

Povoľujem zapožičanie svojej diplomovej práce k študijným účelom a žiadam, aby bola vedená presná evidencia čitateľov. Prevzaté údaje je čitateľ povinný riadne odcítovať.

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra genetiky a mikrobiologie



Štúdium skorých fázi infekcie myším polyomavírusom

Mária Šurinová

Praha 2007

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

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

Mária Šurinová

Ďakujem Doc.RNDr. Jitke Forstovej,CSc. za neoceniteľnú pomoc a rady, ktoré mi poskytovala behom vypracovávania diplomej práce.

Ďakujem RNDr. Jiřine Hánovej, CSc. za odbornú pomoc pri práci s tkanivovými kultúrami a pri izolácii vírusu.

Ďakujem Mgr. Veronike Hruškovej, Mgr. Marianne Stančíkovej a Mgr. Lenke Horníkovej za ich rady a trpezlivosť s mojimi otázkami.

Ďakujem Mgr. Vojtěchovi Žílovi za vyhotovenie elektrón mikroskopických snímok a Mgr. Ondřejovi Šebestovi za pomoc pri konfokálnej mikroskopii.

Ďakujem Mgr. Alene Morávkovej, PhD. za pomoc s protilátkami a pri vypracovávaní diplomovej práce.

Ďakujem pani laborantkám Vlastě Sakařovej a Ivane Polívkovej za pomoc pri práci a za ich milé a povzbudivé slová v tom správnom čase.

Sice na poslednom mieste, ale rozhodne nie ako posledným, ďakujem svojej mamke, Vali a celej rodine za podporu, možnosť študovať a vyštudovať.

Studies of early stage of mouse polyomavirus infection

ABSTRACT

The long-term research project of our laboratory is concentrated on the studies of the life cycle of the mouse polyomavirus. One of the many fields of our interest is targeted on entry and transport of the mouse polyomavirus into cells. Endocytic pathways are not completely understood but in general, it is known that the polyomavirus does not use only one endocytic pathway. After its binding to a receptor containing sialic acid, the virus is internalised into smooth monopinocytic vesicles. Monopinocytic vesicles carrying virions fuse often with early endosomes. Acidic pH of endosomes is necessary for successful virus infection. The role of caveolin in the above-mentioned process still remains unclear. Three hours post infection, a signal of the virus can be found in endoplasmatic reticulum and also in recycling endosomes. Regardless multiplicity of infection, only few virions successfully deliver their genomes into the cell nucleus for their expression. Where virus uncoating occurs and how virus genomes enter the nucleus remains unexplained. As well, the contribution of the minor structural proteins VP2 and VP3 is unclear. It is only partial information about processes of defence mechanisms of cell. To contribute to elucidation of some of these processes, we chose, besides virions, VLPs (pseudocapsids), which do not contain viral genomes and are not able to induce productive infection but consist of capsid structures to the virions.

We isolated mouse polyomavirus with infection titre $2 \cdot 10^{11}$ from infected whole mouse embryo cells and VP1 and VP1/3 pseudocapsids from insect cells infected by recombinant baculoviruses. With these isolates we studied whether pseudocapsids (composed of VP1 only) or (containing one of the minor proteins) can be competitive inhibitors of polyomavirus infection when added to virus inoculum prior infection. We found that VP1/3 have ability to compete infection 60% (in ratio 100 pseudocapsids per 1 viron) and VP1 pseudocapsids 43% (under the same conditions). We further studied colocalisation of entering virions and pseudocapsids by confocal microscopy. Only the minority of entering virions (and pseudocapsids) colocalised with caveolin-1 20 minutes post infection. Substantially higher level of colocalisation of these structures was observed 3 hours post infection, in particular in perinuclear areas. Surprisingly, the most abundant colocalisation of VP1 and caveolin 1 could be seen throughout the cytoplasm 12 hours post infection. This suggests, that caveolin rich vesicles may be involved in discharging of disassembled virus particles from cells.

Key words: polyomavirus, VLP, inhibition of infection, virus entry, caveolin, VP1

ZOZNAM SKRATIEK

- 5HT_{2A}R- receptor pre 5 hydroxytryptamín 2A
ATP- adenzín trifosfát
BFM- bromfenolová modrá
bp- páry bází
BKV- BK vírus
BSA- bovinny sérum albumín
Cer- ceramid
COPI- „coatomer protein complex“
DNA- deoxyribonukleová kyselina
Eps15- „epidermal growth factor receptor pathway substrate 15“
EtBr- etídium bromid
Gal- galaktóza
GalCer- galaktozyl ceramid
GalNAc- N- acetylgalaktozamin
h, hod- hodina
h.p.i.- hodin po infekci
HAU- hemaglutinačné jednotky
JCV- JC vírus
kDa- kilodalton
LT- veľký T antigén
MHC gp I- glykoproteín hlavného histokompatibilného komplexu I. Triedy
min.- minúta
min. p.i. – minút po infekcii
M.O.I.- multiplicita infekcie
mPyV- myší polyomavírus
mRNA- mediátorová ribonukleová kyselina
MT- stredný T antigén
NPC- komplex jadrových pórov

OD- opická denzita
ORI- začiatok replikácie
PBS- „phosphate buffered saline“
PIK3- proteín kináza 3
p.f.u.- „plaque forming units“
RTG- röntgenový
rpm- otáčky za minútu
ST- malý T antigén
SV40- simian vírus 40
T antigén- tumor antigén
TK- tkanivové kultúry
VP1- vírusový kapsidový proteín
VP2- vírusový kapsidový proteín
VP3- vírusový kapsidový proteín
VLP- „virus like particules“
WME- „whole mouse embryo“
YY1- „ying yang“

OBSAH

1. Úvod	11
2. Literárny prehľad	13
2.1. Polyomaviridea	14
2.2. Biologické vlastnosti polyomavírusov	15
2.3. Myší polyomavírus.....	15
2.3.1. Štruktúra viriónu.....	15
2.3.2. Organizácia genómu.....	16
2.3.3. Replikačný cyklus.....	17
2.3.4. Expresia a funkcie génových produktov.....	19
2.3.4.1. Expresia skorých génov.....	19
2.3.4.2. Replikácia vírusovej DNA.....	23
2.3.4.3. Expresia neskorých génov.....	24
2.3.4.4. Morfogenéza virónov.....	30
2.5. Simian vírus (SV40).....	31
2.6. BK a JC vírus.....	32
2.7. Vstup a transport polyomavírusov do bunky.....	34
2.7.1. Možné spôsoby vstupu polyomavírusov do bunky.....	34
2.7.1.1. Vstup a transport myšieho polyomavírusu do buniek.....	35
2.7.1.2. Vstup a transport SV40 do buniek.....	38
2.7.1.3. Vstup a transport BK a JC vírusu do buniek.....	40
3. Cieľe diplomovej práce.....	41
4. Materiál a metódy.....	44
4.1. Prístroje.....	45
4.2. Materiál.....	46
4.2.1. Chemikálie.....	46
4.2.2. Roztoky.....	48
4.2.2.1. Enzými.....	51
4.2.3. Markre molekulových hmotností.....	53
4.2.4. Protilátky.....	54
4.2.5. Média a materiál pre kanivové kultúry.....	55

4.2.6. Použité bakteriálne kmene, bunkové línie a vírusy.....	56
4.3. Metódy.....	58
4.3.1. Sterilizácia.....	58
4.3.2. Práca s tkanivovými kultúrami.....	58
4.3.2.1. Pasážovanie hmyzích buniek.....	58
4.3.2.2. Infekcia hmyzích buniek bakulovírusom.....	59
4.3.2.3. Fixácia hmyzích buniek.....	59
4.3.2.4. Pasážovanie cicavčích buniek.....	59
4.3.2.5. Synchronizácia cicavčích buniek pred infekciou.....	60
4.3.2.6. Infekcia cicavčích buniek vírusom.....	60
4.3.2.7. Infekcia cicavčích buniek na mikroskopické sklíčka pre imunofluorescenčné značenie vírusových antigénov.....	60
4.3.2.8. Fixácia civačích buniek paraformaldehydom.....	61
4.3.2.9. Nepriama imunofluorescencia.....	61
4.3.2.10. Titrácia myšieho polyomavírusu.....	61
4.3.2.11. Hemaglutinačný test.....	62
4.3.3. Práca s bakteriálnymi kmeňmi.....	63
4.3.3.1. Kultivácia baktérií.....	63
4.3.3.2. Príprava kompetentných buniek pre elektroporáciu.....	63
4.3.3.3. Elektroporácia plazmidovej DNA do kompetentných buniek.....	64
4.3.4. Práca s DNA.....	64
4.3.4.1. Horizontálna agarózová elektroforéza.....	64
4.3.4.2. Maxiizolácia plazmidovej DNA-alkalická metóda.....	65
4.3.4.3. Odstránenie RNA zo vzorky DNA.....	66
4.3.4.4. Miniizolácia plazmidovej DNA- alkalická metóda.....	66
4.3.4.5. Izolácia fragmentov DNA z agarózového gelu kitom.....	67
4.3.4.6. Štiepenie DNA restriktívnymi endonukleázami.....	67
4.3.4.7. Defosforylácia vektorovej DNA.....	68
4.3.4.8. Ligácia.....	68
4.3.5. Práca s proteínmi.....	68
4.3.5.1. Príprava lyzátu z infikovaných hmyzích buniek.....	68

4.3.5.2. Izolácia pseudokapsíd z lyzátu hmyzích buniek.....	69
4.3.5.3. Izolácia myšieho polyomavírusu.....	69
4.3.5.4. Centrifugácia cez 10% sacharózový vankúš.....	70
4.3.5.5. Izopyknnická centrifugácia v rovnovážnom CsCl gradiente.....	70
4.3.5.6. Dialýza.....	71
4.3.5.7. SDS-polyakrylamidová elektroforéza (SDS-PAAGE).....	71
4.3.5.8. Western blot.....	72
4.3.5.9. Dot blot.....	72
4.3.5.10. Imunodetekcia proteínov.....	72
4.3.5.11. Meranie koncentrácie proteínov podľa Bradfordovej.....	72
5. Výsledky.....	73
5.1 Izolácia myšieho polyomavírusu.....	74
5.2. Izolácia VP1, VP1/2 a VP1/3 pseudokapsíd z lyzáto hmyzích buniek.....	79
5.3. Testovanie schopnosti VP1 a VP1/3 pseudokapsíd inhobovať vstúp natívnych viriónov do hostiteľskej bunky.....	87
5.4. Vzťah caveolinových váčkov k pohybu myšieho polyomavírusu a pseudokapsíd bunkou.....	91
5.5. Konštrukcia palzmidu pFastBac-LT.....	105
6. Diskusia.....	110
7. Záver.....	117
8. Zoznam citovanej literatúry.....	119

1. ÚVOD

Polyomavírusy sú malé neobalené DNA vírusy a sú dôležitým modelovým organizmom. Od roku 1953 sú intenzívne študované a hlavné smerovanie prvých prác je ich onkogénny potenciál. Tieto práce viedli k identifikácii nádorového supresorového proteínu p53 a tiež pomohli pochopiť vplyv vírusov na reguláciu cyklu bunky. K ďalším poznatkom patrí napr. štruktúra nadšroubovice DNA, identifikácia počiatku replikácie u eukaryot, objav alternatívneho zostrihu a identifikácia jadrového lokalizačného signálu. Aj napriek významným objavom a širokému spektru oblastí vzhľadom ku ktorým boli a sú polyomavírusy študované stále nemáme dostatok jasných a jednoznačných informácií na základe ktorých by sme mohli bez váhania popísať procesy spojené so vstupom a transportom polyomavírusov v bunke.

Rôzne vírusy používajú pre svoj vstup, okrem iného, všetky známe endocytické dráhy bunky: klatrínom sprostredkovaná endocytóza, vstup cez caveoly, makropinocytózu a ešte nedosatočne popísanú cestu alebo cesty nezávislé na clatrine alebo caveoline. Práve sledovanie vstupu vírusu do buniek pomáha jednotlivé endocytické dráhy a ich vzájomné prepojenie identifikovať. K štúdiu týchto procesov sú okrem natívnych viriónov používané takzvané „virus like particle“- umelo pripravené kapsidy. Tieto štruktúry zastúpením štruktúrnych proteínov zodpovedajú natívnym viriónom, ale nenesú genóm vírusu a tak nie sú schopné produktívnej infekcie. Umelo pripravené kapsidy je možné rôzne upravovať, napr. enkapsidovať do nich nukleovú kyselinu alebo vkladať do ich štruktúr krátke peptidy či krátke proteíny. Takto upravené kapsidy by sa mohli využívať pre terapeutické účely. Aj z tohoto dôvodu je nutné poznať ich pohyb a interakcie v bunke a zmysel týchto interakcií.

2. LITERÁRNY PREHĽAD

2.1. Polyomaviridae

Polyomavírusy sú malé neobalené DNA vírusy. Doposiaľ poznané polyomavírusy produktívne infikujú úzky okruh stavovcov. Cicavčie polyomavírusy sú uvedené v tabuľke 2.1. Medzi najštudovanejšie patrí myší polyomavírus, vírus SV40 a ľudské polyomavírusy – BKV a JC vírus. Myší polyomavírus bol objavený v roku 1953 v nádoroch slinných žliaz myší. Pomenovaný bol na základe schopnosti vyvolávať nádory na rôznych miestach tela (*poly* = grécky mnoho, *oma* = grécky nádor) (GROSS, 1953). Vírus SV40 bol objavený v 60. rokoch 20. storočia, ako kontaminácie tkanivovej kultúry obličkových buniek (*Makkak rhesus*) (EDDY *et al.*, 1962). Ľudské polyomavírusy BKV a JCV boli objavené v roku 1971, infikujú človeka v detstve a sú prítomné v takmer celej ľudskej populácii. BKV bol izolovaný z moču pacientov vystavených imunosupresívnej liečbe po transplantácii (GARDNER *et al.*, 1971) a JCV z tkanív mozgu pacienta s progresívnou multifokálnou leukoencefalopatiou (PADGETT *et al.*, 1971). V roku 2007 boli objavené ďalšie dva ľudské polyomavírusy KI (ALLANDER *et al.*, 2007) a WU (GAYNOR *et al.*, 2007), oba izolované vo väčšine prípadov zo vzoriek dýchacieho traktu pacientov. Ich charakterizácia ešte nie je úplná, ale autori sa na základe zistených sekvencií domnievajú, že sa jedná o novú fylogenetickú vetvu čeľade *Polyomaviridae*.

Vírus	Hostiteľ	Veľkosť genómu (bp)
SV 40	Makak rhesus	5243
JCV	Človek	5130
BKV	Človek	5133
Lymfotropný papovavírus	Makak magot	5270
Bovínny polyomavírus	Dobytok	4967
Polyomavírus škrečkov	Škrečok	5366
Myší polyomavírus	Myš	5397
Kirsten vírus	Myš	5754
Králičí polyomavírus	Králik	X
Potkaní polyomavírus	Potkan	X
Simian agent 12	Pavián	5230 ^{a)}
KI	Človek	5040 ^{b)}
WU	Človek	5229 ^{c)}

Tab. 2.1: Prehľad cicavčích polyomavírusov. X-údaj nie je k dispozícii (COLE 1996; a) CANTALUPO *et al.* 2005 b) ALLANDER *et al.*, 2007; c) GAYNOR *et al.*, 2007)

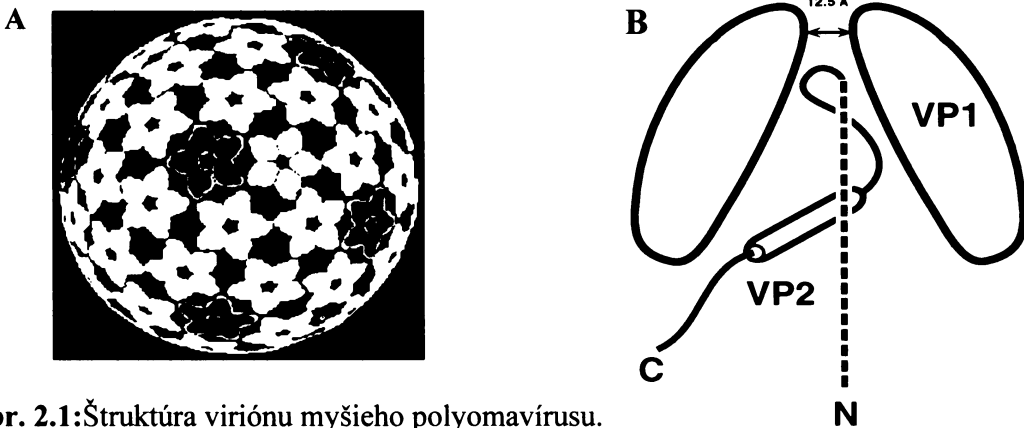
2.2. Biologické vlastnosti polyomavírusov

Polyomavírusy vyvolávajú nádory u imunitne oslabených prirodzených hostiteľov alebo u niektorých nepermissívnych hostiteľov. V permissívnych bunkách sa, ktoré sú schopné zaistiť replikáciu DNA vírusu, dôjde po vzniku potomstva k deštrukcii bunky. Nepermissívne bunky, v ktorých vírus nie je schopný dokončiť svoj replikačný cyklus, neumierajú a pokiaľ sa v nich produkujú polyomavírusové skoré antigény, dochádza k ich transformácii.

2.3. Myší polyomavírus

2.3.1. Štruktúra viriónu

Vírus má kapsidu s ikosahedrálnou symetriou s priemerom 45 nm (Obr.2.1 A), tvorenou tromi štruktúrnymi proteínmi: VP1- majoritný a VP2 a VP3- minoritné. Proteín VP1 sa usporiada do pentaméru. Do centrálnej dutiny každého pentaméru sa viaže buď VP2 alebo VP3 proteín svojimi C-koncovými sekvenciami, ktoré sú u oboch minoritných proteínov rovnaké (Obr.2.1B). Vo vnútri kapsidy sa nachádza „nucleocore“ tvorené genómom polyomavírusu v komplexe s bunkovými histónmi H2A, H2B, H3, H4. Histón H1 je z vírusového minichromozómu odstránený počas morfogénzy viriónov (COLE, 1996)



Obr. 2.1:Štruktúra viriónu myšieho polyomavírusu.

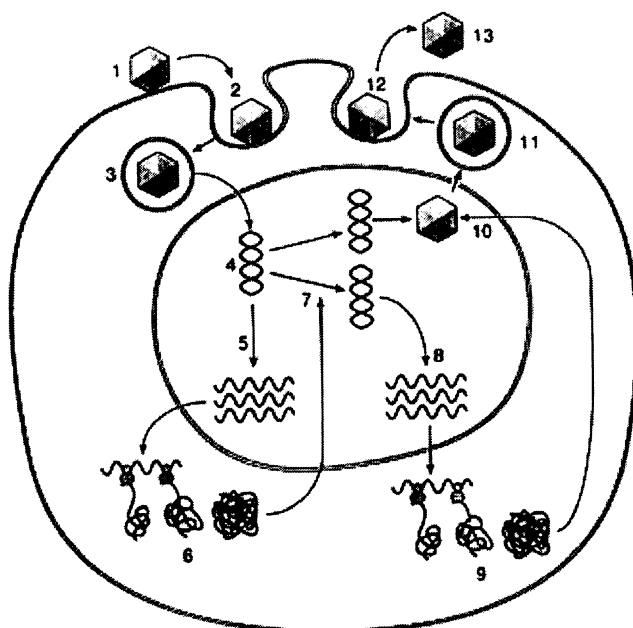
A- Schématické znázornenie kapsidy tvorenej pentamérmi proteínu VP1. Modro sú označené pentavalentné a bielo hexavalentné pentaméry (prevzaté z SALUNKE *et al.*, 1986).

B- Znázornenie štruktúry pentaméru VP1(sú zobrazené len dve molekuly) s proteínom VP2 v centrálnej dutine. Prerušovane je vyznačená unikátna N-koncová časť proteínu VP2. N- a C- koniec proteínu smeruje dovnútra viriónu. (prevzaté z CHEN *et al.*, 1998).

2.3.2 Organizácia genómu

Genóm myšieho polyomavírusu je tvorený jednou dvojitou, kovalentne uzatvorenou molekulou DNA. Veľkosť genómu je 5297 pb a je možné ho rozdeliť na tri oblasti (Obr.2.2): skorá, neskorá a regulačná. Skorá oblasť kóduje tri regulačné T (tumor) proteíny : LT antigén („large“ T), MT antigén („middle“ T), ST antigén („small“ T). Transkripcia a translácia skoréj oblasti začína po vstupe vírusu do jadra a pokračuje aj po začatí replikácie DNA. Neskorá oblasť kóduje kapsidové proteíny VP1, VP2, VP3 a je silne transkribovaná až po začatí replikácie genómu. Netranslatovaná oblasť obsahuje počiatok replikácie DNA (ORI), príahlé promotory pre skorú a neskorú transkripciu a enhancer transkripcie. Transkripcia začína obojsmerne z iniciačných miest ORI a mRNA pre skorú a neskorú oblasť sú prepisované z opačných reťazcov genómu

kapsidové proteíny, ktorá začína 18-20 hod. po infekcii. Dĺžka replikačného cyklu vírusu závisí na fáze bunkového cyklu infikovanej bunky a na multiplicitě infekcie. V exponenciálne rastúcich bunkách začína replikácia vírusovej DNA skôr ako v bunkách v G0 fáze. Replikačný cyklus pri infekcii exponenciálne rastúcej bunkovej kultúry (s multiplicitou nižšou alebo rovnou 1 pfu– plague forming units na bunku) trvá 48 hodín (CHEN a FLUCK 2001). Pri vysokej multiplicitě (40 pfu/bunku; pfu) postupuje infekcia rýchlejšie. Pravdepodobne je tomu tak preto, lebo v bunke sa nachádza viac vírusovej DNA a tým pádom sa môžu rýchlejšie predukovať skoré antigény, ktoré môžu posunúť bunku do S-fázy bunkového cyklu skôr. Replikačný cyklus myšieho polyomavírusu končí vznikom nových viriónov, smrťou bunky a následným uvoľnením vírusového potomstva. Schématické zobrazenie replikačného cyklu myšieho polyomavírusu je na obr.2.3. Na tomto obrázku je znázornený aj aktívny transport vírusu z buniek (fázy 10-13) skôr ako dôjde k ich deštrukcii, tak ako bolo popísané pre vírus SV40 (CLAYSON *et al.*, 1989)



Obr. 2.3: Schéma replikačného cyklu myšieho polyomavírusu

1,adsorbcia vírusu na membránu permissívnych buniek, väzba na receptor 2,vstup do bunky a formovanie transportného váčku 3, vírus je čiastočne rozvolnený a je transportovaný k jadru 4, „nucleocore“ preniká do jadra. 5, transkripcia skorých génov pomocou hostiteľskej RNA polymerázy II a export do cytoplazmy 6, translácia skorých m RNA na ribozómoch a vznik T antigénov 7, presun LT do jadra, kde iniciuje replikáciu vírusovej DNA a neskorú transkripciu z nových DNA templátov. 8, transport neskorých mRNA do cytoplazmy 9, syntéza štruktúrnych kapsidových proteínov 10, transport proteínov VP1, VP2 a VP3 do jadra a morfogenéza viriónov 11,transport viriónov v transportných váčkoch na povrch bunky 12, splynutie membrány transportného váčku s membránou bunky 13, uvoľnenie viriónov z bunky. (Prevzaté z Fields: Virology, 4 th Edition)

2.3.4 Expresia a funkcie génových produktov

2.3.4.1. Expresia skorých génov

Syntéza skorých a neskorých mRNA je katalyzovaná RNA polymerázou II. Transkripcia beží obojsmerne, RNA pre skorú a neskorú oblasť sú syntetizované z opačných reťazcov genómu. Bolo zistené, že transkripcia skorých antigénov, aj napriek ich zaužívanému označeniu, pokračuje v redukovanej miere aj v neskoršej fáze vírusovej infekcie (CHEN a FLUCK 2001). Replikácia vírusových genómov

môže začať, až keď je syntetizovaný veľký T antigén, ktorého funkciou je iniciovať replikáciu z vírusového ORI. Úlohou T antigénov je okrem iného, ako už bolo povedané, indukcia prechodu bunky do S fázy bunkového cyklu pre zaistenie vhodných podmienok pre replikáciu polyomavírusu.

LT antigén

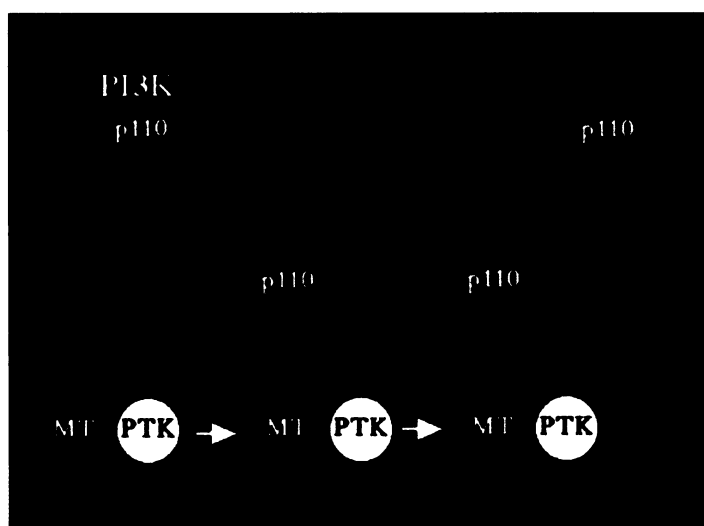
Veľký T antigén myšieho polyomavírusu je multifunkčný proteín s enzymatickými aktivitami a schopnosťou interagovať s rôznymi proteínmi bunky. Vďaka dvom jadrovým lokalizačným signálom je LT transportovaný do jadra (RICHARDSON *et al.* 1986), kde je prítomných 95% z jeho celkového množstva v bunke, pričom časť sa nachádza v nukleoplazme a časť je asociovaná s chromatínom a matrix jadra (STAUFENBIEL a DEPERT, 1983). LT je posttranslačne modifikovaný O-glykozyzáciou (SCHMITT a MANN, 1987), acetyláciou (KLOCKMANN a DEPERT, 1983), adenyláciou, poly(ADP)-ribosyláciou, N-koncovou acetyláciou (MELLOR a SMITH 1978) a fosforyláciou. Fosforylácia sprostredkúva reguláciu enzymatických aktivít a interakcií s ďalšími proteínmi. Význam ostatných modifikácií zatiaľ nie je známy. LT sa viaže k DNA sekvenci G(A/G)GGC v počiatku vírusovej replikácie, kde sa za prítomnosti ATP usporiadava do hexamér, ktoré majú ATP-dependentnú helikázovú aktivitu (COWIE a KAMEN, 1984). Nešpecificky, s nižšou afinitou sa viaže aj k jedno- a dvojvláknovej molekule DNA (COLE, 1996). LT antigén sa taktiež viaže na jednu z podjednotiek DNA polymerázy α a RPA („replication protein A“) čím zabezpečí pritiahnutie proteínov hostiteľského systému replikácie DNA do ORI na polyomavírusovej DNA (DORNREITER *et al.*, 1990). Takisto LT viaže DNA topoizomerázu I. Význam tejto väzby je v zabránení rozvíjania DNA mimo miesto replikácie (HALMER *et al.* 1998). LT takisto interaguje s proteínmi zúčastňujúcimi sa regulácie bunkového rastu, napr. s proteínom pRb a ďalšími proteínmi Rb rodiny, p107 a p130 (MORAN *et al.*, 1988). LT vírusu SV40 interaguje tiež s ďalším onkosupresorovým proteínom, p53. LT myšieho polyomavírusu s p53 neinteraguje a preto nie je schopný bunky

nádorovo transformovať, len ich immortalizovať. (DILWORTH, 1990). LT tvorí komplexy s transkripčnými faktormi AP2, TEF-1, TBP, YY1 a histón-acetylázou p300 (ECKNER *et al.* 1995). Bolo zistené, že YY1 a LT spolu interagujú nepriamo (ŠPANILOVÁ a VELKOVÁ, 2001) Na N-konci LT sa nachádza J doména, ktorá je homologická s J doménou chaperónu DnaJ *Escherichia coli*. Táto doména obsahuje tzv. HDP motív, vďaka ktorému môže chaperon interagovať s Hsc 70 a tým ovplyvňovať jeho aktivitu. DnaJ chaperóny stimulujú ATPázovú aktivitu DnaK chaperónov (napr. Hsc 70) a tak dôjde k uvoľneniu neusporiadaného proteínu z komplexu. DnaK chaperóny sa významnou mierou zúčastňujú metabolizmu proteínov, degradácie zle zbalených proteínov, usporiadavania proteínov a regulačných procesov (HARTL, 1996). LT je polyomavirusový chaperon, ktorý sa zúčastňuje na deregulácii buniek počas vírusovej infekcie. Energia vznikajúca hydrolýzou ATP na proteíne Hsc 70 je použitá ku konformačnej zmene proteínu, ktorý je súčasťou komplexu Rb s bunkovým transkripčným faktorom E2F. LT viaže pRb a týmto spôsobom sa z komplexu Rb-E2F uvoľňuje transkripčný faktor E2F, ktorý sprostredkuje transkripciu E2F závislých génov a zosilní transkripciu E2F závislých génov, dôležitých pre syntézu bunkovej (i vírusovej) DNA (BRODSKY a PIPAS, 1998). Chaperonová aktivita môže mať význam aj pri morfogénéze viriómov (CHROMY *et al.*, 2003).

MT antigén

MT antigén je kódovaný polyomavírusmi hlodavcov, ale nie polyomavírusmi primátov. Je zakotvený v bunkových membránach pomocou C- koncovej hydrofóbnej časti. V cytoplazmatickej membráne asociuje s mnohými proteínmi signálnej trasdukcie. Je to napr. c-src (COURTNEIDGE a SMITH, 1983) fosfatidylinozitol-3- kináza (PI3K) (AUGER *et.al.*,1992), adaptorový proteín Shc (CAMPBELL *et.al.*, 1994), proteín fosfatáza 2A (PALLAS *et.al.*, 1990). MT takto imituje aktivovaný receptor pre rastové faktory a spôsobuje transformáciu buniek. Obr.2.4 schématicky ukazuje interakciu a fosforyláciu komplexu MT

antigénu a PTK (proteín kináza src typu) s PI3K. Táto interakcia je kritická pre transformáciu buniek *in vitro* a indukciu nádorocv *in vivo*. MT je hlavný onkogén myšieho polyomavírusu. Neprítomnosť MT výrazne ovplyvňuje prepnutie skorej transkripcie na neskorú a to niekoľkými pravdepodobnými spôsobmi: napr. MT ovplyvňuje vírusovú replikáciu interakciami s proteínmi AP1/PEA1, PEA3, a c/EBP, ktoré majú väzbové miesto na genóme polyomavírusu v oblasti enhanceru. Dôsledkami sú defekty v replikácii genómu vírusu (CHEN a FLUCK, 2001).



