcie bol vírus odsatý a k bunkám bolo pridané DMEM médium so sérom. Týmto spôsobom bol dosiahnutý synchronný vstup vírusu do bunky.

Materiál:

DMEM médium so sérom

DMEM médium bez séra

Vírusové inokulum: virióny myšieho polyomavírusu v pufri B

3.2.2.4 Transfekcia cicavčích buniek

Na transfekciu cicavčích buniek bol použitý elektroporátor Amaxa Nucleofector® a reagentie Amaxa Nucleofector® Kit.

Cicavčie bunky boli pasážované 24 h pred transfekciou. Bunky boli po odsatí média DMEM so sérom opláchnuté roztokom Versenu. K bunkám bol pridaný 0,25% trypsín v PBS a bunky boli inkubované v termostate, pokiaľ sa nepustili z povrchu misky. Bunky boli resuspendované v DMEM médium so sérom a z tejto suspenzie bolo na 1 reakciu použitých 10^6 buniek, ktoré boli ešte prepláchnuté v PBS. Bunky

boli centrifugované (10 min, 1500 rpm., 21°C, centrifuga Beckman GS-15R, rotor S4180) a resuspendované v 100 µl roztoku na transfekciu (Nucleofector Solution typ V, zahriaty na 21°C). K bunkám bola pridaná plazmidová DNA a suspenzia bola prenesená do elektroporačnej kyvety. Na poráciu bol použitý program T-030. Po porácii bolo k bunkám pridané RPMI médium s 10% FBS (500 µl) a trichostatínom a bunky boli inkubované 15 min pri 37°C. Transfekované bunky boli rovnomerne rozdelené na 6 jamkovú doštičku do DMEM média so sérom a trichostatínom. Po 4 h bolo médium vymenené za čerstvé DMEM médium so sérom.

Materiál:

DMEM médium so sérom

Roztok Versenu v PBS (Sevac)

0,25% trypsín (Sigma) v PBS

PBS pre TK 1x koncentrovaný

Amaxa Nucleofector® Kit

RPMI médium so sérom a trichostatínom

Trichostatín - konečná koncentrácia 200 ng/ml (Sigma)

3.2.2.5. Selekcia buniek po transfekcii

24 h po transfekcii bolo k bunkám pridané selekčné antibiotikum – G418, médium s antibiotikom bolo vymieňané každé dva dni. 10 – 14 dní po transfekcii boli pozitívne kolónie prenesené na 96 jamkovú platničku a ďalej selektované.

Materiál:

G418 (Sigma): konečná koncentrácia 400 µg/ml

3.2.2.6. Príprava konzerv z cicavčích buniek

Bunky narastené na Petriho miske s priemerom 10 cm do 90% konfluencie boli opláchnuté roztokom Versenu a inkubované v 0,25% roztoku trypsínu v PBS. Po uvoľnení buniek z povrchu misky boli bunky resuspendované v médiu so sérom. Bunky boli centrifugované (10 min, 1500 rpm, 21°C, centrifuga Beckman GS-15R, rotor S4180) a bunkový sediment bol resuspendovaný v 1 ml mraziaceho média.

Bunková suspenzia bola prenesená do vychladených sterilných kryoskopických skúmaviek. Skúmavky boli ihneď zabalené do vrstvy buničitej vaty a v polystyrénovej krabici boli uložené na - 80°C. Po 24 h boli skúmavky preložené do kontajneru s tekutým dusíkom. Takto pripravené konzervy boli pred použitím rozmrazené v 37°C a resuspendované v médiu so sérom.

Materiál:

Mraziace médium: DMEM (Sigma), 50% FBS (Sigma), 10% DMSO (Sigma)

3.2.2.7. Fixácia cicavčích buniek na mikroskopických sklíčkach

Bunky narastené (poprípade infikované) na 24 jamkovej doštičke na mikroskopických sklíčkach boli opláchnuté roztokom PBS. Bunky boli 30 min fixované 3% paraformaldehydrom a 5 min permeabilizované 0,5% roztokom Tritonu X-100. Bunky boli potom opláchnuté trikrát po 10 min v roztoku PBS.

Materiál:

PBS

3% paraformaldehyd (Sigma) v PBS

0,5% Triton X-100 (Sigma) v PBS

3.2.2.8. Imunofluorescenčná detekcia proteínov v bunkách

(FORSTOVÁ *et al.* 1993)

Fixované bunky boli inkubované 30 min v roztoku 0,25% želatína, 0,25% BSA v PBS a potom 1 h v primárnej protilátke (200 µl) nariadenej v roztoku 0,25% želatína, 0,25% BSA v PBS. Potom boli bunky premývané v PBS, trikrát po 10 min. Inkubácia so sekundárnou protilátkou (200 µl) nariadenou v roztoku 0,25% želatína, 0,25% BSA v PBS prebiehala 30 min. Po opätovnom trojnásobnom premytí v PBS boli sklíčka položené bunkami nadol do kvapky glycerolu na podložnom skle. Na prezeranie preparátov bol použitý fluorescenčný mikroskop BX-60 (Olympus).

Materiál:

PBS

0,25% želatína (Sigma), 0,25% BSA (Sigma) v PBS

50% glycerol

3.2.3. Izolácia myšieho polyomavírusu**3.2.3.1. Pomnoženie myšieho polyomavírusu**

(TÚRLER a BEARD 1985)

Na pomnožovanie myšieho polyomavírusu bola použitá bunková línia WME. Bunky boli spásané v pomere 1:15 a infikované s multiplicitou infekcie M.O.I. = 0,1 pfu/bunku. Postup infekcie bol priebežne kontrolovaný mikroskopicky posúdením cytopatického efektu a taktiež fluorescenčnou detekciou prítomnosti vírusových antigénov. V 10. deň po infekcii boli bunky s médiom trikrát zmrazené a rozmrazené. Po poslednom rozmrazení boli zostávajúce bunky z povrchu misky zoškrabané a centrifugované (40 min, 4800 rpm, 4°C, centrifúga Beckman Centrifuge GS-15R). Supernatant bol uchovaný pri 4°C, sediment resuspendovaný v 10mM Tris-HCl (pH 7,4) a homogenizovaný v Potter-Elvehjemovom homogenizátore. K bunkovému homogenizátu bola pridaná neuraminidáza (konečná koncentrácia 0,01U/ml zmesi) a aprotinín (konečná koncentrácia 2 µg/ml zmesi). Táto zmes bola inkubovaná cez noc na kývačke pri laboratórnej teplote, a potom centrifugovaná (40 min, 4800 rpm, 4°C, centrifúga Beckman Centrifuge GS-15R). Supernatant bol spojený s predchádzajúcim, sediment bol resuspendovaný v 10 mM Tris-HCl (pH 9), inkubovaný na kývačke 4 h pri laboratórnej teplote a centrifugovaný (40 min, 4800 rpm, 4°C, centrifúga Beckman Centrifuge GS-15R). Supernatant bol spojený s predchádzajúcim a pelet bol vyhodnený.

Materiál:

1M Tris – HCl (pH 7,4)

1M Tris – HCl (pH 9,0)

Neuraminidáza 1U/ml (Serva)

Aprotinín 2mg/ml (Sigma)

3.2.3.2. Izokinetická centrifugácia cez vrstvu 10% sacharózy

Médium obsahujúce vírus (spojené supernatanty z predchádzajúcich krokov) bolo rozdelené do ultracentrifugačných skúmaviek, podvrstvené 10% sacharózou v pufri B a centrifugované na ultracentrifúge Beckman (3h, 35 000 rpm, 4°C, rotor SW 28). Sediment bol resuspendovaný v pufri B.

Materiál:

Pufor B

10% sacharóza (Serva) v pufri B (w/w)

3.2.3.3. Izopyknická centrifugácia v rovnovážnom CsCl gradiente

(TÚRLER a BEARD 1985)

Centrifugácia v CsCl gradiente je metóda umožňujúca separáciu viriónov a prázdnych pseudokapsíd na základe ich rozdielnej vznášavej hustoty.

Resuspendovaný a sonikovaný sediment po centrifugácii cez vrstvu 10% sacharózy bol spojený s CsCl v hmotnostnom pomere 2,5:1,2 tak, aby výsledná hustota vzorky bola $1,3 \text{ g.cm}^{-3}$, čomu zodpovedajú hodnoty refraktometrického indexu v rozmedzí 1,363 – 1,366. Roztok v ultracentrifugačnej kyvete bol prevrstvený parafínovým olejom a po vyvážení kyviet centrifugovaný (20 h, 35 000 rpm, 18°C, rotor SW 41). Vzniknutý gradient bol rozdelený pomocou peristaltickej pumpy na frakcie s objemom 200 μl – 300 μl a u jednotlivých frakcií bol zmeraný refraktometrický index. Plné virióny polyomavírusu majú hustotu $1,33 \text{ g.cm}^{-3}$ (refraktometrický index je v rozmedzí 1,365 – 1,366), prázdne virióny polyomavírusu majú hustotu $1,29 \text{ g.cm}^{-3}$ (refraktometrický index je v rozmedzí 1,362 – 1,363). Takisto bola u každej frakcie zisťovaná prítomnosť VP1 proteínu metódou „dot blot“. Na základe týchto dvoch analýz boli frakcie s podobnými hodnotami pospájané a dialyzované.

Materiál:

CsCl (Serva)

Pufor B

Parafínový olej (Rieder de Häen)

3.2.3.4. Dialýza

Dialýza je metóda, pri ktorej dochádza k prechodu nízkomolekulárnych látok (CsCl) cez semipermeabilnú membránu z prostredia s vysokou koncentráciou týchto látok do prostredia s ich nízkou koncentráciou. Vo vnútri membrány zostávajú vysokomolekulárne látky, ako sú proteíny a DNA.

Dialyzačná membrána bola najprv povarená 10 min v destilovanej vode a potom naplnená spojenými frakciami. Samotná dialýza prebiehala v 2000 cm³ pufru B pri 4°C cez noc za stáleho miešania.

Po dialýze boli vzorky zahustené centrifugáciou cez vrstvu 10% sacharózy (kapitola 3.2.3.2.).

Materiál

Dialyzačná membrána (Sevapor 16 mm, priemer pórov 2,5 nm)

Pufor B

3.2.3.5. Hemaglutinačný test

(TÚRLER a BEARD 1985)

Hemaglutinačný test je používaný na stanovenie koncentrácie vírusových častíc (infekčných aj neinfekčných). V tomto teste sa využíva schopnosť VP1 proteínu interagovať s kyselinou sialovou, ktorá sa nachádza na povrchu membrány morčacích erytrocytov, a tým ich aglutinovať. Aglutinované krvinky vytvoria v jamke tvaru U sieť, zatiaľ čo neaglutinované krvinky sedimentujú na dne jamky. Počet hemaglutinačných jednotiek vírusu (HAU) sa stanoví ako najväčšie riedenie vírusu, ktoré ešte krvinky aglutinovalo. 1 HAU zodpovedá 1×10^7 častíc.

Morčacia krv bola centrifugovaná (Beckman Centrifuge GS-15R, 20 min, 2600 rpm, 4°C) a trikrát premytá v PBS s 0,2% BSA. Koncentrácia krviniek bola overená stanovením hematokrytu nasledujúcim spôsobom: suspenzia krviniek bola opatrne premiešaná a 30 µl suspenzie bolo nanesených do 75 mm heparinizovanej kapiláry, ktorá bola na oboch koncoch zatavená. Kapilára bola centrifugovaná (5 min, 2500 rpm, rotor MPW 300). Hematokryt bol stanovený ako percentuálne vyjadrenie výšky celého stĺpca k výške stĺpca erytrocytov. Suspenzia erytrocytov bola nariedená v PBS s 0,2% BSA na konečnú koncentráciu 0,4%.

Do každej jamky (dno v tvare U) mikrotitračnej doštičky bolo nanosených 50 μ l 0,2% BSA v PBS. Do prvého stĺpca bola nanosená nariedená vírusová suspenzia (5 μ l vírusovej suspenzie + 45 μ l 0,2% BSA v PBS), a po jej premiešaní bolo zo suspenzie odobraných 50 μ l a prenesených do nasledujúcej jamky. Tento postup bol opakovaný až po poslednú jamku v riediacom rade. Na záver bolo do každej jamky pridaných 50 μ l 0,4%-nej suspenzie morčacích erytrocytov a mikrotitračná doštička bola uložená pri 4°C. Výsledok hemaglutinácie bol odčítaný po 6 h.

Materiál:

Morčacie krvinky

0,2% BSA v PBS pre tkanivové kultúry (Sevac)

Pufor B

3.2.3.6. Titrácia vírusu

Bunky narastené na mikroskopických sklíčkach boli synchronizované a infikované vírusovým inokulom s neznámym titrom. Na infekciu bolo použité inokulum nariedené 1000x, 10 000x a 100 000x v DMEM médiu bez séra. Po 24h boli bunky fixované a polyomavírusový antigén LT bol fluorescenčne detegovaný protilátkou (kapitoly 3.2.2.7. až 3.2.2.8.). Bunky, v ktorých bol prítomný sledovaný antigén, boli spočítané a bol určený titer vírusu.

Materiál:

DMEM médium so sérom

DMEM médium s 0,5 % sérom

Roztok Versenu v PBS (Sevac)

0,25% trypsín (Sigma) v PBS

Vírusové inokulum: virióny myšieho polyomavírusu v pufri B

PBS

3% paraformaldehyd (Sigma) v PBS

0,5% Triton X-100 (Sigma) v PBS

0,25% želatína (Sigma), 0,25% BSA (Sigma) v PBS

50% glycerol

3.2.4. Inhibičné pokusy

3.2.4.1. Štúdium vplyvu proteazomálnych inhibítorov na infektivitu myšieho polyomavírusu

Bunky línie 3T6 boli nasadené na sklíčka v 24 jamkovej platničke (kapitola 3.2.2.1.) a synchronizované (kapitola 3.2.2.2.). Proteazomálny inhibítor MG-132 bol rozpustený v DMSO a tesne pred použitím ďalej nariadený v DMEM médiu bez séra, resp. v kompletnom médiu so sérom na požadované koncentrácie. Inhibítor bol k bunkám pridávaný v rôznych časoch cyklu infekcie. Adsorpcia vírusu prebiehala pri 4°C (kapitola 3.2.2.3.) s rôznou multiplicitou infekcie. Po odstránení inhibítora boli bunky trikrát prepláchnuté médiom a neinternalizovaný vírus bol neutralizovaný inkubáciou s anti-VP1 sérom po dobu 30 min. Kontrolná vzorka bola inkubovaná v médiu s príslušnou koncentráciou DMSO. Bunky boli 16 h po infekcii fixované (kapitola 3.2.2.7.), imunologicky testované na prítomnosť skorých T antigénov (3.2.2.8.) a percento infekcie bolo stanovené ako podiel infikovaných buniek k celkovému počtu buniek.

Materiál:

DMEM médium bez séra

DMEM médium so sérom

DMSO (dimetyl sulfoxid)

MG-132 (Calbiochem): zásobný roztok 10 mM (v DMSO)

3.2.4.2. Stanovenie cytotoxicity proteazomálneho inhibítora MG132

Cytotoxicita bola stanovená po 5 h a po 24 h pôsobenia inhibítora. Bunky boli spasáňované na 24 jamkovú platničku a po 24 h k nim bol pridávaný inhibítor o rôznych koncentráciách (resp. DMSO) na 5 h alebo na 24 h. V prvom prípade bolo médium odstránené po 5 h, bunky boli 3x opláchnuté médiom a ďalej kultivované v čerstvom médiu ešte 19 h, v druhom prípade bol inhibítor v médiu prítomný počas 24 h. Po uplynutí tejto doby bolo médium s mŕtvymi bunkami odobrané, bunky, ktoré zostali v jamkách boli oddelené trypsinizáciou a spojené suspenzie boli centrifugované (10 min, 1500 rpm, 4°C). Bunkový pelet bol resuspendovaný v médiu bez séra s propídium jodidom a inkubovaný 30 min pri 37°C. Po centrifugácii (10

min, 1500 rpm, 4°C) boli bunky resuspendované v bezsérovom médiu a po nanesení na podložné sklo prikryté krycím sklíčkom. Cytotoxicita bola stanovená ako podiel mŕtvych buniek k celkovému počtu buniek.

Materiál:

DMEM médium so sérom

DMEM médium bez séra

Roztok Versenu v PBS (Sevac)

0,25% trypsín (Sigma) v PBS

propidium jodid (konečná koncentrácia 25 µg/ml)

3.2.5. Práca s baktériami

3.2.5.1. Príprava kompetentných buniek na elektroporáciu

(DOWER *et al.* 1988)

Príprava kompetentných buniek prebiehala vo všetkých krokoch v sterilných podmienkach. Baktérie *Escherichia coli* boli zaočkované do 10 ml TPN média a aerobne kultivované cez noc pri 37°C. Suspenzia bola nariadená do 500 ml TPN média tak, aby výsledná optická denzita suspenzie bola OD = 0,1 a bunky boli ďalej kultivované pri 37°C. Po dosiahnutí optickej denzity 0,5 – 0,7 (OD meraná pri vlnovej dĺžke 560 nm, šírka kyvety 1 cm) boli baktérie centrifugované (15 min, 4300 rpm, 4°C, centrifúga Megafuge 1.0). Bakteriálny pelet bol resuspendovaný v 500 ml demineralizovanej vody (vychladenej na 4°C) a znova centrifugovaný (15 min, 4300 rpm, 4°C, centrifúga Megafuge 1.0). Rovnakým spôsobom bol pelet premytý postupne v 250 ml demineralizovanej vody, 20 ml 10% glycerolu a 10 ml 10% glycerolu. Po poslednej centrifugácii bol bakteriálny pelet resuspendovaný v 1 ml 10% glycerolu a bunky boli rozdelené po 100 µl do mikroskúmaviek. Takto pripravené elektrokompetentné bunky boli zmrazené v tekutom dusíku a skladované pri -80°C.

Materiál:

TPN médium: 0,5% kvasničný autolyzát (Imuna)
2% peptón pre bakteriologiu (Imuna)
0,5% NaCl
10% glycerol v demineralizovanej vode

3.2.5.2. Elektroporácia baktérii

(DOWER *et al.* 1988)

Kompetentné bunky a DNA boli pomaly rozmrazené pri 0°C. K 50 µl elektrokompetentných buniek boli pridané 1 – 2 µl DNA v demineralizovanej vode. Po premiešaní bola suspenzia prenesená do vychladenej elektroporačnej kyvety (vzdialenosť elektród 2 mm). Kyveta bola vložená medzi elektródy a bol aplikovaný pulz s nastavenými hodnotami elektroporátoru 25 µF, 2,5 kV, 200 Ω. Optimálna dĺžka pulzu bola 4,5 ms. K baktériám v kyvete bolo okamžite po pulze pridané SOC médium (1 ml) a bunky boli kultivované 1 h pri 37°C. Baktérie boli vysiate na živný agar so selekčným antibiotikom a kultivácia prebiehala cez noc.

Materiál:

Živný agar č. 2 (Imuna), 4%
SOC médium: 2% peptón pre bakteriologiu (Imuna)
0,5% kvasničný autolyzát (Imuna)
20 mM glukóza
10 mM NaCl
2,5 mM KCl
10 mM MgCl₂
10 mM MgSO₄

MgCl₂ a MgSO₄ bolo sterilizované oddelene a s médiom bolo zmiešané až pred použitím

3.2.5.3. Kultivácia baktérií

Baktérie boli kultivované na pevnom agare (živný agar) v termostate alebo v tekutom médiu (živný bujón) v trepačke. Kultivácia prebiehala cez noc pri 37°C za prítomnosti selekčného antibiotika kanamycínu (konečná koncentrácia 100 µg/ml).

Materiál:

Živný agar č. 2 (Imuna), 4%

Živný bujón č. 2 (Imuna), 2,5%

Kanamycín (Léčiva)

3.2.5.4. Kultivácia baktérií pre izoláciu pomocou kitu „EndoFree Plasmid Maxi Kit QUIAGEN®“

Z kultivačnej misky so selekčným antibiotikom s čerstvou bakteriálnou kultúrou bola odobraná jedna samostatná kolónia, ktorá bola zaočkovaná do 3 ml Luria Bertani (LB) média so selekčným antibiotikom kanamycínom. Baktérie boli kultivované na trepačke 8 h pri 37°C, 300 rpm. 400 µl narastenej kultúry bolo zaočkovaných do 200 ml LB média a baktérie boli ďalej kultivované 16 h pri 37°C, 300 rpm. Keď kultúra dosiahla hustotu 3-4.10⁹ buniek na ml (t.j. hmotnosť peletu približne 3 g/l média), bunky boli centrifugované (4800 rpm, 15 min, 4°C) a následne z nich bol vyizolovaný plazmid (kapitola 3.2.6.7.).

Materiál:

Luria Bertani (LB) médium: 10 g/l tryptón (Imuna)

5 g/l kvasničný autolyzát (Imuna)

10 g/l NaCl

3.2.5.5. Skladovanie baktérií

(SAMBROOK *et al.* 1989)

Baktérie narastené na Petriho miskách boli krátkodobo skladované pri 4°C. Pre dlhodobé skladovanie boli čerstvo narastené baktérie v živnom bujóne premyté demineralizovanou vodou, resuspendované v 30% glycerole a skladované pri -80°C.

Materiál:

30% glycerol v demineralizovanej vode

Živný bujón č. 2 (Imuna), 2,5%

3.2.6. Práca s DNA**3.2.6.1. Izolácia plazmidovej DNA alkalickou metódou**

(BIRMBOIM a DOLY 1979)

50 ml bakteriálnej kultúry bolo kultivovaných cez noc v živnom bujóne č. 2 pri 37°C. Kultúra bola centrifugovaná (10 min, 4800 rpm, 4°C). Sediment bol resuspendovaný v 2 ml roztoku I, potom bol pridaný roztok II (4 ml), zmes bola premiešaná a inkubovaná 5 min pri laboratórnej teplote. Potom bola zmes zmiešaná s 3 ml roztoku III, opatrne premiešaná otáčaním skúmavky a po 20 min inkubácie na ľade centrifugovaná (30 min, 4800 rpm, 4°C). Supernatant bol prefiltrovaný cez tri vrstvy gázy, zmiešaný s 0,7 objemom izopropanolu, inkubovaný 10 min pri 4°C a centrifugovaný (30 min, 4800 rpm, 4°C). Sediment bol premytý 80% etanolom, vysušený pri laboratórnej teplote a rozpustený v TE pufri. Z takto získanej DNA boli odstránené proteíny extrakciou fenol/chloroformom (kapitola 3.2.6.2.) a RNA bola odstránená inkubáciou s RNA-ázou A (kapitola 3.2.6.3.).

