Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza

Bc. Dominik Musil

Analýza posttranslačních modifikací proteinů hmotnostní spektrometrií

Analysis of posttranslational modifications of proteins by mass spectrometry

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Miroslav Šulc, Ph.D.
Konzultant: RNDr. Hana Španielová, Ph.D.

Praha 2019

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Místo a datum: Podpis:

Abstrakt:

Viry, původci mnoha infekčních onemocnění, jsou malé nebuněčné částice replikující se pouze v hostitelských buňkách. Předpokládá se, že za jejich infektivitu jsou zodpovědné posttranslační modifikace virových kapsidových proteinů (např. fosforylace, které jsou katalysovány kinasami hostitelských buněk). Vhodným modelem, který lze využít pro studium vztahu fosforylačního „profilu“ viru a infektivity je myší polyomavirus z čeledi *Polyomaviridae*.

Srovnáním virionů, a tedy i hlavních kapsidových proteinů VP1 divokého kmene myšího polyomaviru s virovou mutantou vytvořenou pomocí delece části genomu kódujícího regulační proteiny viru a produkovaných ve dvou různých buněčných liniích WOP a 3T6, byla zjištěna hmotnostní spektrometrií majoritní fosforylace na třech konkrétních aminokyselinách VP1. Ty jsou považovány za důležité pro správnou morfogenesi virionů a jejich schopnost infikovat hostitelské buňky. Kvalitativní zastoupení nebylo ovlivněno volbou buněčné linie.

Kromě toho, v případě pozorování „dimerizace“ VP1 na elektroforeogramu SDS-PAGE byla v aminokyselinové sekvenci detekována dvojitá fosforylace VP1: pThr63, pSer66 v našem experimentálním provedení *in vivo*. Je tedy pravděpodobné, že posttranslační modifikace, konkrétně fosforylace mohou ovlivňovat strukturní vlastnosti virových proteinů.

Nedílnou součástí práce je úspěšná optimalizace řady použitých metodických postupů: purifikace nepoškozených virových částic, stanovení koncentrace proteinů ve virionech a nabohacení proteinů virových částic i v případě nízké koncentrace purifikovaných virionů.

Klíčová slova: myší polyomavirus, posttranslační modifikace proteinů, hmotnostní spektrometrie

Abstract:

Viruses, etiological agents of many infectious diseases, are small noncellular particles that run their replication process solely inside host cells. It is generally assumed that the posttranslational modifications of viral capsid proteins are responsible for their infectivity (e.g. phosphorylation catalysed by kinases of host cells). The appropriate model for study of the viral phosphorylation "profile" relation with its infectivity is mouse polyomavirus of the *Polyomaviridae* family.

By comparison of virions, as well as the major capsid protein VP1 of wild type mouse polyomavirus with viral mutant created by deletion of the part of the genome coding regulatory proteins of virus and produced in two different cell lines WOP and 3T6 was found by mass spectrometry a major phosphorylation in the three specific amino acids of VP1. These are considered important for proper morphogenesis of virions and their ability to infect host cells. The qualitative representation was not affected by the cell line selection.

Furthermore, in case of VP1 "dimerization" detected on SDS-PAGE electrophoretogram the double phosphorylation of VP1 pThr63, pSer66 was confirmed in our experimental *in vivo* approach. Therefore, posttranslational modifications, specifically phosphorylation, could probably affect structural properties of viral proteins.

The integral part of the work was a successful optimalization of many used methodical approaches: the purification of intact viral particles, determination of protein concentration of virions as well as protein enrichment of viral particles also in a case of the low concentration of the purified virions.