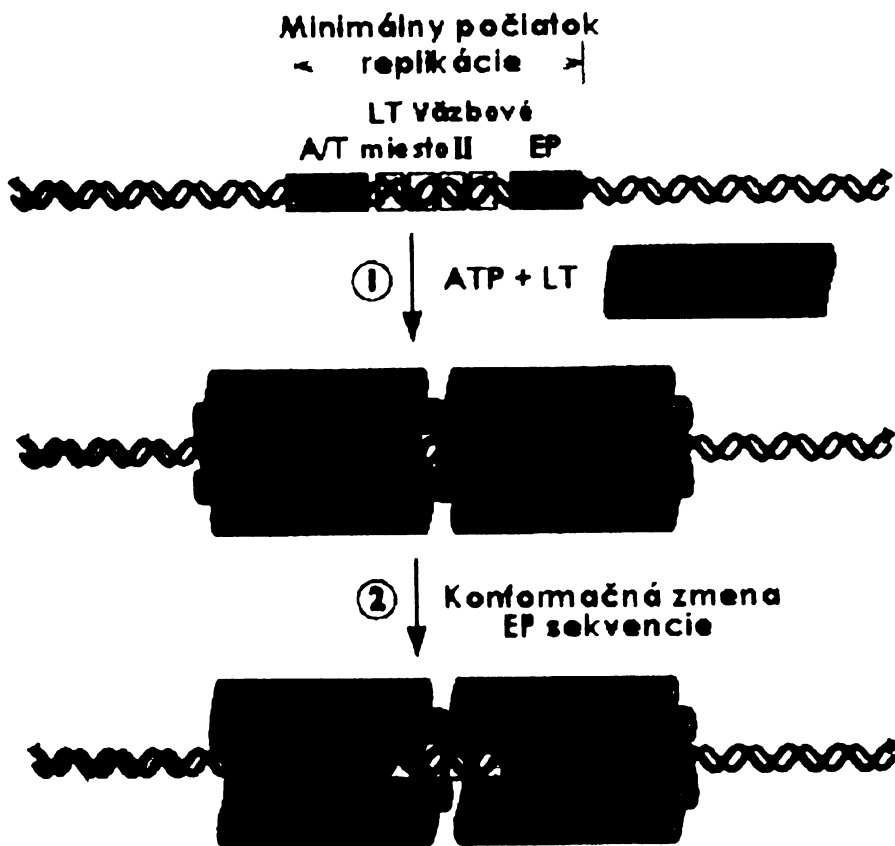
Obr. 2.4: Schéma fosforylácie PI3K za účasti MT antigénu. (Prevzaté z <http://www.tufts.edu/med/biochemistry/faculty/schaffh/mt.html>) Asociácia MT s PI3K je sprostredkovaná SH2 doménami podjednotky p85 PI3K. pY = fosforylovaný tyrozín, pS = fosforylovaný serín

ST antigén

Takmer celá sekvencia ST antigénu je obsiahnutá v MT antigéne. Je lokalizovaný v jadre aj v cytoplazme (ELLMAN *et al.*, 1984). Tvorí komplex s proteín fosfatázou 2A a inhibuje jej fosfatázovú aktivitu (YANG *et al.*, 1987), má vplyv na aktiváciu MAP kinázovej dráhy, čím pravdepodobne zabezpečuje stimuláciu bunkovej proliferácie (SONTAG *et al.*, 1993). Tento proteín nie je pre produktívnu infekciu permissívnych buniek nutný (STANELONI *et al.*, 1974)

2.3.4.2 Replikácia vírusovej DNA

Replikácia polyomavírusových genómov prebieha v jadre hostiteľskej bunky a jediný vírusový proteín potrebný pre tento proces je LT. LT spolu s ostatnými skorými antigénmi stimuluje prechod bunky do S fázy a tak pripraví optimálne prostredie pre replikáciu vírusovej DNA. Tá prebieha nielen v priebehu S-fázy, ale s nižšou intenzitou aj v G1 a G2 fázach bunkového cyklu (CHEN a FLUCK 2001). Replikácia vírusového genómu je iniciovaná nasadením dvoch hexamérov LT antigénu do ORI (Obr.2.5). Počiatok replikácie je v regulačnej oblasti a obsahuje 14bp dlhú invertovanú repetíciu, centrálny na GC bohatý, 23-24bp palindróm a 15-20 bp dlhú AT sekvenciu (De PAMPHILIS *et al.*, 1993). Po nasadení LT dôjde k miestnemu rozvinutiu centrálného palindrómu a AT bohatej oblasti. LT sa následne naviaže na DNA v ORI špecificky, pretože DNA už nie je dvojvláknová. Následne asociuje s RPA, proteínom zloženým z troch podjednotiek, ktorý má afinitu k jednovláknovej DNA a stabilizuje rozvolnenú oblasť DNA a spolu s helikázovou aktivitou LT umožňuje ďalšie rozvolňovanie dvojzávitnicovej DNA. Tento komplex sa nazýva preiniciačným a po nasadení DNA-polymerázy α primázy sa stáva komplexom iniciačným (GANNON *et al.*, 1990). Syntéza DNA pokračuje z ori obojsmerne okolo genómu. Dochádza k vzniku primeru a väzbe RFC na 3' koniec primeru, čo umožní nasadeniu PCNA a DNA polymerázy δ na DNA. Replikačná vidlica sa pohybuje za pomoci helikázovej aktivity LT. Dôjde k syntéze vedúceho reťazca a Okazakiho fragmentov na zaosávajúcom reťazci. Odstránenie primerov a ligácia Okazakiho fragmentov je sprostredkovaná RNázou H a DNA ligázou I.



Obr. 2.5: Model ATP-závislej formácie LT (Prevzaté z Flint, 2000).

2.3.4.3. Expresia neskorých génov

S počiatkom replikácie vírusového genómu dochádza k zmene transkripcie a k výraznému zvýšeniu transkripcie neskorých génov. Donesť sa predpokladalo, že skorá transkripcia je v neskoraj (HERBIG *et al.*, 1999) Podrobná analýza v laboratóriu M.Fluck (CHEN a FLUCK, 2001) ukázala, že transkripcia aj translácia z oblasti skorých génov prebieha intenzívne aj v neskoraj fáze infekcie. Primárny transkript je tvorený niekoľkonásobnými kópiami celého genómu (ACHESON, 1987) a prechádza tzv. “leader- to- leader” zostrihom. Sú k sebe zostrihané nekódujúce “leader” sekvencie z jednotlivých kópií genómu a intróny, ktoré tvoria zvyšok genómu, sú vystrihnuté (KAMEN *et al.*, 1980). Následne je k

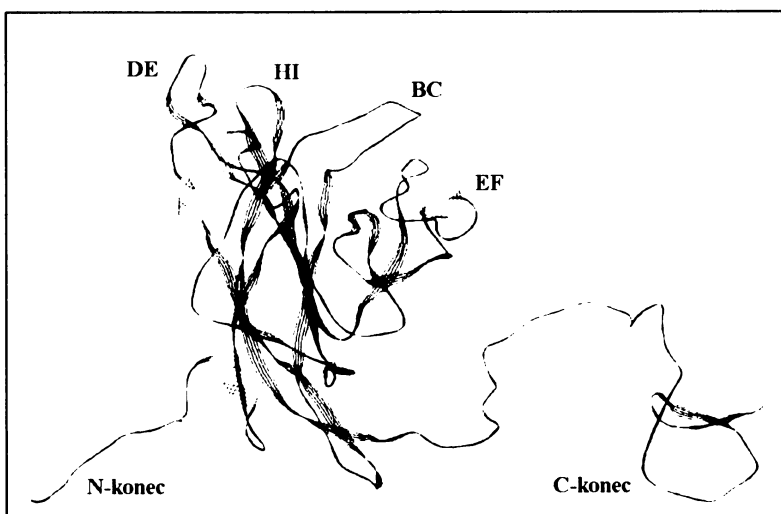
spojeným “leader” sekvenciám pomocou “leader- to- body” zostrihu pripojená kódujúca sekvencia VP1,VP2 alebo VP3. Vznikajú 3 typy monocistronických mRNA : 16S-mRNA kódujúca VP1 (45kDa), 18S- mRNA kódujúca VP3 (23kDa) a 19S- mRNA kódujúca VP2 (35 kDa). Minoritné proteíny sú translatované z rovnakého čítacieho rámca tak, že kratšia sekvencia VP3 je obsiahnutá v C-koncovej časti VP2. Gén pre VP1 je translatovaný z odlišného čítacieho rámca ako minoritné proteíny a 5 koncom sa prekrýva s C-koncovou časťou minoritných proteínov. Štruktúrne proteíny sú po syntéze transportované do jadra.

Hlavný štruktúrny proteín-VP1

VP1 tvorí 75% vírusovej kapsidy. Terciárna štruktúra proteínu VP1 (Obr.2.6) je rozdelená na 3 časti: oblasť N-koncová, oblasť stredná a C-koncová oblasť (LIDDINGTON *et al.* 1991). Prvých 15 aminokyselín na N-koncovej oblasti je orientovaných do dutiny pentaméru, kde interagujú s nukleoproteínovým jadrom. Je v nich obsiahnutý jadrový lokalizačný signál - prvých 11 aminokyselín (CHANG *et al.* 1992) a nachádza sa tu aj DNA väzbová doména- prvých 5 aminokyselín, sekvenčne interagujúcich s DNA nešpecificky (CHANG *et al.* 1993).

Strednú časť proteínu tvoria α -helixy a β -listy, ktoré sú spojené šiestimi sľučkami: BC, DE, HI, EF, FG a G2. Sľučky BC, DE a HI sú orientované von z kapsidy a zúčastňujú sa procesu rozpoznania receptora na povrchu bunky. Sľučky EF a FG napomáhajú stabilizácii viriónu, EF tvorí súčasť väzbového miesta pre vápenaté ióny(Obr.2.6).

Flexibilná C-koncová časť umožňuje interakcie medzi jednotlivými pentamérmi (GARCEA *et al.* 1987). Nachádza sa tu druhá časť väzbového miesta pre vápenaté ióny (LIDDINGTON *et al.* 1991).



Obr. 2.6: Terciárna štruktúra proteínu VP1.

Proteín VP1 sa po syntéze usporiada do pentaméru a podlieha niekoľkým posttranslačným modifikáciám, na základe ktorých môže byť rozdelený do minimálne desiatich foriem (FORSTOVÁ *et al.*, 1993). Tieto modifikácie sú fosforylácia, sulfonylácia, acetylácia, hydroxylácia a metylácia (BOLEN *et al.*, 1981). Tieto modifikácie majú vplyv na konformáciu proteínu VP1, jeho subcelulárnu lokalizáciu a ovplyvňujú niektoré etapy životného cyklu vírusu, napr. väzbu viriónu na receptor alebo morfogenézu viriónov. Najlepšie preštudovaný je význam fosforylácie. Fosforylácia na threoníne 155 je dôležitá pre morfogenézu viriónu a fosforylácia threonínu 62 hrá podstatnú úlohu pri adsorbácii a väzbe viriónu na receptor (LI a GARCEA, 1994). Acetylácia lyzínov sa objavuje na N-konci VP1 v oblasti jadrového signálu a DNA väzbovej domény a pravdepodobne reguluje funkcie týchto domén (BOLEN *et al.*, 1981). Hydroxylácia prolínu ovplyvňuje transport VP1 z cytoplazmy do jadra. O funkcii sulfonylácie tyrozínu okrem toho, že ovplyvňuje celkový náboj proteínu a jeho terciárnu štruktúru, mnoho nevie. (CONSIGLI *et al.*, 1986)

VP1 je v *in vitro* podmienkach v prítomnosti vápenatých iónov schopný samousporiadať sa do vírusu podobných častíc (VLP - virus like particle). (MONTROS *et al.* 1991). K vzniku týchto štruktúr nie sú potrebné posttranslačné modifikácie ani minoritné kapsidové proteíny (SALUNKE *et al.* 1986). Okrem

kapsíd dokáže VP1 v jadrách hmyzích buniek vytvárať tiež menšie a väčšie sférické alebo filamentárne častice (FORSTOVÁ *et al.* 1995). VLP sa vytvárajú taktiež v jadrách hmyzích buniek po infekcii bakulovírusom s integrovaným génom pre VP1 protein (MONTROS *et al.*, 1991). Tieto častice sú schopné enkapsidovať DNA *in vitro* (FORSTOVÁ *et al.*, 2005), ale taktiež už v jadrách hmyzích buniek (GILLOCK *et al.*, 1997). Druhou zložkou, ktorú je možné získať sú prázdne kapsidy neobsahujúce žiadnu DNA. VP1 vytvára VLPs taktiež pri expresii v bunkách kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (PALKOVÁ *et al.* 2000a). Významnú úlohu v zostavovaní infekčných viriónov a pseudokapsíd majú Ca^{2+} ióny, ktoré sú dôležité pre stabilitu kapsíd. Ca^{2+} ióny sa viažu v oblasti C-konca VP1 molekuly, konkrétne v oblasti Pro₍₂₃₂₎-Asp₍₃₆₄₎ (HAYNES *et al.*, 1993). V tejto oblasti sa vyskytuje sekvencia aminokyselín Asp₍₂₆₆₎-Glu₍₂₇₇₎ podobná sekvenciám iných Ca^{2+} väzbových proteínov ako napr. calmodulín, troponín C. Mutácia v tejto oblasti zabráni vzniku kapsíd a VP1 zostáva vo forme pentamér. Pre *in vitro* zostavovanie sa VLPs bol navrhnutý dvojkrokový model (SCHMIDT *et al.*, 2000) Najskôr dôjde k rovnováhe medzi kapsidami a kapsomérmi nezávisle na redoxných podmienkach a disulfidických väzbách. V prípade neprítomnosti Ca^{2+} je rovnováha posunutá na stranu kapsomér, po pridaní Ca^{2+} sa posunie k formácii kapsíd. V druhom kroku sú vzniknuté kapsidy fixované vznikom vnútropentamérových disulfidických väzieb.

Minoritné štruktúrne proteíny-VP2 a VP3

Funkcia týchto proteínov nie je zatiaľ dostatočne známa. Oba proteíny sú dôležité pre replikačný cyklus polyomavírusu a ich strata je pre vírus letálna. Absencia jedného z nich vedie k výraznému poklesu infekivity. Prítomnosť minoritných proteínov je dôležitá už na počiatku infekcie (MANNOVÁ *et al.*, 2002) V centrálnej dutine pentaméru je lokalizovaná vždy 1 molekula VP2 alebo VP3. Za interakcie minoritných proteínov s proteínom VP1 je zodpovedná C- koncová časť spoločná pre oba minoritné proteíny (aminokyseliny 140-181) (BAROUCH a HARRISON, 1994) Oba proteíny majú vlastný jadrový lokalizačný signál, ale

do jadra sú transportované v komplexe s proteínom VP1 (FORSTOVÁ *et al.*, 1993; BAROUCH a HARRISON, 1994). Imunoflourescenčná analýza ukázala, že po infekcii permissívnych buniek polyomavírusom sú všetky tri neskoré antigény lokalizované v jadre. Avšak pri samostatnej produkcii v hmyzích bunkách bol len VP1 transportovaný do jadra úspešne. VP2 sa hromadil okolo jadra a VP3 v cytoplazme. V prípade koexpresie minoritných kapsidových proteínov s VP1 v hmyzích bunkách sa obnovila ich lokalizácia v jadre. Tieto výsledky ukazujú, že VP1 pomáha dopraviť minoritné štruktúrne proteíny do jadra, kde dochádza k usporiadavaniu viriónov. Posttranslačné úpravy VP3 proteínu nie sú známe. VP2 proteín je na N-konci myristylovaný. Minoritné proteíny sa pravdepodobne zúčastňujú niekoľkých procesov:

Vstup vírusu do bunky a rozbaľovanie vírusu: Myristylovaná skupina VP2 udeľuje proteínu hydrofóbny charakter, vďaka ktorému dokáže interagovať s membránami príp. s inými hydrofóbnymi proteínmi. Lokalizácia myristylovaných proteínov nie je výhradne na membránach, boli pozorované v cytoplazme a jadre. SAHLI *et al.*, (1993) dokazujú, že zámena glycínu (dôležitého pre myristyláciu) za alanín má za následok zníženú infektivitu vírusu a syntéza vírusovej DNA je posunutá o 9 hodín. Preto autori predpokladajú, že myristylácia VP2 je dôležitá vo fáze vstupu vírusu do bunky. KRAUZEWICZ *et al.*, (1990) publikovali, že nemyristylované virióny sú menej stabilné pri nízkom pH. Tieto podmienky sú v endocytických váčkoch, ktorými je vírus transportovaný do bunky, preto môžu byť poškodené a tak sa zníži infektivita vírusu. CHEN *et al.*, (1998) predpokladajú sférické zmeny viriónu, ktoré sú sprostredkované myristylovou skupinou a uľahčujú interakcie s membránami bunky. V rozpore s týmito predpokladmi sú výsledky podrobných mutačných analýz MANNOVÁ *et al.*, (2002), ktoré ukazujú, že myristylácia nie je rozhodujúca pre skorú fázu infekcie, ale naopak počas zostavovania viriónov a reinfekcie v okolí potomstvom vírusu. Pre produktívnu veľmi skorú fázu infekcie je však dôležitá prítomnosť minoritných proteínov vo vírusových časticiach.

Interakcie s VP1: Interakcia VP2 a VP3 s VP1 pentamérmi ovplyvňuje nielen priestorové usporiadanie minoritných proteínov, ale aj konformáciu VP1 molekúl na povrchu kapsoméry, čo môže mať za následok zmeny v prístupnosti epitopu VP1. Zmena bola potvrdená pokusmi s protilátkami rozpoznávajúcimi konformačné epitopy VP1, kde sa zmenilo rozpoznanie VP1 a VP1 v komplexe s minoritnými proteínmi (DELOS *et al.*, 1995). Týmto spôsobom môžu minoritné proteíny ovplyvňovať deje spojené s VP1. Koexpresia minoritných proteínov má vplyv na posttranslačné modifikácie VP1, konkrétne fosforyláciu. Pokiaľ je v hmyzích bunkách syntetizovaný VP1 samotný, chýbajú niektoré z jeho fosforylovaných foriem. Pri koexpresii VP2 (ale nie VP3) sa obraz modifikovaných foriem VP1 produkovaného v hmyzích bunkách zhoduje s obrazom VP1 v permisívnych bunkách infikovaných polyomavírusom. (FORSTOVÁ *et al.*, 1993) Stupeň fosforylácie je podstatný nielen pre adsorbciu viriónov na povrch bunky, ale aj pri morfogénéze viriónov. Pri koexpresii VP1 a minoritných proteínov bola zároveň pozorovaná znížená hladina proteolýzy VP1 (LI, 1995)

Usporiadanie sa viriónov: Na základe zistených poznatkov bola navrhnutá teória o usporiadaní sa vírusu. Minoritné proteíny navádzajú pentaméry okolo nukleohistónového jadra, kde VP2 vytvára prepojenie medzi histónmi viazanými na vírusovú DNA a pentamérmi VP1 vytvárajúcimi kapsidu (GRIFFITH *et al.*, 1992; CAI *et al.*, 1994) Táto teória však bola spochybnená zistením, že VP1 proteín je schopný vytvoriť v hmyzích bunkám viriónom podobné častice s "pseudonucleocore" zloženým z hmyzích histónov a akejkolvek DNA (lineárnej alebo kruhovej) o veľkosti polyomavírusového genómu, bez prítomnosti minoritných proteínov (PALKOVÁ *et al.*, 2000a) Ale ako je vyššie uvedené, VP2 v komplexe s VP1 môže sprostredkovať fosforyláciu a je známe, že fosforylácia VP1 ovplyvňuje účinnosť morfogénézy viriónov (LI *et al.*, 1995)

2.3.4.4 Morfogenéza viriónov

K tvorbe viriónov dochádza v jadre po transporte kapsidových proteínov z cytoplazmy do tohto kompartmentu. Transportované sú pentaméry VP1 spojené buď s jednou molekulou VP2 alebo VP3. Jeden z modelov morfogenézy je, že VP1 pentaméry s minoritným proteínom sa zhukujú okolo vírusového minichromozómu, kam ich navádzajú minoritné proteíny (GRIFFITH *et al.*, 1992). Počas zostavovania viriónu pravdepodobne dôjde ku kondenzácii vírusového minichromozómu a vytesneniu histónu H1 z neho. Mechanizmus tohto procesu nie je zatiaľ úplne objasnený. Na konci procesu morfogenézy nastane pravdepodobne konformačná zmena, ktorá dá vznik stabilnému, zrelému viriónu (YUEN a CONSIGLI, 1983). Boli izolované rozličné prekurzory viriónov. Vírusový minichromozóm 75S a 90S, previrión 200S a virión 240S. Históny H2A, H2B, H3 a H4 sa nachádzali vo všetkých izolovaných komplexoch, ale histón H1 sa vyskytoval len v komplexoch 90S, v ktorých sa pravdepodobne zúčastňoval na tvorbe minichromozómu. VP1 proteín bol detekovaný vo všetkých štruktúrach. V 75S a 90S formách bol tiež nájdený LT antigén (GARCEA a BENJAMIN, 1983). Všetky tri kapsidové proteíny, VP1, VP2 a VP3 boli detekované vo všetkých izolovaných komplexoch (90S, 200S a 240S). Množstvo hlavného kapsidového proteínu s rastúcim sedimentačným koeficientom komplexov rástlo (YUEN a CONSIGLI, 1985).

Takisto aj bunkové proteíny sa spolupodieľajú na morfogenéze viriónov. Jedným zo študovaných je Hsc70, ktorý asociuje s proteínom VP1 myšieho polyomavírusu a následne sa transportuje do jadra (CRIPE *et al.*, 1995). Je možné, že by mohol tento chaperon kooperovať v určitom štádiu morfogenézy viriónov s chaperonovou doménou LT antigénu. Zaujímavým sa z tohto hľadiska stal aj proteín YY1. Je to transkripčný regulátor, ktorý sa viaže na enhancerovú oblasť genómu polyomavírusu a do oblastí génu pre proteín VP1. YY1 interaguje priamo s hlavným štruktúrnym proteínom VP1 (PALKOVÁ *et al.*, 2000b), takže sa predpokladá, že by mohol napomáhať morfogenéze viriónov v jadre bunky.

2.5. Simian virus 40 (SV40)

SV 40 je polyomavírus primátov. Na rozdiel od myšieho polyomavírusu kóduje štyri neskoré proteíny: VP1, VP2, VP3 a agnoproteín. Agnoproteín je vysokobázický polypeptid schopný väzby k dvoj- aj jednoreťazcovej DNA. Pravdepodobne sa uplaňuje pri transporte VP1 do jadra (CARSWELL *et al.*, 1986) a pri uvoľňovaní vírusu z bunky (RESNICK *et al.*, 1986) VP2 a VP3 sa na rozdiel od myšieho polyomavírusu dostávajú do jadra aj bez prítomnosti VP1 proteínu (CLEVER *et al.*, 1991). Medzi minoritnými proteínmi myšieho polyomavírusu a SV40 je veľká homológia, rozdiel je na C-konci proteínu, ktorý je u SV 40 dlhší o 28 aminokyselín, medzi ktorými sa nachádza niekoľko bázických zbytkov zodpovedných sa nešpecifickú DNA väzbovú aktivitu. U minoritných antigénov SV40 sú zapojené aj niektoré aminokyseliny z tejto oblasti do interakcií centrálnou dutinou VP1 pentaméru. CLEVER *et al.*, (1991) sa domnievajú, že u myšieho polyomavírusu väzbovými silami medzi VP1 a minoritnými proteínmi sú hydrofóbne sily v prípade SV40 sú to sily elektrostatické. GREBER *et al.*, (1996) ukázali prítomnosť hydrofóbnej oblasti u SV40, ktorá sa takisto podieľa na interakciách s VP1. Všetky kapsidové proteíny SV40 obsahujú DNA väzbovú doménu a preto niektorí autori predpokladajú väzbu minoritných proteínov s minichromozómom vírusu a až po vzniknutí tejto väzby prepojenie VP1 DNA väzbových domén pentaméru VP1 s minichromozómovým komplexom (CLEVER *et al.*, 1991) GORDON-SHAAG *et al.*, (1998) publikovali, že C-koniec VP3 proteínu interaguje s Sp1 a GC boxom regulačnej oblasti SV40 genómu a tým priamo blokuje stimuláciu promotorovej aktivity SV40. Podľa týchto autorov je oblasť, na ktorú sa viažu transkripčné faktory Sp1 a AP2, kritická pre enkapsidáciu DNA. Schopnosť väzby VP3 k Sp1 a DNA otvára možnosť ďalšieho modelu usporiadania sa viriónov. Sp1 viazané na DNA asociuje s VP3 a pravdepodobne VP2. Tento komplex asociuje s VP1, ktorý nahradí Sp1. Týmto by mohlo byť začaté preusporiadanie nukleozómov, kondenzácia chromatinu a vytvorenie viriónu.

2.6 BK a JC vírus

BK a JC vírus sú ľudské polyomavírusy. Séropozitivita našej populácie je 85%. JC vírus u imunosuprimovaných pacientov vyvoláva progresívnu multifokálnu leukoencefalopatiu (PML)(BERGER *et al.*,1999). Bol izolovaný z mozgu a z mnohých tumorov CNS (DEL VALLE *et al.*,2001). K infekcii dochádza v ranom detstve a vo väčšine prípadov vírus perzistuje v organizme po celý život bez príznakov. Prejavuje sa u imunosuprimovaných osôb.

BKV bol prvýkrát izolovaný z moču pacienta po transplantácii obličiek (GARDNER *et al.*, 1971) a je identifikovateľný u pacientov s ochoreniami obličiek, močového mechúra a po transplantácii kostnej drene (APPERLEY *et al.*, 1987). Popisuje sa taktiež v súvislosti s ochoreniami ako zápal sietnice (HEDQUIST *et al.*, 1999), nefritída, zápal pľúc (SANDLER *et al.*, 1997) a encefalitída (VOLTZ *et al.*, 1997). Primárna infekcia nastáva v detstve (3-4 roky), prebieha bezpríznakovo a málokedy spôsobuje klinické ochorenie. BK vírus perzistuje v obličkách, mozgu a periférnej krvi (DORRIES *et al.*, 1994). K aktivácii dochádza u jedincov s oslabenou imunitou, alebo u pacientov po transplantácii, ktorým sú podávané imunosupresívne lieky. Prenos BK vírusu môže prebiehať niekoľkými cestami: prenos dýchacími cestami a aerosolom (DORRIES, 1998), sexuálny prenos (MONINI *et al.*, 1996), prenos cez placentu z matky na plod (PIETRAPAOLLO *et al.*, 1998), transplantovanými orgánmi a krvou. BOFILL-MAS *et al.* (2001) dokázali častý výskyt ľudských polyomavírusov (BKV, JCV) v mestských odpadných vodách, čo ukazuje, že ľudia sú vystavení vysokej koncentrácii týchto vírusov.

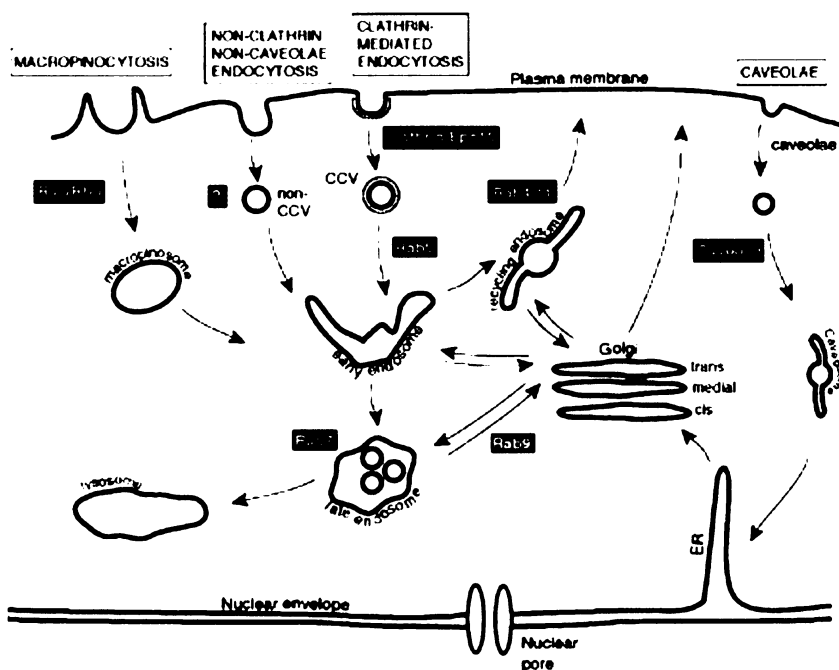
Z molekulárneho hľadiska nie sú tieto vírusy tak dobre preštudované ako myší polyomavírus alebo SV40. Oba ľudské polyomavírusy majú dlhší C-koniec minoritných proteínov podobne jako SV40, vďaka ktorému majú schopnosť interagovať nešpecificky s DNA (CLEVER *et al.*, 1993, DEAN *et al.*, 1995). Tejto doméne sa taktiež pripisuje schopnosť riadiť umiestnenie minoritných

proteínov a tým aj VP1, ktorý je s nimi v komplexe do špecifických (PML = promyelocytic leukemia nuclear bodies) domén v jadre bunky. Štruktúrne proteíny JC vírusu sa akumulujú v jadre v blízkosti PML teliesok, kde prebieha morfogéza viriónu (SHISHIDO-HARA *et al.*, 2004).

2.7. Vstup a transport polyomavírusov do bunky

2.7.1 Možné spôsoby vstupu polyomavírusov do bunky

Polyomavírusy interagujú s rôznymi povrchovými molekulami (Tab. 2.2) ako receptory a využívajú aj rôzne endocytické cesty na transport bunkou. Niektoré z predpokladaných endocytických dráh sú schématicky zobrazené na obr. 2.7



Obr. 2.7: Schéma hlavných endocytických ciest

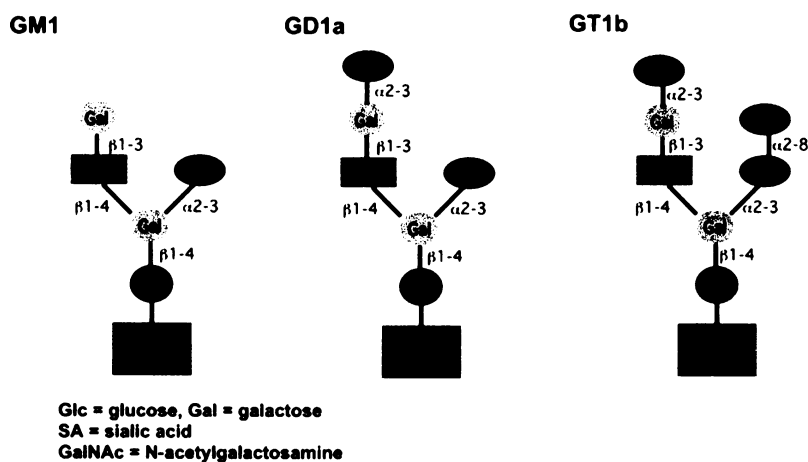
Cesta pomocou váčkov obalených klatrínom: Klatrínom obalené váčky (CCV) asociujú s Rab5 proteínom. Náklad môže recyklovať cez recyklujúce endozómy späť k bunkovému povrchu, (táto dráha je závislá na Rab4 alebo Rab11) alebo v prítomnosti Rab7 proteínu a postupným okyselením lumen endozómu pokračovať v transporte do pozdneho endozómu a prípadne do lyzozómu. Iné možnosti vstupu, ktoré vedú k vzniku endozómov sú makropinocytóza závislá na Rac/Rho GTPázach alebo pomocou neobalených váčkov. Ďalšou možnosťou je využitie caveol a pomocou caveosomov transportovať vírus do endoplazmatického retikula. Bola taktiež popísaná dráha nezávislá ani na klatríne ani na caveolách. (Prevzaté z SIECZKARSKI a WHITTAKER, 2002)

Vírus	Sialová kyselina	Proteínová zložka	Gangliozid
JCV	koncová α 2-6 – spojená kys.sialová	5-HT _{2A} R	GT1b
BKV	koncová α 2-6 – spojená sial.kyselina	nepoznaná	GD1b,GT1b
SV40	nie je nutná	MHC gp I	GM 1
mPyV	α 2-6 a α 2-3 – spojená kys.sialová	integrín α 4 β 1	GD1a,GT1b

Tab. 2.2: Bunkové povrchové molekuly využívané pri vstupe vírusu do bunky (Prevzaté a upravené GEE et al., 2006)

2.7.1.1. Vstup a transport myšieho polyomavírusu do buniek

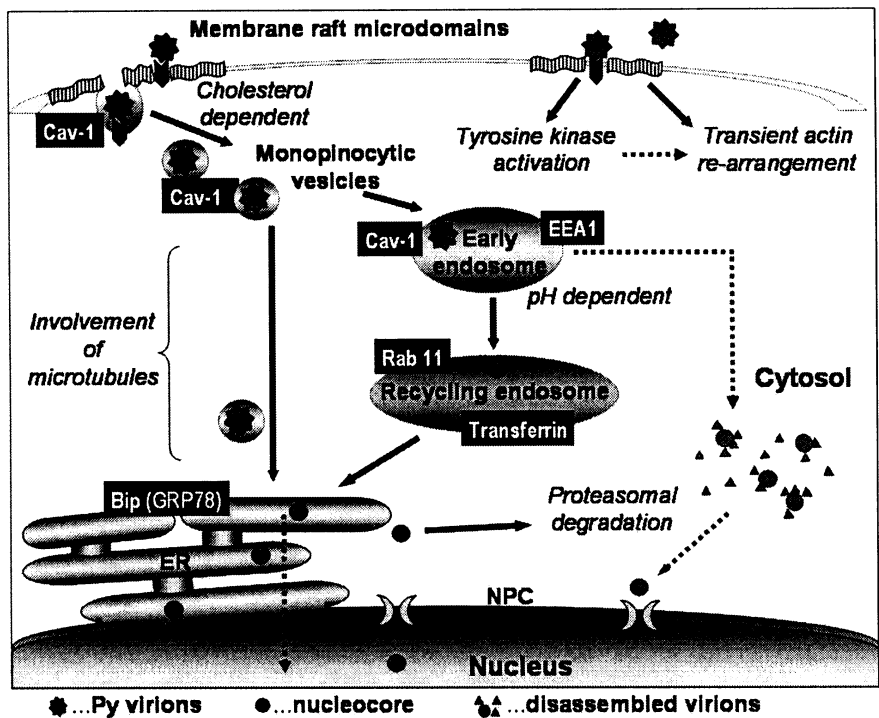
Myší polyomavírus vstupuje do buniek receptorom sprostredkovanou endocytózou v hladkých monopinocytických váčkoch. Ako receptory boli identifikované gangliozidy GD1a a GT1b (Obr.2.8.) (TSAI *et al.*, 2003) Vírus sa viaže na ich sialovú kyselinu, ktorá je umiestnená na ľavom ramene cukorných zbytkov (TSAI *et al.*, 2003)



Obr. 2.8: Schématická štruktúra gangliozidov, ktoré slúžia ako receptory pre vstup vírusu SV 40 a myšieho polyomavírusu (Prevzaté z TSAI *et al.*, 2003)