Materiál:

Roztok I: 50 mM glukóza
25 mM Tris – HCl (pH = 8,0)
10 mM EDTA – NaOH (pH = 8,0)

Roztok II: 1% SDS (Sigma)
0,2 M NaOH

Roztok III: 3 M Kac
2 M kyselina octová

Izopropanol

80% etanol

TE pufor: TE pufor: 10 mM Tris – HCl (pH 8,0)
1 mM EDTA – NaOH (pH 8,0)

3.2.6.2. Deproteinácia DNA upraveným fenolom a chloroformom

(SAMBROOK *et al.* 1989)

K roztoku DNA bol pridaný 1 objem upraveného fenolu, roztok bol premiešaný a centrifugovaný 5 min pri 15000 rpm. Vrchná fáza bola po odobraní zmiešaná s 0,5 objemom upraveného fenolu a 0,5 objemom upraveného chloroformu a po premiešaní bola zmes centrifugovaná 5 min pri 15000 rpm. Vrchná fáza bola odobraná a predchádzajúci krok bol opakovaný, pokiaľ nezmizla medzifáza tvorená vyzrážanými proteínmi. Nakoniec bol k roztoku pridaný 1 objem upraveného chloroformu, po premiešaní bol roztok centrifugovaný 5 min pri 15000 rpm. Vrchná fáza bola odobraná a DNA, ktorá sa v nej nachádzala bola vyzrážaná etanolom.

Materiál:

Upravený fenol: redestilovaný kryštalický fenol, pH upravené s Tris – HCl (pH 8,0) na pH 7,8 – 8,0

Upravený chloroform: chloroform s izoamylalkoholom v pomere 24:1

3.2.6.3. Odstránenie RNA zo vzorky DNA

(SAMBROOK *et al.* 1989)

Ku vzorke DNA bola pridaná RNA-áza A (0,1 objemu) a vzorka bola inkubovaná 1 h pri laboratórnej teplote. RNáza A bola zo vzorky odstránená upraveným fenolom a chloroformom (kapitola 3.2.6.2.).

Materiál:

RNA-áza A (Serva): 10 mg/ml v roztoku 10 mM Tris – HCl (pH 8,0) a 15 mM NaCl. Prípadné DNA-ázy boli inaktivované 5 min povarením.

3.2.6.4. Zrážanie DNA etanolom

(SAMBROOK *et al.* 1989)

K roztoku DNA bola pridaná 1/10 objemu 3M octanu sodného (pH 5,2) a 2,5 násobok objemu 96% etanolu (vychladeného na -20°C). Zmes bola po premiešaní inkubovaná 30 min pri -80°C. Vyzrážaná DNA bola sedimentovaná 15 min pri

15300 rpm pri 4°C. Sediment bol premytý 80% etanolom a po vysušení rozpustený v odpovedajúcom množstve TE pufru alebo demi H₂O. Takto pripravená plazmidová DNA bola použitá na restričné overenie plazmidov.

Materiál:

3M octan sodný (pH 5,2, upravené kyselinou octovou)

96% etanol

80% etanol

TE pufor: 10 mM Tris – HCl (pH 8,0)

1 mN EDTA – NaOH (pH 8,0)

3.2.6.5. Štiepenie DNA restričnými enzýmami

(SAMBROOK *et al.* 1989)

Restričná zmes: 0,2 – 1 µg DNA
4 - 6 U restričného enzýmu
2µl 10x koncentrovaného restričného pufru
objem bol doplnený do 20 µl
demineralizovanou vodou

Restričný enzým bol do reakcie pridaný ako posledný. Restričná zmes bola inkubovaná 1 – 2 h pri optimálnej restričnej teplote a výsledok restričie bol overený elektroforeticky.

Materiál:

Restričné enzýmy: *Xho*I (Fermentas)
*Hind*III (Fermentas)
*Nhe*I (Fermentas)
*Mlu*I (Fermentas)

Restričné pufrы: Pufor Yellow TangoTM (10x): 33 mM Tris – acetát (pH = 7,9)
(Fermentas) 10 mM octan horečnatý
66 mM octan sodný
0,1 mg/ml BSA

Pufor Red (10x):	10 mM Tris-HCl (pH 8,5)
	10 mM MgCl ₂
	100 mM KCl
	0,1 mg/ml BSA

3.2.6.7. Izolácia plazmidovej DNA pomocou kitu „EndoFree Plasmid Maxi Kit QUIAGEN®“

Použitie tohto kitu umožňuje zisk vysokých výťažkov plazmidovej DNA vo veľmi čistej forme bez kontaminujúcich endotoxínov.

Bakteriálny pelet bol resuspendovaný v 10 ml pufru P1 s RNA-ázou A. Po pridaní 10 ml pufru P2 bola bakteriálna kultúra premiešaná prevracaním skúmavky a inkubovaná 5 min pri laboratórnej teplote. K lyzátu bol pridaný vychladený pufor B3 a lyzát bol opäť premiešaný prevracaním skúmavky. Lyzát bol prevedený do priloženej špeciálnej skúmavky s tryskou, ktorá obsahovala filter („QIAfilter Cartridge“). Po 10 min inkubácii pri laboratórnej teplote bol lyzát prefiltrovaný do novej 50 ml skúmavky. K filtrovanému lyzátu bol pridaný pufor ER, lyzát bol jemne premiešaný a inkubovaný na ľade 30 min. Priložená kolónka na izoláciu DNA bola vysytená pufrom QTB (10 ml) a vysušená na vzduchu. Na takto pripravenú kolónku bol nanesený prefiltrovaný lyzát. Plazmidová DNA sa prechodom kolónkou naviazala. Kolónka bola premytá 2 x 30 ml pufrom QC. Vo všetkých nasledujúcich krokoch boli použité roztoky, skúmavky, mikroskúmavky a špičky zbavené endotoxínov. DNA bola z kolonky vymytá 15 ml pufrom QN, zahriatym na 65°C. DNA bola vyzrážaná 0,7 objemom izopropanolu a centrifugovaná (30 min, 14000 rpm, 4°C). Pelet bol opláchnutý 80% EtOH a znova centrifugovaný (30 min, 14000 rpm, 4°C). Pelet bol vysušený a resuspendovaný v pufrí TE. Takto pripravená plazmidová DNA bola použitá na transfekciu cicavčích buniek.

Materiál:

„EndoFree Plasmid Maxi Kit QUIAGEN®“

Izopropanol

80% etanol

3.2.6.8. Meranie koncentrácie DNA

(SAMBROOK *et al.* 1989)

Koncentrácia DNA bola meraná na spektrofotometre Helios β . Vzorka DNA bola 200x zriedená. Koncentrácia DNA bola meraná pri vlnovej dĺžke 260 nm, čo je absorpčné maximum purínových a pyrimidínových báz. Čistota vzorky bola zistená meraním absorbancie pri vlnovej dĺžke 280 nm, čo je absorpčné maximum proteínov. V prípade, že pomer A_{260}/A_{280} bol v rozmedzí 1,6 – 2,0, takáto DNA bola použitá a koncentrácia DNA bola vypočítaná podľa vzorca $c(\mu\text{g/ml}) = 50 \times A_{260}/A_{280}$.

3.2.6.9. Agarózová elektroforéza

(SAMBROOK *et al.* 1989)

1% agarózový gel bol pripravený krátkym povarením agarózy v TBE pufre. Po ochladení agarózy na 50°C bol pridaný etídium bromid. Agaróza bola naliata do nalievacej aparatúry s hrebeňom, ktorá bola po stuhnutí gelu (cca 20 – 30 min) umiestnená do elektroforetickej aparatúry. Gel bol preliaty pufrom 0,5 x TBE a hrebeň bol odstránený. Do jamiek boli nanosené vzorky DNA zmiešané s BFB. Aparatúra bola pripojená ku zdroju jednosmerného prúdu, napätie bolo zvolené tak, aby intenzita elektrického poľa medzi elektródami bola 5V/cm. Potom, čo BFM dosiahla cca 0,5 cm od konca gelu, bol gel prehliadnutý pod UV transluminátorom.

Materiál:

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

2 mM EDTA – NaOH (pH 8,0)

90 mM kyselina boritá

BFB: 50% glycerol

0,13M EDTA – NaOH (pH 8,0)

0,12% bróm – fenolová modrá (BFM)

EtBr: 1 mg EtBr (Serva) / ml destilovanej vody

Agaróza pre elektroforézu (Serva, Sigma)

4. Výsledky

4.1. Izolácia myšieho polyomavírusu

Myší polyomavírus, kmeň P16, bol purifikovaný podľa postupu uvedeného v kapitole 3.2.3. Na infekciu bolo použitých $3,75 \cdot 10^6$ buniek, ktoré boli infikované s M.O.I = 0,1. Po centrifugácii vírusu cez vrstvu 10% sacharózy a v CsCl gradiente bol obsah centrifugačnej kvety rozdelený pomocou peristaltickej pumpy na frakcie, hodnoty nameraných refraktometrických indexov sú uvedené v tabuľke č. 4.1. Frakcie boli taktiež otestované metódou dot – blot pomocou protilátky proti VP1 (neuvedené).

Číslo frakcie	Refraktometrický index
1.	1,3655
2.	1,3650
3.	1,3645
4.	1,3640
5.	1,3650
6.	1,3645
7.	1,3640
8.	1,3640
9.	1,3635
10.	1,3630
11.	1,3620
12.	1,3620

Tab. č. 4.1.: Hodnoty refraktometrických indexov jednotlivých frakcií CsCl gradientu. Spojená frakcia č. 1 je označená červenou farbou, spojená frakcia č. 2 čiernou a spojená frakcia č. 3 je označená modrou farbou.

Na základe hodnôt refraktometrického indexu a prítomnosti proteínu VP1 v jednotlivých frakciách boli tieto frakcie spojené do troch frakcií nasledovne:

F1: 1 - 4

F2: 5 - 9

F3: 10 - 12

Spojené frakcie boli dialyzované v pufrí B (kapitola 3.2.3.4.) a skoncentrované centrifugáciou cez vrstvu 10% sacharózy (kapitola 3.2.3.2.). U každej frakcie bol určený infekčný titer (kapitola 3.2.3.6.) a hemaglutinačný titer (kapitola 3.2.3.5.). Výsledky sú zhrnuté v tabuľke č. 4.2. Elektrónmikroskopické snímky frakcií č. 2 a č. 3 sú zobrazené na obr. č. 4.1.

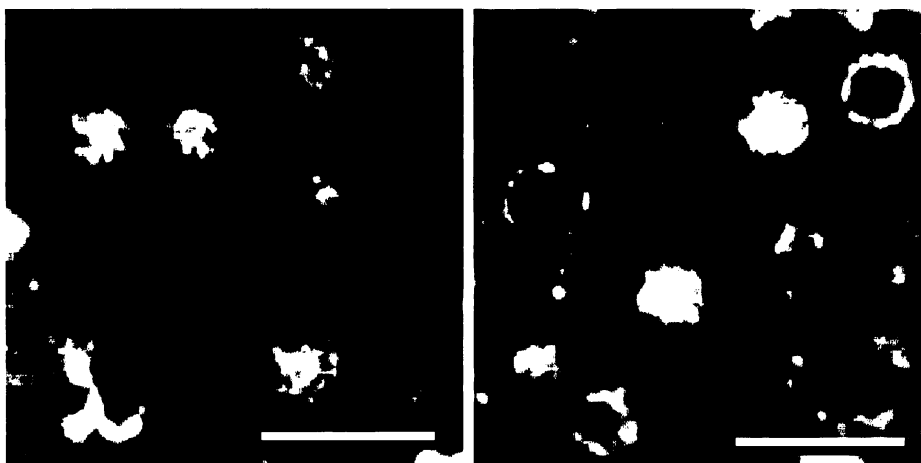
Frakcia č.	Objem získanej frakcie	Infekčný titer	Hemaglutinačný titer	Podiel všetkých vírusových častíc k infekčným
F1	300 μ l	$2 \cdot 10^7$ pfu/ml	$8 \cdot 10^9$ vpu/ml	400
F2	300 μ l	$3 \cdot 10^9$ pfu/ml	$1,024 \cdot 10^{12}$ vpu/ml	341
F3	300 μ l	$4 \cdot 10^9$ pfu/ml	$5,12 \cdot 10^{11}$ vpu/ml	128

Tab. č. 4.2.: Hodnoty infekčného a hemaglutinačného titru pre izolované frakcie.

pfu – plaque forming units

vpu – virus particle unit

Frakcia č. 2 bola použitá v ďalších pokusoch.



Obr. č. 4.1: Vzorka mPyV po izolácii cez CsCl gradient a zahutnení cez sacharózový vankúš.

A - vo frakcii č. 2 sa vyskytujú plné virióny (biele) aj prázdne (čierne)

B - vo frakcii č. 3 sa vyskytujú plné virióny, prázdne kapsidy a veľa rozpadnutého materiálu.

Mierka: 100 nm.

4.2. Príprava buniek exprimujúcich kaveolín-1 dominantne negatívnu mutantu (cav-1 DN mt)

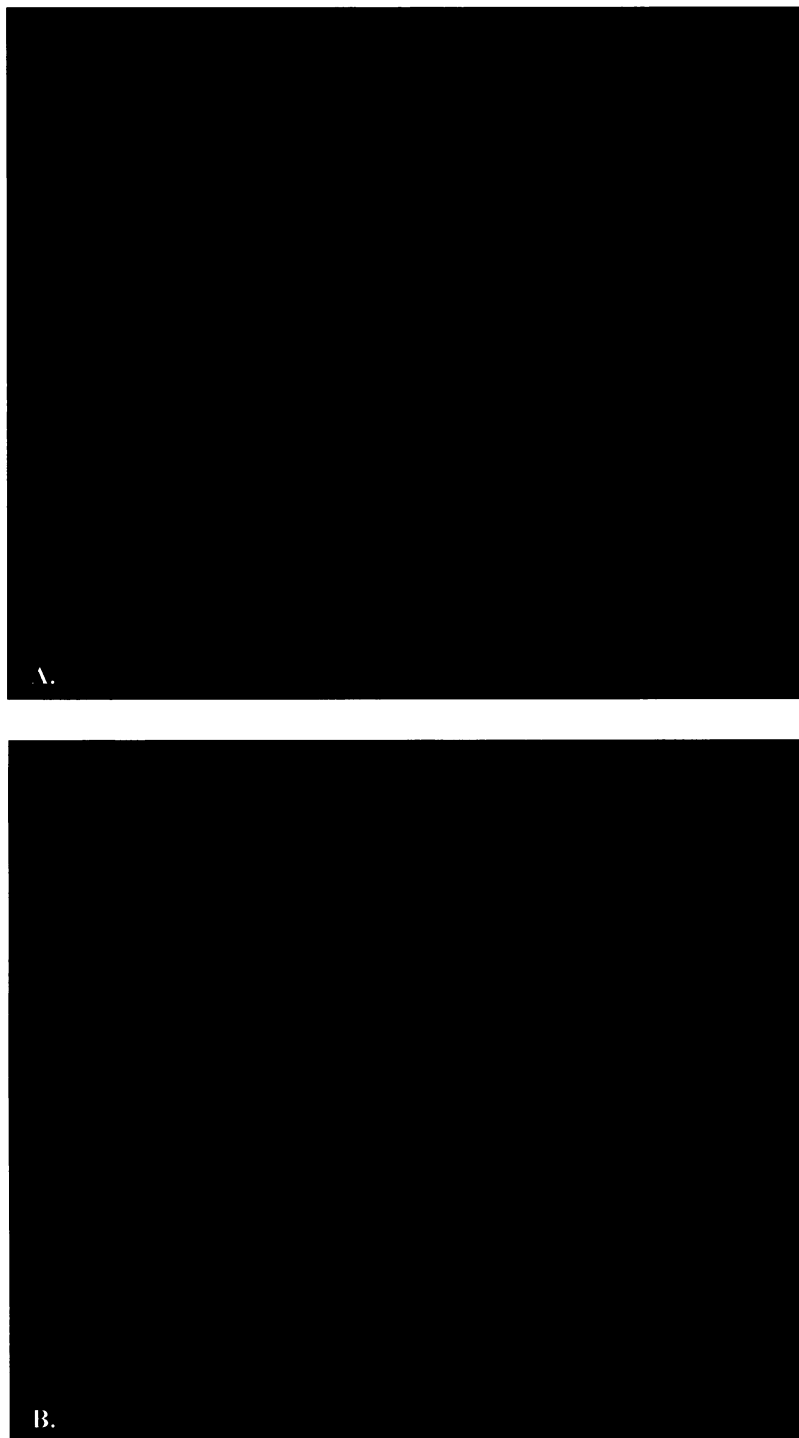
Myší PyV vstupuje do bunky v oblasti lipidových mikrodomén bohatých na kaveolín-1 (RICHTEROVÁ *et al.* 2001). Nedávne výsledky však ukázali, že mPyV vstupuje aj do buniek, ktoré kaveolín-1 neprodukujú a nemajú funkčné kaveoly (LIEBL *et al.* 2006). Nás zaujímalo, aký bude mať vplyv na polyomavírusovú infektivitu expresia génu pre dominantne negatívnu mutantu kaveolínu-1.

Produkcia dominantne negatívnej mutanty kaveolínu-1 rozrušuje tvorbu lipidových raftov obsahujúcich kaveolín-1 a spôsobuje jeho prerozdelenie z oblastí membrány s nízkou hustotou do tých častí membrány, ktoré majú vysokú hustotu a sú rozpustné pomocou detergentu (TROUET *et al.* 2001).

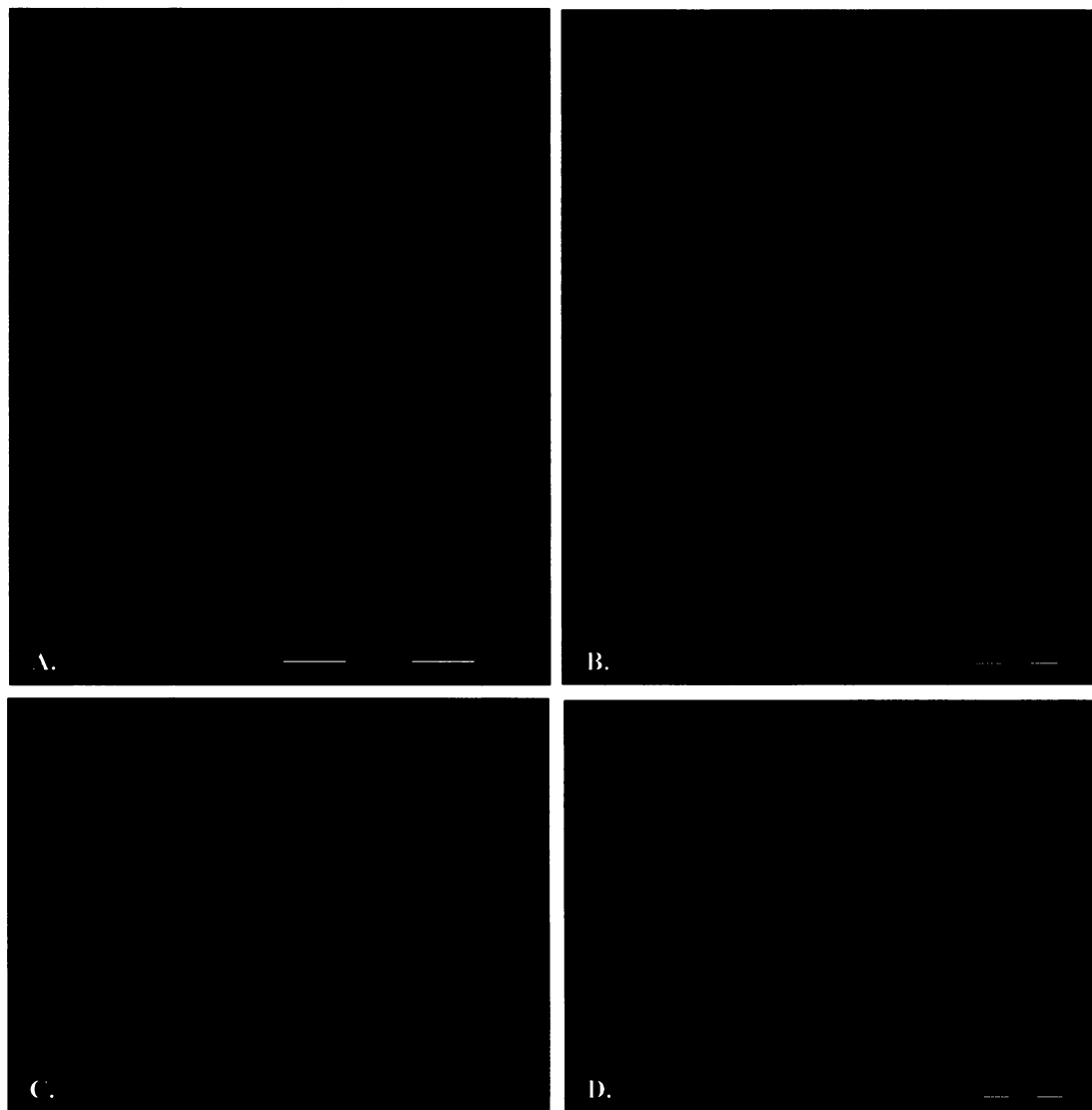
Plazmid pCINeo/IRES-GFP/cav-1 DN (obr. č. 3.1.) umožňujúci expresiu dominantne negatívnej mutanty kaveolínu-1 a GFP bol restriktčne overený Mgr. Lenkou Horníkovou. Po overení plazmidu bola pripravená veľmi čistá DNA bez kontaminujúcich endotoxínov izoláciou plazmidu pomocou kitu „EndoFree Plasmid Maxi Kit QUIAGEN®“ (kapitola 3.2.6.7) z bakteriálnej kultúry *E. coli*, kmeň DH5 α , obsahujúcej príslušný plazmid (kapitola 3.2.5.4.). Bola zmeraná koncentrácia DNA a overená čistota porovnaním absorbancií pri 260 nm a 280 nm. Agarózovou elektroforézou bolo skontrolované, či plazmidy nie sú kontaminované RNA a chromozomálnou DNA alebo degradované.

Bunková línia NMuMG bola transfekovaná 3 μ g DNA pomocou elektroporátoru Amaxa Nucleofector® (kapitola 3.2.2.4.). 24 h po transfekcii boli bunky prehliadnuté pod fluorescenčným mikroskopom, či dochádza k expresii GFP. Účinnosť transfekcie bola približne 10%. Transfekované bunky boli preto ďalej kultivované v prítomnosti selekčného antibiotika geneticínu 7-10 dní, po dosiahnutí konfluencie boli pod fluorescenčným mikroskopom vybrané rezistentné klony exprimujúce GFP (obr. č. 4.2.) a prenesené na 96-jamkovú platničku. Tieto bunky by mali takisto produkovať dominantne negatívnu mutantu kaveolínu-1, pretože obidva gény by sa mali v dôsledku prítomnosti IRES (Internal ribosomal entry site) sekvencie exprimovať z rovnakej mRNA. Po tom, čo bunky dosiahli konfluencie, boli postupne spasáňované na väčšie platničky a opäť boli pod fluorescenčným mikroskopom vybrané rezistentné klony. Selekcia buniek bola skončená, keď bunky produkujúce

GFP tvorili 50% (obr.č. 4.3.). Takto pripravené bunky boli pomnožené a uložené do konzerv v tekutom dusíku.