Key words: mouse polyomavirus, posttranslational modifications of proteins, mass spectrometry

Poděkování:

Na prvním místě bych chtěl poděkovat panu doc. RNDr. Miroslavu Šulcovi, Ph.D. nejen za vedení bakalářské práce, neocenitelnou pomoc, inspiraci, podnětné rady a čas, které mi věnoval, ale hlavně za poskytnutou příležitost k vypracování práce na toto zvolené téma. Také velmi děkuji paní RNDr. Haně Španielové, Ph.D. za pomoc, cenné postřehy, rady a čas, který mi věnovala v rámci laboratoře virologie. Dále velmi děkuji za pomoc paní Mgr. et Mgr. Alžbětě Hejtmánkové a Mgr. Janě Váňové za všechnu jejich pomoc, obětavost a čas. Dále děkuji panu RNDr. Tomáši Ječmenovi, Ph.D. a paní Vlastě Sakařové za její pomoc s izolací částic. Také děkuji členům obou laboratoří za přátelské pracovní prostředí.

Především však děkuji své rodině za podporu, pochopení a trpělivost během mého studia.

Obsah:

1 Úvod ..... - 1 -
2 Polyomaviry ..... - 2 -
2.1 Životní cyklus MPyV a jeho genom ..... - 2 -
2.1.1 T-antigeny ..... - 4 -
2.2 Struktura kapsidy ..... - 4 -
2.2.1 Kapsidový protein VP1 ..... - 4 -
3 Proteomika ..... - 7 -
3.1 Úvod do proteomiky a její rozdělení ..... - 7 -
3.2 Metody proteomiky a jejich využití ..... - 7 -
3.3 Proteomika a posttranslační modifikace ..... - 8 -
4 Hmotnostní spektrometrie ..... - 9 -
4.1 Úvod do hmotnostní spektrometrie ..... - 9 -
4.2 Princip a základní uspořádání MS ..... - 9 -
4.3 MALDI-TOF MS ..... - 11 -
4.3.1 Ionisační zdroj MALDI ..... - 11 -
4.3.2 Ionisace elektrosprejem ..... - 12 -
4.3.3 Průletový analysátor ..... - 13 -
4.3.4 Kvadrupólový analysátor ..... - 13 -
5 Cíle práce ..... - 14 -
6 Materiál a metody ..... - 15 -
6.1 Materiál ..... - 15 -
6.1.1 Chemikálie ..... - 15 -
6.1.2 Přístroje ..... - 16 -
6.1.3 Složení běžně užívaných roztoků ..... - 17 -
6.1.4 Protilátky a antibiotika ..... - 17 -
6.1.5 Ensymy ..... - 17 -
6.1.6 Použitá kultivační média ..... - 18 -
6.1.7 Standardy pro určení velikosti molekulových hmotností analytů ..... - 18 -
6.1.8 Ostatní materiál ..... - 19 -
6.2 Buněčné kultury a virová inokula ..... - 19 -
6.3 Práce s tkáňovými kulturami ..... - 20 -
6.3.1 Elektroporace plasmidů do bakteriálních buněk a následná kultivace ..... - 20 -
6.3.2 Izolace plasmidů pomocí Maxiprep procedury ..... - 20 -
6.3.3 Restrikční analysa plasmidů pLUC a pMJAG ..... - 20 -