Ako koreceptor bol identifikovaný α 4 β 1 integrín (CARUSO *et al.*, 2003) Spôsob väzby vírusu na koreceptor je nejasný. RICHTEROVÁ *et al.*,(2001) zistili, že

myší polyomavírus sa nachádza vo váčkoch obsahujúcich caveolin-1 aj keď nie iba výhradne. U časti váčkov nesúcich vírus nebol caveolín detekovaný. Kolokalizácia vírusu s caveolínom bola pozorovaná na ceste vírusu až do perinukleárneho priestoru. Tieto výsledky sú v rozpore s prácami GILBERT a BENJAMIN (2000) a GILBERT *et al.*, (2003), ktorí publikovali, že nepozorovali žiadnu kolokalizáciu s caveolínom a že látky blokujúce endocytózu cez caveoly alebo clathrinové váčky nemajú žiadny vplyv na infektivitu polyomavírusu, z čoho uzatvorili, že myší polyomavírus používa pre svoj vstup doposiaľ nepopísanú dráhu. Po identifikácii receptora publikovali tí istí autori GILBERT a BENJAMIN (2004), že pokiaľ sú v bunkách dostatočne prítomné gangliozidy slúžiace ako receptory, tak myší polyomavírus vstupuje do buniek vo váčkoch odvodených od caveol. Pokusy s dominantne negatívnym mutantom caveolinu a pokusy s Jurkat bunkami, ktoré caveolín neprodukuje ukázali, že neprítomnosť caveolínu neovplyvňuje internalizáciu viriónov do monopinosomických váčkov ani infektivitu polyomavírusu (LIEBL *et al.*, 2006) Pre transport k jadru využíva polyomavírus skoré endozómy, recyklujúce endozómy a subpopuláciu vírusu je možné nájsť aj v endoplazmatickom retikule. Pre svoj transport do endoplazmatického retikula nevyužíva myší polyomavírus na rozdiel od SV40 COPI váčky (MANNOVÁ a FORSTOVÁ, 2003). Virióny, ktoré sa dostanú do endoplazmatického retikula sú pravdepodobne rozvolňované proteínmi z rodiny disulfid izomeráz napr. Erp29 (MAGNUSON *et al.*, 2005). MANNOVÁ a FORSTOVÁ, (2003) publikovali, že do bunkového jadra sa dostáva minimálne množstvo vírusových genómov a to aj pri vysokej multiplicitate infekcie. Väčšina vírusu sa dostáva buď do cytozolu, kde je degradovaná v proteasómoch Bola taktiež pozorovaná exocytóza VP1 z buniek von. Experimentálne zistené dráhy vstupu myšieho polyomavírusu a navrhované možná alternatívy sú schematicky zobrazené na obr.2.9

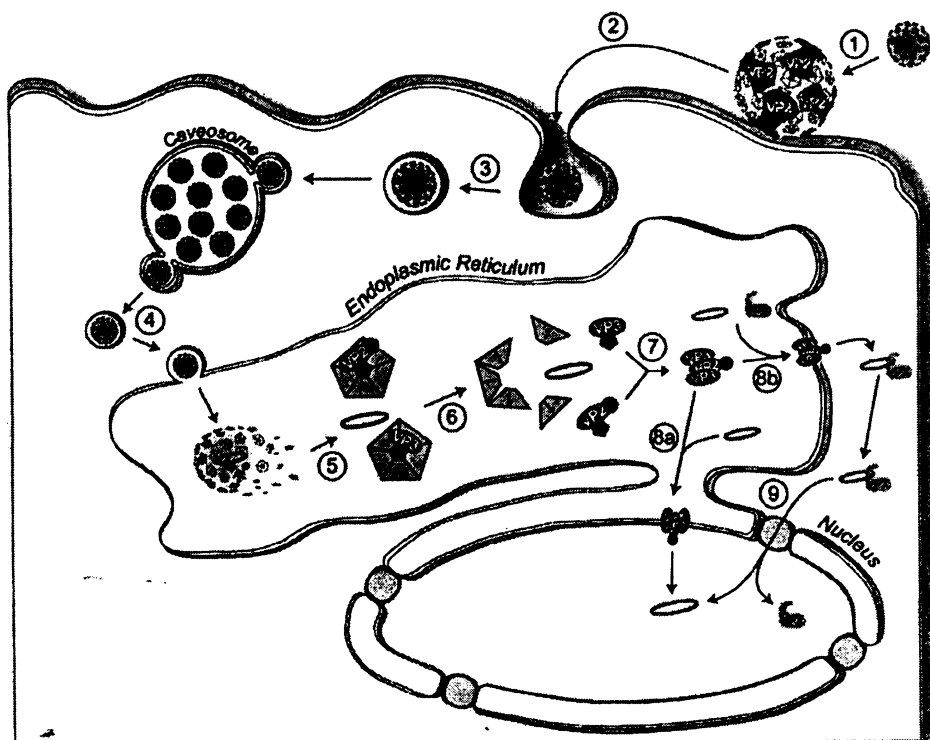


Obr. 2.9: Schéma transportu myšieho polyomavírusu od cytoplazmatickej membrány do jadra (LIEBL *et al.*, 2006)

Virióny sú internalizované cez lipidické rafty do monopinocytických váčkov (ktoré môžu či nemusia byť odvodené o caveol). Tieto váčky fúzujú so skorými endozómami, kyslé pH endozómov je nevyhnutné pre produktívnu vírusovú infekciu. Adsorbcia vírusu je sprevádzaná signalizáciou cez proteín tyrozín kinázu (Hollanderová, 2004) a s dočasnou dezorganizáciou aktínovej siete. Vírus ďalej postupuje do recyklujúcich endozómov, ako bolo dokázané jednak kolokalizáciou VP1 myšieho polyomavírusu a Rab11 GTPázou i FRET (fluorescence resonance energy transfer) technikou s použitím protilátok proti VP1 a Rab11 alebo transferín (oboje markery recyklujúcich endozómov). Kolokalizácia s Bip proteínom - markerom endoplazmatického retikula bola ukázaná v práci MANNOVÁ *et al.*, (2003). Doposiaľ nepublikované pokusy s živými bunkami a fluorescenčne značeným vírusom (Difato F., Žíla V.) potvrdili, že vírus je transportovaný do ER. Cesta vírusu alebo jeho genómu do jadra ani spôsob a miesto rozvolnenia vírusu sú zatiaľ nejasné. Čierne šípky – experimentálne zistené, prerušované šípky - možné alternatívne dráhy, NPC = komplex jadrového póru. (Prevzaté z LIEBL *et al.*, 2006).

2.7.1.2. Vstup a transport SV40 do buniek

Receptorom pre vstup SV40 je zrejme gangliozid GM1 (Obr. 2.8) Ako receptor bol jako prvý popísaný MHCgpl. Molekuly MHCgpl sice taktiež sprostredkujú väzbu SV40 na plazmatickú membránu, ale zdá sa, že sa nepodieľajú na jeho internalizácii, pretože nie sú endocytované spolu s viriónmi. Toto poukazuje na jeho funkciu ako možného koreceptoru (ANDERSON *et al.*,1998). Infekcia SV40 je senzitivna na odstránenie cholesterolu z membránových domén (PELKMANNS *et al.*,2001). SV40 vstupuje do buniek prostredníctvom caveol (ANDERSON *et al.*, 1996; PELKMANNS *et al.*, 2001), pokračuje do caveozómu (organela s neutrálnym pH, bohatá na caveolín-1). Následne je transportovaný do endoplazmatického retikula (NORKIN *et al.*, 2002). Transport viriónov SV40 do hladkého endoplazmatického retikula je senzitivny na brefeldín A a je sprostredkovaný COPI dráhou (NORKIN *et al.*, 2002, RICHARD *et al.*, 2002). DANIELS *et al.*,(2006) predpokladajú, že minoritné proteíny VP2 a VP3 vytvárajú homo- a heterooligoméry v membráne endoplazmatického retikula a tak dávajú vznik pórom, ktorými by sa genóm SV40 mohol prepraviť do cytosolu a potom jadrovými pórmi do jadra. Schématické znázornenie možného vstupu a transportu SV40 je na obr.2.10.



Obr. 2.10: Model vstupu SV40 do bunky a jeho prechodu do endoplazmatického retikula. 1, VP2 sa spolupodieľa na väzbe SV 40 na povrch hostiteľskej bunky. 2, Vírus vstupuje do bunky receptorom sprostredkovanou endocytózou, kde receptorom je GM1 gangliozid. 3, Transport vírusu v caveolínových váčkoch do kaveozómu 4, Virióny pučia z caveozomu a sú transportované COPI retrográdnou dráhou do endoplazmatického retikula. 5, Chaperony (Erp 29) napomáhajú rozvoľňovať virióny. 6, Uvoľnenie VP2 a VP3 minoritných proteínov z komplexu s VP1 7, Oligomerizácia minoritných proteínov a tvorba multimérnych komplexov. 8a, Komplexy proteínov VP2/VP3 vytvárajú pór na jadrovej membráne. 8b, Transport vírusového genómu do cytozolu cez membránu endoplazmatického retikula. 9, Proteín „VPX“ využíva DNA väzbovú doménu a jadrový lokalizačný signál pre transport genómov vírusu do jadra (Prevzaté z Daniels et al., 2006a)

2.7.1.3. Vstup a transport BK a JC vírusu do buniek

Receptormi pre vstup BK vírusu sú GD1b a GT1b gangliozidy, rovnaké ako pre myši polyomavírus. (JONATHAN *et al.*, 2005). DUGAN *et al.*, (2005) popisujú, že BK vírus rozpoznáva na povrchu bunky N- glykoproteíny obsahujúce $\alpha(2,3)$ - sialovú kyselinu, ale nie glykoproteíny s naviazanou $\alpha(2,6)$ - sialovou kyselinou. Ich práca ukazuje, že N-glykoproteíny sú dostačujúcim receptormi na sprostredkovanie infekcie. Pre ďalší transport využíva BK vírus caveoly pričom je s nimi asociovaný maximálne 4 hod.(MORIYAMA *et al.*, 2007). Produktívna infekcia je závislá na kyslom endozomálnom pH (EASH *et al.* ,2004). JONATHAN *et al.*, (2005) publikovali, že BK vírus interaguje s membránou endoplazmatického retikula a táto interakcia je podstatná pre transport vírusových genómov do jadra.

Štruktúra zodpovedná za vstup JC vírusu do buniek je $\alpha(2,6)$ -sialová kyselina. Navrhovaný model predpokladá, že pri vstupe interaguje JC vírus najskôr s glykoproteínom obsahujúcim $\alpha(2,6)$ - sialovú kyselinu a potom s receptorom 5HT_{2A}R (serotonínový typ receptoru), čo vedie k rýchlej a efektívnej internalizácii vírusu (ELPHICK *et al.*, 2004). KOMAGOME *et al.*, (2002) použitím JCV VLPs zistili, že virióny sú schopné viazať sa na gangliozidy GM3, GD2, GD3, GD1a, GD1b, GT1b, GQ1b, GalCer. Aj v tomto prípade je za väzbu zodpovedná kyselina sialová. Gangliozidy sa taktiež stali kandidátmi receptorov pre vstup do buniek. JC vírus však vstupuje do bunky na rozdiel od BK, SV40 a myšieho polyomavírusu clathrínom sprostredkovanou endocytózou (PHO *et al.*, 2000). Väzba viriónov na bunky indukuje signál, ktorý je potrebný pre vstup do bunky. Tento signál spúšťa fosforyláciu alebo aktiváciu MAP kináz ERK1 a ERK2. Takisto proteín eps15 (epidermal growth factor receptor pathway substrate), ktorý je súčasťou endocytickej dráhy sprostredkovanej klatrínom, sa podieľa na vstupe vírusu JC do bunky (QUERBES *et al.*, 2004). Pre funkčnosť tejto dráhy je dôležité kyslé pH skorých endozómov, ktorého vplyvom dôjde ku konformačným zmenám proteínov vírusu a tak sprostredkuje rozvoľnenie viriónov (ASHOK a ATWOOD 2003).

3. CIEĽE DIPLOMOVEJ PRÁCE

V našom laboratóriu sa zaoberáme štúdiom jednak možnosťami využitia umelých vírusových kapsíd pre terapiu, jednak štúdiom mechanizmov jednotlivých štádií infekcie myšieho polyomavírusu v bunke, vrátane jeho vstupu do buniek a mechanizmov dopravy jeho genetickej informácie do bunkového jadra. Napriek tomu, že sa podarilo identifikovať mnoho endocytických kompartmentov do ktorých sa polyomavírus v bunke dostáva, zostáva v riešení týchto otázok stále veľa nejasností. Nie sú objasnené, miesto rozvolnenia viriónu a spôsob dopravy genómu myšieho polyomavírusu. Podrobné štúdie vstupu jednotlivých vírusov do buniek za posledné roky prinášajú dôkazy, že aj jeden typ vírusu môže využívať pre svoj vstup do bunky a pohyb v cytoplazme viac endocytických dráh, podľa typu bunky. Toto zrejme platí aj pre myšiu polyomavírus. Najväčším problémom je, že iba malá časť vstupujúcich viriónov dopraví genóm myšieho polyomavírusu do jadra. Väčšina vírusovej DNA sa s hlavným kapsidovým proteínom VP1 presúva z perinukleárnej oblasti späť do cytozolu, kde je pravdepodobne degradovaná (MANNOVÁ a FORSTOVÁ 2003). Nie je jasné, či niekoľko úspešných viriónov, ktoré dopraví genóm do jadra využíva rovnakú endocytickú dráhu ako neúspešné virióny. Jedna z možností je, že vírus zneužíva dráhu, ktorá je obranou bunky a ktorá zvádza virióny k degradácii s tým, že niekoľko viriónov resp. nimi nesený nukleoproteín degradácii unikne a dostane sa cez jadrové póry do jadra. To je mechanizmus, ktorý využívajú niektoré bakteriálne toxíny. Je taktiež možné, že úspešné virióny sa pohybujú odlišnou cestou, ktorá uniká našej pozornosti. Je možné, že o osude viriónu sa rozhoduje už pri internalizácii. U mnohých viriónov je internalizácia sprevádzaná, okrem inetrakcie s receptorom (za ktorú je zodpovedný hlavný štruktúrny proteín VP1) ešte ďalšou inetrakciou s koreceptorom. Po inetrakcii polyomavírusov s putatívnym koreceptorom sa v súčasnej dobe pátra. Vírusovými kandidátmi pre túto interakciu sú minoritné štruktúrne proteíny, ktorých funkcia je doposiaľ nejasná. Vie sa, ale že ich neprítomnosť vo virióne dramaticky zníži vírusovú infektivitu. Cieľom tejto diplomovej práce bolo prispieť k pochopeniu interakcií vírusu a bunky behom vstupu vírusu do bunky a jeho pohyboch cytoplazmou a k pochopeniu zmyslu týchto inetrakcií.

Konkrétne ciele tejto diplomovej práce boli:

1. Pripraviť infekčný myšší polyomavírus.
2. Izolovať z hmyzích buniek pseudokapsidy (VLP) zložené iba z hlavného štruktúrneho proteínu VP1 (VL-VP1), alebo obsahujúce navyše minoritné proteíny VP2(VL-VP1/2) a VP3 (VL-VP1/3).
3. Zistiť či, niektoré z týchto pseudokapsíd pôsobia ako kompetitívne inhibítory polyomavírusovej infekcie.
4. Konfokálnou mikroskopiou pomocou bunkových markrov a fluorescenčne značených sekundárnych protilátok sledovať skoré fázy infekcie myším polyomavírusom a pseudokapsidami.

Okrem vyššie uvedených cieľov bol ešte urobený pokus o prípravu transferového bakulovírusového vektoru, ktorý by bol použitý pre prípravu rekombinantného bakulovírusu z ktorého by bolo možné produkovať LT antigén s histidínovou kotvou.

4. MATERIÁL A METÓDY

4.1 Prístroje

Aparatúra pre SDS-PAGE (Hoefler)

Aparatúra pre „western blotting“ (Biorad)

Bio-Freezer (Forma Scientific)

Centrifúga GS-15R, rotor S4180 (Beckman)

CO₂ termostat (Forma Scientific)

Elektroporátor Gene Pulser Apparatus(Biorad)

Fluorescenčný mikroskop BX-60 (Olympus)

Konfokálny mikroskop Leica TCS-sp

Kultivačné prístroje(Labnet, Lab Therm)

Mikrocentrifúga Beckman Microfuge Centrifuge, rotor F241,5

Sonikátor Soniprep 150 (Schoeller Pharmacia Praha)

Sonikátor Brasonic 5 (Cole-Parmer Instrument Company)

Spektrofotometer Spekol 11 (Carl Zeiss- Jena)

Spektrofotometer Helios β (Thermo elektron corporation)

Termobox LBT 165

Termostat TCH 100 (laboratórne prístroje Praha)

Trepačka (Labnet)

Ultracentrifúga L5-50B, rotor SW 28, SW41 (Beckman)

UV transluminátor (Biolum)

Vortex Genie 2 (Scientific Industries)

4.2 Materiál

4.2.1 Chemikálie

Chemikálie	Výrobca
Agaróza pre elektroforézu	Sigma, Serva
Akrylamid	Serva
Amonium persulfát	Serva
Ampicilín	Léčiva
Antibiotiká pre TK	KRD
Baktopepton	Imuna
Bis akrylamid	Serva
Bovínny sérový albumin (BSA)	Sigma
Bromfenolová modrá (BFM)	Lachema
Cezium chlorid CsCl	Serva
Dihydrogenfosforečnan draselný	Lachema
Disodná soľ kyseliny diethyltetraoctové (EDTA)	Sigma
Dithiotreitol (DTT)	Roche
Ethanol	Lachema
Ethidium bromid (EtBr)	Lachema
Fenol	Lachema
Fetálne teľacie sérum (FCS)	Sigma
Glycerol	Lachema
Glycin	Serva
Glukóza	Serva
Glutathion	Sigma
Hydrogénfosforečnan disodný (dodekahydrát)	Lachema
Hydroxid sodný	Lachema
Chlorid draselný	Lachema

Chlorid sodný	Sigma
Chlorid horečnatý	Lachema
Chlorid vápenatý	Sigma
Chloroform	Lachema
Isopropyl- β -D-thiogalaktosid (IPTG)	Fermentas
Izopropanol	Lachema
Kyselina boritá	Serva
Kyselina fosforečná	Lachema
Kyselina chloristá	Lachema
Kyselina chlorovodíková	Lachema
Kyselina octová	Lachema
Kyselina p-kumarová	Sigma
Kvasničný autolyzát	Imuna
L-glutamin	Sigma
Luminol	Serva
β -merkaptoethanol	Serva
Methanol	Lachema
Octan draselný (KAc)	Lachema
Octan horečnatý (MgAc)	Lachema
Octan sodný (NaAc)	Lachema
Síran horečnatý	Lachema
Dodecylsulfát sodný	Sigma
N,N,N',N' – Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Sigma
Tween 20	Fluka
Triton X-100	Sigma
Živný agar (ŽA č. 2)	Imuna
Živný bujón (ŽB č. 2)	Imuna

4.2.2 Roztoky

BFM: 50% glycerol

0,13 M EDTA-NaOH (pH 8.0)

0,12% brom-fenolová modrá

Blotovací pufo: 25 mM Tris

195 mM glycín

20 % methanol

Pufo B: 10 mM Tris (pH 7.4)

150 mM NaCl

0,01 mM CaCl₂

CCB: 0,25 % Coomassie Brilliant Blue R250

3,5 % kyselina chloristá

Činidlo Bradfordovej: 100mg „Coomassie Brilliant Blue G250“ v 50 ml 96% ethanolu bolo rozpustených cez noc. Ďalší deň bolo pridaných 100 ml H₃PO₄ a doplnené demineralizovanou vodou do 1000 ml. Vzniknutý roztok bol prefiltrovaný na 0,22 µm filtre.

Elektroforetický pufo (10x): 250 mM Tris

1,92 mM glycín

1% SDS

Fixačný roztok: 50 % methanolu

5 % kyselina chloristá

Mlieko: 5 % mlieko: mlieko sušené, netučné Laktino (Promil), rozpustené v PBS

PBS (10x) (0,5 l): 1,37 M NaCl pH=7,4
27mMKCl
100mM Na₂HPO₄·12H₂O
18mM KH₂PO₄

RIPA pufo: 50 mM Tris-HCl (pH 7.4)
150 mM NaCl
1% NP-40
0,1 % SDS
0,5 % deoxycholát sodný
1 % Triton X-100

Roztok pre spodný gel pre SDS-PAGE: 4 ml 30 % akrylamid
0,375 ml 1 M Tris-HCl (pH 8.8)
120 µl 10 % SDS
3,25 ml demineralizovanej vody
40 µl 10% amonium persulfát
8,5 µl TEMED

Roztok pre horný gel pre SDS-PAGE: 0,5 ml 30% akrylamid
0,375 ml 1 M Tris- HCl (pH 6.8)
30 µl 10 % SDS
2,11 demineralizovanej vody
20 µl 10 % amonium persulfát
5 µl TEMED

Roztok I: 25 mM Tris-HCl (pH 8.0)
10 mM EDTA-NaOH (pH 8.0)
50 mM glukóza

Roztok II: 0,2 M NaOH

1% SDS

Roztok III: 60 ml 5 M octanu draselného

11,5 ml ľadovej kyseliny octovej

28,5 ml destilovanej vody

„SDS loading pufo“ (5x): 5% SDS

50 mM Tris-HCl (pH 6.8)

50% glycerol

25% β -merkaptoethanol

0,005% bromfenolová modrá

SOC médium: 2% baktopepton

0.5% kvasničný autolyzát

10 mM NaCl

2.5 mM KCl

10 mM MgCl₂

10 mM MgSO₄

20mM glukóza

MgCl₂ a MgSO₄ boli sterilizované samostatne a k médiu pridávané až pred použitím.

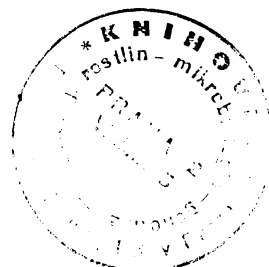
TBE pufo (Tris – borátový – EDTA): 40 mM Tris-HCl (pH 8.0)

2 mM EDTA-NaOH (pH 8.0)

90 mM kyselina boritá

TE pufo: 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)

1 mM EDTA-NaOH (pH 8.0)



TPN médium: 2% baktopepton
0,5% kvasničný autolyzát
0,5%NaCl

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

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

4.2.2.1 Enzými

Ribonukleáza A (Sigma)- koncentrácia 10mg/ml

T4 DNA ligáza (Fermentas)

Alkalická fosfatáza (Boehringer Mannheim)

Restrikčné endonukleázy (Fermentas): Bam HI

Bsa I

Eco RI

Pst I

Sal I

4.2.2.2 Pufre

Pufor pre T4 DNA ligázu (Fermentas): 40 mM Tris – HCl (pH 7.8)

10 mM MgCl₂

10 mM DTT

5 mM ATP

Pufor pre Bam HI (Fermentas) :10 mM Tris – HCl (pH 8.0)

5 mM MgCl₂

100 mM KCl

0,02% Triton X-100

0,1 mg/ml BSA

Pufor pre Eco RI (Fermentas): 50 mM Tris – HCl (pH 7.5)

10 mM MgCl₂

100 mM NaCl

0,02% Triton X-100

0,1 mg/ml BSA

Pufor O⁺ (Fermentas): 50 mM Tris – HCl (pH 7.5)

10 mM MgCl₂

100 mM NaCl

0,1 mg/ml BSA

Pufor pre Bsa I: 50 mM Tris – HCl (pH 7.9)

10 mM MgCl₂

100 mM NaCl

1mM dithiothreitol

Pufor B (Fermentas): 10 mM Tris – HCl (pH 7.5)

10 mM MgCl₂

0,1 mg/ml BSA

Pufor pre Pst I: 50 mM Tris – HCl (pH 7.9)

10 mM MgCl₂

100 mM NaCl

1mM dithiothreitol

Pufor pre alkalickú fosfatázu (Boehringer Mannheim): 10 mM Tris – HCl (pH 8.3)

1 mM MgCl₂

1 mM ZnCl₂

4.2.3 Markre molekulových hmotností

SDS – PAGE marker molekulových váh (Sigma):

α₂ – makroglobulin (187,3 kDa)

β – galaktozidáza (116,1 kDa)

Lactoferrin (100,6 kDa)

Pyruvátkináza (70,3 kDa)

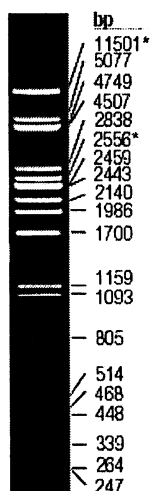
Fumaráza (60,4 kDa)

Laktátdehydrogenáza (37,3 kDa)

Triózofozfátizomeráza (33,3 kDa)

DNA marker λ DNA/Pst I (Obr.4.1.): DNA fága λ štiepená restričnou endonukleázou Pst I. Veľkosti fragmentov po štiepení Pst I (bp): 11501*, 5077, 4749, 4507, 2838, 2556*, 2459, 2443, 2140, 1986, 1700, 1159, 1093, 805, 514, 468, 448, 339, 264, 247.

Kohezivne konce s presahom 12 bází fragmentov 11501 a 2556 (označených *) môžu asociovať a vytvárať ďalší fragment s veľkosťou 14057 bp.



Obr. 4.1: Marker molekulových hmotností λ DNA/Pst I marker, Fermentas 1,5% agaróza, 0,5 μg prúžok, gel dlhý 8cm, 1xTAE, 12V/cm. Prevzaté z www.fermentas.com

4.2.4 Protilátky

Primárne protilátky

Anti-PyVP1-A1: myšia monoklonálna protilátka proti polyomavírusovému VP1 (Morávková 2001)

Anti-VP1: králičia polyklonálna protilátka proti VP1 (riedenie 1:250) (vyrobená v našom laboratóriu)

Anti-VP1: myšia monoklonálna protilátka proti VP1, izotyp IgG (riedenie 1:5) (Forstová *et al.*, 1993)

Anti-PyVP2/3: myšia monoklonálna protilátka proti natívnym proteínom VP2/3, izotyp IgG1 (Forstová *et al.*, 1993)

Anti-PyVP2/3: myšia monoklonálna protilátka proti denaturovaným proteínom VP2/3, izotyp IgG1 (Forstová *et al.*, 1993)

Anti LT4: potkania monoklonálna protilátka proti antigenu LT (S. Dilworth, Imperial College School of Medicine, London)

Anti-BiP (GRP94): potkania monoklonálna protilátka proti proteínu endoplazmatického retikula GRP94 (riedenie 1:100) (Alexis)

Anti-caveolin-1: králičia monoklonálna protilátka proti kaveolinu-1 (riedenie 1:200) (Santa Cruz Biotechnology)

Sekundárne protilátky

Kozia protilátka proti myšiemu IgG konjugovaná s chrenovou peroxidázou (riedenie 1:1000) (Pierce)

Kozia protilátka proti potkaním IgG konjugovaná Alexa Fluor 488 (riedenie 1:1000) (Molecular Probes)

Kraličia protilátka proti myším IgG konjugovaná Alexa Fluor 488 (riedenie 1:1000) (Molecular Probes)

Kozia polyklonálna protilátka proti králičím imunoglobulínom Alexa Fluor 488 nm (riedenie 1:2000) (Molecular Probes)

Kozia polyklonálna protilátka proti králičím imunoglobulínom Alexa Fluor 594 nm (riedenie 1:1000) (Molecular Probes)

Oslia polyklonálna protilátka proti myším imunoglobulínom Alexa Fluor 488 nm (riedenie 1:1000) (Molecular Probes)

Oslia polyklonálna protilátka proti kozím imunoglobulínom Alexa Fluor 546 nm (riedenie 1:1000) (Molecular Probes)

4.2.5 Médiá a materiál pre tkanivové kultúry

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

10% fetálne bovínne sérum (Sigma)

2 mM L-glutamin (Gibco)

1/100 objemu zmesi antibiotík pre TK (Sigma)

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

2 mM L-glutamin (Gibco)

Hmyzie médium so sérom: TNM-FH insect medium (Sigma)
10% fetálny bovinny albumin (Sigma)
1/100 objemu zmesi antibiotík pre TK (Sigma)

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

Versen(Sevac)

Trypsín(Sigma)

Zmes antibiotík pre tkanivové kultúry: Ampicilin (Sigma) je používaný v konečnej koncentrácii 100µg/ml. Zmes antibiotík pre tkanivové kultúry: používaný 100x koncentrovaný roztok obsahuje na 1 ml – 10 000 jednotiek penicilinu, 10 mg streptomycínu, 25 mg amphotericínu B.

4.2.6 Použité bakteriálne kmene, bunkové línie a vírusy

Bakteriálne kmene:

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

Použitý kmeň bol získaný zo zbierky Katedry genetiky a mikrobiologie, PŕF UK

Bunkové línie:

Bunková línia NIH 3T6 – stabilná línia myších fibroblastov, senzitivna a permisivna pre myší polyomavirus (Prof.Griffin, Royal Postgraduate School, London)

Bunková línia Sf9 – línia hmyzích buniek odvodená z tkaniva ovaríí motýľa *Spodoptera frugiperda* (American Type Culture Collection No. CRL-1711)

Primárna buková kultúra WME – bunky z embryíí myších fibroblastov (RNDr. Jiřina Hánová, CsC.)

Vírusy:

Myší polyomavírus kmeň A2 (poskytnutý P. Amatim)

VL-VP1: Rekombinantný bakulovírus *Autographa californica* produkujúci hlavný štruktúrny proteín myšieho polyomavírusu (Forstová *et al.*, 1993)

AcVP1/2: Rekombinantný bakulovírus *Autographa californica* produkujúci hlavný štruktúrny proteín a minoritný štruktúrny proteín VP2 (Mgr.Karolína Řípová)

AcVP 1/3: Rekombinantný bakulovírus *Autographa californica* produkujúci hlavný štruktúrny proteín a minoritný štrktúrny proteín VP3 (Richterová *et al.*, 2001)

Plazmidy:

pFastBac HT A : Bakulovírusový transferový vektor. Selekcia pomocou *amp^r* a *gen^r*. (Invitrogen)

GBT9-LT: plazmid s génom pre LT myšieho polyomavírusu. Selekcia pomocou *amp^r* (Mgr.Klára Velková)

Antibiotiká:

Ampicilín (Léčiva): používaný v konečnej koncentrácii 100µg/ml

Gentamicín(Gibco): používaný v konečnej koncentrácii 7µg/ml

Zmes antibiotík pre tkanivové kultúry (Sigma): používaný 100x koncentrovaný roztok obsahujúci na 1ml: 10 000 jednotiek ampicilínu, 10 mg streptomycínu, 25 mg amphotericín B.

4.3 Metódy

4.3.1 Sterilizácia

Všetky roztoky, špičky k mikropipetám a mikroskúmavky boli sterilizované v autokláve (30 min., 120 kPa, 127°C).

Roztoky, ktoré nemohli byť sterilizované v autokláve, boli sterilizované filtráciou cez sterilný filter (0,22 µm).

Chemické sklo bolo sterilizované teplým vzduchom pri 180°C 3 hodiny.

4.3.2 Práca s tkanivovými kultúrami

Hmyzie bunky boli kultivované v termostate. Termobox LBT 165 pri 28°C. Cicavčie bunky boli kultivované v CO₂ termostate (Forma Scientific) pri 37°C a 5% CO₂.

4.3.2.1 Pasážovanie hmyzích buniek

(SUMMERS *et al.*, 1987)

Konfluentne narastené bunky na Petriho miske boli zoškrabané škrabátkom a bunková suspenzia bola prevedená do 50 ml sterilnej skúmavky. K bunkám bolo pridané TNM-FH hmyzie médium s 10 % FCS tak, aby pomer bunkovej suspenzie a média bol 1:4. Bunky boli resuspendované v celom objeme a rozdelené do Petriho misiek.

4.3.2.2 Infekcia hmyzích buniek bakulovírusom

(SUMMERS *et al.*, 1987)

Bunky boli pasážované do bezsérového média tak, aby boli z 50% konfluentné. Po prichytení buniek na Petriho misku bolo odsaté médium a pridané bakulovírusové inokulum. Bunky boli za stáleho kolísania inkubované 1h pri laboratórnej teplote. Následne bolo pridané TNM-FH hmyzie médium s 10 % FCS. Infikované bunky boli inkubované 72 hod. pri 28°C. Potom boli bunky zoškrabané do 50 ml skúmavky a centrifugované 10 min. pri 2000 rpm a 4°C. Sediment buniek bol premytý roztokom PBS bol použitý na izoláciu pseudokapsíd. Médium, ktoré obsahovalo virióny rekombinantného bakulovírusu bolo skladované pri 4°C a použité na ďalšiu infekciu buniek Sf9.

4.3.2.3 Fixácia hmyzích buniek

Z buniek narastených na sklíčku v 24 jamkových miskách bolo odsaté médium a bunky boli opláchnuté roztokom PBS. Potom bol k bunkám pridaný roztok methanol/acetón v pomere 1:1. Roztok bol na bunkách ponechaný 4 min. a odsatý a bunky boli ponechané voľne k usušeniu. Fixované bunky boli vysytené 30 min. v roztoku 0,25% želatíny a 0,25% BSA v PBS.

4.3.2.4 Pasážovanie cicavčích buniek

Z konfluentne narostenej misky bolo odsaté médium a bunky boli opláchnuté 6 ml versenu a inkubované 1-4 min. v 300µl 0,25 % roztoku tyrpsínu vo verséne pri 37°C. Po uvoľnení buniek z povrchu misky bolo pridaných 6 ml DMEM média s 10 % séra a bunky boli resuspendované. Následne bola suspenzia rozdelená na šesť Petriho misiek a na každú bolo ešte pridaných 5 ml DMEM média s 10 % sérom. Bunky boli inkubované pri 37°C v CO₂ inkubátore.