Obr. č. 4.2.: Zelené kolónie buniek NMuMG transfekované plazmidom pCINeo/IRES-GFP/cav-1 DN po 7-10 dňoch selekcie (A, B). Snímky živých buniek boli vyfotografované na invertovanom fluorescenčnom mikroskope Olympus IX71. Mierka: 100 μ m



Obr. č. 4.3.: Bunky NMuMG produkujúce dominantne negatívnu mutantu kaveolínu-1. Fixované bunky boli vyfotografované na fluorescenčnom mikroskope Olympus BX-60. Proteín GFP bol prifarbený králičou polyklonálnou protilátkou proti GFP a sekundárnou koziou protilátkou Alexa Fluor 488 proti králičím imunoglobulínom (zelená, A - D). DAPI (modrá) sa viaže na bunkovú DNA (A - C).

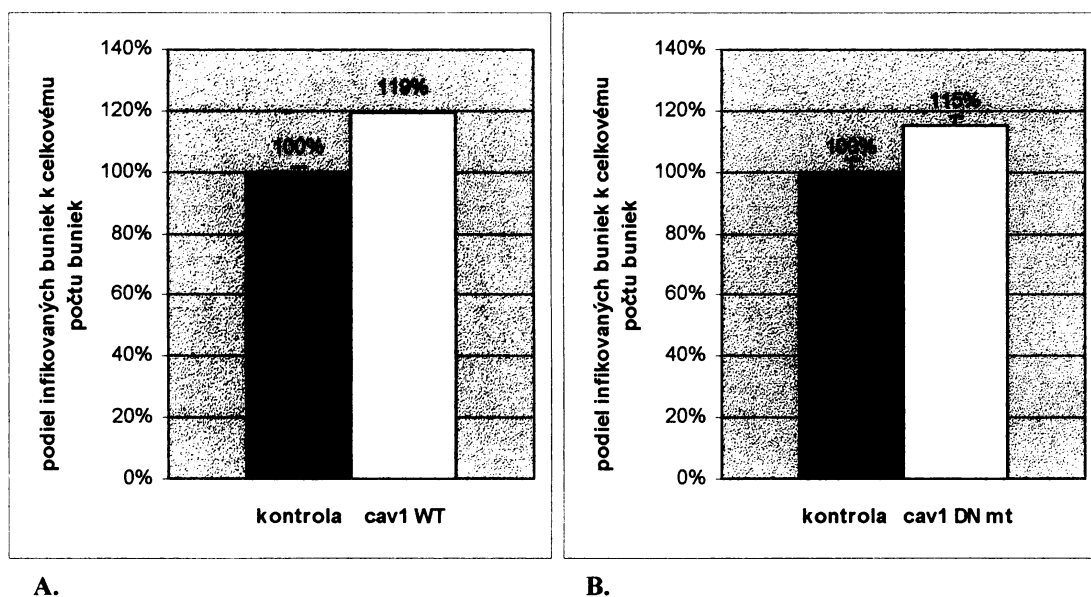
A: Selekcia bola skončená, keď GFP-pozitívne bunky tvorili 50%.

B, C, D: Fenotyp buniek exprimujúcich plazmid pCINeo/IRES-GFP/cav-1 DN.

Mierka: A – 100 μm , B, C, D – 20 μm

4.3. Vplyv expresie génu pre kaveolín-1 dominantne negatívnu mutantu na efektivitu infekcie myšieho polyomavírusu

Bunky NMuMG produkujúce dominantne negatívnu mutantu kaveolínu (cav-1 DN mt) alebo divoký typ (cav-1 WT) boli spásávané na mikroskopické sklíčka, synchronizované a po dosiahnutí 50% konfluencie boli infikované vírusom P16 s multiplicitou infekcie 7 pfu/bunku pri 0°C (kapitola 3.2.2.3.). 24 h po infekcii boli bunky zafixované (kapitola 3.2.2.7.) a prítomnosť GFP a všetkých troch skorých antigénov bola detegovaná imunologicky (kapitola 3.2.2.8.). Fixácia buniek totiž oslabil signál GFP, a preto musel byť zosilnený pomocou protilátky.



Graf č. 4.1.: Vplyv expresie génu pre kaveolín-1 dominantne negatívnu mutantu a divokého typu na efektivitu infekcie polyomavírusu.

A) cav-1 WT, B) cav-1 DN. Infikované bunky boli detekované pomocou primárnej protilátky proti CR (spoločná oblasť všetkých troch skorých antigénov mPyV) a sekundárnej kozej protilátky Alexa Fluor 546 proti krysím imunoglobulínom. GFP bol po fixácii prifarbený králičou polyklonálnou protilátkou proti GFP a sekundárnou koziou protilátkou Alexa Fluor 488 proti králičím imunoglobulínom.

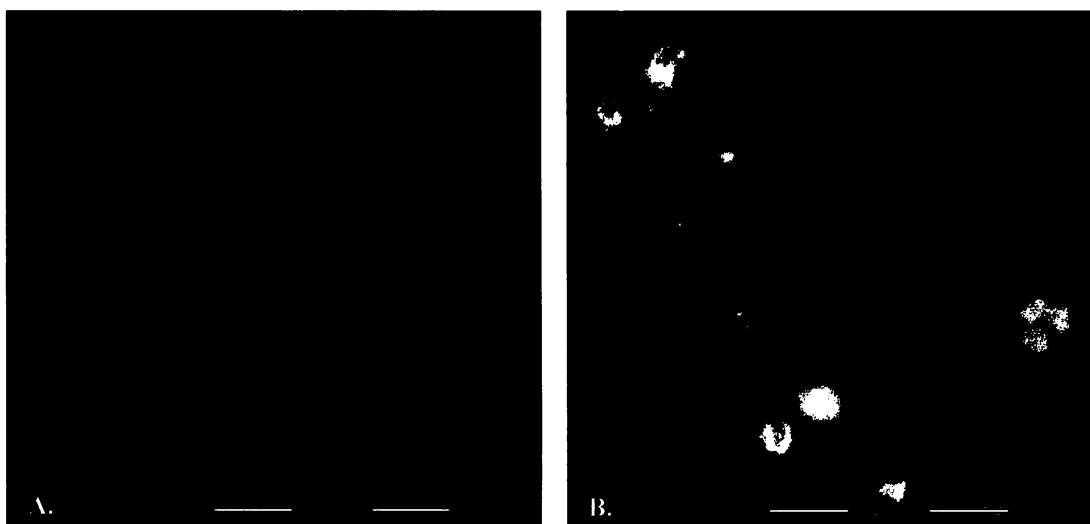
Zelená: Kontrolné bunky bez plazmidu. Pomer infikovaných buniek k celkovému počtu buniek (priemerná hodnota 0,11) bol stanovený ako 100%.

Žltá: Bunky nesúce príslušný plazmid. Pomer infikovaných buniek k celkovému počtu buniek bol percentuálne vyjadrený vzhľadom ku kontrole.

Hodnoty v grafoch reprezentujú 100 optických polí (zväčšenie 400 x) z dvoch nezávislých pokusov.

Infekcia buniek s nadexpresiou divokého typu kaveolínu (*cav-1* WT) tu slúžila ako kontrola; predchádzajúce výsledky ukázali, že expresia divokého typu kaveolínu zvyšuje efektivitu infekcie (LIEBL *et al.* 2006). Ako kontrola ku každej infekcii bola použitá bunková línia NMuMG bez plazmidu.

Produkcia dominantne negatívnej mutanty kaveolínu-1 mierne zvyšovala efektivitu infekcie mPyV oproti kontrole – na 115%, podobne ako kontrolná infekcia divokého typu kaveolínu-1 – na 119% (graf č. 4.1.). Ukážky infekcie NMuMG buniek a zmesi NMuMG + NMuMG-*cav-1* DN mt, z ktorých boli počítané pomery infikovaných a neinfikovaných buniek sú na obr. č. 4.4. Infekcia NMuMG-*cav-1* DN mt je pre lepšie rozlíšenie ešte ukázaná na obr. č. 4.5., kde je vynechané farbenie na DAPI, takže nie sú zobrazené netransfekované bunky.

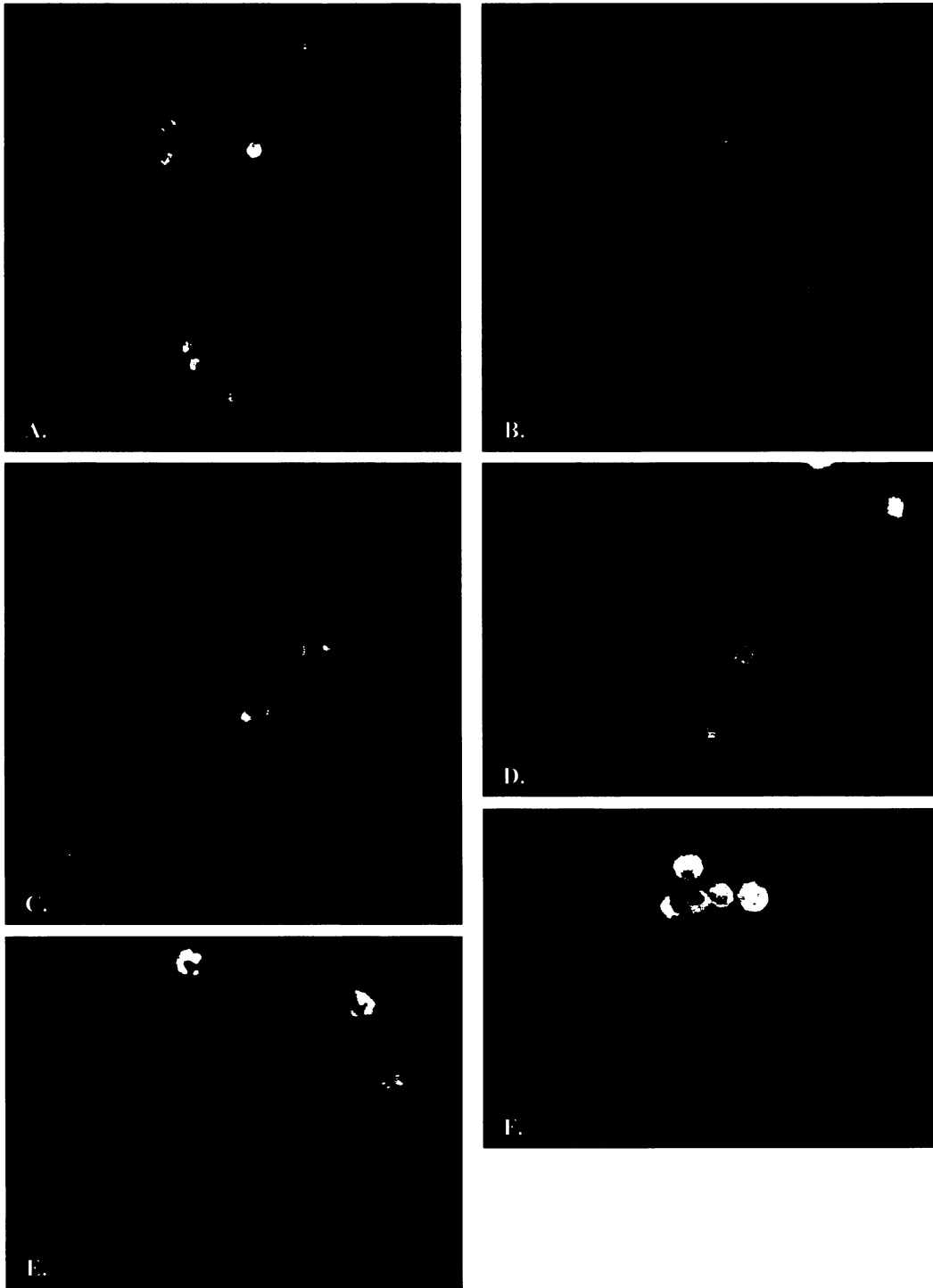


Obr. č. 4.4: Vplyv produkcie kaveolín-1 dominantne negatívnej mutanty na efektivitu infekcie. Bunky NMuMG, resp. NMuMG-*cav-1* DN boli fixované 24 h po infekcii a infikované bunky boli detekované pomocou primárnej protilátky proti CR (spoločná oblasť všetkých troch skorých antigénov mPyV) a sekundárnej kozej protilátky Alexa Fluor 546 proti krysím imunoglobulínom (červená). GFP bol po fixácii prifarbený králičou polyklonálnou protilátkou proti GFP a sekundárnou koziou protilátkou Alexa Fluor 488 proti králičím imunoglobulínom (zelená). Bunková DNA je označená pomocou DAPI (modrá). Na snímkoch sú ukážky optických polí pre počítanie infikovaných buniek. Snímky boli vyfotografované na fluorescenčnom mikroskope Olympus BX-60

A: Kontrolná infekcia NMuMG buniek.

B: Infekcia NMuMG-*cav-1* DN

Mierka: 100 μ m



Obr. č. 4.5: Vplyv produkcie kaveolín-1 dominantne negatívnej mutanty na efektivitu infekcie (A – F). Bunky NMuMG-cav-1 DN boli fixované 24 h po infekcii a infikované bunky boli detekované pomocou primárnej protilátky proti CR (spoločná oblasť všetkých troch skorých antigénov mPyV) a sekundárnej kozej protilátky Alexa Fluor 546 proti krysím imunoglobulínom (červená). GFP bol po fixácii prifarbený králičou polyklonálnou protilátkou proti GFP a sekundárnou koziou protilátkou Alexa Fluor 488 proti králičím imunoglobulínom (zelená). Na snímkoch sú ukážky optických polí pre počítanie infikovaných buniek. Snímky boli vyfotografované na fluorescenčnom mikroskope Olympus BX-60.

Mierka: A - C: 100 μ m, D - F: 50 μ m

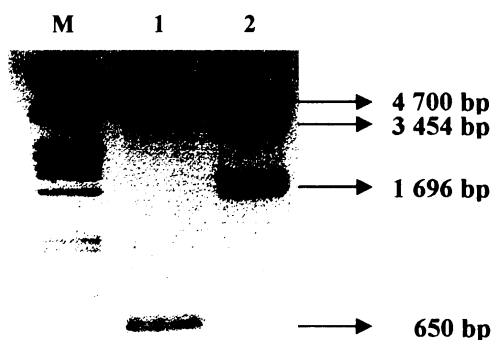
4.4. Vplyv expresie génu pre Rab11 dominantne negatívnu mutantu (Rab11S25N, Rab11 DN mt) na efektivitu infekcie

Rab11 je malý GTP väzbový proteín asociovaný s recyklujúcimi endozómami (RE) nachádzajúcimi sa v pericentriolárnej oblasti (ULLRICH *et al.* 1996, SÖNNICHSEN *et al.* 2000), ale jeho prítomnosť bola detekovaná aj v *trans* Golgiho aparáte (TGA) a post Golgiho váčkoch (URBÉ *et al.* 1993). Rab11 reguluje transport cez recyklujúce endozómy a pomocou konfokálnej a elektrónovej mikroskopie bolo ukázané, že v RE kolokalizuje internalizovaný transferín (Tfn) s Rab11 (ULLRICH *et al.* 1996).

Rab11S25N je dominantne negatívna mutanta Rab11, ktorá preferenčne viaže GDP. Produkcia Rab11S25N inhibuje transport internalizovaného Tfn z RE k plazmatickej membráne, spôsobuje fragmentáciu RE v cytoplazme (ULLRICH *et al.* 1996) a takisto inhibuje transport Tfn zo skorých triediacich endozómov na bunkový povrch (REN *et al.* 1998). Neskôr bolo ukázané, že produkcia Rab11 dominantne negatívnej mutanty inhibuje transport STxB (B podjednotka Shiga toxínu, ktorá sa dostáva z plazmatickej membrány do ER retrográdnym transportom z GA) a transport TGN38 (bunkový proteín, ktorý recykluje medzi plazmatickou membránou a trans GA cez skoré endozómy) z endozómov do GA (WILCKE *et al.* 2000).

V našom laboratóriu bola pomocou konfokálnej mikroskopie pozorovaná subpopulácia myšieho PyV v recyklujúcich endozómoch 1,5 a 3 h po infekcii (MANNOVÁ a FORSTOVÁ 2003, LIEBL *et al.* 2006). Nás zaujímalo, či recyklujúce endozómy sú súčasťou produktívnej cesty pri vstupe mPyV. Preto sme sa rozhodli zistiť, aký má expresia génu pre dominantne negatívnu mutantu Rab11 vplyv na efektivitu infekcie mPyV.

Plazmid pEGFP-C3-Rab11S25N (obr. č. 3.2.) umožňujúci produkciu GFP – fúzneho proteínu Rab11 DN bol restriktčne overený (obr. č. 4.6.). Po štiepení restriktčnými enzýmami *XhoI* a *HindIII* by mali vzniknúť dva fragmenty veľké 4700 bp a 650 bp a po štiepení restriktčnými enzýmami *NheI* a *MluI* dva fragmenty veľké 3454 bp a 1696 bp.



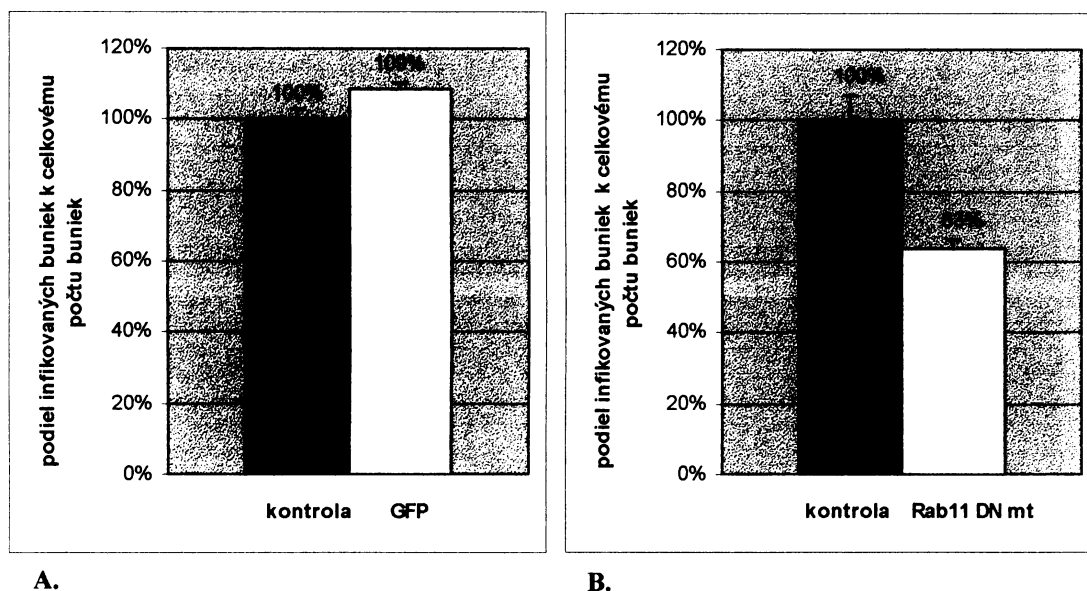
Obr.č. 4.6.: Restriktčné overenie plazmidu pEGFP-C3-Rab11S25N.

M: marker molekulových hmotností Lambda DNA/*PstI*, **dráha 1:** štiepenie restriktčnými enzýmami *XhoI* a *HindIII*, **dráha 2:** štiepenie restriktčnými enzýmami *NheI* a *MluI*.

Po overení plazmidu bola pripravená veľmi čistá DNA bez kontaminujúcich endotoxínov izoláciou pomocou kitu „EndoFree Plasmid Maxi Kit QUIAGEN®“ (kapitola 3.2.6.7) z bakteriálnej kultúry *E. coli*, kmeň DH5 α , obsahujúcej príslušný plazmid (kapitola 3.2.5.4.). Bola zmeraná koncentrácia DNA a overená čistota porovnaním absorbancií pri 260 nm a 280 nm. Agarózovou elektroforézou bolo skontrolované, či plazmidy nie sú kontaminované RNA a chromozomálnou DNA alebo degradované. Tým istým spôsobom bola pripravená čistá plazmidová DNA pEGFP-C2 (z tohto plazmidu je exprimovaný iba GFP) Mgr. Sandrou Huerfano.

Bunková línia 3T6 bola tranzientne transfekovaná 3 μ g DNA plazmidom pEGFP-C3-Rab11S25N alebo pEGFP-C2 pomocou elektroporátoru Amaxa Nucleofector® (kapitola 3.2.2.4.) a bunky boli rozdelené na mikroskopické sklíčka v 24-jamkovej platničke. 24 h po transfekcii boli bunky prehliadnuté pod fluorescenčným mikroskopom, či dochádza k expresii GFP. Bunky boli po synchronizácii infikované polyomavírusovým kmeňom P16 s multiplicitou infekcie 7 pri 0°C (3.2.2.3.). 24 h po infekcii boli bunky zafixované (kapitola 3.2.2.7.) a prítomnosť GFP a všetkých troch

skorých antigénov bola detegovaná imunologicky (kapitola 3.2.2.8.). Ako kontrola boli spočítané bunky NMuMG bez plazmidu.