6.3.4 Agarosová elektroforesa ..... - 21 -
6.3.5 Přečištění plasmidové DNA pomocí fenol-chloroformové extrakce ..... - 21 -
6.3.6 Ligace štěpených plasmidů pMJAG a pLUC ..... - 22 -
6.3.7 Transfekce plasmidů do 3T6 a WOP buněčných linií ..... - 22 -
6.4 Kultivace 3T6 a WOP buněk ..... - 23 -
6.4.1 Kultivace savčích 3T6 a WOP buněk ..... - 23 -
6.4.2 Infekce savčích 3T6 a WOP buněk ..... - 23 -
6.5 Izolace viru MPyV ..... - 24 -
6.5.1 Izolace 3T6 a WOP buněčných linií ..... - 24 -
6.5.2 Isokinetická centrifugace v sacharosovém gradientu ..... - 24 -
6.5.3 Isopiknická centrifugace v rovnovážném CsCl gradientu ..... - 25 -
6.5.4 Dialysa a finální úprava vzorků ..... - 25 -
6.6 Charakterizace MPyV ve vzorcích ..... - 26 -
6.6.1 Refraktometrie ..... - 26 -
6.6.2 Dot Blot ..... - 26 -
6.6.3 Elektronová mikroskopie ..... - 26 -
6.6.4 Imunofluorescence buněčných linií ..... - 27 -
6.6.5 Kontrola virem infikovaných buněk ..... - 28 -
6.6.6 Stanovení aktivity luciferasy v buněčné linii ..... - 28 -
6.7 Práce s proteiny ..... - 29 -
6.7.1 Stanovení koncentrace proteinů spektrofotometricky a metodou bicinchoninové kyseliny ..... - 29 -
6.7.2 Příprava vzorku na SDS elektroforesu v polyakrylamidovém gelu ..... - 30 -
6.7.3 Precipitace proteinů ..... - 30 -
6.7.4 SDS elektroforesa v polyakrylamidovém gelu ..... - 30 -
6.7.5 Fixace a barvení po SDS-PAGE ..... - 31 -
6.8 Příprava vzorku na MALDI-TOF ..... - 31 -
7 Výsledky a diskuse ..... - 32 -
7.1 Restrikční analysa, izolace plasmidů a transfekce ..... - 32 -
7.2 Imunofluorescence infikovaných savčích buněk ..... - 33 -
7.3 Izolace virů ze savčích buněčných linií ..... - 35 -
7.4 Vizualizace virů pomocí elektronové mikroskopie ..... - 36 -
7.5 Kontrola infekce buněk jednotlivými preparacemi virů ..... - 37 -
7.6 Luciferasová assay ..... - 40 -
7.7 Stanovení koncentrace jednotlivých vzorků ..... - 42 -

7.8 Výsledné zobrazení virových částic na gelu SDS-PAGE..... - 44 -
7.9 Analysa fosforylace pomocí MALDI-TOF MS ..... - 47 -
8 Závěr ..... - 51 -
Přehled použité literatury ..... - 52 -

Seznam zkratek:

$A_{průměr}$	průměrná absorbance při vlnové délce xxx nm
A_{xxx}	absorbance při vlnové délce xxx nm
AMK	aminokyselina
APS	peroxodisíran amonný (z angl. ammonium persulfate)
BCA	bicinchoninová kyselina (z angl. bicinchoninic acid)
bp	páry bází (z angl. base pairs)
BSA	hovězí sérový albumin (z angl. bovine serum albumin)
BSM	bezsérové médium
c	molární koncentrace [mol dm^{-3}]
$c_{průměr}$	průměrná molární koncentrace [mol dm^{-3}]
CBB-R250	briliantová modř (z angl. Coomassie Brilliant Blue-R250)
DAPI	fluorescenční barva 4',6-diamidin-2-fenylindol
DMEM	Dulbeccem modifikované Eaglovo médium (z angl. Dulbecco's Modified Eagle's Médium)
dsDNA	dvojřetězcová DNA
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina (z angl. ethylenediaminetetraacetic acid)
ER	endoplasmatické retikulum
EM síťka	elektron-mikroskopická síťka
ESI	ionisace elektrosprejem (z angl. electrospray ionization)
EtMf	ethylmorfolin (z angl. ethylmorpholine)
FBS	fetální hovězí sérum (z angl. fetal bovine serum)
HCCA	α-kyano-4-hydroxyskořicová kyselina (z angl. α-cyano-4-hydroxicinnamic acid)
IAA	iodoacetamid (z angl. iodoacetamide)
kDa	kilodalton
LB médium	Luria-Bertani médium
LT	velký T-antigen (z angl. large T-antigen)
λ	vlnová délka [nm]
m/z	poměr hmotnost/náboji
MALDI	matricí asistovaná laserová desorpce/ionisace
MALDI-TOF	desorpce a ionisace za přítomnosti matrice – měření doby letu (z angl. matrix assisted laser desorption/ionization – time of flight)
MPyV	myší polyomavirus
MS	hmotnostní spektrometrie (z angl. mass spectrometry)
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
MT	střední T-antigen (z angl. middle T-antigen)
NK	negativní kontrola
NLS	jaderný lokalizační signál (z angl. nuclear localization signal)
PBS	fyziologický roztok
pH	záporný dekadický logaritmus koncentrace vodíkových kationtů
pLUC	plasmid obsahující gen pro luciferasu