4.3.2.5 Synchronizácia cicavčích buniek pred infekciou

(CHEN a FLUCK 2001)

Bunky boli synchronizované do G0 fáze bunkového cyklu 20–24 hodinovou inkubáciou v DMEM médiu bez séra pri 37°C v CO₂ inkubátore. Po uplynutí tejto doby boli bunky pripravené pre infekciu.

4.3.2.6 Infekcia cicavčích buniek vírusom

(TÜRLER a BEARD 1985)

Vírusové inokulum bolo 3x po 1 min. sonikované v stolnom sonikátore Bransonic 5 (Cole – Parmer Instrument Company). Z buniek narastených do 50% konfluencie bolo odsaté DMEM médium a bunky boli opláchnuté bezsérovým DMEM médiom. Na Petriho miske (9 cm) bol pridaný 1 ml bezsérového DMEM média, na mikroskopické sklíčko v 24 jamkovej doštičke bolo pridaných 200 µl DMEM média bez séra. Bolo pridané také množstvo vírusového inokula, aby bola dosiahnutá požadovaná multiplicita infekcie. Bunky boli inkubované v CO₂ termostatu 1 – 1,5 hodiny. Po uplynutí danej doby bolo k bunkám pridané DMEM médium s 10% sérom. Doba infekcie bola počítaná od chvíle prídania vírusového inokula. Bunky boli inkubované pri 37°C v CO₂ inkubátore.

4.3.2.7 Infekcia cicavčích buniek na mikroskopických sklíčkach pre imunofluorescenčné značenie vírusových antigénov

Synchronizované bunky boli ochladené krátkou inkubáciou na ľade. Bunky boli kultivované na krycích sklíčkach v 24 jamkovej doštičke pri 37°C a 5% CO₂ v termostate. Z buniek bolo odsaté médium a na každú jamku bolo pridaných 200 µl vírusového inokula. Bunky boli inkubované 60 min. pri laboratórnej teplote a bolo k nim pridané DMEM so sérom ohriate na 37°C. Bunky boli ponechané k infekcii rôznu dobu v CO₂ inkubátore pri 37°C.

4.3.2.8 Fixácia cicavčích buniek paraformaldehydrom

Z buniek bolo odsaté médium a boli opláchnuté roztokom PBS. K bunkám bol pridaný 3 % paraformaldehyd v PBS a boli fixované 30 min. pri laboratórnej teplote za mierneho kývania. Následne boli bunky premyté roztokom PBS a permeabilizované 5 min. v 0,5% roztoku Tritonu X-100 v PBS. Potom boli 3x 10 min. premyté v PBS. Zafixované bunky boli vysýtené 30 min. v roztoku 0,25% želatíny a 0,25% BSA v PBS.

4.3.2.9 Nepriama imunofluorescencia

K fixovaným a vysýteným bunkám bola pridaná primárna protilátka riedená v PBS a bunky boli inkubované 1 hod. pri laboratórnej teplote za mierneho kývania. Potom bola primárna protilátka odsatá a bunky boli premyté 3x 10 min v PBS. K bunkám bola pridaná sekundárna protilátka riedená v PBS a bunky boli inkubované 30 min. pri laboratórnej teplote za mierneho kývania. Protilátka bola odstránená a bunky boli premývané 3x 10 min. v PBS. Bunky boli pozorované pod fluorescenčným mikroskopom Olympus BX-60.

4.3.2.10 Titrácia myšieho polyomavírusu

Bunky narastené na mikroskopických sklíčkach boli infikované vírusovým inokulom s neznámym titrom. Na infekciu bolo skúmané inokulum riedené 1000x, 10 000x a 100 000x v DMEM médiu bez séra. Po 24 hod. od prídania vírusu boli bunky fixované (kapitola 4.3.2.8) a polyomavírusový antigén LT bol fluorescenčne detekovaný protilátkou (kapitola 4.3.2.9) Bunky, v ktorých bol prítomný sledovaný antigén, boli spočítané a bol určený titer vírusu.

4.3.2.11 Hemaglutinačný test

(TÜRLER a BEARD,1985)

Hemaglutinačný test je používaný na stanovenie koncentrácie vírusových častíc, infekčných i neinfekčných. Test je založený na schopnosti VP1 proteínu interagovať s kyselinou sialovou, ktorá sa nachádza na povrchu erytrocytov morčiat a tým ich aglutinovať. Aglutinované krvinky tvoria sieť, neaglutinované sedimentujú na dno jamky mikrotitračnej doštičky. Počet hemaglutinačných jednotiek (HAU) sa stanovuje ako najväčšie riedenie vírusu, ktoré ešte krvinky aglutinovalo. 1 HAU zodpovedá 1×10^7 častíc myšieho polyomavírusu.

Morčacia krv bola centrifugovaná (Beckman Centrifuge GS-15R, 20 min, 2600 rpm, 4°C) a 3x premytá v PBS s 0,2% BSA. Koncentrácia červených krviniek bola zistená stanovením hematokrytu: suspenzia krviniek bola premiešaná a 30µl suspenzie bolo nanosených do heparinizovanej kapiláry, ktorá bola po 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 bola nariedená v PBS s 0,2 % BSA na konečnú koncentráciu 0,4%. Do každej jamky mikrotitračnej doštičky bolo nanosených 50 µl 0,2% BSA v PBS. Do prvej jamky v riadku bola nanosená nariedená vírusová suspenzia (5µl vírusovej suspenzie a 45µl 0,2% BSA v PBS) a po jej premiešaní bolo zo suspenzie odobratých 50µl a prenesených do nasledujúcej jamky. Tento postup bol opakovaný až do poslednej jamky v riadku. Nakoniec bolo do každej jamky pridaných 50 µl 0,4%-nej suspenzie morčacích erytrocytov a mikrotitračná doštička bola uložená pri 4°C. Výsledok hemaglutinácie bol odčítaný po 6 hod.

4.3.3 Práca s bakteriálnymi kmeňmi

4.3.3.1 Kultivácia baktérií

Bakterie boli kultivované aeróbne v tekutom médiu (ŽB č.2) v trepačke pri 37°C alebo na pevnom agare (ŽA č.2) v termostate pri 37°C cez noc. Pre selekciu baktérií transformovaných plazmidom boli do média pridané selekčné antibiotiká.

4.3.3.2 Príprava kompetentných buniek pre elektroporáciu

(DOWER *et al.*, 1988)

Bakterie boli zaočkované do TPN média a kultivované aeróbne cez noc v trepačke pri 37°C. Suspenzia bola nariedená TPN médiom tak, aby výsledná OD₅₆₀ v 500 ml bola 0,1. Suspenzia bola aeróbne kultivovaná a priebežne bola meraná hodnota OD₅₆₀ pokiaľ nedosiahla hodnoty 0,5 – 0,7. Suspenzie bola centrifugovaná 10 min pri 4°C a 4300 rpm (Beckman Centrifuge GS-15R, rotor S4180). Pelet bol resuspendovaný v 50 ml demineralizovanej vody vychladenej na 4°C. Suspenzia bola centrifugovaná 10 min pri 4°C a 4300 rpm (Beckman Centrifuge GS-15R, rotor S4180). Pelet bol resuspendovaný v 250 ml demineralizovanej vody vychladenej na 4°C. Suspenzia bola centrifugovaná 10 min pri 4°C a 4300 rpm (Beckman Centrifuge GS-15R, rotor S4180). Pelet bol resuspendovaný v 20 ml 10% glycerolu vychladeného na 4°C. Suspenzia bola centrifugovaná 10 min pri 4°C a 4300 rpm (Beckman Centrifuge GS-15R, rotor S4180). Pelet bol resuspendovaný v 10 ml 10% glycerolu. Suspenzia bola centrifugovaná 10 min pri 4°C a 4300 rpm (Beckman Centrifuge GS-15R, rotor S4180). Pelet bol resuspendovaný v 1 ml 10% glycerolu a bunky boli po 100 µl rozpipetované do mikroskúmaviek, zmrazené v tekutom dusíku a uchovávané pri -72°C.

4.3.3 Elektroporácia plazmidovej DNA do kompetentných buniek

(DOWER *et al.*, 1988)

Kompetentné bunky boli rozmrazené pri 0°C. Bola pripravená zmes z 50 µl kompetentných buniek a 1 µl DNA, táto zmes bola premiešaná a prevedení do elektroporačnej kyvety vychladenej na 0°C. Na elektroporátore (Gene Pulser Apparatus) boli nastavené hodnoty: 25 µF, 2.5 kV a 200 Ω. Elektroporačná kyveta bola umiestnená do elektroporátoru a bol aplikovaný elektrický pulz. Optimálna dĺžka pulzu bola 4-5 ms. Ihneď po aplikácii pulzu bol k baktériám pridaný 1 ml SOC média. Suspenzia bola prenesená do sterilnej banky a aeróbne kultivovaná 1 hod. pri 37°C. Bakterie boli vysiate na misku s pevným médiom a antibiotikami a boli kultivované cez noc pri 37°C.

4.3.4 Práca s DNA

4.3.4.1 Horizontální agarózová elektroforéza

(SAMBROOK *et al.*, 1989)

1% agarózový gel bol pripravený z 0,25 g agarózy a 25 ml 0,5x koncentrovaného TBE pufri krátkym povarením. Po ochladení na asi 50°C bolo pridaných 12,5 µl ethidiumbromidu (1µg/ml). Roztok bol naliaty do plexisklového bločku, ktorého dve strany boli tvorené lepiacou páskou. Približne 1 cm od kraja bol umiestnený hrebeň. Po stuhnutí gelu bola odstránená lepiaca páska a hrebeň, gel aj s bločkom boli vložené do elektroforetickej vaničky a zaliate 0,5x TBE pufrom. Vzorky pripravené zmiešaním s BFM boli nanosené do jamiek, ktoré vznikli po vybratí hrebeňa. Aparatúra bola pripojená k zdroju napätia, veľkosť napätia bola nastavená na 60-70 V (5V/cm). Doba potrebná k rozdeleniu DNA bola asi 60 minút. Vzorky boli vizualizované pomocou UV transluminátora.

4.3.4.2 Maxiizolácia plazmidovej DNA – alkalická metóda

(BIRNBOIM a DOLY, 1989)

500 ml bakteriálnej kultúry, ktorá bola kultivovaná cez noc pri 37°C v ŽB č. 2, bola centrifugovaná 10 min pri 4000 rpm (Beckman Centrifuge GS-15R, rotor S4180). Sediment bol resuspendovaný v 20 ml roztoku I. Následne bolo pridaných 40 ml roztoku II, zmes bola opatrne premiešaná otáčaním skúmavky a inkubovaná 5-10 min. pri laboratórnej teplote. K zmesi bolo pridaných 30 ml roztoku III, zmes bola opatrne premiešaná otáčaním skúmavky a inkubovaná 20 min na ľade. Zmes bola centrifugovaná 30 min. pri 4300 rpm a 4°C (Beckman Centrifuge GS-15R, rotor S4180). Supernatant bol prefiltrovaný cez 4 vrstvy gázy. K supernatantu bolo pridaných 0,7 objemu izopropanolu, zmes bola premiešaná a inkubovaná 10 min. pri 4°C. Zmes bola centrifugovaná 30 min pri 4300 rpm a 4°C (Beckman Centrifuge GS-15R, rotor S4180). Sediment bol premytý 80% ethanolom, vysušený pri laboratornej teplote a rozpustený v 300 µl TE pufri. Roztok bol extrahovaný 1x1 objemom upraveného fenolu, 1 objemom zmesi upravený fenol/chloroform, pokiaľ nezmizla medzifáza tvorená vyzrážanými zbytkami proteínov a nakoniec 1x1 objemom upraveného chloroformu. K roztoku bol pridaný 0,1 objem 3 M NaAc a 2,5 objemu 96% ethanolu, ktorý bol vychladený pri -20°C. Roztok bol inkubovaný 20-30 min. pri -72°C. Vyzrážaná DNA bola sedimentovaná 10 min. pri 15300 rpm a 4°C (Mikrocentrifuga Beckman Mikrofuge Centrifuge, rotor F241,5). Sediment bol premytý 80% ethanolom, vysušený pri laboratornej teplote a resuspendovaný v 100 µl TE pufri.

4.3.4.3 Odstránenie RNA zo vzorky DNA

(SAMBROOK *et al.*, 1989)

K vzorke DNA bolo pridaných 0,1 objemu RNázy A (1mg/ml) a vzorka bola inkubovaná 1 hod pri laboratornej teplote. Roztok bol extrahovaný 1x1 objemom upraveného fenolu, 1 objemom zmesi upravený fenol/chloroform, pokiaľ nezmizla medzifáza tvorená vyzrážanými zbytkami proteínov a nakoniec 1x1 objemom upraveného chloroformu. K roztoku bol pridaný 0,1 objem 3 M NaAc a 2,5 objemu 96% ethanolu, ktorý bol vychladený pri -20°C. Roztok bol inkubovaný 20-30 min pri -72°C. Vyzrážaná DNA bola sedimentovaná 10 min pri 15300 rpm a 4°C (Mikrocentrifuga Beckman Mikrofuge Centrifuge, rotor F241,5). Sediment byl premytý 80 % ethanolom, vysušený pri laboratornej teplote a resuspendovaný ve 100 µl TE pufre.

4.3.4.4 Miniizolácia plazmidovej DNA – alkalická metóda

Jednotlivé kolónie boli zaočkované do 700 µl ŽB č. 2 s ampicilínom a kultivované cez noc pri 37°C. Bunky boli centrifugované 1 min. pri 15300 rpm (Mikrocentrifuga Beckman Mikrofuge Centrifuge, rotor F241,5). Pelet bol resuspendovaný v 250 µl roztoku I, ďalej bolo pridaných 250 µl roztoku II a následne 200 µl roztoku III. Premiešaná zmes bola centrifugovaná 5 min pri 15300 rpm (Mikrocentrifuga Beckman Mikrofuge Centrifuge, rotor F241,5). K supernatantu bolo pridaných 500 µl 100% izopropanolu. Zmes bola centrifugovaná 10 min pri 15300 rpm (Mikrocentrifuga Beckman Mikrofuge Centrifuge, rotor F241,5). Sediment bol prepláchnutý 80% ethanolom a resuspendovaný v 15-25 µl TE pufre s RNázou A (10mg/ml).

4.3.4.5 Izolácia fragmentov DNA z agarózového gelu kitom

DNA bola rozdelená v agarózovom gele. Na izoláciu bol použitý „NucleoSpin Extrakt II“ (Macherey-Nagel).

Izolácia prebiehala podľa priloženého manuálu:

Časť gelu s DNA bola vyrezaná a prevedená do mikroskúmavky. Do mikroskúmavky bolo pridaných 200µl/100mg NT pufru a mikroskúmavka bola inkubovaná 5-10 min vo vodnom kúpeli pri 50°C. Zmes bola prenesená do mikroskúmavky „NucleoSpin Extrakt II“ a bola centrifugovaná 1 min pri 15300 rpm (Mikrocentrifuga Beckman Mikrofuge Centrifuge, rotor F241,5). Do mikroskúmavky bolo pridaných 600 µl NT3 pufru a zmes bola centrifugovaná 1 min 15300 rpm. Na odstránenie zbytku NT3 pufru bola celá zmes centrifugovaná 2 min pri 15300rpm (Mikrocentrifuga Beckman Mikrofuge Centrifuge, rotor F241,5). Po odstránení NT3 pufru bola DNA eluovaná 30-50 µl „Elution Buffer“ predhriateho na 60°C a centrifugovaná 1 min pri 15300 rpm (Mikrocentrifuga Beckman Mikrofuge Centrifuge, rotor F241,5). Supernatant obsahujúci DNA bol prenesený do novej mikroskúmavky.

4.3.4.6 Štiepenie DNA restričnými endonukleázami

(SAMBROOK *et al.*, 1989)

Bola pripravená restričná zmes:

DNA

Restričná endonukleáza

Restriční pufor (výsledná koncentrácia 1x koncentrovaný)

Demineralizovaná voda

Zmes bola inkubovaná cez noc v optimálnych restričných podmienkach.

Naštiepená DNA bola izolovaná z gelu kitom „NucleoSpin Extrakt II“(kapitola 4.3.4.5.)

4.3.4.7 Defosforylácia vektorovej DNA

(SAMBROOK *et al.*, 1989)

K 50 μ l štiepenej vektorovej DNA bolo pridaných 10 μ l pufru pre alkalickú fosfatázu, 38 μ l demi vody a 2 μ l alkalické fosfatázy. Reakčná zmes bola inkubovaná 30 min pri 37°C, potom boli pridané znovu 2 μ l alkalické fosfatázy a zmes bola inkubovaná 30 min pri 37°C. Fosfatáza bola inaktivovaná 10 μ l 10% SDS, 1 μ l 0,5M EDTA (pH 8.0) a 1 μ l proteínázy K (10 mg/ml) a inkubáciou 30 min pri 55°C. DNA bola prečistená extrakciou fenolom a chloroformom a zrážaná ethanolom. Potom bola DNA rozpustená v 30-50 μ l TE pufru.

4.3.4.8 Ligácia

(SAMBROOK *et al.*, 1989)

Ligačná zmes bola pripravená z linearizovaného plazmidu a fragmentu tak, aby bol fragment oproti vektoru v dvojnásobnom množstve. K ligačnej zmesi bola pridaná T4 DNA ligáza a ligačný pufr pre T4 DNA ligázu (výsledná koncentrácia 1x koncentrovaný). Takto pripravená ligačná zmes bola inkubovaná cez noc pri laboratornej teplote. Ligovaná DNA bola použitá k elektroporácii.

4.3.5 Práca s proteínmi

4.3.5.1 Príprava lyzátu z infikovaných hmyzích buniek

Sediment hmyzích buniek Sf9 infikovaných rekombinantným bakulovírusom bol resuspendovaný v 60-100 μ l RIPA pufru. Suspenzia bola inkubovaná 20 min. na ľade. Potom bola centrifugovaná 10 min. pri 4800 rpm pri 4°C (Centrifúga GS-15R, rotor S4180). Supernatant bol prevedený do skúmavky a bol použitý k imunologickej detekcii.

4.3.5.2 Izolácia pseudokapsíd z hmyzích buniek

Bunky infikované rekombinantným bakulovírusom boli prenesené do 50 ml skúmavky a centrifugované 10 min. pri 2000 rpm a 4°C (Centrifúga GS-15R, rotor S4180). Pelet bol prepláchnutý roztokom PBS, resuspendovaný v B-pufre a sonikovaný 3x 30 sek. Potom bola suspenzia centrifugovaná 10 min. pri 4800 rpm a 4°C (Centrifúga GS-15R, rotor S4180). Následne bol supernatant centrifugovaný cez 10 % vankúš v B-pufre 3 hod. pri 35 000 pri 4°C (rotor SW41). Sediment bol preliaty B-pufrom a sonikovaný 3x 30sek. Suspenzia bola centrifugovaná v CsCl gradiente 20 hod. pri 35 000 rpm a 18°C (rotor SW41). Po odobraní frakcií gradientu bol zmeraný ich refraktometrický index. Na jeho základe boli frakcie spojené do dvoch výsledných frakcií, ktoré boli dialyzované proti B-pufru v dvoch krokoch. Frakcie boli zahustené cez 10 % sacharózový vankúš. Sediment bol resuspendovaný v B-pufre.

4.3.5.3 Izolácia myšieho polyomavírusu

(TÜRLER a BEARD, 1985)

Bunky 3T6 boli pasážované v pomere 1:10 a infikované myším polyomavírusom s nízkou multiplicitou infekcie, M.O.I. = 0,1 pfu/bunku. Po 6 dňoch bolo z buniek odsaté médium, uchované pri 4°C a k bunkám bolo pridané čerstvé DMEM médium s 5% sérom. Po uplynutí 11 dní po infekcii boli bunky aj s médiom 3x zamrazené a rozmrazené. Po poslednom rozmrazení boli bunky z misiek zoškrabané gumovým škrabátkom a centrifugované, spoločne s médiom zobraňým z buniek 6. deň po infekcii, 40 min pri 4800 rpm a 4°C (Beckman Centrifuge GS-15R). Supernatant bol uschovaný pri 4°C. Pelet bol resuspendovaný v 10 mM Tris-HCl (pH=7,4), suspenzia bola homogenizovaná v homogenizátore chladenom na ľade. K zmesi bol pridaný inhibítor proteáz aprotinin (2 µg/ml) a neuraminidáza (0,01 U/ml) a zmes bola inkubovaná cez noc pri laboratornej teplote za stáleho kývania. Suspenzia bola centrifugovaná 40 min. pri 4800 rpm a 4°C (Beckman Centrifuge GS-15R). Supernatant bol pridaný

k predchádzajúcemu. Pelet bol resuspendovaný v 10mM Tris-HCl (pH=9) a inkubovaný 4 hod. pri laboratornej teplote za stáleho kývania. Suspenzia bola centrifugovaná 40 min. pri 4800 rpm a 4°C (Beckman Centrifuge GS-15R). Supernatant bol pridaný k predchádzajúcim. Supernatanty obsahujúce virióny boli v ultracentrifugačných skúmavkách podvrstvené 2-3 ml 10% sacharózy v B-pufri. Skúmavky boli vložené do centrifugačných kyviet a vyvážené B-pufrom. Centrifugácia prebiehala 3 hod. pri 25000 rpm a 4°C (ultracentrifuga Beckman, rotor SW41). Sediment bol resuspendovaný v B-pufre.

Vzorka obsahujúca vírusové kapsidy v pufri B bola daná do centrifugačných skúmaviek a podvrstvená 1,5 ml 10% sacharózy v B-pufre. Skúmavky boli vložené do centrifugačných kyviet a vyvážené B-pufrom. Centrifugácia prebiehala 3 hod. pri 35000 a 4°C (ultracentrifuga Beckman, rotor SW41).

Sediment bol resuspendovaný v pufri B. So získanými sedimentmi bolo ďalej pracované podľa kapitol 4.3.5.5 a 4.3.5.6

4.3.5.4 Centrifugácia cez 10 % sacharózový vankúš

Do centrifugačných skúmaviek bola daná vzorka obsahujúca vírové kapsidy v B-pufre. Vzorka bola prevrstvená 1-1,5 cm vrstvou 10 % sacharózy. Skúmavky boli vložené do centrifugačných kyviet a vyvážené B-pufrom. Centrifugácia prebiehala 3 hod. pri 35 000 rpm a 4°C (rotor SW41). Sediment bol resuspendovaný v B-pufre sonikáciou.

4.3.5.5 Izopyknická centrifugácia v rozvnovážnom CsCl gradiente

(TÜRLER a BEARD, 1985)

V centrifugačnej skúmavke bolo zmiešaných 7,9g vzorky v B-pufre s 3,79g CsCl. Zmes bola prevrstvená parafínovým olejom. Skúmavky boli vložené do centrifugačných kyviet a vyvážené. Centrifugácia prebiehala 20 hod. pri 18°C a 35 000 (rotor SW41). Následne boli frakcie rozdelené pomocou peristaltickej pumpy do mikroskúmaviek. Bol zmeraný refraktometrický index u jednotlivých

frakcií a na jeho základe boli frakcie spojené do dvoch frakcií. Tieto frakcie boli dialyzované proti B-pufro.

4.3.5.6 Dialýza

Dialyzačná membrána bola povarená 10 min. v destilovanej vode. Vzorka bola prenesená do membrány z oboch strán uzatvorená svorkami. Dialýza prebiehala proti B-pufro v dvoch krokoch cez noc pri 4°C za stáleho miešania. Následne bola vzorka zahustená centrifugáciou cez sacharózový vankúš (kapitola 4.3.5.4).

4.3.5.7 SDS-polyakryamidová elektroforéza (SDS-PAAGE)

(SAMBROOK *et al.*,1989)

Sklá pre elektroforézu boli dôkladne umyté (čistiaci prášok, denaturovaný lieh, demineralizovaná voda). Suché sklá boli potreté PLOT koncentrátom, umiestnené do nalievacej aparatury a bol vyznačený spodok zubov hrebeňa. Medzi sklá bol naliaty spodný gel 0,5 cm pod okraj zubov hrebeňa. Gel bol prevrstvený demineralizovanou vodou a polymerizoval 20-30 min. Po polymerizácii bola voda odstránená a bol naliaty horný gel. Po naliatí bol vsunutý do aparatury vsunutý hrebeň. Gel polymerizoval 15-20 min. Po polymerizácii bol hrebeň odstránený, sklá boli prenesené do elektroforetickej aparatury a bol naliaty elektroforetický pufor, ktorým boli prepláchnuté jamky.

Boli nanesené vzorky zmiešané s SDS „loading“ pufrom a marker molekulových váh. Elektroforéza prebiehala 20 min. pri napätí 80V/cm. Po zkoncentrovaní vzoriek na rozhraní horného a dolného gelu bolo zvýšené napätie na 120V/cm. Elektroforéza prebiehala pokiaľ vzorky nedoputovali k okrajom spodného gelu.

4.3.5.8 Western blot

(SAMBROOK *et al.*, 1989)

Gel bol inkubovaný v blotovacom pufry. Bol zostavený blotovací sendvič: čierna mriežka, hubička, filtračné papiere, Whattman, gel, nitrocelulózová membrána, Whattman, filtračné papiere, hubička, biela mriežka. Prenos prebiehal pri 250mA 3 hod. Po ukončení blotovania bola membrána vložená minimálne na 30 min. do 5% mlieka v PBS. Vzorky proteínov boli imunologicky detekované.

4.3.5.9 Dot blot

(SAMBROOK *et al.*, 1989)

Lyzát Sf9 buniek bol nanesený na nitrocelulózovú membránu a po zaschnutí bola membrána použitá k imunologickej detekcii. Nanášaných 0,5 μ l vzorky.

4.3.5.10 Imunodetekcia proteínov

(SAMBROOK *et al.*, 1989)

Membrána bola inkubovaná 30 min. v odtučnenom 5 % mlieku v PBS, opláchnutá v PBS. Nasledovala inkubácia s primárnou protilátkou nariadenou v 5 % odtučnenom mlieku 1 hod. Membrána bola 3x 10 min. premývaná a inkubovaná 30 min. so sekundárnou protilátkou nariadenou v 5 % odtučnenom mlieku a 3x 10 min. premývaná v PBS. V tmavej komore bola membrána preliata roztokom Luminol, daná do fólie a bol priložený RTG film. Doba expozície bola 15 sek.-20 min. Film bol vložený do vývojky a po vyvolaní do ustálovača.

4.3.5.11 Meranie koncentrácie proteínov podľa Bradfordovej

Bola pripravená riediaca rada v rozmedzí koncentrácií 0-1 mg BSA/ml. 2 μ l z každej koncentrácie a 2 μ l vzorky boli nanesené na mikrotitračnú doštičku. Bolo pridané 100 μ l činidla ku každej vzorke bola meraná absorbancia pri 595 nm.

5. VÝSLEDKY

5.1 Izolácia myšieho polyomavírusu

Na infekciu bol požitý myší polyomavírus kmeň A2 z laboratória P. Amatiho. Bolo infikovaných $2,7 \cdot 10^9$ buniek s multiplicitou infekcie M.O.I.= 0,1. Po centrifugácii vírusu cez 10% sacharózovú vrstvu (kapitola 4.3.5.4) a v CsCl gradiente (kapitola 4.3.5.5) bol obsah kvety rozdelený pomocou peristaltickej pumpy na jednotlivé frakcie. Frakcie boli imunodetekciou (dot blot) (kapitola 4.3.5.9) testované na prítomnosť hlavného kapsidového proteínu VP1 (ukážka na obr.5.1) Hodnoty zistených refraktometrických indexov jednotlivých frakcií sú uvedené v tabuľke 5.1 Na základe hodnôt refraktometrického indexu boli získané frakcie zoskupené do 3 výsledných frakcií F1, F2, F3. Podľa hodnôt vznášateľnej hustoty sú virióny očakávané vo frakcii F2 (vznášateľná hustota $1,33 \text{ g/cm}^3$) a prázdne kapsidy vo frakcii F3 (vznášateľná hustota $1,29 \text{ g/cm}^3$) Tieto frakcie boli dialyzované v B-pufri (kapitola 4.3.5.6) a skoncentrované centrifugáciou cez vrstvu 10% sacharózy. U každej z frakcií bol zistený infekčný titer (kapitola 4.3.2.11) (Obr.č.5.2.) a hemaglutinačné jednotky, ktoré boli podľa empirického údaju (TURGLER a BEARD 1985) prepočítané na celkový počet hemaglutinačných častíc (infekčných aj neinfekčných) (kapitola 4.3.2.10) (tabuľka 5.2.). Z tohto stanovenia vyplýva, že vo frakcii č.2, kde sa podľa refraktometrických indexov očakávali infekčné virióny pripadá približne 10 vírusových (hemaglutinujúcich) častíc na jednu infekčnú časticu. U frakcie F3 je infekčná približne jedna zo sto častíc. Kvalita izolovaného vírusu bola overená taktiež elektrónovou mikroskopiou, metódou negatívneho farbenia. Obr. 5.3 ukazuje snímky jednotlivých frakcií. (A-rozpadnuté virióny B- plné virióny C- prázdne virióny)

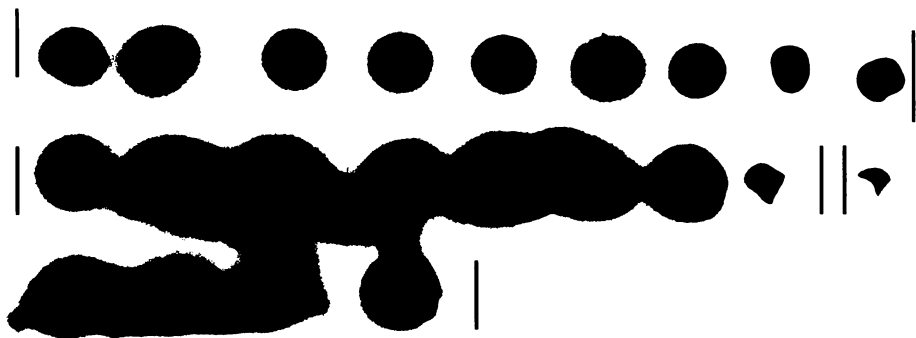
Tab. 5.1: Hodnoty refraktometrických indexov jednotlivých frakcií CsCl gradientu. Prvá spojená frakcia nie je vyznačená, druhá spojená frakcia je vyznačená tučným písmom a tretia spojená frakcia je vyznačená podčiarknutím

Číslo frakcie	Refraktometrický index	Číslo frakcie*	Refraktometrický index*
1.	1,379	1.	1,377
2.	1,377	2.	1,378
3.	1,375	3.	1,375
4.	1,3745	4.	1,371
5.	1,374	5.	1,371
6.	1,370	6.	1,370
7.	1,3695	7.	1,370
8.	1,3685	8.	1,369
9.	1,368	9.	1,367
10.	1,367	10.	1,366
11.	1,365	11.	1,367
12.	1,367	12.	1,369
13.	1,366	13.	1,366
14.	1,365	14.	1,366
15.	1,365	15.	1,364
16.	1,365	16.	1,364
17.	1,365	17.	1,364
18.	1,364	18.	<u>1,3625</u>
19.	1,364	19.	<u>1,3625</u>
20.	1,364	20.	<u>1,3625</u>
21.	1,364	21.	<u>1,3635</u>
22.	<u>1,3635</u>	22.	<u>1,632</u>
23.	<u>1,3625</u>	23.	1,360
24.	<u>1,363</u>	24.	<u>1,3595</u>
25.	<u>1,362</u>	25.	<u>1,359</u>
26.	<u>1,361</u>		
27.	<u>1,361</u>		
28.	<u>1,359</u>		
29.	<u>1,358</u>		

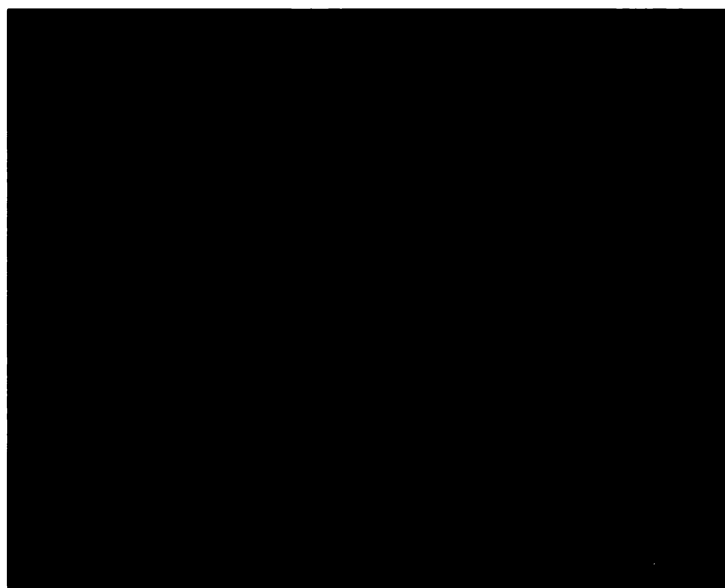
F1: (1-10)+(1-9)*

F2: (11-21)+(10-17)*

F3: (22-29)+(18-25)*



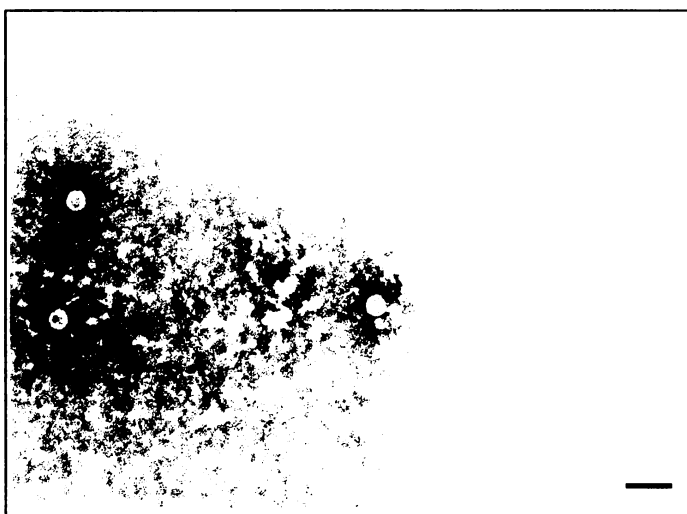
Obr. 5.1 Imunoanalýza jednotlivých frakcií 1-25* po CsCl gradiente. Membrána bola značená primárnou protilátkou proti VP1, sekundárnou proti myšiemu imunoglobulínu kojugovanou s chrenovou peroxidázou. Membrána bola vyvolávaná roztokom LUMINOL. Zelenými úsečkami je ohraničená frakcia č.1, červenými úsečkami je ohraničená frakcia č.2 a modrými úsečkami je ohraničená frakcia č.3