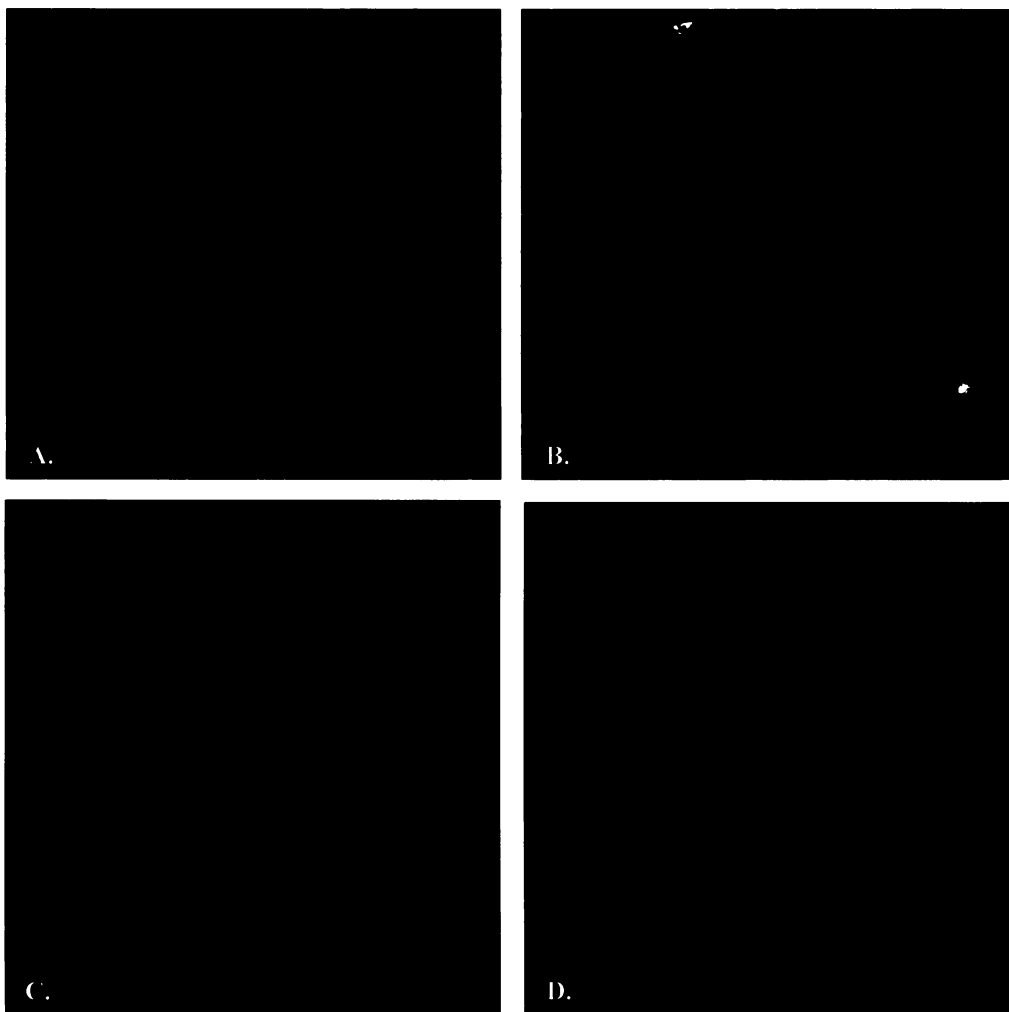
Graf č. 4.2.: Vplyv expresie génu pre Rab11 dominantne negatívnu mutantu, resp. samotného GFP na efektivitu infekcie polyomavírusu. A) GFP, B) Rab11 DN.

Infikované bunky boli detekované pomocou primárnej protilátky proti CR (spoločná oblasť všetkých troch skorých antigénov mPyV) a sekundárnej kozej protilátky Alexa Fluor 546 proti krysím imunoglobulínom. GFP bol po fixácii prifarbený králičou polyklonálnou protilátkou proti GFP a sekundárnou koziou protilátkou Alexa Fluor 488 proti králičím imunoglobulínom. Zelená: Kontrolné bunky bez plazmidu. Pomer infikovaných buniek k celkovému počtu buniek (priemerná hodnota 0,14) bol stanovený ako 100%.

Žltá: Bunky nesúce príslušný plazmid. Pomer infikovaných buniek k celkovému počtu buniek bol percentuálne stanovený vzhľadom ku kontrole.

Hodnoty v grafoch reprezentujú 120 optických polí (v prípade Rab11 DN) a 45 zorných polí (pre GFP) z dvoch nezávislých pokusov (zväčšenie 400 x).

Expresia génu pre Rab11 dominantne negatívnu mutantu výrazne znižovala efektivitu infekcie polyomavírusu – až o 37% (obr. č. 4.7., graf č. 4.2.B). Bunková expresia prázdneho plazmidu pEGFP-C2 nemala podstatný vplyv na polyomavírusovú infektivitu (graf č.4.2.A). Tieto výsledky naznačujú, že recyklujúce endozómy sú bunkový kompartment, ktorý sa podieľa na produktívnej infekcii mPyV.



Obr. č. 4.7: Vplyv expresie génu pre Rab11 dominantne negatívnu mutantu na efektivitu infekcie.

A, B: Pomer infikovaných a neinfikovaných buniek produkujúcich fúzny proteín Rab 11 DN - GFP (zelené bunky) a okolitých (kontrolných) netransfekovaných 3T6 buniek. Bunky boli fixované 24 h po infekcii a infikované bunky boli detekované pomocou primárnej protilátky proti CR (spoločná oblasť všetkých troch skorých antigénov mPyV) a sekundárnej kozej protilátky Alexa Fluor 546 proti krysím imunoglobulínom (červená). Proteín GFP bol po fixácii prifarbený králičou polyklonálnou protilátkou proti GFP a sekundárnou koziou protilátkou Alexa Fluor 488 proti králičím imunoglobulínom (zelená). Bunková DNA je označená pomocou DAPI (modrá). Na snímkoch sú ukážky optických polí pre počítanie infikovaných buniek.

C,D: Fenotyp buniek exprimujúcich plazmid pEGFP-C3-Rab11S25N. Proteín GFP bol po fixácii prifarbený králičou polyklonálnou protilátkou proti GFP a sekundárnou koziou protilátkou Alexa Fluor 488 proti králičím imunoglobulínom (zelená).

Snímky boli vyfotografované na fluorescenčnom mikroskope Olympus BX-60.

Mierka: A , B: 200 μ m, C, D: 50 μ m

4.5. Vplyv inhibície proteazómu na efektivitu infekcie polyomavírusu

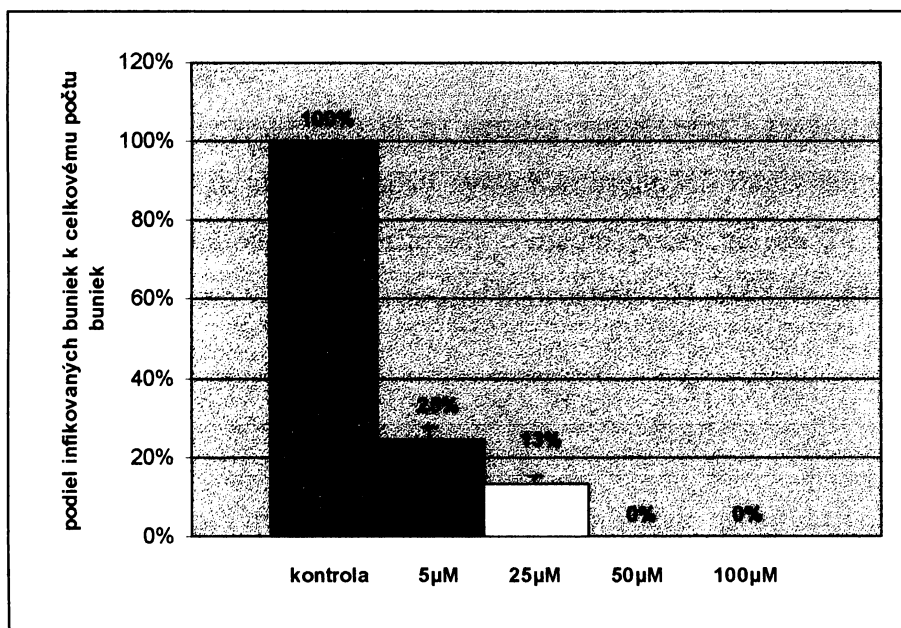
Ako bolo popísané v kapitole 2.3.5.2., niektoré vírusy, ktoré sa počas transportu bunkou dostávajú do endozómov, interagujú po ich opustení s cytoplazmatickými proteázami. Na jednej strane môže ubiquitín – proteazomálny systém bunky predstavovať prekážku pre vstupujúci virión, ale v súčasnej dobe sa hromadia poznatky o vírusoch, ktorých produktívna infekcia je na funkčnom proteazomálnom systéme závislá. Nás preto zaujímalo, či proteazóm hrá nejakú úlohu v skorej fáze infekcie mPyV.

Po naštudovaní dostupnej literatúry bol zo širokého spektra rôznych komerčných proteazomálnych inhibítorov vybraný inhibítor MG-132, ktorý sa pre naše účely javil ako najvhodnejší. Vplyv MG-132 na bunkové proteazómy je reverzibilný a ovplyvňuje proteazóm len v určitom, nami požadovanom čase. Schopnosť proteazómov degradovať peptidy je úplne obnovená 1 h po odstránení inhibítora z média. (PALOMBELLA *et al.* 1994, ROCK *et al.* 1994, LEE a GOLDBERG 1996).

4.5.1. Vplyv vzrastajúcej koncentrácie reverzibilného proteazomálneho inhibítora MG-132 na efektivitu infekcie mPyV

Pokus bol urobený podľa metódy popísanej v kapitole 3.2.4.1. Inhibítor MG-132 bol nariadený v bezsérovom médiu, resp. v médiu so sérom na konečnú koncentráciu 5 μM , 25 μM , 50 μM a 100 μM a pridaný k bunkám línie 3T6 (táto bunková línia bola používaná vo všetkých nasledujúcich inhibičných pokusoch). Inhibítor bol k bunkám pridaný 1 h pred infekciou (aby bola zaručená inhibícia proteazómu už v čase, keď sú bunky infikované) a z kultúry buniek bol odstránený 4 h po infekcii. Bunky boli infikované vírusom P16 s multiplicitou infekcie 0,1 pfu/bunku pri 0°C (kapitola 3.2.2.3.). Po odmytí inhibítora a neutralizácii neinternalizovaného vírusu boli bunky inkubované v čerstvom médiu ďalších 11,5 h (t.j. infekcia prebiehala po dobu 16 h od absorpcie).

Z grafu č. 4.3. je zrejmé, že so zvyšujúcou sa koncentráciou proteazomálneho inhibítora sa výrazne znižuje efektivita infekcie mPyV. Pri použití koncentrácie 5 μM klesla efektivita infekcie o 75% oproti kontrole, pri použití koncentrácie 25 μM klesla efektivita infekcie o 87% oproti kontrole a v prípade použitia koncentrácií 50 μM a 100 μM bola inhibícia efektivity infekcie 100%. Z toho vyplýva, že funkčné bunkové proteazómy sú nutnou podmienkou pre skoré štádiá mPyV infekcie.



Graf č. 4.3.: Vplyv vzrastajúcej koncentrácie reverzibilného proteazomálneho inhibítora MG-132 na efektivitu infekcie.

Inhibítor nariadený na rôzne koncentrácie bol do média pridaný 1 h pred infekciou a odmytý bol 4 h po infekcii. Po odmytí inhibítora a neutralizácii neinternalizovaného vírusu boli bunky ďalej inkubované v čerstvom médiu ešte 11,5 h. Infikované bunky boli detekované pomocou primárnej protilátky proti CR (spoločná oblasť všetkých troch skorých antigénov mPyV) a sekundárnej kozej protilátky Alexa Fluor 488 proti krysím imunoglobulínom.

Modrá: Kontrolné bunky bez inhibítora. Tieto bunky boli inkubované s DMSO (použitý na rozpustenie inhibítora, množstvo pridávaného DMSO do kontroly zodpovedá množstvu inhibítora pridaného do vzoriek). Pomer infikovaných buniek k celkovému počtu buniek (priemerná hodnota 0,15) bol stanovený ako 100%.

Ostatné stĺpce: Vzorky s prítomným inhibítorm. Pomer infikovaných buniek k celkovému počtu buniek bol percentuálne vyjadrený vzhľadom ku kontrole.

Hodnoty v grafoch reprezentujú 50 optických polí (zväčšenie 400 x) z dvoch nezávislých pokusov.

4.5.2. Stanovenie cytotoxicity MG-132

Pri používaní inhibítorov sa môže stať, že blokácia nejakej dôležitej bunkovej funkcie má negatívny vplyv na životaschopnosť bunky. Preto sme sa rozhodli zistiť, či nami používané koncentrácie ovplyvňujú viabilitu buniek v kultúre stanovením cytotoxicity inhibítora po 5h a takisto po 24 h (kapitola 3.2.4.2.). Kontrolné bunky boli inkubované s DMSO, cytotoxicita bola stanovená ako podiel mŕtvych buniek k celkovému počtu buniek a bola vyjadrená percentuálne, rovnako ako vo vzorkách, kde bol prítomný inhibítor.

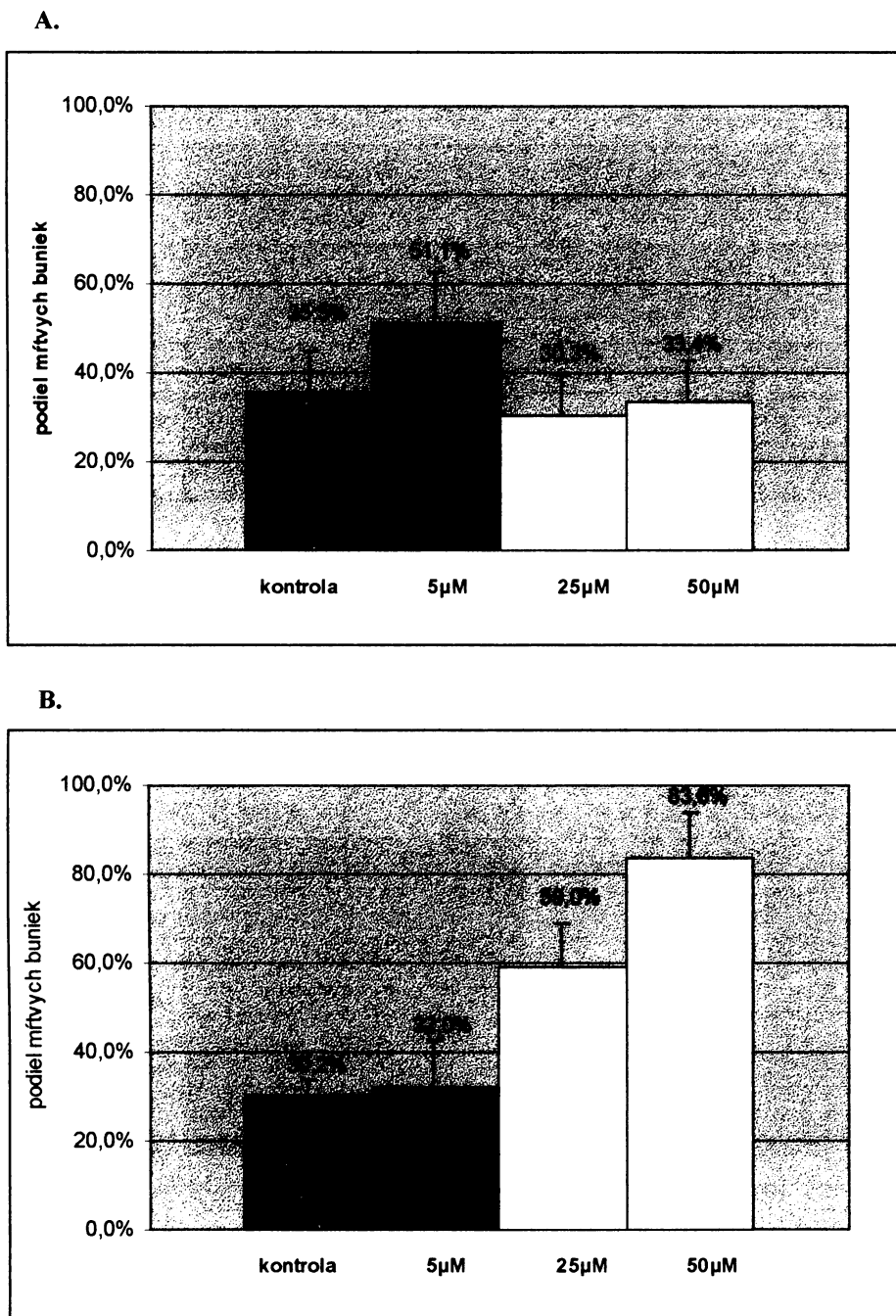
Krátkodobé pôsobenie inhibítora (5 h) nemalo v porovnaní s kontrolou vplyv na životaschopnosť buniek ani pri použití vyšších koncentrácií inhibítora (graf č. 4.4. A). V prípade, že inhibítor bol prítomný v médiu počas celých 24 h, percento mŕtvych buniek výrazne vzrástlo pri použití koncentrácií 25 μM a 50 μM (graf č. 4.4. B).

4.5.3. Vplyv multiplicity infekcie na mieru inhibície produktívnej infekcie proteazomálnym inhibítorom

Ďalej nás zaujímalo, či zvyšujúca sa multiplicita vírusu bude mať vplyv na mieru inhibície produktívnej infekcie proteazomálnym inhibítorom. Pokus bol urobený podľa metódy popísanej v kapitole 3.2.4.1. Inhibítor MG-132 bol nariadený v bezsérovom médiu, resp. v médiu so sérom na konečnú koncentráciu 25 μM a pridaný k bunkám 1 h pred infekciou a odstránený 4 h po infekcii. Bunky boli infikované vírusom P16 (kapitola 3.2.2.3.) s multiplicitou infekcie 1,7 pfu/bunku, resp. 6 pfu/bunku pri 0°C. Po odmytí inhibítora a neutralizácii neinternalizovaného vírusu boli bunky ďalej inkubované v čerstvom médiu ešte 11,5 h (t.j. infekcia prebiehala po dobu 16 h od absorpcie).

V prípade, že boli bunky infikované s M.O.I. = 1,7 pfu/bunku, proteazomálny inhibítor mal podobne ako v predchádzajúcom prípade (kapitola 4.5.1.) výrazný vplyv na efektivitu infekcie – so zvyšujúcou sa koncentráciou inhibítora sa znižoval podiel infikovaných buniek a pri použití koncentrácie 50 μM bola inhibícia infekcie 100% (graf č. 4.5. A). Avšak v prípade, že bunky boli infikované s M.O.I. = 6 pfu/bunku, koncentrácie 5 μM a 25 μM nemali na efektivitu infekcie žiadny vplyv,

najvyššia použitá koncentrácia 50 μM spôsobila iba mierny pokles (o 22%) infekivity (graf č. 4.5. B). Z týchto pokusov vyplýva, že v prípade, že sú bunky infikované s vyššou multiplicitou infekcie, efektivita infekcie už nie je závislá na prítomnosti funkčných proteazómov.



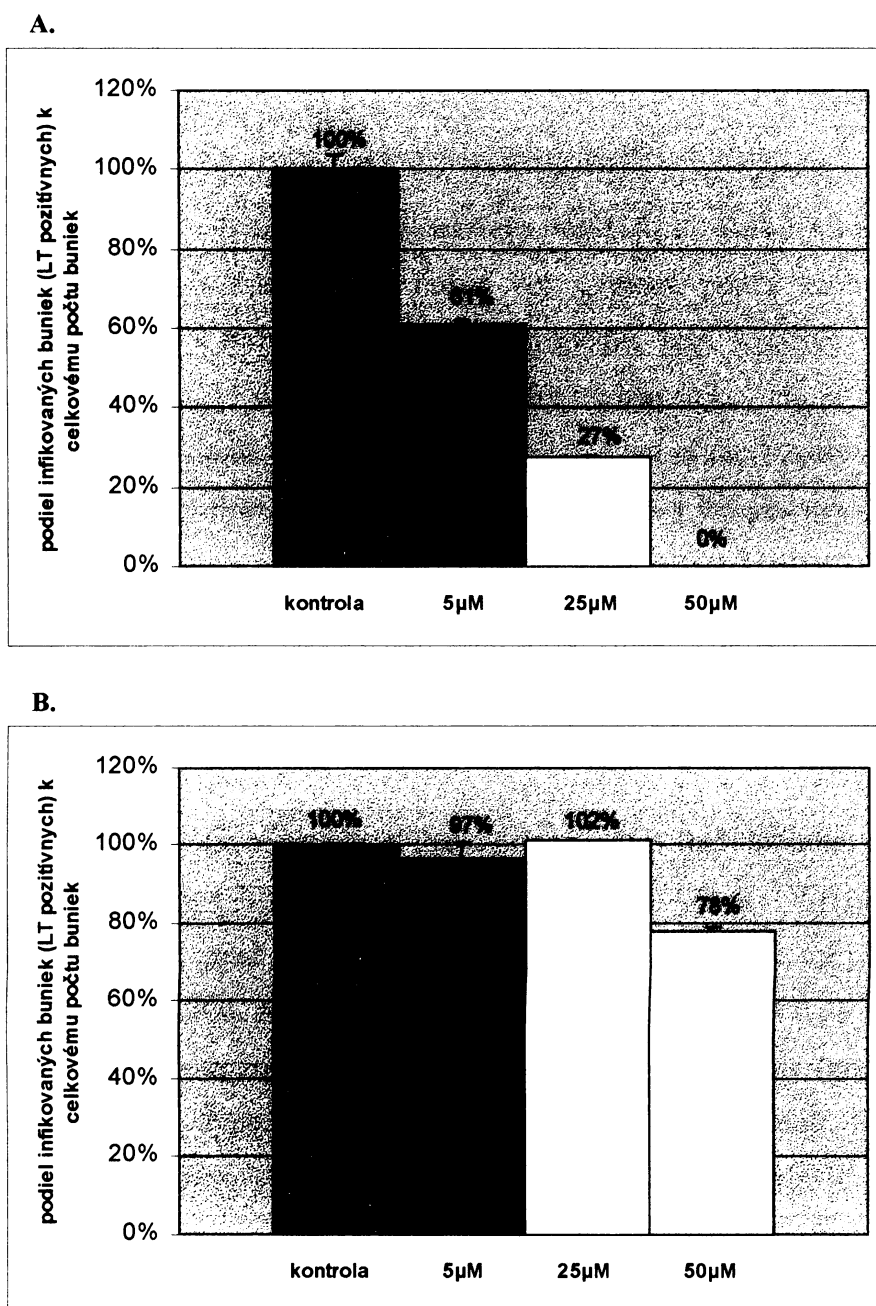
Graf č. 4.4.: Cytotoxicita MG-132.

A) Inhibitor nariadený na rôzne koncentrácie bol v médiu prítomný 5 h a odmytý. Bunky boli ďalej kultivované v čerstvom médiu ešte 19 h. B) Inhibitor bol prítomný v médiu 24 h. Mŕtve bunky boli od živých rozlíšené pomocou propidium jodidu. Hodnoty v grafoch reprezentujú pomer mŕtvych buniek k celkovému počtu buniek a tento podiel je vyjadrený v percentách.

Modrá: Kontrolné bunky bez inhibítora. Tieto bunky boli inkubované s DMSO.

Ostatné stĺpce: Vzorky s prítomným inhibítorm.

Hodnoty v grafoch reprezentujú 60 optických polí (zväčšenie 400 x) z dvoch nezávislých pokusov.



Graf č. 4.5.: Vplyv multiplicity infekcie na mieru inhibície produktívnej infekcie proteazomálnym inhibítorm

A) Infekcia s M.O.I. = 1,7 pfu/bunku. B) Infekcia s M.O.I. = 6 pfu/bunku.

Inhibitor nariadený na rôzne koncentrácie bol do média pridaný 1 h pred infekciou a odmytý bol 4 h po infekcii. Po odmytí inhibítora a neutralizácii neinternalizovaného vírusu boli bunky ďalej inkubované v čerstvom médiu ešte 11,5 h. Infikované bunky boli detekované pomocou primárnej protilátky proti CR (spoločná oblasť všetkých troch skorých antigénov mPyV) a sekundárnej kozej protilátky Alexa Fluor 488 proti krysim imunoglobulínom.