pMJAG	plasmid obsahující všechny virové geny
PTA	kyselina fosfowolframová (z angl. phosphotungstic acid)
PTM	posttranslační modifikace
PK	pozitivní kontrola
PyV	polyomavirus
rpm	otáčky za minutu
SDS	dodecylsíran sodný (z angl. sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	elektroforesa na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného (z angl. sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
ST	malý T-antigen (z angl. small T-antigen)
t	čas [min]
TBE	tris-borátový pufr (z angl. tris borate-EDTA buffer)
TCEP	tris(2-carboxyethyl)fosfin (z angl. tris(2-carboxyethyl)phosphine)
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (z angl. N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine)
TFA	trifluoroctová kyselina (z angl. trifluoroacetic acid)
TOF	průletový analysátor (z angl. time of flight)
UV	ultrafialové spektrum (z angl. ultraviolet spectrum)
VP1	virový kapsidový protein 1
VP2	virový kapsidový protein 2
VP3	virový kapsidový protein 3
v/v	poměr objem/objem
v/v/v	poměr objem/objem/objem
VIS	viditelné spektrum (z angl. visible spectrum)
WOP	savčí buněčná linie WOP
WOP_pLUC	virus s genem pro luciferasu produkovaný ve WOP buněčné linii
WOP_WT	virus se všemi virovými geny produkovaný ve WOP buněčné linii
WOP_WT-	virus se všemi virovými geny produkovaný ve WOP buněčné linii bez přidaného inhibitoru fosfatas
WT	kmen divokého viru se všemi virovými geny
w/v	poměr hmotnost/objem
3T6	savčí buněčná linie 3T6
3T6_pLUC	virus s genem pro luciferasu produkovaný ve 3T6 buněčné linii
3T6_WT	virus se všemi virovými geny produkovaný ve 3T6 buněčné linii
3T6_WT-	virus se všemi virovými geny produkovaný ve 3T6 buněčné linii bez přidaného inhibitoru fosfatas

1 Úvod

Polyomaviry (PyV) jsou malé, neobalené viry z čeledi *Polyomaviridae*, jejichž genom je tvořen dvojřetězcovou DNA (dsDNA). Mohou vyvolávat různé typy nádorů u různých živočišných druhů. Odtud také pochází jejich název, tedy z řeckého „poly“ (mnoho) a „oma“ (nádor). Polyomaviry napadají celou řadu vyšších organismů od ryb přes ptáky a savce, tedy i člověka. Klasickými zástupci, kteří způsobují persistentní infekce u člověka jsou Simian virus 40, BK virus, Lidský polyomavirus Merkelových buněk a JC polyomavirus (může vyvolat závažné onemocnění nazývané progresivní multifokální leukoencefalopatie).

Majoritní kapsidový protein VP1, který tvoří virovou kapsidu PyV, je zodpovědný za infektivitu PyV díky schopnosti interakce s povrchovými receptory hostitelských buněk [1]. Vlastnosti viru a změny vazby na tyto hostitelské buňky mohou ovlivňovat posttranslační modifikace (PTM) kapsidového proteinu VP1. Řada z nich již byla popsána, přesto je cílem této práce využití hmotnostní spektrometrie (MS) a proteomických technik pro jejich strukturně-funkční studium.

Polyomaviry jsou často využívány jako modelové organismy pro studium transformačních mechanismů, buněčné signalizace [2,3] a karcinogenních vlastností virů. Jejich studium také přispělo k řadě významných objevů v molekulární biologii [4,5]. Typickým zástupcem z rodu *Polyomavirus* je Myší polyomavirus (MPyV), někdy též nazývaný pouze polyomavirus.