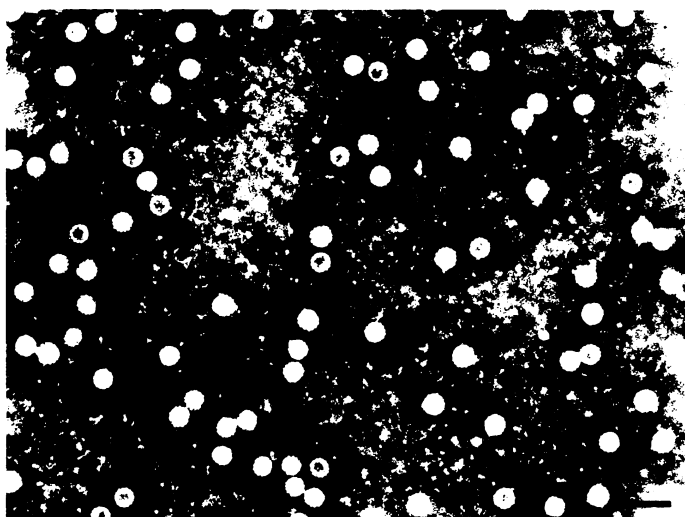
Obr. 5.2: K titráci myšieho polyomavírusu boli použité bunky 3T6 infikované myším polyomavírusom, fixované 24h. po infekcii. K imunofluorescencii bola použitá protilátka proti LT a sekundárna Alexa Flour 488 kozia proti potkaním IgG. Boli počítané bunky pozitívne na LT vždy v 80 optických poliach Mierka:10 μ m

Číslo frakcie	Objem frakcie	Infekčný titer (pfu/ml)	Hemaglutinačný titer (HAU)	Približný počet vírusových častíc/ml
1.	320μl	$4 \cdot 10^7$	<40	-
2.	320μl	$2 \cdot 10^{10}$	20480	$2,0 \cdot 10^{11}$
3.	320μl	$1 \cdot 10^{10}$	16340	$1,6 \cdot 10^{12}$

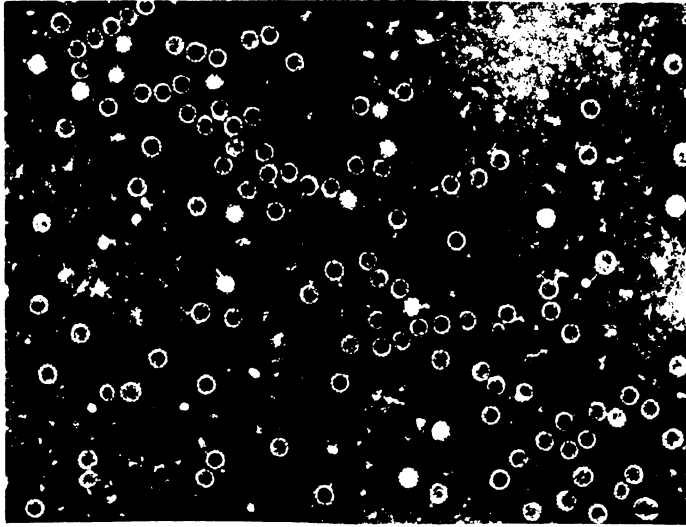
Tab 5.2: Hodnoty infekčného a hemaglutinačného titru pre izolované frakcie



A. Vo frakcii č.1 sa nachádzajú rozpadnuté virióny. Mierka:100nm



B. Vo frakcii č.2 sa prevažne vyskytujú plné virióny (biele). Mierka:100nm



C. Vo frakcii č.3 sa prevažne vyskytujú prázdne virióny(čierne). Mierka:100nm

Obr. 5.3: Elektrónová mikroskopia (negatívne farbenie) frakcií F1, F2, F3 Vzorok myšieho polyomavírusu po zahutení cez sacharózový vankúš

5.2 Izolácia VP1, VP1/2 a VP1/3 pseudokapsíd z lyzátov hmyzích buniek

Rekombinantné bakulovírusy VL-VP1, AcVP1/2 a AcVP1/3 boli použité pre infekciu hmyzích buniek narastených na miskách s priemerom 9 cm (32 misiek pre každý typ bakulovírusu). Po 72h. kultivácie pri 28°C boli bunky vzaté z misiek, resuspendované v pufri B a rozrušené sonikáciou. Získaný lyzát bol centrifugovaný v 10% sacharóze (kapitola 4.3.5.4) a následne v hustotnom CsCl gradiente (kapitola 4.3.5.5). Po centrifugácii boli v kyvete viditeľné dva prúžky. Získaný materiál bol rozdelený pomocou peristaltickej pumpy na jednotlivé frakcie u ktorých bol zmeraný refraktometrický index.(Tab.5.3) Frakcie boli ďalej imunologicky testované na prítomnosť hlavného polyomavírusového štruktúrneho proteínu VP1 metódou dot blot (kapitola 4.3.5.9)(Obr. 5.4, 5.5, 5.6) Napriek tomu, že na membránu bolo nanášaných iba 0,5μl jednotlivých frakcií, signál VP1 proteínu bol silný vo všetkých odobraných frakciách. Na základe refraktometrických indexov boli frakcie každého z gradietov spojené do troch preparácií F1, F2, F3. Frakcia F3 by mala podľa refraktometrického indexu obsahovať prevažne prázdne kapsidové štruktúry, frakcia F2 prevažne kapsidy s enkapsidovanou bakulovírusovou DNA alebo DNA hmyzích buniek, prípadne väčšie agregáty. Polyomavírusové štruktúrne proteíny boli v získaných izolátoch, po zahustení centrifugáciou cez 10% roztok sacharózy v pufre B (kapitola 4.3.5.4) imunologicky detekované metódou Western blot (kapitola 4.3.5.8) (Obr.5.7, 5.8, 5.9). Kompaktnosť pseudokapsíd v spojených frakciách bola posudzovaná elektrónovou mikroskopiou, metódou negatívneho farbenia.(Obr. 5.10, 5.11, 5.12, 5.13, 5.14) U výsledných vzoriek bola meraná koncentrácia proteínov metódou Bradfordovej (kapitola 4.3.5.11) (Tab.5.4). Izolácia VP1/2 pseudokapsíd bola opakovaná 4x. Bohužiaľ sa nepodarilo izolovať inaktívne kapsidové štruktúry aj keď bol v hmyzích bunkách identifikovaný ako VP1, tak VP2 proteín.

Tab.5.3. Namerané hodnoty refraktometrického indexu jednotlivých frakcií po CsCl gradiente. Prvá spojená frakcia nie je vyznačená, druhá spojená frakcia je vyznačená tučným písmom a tretia spojená frakcia je vyznačená podčiarknutím.

Číslo frakcie	Refraktometrický index VL-VP1	Refraktrometrický index Ac VP1/2	Refraktometrický index Ac VP1/3
1.	1,375	1,376	1,375
2.	1,372	1,375	1,372
3.	1,369	1,369	1,367
4.	1,3675	1,366	1,364
5.	1,367	1,366	1,364
6.	1,366	1,364	1,364
7.	1,364	<u>1,363</u>	1,365
8.	<u>1,362</u>	<u>1,363</u>	<u>1,363</u>
9.	<u>1,362</u>	<u>1,360</u>	<u>1,360</u>
10.	<u>1,360</u>	1,359	<u>1,360</u>
11.	1,358	1,358	1,355

F1: VL-VP1: (1-3)+11

Ac VP1/2: (1-3)+10,11

Ac VP1/3: 1,2,11

F2: VL-VP1: 4-7

Ac VP1/2: 4-6

Ac VP1/3: 3-7

F3: VL-VP1: 8-10

Ac VP1/2: 7-9

Ac VP1/3: 8-10



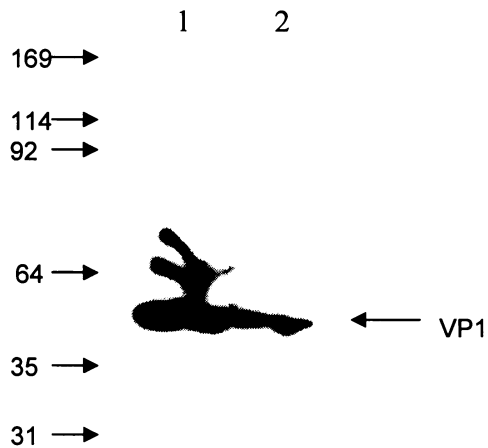
Obr. 5.4:Imunologická detekcia VP1 v jednotlivých frakciách VL-VP1 po CsCl gradiente. Membrána je značená primárnou protilátkou proti VP1, sekundárnou proti myšiemu imunoglobulínu kojigovanou s chrenovou peroxidázou. Membrána bola vyvolávaná roztokom LUMINOL.



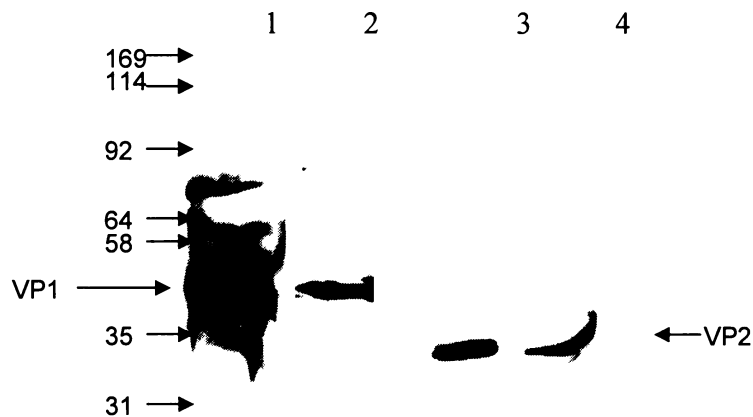
Obr. 5.5:Imunoanalýza jednotlivých frakcií Ac VP1/2 po CsCl gradiente. Membrána bola značená primárnou protilátkou proti VP1, sekundárnou proti myšiemu imunoglobulínu kojigovanou s chrenovou peroxidázou. Membrána bola vyvolávaná roztokom LUMINOL



Obr. 5.6:Imunoanalýza jednotlivých frakcií Ac VP1/3 po CsCl gradiente. Membrána bola značená primárnou protilátkou proti VP1, sekundárnou proti myšiemu imunoglobulínu kojigovanou s chrenovou peroxidázou. Membrána bola vyvolávaná roztokom LUMINOL

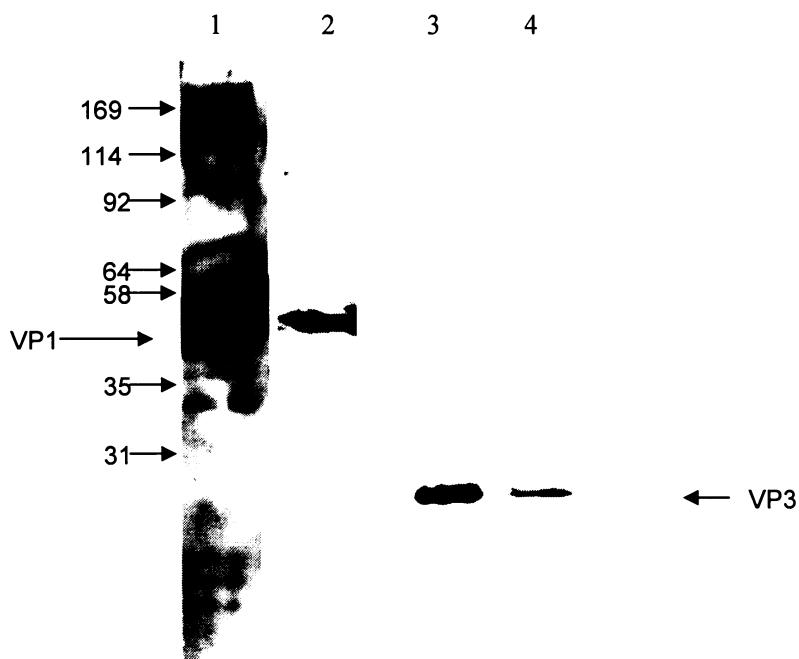


Obr. 5.7: Membrána značená primárnou protilátkou proti VP1, sekundárnou proti myšiemu imunoglobulínu kojigovanou s chrenovou peroxidázou. Membrána bola vyvolávaná roztokom LUMINOL. Detekovaný VP1 proteín z lyzátu izolovaných pseudokapsíd VL-VP1. 1-lyzát izolovaných VL-VP1, 2-lyzát predom overených VL-VP1



Obr. 5.8 : Membrána značená primárnou protilátkou proti VP1 a primárnou protilátkou proti spoločným sekvenciám proteínu VP2 a VP3 sekundárnou proti myšiemu imunoglobulínu kojigovanou s chrenovou peroxidázou. Membrána bola vyvolávaná roztokom LUMINOL. Detekovaný VP1 a VP2 proteín z lyzátu izolovaných pseudokapsíd VL-VP1/2. 1-lyzát izolovaných VL-VP1/2 pseudokapsíd 2-pozitívna kontrola VL-VP1 overených 3-pozitívna kontrola VL-VP1/2 overených 4-lyzát izolovaných VL-VP1/2

Obr. 5.9: Membrána značená primárnou protilátkou proti VP1 a protilátkou proti spoločným sekvenciám proteínu VP2 a VP3, sekundárnou proti myšiemu imunoglobulínu kojigovanou s chrenovou peroxidázou. Membrána bola vyvolávaná roztokom LUMINOL. Detekovaný VP1 a VP3 proteín z izolovaných pseudokapsíd VL- VP1/3.1-lyzát izolovaných VL-VP1/3, 2-pozitívna kontrola VL-VP1 overených, 3-lyzát izolovaných VL-VP1/3, 4-pozitívna kontrola VL-VP1/3 overených

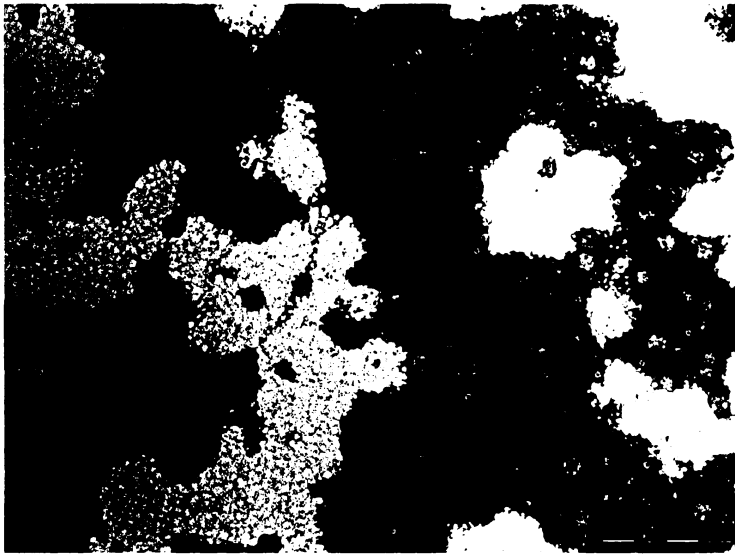


VL-VP1		AcVP1/2		AcVP1/3	
vzorka	koncentrácia	Vzorka	koncentrácia	vzorka	koncentrácia
frakcia 2	0,154 mg/ml	frakcia 2	1,1 mg/ml	frakcia 2	0,045 mg/ml
frakcia 3	0,018 mg/ml	frakcia 3	0,208 mg/ml	frakcia 3	0,41 mg/ml

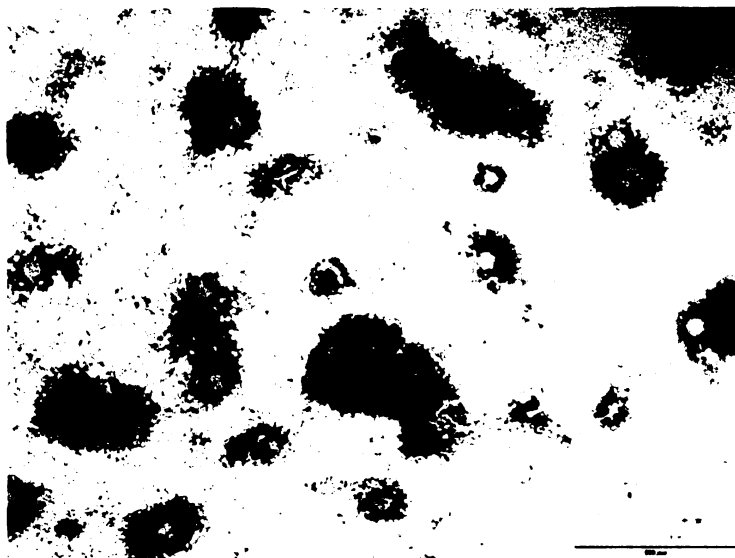
Tab. 5.4: Stanovenie koncentrácie proteínov vo vzorkách izolovaných pseudokapsíd pomocou Bradfordovej metódy



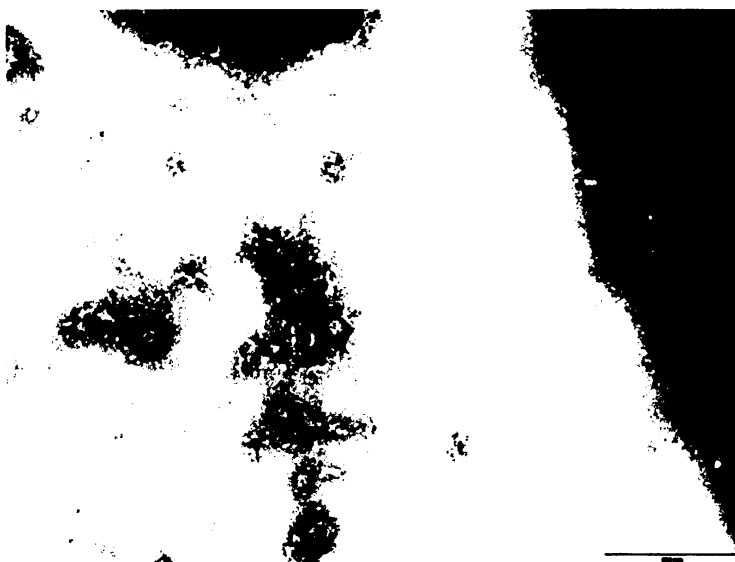
Obr. 5.10: Elektrónmikroskopická analýza frakcie č.3 VP1 pseudokapsíd. Metóda negatívneho farbenia. Mierka:500 μ m



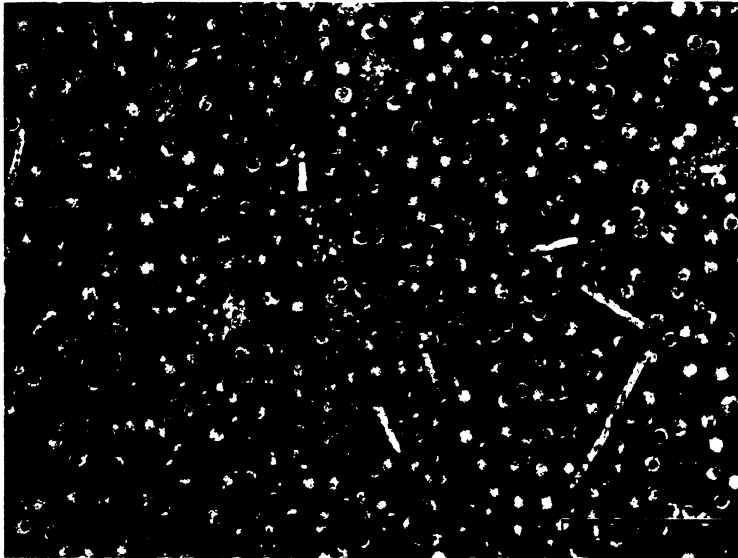
Obr. 5.11:Elektrónmikroskopická analýza frakcie č.2 VP1 pseudokapsíd. Metóda negatívneho farbenia. Mierka:500 μ m



Obr. 5.12: Elektrónmikroskopická analýza frakcie č.3 VP1/2 pseudokapsíd. Metóda negatívneho farbenia. Mierka: 500 μ m



Obr. 5.13: Elektrónmikroskopická analýza frakcie č.2 VP1/2 pseudokapsíd. Metóda negatívneho farbenia. Mierka: 500 μ m



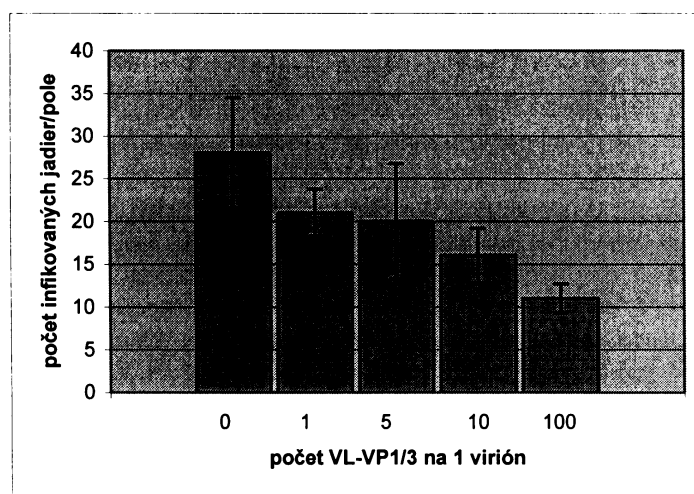
Obr. 5.14: Elektrónmikroskopická analýza frakcie č.3 VP1 /3 pseudokapsíd. Metóda negatívneho farbenia. Mierka:500 μ m

5.3. Testovanie schopností VP1 a VP1/3 pseudokapsíd inhibovať vstup natívnych viriónov do hostiteľských buniek.

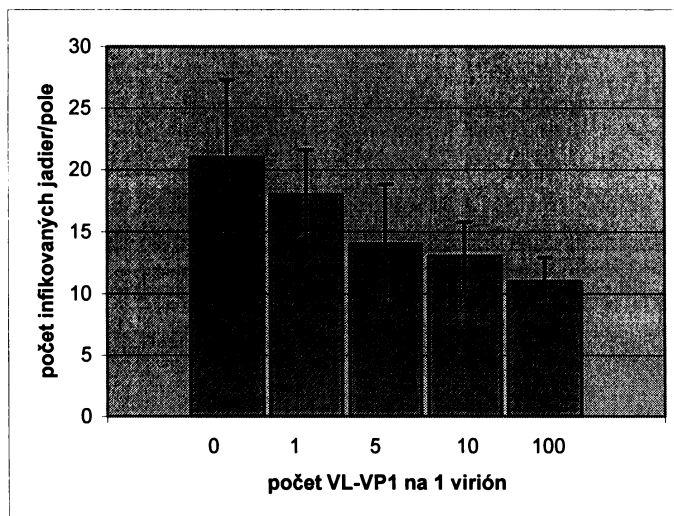
Schopnosť pseudokapsíd inhibovať vírusovú infekciu bola testovaná s frakciami obsahujúcimi prázdne VP1 a VP1/3 pseudokapsidy. Použitie VP1/2 pseudokapsíd nebolo možné vzhľadom k veľmi malým množstvám celistvých pseudokapsíd z izolácií. Stanovením koncentrácie pomocou Bradfordovej (kapitola 4.3.5.11) bolo stanovené približné množstvo častíc pseudokapsíd. Výsledky sú uvedené v tabuľke 5.5. Množstvo častíc vírusu bolo určených z hemaglutinačného titru vírusu. Myšie fibroblasty (3T6) narastené na mikroskopických sklíčkach približne do 60% konfluentnosti boli infikované natívnym myším polyomavírusom tak, aby počet infikovaných buniek (vo vzorkách bez prítomnosti pseudokapsíd) bol približne 20-30 buniek na zorné pole mikroskopu (multiplicita infekcie približne 40 častíc/ bunka). Vírus bol pridávaný k bunkám a zmiešaný s 0, 1x, 5x, 10x a 100x vyšším množstvom VP1 alebo VP1/3 pseudokapsíd. Bunky boli po 24 h. po infekcii fixované paraformaldehydom (kapitola 4.3.2.8) a LT antigén v infikovaných bunkách bol zviditeľnený metódou nepriamej imunofluorescencie (kapitola 4.3.2.9). Počty buniek boli sledované na fluorescenčnom mikroskope Olympus BX-60. Graf 5.1 ukazuje ako klesal počet infikovaných jadier so zvyšujúcim sa množstvom pridaných VP1/3 pseudokapsíd a graf 5.2 zobrazuje ako klesal počet infikovaných jadier so zvyšujúcim sa množstvom VP1 pseudokapsíd. Bolo počítaných vždy celkom 80 svetelných polí u dvoch paralelných sklíčok pre každú hodnotu. Tabuľka 5.6 sumarizuje zistené hodnoty infikovaných jadier a % inhibície vzhľadom k množstvu a druhu pseudokapsíd a vyplýva, z nej, že prítomnosť pseudokapsíd obsahujúci proteín VP3 inhibujú produktívnu infekciu výraznejšie než prítomnosť kapsíd zložených len z hlavného štruktúrneho proteínu VP1. Obr.5.15 ukazuje znižujúci sa počet infikovaných buniek pri nadbytku 0, 1 a 100 pseudokapsíd na 1 virión

Vzorka	Množstvo častíc / μ ml
VL-VP1	$6,6 \cdot 10^8$
VL-VP1/3	$2 \cdot 10^{10}$

Tab. 5.5: Výsledné množstvá častíc použitých pre inhibičné testy



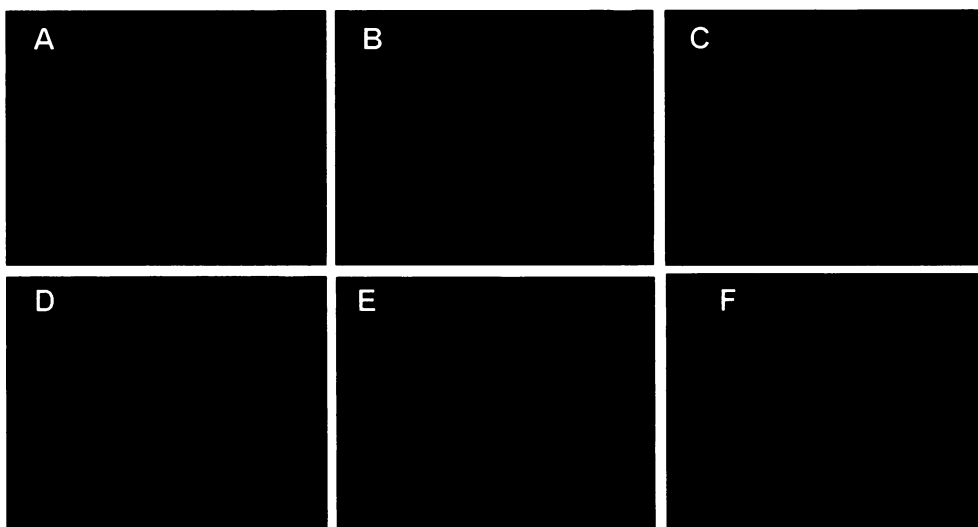
Graf. 5.1: Oplyvnenie infekivity polyomavírusov prítomnosťou pseudokapsíd VP1/3 vo vírusovom inokule. Graf ukazuje závislosť infikovaných jadier na svetelné pole v závislosti od počtu pridaných VL-VP1/3. V prvom stĺpci neboli pridané VP1/3 pseudokapsidy do vírusového inokula, v druhom pripadala na 1 virión natívneho polyomavírusu 1 pseudokapsidu, v nasledujúcich stĺpcoch stúpala koncentrácia VP1/3 pseudokapsíd v poradí 5, 10, 100 pseudokapsíd na 1 virión myšieho polyomavírusu.



Graf. 5.2: Ovplyvnenie infekivity polyomavírusov prítomnosťou pseudokapsíd VP1 vo vírusovom inokule. Graf ukazuje závislosť infikovaných jadier na svetelné pole v závislosti od počtu pridaných VL-VP1. V prvom stĺpci neboli pridané VL-VP1 pseudokapsidy do vírusového inokula, v druhom pripadala na 1 virión natívneho polyomavírusu 1 pseudokapsidu, v nasledujúcich stĺpcoch stúpala koncentrácia VL-VP1 pseudokapsíd v poradí 5, 10, 100 pseudokapsíd na 1 virión myšieho polyomavírusu

Vzorka	Množstvo pseudokapsíd na 1 virión	Priemerný počet svietiacich jadier/pole	Smerodatná odchyľka	Inhibície (%)
Virióny	-	21	6,3	0
VL-VP1	1	18	3,6	13
	5	14	4,8	33
	10	13	2,8	38
	100	11	1,9	48
VL-VP1/3	-	28	6,5	0
	1	21	2,8	25
	5	20	6,8	28
	10	16	3,2	43
	100	11	1,7	60

Tab. 5.6: Výsledky porovnávacích testov. Priemerné hodnoty sú počítané z osemdesiatich polí.