Modrá: Kontrolné bunky bez inhibítora. Tieto bunky boli inkubované s DMSO. Pomer infikovaných buniek k celkovému počtu buniek bol stanovený ako 100%.

Ostatné stĺpce: Vzorky s prítomným inhibítorm. Pomer infikovaných buniek k celkovému počtu buniek bol percentuálne vyjadrený vzhľadom ku kontrole.

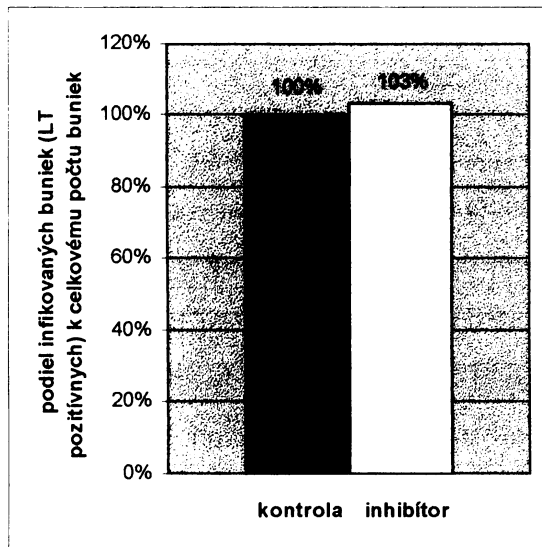
Hodnoty v grafoch reprezentujú 60 optických polí (zväčšenie 400 x) z dvoch nezávislých pokusov.

4.5.4. Vplyv inhibície proteazómu na infekciu mPyV v intervale skorej transkripcie a zahájenia replikácie

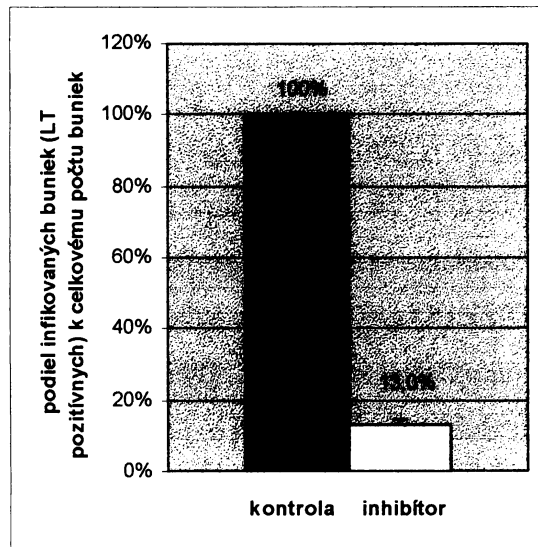
Ďalej nás zaujímalo, či inhibícia proteazómu inhibuje aj ďalšie štádiá vírusovej infekcie, napr. skorú transkripciu. Pokus bol urobený podľa kapitoly 3.2.4.1. Inhibítor MG-132 bol nariadený v bezsérovom médiu, resp. v médiu so sérom na konečnú koncentráciu 25 μM a pridaný k bunkám v rôznych časoch: A) Inhibítor bol pridaný 4 h pred infekciu na 4 h (-4/0), B) Inhibítor bol pridaný hneď po adsorpcii vírusu a ponechaný v médiu po dobu 4 h (0/4), C) Inhibítor bol pridaný v čase 4 h po infekcii a takisto ponechaný v médiu 4 h (4/8). Bunky boli infikované vírusom P16 (kapitola 3.2.2.3.) s multiplicitou infekcie 0,1 pfu/bunku, adsorpcia prebiehala pri 0°C. Po odmytí inhibítora a neutralizácii neinternalizovaného vírusu boli bunky ďalej inkubované v čerstvom médiu ešte 11,5 h (t.j. infekcia prebiehala po dobu 16 h od absorpcie).

Inhibícia infekcie bola pozorovaná iba v prípade, keď bol inhibítor pridaný po adsorpcii vírusu na 4 h a to výrazná – 87% (graf č. 4.6. B). V prípade, že bol inhibítor pridaný 4 h pred infekciou na 4 h, na efektivitu infekcie mPyV to nemalo žiadny vplyv (graf č. 4.6. A). V prípade, že bol inhibítor pridaný 4 h po infekcii na 4 h, efektivita infekcie sa znížila iba mierne – o 16% oproti kontrole (graf č. 4.6. C). Z týchto výsledkov vyplýva, že bunkový proteazóm sa uplatňuje len v prvých hodinách polyomavírusovej infekcie a nemá vplyv na skorú transkripciu.

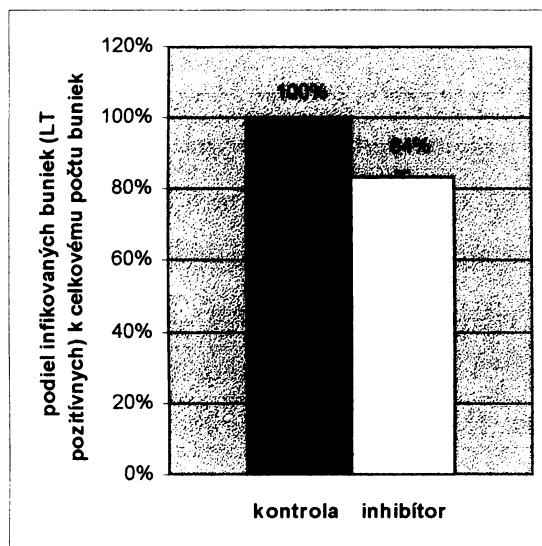
A. -4/0



B. 0/4



C. 4/8



Graf č. 4.6.: Časový priebeh inhibície infekcie proteazomálnym inhibítorom.

Inhibítor (25 μ M) bol k bunkám pridávaný v rôznych časoch pred / po infekcii: A.) -4/0: inhibítor bol v médiu prítomný 4 h pred infekciou, B.) 0/4: inhibítor bol pridaný hneď po adsorpcii vírusu a ponechaný v médiu po dobu 4 h, C.) 4/8: inhibítor bol prítomný v médiu v čase 4h po infekcii a takisto ponechaný v médiu 4 h. Po odmytí inhibítora a neutralizácii naviazaného vírusu boli bunky ďalej inkubované v čerstvom médiu, infekcia bola skončená 16 h po adsorpcii vírusu. Infikované bunky boli detekované pomocou primárnej protilátky proti CR (spoločná oblasť všetkých troch skorých antigénov mPyV) a sekundárnej kozej protilátky Alexa Fluor 488 proti kryším imunoglobulínom.

Zelená: Kontrolné bunky bez inhibítora. Tieto bunky boli inkubované s DMSO. Pomer infikovaných buniek k celkovému počtu buniek (priemerná hodnota 0,12) bol stanovený ako 100%.

Žltá: Vzorky s prítomným inhibítorom. Pomer infikovaných buniek k celkovému počtu buniek bol percentuálne vyjadrený vzhľadom ku kontrole.

Hodnoty v grafoch reprezentujú 40 optických polí (zväčšenie 400 x) z dvoch nezávislých pokusov.

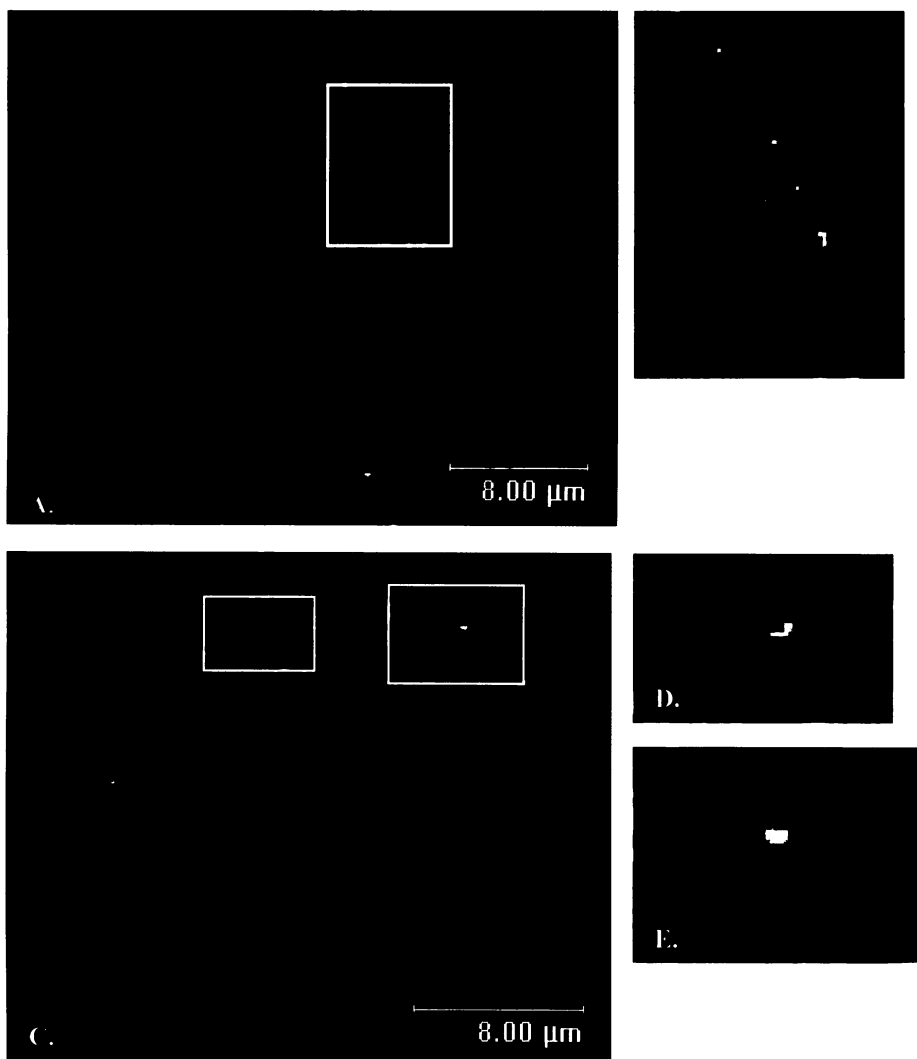
4.6. Možnosť existencie alternatívnej dráhy mPyV

Ako bolo už uvedené v kapitole 2.2.1.2., spôsob dopravy genómu mPyV do jadra bunky je stále neznámy. Elektrónovou mikroskopiou boli virióny SV40 a mPyV detekované v perinukleárnom priestore dvojitej jadrovej membrány a takisto aj v jadre (MATTERN *et al.* 1966, HUMMLER *et al.* 1970, MACKAY a CONSIGLI 1976, MAUL *et al.* 1978, KARTENBECK *et al.* 1989). Za pomoci elektrónovej mikroskopie boli ojedinelé virióny mPyV detekované v jadre a v perinukleárnom priestore už veľmi skoro po infekcii, v rozmedzí 15 min a 1 h po infekcii (LIEBL, nepublikované výsledky). Bola preto vyslovená hypotéza, že mPyV by mohol využívať nejakú inú, rýchlejšiu alternatívnu dráhu dopravy genómu do jadra. Nás zaujímalo, či bude pomocou konfokálnej mikroskopie možné detekovať signál majoritného kapsidového proteínu mPyV VP1 v tesnej blízkosti jadrovej membrány aj vo veľmi skorých časoch po infekcii.

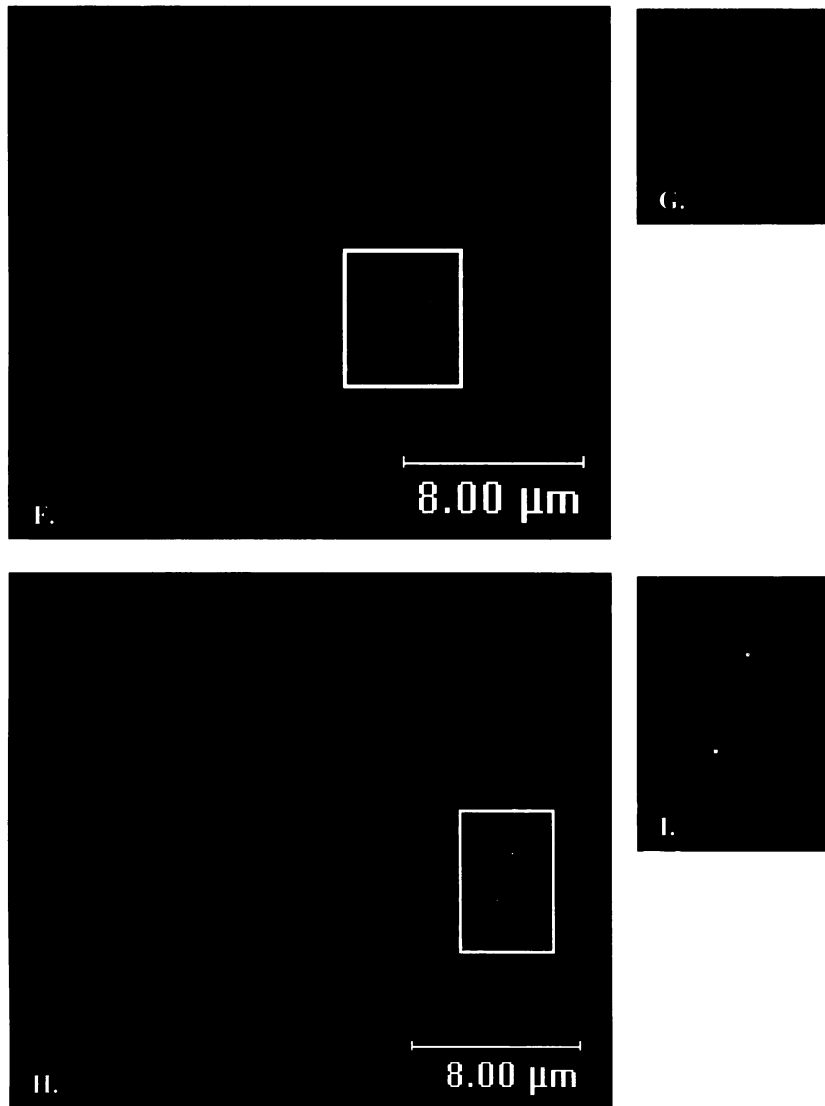
Buky 3T6 boli infikované mPyV, kmeň P16 (kapitola 3.2.2.3.) a 1 h po infekcii boli fixované. Fixované bunky boli zafarbené protilátkou proti VP1 a protilátkou proti nukleoporínu, resp. faloidínom konjugovaným s rodamínom. Snímky boli nafotené konfokálnym mikroskopom Leica TSC.

Pomocou konfokálnej mikroskopie sme detekovali signál VP1 v tesnej blízkosti jadra už 1 h po infekcii. Tento signál, hoci bol na úrovni jadrovej membrány (alebo v jej bezprostrednej blízkosti), iba zriedka kolokalizoval so signálom nukleoporínu (obr. č. 4.8.).

Na obrázku č. 4.9. sú vidieť konfokálne rezy jedinou bunkou. Na nich je viditeľné, že niektoré vírusové častice sú v blízkosti jadrovej membrány alebo v jadre (šipkou označené signály), ktoré sa vyskytujú v jednom reze, avšak nie v susedných rezoch.



(popis obrázku je na následující strane)



Obr. č. 4.9. Kolokalizácia VP1 s nukleoporínom 1 h po infekcii.

Bunky 3T6 boli infikované mPyV a fixované 1 h po infekcii. Proteín VP1 bol detekovaný pomocou primárnej králičej polyklonálnej protilátky proti VP1 a sekundárnej kozej protilátky Alexa Fluor 546 proti králičím imunoglobulínom (červená). Jadrové póry boli detekované myšiou monoklonálnou protilátkou proti NUP153 a sekundárnou osliou protilátkou Alexa Fluor 488 proti myším imunoglobulínom (zelená). Snímky boli vyfotografované konfokálnym mikroskopom Leica TSC.

A, C, F, H - konfokálny rez bunkou - zložený obraz

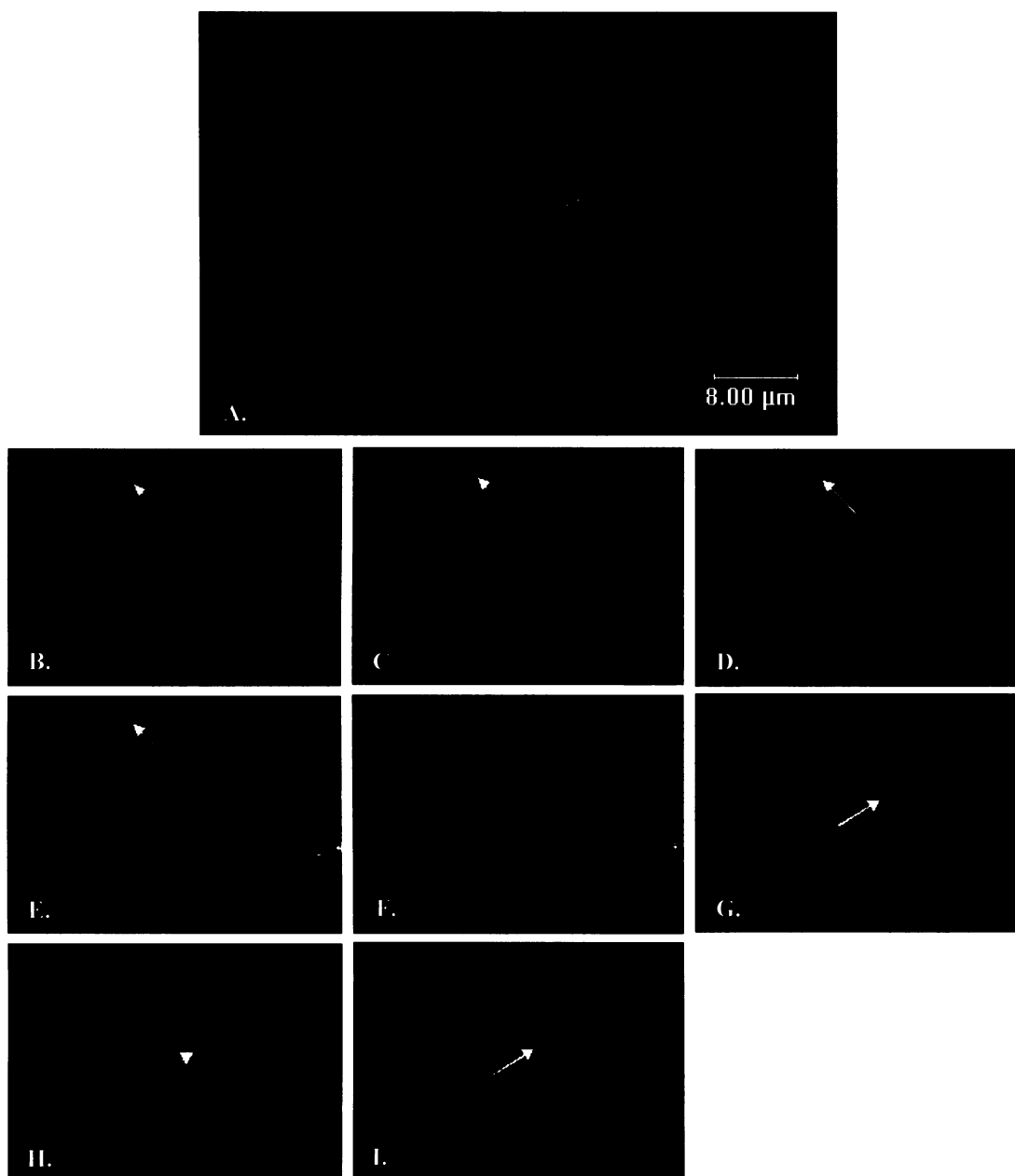
B - vybraný detail v bunke na obr. A

D, E - vybrané detaily v bunke na obr. C

G - vybraný detail v bunke na obr. F

I - vybraný detail v bunke na obr. H

Mierka: 8 μm



Obr. č. 4.9. Detekcia signálu VP1 v blízkosti jadra 1 h po infekcii.

Bunky 3T6 boli infikované mPyV a fixované 1 h po infekcii. Proteín VP1 bol detekovaný pomocou primárnej králičej polyklonálnej protilátky proti VP1 a sekundárnej kozej protilátky Alexa Fluor 488 proti králičím imunoglobulínom (zelená). Aktín bol zafarbený faloidínom konjugovaným s rodamínom (červená). Bunková DNA je označená pomocou DAPI (modrá). Snímky boli vyfotené konfokálnym mikroskopom Leica TSC, hrúbka konfokálnych rezov je 958 nm.

A: zložený obraz bunky; mierka: 8 μm

B – I: konfokálne rezy po sebe nasledujúcich vrstiev, vybraný detail bunky. Farebné šípky označujú prítomnosť, resp. neprítomnosť signálu VP1 v danom reze na konkrétnom mieste v bunke. Žltá šípka: VP1 signál prítomný v reze D; červená šípka: VP1 signál prítomný v reze D; zelená šípka: VP1 signál prítomný v reze G; biela šípka: VP1 signál prítomný v reze H;

5. Diskusia

5.1. Izolácia vírusu

Pri izolácii vírusu sme postupovali podľa postupu TÚRLER a BEARD (1985). Na základe tohto postupu by sa infekčné virióny mali vyskytovať vo frakcii č. 2, zatiaľ čo prázdne virióny by sa mali prevažne nachádzať vo frakcii č. 3. Z výsledkov uvedených tabuľke č. 4.2. vyplýva, že vo frakcii č. 3 sa nachádza viac infekčných viriónov ako vo frakcii č. 2.

Tento rozporuplný výsledok by mohol byť vysvetlený tým, že plné virióny prítomné vo frakcii č. 2 sú neinfekčné pseudovirióny (virióny s enkapsidovanou bunkovou DNA), ktoré majú rovnakú vznášavú hustotu a nedajú sa rozlíšiť ani pri elektrónmikroskopickej analýze. Navyše, pre lepšie oddelenie rozpadnutých, prázdnych a plných viriónov by bolo nutné opakovane použiť gradientové centrifugácie (kombináciu CsCl gradientu a gradientu cez 10% sacharózu).

Aj napriek nižšiemu infekčnému titru a vyššiemu hemaglutinačnému titru sme sa rozhodli v nasledujúcich pokusoch použiť frakciu č. 2, pretože z elektrónmikroskopických snímok je zrejmé, že sa v tejto frakcii nachádza menej rozpadnutého materiálu.