2 Polyomaviry

2.1 Životní cyklus MPyV a jeho genom

MPyV může infikovat mnoho typů savčích buněk, nicméně od jeho objevení v roce 1953 [6] nejsou všechny detaily jeho životního cyklu zcela objasněny.

Prvním krokem životního cyklu je přichycení virionu na povrchové receptory hostitelské buňky obsahující sialovou kyselinu (gangliosidy; [7]) pomocí kapsidového proteinu VP1 [1]. Po interakci gangliosidů s kapsidou následuje endocytosa viru v kaveolinových váčcích, kterými se virus může dostat buď do časného endosomu nebo především do endoplasmatického retikula (ER). V lumen ER dochází k rozvolnění virionů, které se následně dostávají do jádra pomocí jaderného lokalizačního signálu (NLS; z anglického nuclear localization signal) za současného využití transportního sytému cytoskeletu [8].

Jakmile se virus dostane do jádra dochází k expresi genů a replikaci genomu. MPyV mají relativně malý genom o velikosti 5307 párů bazí [AF442959, 8], který lze rozdělit do tří oblastí kódujících časné, pozdní a regulační geny.

Regulační oblast obsahuje regulační elementy, zesilovací geny, tzv. „enhancery“ a iniciační segmenty časné a pozdní oblasti, tzv. „promotory“.

Nejprve probíhá transkripce a translace časných genů za vzniku časných proteinů, tzv. T-antigenů. Nejdůležitějším z nich je replikační protein, velký T-antigen (LT), který hraje mimo jiné roli v genové expresi (viz. kapitola 2.1.1). Bez přítomnosti LT by se virový genom neměl replikovat a virové potomstvo by nemělo vznikat.

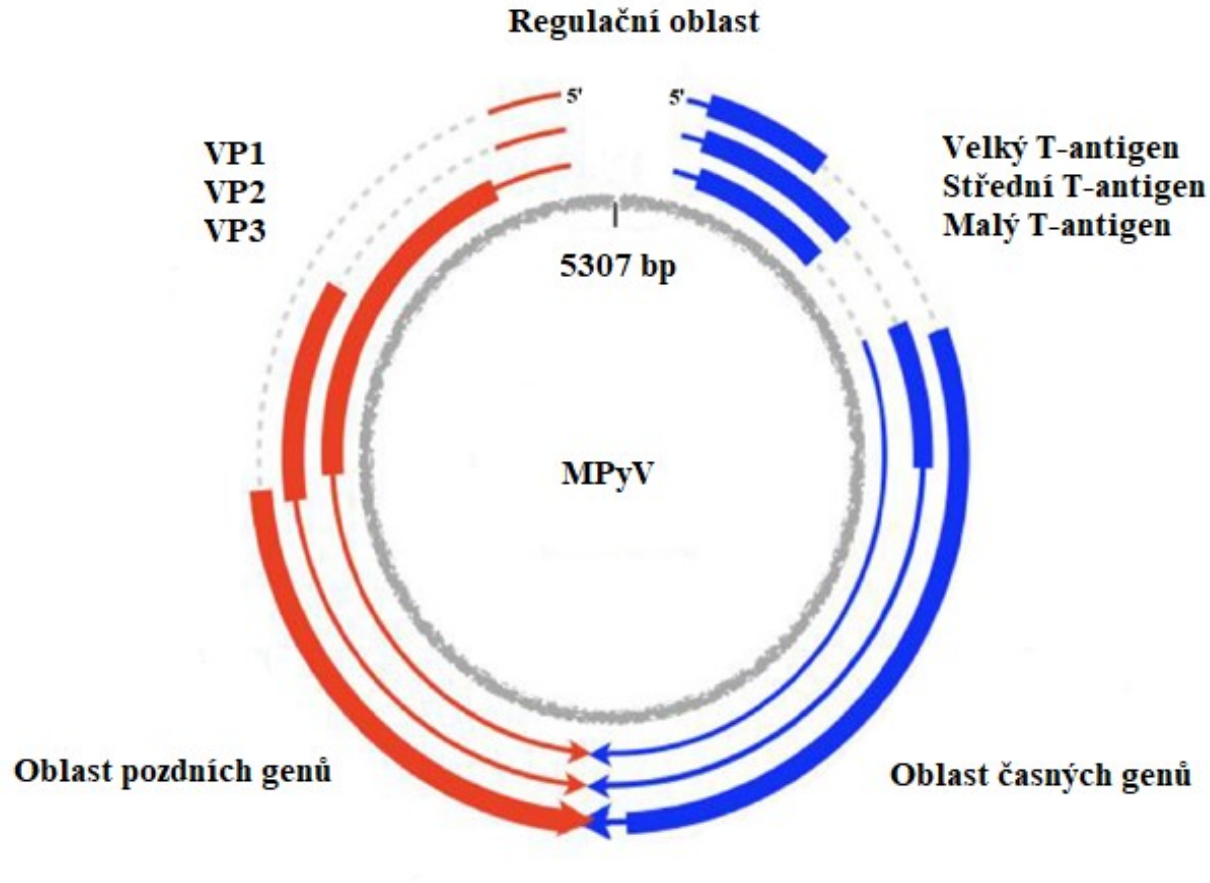
Kromě genu pro LT obsahuje časná oblast i střední T-antigen (MT) a malý T-antigen (ST), které se účastní replikace viru na mnohých úrovních.