Obr. 5.15: Ukážka z výrezu reprezentatívnych polí infikovaných buniek inhibičných pokusov (metóda nepriamej imunofluorescencie). Vyvolané primárnou protilátkou proti LT 24 h po infekcii. Ako sekundárna bola použitá kozia protilátka konjugovaná s Alexa Fluor 488 namierená proti potkaním IgG. Mierka: 10 μ m **A:** 0 VL-VP1/1 virión **B:** 1 VL-VP1/ 1 virión **C:** 100 VL-VP1/1 virión **D:** 0 VL-VP1/3 /1 virión **E:** 1 VL-VP1/3 /1 virión **F:** 100 VL-VP1/3 /1 virión

5.4. Vzťah caveolinových váčkov k pohybu myšieho polyomavírusu a pseudokapsíd bunkou

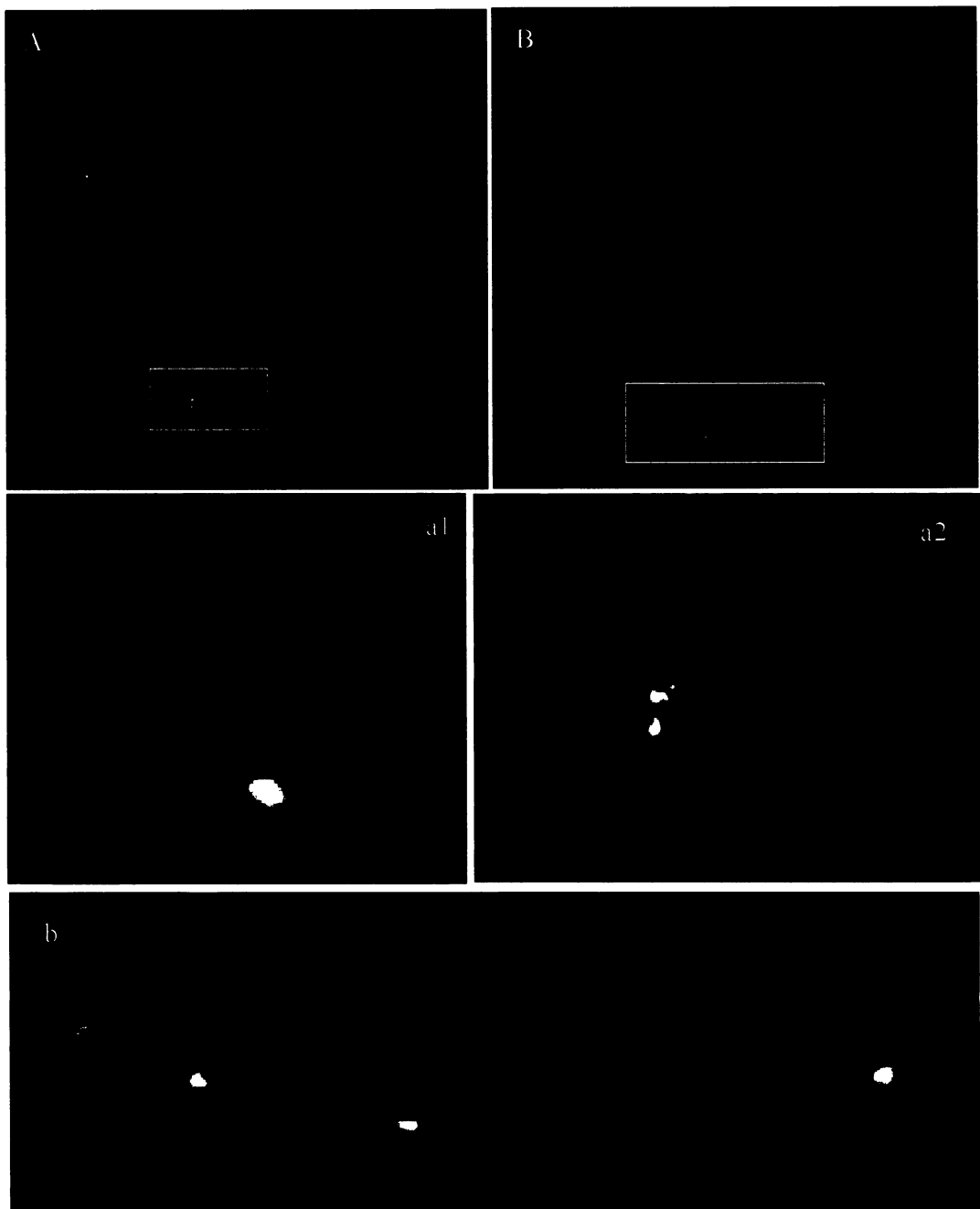
Ako bolo uvedené v kapitole 2.7.1.1 spôsob aj účel transportu bunkou viriónov myšieho polyomavírusu, ale aj iných polyomvírusov ma ešte mnoho otáznikov. Predovšetkým nie je stále, aj napriek intenzívnemu štúdiu niekoľkých laboratórií úplne jasná úloha caveolinových váčkov v produktívnej polyomavírusovej infekcii. Nás v tejto práci zaujímalo, ako sa mení kolokalizácia vírusu s caveolinom v čase a či nebude pozorovaný nejaký rozdiel v pohybe medzi viriónmi a pseudokapsidami. Pre pozorovanie lokalizácie caveolinu a vírusu v bunkách sme zvolili tri časy: 20 minút, 3 hodiny a 12 hodín po infekcii. V prvom čase sme predpokladali (z predchádzajúcich pozorovaní), že väčšina častíc bude v monopinocytických váčkoch alebo v skorých endozómoch (ktoré ale rovnako môžu obsahovať caveolinové domény). V čase 3 hod. po infekcii sa časť vírusu nachádza už v perinukleárnom priestore. Zaujímala nás proporcia medzi kolokalizáciou vírusu s endoplazmatickým retikulom a váčkami bohatými na caveolin. V predchádzajúcich prácach (RICHTEROVÁ *et al.*, 2001; MANNOVÁ a FORSTOVÁ 2003) bolo pozorované, že pri vyšších multiplicitách infekcie sa väčšina čiastočne rozvolnených vírusových štruktúr (ktoré sa v čase 3-4 hodiny zhromažďujú v perinukleárnom priestore), sťahuje späť k bunkovej periférii. Tieto štruktúry (VP1 aj DNA) sú čiastočne bunkou degradované, ale konfokálne obrázky so značeným aktínom (Richterová, Forstová, nepublikované výsledky) naznačovali, že sa bunka zbytkov kapsidových proteínov zbavuje možno aj endocytózou. Preto sme sa chceli pozrieť aj na vzájomnú kolokalizáciu caveolinových váčkov a vírusového signálu v neskoršom čase t.j. 12 hod. po infekcii.

Obr.5.16 ukazuje iba skorú občasnú kolokalizáciu vírusu (protilátka proti VP1 zelenou) a caveolinom (červenou) 20 min. po infekcii Podobne je to aj u pseudoinfekcie s pseudokapsidami VP1/3 (Obr.5.17)

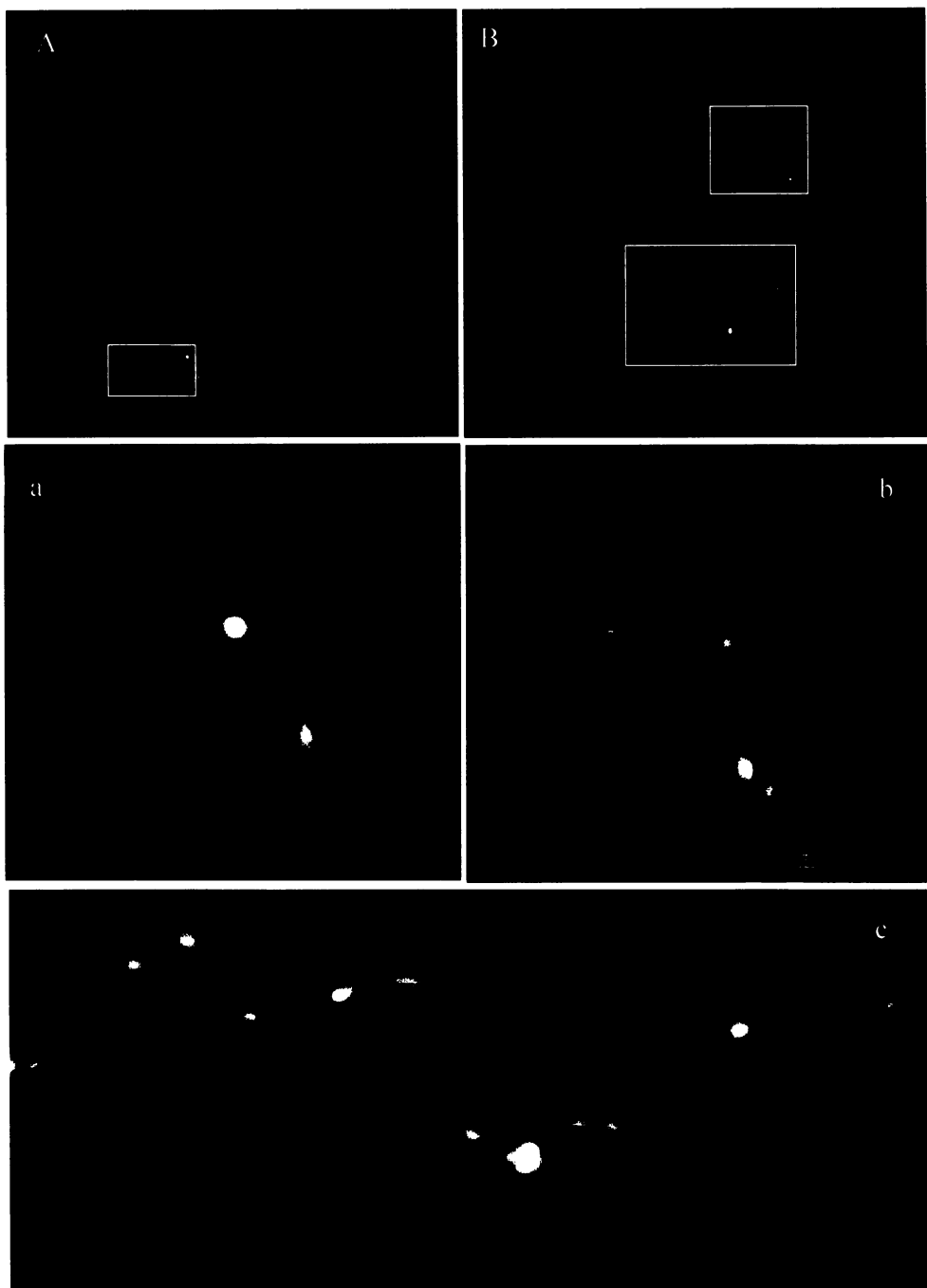
Tri hodiny po infekcii nie je rozhodne mierna kolokalizácia VP1(viriónov) a caveolinu nižšia, než 20 min. po infekcii (Obr.5.18). Signál VP1 je v tomto čase

vidieť aj ako väčšie zhluky v perinukleárnom priestore (Obr. 5.18 B, D) Vzhľadom k tomu, že na rezoch buniek pozorovaných elektrónovou mikroskopiou (RICHTEROVÁ *et al.*, 2001, LIEBL *et al.*, 2006) bolo možno vidieť v perinukleárnom priestore len ojedinele vírusové častice aj napriek tomu, že signál VP1 protínu bol vysoký, predpokladali sme, že v tejto dobe je množstvo viriónov už rozvolnených. Skúsili sme, či nebude v tomto čase možné detekovať v bunkách minoritné vírusové proteíny VP2 a VP3, ktorých epitopy sú v intaktných viriónoch nedostupné protilátkam. Na obr. 5.19 3h po infekcii u natívnych viriónov bola použitá protilátka proti spoločnej časti VP2 a VP3 proteínom (zelená), proti caveolinu (červená). Na obrázku je vidieť slabý, málo dôkazný zelený signál. Relatívne vysoké percento kolokalizácie VP1 a caveolinu je vidieť 3 hod. po pseudoinfekcii pseudokapsidami (Obr. 5.20 a 5.21) Na obrázku 5.21 sa podarilo zobrazit' tri veľké caveolinové váčky v perinukleárnom priestore bunky, ktoré sú pozitívne na VP1 signál pseudokapsíd 3 h. po infekcii. V zväčšenom detaile obrázku je možné vidieť, že VP1 signál sa nachádza skôr asociovaný s membránou, než vo vnútri membránového váčku. Na obr. 5.22 je zviditeľnené endoplazmatické retikulum protilátkou proti chaperonu BiP (GRP 78/BiP je členom hsp 70 rodiny a nachádza sa v lumen endoplazmatického retikula) a vírus 3h. po infekcii. Len málo VP1 kolokalizuje si signálmi BiP proteínu. Vyššiu mieru kolokalizácie týchto dvoch markrov môžeme opäť vidieť u pseudokapsíd (Obr. 5.23). V čase 12h. po infekcii bolo v jadrách niektorých buniek už možno detekovať novo vznikajúci VP1 (Obr. 5.24 C, D), zatiaľ čo v časti bunkovej populácie VP1 detekovaný ešte nebol. V cytoplazme oboch typov buniek bolo (v súlade s predchádzajúcimi pozorovaniami, MANNOVÁ a FORSTOVÁ, 2003) možno vidieť veľké množstvo VP1 signálov z pôvodných viriónov použitých k infekcii. Prekvapivým zistením bolo, že u mnohých buniek zhluky signálu VP1 kolokalizovali s caveolinovými váčkami, ktorými boli zrejme nesené späť k bunkovej membráne (Obr. 5.24 C, D). Okrem drobných caveolinových váčkov kolokalizujúcich s VP1 a vyskytujúcich sa rozprestrené v cytoplazme sú vidieť aj veľké caveolinové váčky so signálom VP1 v perinukleárnom priestore, podobne ako u buniek 3h. po infekcii. V niektorých

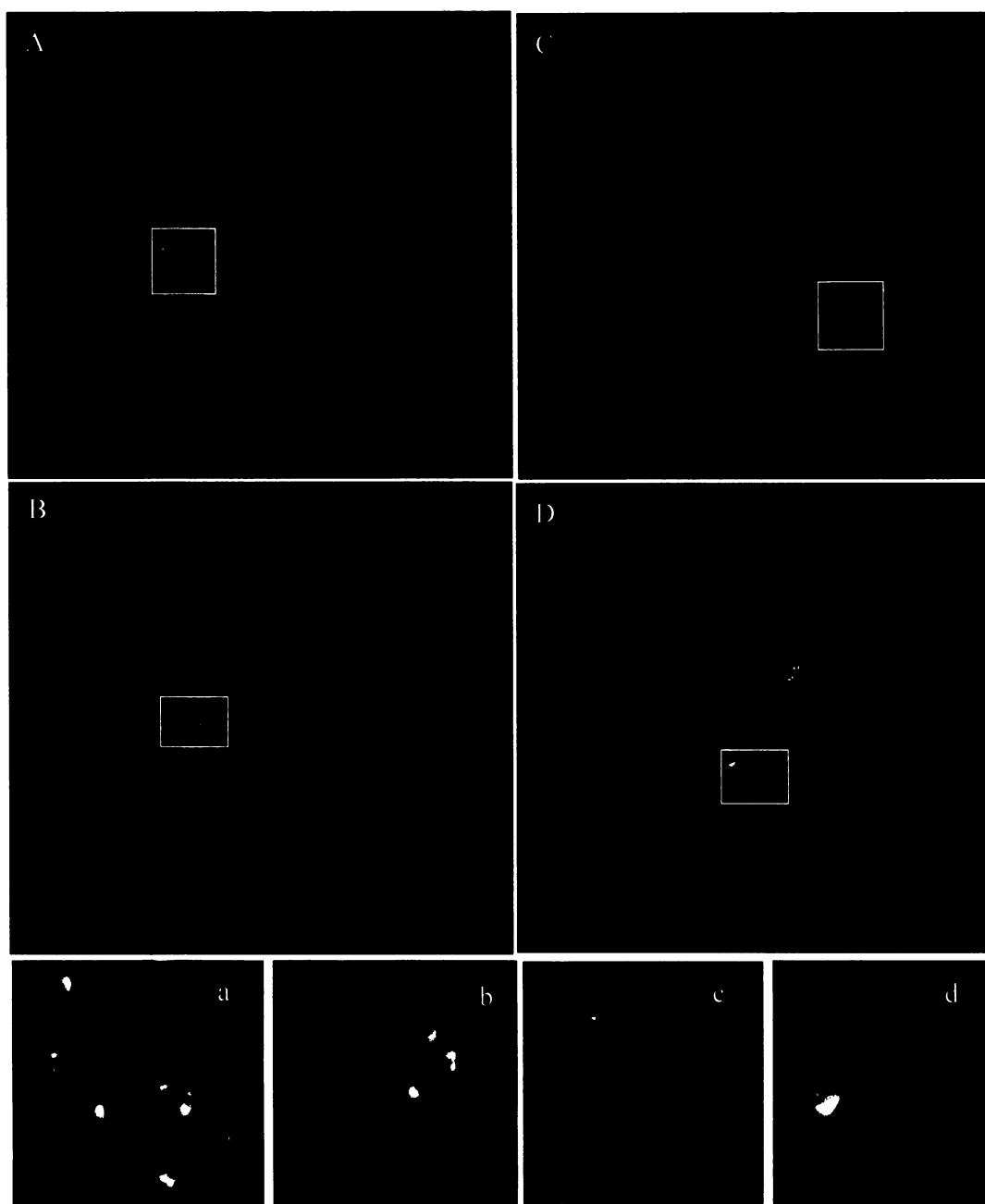
bunkách naopak zhluky VP1 s caveolinovými váčkami väčšinou nekolokalizovali (Obr.5.24.A,B). Obr.5.25 ukazujú, že aj VP1 VP1/3 pseudokapsíd 12h. po infekcii kolokalizuje do určitej miery s caveolinom. Zaujímalo nás ďalej, či nebude možné vedľa VP1 signálu v časoch 3h. a 12 h. po infekcii detekovať signál minoritných proteínov. Preto sme infikované bunky označili protilátkami proti proteínu VP1 červenou a proti minoritným proteínom zelenou. Obr.5.26 A, B ukazuje rezy dvoma bunkami, ktoré boli infikované 3 h. po infekcii. V súlade s Obr.5.19 je vidieť iba červené značenie, čo znamená, že epitop pre VP2/3 bol v tomto čase ešte stále nedostupný aj keď pravdepodobne k určitým zmenám v konformácii viriónov už došlo. Naproti tomu, 12h. po infekcii (Obr.5.26 C, D, E, F) bolo možné detekovať rozvolnenie viriónov tj. signály jako hlavného tak minoritných proteínov rovnakých lokalitách, čo sa prejavilo ich žltým zafarbením. Na obr 5.26. C-F je znovu vidieť červene zafarbené jadro- signál novo syntetizovaného VP1.



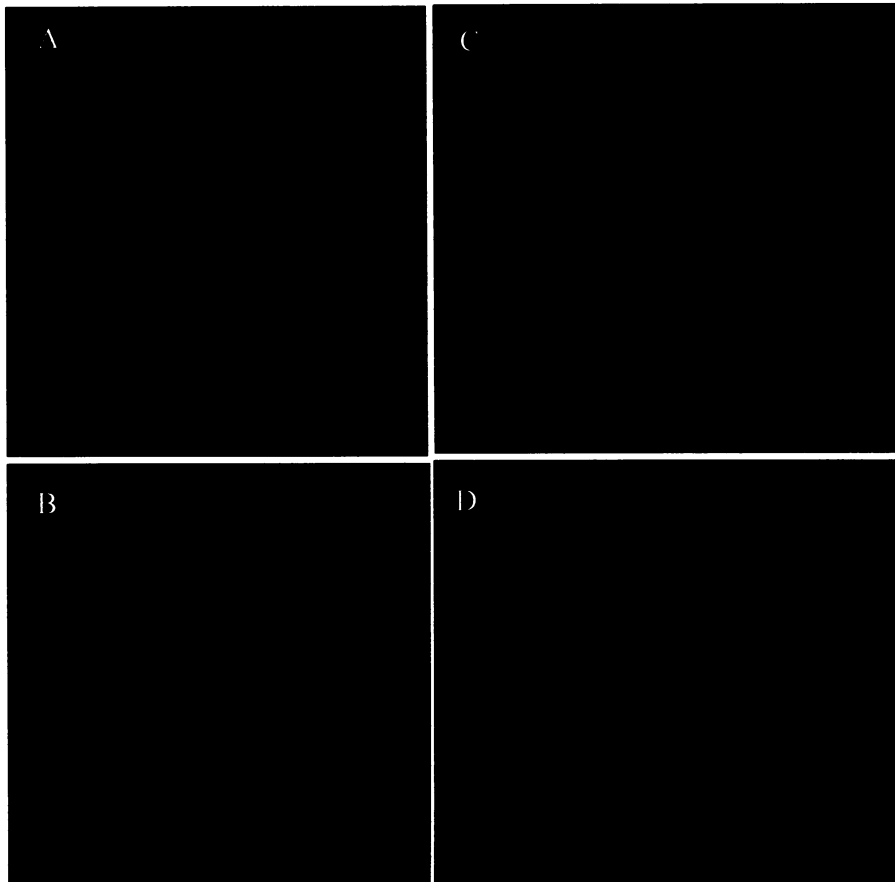
Obr. 5.16: Lokalizácia caveolinu a vírusu v bunkách. Caveolin (červená) a VP1 myšieho polyomavírusu (zelená) detekované 20 min.p.i. Snímky rezov dvoch buniek A, B. Detaily buniek-a1, a2, b sú označené bielym výrezom na obrázkoch A,B. Protilátky: zmes myšej monoklonálnej protilátky proti VP1a králičej monoklonálnej protilátky proti caveolinu; sekundárna protilátka Alexa Fluor 488 oslia proti myším IgG (zelená) a Alexa Fluor 594 kozia proti králičím IgG (červená). Značenie jadier DAPI (modrá).



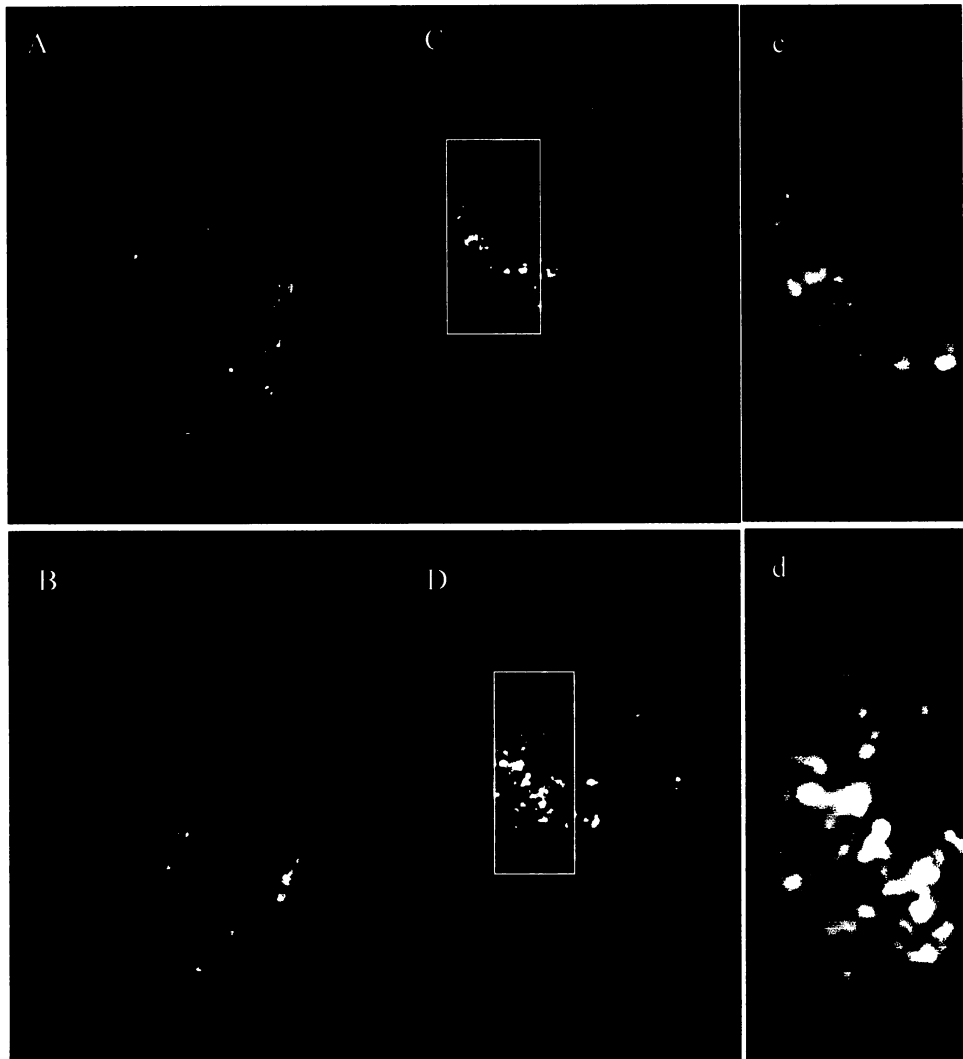
Obr. 5.17: Lokalizácia caveolinu a vírusu v bunkách. Caveolin (červená) a VP1 myšieho polyomavírusu (zelená) detekované 20min.p.i.. Snímky rezov dvoch buniek A, B. Detaily buniek-a1,a2, b sú označené bielym výrezom na obrázkoch A, B. Protilátky: zmes myšia monoklonálna protilátky proti VP1 a králičej monoklonálnej protilátky proti caveolinu; sekundárna protilátka Alexa Fluor 488 oslia proti myšim IgG (zelená) a Alexa Fluor 594 kozia proti králičím IgG (červená). Značenie jadier DAPI (modrá).



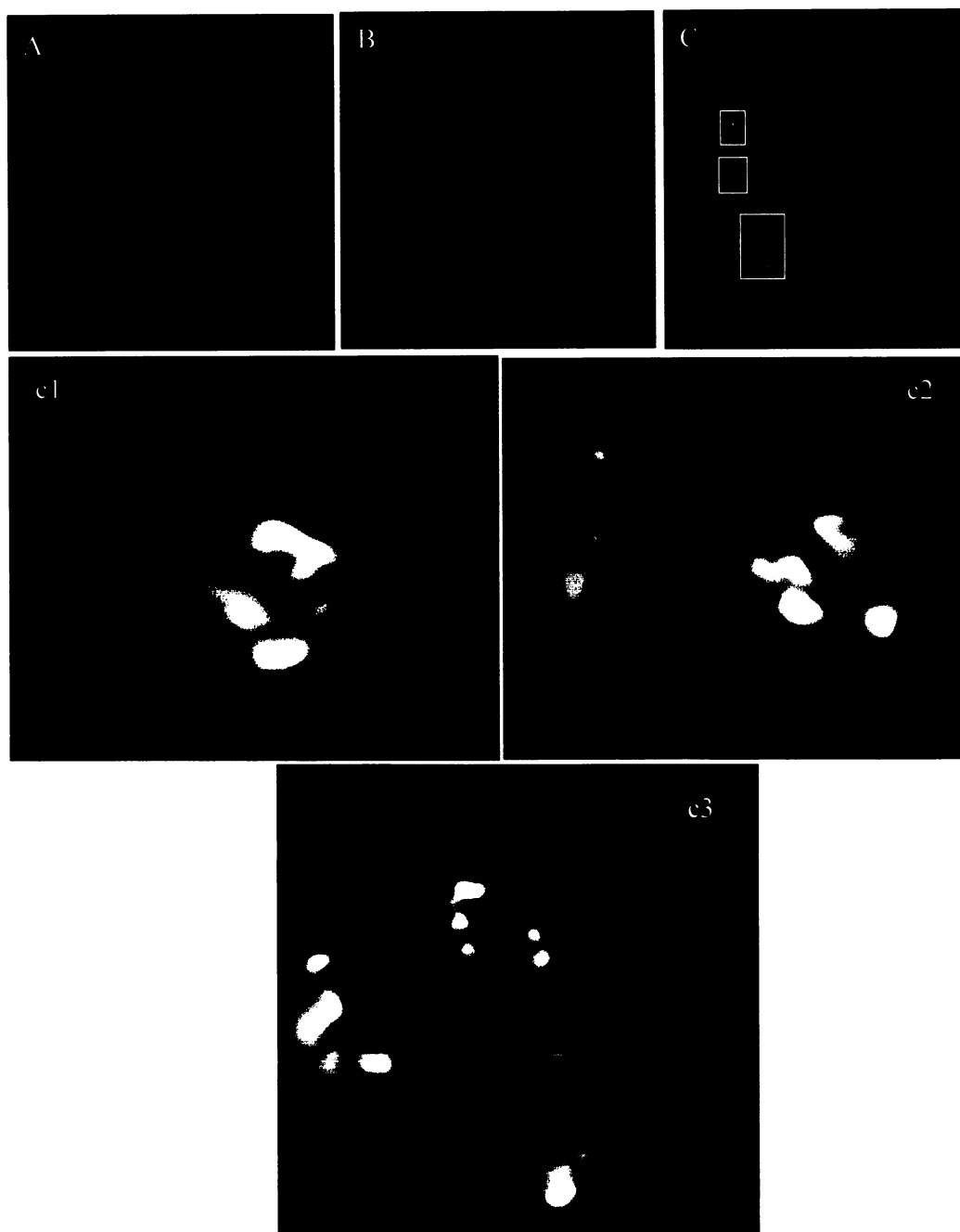
Obr. 5.18: Lokalizácia caveolinu a vírusu v bunkách. Caveolin (červená) a VP1 myšieho polyomavírusu (zelená) detekované 3h.p.i.. Snímky rezov rovnakých buniek v stĺpci A, B a C, D. Detaily buniek-a, b, c, d sú označené bielym výrezom na obrázkoch A, B, C, D. Protilátky: zmes myšej monoklonálnej protilátky proti VP1 a králičej monoklonálnej protilátky proti caveolinu; sekundárna protilátka Alexa Fluor 488 oslia proti myším IgG (zelená) a Alexa Fluor 594 kozia proti králičím IgG (červená). Značenie jadier DAPI (modrá).



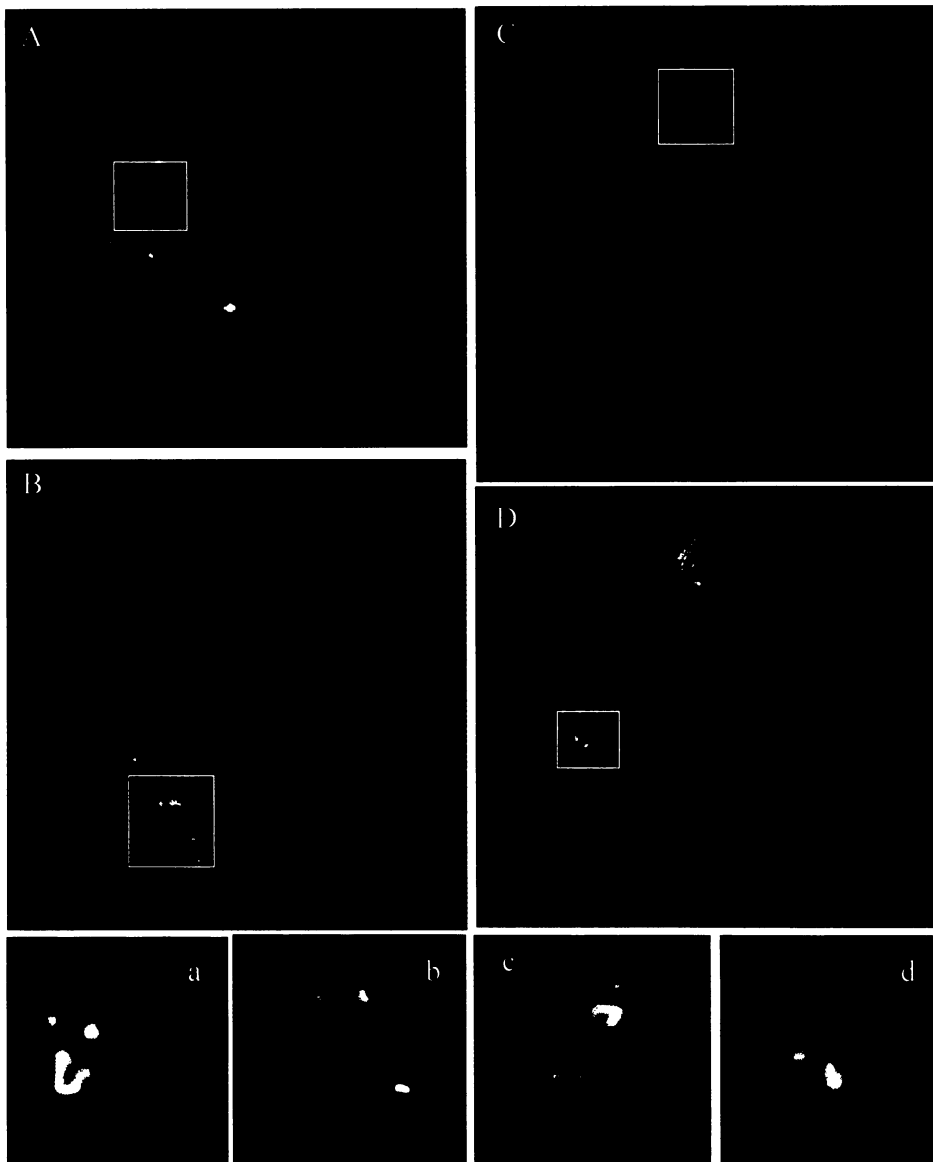
Obr. 5.19: Lokalizácia caveolinu a vírusu v bunkách. Caveolin (červená) a VP3 myšieho polyomavírusu (zelená) detekované 3h.p.i.. Snímky rezov rovnakých buniek v stĺpci A, B a C, D. Protilátky: zmes myšej monoklonálnej protilátky proti VP2/3 a králičej monoklonálnej protilátky proti caveolinu; sekundárna protilátka Alexa Fluor 488 oslia proti myším IgG (zelená) a Alexa Fluor 594 kozia proti králičím IgG(červená). Značenie jadier DAPI (modrá).



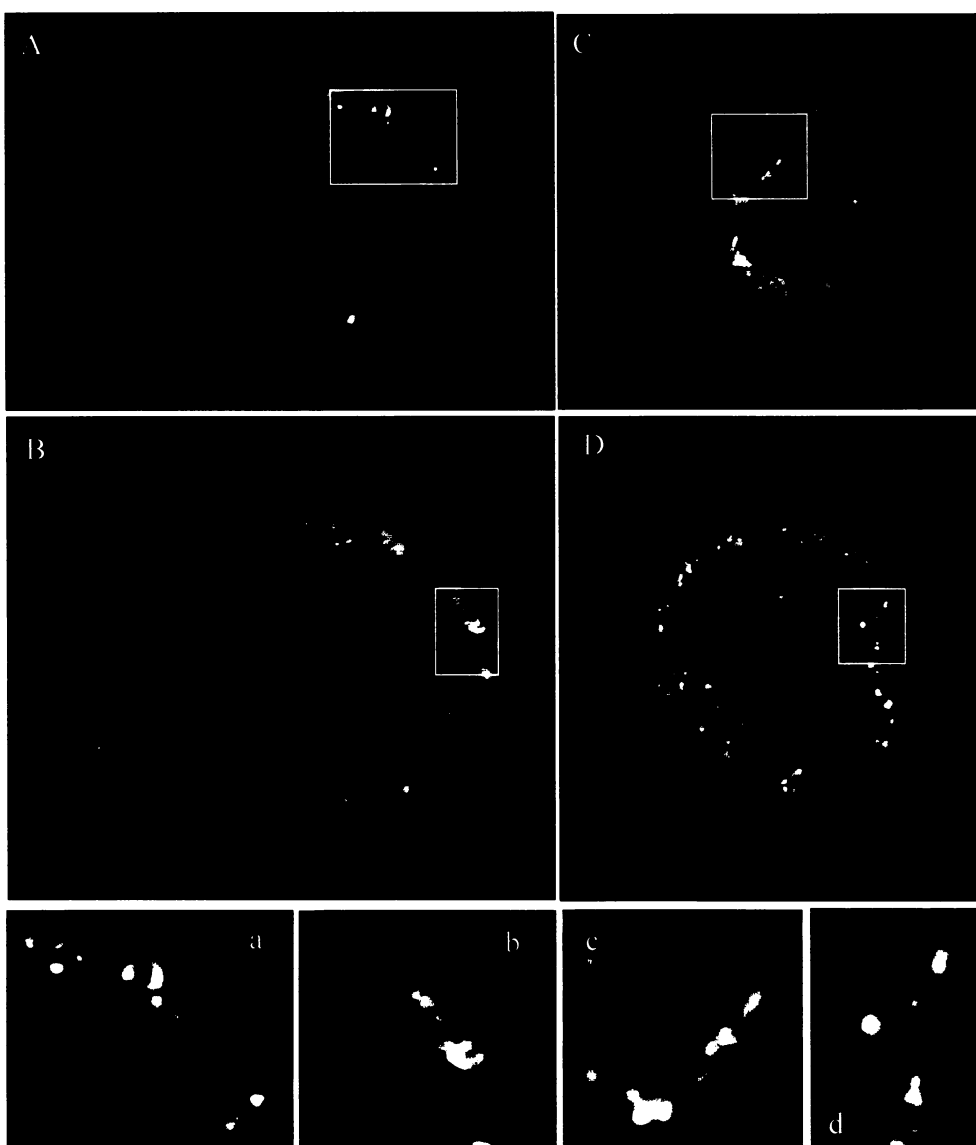
Obr. 5.20: Lokalizácia caveolinu a pseudokapsíd VP1/3 v bunkách. Caveolin (červená) a VP1 pseudokapsíd myšieho polyomavírusu (zelená) detekované 3h.p.i.. Snímky rezov rovnakých buniek v stĺpci A, B a C, D. Detaily buniek- c, d sú označené bielym výrezom na obrázkoch C, D. Protilátky: zmes myšej monoklonálnej protilátky proti VP1a králičej monoklonálnej protilátky proti caveolinu; sekundárna protilátka Alexa Fluor 488 oslia proti myším IgG (zelená) a Alexa Fluor 594 kozia proti králičím IgG (červená). Značenie jadier DAPI (modrá).