5.2. Účast' kaveolínu-1 pri infekcii

Vírusy, ktoré sú obligatórnyimi bunkovými parazitmi, museli vyvinúť mechanizmus, ako vstúpiť do bunky za účelom zahájenia replikácie a úspešného pomnoženia sa. Vo všeobecnosti sa vírusy môžu dostať do živočíšnej bunky dvoma hlavnými spôsobmi: priamou fúziou vírusového obalu a plazmatickej membrány bunky, alebo internalizáciou do bunkových kompartmentov. Endocytické dráhy využívané neobalenými vírusmi pri vstupe do buniek zahŕňajú klatrínom sprostredkovanú endocytózu, vstup cez kaveoly, makropinocytózu a novú, doteraz ešte nedostatočne charakterizovanú endocytózu nezávislú ani na klatríne ani na kaveolách (SIECZKARSKI a WHITTAKER 2002b).

Vstup mPyV do bunky nie je závislý na klatrínom sprostredkovej endocytóze. Použitie špecifických dominantne negatívnych mutant, ktoré inhibujú klatrínovú endocytózu, nezabránilo produktívnej infekcii mPyV (bunková línia NMuMG, LIEBL *et al.* 2006) a pomocou elektrónovej mikroskopie bolo pozorované, že endocytické vāčky nesúce virióny sú hladké; nie sú obalené typickým klatrínovým plášťom (RICHTEROVÁ *et al.* 2001)

Úloha kaveolínu-1 a kaveol pri vstupe mPyV je stále sporná. Je možné, že mPyV využíva v rôznych typoch buniek alternatívne endocytické dráhy. O tom, ktorou endocytickou dráhou mPyV vstúpi do bunky by mohlo byť rozhodnuté už pri väzbe mPyV na bunkový receptor.

GILBERTOVÁ a BENJAMIN (2000) prišli k záveru, že inkubácia buniek línie NIH 3T3 a BMK s látkami vyvážujúcimi cholesterol z membrán - nystatín a filipín (sprievodným javom je rozrušenie lipidových raftov a zabránenie endocytózy cez kaveoly) nemá vplyv na efektivitu infekcie mPyV. Na druhej strane bolo v našom laboratóriu ukázané, že M β CD výrazne znižuje účinnosť infekcie v prípade, že je táto látka pridaná k bunkovým líniam NIH 3T6 a NMuMG. Navyše, pomocou konfokálnej a elektrónovej mikroskopie boli pozorované virióny mPyV v kaveolín-1 pozitívnych vāčkoch. Takisto skoro po adsorpcii viriónov na bunkový povrch bola pozorovaná akumulácia kaveolínu v tých oblastiach membrány, kde virióny vstupovali do bunky (RICHTEROVÁ *et al.* 2001).

Interakcie mPyV s membránovými doménami obsahujúcimi kaveolín-1 odhalili, že niektoré virióny mPyV vstupujú do bunky cez kaveolínové domény, zatiaľ čo ďalšie ich obchádzajú. Existenciu alternatívnej dráhy vstupu mPyV nezávislej na kaveolíne dokladajú aj pozorovania, že mPyV je efektívne internalizovaný v bunkách línie Jurkat, ktoré kaveolín-1 neprodukujú a postrádajú funkčné kaveoly. Takisto bolo pozorované, že prechodná expresia dominantne negatívnej mutanty kaveolínu-1 skráteneho o prvých 81 N-koncových aminokyselín ($\Delta 1 - 81$) nezabraňuje produktívnej infekcii (LIEBL *et al.* 2006). Nás ďalej zaujímalo, ako produkcia tejto mutanty kaveolínu-1 ovplyvní pomer infikovaných a neinfikovaných buniek. Na tento účel boli pripravené bunky NMuMG, ktoré exprimujú túto mutantu. Ako kontrola boli použité bunky NMuMG, nesúce plazmid exprimujúci gén pre divoký typ kaveolínu-1 (cav-1 WT). Bolo ukázané, že expresia génu pre divoký typ kaveolínu efektivitu infekcie mierne zvyšuje (LIEBL *et al.* 2006). Tento poznatok sme potvrdili a ďalej sme s prekvapením zistili, že expresia génu pre dominantne

negatívnu mutantu kaveolínu-1 rozhodne efektívitu infekcie neznižuje.

Po biochemickej stránke sa kaveoly správajú ako membrány nerozpustné detergentom a majú nízku vznášavú hustotu (BROWN a ROSE 1992). Cholesterol, s ktorým je kaveolín špecificky asociovaný (MURATA *et al.* 1995) sa prednostne nachádza v týchto membránových frakciách nerozpustných detergentom a reprezentuje tretinu až polovicu všetkých membránových lipidov (PIKE *et al.* 2004). Kľúčová úloha kaveolínu je kontrolovať hladinu cholesterolu v plazmatickej membráne (FIELDING a FIELDING 1997b) a podieľa sa na transporte novo syntetizovaného cholesterolu z ER do membránových kaveol (UITTENBOGAARD *et al.* 1998, UITTENBOGAARD a SMART 2000). Expresia kaveolínu-1 je tesne spätá s hladinou voľného cholesterolu cez sterol-senzitívny element nachádzajúci sa v promotore pre kaveolín-1 (HAILSTONES *et al.* 1998, FIELDING *et al.* 1997a) a produkcia kaveolínu zvyšuje transport novo syntetizovaného cholesterolu do plazmatickej membrány (SMART *et al.* 1996). V bunkách NMuMG transfekovaných plazmidom exprimujúcim gén pre divoký typ kaveolínu-1 dochádza k zvýšenej produkcii kaveolínu a je preto pravdepodobné, že to nejakým spôsobom ovplyvňuje aj metabolizmus cholesterolu. Hoci otázka účasti cholesterolu pri mPyV infekcii je stále diskutabilná (GILBERTOVÁ a BENJAMIN 2000, RICHTEROVÁ *et al.* 2001), prípadné zmeny v distribúcii cholesterolu by mohli mať vplyv na vstup mPyV.

Z dôvodov, ktoré sú zatiaľ nejasné, je intaktný N-koniec kaveolínu potrebný na jeho správnu funkciu (ROY *et al.* 1999, PELKMANS *et al.* 2001). Produkcia dominantne negatívnej mutanty kaveolínu-1 $\Delta 1 - 81$ rozrušuje tvorbu lipidových raftov obsahujúcich kaveolín-1 a spôsobuje jeho prerozdelenie z oblastí membrán s nízkou hustotou do tých častí membrány, ktoré majú vysokú hustotu a sú rozpustné pomocou detergentu (TROUET *et al.* 2001). Iná dominantne negatívna mutanta kaveolínu-3 skrátaná o prvých 54 N-koncových aminokyselín spôsobila akumuláciu cholesterolu v neskorých endozóмоch a zapríčinila zníženie množstva cholesterolu v plazmatickej membráne (POL *et al.* 2001). Dominantne negatívna mutanta kaveolínu teda rozrušuje membránové rafty bohaté na kaveolín a tým blokuje internalizáciu sprostredkovanú kaveolami. Zistenie, že produkcia dominantne negatívnej mutanty kaveolínu-1 produktívnej infekcii mPyV nezabraňuje, podporuje predchádzajúce závery, že mPyV je schopný vstupovať do bunky aj alternatívnou dráhou, ktorá je nezávislá na kaveolách. To, že v tomto prípade dochádza k miernemu zvýšeniu efektivity infekcie bolo prekvapivé zistenie. Toto zvýšenie je

pomerne malé (115% oproti kontrole) a nemusí byť preto relevantné. Pretože však plazmatická membrána je veľmi dynamický komplex, je možné, že zmena obsahu kaveolínu a cholesterolu ovplyvňuje aj rozloženie iných molekúl v membráne. Možnosťou preto zostáva, že produkcia cav-1 DN mt spôsobí, že sa prejaví iný endocytický proces, ktorý nie je využívaný mPyV v neporušených podmienkach. V budúcnosti bude potrebné závery, že vstup mPyV je nezávislý na endocytóze sprostredkovej klatrínom a na kaveolách ešte potvrdiť simultánnou inhibíciou klatrínovej aj kaveolínovej endocytózy.

Endocytická dráha, ktorú využívajú rotavírusy (neobalené ds RNA vírusy, čeľaď *Reoviridae*) na vstup do bunky sa zdá byť podobná mPyV. Špeciálne inhibítory a dominantne negatívne mutanty, ktoré rozrušujú klatrínom sprostredkovanú endocytózu, nemajú vplyv na rotavírusovú infekciu. Transfekcia buniek dominantne negatívnou mutantou kaveolínu-1, resp. kaveolínu-3 infekciu neinhibovala, podobne ako inhibítory nystatín a filipín, ktoré vyvážujú cholesterol a tým narušujú funkciu kaveol. Navyše, podobne ako v prípade mPyV, ošetrenie buniek M β CD viedlo k výraznému zníženiu efektivity infekcie. Autori na základe týchto zistení vyslovili hypotézu, že vyčerpanie cholesterolu z membrány pôsobením M β CD inhibuje vstup rotavírusu nie kôli interferencii s endocytózou sprostredkovanou kaveolami, ale pravdepodobne ovplyvňuje integritu lipidových mikrodomén (SÁNCHEZ-SAN MARTÍN *et al.* 2004).

O víruse chrípky (čeľaď *Orthomyxoviridae*) sa dlho predpokladalo, že vstupuje do bunky výlučne klatrínom sprostredkovanou endocytózou, nedávno sa však zistilo, že takisto môže využívať endocytickú dráhu nezávislú na klatríne a na kaveolách (SIECZKARSKI a WHITTAKER 2002a).

Endocytické dráhy, ktorými vstupujú do bunky najbližší príbuzný mPyV sú rôzne. JCV vstupuje do bunky klatrínom sprostredkovanou endocytózou (PHO *et al.* 2000), BKV endocytózou sprostredkovanou kaveolami (EASH *et al.* 2004). SV40 bol prvý vírus, u ktorého sa dokázalo, že do bunky vstupuje kaveolami (ANDERSON *et al.* 1996, STANG *et al.* 1997). Transfekcia buniek CV-1 dvomi odlišnými dominantne-negatívnymi mutantami kaveolínu-1 (skrátene na N-konci o prvých 53 resp. 107 aminokyselín) inhibovala efektivitu infekcie (ROY *et al.* 1999). Podobne, produkcia fúzneho proteínu GFP-cav-1 (GFP sa nachádza na N-konci kaveolínu-1, tento fúzny proteín tu funguje ako dominantne-negatívna mutanta) inhibovala vstup SV40 do buniek a produkciu skorých antigénov (PELKMANS *et al.* 2001). Na druhej strane

sa však nedá vylúčiť ani dráha nezávislá na kaveolách (a zároveň nezávislá na klatrínom sprostredkovanj endocytóze), pretože SV40 efektívne vstupuje do buniek, ktoré kaveolín-1 neexprimujú, avšak prítomnosť cholesterolu sa ukazuje byť nutnou podmienkou infekcie (DAMM *et al.* 2005). Je teda zrejmé, že aj SV40 môže využívať viac alternatívnych dráh.

Aj keď sa hromadia poznatky o jednotlivých endocytických dráhach, ktoré vírusy využívajú na svoj vstup do bunky, to, ktoré dráhy využívajú vírusy prednostne, aký receptor pri konkrétnej dráhe využívajú, alebo za akých podmienok vstupujú do bunky je stále nevyriešená otázka.

5.3. Účasť recyklujúcich endozómov pri produktívnej infekcii

mPyV, ktorý je internalizovaný do bunky kaveolami alebo alternatívnou dráhou nezávislou na kaveolách a na klatrínom sprostredkovanj endocytóze neskôr vstupuje do kompartmentov klasickej endocytickej dráhy. Pozorovaná kolokalizácia VP1 s EEA1 a EEA1 s kaveolínom-1 naznačuje, že monopinocytický váčok bohatý na kaveolín a nesúci vírus fúzuje s EEA1 pozitívnymi skrými endozómami. Navyše, produktívna infekcia mPyV je závislá na kyslom prostredí skorých endozómov (LIEBL *et al.* 2006).

V neskorších časoch po infekcii bola subpopulácia viriónov pozorovaná v perinukleárnej oblasti v recyklujúcich endozómoch pozitívnych na Rab11 (MANNOVÁ a FORSTOVÁ 2003, LIEBL *et al.* 2006). Tranzientná transfekcia myších fibroblastov 3T6 dominantne negatívnou mutantou Rab11 spôsobila pokles efektivity infekcie mPyV o 37%, podporujúc hypotézu, že recyklujúce endozómy by mohli byť kompartment, podieľajúci sa na produktívnej infekcii PyV.

Pretože signál mPyV bol detekovaný aj v ER, zdá sa, že podobne ako v prípade bakteriálnych toxínov (napr. Shiga toxín, alebo cholera toxín), veľká časť viriónov mPyV sa dostáva zo skorých endozómov do recyklujúcich endozómov a odtiaľ do ER. Avšak na rozdiel od bakteriálnych toxínov, mPyV nikdy nebol pozorovaný v GA a pravdepodobne tento bunkový kompartment obchádza (MANNOVÁ a FORSTOVÁ 2003).

Vstup mPyV sa najviac podobá vstupu BKV, v porovnaní s ostatnými študovanými zástupcami tejto čeľade. Ako už bolo spomenuté vyššie, BKV vstupuje do

hostiteľskej bunky prostredníctvom kaveol, a podobne ako u mPyV, produktívna infekcia je závislá na kyslom prostredí skorých endozómov (EASH *et al.* 2004). Na rozdiel od BKV a mPyV, SV40 pri vstupe obchádza klasické endocytické organely (DAMM *et al.* 2005) a nie je citlivý ku zmene pH v endozómoch. Virióny sú internalizované do malých endocytických váčkov, ktoré vyzerajú a správajú sa rovnako bez ohľadu na to, či obsahujú kaveolín alebo nie. Tieto váčky fúzujú s cytoplazmatickou organelou s neutrálnym pH, v prípade endocytózy cez kaveoly bola táto organela popísaná ako kaveozóm (DAMM *et al.* 2005).

Otázkou stále zostáva, aký je vzťah medzi kaveolami a recyklujúcimi endozómami. Kaveozómy boli popísané ako membránové cytoplazmatické organely s neutrálnym pH, bohaté na kaveolín-1 a odlišné od kompartmentov klasickej endocytickej a sekrečnej dráhy, ale ich detailnejšia charakteristika stále chýba (PELKMANS *et al.* 2001). Recyklujúce endozómy sú váčky s mierne kyslým pH obsahujúce zložky membránových mikrodomén, ako napr. sfingomyelín, kaveolín-1 a cholesterol. V týchto ohľadoch pripomínajú RE kaveozómy. Navyše, RE neobsahujú proteíny typické pre skoré endozómy, čo naznačuje, že táto organela je odlišná od klasických skorých endozómov (GAGESCU *et al.* 2000). Funkčné a biochemické odlišnosti oboch bunkových kompartmentov, ako aj spôsob komunikácie s ďalšími cytoplazmatickými váčkami zostávajú aj naďalej predmetom intenzívneho štúdia.

5.4. Spôsob dopravy genómu mPyV do jadra: účasť ubiquitín-proteazomálnej degradačnej dráhy pri infekcii mPyV?

Ubiquitín – proteazomálna degradačná dráha je komplexný systém, ktorý sa podieľa na mnohých bunkových pochodoch. Výsledky mnohých prác ukazujú, že zložky ubiquitín – proteazomálneho systému hrajú významnú úlohu v životnom cykluse mnohých vírusov (kapitola 2.3.5.1.) a zdá sa, že v niektorých prípadoch sa dokonca podieľajú na produktívnej infekcii vírusu (kapitola 2.3.5.2.1.), aj keď na druhej strane môže ubiquitín – proteazomálny systém predstavovať pre vstupujúci vírus prekážku (2.3.5.2.2.).

Nás zaujímalo, či v prípade mPyV je funkčný ubiquitín – proteazomálny systém zneužívaný vírusom pri produktívnej infekcii, alebo či tu jednoducho funguje len ako obrana bunky. Na inhibíciu proteazómu sme používali reverzibilný proteazóm MG-

132, pretože už 1 h po odstránení inhibítora z média dochádza k úplnému obnoveniu funkcie proteazómov.

Z predchádzajúcich pokusov vieme, že 3 h po infekcii sa kapsidový proteín vírusu nachádza už perinukleárnom priestore a 6 h po infekcii už prebieha transkripcia skorých antigénov v jadre. Najprv sme sa zamerali na skorú fázu infekcie, teda na čas, keď sa virióny pohybujú po internalizácii cytoplazmou do jadra bunky. V prípade, že bol inhibítor k bunkám pridaný 1 h pred infekciou a odobraný 4 h po infekcii, bola pozorovaná výrazná inhibícia infekcie, ktorá bola závislá na zvyšujúcej sa koncentrácii inhibítora. Z týchto pozorovaní vyplýva, že funkčné bunkové proteazómy sú nutnou podmienkou pre skoré štádiá infekcie mPyV. Tento inhibítor nepôsobil na bunky cytotoxicky v koncentráciách, ktoré sme používali počas max. 5 h, kedy bol inhibítor prítomný v bunkovej kultúre.

Ďalej nás zaujímalo, či inhibícia proteazómu inhibuje aj ďalšie štádiá vírusovej infekcie, napr. skorú transkripciu. Inhibítor bol k bunkám pridávaný v troch rôznych časoch vždy na 4 h: 4 h pred infekciou, ihneď po adsorpcii vírusu a 4 h po infekcii. V prípade, že bol inhibítor pridaný do média 4 h pred infekciou a pred adsorpciou PyV bol odmytý, nebola pozorovaná žiadna inhibícia infekcie. Výrazná inhibícia infekcie bola opäť pozorovaná v prípade, keď bol inhibítor pridaný ihneď po adsorpcii vírusu na bunkovú membránu, ako sme už pozorovali v predchádzajúcom pokuse. Naopak, keď bol inhibítor pridaný až po 4 h od vírusovej adsorpcie, jeho inhibičný efekt na efektivitu infekcie bol len mierny. Pozorovanie, že inhibítor pridaný 4 h pred infekciou nemá inhibičný efekt na vírusovú infekciu znamená, že inhibícia pozorovaná po infekcii je špecifická a nie je spôsobená vedľajším účinkom na iné pochody v bunke. Ďalej tieto výsledky naznačujú, že k interakcii medzi mPyV a ubiquitín – proteazomálnym systémom dochádza v dobe, keď mPyV putuje od bunkového povrchu k jadrú a po 4 h, keď už sú virióny / resp. genetická informácia doručená do jadra bunky, ubiquitín – proteazomálny systém nemá na vírusovú infekciu žiadny výrazný vplyv.

To, že inhibícia proteazómu znižuje efektivitu infekcie, bolo pre nás prekvapivým zistením. V minulosti bolo totiž v našom laboratóriu pomocou *in situ* hybridizácie so sondou špecifickou voči DNA mPyV zistené, že aj napriek vysokej multiplicitate infekcie (100 a viac pfu/bunku) iba malá časť viriónov doručí svoj genóm do jadra hostiteľskej bunky (MANNOVÁ a FORSTOVÁ 2003). Navyše, signál VP1 nebol nikdy detekovaný v jadre bunky, čo nás viedlo k hypotéze, že iba malá časť viriónov

vstúpi do jadra a väčšina vírusových častíc je rozvoľnená a následne degradovaná v cytoplazme. Preto sme predpokladali, že inhibícia proteazómu a s tým spojená inhibícia degradácie proteínov zabráni degradácii viriónov a efektivitu infekcie mPyV bude zvyšovať. Zistenie, že inhibícia proteazómu znižuje efektivitu infekcie, by mohla vysvetľovať hypotéza, že mPyV, podobne ako niektoré toxíny (napr. A reťazec ricínu, DEEKS *et al.* 2002) by mohol využívať degradáciu asociovanú s endoplazmatickým retikulom (ERAD). Podľa tejto hypotézy by virióny, ktoré opúšťajú ER translokáciou do cytoplazmy, mohli podliehať čiastočnej proteolýze kapsíd prostredníctvom ERAD a proteolýza by mohla uvoľňovať nucleocore, ktoré potom vstúpi do jadra. Pokiaľ by táto dráha bola produktívnou cestou infekcie, vysvetľovalo by to aj ten poznatok, že signál VP1 nebol nikdy detekovaný v jadre bunky.

Účasť ubiquitín – proteazomálneho systému v skorých fázach vírusovej infekcie bola pozorovaná aj v prípade ďalších vírusov, napr. vírusu myšej hepatitídy (MHV, čeľaď *Coronaviridae*, YU a LAI 2005), HIV-1 (čeľaď *Retroviridae*, SCHWARTZ *et al.* 1998) alebo vírusu chrípky (čeľaď *Orthomyxoviridae*, KHOR *et al.* 2003). Aj v týchto prípadoch inhibícia ubiquitín – proteazomálnej degradačnej dráhy rôznymi proteazomálnymi inhibítormi výrazne znižovala efektivitu infekcie vstupujúceho vírusu.

MVM, ktorý pri infekcii hostiteľskej bunky putuje podobne ako mPyV cez skoré a neskoré endozómy, vyžaduje na svoju produktívnu infekciu funkčný ubiquitín – proteazomálny systém. Počas inhibície funkcie proteazómu inhibítorom MG-132 dochádzalo k akumulácii viriónov MVM v perinukleárnej oblasti - virióny neboli schopné vstupovať do jadra. Po odstránení inhibítora z média sa schopnosť MVM translokovať do jadra obnovila a bola zahájená vírusová replikácia. Avšak analýza vírusových kapsidových proteínov ukázala, že počas infekcie nie sú kapsidy MVM ani ubiquitinylované, ani degradované (ROS a KEMPF 2004). Preto sa zdá, že ani endozómy, ani proteazómy nie sú miestom konečného rozvolnenia vírusovej kapsidy MVM. Interakcia vstupujúcich viriónov s bunkovým proteazómom alebo zložkami ubiquitín – proteazomálnej dráhy teda zostáva stále nejasná.

Zaujímavým zistením je fakt, že pri vyššej multiplicity infekcie nebola pozorovaná výrazná inhibícia efektivity infekcie mPyV ani pri najvyšších použitých koncentráciách inhibítora. Toto zistenie tak odporuje teórii, že vstupujúci mPyV využíva výhradne ERAD dráhu. Pozorovanie, že ak sú bunky infikované s vyššou

multiplicitou infekcie, efektivita infekcie už nie je závislá na prítomnosti funkčných proteazómov, by mohlo byť vysvetlené existenciou nejakej ďalšej, alternatívnej dráhy dopravy genómu mPyV do jadra bunky, ktorá sa prejaví až pri vyššej M.O.I. infekcie.