Dostatečné množství časných proteinů (hlavně LT) způsobí přepnutí transkripce z časné oblasti na replikaci viru [10], po které dochází k transkripci genů v pozdní oblasti. V této oblasti jsou kódované geny zodpovědné za vznik kapsidových proteinů VP1, VP2 a VP3 (viz. kapitola 2.2). Translace kapsidových proteinů probíhá v cytosolu, odkud se proteiny dostávají zpět do jádra. Navíc, vzniklé kapsidové proteiny mohou být různě posttranslačně modifikovány a hrát důležitou roli v životním cyklu viru. Například fosforylace je u virů velice důležitá pro účinné skládání kapsid či infektivitu (viz. kapitola 2.2.1).

Morfogenese a vznik virionů probíhá v jádře infikované buňky [11]. Nově syntetisovaná dsDNA spolu s buněčnými histony H2A, H2B, H3 a H4 tvoří virový minichromosom [12], který je uzavřen do virové kapsidy vznikající samosložením ze 72 pentamerů proteinu VP1 a jedné molekuly minoritního proteinu VP2 nebo VP3. Tyto minoritní proteiny mohou hrát

podpůrnou roli při skládání virové kapsidy. Nahromaděné viriony se dostávají ven z buňky po její lysy [13].

V rámci této bakalářské práce byly využity dvě odlišné buněčné linie myších fibroblastů, buněčná linie 3T6 (ATCC; CCL-96) a buněčná linie WOP (prof. Amati, Universita La Sapienza, Rome), které byly infikovány MPyV. Buněčná linie 3T6 je permisivní k replikaci MPyV [14]. WOP je buněčná linie myších fibroblastů, které jsou transformované genomem MPyV a produkují časné virové proteiny. Díky tomuto je virus bez potřebných genů pro replikaci (například virová mutanta vzniklá delecí části genomu kódující časné geny) schopný replikačního cyklu (dochází k tzv. komplementaci). Buněčná linie WOP totiž obsahuje potřebné geny a buněčné proteiny nezbytné pro replikaci virových částic takto pozměněných MPyV mutant [15], naopak v 3T6 buněčné linii by takové virové mutanty vznikat neměly.



Obr. 1 - Genom MPyV. Obrázek zobrazuje regulační oblast, oblast časných genů (modře) a oblast pozdních genů (červeně). Na obrázku jsou směrem do středu zobrazeny geny časné oblasti: velký, střední a malý T-antigen. V pozdní oblasti jsou směrem do středu vyznačeny kapsidové proteiny VP1, VP2 a VP3. Převzato a upraveno dle Carmichael, 2016.