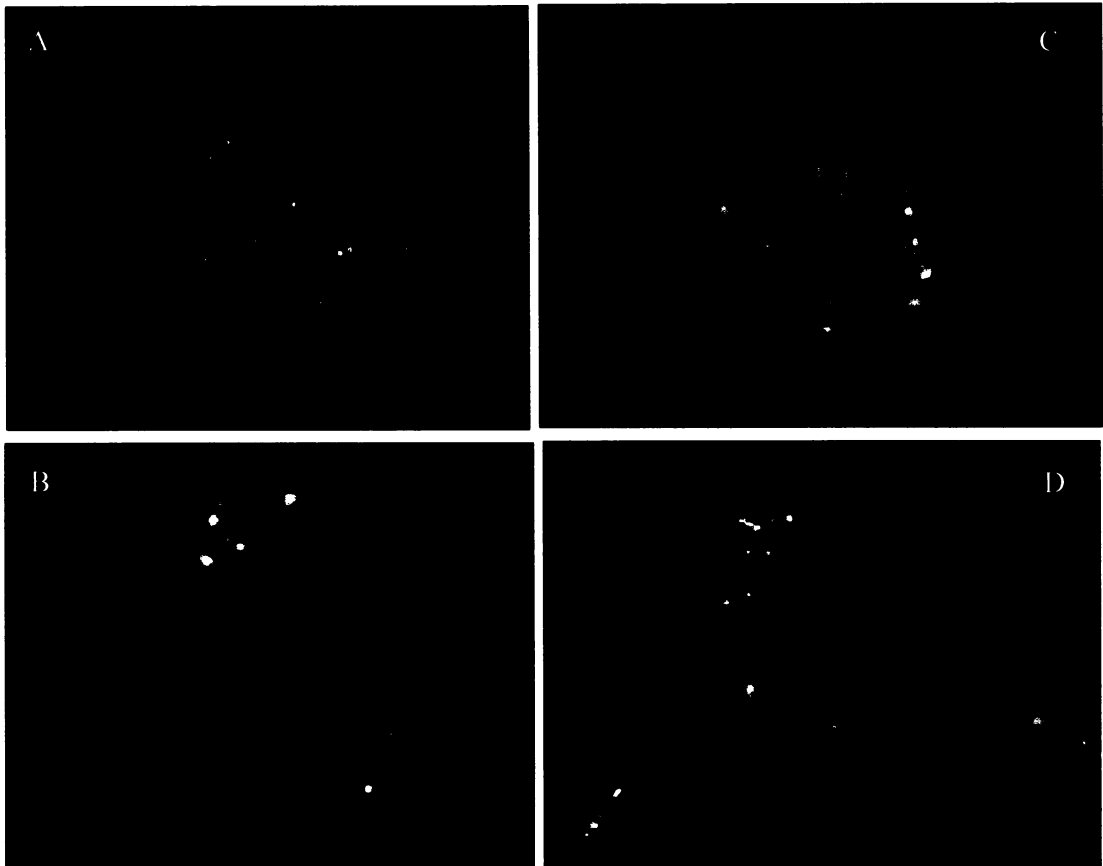
Obr. 5.21: Kolokalizácia caveolinu a pseudokapsíd VP1/3 v bunkách. Caveolin (červená) a VP1 pseudokapsíd myšieho polyomavírusu (zelená) detekované 3h.p.i. A- lokalizácia caveolinu, B- lokalizácia VP1 pseudokapsíd VP1/3, C- prekryv obrázkov A a B. Detaily bunky- c1,c2,c3 sú ozančené bielym výrezom na obrázku C. Protilátky: zmes myšej monoklonálnej protilátky proti VP1a králičej monoklonálnej protilátky proti caveolinu; sekundárna protilátka Alexa Fluor 488 oslia proti myším IgG (zelená) a Alexa Fluor 594 kozia proti králičím IgG (červená). Značenie jadier DAPI (modrá).



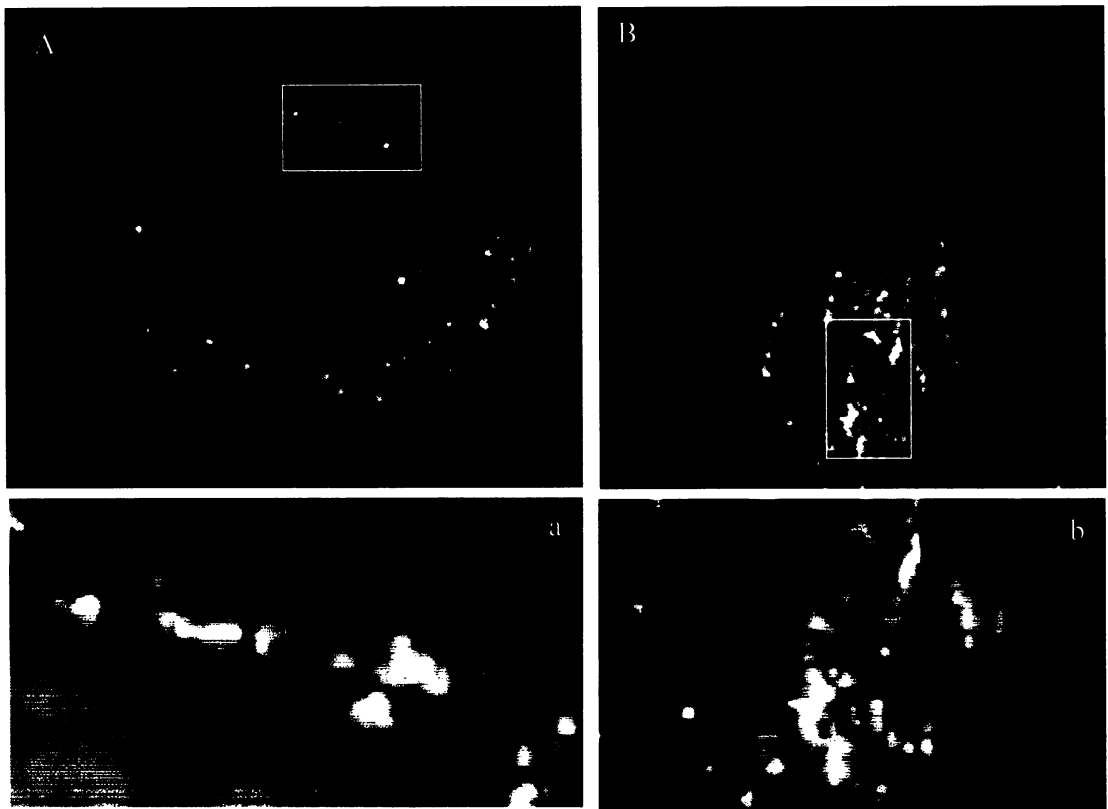
Obr. 5.22: Lokalizácia BiP proteínu (proteín endoplazmatického retikula) a vírusu v bunkách. BiP (červená) a VP1 myšieho polyomavírusu (zelená) detekované 3h.p.i.. Snímky rezov rovnakých buniek v stĺpci A, B a C, D. Detaily buniek-a, b, c, d sú ozančené bielym výrezom na obrázkoch A, B, C, D. Protilátky: zmes myšej monoklonálnej protilátky proti VP1 a potkanej monoklonálnej protilátky proti BiP proteínu; sekundárna protilátka Alexa Fluor 488 oslia proti myším IgG(zelená) a Alexa Fluor 594 oslia proti potkaním IgG (červená). Značenie jadier DAPI (modrá).



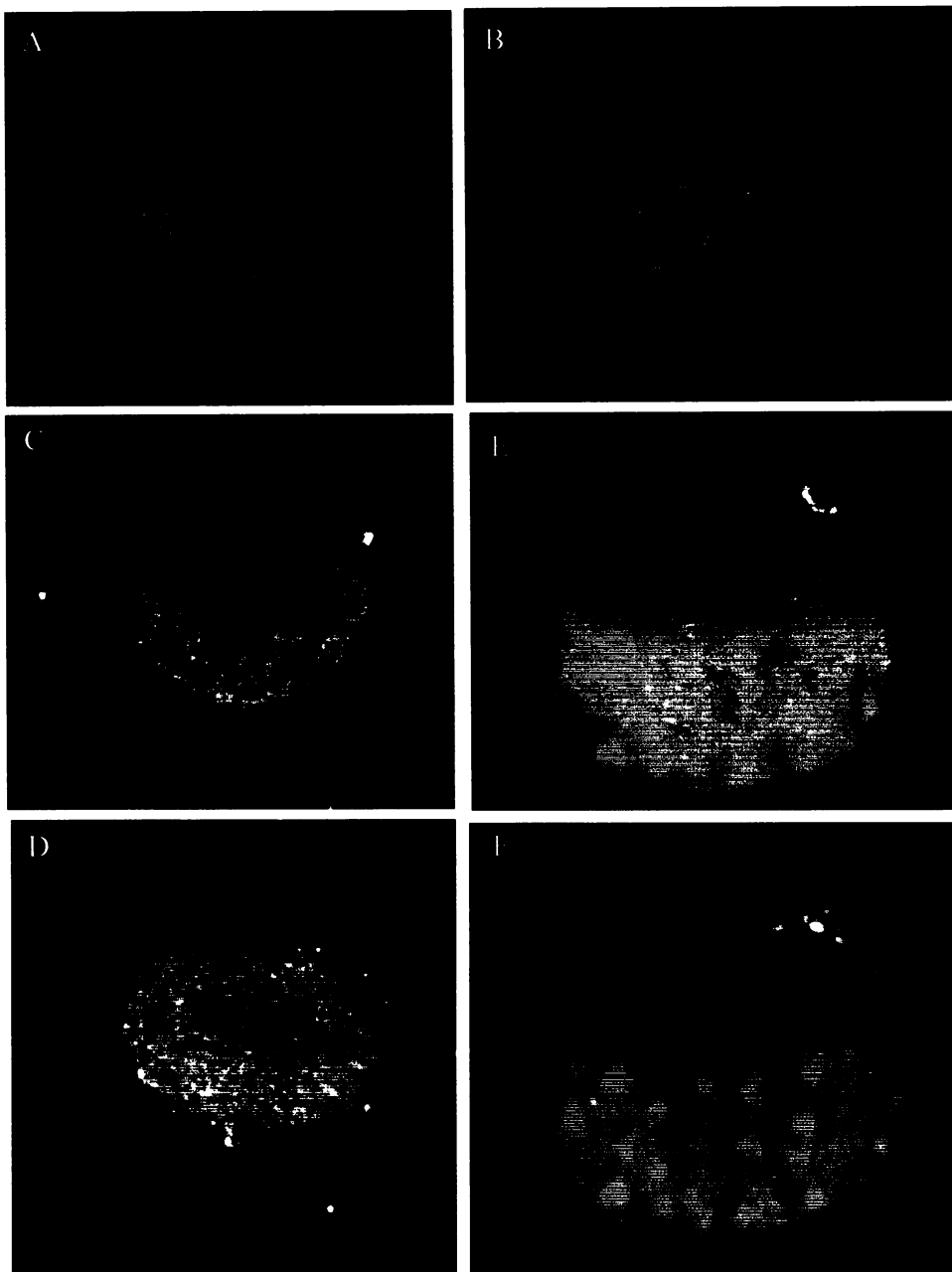
Obr. 5.23: Lokalizácia BiP proteínu (proteín endoplazmatického retikula) a pseudokapsíd VP1/3 v bunkách. BiP (červená) a VP1 pseudokapsíd myšieho polyomavírusu (zelená) detekované 3h.p.i. Snímky rezov rovnakých buniek v stĺpci A, B a C, D. Detaily buniek-a, b, c, d sú označené bielym výrezom na obrázkoch A, B, C, D. Protilátky: zmes myšej monoklonálnej protilátky proti VP1a potkanej monoklonálnej protilátky proti BiP proteínu; sekundárna protilátka Alexa Fluor 488 oslia proti myším IgG(zelená) a Alexa Fluor 594 oslia proti potkaním IgG (červená). Značenie jadier DAPI (modrá).



Obr. 5.24: Lokalizácia caveolinu a vírusu v bunkách. Caveolin (červená) a VP1 myšieho polyomavírusu (zelená) detekované 12h.p.i. Snímky rezov rovnakých buniek v stĺpci A, B a C, D. Protilátky: zmes myšej monoklonálnej protilátky proti VP1 a králičej monoklonálnej protilátky proti caveolinu; sekundárna protilátka Alexa Fluor 488 oslia proti myším IgG (zelená) a Alexa Fluor 594 kozia proti králičím IgG (červená). Značenie jadier DAPI (modrá).



Obr. 5.25: Lokalizácia caveolinu a pseudokapsíd VP1/3 v bunkách. Caveolin (červená) a VP3 pseudokapsíd myšieho polyomavírusu (zelená) detekované 12h.p.i.. Snímky rezov rovnakých buniek v stĺpci A, B. Detaily buniek-a,b sú označené bielym výrezom na obrázkoch A, B. Protilátky: zmes monoklonálne protilátky proti VP2/3 a králičej monoklonálnej protilátky proti caveolinu; sekundárna protilátka Alexa Fluor 488 oslia proti myším IgG (zelená) a Alexa Fluor 594 kozia proti králičím IgG (červená). Značenie jadier DAPI (modrá).

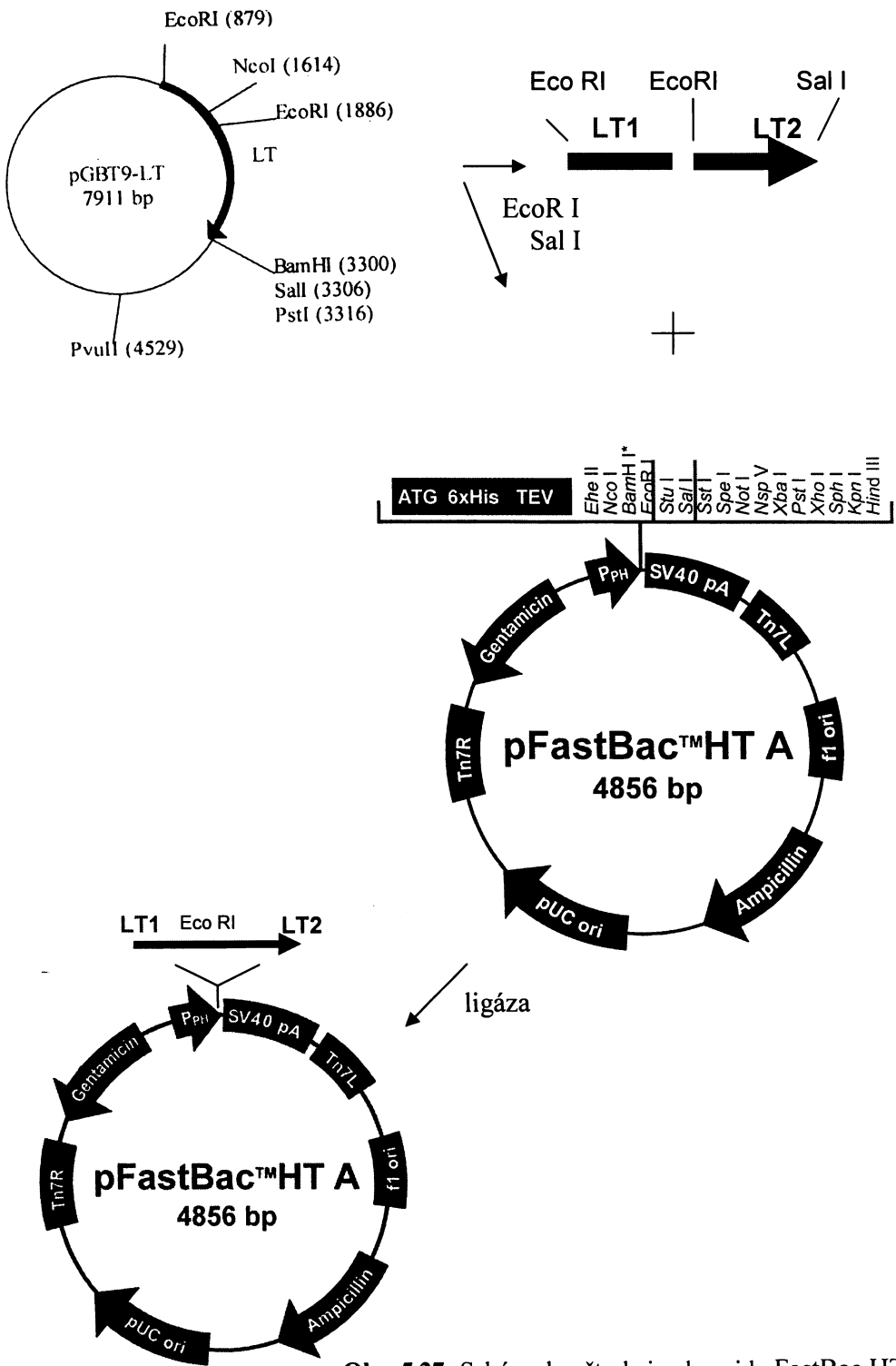


Obr. 5.26: Lokalizácia vírusu v bunke. VP1 (červeným),VP3 myšieho polyomavírusu detekované 3h.p.i a 12h.p.i.. Obrázkom **A a B** zodpovedajú rezy dvoma rôznymi bunkami, detekcia proteínov **3h.p.i.** Snímky rezov rovnakých buniek v stĺpci C, D a E,F. Obrázky **C,D,E,F**-detekcia proteínov po **12h.p.i.** Protilátky: zmes myšej monoklonálnej protilátky proti VP2/3 a králičia polyklonálna proti VP1; sekundárna protilátka Alexa Fluor 488 oslia proti myším IgG(zelená) a Alexa Fluor 594 kozia proti králičím IgG (červená). Značenie jadier DAPI (modrá).

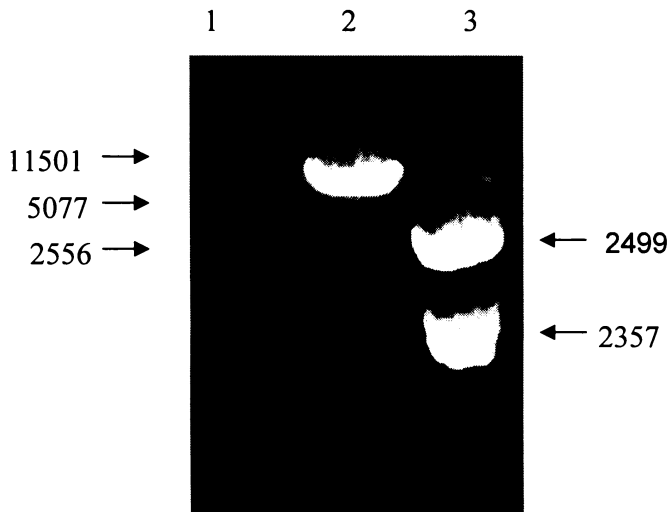
5.5 Konštrukcia plazmidu FastBac HT A- LT

Pre účely štúdia ďalších fází polyomavírusovej infekcie, hlavne pre štúdium premien v štruktúre bunkového jadra v priebehu polymavírusovej infekcie a pre štúdium mechanizmov morfogénézy viriónov sme sa rozhodli pripraviť ďalšie polyklonálne aj monoklonálne protilátky proti LT antigénu. Za účelom získania antigénu LT pre imunizáciu bola navrhnutá konštrukcia rekombinantného bakulovírusu z ktorého by bol LT syntetizovaný spolu s histidínovou kotvou, ktorá by umožnila jeho jednoduchšiu purifikáciu. Pre tieto účely bolo nutné najskôr vložiť do transferového bakulovírusového vektoru gén pre LT. Bol vybraný transferový vektor FastBac HT A s histidínovou kotvou za polyhedrínovým promotorom. Návrh konštrukcie je schématicky znázornený na obr.5.27. Ako zdroj génu pre LT bol použitý plazmid GBT9-LT pripravený v našom laboratóriu. Izolovaný plazmid FastBac HT A bol restričkne overený (kapitola 4.3.4.6) pomocou restričknej endonukleázy BsaI (Obr. 5.28). Z plazmidu GBT9-LT bola vyštiepená pomocou restričkých endonukleáz Eco RI a Sall sekvencia zodpovedajúca LT génu. Na géne pre LT sú 2 restričné miesta, takže po štiepení vznikajú 2 fragmenty génu pre LT. Prvý fragment mal veľkosť 1005 bp, druhý fragment mal veľkosť 1353 bp (Obr.5.29). Získané fragmenty boli prečistené pomocou „NucleoSpin Extrakt II“ (Macherey-Nagel) (kapitola 4.3.4.5) (Obr.5.30). Plazmid FastBacHT A bol naštiepený restričkými endonukleázami Eco RI a Sall a následne bol defosforylovaný. Týmto bol linearizovaný a defosforylovaný plazmid FastBac HT A pripravený pre klonovanie fragmentov LT. Bola pripravená ligačná zmes obsahujúca linearizovaný a defosforylovaný plazmid FastBac HT A s dvojnásobným množstvom fragmentov LT1 a LT2. Zároveň bola pripravená kontrolná ligačná zmes s vynechaním oboch LT fragmentov. Ligácia porebiehala pri laboratórnej teplote cez noc (kapitola 4.3.4.8). 2 μ l každej ligačnej zmesi bolo vpravených elektroporáciou (kapitola 4.3.3.3) do baktérií kmeňa DH5 α . Baktérie boli vysiate na pevné médium s ampicilínom (50mg/ml) a inkubované 12-16h. pri 37°C. Z kontrolnej ligačnej zmesi vyrástli na pevnom médiu 2-5 kolónií, z ligačnej zmesi obsahujúcej LT

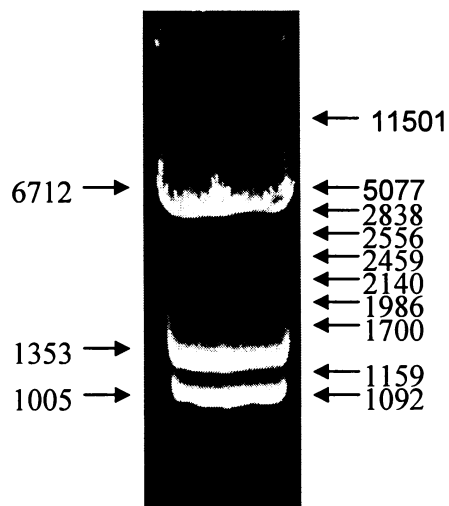
fragmenty 30-50 kolónií. Z vybraných kolónií bola metódou miniizolácie (kapitola 4.3.4.4.) získaná DNA plazmidov a následne bola restriktívne overená prítomnosť vložených fragmentov. Takto bolo otestovaných približne 200 kolónií. Ako je zreteľné z obr.5.31 v niektorých izoláciách nebolo vyizolované dostatočné množstvo DNA, preto nebolo možné určiť prítomnosť inzertu a v prípadoch dostatočného množstva DNA neboli nájdené inzerty. Práca na tomto projekte stále pokračuje.



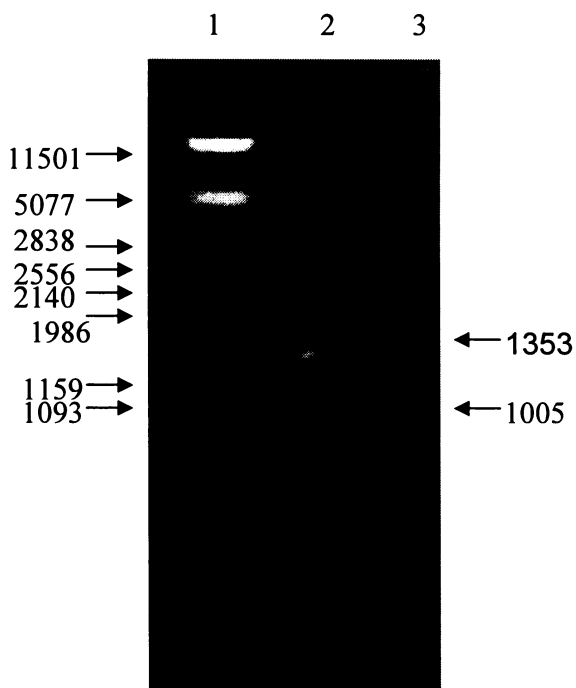
Obr. 5.27: Schéma konštrukcie plazmidu FastBac HT A-LT



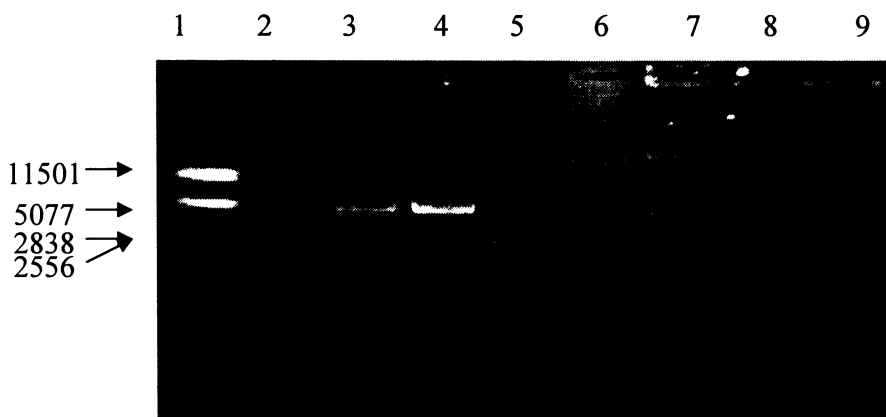
Obr. 5.28: Elektroforéza fragmentácie plazmidu FastBac HT A pomocou restriktívnej endonukleázy BsaI. Bol použitý 1% agarózový gel, nanesených 4µl vzorky. Gel bol farbený pridaním roztoku EtBr. 1- DNAλ/PstI marker, 2- linearizovaný a defosforylovaný plazmid Fast Bac HT A pomocou restriktívnych endonukleáz Sal I a EcoRI, 3- fragmentácia FastBac HT A pomocou restriktívnej endonukleázy Bsa I



Obr. 5.29: Elektroforéza fragmentácia plazmidu GBT9-LT restriktívnymi endonukleázami SalI a Eco RI. Bol použitý 1% agarózový gel, nanesených 5µl vzorky. Gel bol farbený pridaním roztoku EtBr.



Obr. 5.30: Elektroforéza fragmentov LT po prečistení pomocou „NucleoSpin Extrakt II“ (Macherey-Nagel). Bol použitý 1% agarózový gel. Gel bol farbený pridaním roztoku EtBr. 1- λ DNA/PstI marker- nanosených 5 μ l, 2- LT2 fragment- nanosené 2 μ l, 3-LT1 fragment- nanosené 2 μ l



Obr. 5.31: Elektroforéza DNA izolovaných z monokolónií kmeňa DH5 α , naštiepená restriktčnými endnukleázami SalI a Eco RI. Bol použitý 1% agarózový gel, nanosených 5 μ l vzorky. Gel bol farbený pridaním roztoku EtBr. 1- λ DNA/PstI marker- nanosených 5 μ l, 2-9 izolovaná DNA z monokolónií kmeňa DH5 α , naštiepená restriktčnými endnukleázami SalI a Eco RI - nanosených 10 μ l.

6. DISKUSIA

Prvá časť diplomovej práce bola zameraná na izolácie viriónov a troch druhov pseudokapsíd a ich následné použitie v inhibičných pokusoch. Druhá časť popisuje pozorovania pomocou konfokálnej mikroskopie.

Izolácia vírusu

Pri izolácii vírusu sme postupovali podľa postupu TÜRLER a BEARD (1985). Z výsledkov vyplýva, že pri izolácii v CsCl gradiente sme vo frakcii zodpovedajúcej svojej špecifickej hustotou plným viriónom získali virióny u ktorých sa líšil infekčný titer (t.j počet infekčných častíc) od počtu odhadnutých častíc z hemaglutinačného testu o jeden rád. Existuje niekoľko možných príčin, ktoré môžu vysvetliť tento výsledok. Ako ukazuje obr.5.1 imunodetekcia VP1 proteínu v jednotlivých CsCl frakciách, kde bolo nanášaných 0,5 μ l každej frakcie, gradient bol predimenzovaný a napriek tomu, že elektrónová mikroskopia ukázala dobré oddelenie prázdnych kapsíd od plných, predsa len nedošlo k úplnému oddeleniu oboch štruktúr. Ďalšou z možností je vznik defektných častíc. Pokiaľ dôjde k nejakej delecii v kódujúcej oblasti genómu a zároveň v repetícii v regulačnej oblasti, vrátane replikačného počiatku genómu myšieho polyomavírusu, takéto genómy majú replikačnú výhodu pred nemutovanou formou a enkapsidujú sa do neinfekčných častíc, ktoré nie je možné oddeliť v hustotných gradientoch. Ďalším možným vysvetlením je charakter a stav používaných buniek. Účinná replikácia a transkripcia vírusu závisí okrem iného aj od prítomnosti bunkových transkripčných faktorov, ktoré sa zúčatňujú týchto dejov väzbou na enhancer regulačnej oblasti. Nie u každej bunky môže byť zloženie a koncentrácia transkripčných faktorov vyhovujúca pre účinnú replikáciu. Zmeny môžu nastať aj pri morfogenéze viriónov. Málo účinný proces morfogenézy môže mať za následok vysoký pomer prázdnych kapsíd a pseudoviriónov tj. vírusu, ktorý enkapsidoval fragmenty bunkovej DNA, príp.aj s bunkovými histónmi. Pseudovirióny majú podobnú vznášateľnú hustotu ako infekčné virióny, takže ich rovnako nie je možné oddeliť pomocou hustotných gradientov využívaných pri izolácii. Nie je možné zanedbať ani vplyv snahy bunky, odviezť vírus na neproduktívnu dráhu, vedúcu k jeho degradácii,

rozvoľnený v iných kompartmentoch ako v bunkovom jadre a možno aj vylúčenie z bunky. Aj napriek nižšiemu infekčnému titru (Tab.5.2) sme získali dostatok intaktných viriónov k ďalším pokusom.

Izolácia VP1, VP1/2 a VP1/3 pseudokapsíd z lyzátov hmyzích buniek a inhibičné testy

Myší polyomavírus sa viaže na bunkový povrch cez sialovú kyselinu receptoru rozpoznávanú VP1 proteínom (kapitola 2.7.1.1). V každom prípade, ale analýza mutovaných vírusov s chýbajúcim jedným alebo druhým minoritným proteínom ukázala, že minoritné proteíny hrajú pravdepodobne úlohu vo veľmi skorých fázach infekcie. Preto sme chceli zistiť, či pseudokapsidy obsahujúce jeden alebo druhý minoritný proteín budú pôsobiť ako silnejšie kompetičné inhibítory polyomavírusovej infekcie.