V súčasnej dobe sa hromadia nové poznatky o tom, že ubiquitín je jedným z bunkových faktorov, ktoré sa podieľajú pri regulácii množstva povrchových receptorov zúčastňujúcich sa na bunkovej signalizácii. Receptory sú z bunkového povrchu odstraňované endocytózou a následne sú degradované v lyzozómoch. Tento proces je sprevádzaný modifikáciou receptoru a asociovaných proteínov pripojením jednej molekuly ubiquitínu. Množstvo dôkazov podporuje fakt, že monoubiquitinylácia slúži ako dôležitý internalizačný signál (HÖLLER a DIKIC 2004). Jedným z príkladov je EGF receptor (EGFR, receptor pre epidermálny rastový faktor), ktorý je monoubiquitinylovaný prostredníctvom bunkovej ubiquitín ligázy Cbl (Casitas B-lineage lymphoma) (DIKIC a GIORDANO 2003, DIKIC *et al.* 2003) a mnohonásobná monoubiquitinylácia EGFR slúži ako signál na internalizáciu receptoru a jeho následnú degradáciu (HAGLUND *et al.* 2003). Neskôr bolo ukázané, že keď je EGFR stimulovaný vyššou koncentráciou ligandu, veľká časť receptoru je endocytovaná nezávisle na klatríne cez lipidové rafty (SIGISMUND *et al.* 2004)

Keďže vírusy počas svojej evolúcie vynašli mnoho spôsobov, ako vstúpiť do bunky a úspešne sa pomnožiť, nie je ťažké si predstaviť, že by mohli nájsť aj spôsob, ako využiť vyššie uvedený mechanizmus. Takto internalizované virióny by síce boli internalizované do skorých endozómov a odtiaľ by boli smerované na degradáciu cez neskoré endozómy a lyzozómy, ale pri zvýšenej multiplicitate infekcie by subpopulácia viriónov mohla uniknúť a dostať sa na produktívnu dráhu infekcie. Zníženie efektivity infekcie v skorej fáze infekcie v prítomnosti proteazomálneho inhibítora by v tomto prípade mohla byť vysvetlená tým, že pri inhibícii proteazómu dochádza postupne k poklesu hladiny voľného Ub v bunke a pri jeho nedostatku nedochádza k označeniu povrchových receptorov a tým ani k ich internalizácii. Jedným z problémov pri navrhovaní pokusov, ktoré by túto hypotézu podporovali je ten, že pomocou nám dostupných protilátok sa nedá rozlíšiť voľný ubiquitín, monoubiquitín a tetraubiquitín a tieto pokusy vyžadujú náročnejšie techniky.

Vedľajší efekt účinku MG-132 okrem inhibície proteazómovej funkcie je aj inhibícia určitých lyzozomálnych cysteínových proteáz a calpaínov. Nedá sa preto ani vylúčiť

možnosť, že pozorovaná inhibícia infekcie mohla byť z časti alebo úplne spôsobená inhibíciou týchto ďalších proteáz. Pokúsili sme sa zopakovať tieto pokusy pomocou špecifického ireverzibilného inhibítora epoxomicínu. Keďže LT antigén je možné pomocou metódy nepriamej imunoflorescencie detekovať v bunke až po 8 – 12 h, problém je, že nevratný charakter epoxomicínu môže za takýto dlhý čas spôsobiť ďalšie rozsiahle zmeny v bunke. Bude preto treba optimalizovať použitú koncentráciu inhibítora zároveň so stanovením jeho cytotoxického efektu na potvrdenie pozorovaní inhibície infekcie blokáciou proteazómu. V ďalších pokusoch by bolo zaujímavé overiť, či v prítomnosti inhibítora dochádza k úplnému potlačeniu infekcie, alebo či tu len dochádza k oneskoreniu syntézy LT. Takisto by bolo zaujímavé pomocou konfokálnej mikroskopie zistiť, či v prítomnosti inhibítora využíva vírus rovnaké endocytické dráhy ako za normálnych podmienok a kde prípadne dochádza v bunkách k zadržaniu vírusu v prípade inhibície proteazómu. Keďže bunka je veľmi komplikovaný a komplexný systém, bezpochyby existuje nepreberné množstvo interakcií medzi bunkovými štruktúrami a vírusom, ktoré nám zatiaľ nie sú známe. Isté však je, že skúmanie týchto interakcií bude viesť aj k lepšiemu a detailnejšiemu pochopeniu bunkových funkcií.

5.5. Možnosť existencie alternatívnej dráhy vstupu mPyV

Možnosť, že virióny, ktoré sú zodpovedné za produktívnu infekciu a tie, ktoré sú nasmerované na neskoršiu degradáciu, vstupujú do bunky odlišnými endocytickými dráhami nemôže byť vylúčená. Elektrónmikroskopická analýza naznačovala, že niektoré hladké váčky by mohli priamo fúzovať s jadrovou membránou, a to už veľmi skoro po internalizácii viriónov (MATTERN *et al.* 1966, HUMMLER *et al.* 1970, MACKAY a CONSIGLI 1976, MAUL *et al.* 1978, KARTENBECK *et al.* 1989, LIEBL nepublikovane výsledky). Preto sme sa rozhodli túto hypotézu overiť pomocou konfokálnej mikroskopie.

Signál VP1 väčšiny vstupujúcich viriónov sa objavuje v perinukleárnom priestore približne 3 h po adsorpcii. Zamerali sme sa na detekciu jednotlivých viriónov (detekcia signálu VP1) v bezprostrednej blízkosti jadrovej membrány alebo priamo v bunkovom jadre už 1 h po infekcii. Tento signál, hoci bol detekovaný na úrovni jadrovej membrány (alebo v jej bezprostrednej blízkosti), iba zriedka kolokalizoval

so signálom nukleoporínu. Keďže rozlišovacia schopnosť konfokálneho mikroskopu je 250 nm, nemusí ani občasná kolokalizácia signálu nutne znamenať, že VP1 je asociovaný s jadrovým pórom, ale môže sa nachádzať niekde v tesnej blízkosti. Na jednotlivých konfokálnych rezoch bunkou sme pozorovali signál VP1, ktorý sa v predchádzajúcom a nasledujúcom reze nenachádzal. Keďže veľkosť kapsidy mPyV je 45 nm a jednotlivé rezy boli hrubé 958 nm, usudzujeme, že tento signál je špecifický pre jeden rez.

Z týchto pozorovaní usudzujeme, že mPyV by mohol využívať nejakú inú, rýchlejšiu alternatívnu dráhu dopravy genómu do jadra. Je možné, že tieto „úspešné“ virióny putujú cytoplazmou v monopinocytických váčkoch rýchlo na tubulínových vláknach a priamo fúzujú s ER (RICHTEROVÁ *et al.* 2001) alebo dokonca s jadrovou membránou. Vstup „úspešných“ viriónov do jadra touto alternatívnou cestou by predstavoval nový, doteraz nepopísaný mechanizmus. Túto hypotézu bude však veľmi náročné dokázať, pretože je veľmi ťažké oddeliť v bunke masu viriónov, určených na degradáciu od tých, ktoré predstavujú „úspešné“ virióny. Veľmi málo je dnes známo o zložení jadrovej membrány aj o mechanizmoch ich fúzií. V súčasnej dobe prebieha v našom laboratóriu výskum interakcií poloyomavírusových štruktúrnych proteínov s membránami, vrátane jadrovej a v pláne je tiež izolácia bunkových jadier a monopinocytických váčkov nesúcich virióny a aj *in situ* hybridizácia so sondou špecifickou voči DNA mPyV. Pomôcť by tiež mohlo pozorovanie dejov na jadrovej membráne technikou EM tomografie.

6. Súhrn

1. Bolo zistené, že expresia génu pre dominantne negatívnu mutantu kaveolínu-1 nemá vplyv na produktívnu infekciu mPyV. To podporuje doterajšie pozorovania, že mPyV môže vstupovať do hostiteľskej bunky dráhou nezávislou na endocytóze cez kaveoly.
2. Bolo zistené, že expresia génu pre dominantne negatívnu mutantu Rab11 znižuje efektivitu infekcie mPyV. To naznačuje účasť recyklujúcich endozómov na produktívnej infekcii mPyV.
3. Funkčný ubiquitín – proteazomálny systém sa uplatňuje v prvých hodinách polyomavírusovej infekcie, t.j. v čase od vstupu viriónov do bunky po dopravu genetickej informácie do jadra a nemá vplyv na skorú transkripciu. Inhibícia infekčnosti v skoréj fáze cyklu mPyV je závislá na zvyšujúcej sa koncentrácii proteazomálneho inhibítora. Inhibičný efekt proteazomálneho inhibítora sa dá prekonať zvýšením multiplicity infekcie.
4. Pomocou konfokálnej mikroskopie sme detekovali jednotlivé signály VP1 jednak v tesnej blízkosti jadra, ako aj vnútri jadra už 1 h po infekcii, tj. v čase, keď prevážna väčšina vírusových častíc se nachádza v endozómoch rozptýlených v cytoplazme.

7. Zoznam citovanej literatúry

Anderson, R.G.W. (1993): Caveolae: Where incoming and outgoing signals meet. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10909 – 10913.

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. *Mol. Biol. Cell.* 7: 1825 – 1834.

Anderson, H.A., Chen, Y., Norkin, L.C. (1998): MHC class I molecules are enriched in caveolae but do not enter with simian virus 40. *J. Gen. Virol.* 79: 1469 – 1477.

Apcher, G.S., Heink, S., Zantopf, D., Kloetzel, P-M., Schmid, H-P., Mayer, R.J., Krüger, E. (2003): Human immunodeficiency virus – 1 Tat protein interacts with distinct proteasomal α and β subunits. *FEBS Lett.* 553: 200 – 204.

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: 1347 – 1356.

Atwood, W.J., Norkin, L.C. (1989): Class I major histocompatibility proteins as cell surface receptors for simian virus 40. *J. Virol.* 63: 4474 – 4477.

Bartlett, J.S., Wilcher, R., Samulski, R.J. (2000): Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors. *J. Virol.* 74: 2777 - 2785.

Bauer, P.H., Cui, C., Liu, R., Stehle, T., Harrison, S.C., DeCaprio, J.A., Benjamin, T.L. (1999): Discrimination between sialic acid-containing receptors and pseudoreceptors regulates polyomavirus spread in the mouse. *J. Virol.* 73: 5826 - 5832.

Biederer, T., Volkwein, C., Sommer, T. (1996): Degradation of subunits of the Sec61p complex, an integral component of the ER membrane, by the ubiquitin – proteasome pathway. *EMBO J.* 15: 2069 – 2076.

Biederer, T., Volkwein, C., Sommer, T. (1997): Role of Cue1p in ubiquitination and degradation at ER surface. *Science* 278: 1806 – 1809.

Birnbiom, H.C., Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.* 7: 1513.

Bonifacino, J.S., Weissman, A.M. (1998): Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14: 19 - 57.

- Bochtler, M., Ditzel, M., Groll, M., Hartmann, C., Huber, R. (1999):** The proteasome. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 28: 295 – 317.
- Braun, B.C., Glickman, M., Kraft, R., Dahlmann, B., Kloetzel, P.M., Finley, D., Schmidt, M. (1999):** A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell.* 94: 615 - 623.
- Breau, W.C., Atwood, W.J., Norkin, L.C. (1992):** Class I major histocompatibility proteins are an essential component of the simian virus 40. *J. Virol.* 66: 2037 – 2045.
- Breitschopf, K., Bengal, E., Ziv, T., Admon, A., Ciechanover, A. (1998):** A novel site for ubiquitination: the N-terminal residue and not internal lysines of MyoD, is essential for conjugation and degradation of the protein. *EMBO J.* 17: 5964 - 5973.
- Brown, D.A., Rose, J.K. (1992):** Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 68: 533 - 544.
- Cahan, L.D., Singh, R., Paulson, J.C. (1983):** Sialyloligosaccharide receptors of binding variants of polyoma virus. *Virol.* 130: 281 – 289.
- Cardozo C. (1993):** Catalytic components of the bovine pituitary multicatalytic proteinase complex (proteasome). *Enzyme Protein.* 47: 296 - 305.
- Caruso, M., Belloni, L., Sthandier, O., Amati, P., Garcia, M.I. (2003a):** $\alpha 4\beta 1$ integrin acts as a cell receptor for murine polyomavirus at the postattachment level. *J. Virol.* 77: 3913 – 3921.
- Caruso, M., Cavaldesi, M., Gentile, M., Sthandier, O., Amati, P., Garcia, M.I. (2003b):** Role of sialic acid – containing molecules and the $\alpha 4\beta 1$ integrin receptor in the early steps of polyomavirus infection. *J. Virol.* 84: 2927 – 2936.
- Chen, M.H., Benjamin, T. (1997):** Roles of N - glycans with $\alpha 2,6$ as well as $\alpha 2,3$ linked sialic acid in infection by polyomavirus. *Virol.* 233: 440 - 442.
- Chen, L., Fluck, M. (2001):** Kinetic analysis of the steps of the polyomavirus lytic cycle. *J. Virol* 75: 8368 - 8379.
- Chen, Y., Norkin, L.C. (1999):** Extracellular simian virus 40 transmits a signal that promotes virus enclosure within caveolae. *Exp. Cell Res.* 246: 83 – 90.
- Clever, J., Ymada, M., Kasamatsu, H. (1991):** Import of simian virus 40 virions through nuclear pore complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7333 – 7337.

- Cole, C.N., Conzen, S.N. (2001):** Polyomaviridae: The Viruses and Their Replication. In : Knipe, D.M., Howley, P.M. (eds.): Fields Virology 2. Fourth edition, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia
- Cotmore, S.F., Tattersall, P. (1987):** The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates. *Adv. Virus. Res.* 33: 91 - 174.
- Damm, E.M., Pelkmans, L., Kartenbeck, J., Mezzacasa, A., Kurzchalia, T., Helenius, A. (2005):** Clathrin - and caveolin - 1 - independent endocytosis: entry of simian virus 40 into cells devoid of caveolae. *J. Cell Biol.* 168: 477 - 488.
- Dangoria, N.S., Breau, W.C., Anderson, H.A., Cishek, D.A., Norkin, L.C. (1996):** Extracellular simian virus 40 induces an ERK/MAPK - independent signaling pathway that activates primary response genes and promotes virus entry. *J.Gen.Virol.* 77: 2173 - 2182.
- Deveraux, Q., Ustrell, V., Pickart, C., Rechsteiner, M. (1994):** A 26S protease subunit that binds ubiquitin conjugates. *J. Biol. Chem.* 269: 7059 - 7061.
- Deveraux, Q., van Nocker, S., Mahaffey, D., Vierstra, R., Rechsteiner, M. (1995):** Inhibition of ubiquitin - mediated proteolysis by the Arabidopsis 26S protease subunit S5a. *J. Biol. Chem.* 270: 29660 - 29663.
- Dick, T.P., Nussbaum, A.K., Deeg, M., Heinemeyer, W., Groll, M., Schirle, M., Keilholz, W., Stevanovic, S., Wolf, D.H., Huber, R., Rammensee, H.G., Schild, H. (1998):** Contribution of proteasomal beta-subunits to the cleavage of peptide substrates analyzed with yeast mutants. *J. Biol. Chem.* 273: 25637 - 25646.
- Dikic, I., Giordano, S. (2003):** Negative receptor signalling. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 15: 128 - 135.
- Dikic, I., Szymkiewicz, I., Soubeyran, P. (2003):** Cbl signaling networks in the regulation of cell function. *Cell. Mol. Life Sci.* 60: 1805 - 1827.
- Dower, W.J., Miller, J.F., Ragsdale, Ch. W. (1988):** High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleid Acids Res.* 16: 6127-6145.
- 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.
- Eash, S., Atwood, W.J. (2005):** Involvement of cytoskeletal components in BK virus infectious entry. *J. Virol.* 79: 11734 - 11741.
- Eash, S., Querbes, W., Atwood, W.J. (2004):** Infection of Vero cells by BK virus is dependent on caveolae. *J. Virol.* 78: 11583 - 11590.

- Eash, S., Tavares, R., Stopa, E.G., Robbins, S.H., Brossay, L., Atwood, W.J. (2004):** Differential distribution of the JC Virus receptor – type sialic acid in normal human tissues. *Am. J. Pathol.* 164: 419 – 428.
- Elphick, G.F., Querbes, W., Jordan, J.A., Gee, G.V., Eash, S., Manley, K., Dugan, A., Stanifer, M., Bhatnagar, A., Kroeze, W.K., Roth, B.L., Atwood, W.J. (2004):** The human polyomavirus, JCV, uses serotonin receptors to infect cells. *Science* 306: 1380 – 1383.
- Enekel, C., Lehmann, H., Kipper, J., Guckel, R., Hilt, W., Wolf, D.H. (1994):** PRE3, highly homologous to the human major histocompatibility complex-linked LMP2 (RING12) gene, codes for a yeast proteasome subunit necessary for the peptidylglutamyl-peptide hydrolyzing activity. *FEBS Lett.* 34: 193 - 196.
- Fenteany, G., Standaert, R.F., Lane, W.S., Choi, S., Corey, E.J., Schreiber, S.L. (1995):** Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science* 268: 726 - 731.
- Ferrel, K., Wilkinson, C.R.M., Dubiel, W., Gordon, C. (2000):** Regulatory subunit interactions of the 26S proteasome, a complex problem. *Trends Biochem. Sci.* 25: 83 - 88.
- Fielding, C.J., Bist, A., Fielding, P.E. (1997a):** Caveolin mRNA levels are up-regulated by free cholesterol and down-regulated by oxysterols in fibroblast monolayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 94: 3753 - 3758.
- Fielding, C.J., Fielding, P.E. (1997b):** Intracellular cholesterol transport. *J. Lipid. Res* 38: 1503 - 1521.
- 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., Calderone, A., Dawe, C.J., Benjamin, T.L. (1991):** Polyomavirus tumor induction in mice: effects of polymorphisms of VP1 and large T-antigen. *J. Virol.* 65: 335 – 341.
- Fried, H., Cahan, L.D., Paulson, J.C. (1981):** Polyoma virus recognizes specific sialyloligosaccharide receptors on host cells. *Virol.* 109: 188 – 192.
- 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.
- Gee, G.V., Dugan, A.S., Tsomaia, N., Mierke, D.F., Atwood, W.J. (2006):** The role of sialic acid in human polyomavirus infection. *Glycoconj. J.* 23: 19 – 26.

- Gething, M.J., Sambrook, J. (1992):** Protein folding in the cell. *Nature* 355: 33 – 45.
- Gilbert, J.M., Benjamin, T. (2000):** Early steps of polyomavirus entry into cells. *J. Virol* 74: 8582 – 8588.
- Gilbert, J., Benjamin, T. (2004):** Uptake pathway of polyomavirus via ganglioside GD1. *J. Virol.* 78: 12259 – 12267.
- Gilbert, J., Dahl, J., Riney, C., You, J., Cui, C., Holmes, R., Lencer, W., Benjamin, T. (2005):** Ganglioside GD1a retore infectibility to mouse cells lacking functional receptors for polyomavirus. *J. Virol.* 79: 615 – 618.
- Gilbert, J.M., Goldberg, T.B., Benjamin, T.L. (2003):** Cell penetration and trafficking of polyomavirus. *J. Virol.* 77: 2615 – 2622.
- Glickman, M.H., Ciechanover, A. (2002):** The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol. Rev.* 82: 373 - 428.
- Glickman, M.H., Rubin, D.M., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Baumeister, W., Fried, V.A., Finley, D. (1998):** A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell* 94: 615 - 623.
- Griffith, G.R., Consigli, R.A. (1984):** Isolation and characterization of monopinocytotic vesicles containing polyomavirus from the cytoplasm of infected mouse kidney cells. *J. Virol.* 50: 77 - 85.
- Griffith, G.R., Mariott, S.J., Rintoul, D.A., Consigli, R.A. (1988):** Early events in polyomavirus infection: fusion of monopinocytotic vesicles containing virions with mouse kidney cell nuclei. *Vir. Res.* 10: 41 – 52.
- Greber, U.F., Kasamatsu, H. (1996):** Nuclear targeting of SV40 and adenovirus. *Trends in cell. biol.* 6: 189 – 195.
- Groll, M., Ditzel, L., Loewe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H.D., Huber, R. (1997):** Structure of 20S proteasome from yeast at a 2.4 Angstrom resolution. *Nature* 386: 463 – 471.
- 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.
- Haas, A.L., Warms, J.V.B., Hershko, A., Rose, I.A. (1982):** Ubiquitin-activating enzyme. Mechanism and role in protein-ubiquitin conjugation. *J. Biol. Chem.* 257: 2543 – 2548.

Haglund, K., Di Fiore, P.P., Dikic, I. (2003): Distinct monoubiquitin signals in receptor endocytosis. *Trends Biochem. Sci.* 28: 598 - 603.

Hailstones, D., Sleer, L.S., Parton, R.G., Stanley, K.K. (1998): Regulation of caveolin and caveolae by cholesterol in MDCK cells. *J. Lipid. Res.* 39: 369 - 379.

Hale, A.D., Bartkeviciute, D., Dargeviciute, A., Jin, L., Knowles, W., Staniulis, J., Brown, D.W., Sasnauskas, K. (2002): Expression and antigenic characterization of the major capsid proteins of human polyomaviruses BK and JC in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Virol. Methods.* 104: 93 - 98.

Hansen, J., Qing, K., Kwon, H.J., Mah, C., Srivastava, A. (2000): Impaired intracellular trafficking of adeno-associated virus type 2 vectors limits efficient transduction of murine fibroblasts. *J. Virol.* 74: 992 - 996.

Hammod, C., Helenius, A. (1995): Quality control in the secretory pathway. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 7: 523 - 529.

Harty, R.N., Brown, M.E., McGettigan, J.P., Wang, G., Jayakar, H.R., Huibregtse, J.M., Whitt, M.A., Schnell, M.J. (2001): Rhabdoviruses and the cellular ubiquitin - proteasome system: a budding interaction. *J. Virol.* 75: 10623 - 10629.

Heinemeyer, W., Gruhler, A., Mohrle, V., Mahe, Y., Wolf, D.H. (1993): PRE2, highly homologous to the human major histocompatibility complex-linked RING10 gene, codes for a yeast proteasome subunit necessary for chymotryptic activity and degradation of ubiquitinated proteins. *J. Biol. Chem.* 268: 5115 - 5120.

Hershko, A., Heller, H., Elias, S., Ciechanover, A. (1983): Components of the ubiquitin protein ligase system: resolution, affinity purification and role in protein breakdown. *J. Biol. Chem.* 258: 8206 - 8214.

Hershko, A., Ciechanover, A., Heller, H., Haas, A.L., Rose, I.A. (1980): Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77: 1783 - 1786.

Hiller, M.M., Finger, A., Schweiger, M., Wolf, D.H. (1996): ER degradation of a misfolded luminal protein by the cytosolic ubiquitin-proteasome pathway. *Science* 273: 1725 - 1728.

Hilt, W., Enenkel, C., Gruhler, A., Singer, T., Wolf, D.H. (1993): The PRE4 gene codes for a subunit of the yeast proteasome necessary for peptidylglutamyl-peptide-hydrolyzing activity. Mutations link the proteasome to stress- and ubiquitin-dependent proteolysis. *J. Biol. Chem.* 268: 3479 - 3486.