2.1.1 T-antigeny

Časná oblast MPyV kóduje geny pro tři hlavní časné proteiny, LT, MT a ST. N-koncová aminokyselinová sekvence je pro tyto proteiny identická, nicméně se liší svojí C-koncovou částí.

Nejdůležitějším z těchto T-antigenů je LT, který je zodpovědný hlavně za iniciaci a udržení replikace viru [10,17], dále je zodpovědný také za transkripci genů a spolu s MT se podílí na imortalizaci primárních buněk a jejich transformaci [3,18].

MT je hlavní onkogenní gen MPyV zodpovědný za infektivitu, tumorigenesi a může také hrát roli v regulaci přepínání replikace z oblasti časných genů do oblasti pozdních genů [2,10,19]. Nicméně i LT se podílí na přepnutí transkripce genů z časné do pozdní oblasti. ST převážně doplňuje funkci LT a má vliv na udržení transformovaného stavu či může hrát roli v tumorigenicitě viru [20].

2.2 Struktura kapsidy

Za tvorbu virové kapsidy jsou zodpovědné geny kódované v pozdní oblasti genomu. Tyto geny jsou transkribovány a následně translatované po ukončení replikace virové dsDNA před tvorbou kapsidy a lysí hostitelské buňky. Hlavní roli zde hraje kapsidový protein VP1 s minoritním přispěním VP2 a VP3.

V celé kapsidě je celkově 360 molekul VP1, které mezi sebou interagují svými volnými C konci a následně tvoří pentamery VP1, ze kterých se skládá vlastní kapsida. Struktura těchto proteinů byla studována pomocí krystalografie a rentgenové difrakce [21]. Celá kapsida (obr. 2, str. 6) je tvořena 60 hexavalentními pentamery a 12 pentavalentními pentamery, nicméně je dokázáno, že hexavalentní pentamery jsou strukturně neodlišitelné od pentavalentních pentamerů [22].

Součástí kapsidového obalu jsou i minoritní proteiny VP2 a VP3. Na jednu kapsidu připadá pouze 72 těchto minoritních proteinů, a to buď VP2 nebo VP3 (Obr. 2, str. 6). Griffith et al. zjistili, že VP2 a VP3 mají vliv na uspořádání virové kapsidy a zároveň interagují s buněčnými proteiny [23]. Ve stabilizaci celé kapsidy hrají důležitou roli vápenaté ionty [24] a disulfidické můstky mezi cysteiny jednotlivých VP1 [21].