Pre produkciu pseudokapsíd v hmyzích bunkách boli použité rekombinantné bakulovírusy VL-VP1, AcVP1/2, AcVP1/3. Tieto bakulovírusy mali pod silným neskorým promotormom buď jeden gén pre hlavný štruktúrny proteín VP1 alebo pod dvoma silnými promotormi vždy jeden gén pre VP1 a gén pre jeden z minoritných proteínov. Zo skorších prác (FORSTOVÁ *et al.*, 1993) vyplýva, že VP1 pentamér a vždy jedna molekula jedného z minoritných proteínov sa skladajú už v cytoplazme do komplexov a pseudokapsidy sa tvoria po transporte týchto komplexov do jadra buniek. Pri dostatočne silnej expresii minoritných proteínov potom môžu obsahovať každá až 72 molekúl minoritného proteínu. Pseudokapsidy VP1, VP1/2, VP1/3 som izolovala postupom popísaným v kapitole 4.3.5.2. Po centrifugácii v CsCl gradiente som získané frakcie nanášala na nitrocelulóзовú membránu a metódou dot blot som detekovala prítomnosť VP1 proteínu. Predpokladala som nielen pozitívnu detekciu tohoto proteínu, ale aj rozdiely v intenzite signálu VP1 proteínu v jednotlivých frakciách. Podľa týchto rozdielov a z hodnôt refraktometrického indexu pre jednotlivé frakcie by bolo možné presnejšie určiť frakcie bohaté na pseudokapsidy. Ako je vidieť z obr.5.4, 5.5, 5.6 žiadne výraznejšie rozdiely v intenzite VP1 signálu neboli detekované, jednak pravdepodobne kôli príliš veľkému množstvu VP1 v kvete, ale taktiež

vzhľadom k heterogenite vzniknutých štruktúr (pseudokapsidy prázdne, pseudokapsidy s enkapsidovanými väčšími či menšími fragmentami DNA, alebo dokonca aj pseudokapsidy, ktoré obsahujú pseudonukleocore zložené z DNA a histónov hmyzích buniek). Preto som spojila jednotlivé frakcie na základe refraktometrických indexov. Elektrónová mikroskopia ukázala pomerne homogénnu preparáciu pseudokapsíd VP1 a VP1/3 vo frakciách zodpovedajúcich refraktometrickým indexom hustote prázdnych kapsíd. U pseudokapsíd VP1/3 bola v tejto frakcii pomocou Western blotu dokazaná prítomnosť proteínu VP3. V oboch preparáciách je na obr.5.10 a 5.14 vidieť okrem prevahy pravidelných kapsidových štruktúr aj filamentné štruktúry VP1 proteínu. Pseudokapsidy VP1/2 sa nepodarilo izolovať. Western blot preukázal prítomnosť oboch polyomavírusových génových produktov VP1 a VP2 v lyzátoch hmyzích buniek aj v CsCl frakciách. Izoláciu tohoto druhu kapsíd sme opakovali niekoľkokrát s rôznymi zmenami napr. v dobe infekcie pričom sme sa snažili získať intaktné kapsidy. Bohužiaľ ani jedna izolácia nepriniesla výrazné zlepšenie. Vysvetlení tohoto neúspechu môže byť niekoľko. Jednou z možností je, že pokiaľ každá kapsoméra (VP1 pentamér) niesla jeden proteín VP2 mohlo dôjsť pri zostavovaní pseudokapsíd k sterickým problémom. U viriónov je v jednej častici v 72 centrálnych dutinách celkom 72 molekúl minoritných proteínov, ale zhruba polovica je zastúpená v kratšej forme t.j ako VP3. Iní autori, ale publikovali vznik pseudokapsíd zložených z VP1 a VP2 proteínu (An *et al.*, 1991; Richterová, Diplomová práca 1996). Z ich prác však nie je jasné koľko molekúl VP2 ich kapsidy obsahovali. Je možné, že pri vysokej koncentrácii VP2 vzhľadom k VP1, vznikajú pokiaľ vôbec, nestabilné pseudokapsidy. U každej izolácie boli obidva proteíny detkované Western blotom, ale aj napriek tomu mohlo dôjsť v bakulovíruse k mutácii v géne pre VP1 proteín v mieste, ktoré je zodpovedné za vytváranie pseudokapsidových štruktúr t.j. na jeho C-konci. V súčasnej dobe sa preto izoláty rekombinantných bakulovírusov nesúcich gény pre VP1 a VP2 analyzujú

Pokus inhibičných testov, tak ako mal byť urobený v tejto práci bol už urobený v inom laboratóriu. An a spolupracovníci (An *et al.*, 1999) publikovali, že

pseudokapsidy zložené len z VP1 proteínu alebo z VP1 a VP3 sú zlými kompetitívnymi inhibítormi polyomavírusovej infekcie (v 10 násobnom prebytku pseudokapsíd bola inibícia 11% a 14%) zatiaľ čo pseudokapsidy zložené z VP1 a VP2 infekciu inhibovali výrazne viac (v 10 násobnom prebytku pseudokapsíd bola inibícia cca 49%). Skupina M. Pawlity (M. Pawlita ústne podanie) naopak nenašla inhibíciu infekcie všetkými typmi pseudokapsíd. Vzhľadom k týmto rozorupným výsledkom a tiež vzhľadom k tomu, že hľadáme funkciu minoritných proteínov v skoršej fázy infekcie, sme považovali za nutné tento pokus zopakovať. Bohužiaľ, vzhľadom k neúspešnej izolácii VP1/2 pseudokapsíd sme nemohli zistiť či prítomnosť VP2 v pseudokapsidách zosiluje inhibíciu polyomavírusovej infekcie. Naviac, naše pokusy s ostatnými dvoma typmi vírusových pseudokapsíd priniesli ďalší rozdielny výsledok od oboch uvedených (pomerne vysoká miera inhibície 38% pre VP1 a 43% pre VP1/3 pseudokapsidy). Budeme teda musieť pokusy znovu zopakovať.

Vzťah caveolinových váčkov k pohybu myšieho polyomavírusu a pseudokapsíd bunkou

Ako bolo podrobnejšie uvedené v kapitole 2.7.1 rôzne polyomavírusy napriek tomu, že využívajú ako receptory gangliozidy GM1(SV40), alebo GD1 a GT1b (ľudský polyomavírus BK a myšie polyomavírus) a GT1b (aspoň v niektorých bunkách JC vírus), boli publikované rozdielne spôsoby ich vstupu do buniek. JC vírus vstupuje do buniek endocytózou sprostredkovanou clathrinovými váčkami, pre druhý ľudský polyomavírus bolo publikované, že vstupuje do buniek cez caveoly. Internalizácia vírusu do hladkých monopinocytických váčkov odvodených od caveol bola po prvýkrát popísaná u vírusu SV40. Pre vírus SV40 je všeobecne uznávanou skutočnosťou, že vírus vstupujúci do buniek cez caveoly pokračuje do tzv. caveosomov – veľkých váčkov bohatých na caveolin. Z caveosomov je podľa autorov (PELKMANS *et al.*,2002) vírus transportovaný do endoplazmatického retikula s využitím tubulínového cytoskeletu vo váčkoch, ktoré caveolin už neobsahujú. Predpokladá sa že, v endoplazmatickom retikule dôjde k čiastočnému rozvoľneniu vírusu, ktorý je translokovaný do cytozolu a

odtiaľ sa vírusové genómy v komplexe s proteínmi dostávajú cez jadrové póry do bunkového jadra. Produktívna infekcia SV40 je na rozdiel od oboch ľudských vírusov nezávislá na kyslom pH endozómov.

Pre myšiu polyomavírus sa údaje líšia. RICHTEROVÁ *et al.* (2001) zistili, že myšiu polyomavírus sa internalizuje do monopinocytických váčkov z ktorých sa niektoré značili na caveolin a boli zjavne odvodené od caveol. Kolokalizácia vírusu s caveolinom bola pozorovaná aj na ceste vírusu až do perinukleárneho priestoru. Naopak GILBERT a BENJAMIN (2000) a GILBERT *et al.*, (2003) publikovali, že nepozorovali žiadnu kolokalizáciu myšieho polyomavírusu s caveolinom a že látky blokujúce endocytózu cez caveoly alebo clathrinové váčky nemajú žiadny vplyv na infektivitu polyomavírusu aj kde neskôr títo autori toto tvrdenie opravili pre bunky bohaté na gangliozidové receptory (GILBERT a BENJAMIN, 2004). Dôležité zistenie prináša pokus s dominantne negatívnou mutantou caveolinu (LIEBL *et al.*, 2006), ktorý ukazuje, že expresia tejto mutanty v bunkách neovplyvňuje podstatne infektivitu vírusu. To znamená, že caveoly nie sú pre produktívny vstup do buniek nutné. V tejto práci sme pozorovali, že len malá časť vstupujúceho vírusu kolokalizuje s caveolinom. Zaujímavé ale je, že 3h. po infekcii je kolokalizácia s váčkami obsahujúcimi caveolin výrazne vyššia. Veľké caveolinové váčky pozorované 3h (ale aj 12h) po infekcii kolokalizujúce s VP1 signálom (Obr.5.20 a 5.21) pripomínajú váčky popísané ako caveosomy pre vírus SV40. O tých bolo publikované (MUNDY *et al.*, 2002), že sa nachádzajú hlavne v perinukleárnom priestore a majú takmer neutrálne pH. LIEBL *et al.*, (2006) ale pozorovali, že či už caveolin obsahujúce alebo neobsahujúce monopinocytické váčky s vírusom fúzujú najskôr so skorými endozómami a 3h. po infekcii je možno vírus detekovať čiastočne v endoplazmatickom retikule a čiastočne v tzv. recyklujúcich endozómoch (pozitívnych na GTPázu Rab 11 a transferrin- cargo takisto používané ako marker recyklujúcich endozómov). Problém je, že aj tzv. recyklujúce endozómy sú popísané jako váčky len s veľmi mierne kyslým pH, vyskytujúce sa hlavne v perinukleárnom priestore a bohaté na caveolin. Či už sú nami pozorované veľké váčky caveosomy či recyklujúce endozómy alebo sa jedná o totožné kompartmenty, naše pokusy v čase 12h. po

infekcii (Obr.5.24), naznačujú, že sa v nich vírus zdržuje dlhšiu dobu ako v endoplazmatickom retikule. Predchádzajúce pokusy (Mannová a Forstová, nepublikované výsledky) už v čase 6 h. po infekcii nedetekovali prítomnosť vírusu v endoplazmatickom retikule. Je teoreticky tiež možná spätná cesta vírusových zvyškov z endoplazmatického retikula do týchto veľkých váčkov. Veľkým prekvapením pre nás bolo pozorovanie (Obr.5.24 C, D), že VP1 vírusu a pseudokapsíd kolokalizuje s caveolinom v podstate najmasívnejšie 12h. po infekcii. Už skôr bolo pozorované v našom laboratóriu, že aj pri vyššej multiplicitate infekcie len niekoľko virónov dopraví genóm do bukového jadra. Naša predstava to tejto doby bola, že bunka sa proti infekcii vírusom bráni tým, že virióny zvädza do endoplazmatického retikula a ďalej na tzv. ERAD dráhu (degradačná dráha spojená s endoplazmatickým retikulom), kde je väčšina vírusových štruktúr po translokácii do cytosolu degradovaná proteasomami. V niektorých bunkách (Obr.5.24 A, B) masívna kolokalizácia VP1 a caveolinu 12h. po infekcii pozorovaná nebola. Bude zaujímavé zistiť či signál VP1 kolokalizuje s proteasomami. V tejto práci sme sa pokúsili o zistenie kolokalizácie s ubiquitinom (dokumentácia neuvedená), bohužiaľ komerčne dostupná protilátka obstaraná kôli tomuto účelu nebola dostatočne kvalitná. Naše súčasné pozorovanie kolokalizácie caveolinu a VP1 12h. po infekcii, ktorá sa výrazne presunula do perinuklearného priestoru späť ďalej do cytoplazmy a na bunkovú perifériu naznačuje, že by bunka mohla caveolinové váčky využívať k recyklovaniu resp. k exocytóze rozrušených vírusových štruktúr z buniek von. Fúzia caveolinových váčkov s plazmatickou membránou bola pozorovaná napr. pri endotheliálnej transcytóze. Behom transcytózy endozómy odškrtné od caveol na plazmatickej strane pendujú k opačnej endotheliálnej strane, kde fúzujú s cytoplazmatickou membránou a vyložia svoj náklad do perivaskulárneho priestoru (PREDESCU *et al.*, 2007). Fúzia caveolinových váčkov s cytoplazmatickou membránou pripomínajúca exocytózu bola taktiež pozorovaná v oocytoch *Caenorhabditis elegans* po ovulácii a fertilizácii (SATO *et al.*, 2006)

7. ZÁVER

- 1, Z WME buniek sme izolovali myši polyomavírus s infekčným titrom 2.10^{11} .
- 2, Z hmyzích buniek sme izolovali pseudokapsidy VP1 a VP1/3, ktoré boli následne použité v inhibičných pokusoch. Izolácia VP1/2 pseudokapsíd bohužiaľ nebola úspešná.
- 3, Zistili sme, ako pseudokapsidy zložené len z VP1 tak pseudokapsidy VP1/3 ktoré obsahovali minoritní proteín VP3 pokiaľ boli zmiešané s polyomavírusovým inokulom v prebytku inhibovali vírusovú infektivitu. Účinnejšie inhibovali infekciu myšieho polyomavírusu pseudokapsidy VP1/3 ako pseudokapsidy obsahujúce iba hlavný štruktúrny proteín VP1. U pomere 100 pseudokapsíd VP1/3 na 1 virión bola zistená 60% inhibícia infekcie v porovnaní v prípade, kedy k bunkám neboli pridané VP1/3 pseudokapsidy, ale iba natívne virióny myšieho polyomavírusu. U VP1 bola v tomto prípade zistená 43% inhibícia infekcie.
- 4, Iba menšina vstupujúcich viriónů a pseudokapsid kolokalizovala 20 minút po infekcii s caveolinom. Výrazne vyššia miera kolokalizácie VP1 vstupujúcich viriónov a pseudokapsid bola pozorovaná v čase 3h. po infekcii. Prekvapivo sme zistili, že najvýraznejšia kolokalizácia VP1 s caveolinom bola 12h. po infekcii. Pozorovanie naznačuje, že by bunka mohla caveolinové väčky využívať k exocytóze rozrušených vírusových štruktúr z buniek von.

8. ZOZNAM CITOVANEJ LITERATÚRY

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

Allander T., Andreasson K., Gupta S., Bjerkner A., Bogdanovic G., Persson M.A.A., Dalianis T., Ramqvist T., Andreson B. (2007): Identification of a third human polyomavirus. *Journal of virology* 81:4130-4136

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

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

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

Ashok A., Atwood W.J (2003): Contrasting Roles of Endosomal pH and the Cytoskeleton in Infection of Human Glial Cells by JC Virus and Simian Virus 40. *J Virol.* 77: 1347–1356

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

Barouch, D.H., Harrison, S.C. (1994): Interactions among the major and minor coat protein of polyoma virus. *J Virol* 68:3982-3989

Berger JR., Major EO., (1999): Progressive multifocal leukoencephalopathy. *Review. Semin. Neurol.* 19:193-200

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

- Bolen, J.D., Anders, D.G., Trampy, J., Consigly, R.A. (1981):** Differences in the subpopulations of the structural proteins of polyoma virions and capsids: biological functions of the VP1 species. *J Virol* 37:80-91
- Brodsky, J.M., Pipas, J.M. (1998):** Polyomavirus chaperones for multiprotein complexes. *J Virol* 72(7):5329-5334
- Cai Y., Singh B. B., Aslunkov A., Zhao H., Ferreira P. A. (2001):** The docking of kinesins, KIF5B and KIF5C, to ran.binding protein 2 (RanBP2) is mediated via a novel RanBP2 domain. *J Biol Chem.* 276: 41594-41602
- Cahan, L.D., Singh, R., Paulson, J.C. (1983):** Sialyloligosaccharide receptor of binding variants of polyoma virus. *Virology* 130:281-289
- Chang, D., Cai, X., Consigly, R.A. (1993):** Characterization of the DNA binding properties of polyomavirus capsid proteins. *J Virol* 67:6327-6331
- Chang, D., Haynes, J.I. 2nd, Brady, J.N., Consigly, R.A. (1992):** Identification of a nuclear localization sequence in the polyomavirus capsid protein VP2. *Virology* 191:978-983
- Campbell K. S., Orgis E., Burke B., Su W., Auger K. R., Druker B. J., Schaffhausen B. S., Roberts T. M., Pallas D. C. (1994):** Polyoma middle T antigen interacts with SHC via the NPTY motif in middle T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:6344-6348
- Cantalupo P., Doering A., Sullivan C.S., Pal A., Peden K. W. C., Lewis A. M., Pipas J.M. (2005):** Complete Nucleotide Sequence of Polyomavirus SA12. *J Virol.* 79: 13094–13104
- Carswell S., Alwine, J.C. (1986):** Simian virus 40 agnoprotein facilitates perinuclear localization of VP1, the major capsid protein. *J. Virol.* 60:1055-1061
- Caruso M., Bellonii I., Sthandiero., Amati P., Garcia R.L (2003):** Alpha4beta1 integrin acts as a cell receptor for murine polyomavirus at the postattachment level *J. Virol.*77: 3913-21
- Chen, L., Fluck, M. (2001):** Kinetic analysis of the steps of the polyomavirus lytic cycle. *J Virol* 75(18):8368-8379
- Chen, X.S., Stehle, T., Harrison, S.C. (1998):** Interaction of polyomavirus internal protein VP2 with the major capsid protein VP1 and implications for participation of VP2 in viral entry. *EMBO* 17(22):3233-3240

Clayson E. T, Brando L. V., Compans R W (1989): Release of simian virus 40 virions from epithelial cells is polarized and occurs without cell lysis. *J Virol.* 63: 2278–2288

Clever J., Dean D. A., Kasamatsu H. (1993): Identification of a DNA binding domain in simian virus 40 capsid proteins Vp2 and Vp3. *J Biol Chem.* 268(28):20877-83

Consigli R. N., Griffith G. R., Marriot J. S., Ludlow J. W. (1986): Biochemical characterisation of polyomavirus receptor interactions, p. 44-53. R.L. Crowell a K. Longberg-Holm ed., *Virus attachment and entry into cells.* American Society for Microbiology, Washington, D.C

Cole N.C. (1996): Polyomavirinae: The viruses and their replication. In: *Fields Virology 2.* Third edition, Lippincot – Raven Publishers. Philadelphia.

Chromy, L.R., Pipas, J.M., Garcea, R.L. (2003): Chaperone-mediated in vitro assembly of polyomavirus capsids. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(18):10477-10482.

Cocucci E., Racchetti G., Podini P., Rupnik M., Meldolesi J. (2004): Enlargeosome, an exocytic vesicle resistant to nonionic detergents, undergoes endocytosis via a nonacidic route. *Mol Biol Cell* 15: 5356–5368

Cowie, A., Kamen, R. (1984): Multiple binding sites for polyomavirus large T antigen within regulatory sequences of polyomavirus DNA. *J Virol* 52(3):750-760

Cripe, T.P., Delos, S.E., Estes, P.A., Garcea, R.L. (1995): In vivo and in vitro association of hsc 70 with polyomavirus capsid proteins. *J Virol* 69(12): 7807-7813

Courtneidge S. A., Smith A. E. (1983): Polyoma virus transforming protein associates with the product of the c-src cellular gene. *Nature.* 303:435-439

Daniels R, Rusa N.M., Wilbuerk A.K., Norkin L.C., Wadsworth P., Herbet D.N (2006): Simian virus 40 late proteins possess lytic properties that render them capable of permeabilizing cellular membranes *J. Virol.* 80: 6575-6587

Daniels R Rusan N. M., Wadsworth P., Herbert D.N. (2006): SV40 VP2 and VP3 insertion into ER membranes is controlled by the capsid protein VP1: implication for DNA Translocation out of the ER. *Mol Cell* 24: 955-966

Deb, S.P., Tegtmeyer, P. (1987): ATP enhances the binding of simian virus large T antigen to the origin of replication. *J Virol* 61:3649-3654.

Del Valle L., Gordon J., Assimakopoulou M., Enam S., Geddes J.F., Varakis J.N., Katsetos C.D., Croul S., Khalili K.,(2001): Detection of JC virus DNA sequences and expression of the viral regulatory protein T-antigen in tumors of the central nervous system. *Cancer Res* 61:4287-93

DePamphilis M. (1993): Eukaryotic DNA replication: anatomy of an origin. *Ann. Rev. Biochem.* 62: 29-63

Dilworth, S.M. (1990): Cell alterations induced by the large T-antigens of SV40 and polyomavirus. *Semin. Cancer Biol.* 1(6):407-414.

Dorries K. (1998): Molecular biology and pathogenesis of human polyomavirus infections. *Dev Biol Stand.* 94:71-79

Dornreiter, I., Hoss, A., Artur, A.K., Fanning, E. (1990): SV40 T antigen binds directly to the large subunit of purified DNA polymerase α . *EMBO J* 9:3329-3336.

Dower, W. J., Miller, J. F., Ragsdale Ch. W. (1988):High efficiency transformation of E.coli by high voltage electroporation. *Nucleic Acids res.* 16: 6127-6145

Eash S., Atwood W.J (2005): Involvement of cytoskeletal components in BK Virus Infectious Entry *J Virol* 79: 11734–11741

Eddy B. E., Borman G. S, Grubbs G. E., Young R. D. (1962): Identification of the oncogenic substance in rhesus monkey kidney cell culture as simian virus 40. *Virology.* 17:65-75

Ellman, M., Bikel, I., Figge, J., Roberts, T., Schlossman, R., Livingston, D.M. (1984): Localization of the simian virus 40 small T antigen in the nucleus and cytoplasm of monkey and mouse cells. *J Virol* 50:623-628.

Fried, H., Cahan, L.D., Paulson, J.C. (1981): Polyoma virus recognizes specific sialyloligosaccharide receptor on the host cells. *Virology* 109:188-192

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

Forstová, J., Krazewicz, N., Sandig, V., Elliot, J., Palková, Z., Strauss, M., Griffin, B.E. (1995): Polyoma virus pseudocapsids as efficient carriers of heterologous DNA into mammalian cells. *Hum Gene Ther* 6:297-306

Gardner S. D., Field A. M., Coleman D.V., Hulme B. (1971): New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet.* 1:1253-1260

Gannon, J.V., Lane. D. P., (1990): Interactions between SV40 T antigen and DNA polymerase alpha. *New Biol.* 2:311-316

Garcea, R.L., Salunke, D.M., Caspar, D.L. (1987): Site-directed mutation affected polyomavirus capsid self-assembly in vitro. *Nature* 329:86-87.

Garcea R.L., Ballmer-Hofer K., Benjamin T. L. (1985): Virion assembly defect of polyomavirus hr-t mutants under phosphorylation of major capsid protein

Gaynor A.M., Nissen D.M., Whiley M.D., Mackay M.I., Lambert B.S., Wu G., Brennan C.D., Storch A.G., Sloots P.T., Wang D. (2007): Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. *Plos Pathogens* 3(5):595-604

Gordon-Shaag A., Ben-Nun-Shaul O., Kasamatsu H., Oppenheim A. B., Oppenheim A. (1998): The SV40 capsid protein VP3 cooperates with the cellular transcription factor Sp1 in DNA-binding and in regulating viral promoter activity. *J Mol Biol.* 275(2):187-195

Gordon-Shaag A., Ben-Nun-Shaul O., Roitman V., Yosef Y., Oppenheim A. (2002): Cellular transcription factor Sp1 recruits simian virus 40 capsid proteins to the viral packaging signal, *ses.* *J Virol.* 76(12):5915-5924

Gilbert J.M., Benjamin T.L.(2004): Uptake pathway of polyomavirus via ganglioside GD1a. *J.Virol.*78:12259-12267

Gilbert J.M., Benjamin T.L.(2003): Cell penetration and trafficking of polyomavirus *J.Virol* 77:2615-2622

Gilbert J.M., Benjamin T.L.(2000): Early steps of polyomavirus entry into cell. *J.Virol.* 74:8582- 8588

Gillock, E.T., Rottinghaus, S., Chány, D., Cai, X., Smiley, S.A., An, K., Consigli, R.A. (1997): Polyomavirus major capsid protein VP1 is capable of packaging cellular DNA when expressed in the baculovirus system. *J Virol* 71: 2857-2865.

Greber, U.F., Kasamatsu H.(1996):Nuclear targeting of SV40 and adenovirus. *Trends in Cell Biology.* 6:620-628

Griffith J. P., Griffith D. L., Rayment I., Murakami W. T., Caspar D. L. D. (1992): Inside polyomavirus at 25-A resolution. *Nature.* 355:652-4

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

Hansen, U., Tenen, D.G., Livingstone, D.M., Sharp, P.A.(1981): T antigen repression of SV40 earlytranscription from two promoters. *Cell* 27:603-613.

Halmer, L., Vestner, B., Gruss, C. (1998): Involvement of topoisomerases in the initiation of simian virus 40 minichromosome replication. *J. Biol. Chem.* 273:34729-34798

Hartl F. U. (1996): Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature.* 381:571-580

Haynes, J.I., Chány, D., Consigli, R. A. (1993):Mutations in the putative calcium- binding domain of polyomavirus VP1 affect capsid assembly. *J. Virol.* 67: 2486-2495

Hedquist B. G., Bratt G., Hammarin A. L., Grandien M., Nennesmo I., Sundelin B., Seregard S., (1999): Identification of BK virus in a patient with acquired immune deficiency syndrome and bilateral atypical retinitis. *Ophthalmology.* 106:129-132

Herbig U., Weisshart K., Taneja P.,Fanning E. (1999): Interaction of the transcription factor TFIID with simian virus 40 (SV40) large T antigen interferes with replication of SV40 DNA in vitro. *J Virol.* 73: 1099–1107

Ito, Y. (1980):Organization and expression of the genom of polyomavirus. *Viral Onc.* 447-473.

Kamen R., Favaloro J., Parker J. (1980) Topography of the three late mRNAs of polyomavirus which encode the virion proteins. *J. Virology*. 33:637-651

Klockmann, U., Deppert, W. (1983): Acylated simian virus 40 large T antigen a new subclass associated with a detergent resistant lamina of the plasma membrane. *EMBO* 2:1151-1157.

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

Li M., Garcea R. L. (1994): Identification of the threonine phosphorylation sites on the polyomavirus major capsid protein VP1: relationship to the activity of middle T antigen. *J Virol*. 68:320-327

Liddington, R.C., Yan, Y., Moulain, J., Sahli, R., Benjamin, T.L., Harrison, S.C. (1991): Structure of simian virus 40 at 3.8-Å resolution. *Nature* 354:278-294.

Magnuson B., Rainey E.K., Benjamin T.L., Baryshev M., Tsai B.(2005): Erp29 triggers a conformational change in polyomavirus to stimulate membrane binding. *Mol.Cell* 20:289-300

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

Mellor A., Smith A E. (1987): Characterization of the amino-terminal tryptic peptide of simian virus 40 small-t and large-T antigens. *J Virol*. 28: 992–996

Missero C., Calautti E., Eckner R., Chin J., Tsai L. H., Livingston D. M., Dotto G. P., (1995): Involvement of the cell-cycle inhibitor Cip1/WAF1 and the E1A-associated p300 protein in terminal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92: 5451–5455

Monini P., Rotola A., De Lellis L., Corallini A., Secchiero P., Albini A., Benelli R., Parravicini C., Barbanti-Brodano G., Cassai E. (1996): Latent BK virus infection and Kaposi's sarcoma pathogenesis. *Int J Cancer*. 66:717-22

Montross, L., Watkins, S., Moreland, R.B., Mamon, H., Caspar, D.L.D., Garcea, R.L. (1991): Nuclear assembly of polyomavirus capsids in insect cells expressing the major capsid protein VP1. *J Virol* 65:4991-4998.

Moran, E. (1988): A region of SV40 large T antigen can substitute for a transforming domain of the adenovirus E1A products. *Nature* 334:168-170

Moriyama T., Marquez J., P., Wakatsuki T., Sorokin A. (2007): Caveolar Endocytosis Is Critical for BK Virus Infection of Human Renal Proximal Tubular Epithelial Cells *J. Virol.*81: 8552-8562

Norkin L. C., Anderson H. A., Wolfrom S. A., Oppenheim A. (2002): Caveolar endocytosis of simian virus 40 is followed by brefeldin A-sensitive transport to the endoplasmic reticulum, where the virus disassembles. *J Virol.* 76:5156-66

Padgett, B. L., Walker, D. L., ZuRhein, G. M., Eckroade, R. J., Drasel, B. H. (1971): Cultivation of a papova-like virus from human brain with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Lancet.* 1:1257-1260

Pallas D. C., Shahrik L. K., Martin B. L., Jaspers S., Miller T. B., Brautigan D. L., Roberts T. M. (1990): Polyoma small and middle T antigens and SV40 small t antigen form stable complexes with protein phosphatase 2A. *Cell.* 60:167-176

Palková, Z., Adamec, T., Liebl, D., Štokrová, J., Forstová, J. (2000a): Production of polyomavirus structural protein VP1 in yeast cells and its interaction with cell structures. *FEBS Letters* 478:281-289.

Palková, Z., Španielová, H., Gottifredi, V., Hollanderová, D., Forstová, J., Amati, A. (2000b): The polyomavirus major capsid protein interacts with the nuclear matrix regulatory protein YY1. *FEBS letters* 467:359-364.

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

Pietropaolo V., Di Taranto C., Degener A. M., Jin L., Sinibaldi L., Baiocchini A., Melis M., Orsi N. (1998): Transplacental transmission of human polyomavirus BK. *J Med Virol.* 56:372-6

Predescu S. A., Predescu D. N., Shimizu K., Klein I. K., Malik A.B. (2005): Cholesterol- dependent Syntaxin-4 and SNAP-23 clustering regulates caveolar fusion with endothelial plasma membrane. *J Biol.Chem.* 44:37130-37138

Resnick, J., Shenk, T. (1986): Simian virus 40 agnoprotein facilitates normal nuclear location of the major capsid polypeptide and cell- to- cell spread of virus. *J. Virol.* 60: 1098-1106

Richardson, W.D., Roberts, B.L., Smith, A.E. (1986): Nuclear location signal in polyoma virus large-T. *Cell* 44:77-85

Richterová Z., Liebl D., Horák M., Palková Z., Štokrová J., Hozák P., Korb J., Forstová J. (2001): Caveolae are involved in the trafficking of mouse polyomavirus virions and artificial VP1 pseudocapsids toward cell nuclei. *J Virol.*75: 10880-10891

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

Sahli, R., Freund, R., Dubensky, T., Garcea, R., Bronson R., Benjamin T. (1993): Defects in entry and altered pathogenicity of polyomavirus mutant blocked in VP2 myristylation. *Virology*, 192:142-153.

Sandler E. S., Aquino V. M., Gross-Shohet E., Hinrichs S., Krisher K.(1997): BK papovavirus pneumonia following hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 20:163-165

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

Salunke D. M., Caspar D. L., Garcea R. L. (1986): Self assembly of purified polyomavirus capsid protein VP1. *Cell.* 46:895-904

Sato K., Sato M., Audhya A., Oegema K., Schweinsberg P., Grant B.D (2006): Dynamic regulation of caveolin-1 trafficking in the germ line and embryo of *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol. of Cell.* 17:3085-3094

Schmidt U., Rudolph, R. Bohm G. (2000):Mechanism of assembly of recombinant murine polyomavirus like- particles. *J. Virol.* 74:1658

Shishido-Hara Y., Ichinose S., Higuchi K., Hara Y., Yasui K. (2004): Major and Minor Capsid Proteins of Human Polyomavirus JC Cooperatively Accumulate to Nuclear Domain 10 for Assembly into Virions. *J Virol.* 78: 9890–9903.

Schmidt, M.K., Mann, K. (1987): Glycosylation of simian virus 40 T antigen and localization of glycosylated T antigen in the nuclear matrix. *Virology* 156:268-281

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

Sontag E., Fedorov S., Kamibayashi C., Robbins D., Cobb M., Mumby M. (1993) : The interaction of SV40 small tumor antigen with protein phosphatase 2A stimulates the map kinase pathway and induces cell proliferation. *Cell.* 75: 887-897

Staneloni, R.J., Benjamin, T.L. (1974): Host range selection of transformation-defective hr-mutants of polyomavirus. *Virology* 77:598-609.

Staufenbiel, M., Deppert, W. (1983): Different structural systems of the nucleus are targets for SV40 large T antigen. *Cell* 33:173-181

Summers M. D., Smith G. E. (1987): A manual of methods for baculovirus vectors and insect culture procedures. Texas Agricultural Experiment Station, Bulletin No. 155

Španielová, H., Velková, K. (2001): The cellular nuclear matrix regulatory protein YY1 does not directly interact with the mouse polyomavirus large tumor antigen. *Acta Virol* 45(3):191-195

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

Tüler H., Bard P. (1985): Simian virus 40 and polyomavirus: growth, titration, transformation and purification of viral components, p.169-192. in B.W.J. Mahy (ed), *Virology: a practical approaches.* IRL Press, Oxford.

Voltz R., Jager G., Seelos K., Fuhry L., Hohlfeld R. (1997): BK virus encephalitis in an immunocompetent patient. *Arch Neurol.* 53:101-103

Yang S. I., Chen L. H. (2000): Gene delivery via polyomavirus major capsid protein VP1 isolated from recombinant *Escherichia Coli*. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 32: 7379

Yang S. I., Lickteig R. L., Estes R., Rundell K., Walter G., Mumby M. C. (1991): Control of protein phosphatase 2A by simian virus 40 small-t antigen. *Mol. Cell Biol.* 64:1988-1995

Yang J. Q., Remmers E. F., Marcu K. B. (1986): The first exon of the c-myc proto-oncogene contains a novel positive control element. *EMBO J.* 5: 3553–3562

Yuen L. K., Consigli R. A (1983): Generation of capsods from unstable polyoma virions. *J Virol.* 47:620-625