Hochstrasser M. (1996): Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu. Rev. Genet.* 30: 405-439.

Holler, D., Dikic, I. (2004): Receptor endocytosis via ubiquitin-dependent and -independent pathways. *Biochem. Pharmacol.* 67: 1013 - 1017.

Huang, X., Seifert, U., Salzmann, U., Henklein, P., Preissner, R., Henke, W., Sijts, A.J., Kloetzel, P.M., Dubiel, W. (2002): The RTP site shared by the HIV-1 Tat protein and the 11S regulator subunit alpha is crucial for their effects on proteasome function including antigen processing. *J. Mol. Biol.* 323: 771 - 782.

Hummler, K., Tomassini, N., Sokol, F. (1970): Morphological aspects of the uptake of simian virus 40 by permissive cells. *J. Virol.* 6: 87 - 93.

Jensen, T.J., Loo, M.A., Pind, S., Williams, D.B., Goldberg, A.L., Riordan, J.R. (1995): Multiple proteolytic systems, including proteasome, contribute to CFTR processing. *Cell* 83: 129 - 135.

Johnson, J.M., Nicot, Ch., Fullen, J., Ciminale, V., Casareto, L., Mulloy, J.C., Jacobson, S., Franchini, G. (2001): Free major histocompatibility complex class I heavy chain is preferentially targeted for degradation by human T-cell leukemia/lymphotropic virus type 1 p12¹ protein. *J. Virol.* 75: 6086 - 6094.

Jones, T.R., Hanson, L.K., Sun, L., Slater, J.S., Stenberg, R.M., Campbell, A.E. (1995): Multiple independent loci within the human cytomegalovirus unique short region down-regulate expression of major histocompatibility complex class I heavy chains. *J. Virol.* 69: 4830 - 4841.

Kartenbeck, J., Stukenbrok, H., Helenius, A. (1989): Endocytosis of simian virus 40 into the endoplasmic reticulum. *J. Cell. Biol.* 109: 2721 - 2729.

Khor, R., McElroy, L.J., Whittaker, G.R. (2003): The ubiquitin-vacuolar protein sorting system is selectively required during entry of influenza virus into host cells. *Traffic* 4: 857 - 868.

Kisselev, A.F., Akopian, T.N., Goldberg, A.L. (1998): Range of sizes of peptide products generated during degradation of different proteins by archaeal proteasomes. *J. Biol. Chem.* 273: 1982 - 1989.

Komagome, R., Sawa, H., Suzuki, T., Suzuki, Y., Tanaka, S., Atwood, W.J., Nagashima, K. (2002): Oligosaccharides as receptors for JC virus. *J. Virol.* 76: 12992 - 13000.

Lee, D.H., Goldberg, A.L. (1996): Selective inhibitors of the proteasome-dependent and vacuolar pathways of protein degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 271: 27280 - 27284.

- Li, P.P., Naknanishi, A., Tran, M.A., Ishizu, K.I., Kawano, M., Phillips, M., Handa, H., Liddington, R.C., Kasamatsu, H. (2003):** Importance of VP1 calcium – binding residues in assembly, cell entry, and nuclear entry of simian virus 40. *J. Virol.* 77: 7527 – 7538.
- Liddington, R.C., Yan, Y., Moulai, J., Sahli, R., Benjamin, T.L., Harrison, S.C. (1991):** Structure of simian virus 40 at 3,8Å resolution. *Nature* 354: 278 – 284.
- Liebl, D., Difato, F., Hornikova, L., Mannova, P., Stokrova, J., Forstova, J. (2006):** Mouse polyomavirus enters early endosomes, requires their acidic pH for productive infection, and meets transferrin cargo in Rab11-positive endosomes. *J. Virol.* 80: 4610 - 4622.
- Liu, C.K., Wei, G., Atwood, W.J. (1998):** Infection of glial cells by the human polyomavirus JC is mediated by an N – linked glycoprotein containing terminal $\alpha(2-6)$ – linked sialic acids. *J. Virol.* 72: 4643 – 4649.
- Lówe, J., Stock, D., Jap, B., Zwickl, P., Baumeister, W., Huber, R. (1995):** Crystal structure of the 20S proteasome from the archeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science* 268: 533 – 539.
- Low, J.A., Magnuson, B., Tsai, B., Imperiale, M.J. (2006):** Identification of gangliosides GD1b and GT1b as receptors for BK virus. *J. Virol.* 80: 1361 – 1366.
- Mackay, R.L., Consigli, R.A. (1976):** Early events in polyoma virus infection: Attachment, penetration, and nuclear entry. *J. Virol.* 19: 620 – 636.
- Maul, G.G., Rovera, G., Vorbrodt, A., Abramczuk, J. (1978):** Membrane fusion as a mechanism of simian virus 40 entry into different cellular compartments. *J. Virol.* 28: 936 – 944.
- Mannová, P., Forstová, J. (2003):** Mouse polyomavirus utilises recycling endosomes for a traffic pathway independent of COPI vesicle transport. *J. Virol.* 77: 1672 – 1681.
- Mattern, C.F., Takemoto, K.K., Wendell, A.D. (1966):** Replication of polyoma virus in mouse embryo cells: Electron microscopist observations. *Virology* 30: 242 – 256.
- McCracken, A.A., Brodsky, J.L. (1996):** Assembly of ER – associated protein in degradation in vitro: dependence on cytosol, calnexin and ATP. *J. Cell Biol.* 132: 291 – 298.
- Mellman, I., Fuchs, R., Helenius, A. (1986):** Acidification of the endocytic and exocytic pathway. *Annu. Rev. Biochem.* 55: 663 – 700.
- Murata, M., Peranen, J., Schreiner, R., Wieland, F., Kurzchalia, T.V., Simons, K. (1995):** VIP21/caveolin is a cholesterol – binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 10339 – 10343.

- Myung, J., Kim, K.B., Crews, C.M. (2001):** The ubiquitin-proteasome pathway and proteasome inhibitors. *Med. Res. Rev.* 21: 245 - 73.
- Naknanishi, A., Clever, J., Yamada, M., Li, P.P., Kasamatsu, H. (1996):** Association with capsid proteins promotes nuclear targeting of simian virus 40 DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 96 – 100.
- Naknanishi, A., Shum, D., Morioka, H., Otsuka, E., Kasamatsu, H. (2002):** Interaction of the VP3 nuclear localization signal with the importin α 2/ β heterodimer directs nuclear entry of infecting simian virus 40. *J. Virol.* 76: 9368 – 9377.
- Norkin, L.C., Anderson, H.A., Wolfrom, S.A., Oppenheim, A. (2002):** Caveolar endocytosis of simian virus is followed by brefeldin A-sensitive transport to the endoplasmic reticulum, where the virus disassembles. *J. Virol.* 76: 5156 – 5166.
- Norkin, L.C., Kuksin, D. (2005):** The caveolae – mediated SV40 entry pathway bypasses the golgi complex en route to the endoplasmic reticulum. *Virol. J.* 2: 38 – 43.
- Orlowski, M., Wilk, S. (2000):** Catalytic activities of the 20 S proteasome, a multicatalytic proteinase complex. *Arch. Biochem. Biophys.* 383: 1-16.
- Ott, D.E. (1997):** Cellular proteins in HIV virions. *Rev. Med. Virol.* 7: 167-180.
- Ott, D.E., Coren, L.V., Copeland, T.D., Kane, B.P., Johnson, D.G., Sowder, R.C., Yoshinaka, Y., Oroszland, S., Arthur, L.O., Henderson L.E. (1998):** Ubiquitin is covalently attached to the p6^{Gag} proteins of human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus and to the p12^{Gag} protein of moloney murine leukemia virus. *J. Virol.* 72: 2962 - 2968.
- Ott, D.E., Coren, L.V., Sowder R.C., Adams, J., Nagashima, K., Schubert, U. (2002):** Equine infectious anemia virus and the ubiquitin – proteasome system. *J. Virol.* 76: 3038 - 3044.
- Palmer, A., Rivett, A.J., Thomson, S., Hendil, K.B., Butcher, G.W. (1996):** Subpopulations of proteasomes in rat liver nuclei, microsomes and cytosol. *Biochem. J.* 316: 401 – 407.
- Palombella, V.J., Rando, O.J., Goldberg, A.L., Maniatis, T. (1994):** The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell* 78: 773 - 785.
- Panté, N., Aebi, U. (1994):** Towards understanding the three-dimensional structure of the nuclear pore complex at the molecular level. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 4: 187 – 196.
- Parton, R.G., Simons, K. (1995):** Digging into caveolae. *Science* 269: 1398 – 1399.

- Patnaik, A., Chau, V., Wills, J.V. (2000):** Ubiquitin is part of the retrovirus budding machinery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 13069 - 13074.
- Pelkmans, L., Helenius, A. (2003):** Insider information: what viruses tell us about endocytosis. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 15: 414 – 422.
- 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.
- Pelkmans, L., Püntener, D., Helenius, A. (2002):** Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40 – induced internalization of caveolae. *Science* 296: 535 – 539.
- Petrogiannis-Haliotis, T., Sakoulas, G., Kirby, J., Koralnik, I.J., Dvorak, A.M., Monahan-Earley, R., DE Girolami, P.C., DE Girolami, U., Upton, M., Major, E.O., Pfister, L.A., Joseph, J.T. (2001):** BK-related polyomavirus vasculopathy in a renal-transplant recipient. *N. Engl. J. Med.* 345: 1250 - 1255.
- Pike, L.J. (2004):** Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. *Biochem. J.* 378: 281 - 292.
- Pilon, M., Schekman, R., Römisch, K. (1997):** Sec61p mediates export of misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum to the cytosol for degradation. *EMBO J.* 16: 4540 – 4548.
- 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.
- Plempner, R.K., Böhmler, S., Bordallo, J., Sommer, T., Wolf, D.H. (1997):** Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation. *Nature* 388: 891 – 895.
- Poggi, A., Rubartelli, A., Zocchi, M.R. (1998):** Involvement of dihydropyridine-sensitive calcium channels in human dendritic cell function. Competition by HIV-1 Tat. *J. Biol. Chem.* 273: 7205 - 7209.
- Pol, A., Luetterforst, R., Lindsay, M., Heino, S., Ikonen, E., Parton, R.G. (2001):** A caveolin dominant negative mutant associates with lipid bodies and induces intracellular cholesterol imbalance. *J. Cell. Biol.* 152:1057 - 1070.
- Putterman, D., Pepinsky, R.B., Vogt, V.M. (1990):** Ubiquitin in avian leukosis virus particles. *Virology* 176: 633 - 637.
- Qu, Q., Sawa, H., Suzuki, T., Semba, S., Henmi, C., Okada, Y., Tsuda, M., Tanaka, S., Atwood, W.J., Nagashima (2004):** Nuclear entry mechanism of the human polyomavirus JC virus – like particle. *J. Biol. Chem.* 279: 27735 – 27742.

Querbes, W., Benmerah, A., Tosoni, D., Di Fiore, P.P., Atwood, W.J. (2004): A JC virus – induced signal is required for infection of glial cells by a clathrin- and eps15-dependent pathway. *J. Virol.* 78: 250 – 256.

Ren, M., Xu, G., Zeng, J., De Lemos-Chiarandini, C., Adesnik, M., Sabatini, D.D. (1998): Hydrolysis of GTP on rab11 is required for the direct delivery of transferrin from the pericentriolar recycling compartment to the cell surface but not from sorting endosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 95: 6187 - 6192.

Richards, A.A., Stang, E., Pepperkok, R., Parton, R.G. (2002): Inhibitors of COP-mediated transport and cholera toxin action inhibit simian virus 40 infection. *Moll. Biol. Cell* 13: 1750 – 1764.

Richterova, Z., Liebl, D., Horak, M., Palkova, Z., Stokrova, J., Hozak, P., Korb, J., Forstova, J. (2001): Caveolae are involved in the trafficking of mouse polyomavirus virions and artificial VP1 pseudocapsid toward cell nuclei. *J. Virol.* 75: 10880 – 10891.

Rivett, A.J., Palmer, A., Knecht, E. (1992): Electron microscopic localization of the multicatalytic proteinase complex in rat liver and in cultured cells. *J. Histochem. Cytochem.* 40: 1165 – 1172.

Rock, K.L., Gramm, C., Rothstein, L., Clark, K., Stein, R., Dick, L., Hwang, D., Goldberg, A.L. (1994): Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 78: 761 - 771.

Ros, C., Burckhardt, C.J., Kempf, C. (2002): Cytoplasmic Trafficking of Minute Virus of Mice: Low-pH Requirement, Routing to Late Endosomes, and Proteasome Interaction. *J. Virol.* 76: 12634 - 12645.

Ros, C., Kempf C. (2004): The ubiquitin-proteasome machinery is essential for nuclear translocation of incoming minute virus of mice. *Virology* 324: 350 - 360.

Rothberg, K., Heuser, J.E., Donzell, W.C., Ying, Y.-S., Glenney, J.R., Anderson, R.G.W. (1992): Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 68: 673 – 682.

Roy, S., Luetterforst, R., Harding, A., Apolloni, A., Etheridge, M., Stang, E., Rolls, B., Hancock, J.F., Parton, R.G. (1999): Dominant-negative caveolin inhibits H-Ras function by disrupting cholesterol-rich plasma membrane domains. *Nat. Cell Biol.* 1: 98 - 105.

Salzmann, U., Kral, S., Braun, B., Standera, S., Schmidt, M., Kloetzel, P.M., Sijts, A. (1999): Mutational analysis of subunit i beta2 (MECL-1) demonstrates conservation of cleavage specificity between yeast and mammalian proteasomes. *FEBS Lett.* 454: 11 - 15.

Sambrook, J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989): A molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory press.

Sanchez-San Martin, C., Lopez, T., Arias, C.F., Lopez, S. (2004): Characterization of rotavirus cell entry. *J. Virol.* 78: 2310 - 2318.

Scheffner, M., Huibregtse, J.M., Vierstra, R.D., Howley, P.M. (1993): The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75: 495 - 505.

Scheffner, M., Werness, B.A., Huibregtse, J.M., Levine, A.J., Howley, P.M. (1990): The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 63: 1129 - 1136.

Schubert, U., Ott, D.E., Chertova, E.N., Welker, R., Tessmer, U., Princiotta, M.F., Bannink, J.R., Kräusslich, H.-G., Yewdell J.W. (2000): Proteasome inhibition interferes with Gag polyprotein processing, release, and maturation of HIV-1 and HIV-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 13057 - 13062.

Schwartz, O., Marechal, V., Friguet, B., Arenzana-Seisdedos, F., Heard, J.M. (1998): Antiviral activity of the proteasome on incoming human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 72: 3845 - 3850.

Seganti, L., Mastromarino, P., Superti, F., Sinibaldi, L., Orsi, N. (1981): Receptors for BK virus on human erythrocytes. *Acta Virol.* 25: 177 - 181.

Seemuller E, Lupas A, Zuhl F, Zwickl P., Baumeister W. (1995): The proteasome from *Thermoplasma acidophilum* is neither a cysteine nor a serine protease. *FEBS Lett.* 359: 173 - 178.

Seeger, M., Ferrell, K., Frank, R., Dubiel, W. (1997): HIV-1 tat inhibits the 20 S proteasome and its 11 S regulator-mediated activation. *J. Biol. Chem* 272: 8145 - 8148.

Shamu, C.E., Story, C.M., Rapoport, T.A., Ploegh, H.L. (1999): The pathway of US11-dependent degradation of MHC class I heavy chains involves a ubiquitin - conjugated intermediate. *J. Cell. Biol.* 147: 45 - 57.

Sieczkarski, S.B., Whittaker, G.R. (2002a): Dissecting virus entry via endocytosis. *J. Gen. Virol.* 83: 1535 - 1545.

Sieczkarski S.B., Whittaker, G.R. (2002b): Influenza virus can enter and infect cells in the absence of clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol.* 76: 10455 - 10464.

Sigismund, S., Woelk, T., Puri, C., Maspero, E., Tacchetti, C., Transidico, P., Di Fiore, P.P., Polo, S. (2005): Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 102: 2760 - 2965.

Sinibaldi, L., Goldoni, P., Pietropaolo, V., Longhi, C., Orsi, N. (1990): Involvement of gangliosides in the interaction between BK virus and Vero cells. *Arch. Virol.* 113: 291 – 296.

Sinibaldi, L., Viti, D., Goldoni, P., Cavallo, G., Caroni, C., Orsi, N. (1987): Inhibition of BK virus haemagglutination by gangliosides. *J. Gen. Virol.* 68: 879 – 883.

Smart, E.J., Ying, Y., Donzell, W.C., Anderson, R.G. (1996): A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 271: 29427 - 29435.

Smith, A.E., Lilie, H., and Helenius, A. (2003): Ganglioside - dependent cell attachment and endocytosis of murine polyomavirus - like particles. *FEBS Letters.* 555: 199 - 203.

Sönnichsen, B., De Renzis, S., Nielsen, E., Rietdorf, J., Zerial, M. (2000): Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J. Cell. Biol.* 149: 901 - 914.

Stang, E., Kartenbeck, J., Parton, R.G. (1997): Major histocompatibility complex class I molecules mediate association of SV40 with caveolae. *Mol. Biol. Cell* 8: 47 – 57.

Stehle, T., Harrison, S.C. (1996): Crystal structures of murine polyomavirus in complex with straight – chain and branched – chain sialyloligosaccharide receptor fragments. *Structure* 4: 183 – 194.

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.

Stehle, T., Yan, Y., Benjamin, T.L., Harrison, S.C. (1994): Structure of murine polyomavirus complexed with an oligosaccharide receptor fragment. *Nature* 369: 160 – 163.

Strack, B., Calistri, A., Accola, M.A., Palú, G., Göttlinger, H.G. (2000): A role for ubiquitin ligase recruitment in retrovirus release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 13063 - 13068.

Summerford, C., Bartlett, J.S., Samulski, R.J.(1999): AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nat. Med.* 5: 78 - 82.

Summerford, C., Samulski, R.J. (1998): Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J. Virol.* 72: 1438 - 1445.

Suzuki, T., Seko, A., Kitajima, K., Inoue, Y., Inoue, S. (1994): Purification and enzymatic properties of peptide: N – glycanase from C3H mouse - derived L – 929 fibroblast cells. Possible widespread occurrence of post – translational remodeling of proteins by N – deglycosylation. *J. Biol. Chem.* 269: 17611 – 17618.

Touze, A., Bousarghin, L., Ster, C., Combita, A.L., Roingeard, P., Coursaget, P. (2001): Gene transfer using human polyomavirus BK virus – like particles expressed in insect cells. *J. Gen. Virol.* 82: 3005 – 3009.

Trouet, D., Hermans, D., Droogmans, G., Nilius, B., Eggermont, J. (2001): Inhibition of volume-regulated anion channels by dominant-negative caveolin-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284: 461 - 465.

Tsai, B., Gilbert, J.M., Stehle, T., Lencer, W., Benjamin, T.L., Rapoport, T.A. (2003): Gangliosides are receptor for murine polyoma virus and SV40. *EMBO J.* 22: 4346 – 4355.

Türler, H., Beard, P. (1985): Simian virus 40 and polyoma virus: growth, titration, transformation and purification of viral components. In: Mahy B.W.J. (ed.): *Virology: a practical approach.* IRL Press, Oxford, 169 - 192.

Uittenbogaard, A., Ying, Y., Smart, E.J. (1998): Characterization of a cytosolic heat-shock protein-caveolin chaperone complex. Involvement in cholesterol trafficking. *J. Biol. Chem.* 273: 6525 - 6532.

Uittenbogaard, A., Smart, E.J. (2000): Palmitoylation of caveolin-1 is required for cholesterol binding, chaperone complex formation, and rapid transport of cholesterol to caveolae. *J. Biol. Chem.* 275: 25595 - 25599.

Ullrich, O., Reinsch, S., Urbe, S., Zerial, M., Parton, R.G. (1996): Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. *J. Cell. Biol.* 135: 913 - 924.

Urbe, S., Huber, L.A., Zerial, M., Tooze, S.A., Parton, R.G. (1993): Rab11, a small GTPase associated with both constitutive and regulated secretory pathways in PC12 cells. *FEBS Lett.* 334: 175 - 182.

Vihinen-Ranta, M., Yuan, W., Parrish, C.R. (2000): Cytoplasmic trafficking of the canine parvovirus capsid and its role in infection and nuclear transport. *J. Virol.* 74: 4853 - 4859.

Ward, C.L., Omura, S., Kopito, R.R. (1995): Degradation of CFTR by the ubiquitin – proteasome pathway. *Cell* 83: 121 – 127.

Werness, B.A., Levine, A.J., Howley, P.M. (1990): Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 248: 76 - 79.

Whittaker, G.R., Kann, M., Helenius, A. (2000): Viral entry into the nucleus. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 16: 627 - 651.

Wiertz, E.J., Jones, T.R., Sun, L., Bogyo, M., Geuze, H.J., Ploegh, H.L. (1996a): The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Cell* 84: 769 - 779.

Wiertz, E.J., Tortorella, D., Bogyo, M., Yu, J., Mothes, W., Jones, T.R., Rapoport, T.A., Ploegh, H.L. (1996b): Sec61 – mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature* 384: 432 - 438.

Wilcke, M., Johannes, L., Galli, T., Mayau, V., Goud, B., Salamero, J. (2000): Rab11 regulates the compartmentalization of early endosomes required for efficient transport from early endosomes to the trans-golgi network. *J. Cell. Biol.* 151: 1207 - 1220.

Wilk, S., Orlowski, M. (1983): Evidence that pituitary cation-sensitive neutral endopeptidase is a multicatalytic protease complex. *J. Neurochem.* 40: 842 - 849.

Wilkinson, K.D. (1997): Regulation of ubiquitin-dependent processes by deubiquitinating enzymes. *FASEB J.* 11: 1245 - 1256.

Yamada, M., Kasamatsu, H. (1993): Role of nuclear pore complex in simian virus 40 nuclear targeting. *J. Virol.* 67: 119 – 130.

Yang, M., Ellenberg, J., Bonifacio, J.S., Weissman, A.M. (1997): The transmembrane domain of a carboxy – terminal anchored protein determines localization to the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 272: 1970 – 1975.

Yang, Y., Janich, S., Cohn, J.A., Wilson, J.M. (1993): The common variant of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is recognized by hsp70 and degraded in a pre – Golgi nonlysosomal compartment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 9480 – 9484.

Yu, G.Y., Lai, M.M. (2005): The ubiquitin-proteasome system facilitates the transfer of murine coronavirus from endosome to cytoplasm during virus entry. *J. Virol.* 79: 644 - 648.

Zullo, J., Stiles, C.D., Garcea, R.L. (1987): Regulation of *c-myc* a *c-fos* mRNA levels by polyomavirus: Distinct roles for the capsid protein VP1 and the viral early proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 1210 – 1214.