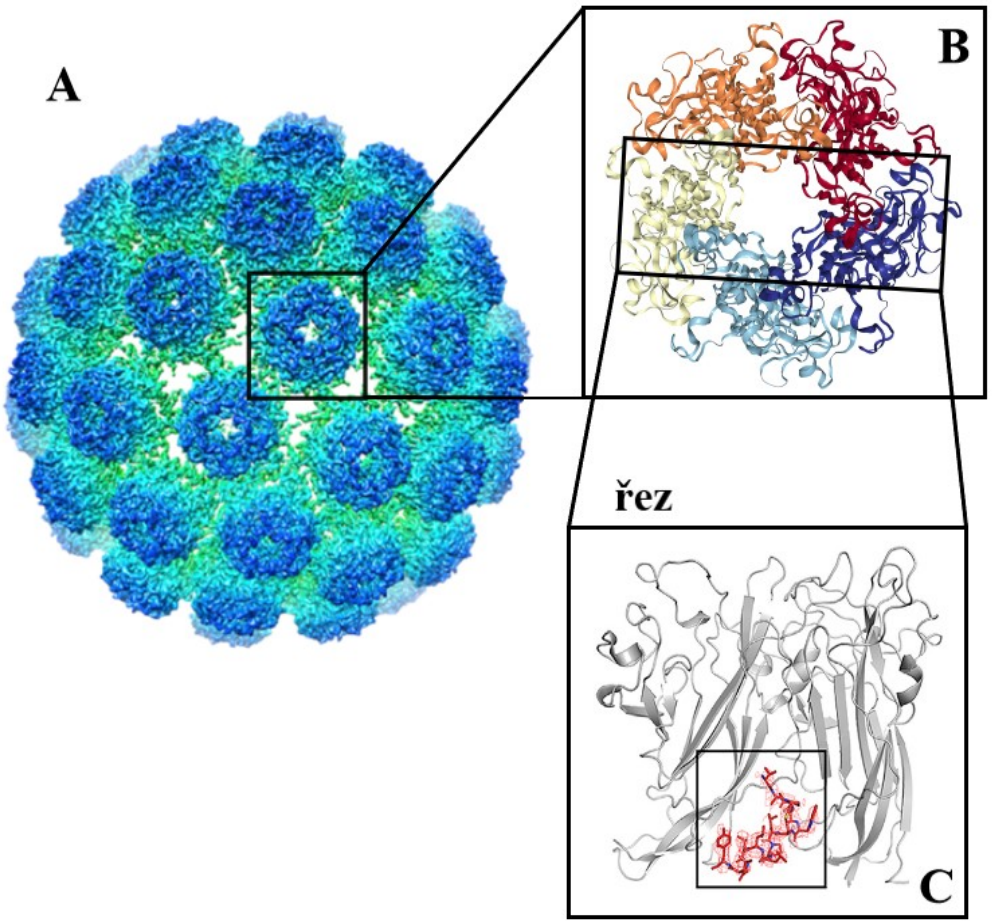
2.2.1 Kapsidový protein VP1

Majoritní kapsidový protein VP1 je dlouhý 384 aminokyselin (AMK; obr. 3, str. 6) a lze ho rozdělit na tři části. N-koncová část obsahuje DNA vazebnou doménu [11,25] a zároveň je zde sekvence prvních dvanácti AMK, která slouží jako NLS [26]. Centrální část VP1 proteinu

tvoří α-helixy a β-barely. Flexibilní C-koncová část umožňuje interakci mezi jednotlivými monomery.

Některé aminokyseliny tvořící kapsidový protein VP1 mohou být modifikovány pomocí PTM. Na VP1 byly pozorovány například methylace, hydroxylace, sulfonace a acetylace. [1,27,28]. Důležitou PTM proteinů VP1 je fosforylace [29–34], která byla identifikována majoritně na threoninech (T-63 a T-156), v minoritní formě také na serinu (S-66). Literatura se rozchází v kvantifikaci zmíněných fosforylací od zastoupení 70 % pro threonin a 30 % pro serin [29,30] po maximální fosforylaci VP1 z 15 % pro threonin [33].

Předpokládá se, že fosforylace virů jsou zodpovědné za účinnou tvorbu a infektivitu virových částic a vazbu na buněčné receptory [1,31]. Většina autorů se shoduje, že pokud daný virus není fosforylovaný na VP1, vznikají defektní viriony [1,31,32]. Garcea et al. provedli experiment, ve kterém porovnávali infektivitu viru u jeho různých geneticky upravených mutant. Prokázali, že v případě přítomné fosforylace jsou viriony schopné až o 50 % větší vazby a infekce buněk než v případě defosforylovaného proteinu viru [29]. Za infektivitu a fosforylaci je pravděpodobně zodpovědný také MT, který zodpovídá za aktivitu threonin kinasy v buňkách, která fosforyluje právě T-63 a T-156 [31]. Proto lze předpokládat, že za maturaci virionů a jejich infektivitu jsou zodpovědné jak fosforylace na VP1, tak i přítomnost virového MT.



Obr. 2 – Struktura virové kapsidy. Obrázek A zobrazuje celkový pohled na virovou kapsidu. Obrázek B zobrazuje detailní uspořádání pentameru VP1. Obrázek C zobrazuje uspořádání C-koncové části VP2 (červeně) v pentameru a při interakci VP1. Obrázky převzaty a upraveny dle Hurdiss et al., 2018 a RCSB Protein Data Bank.

```
  1   MAPKRKSGVS KCETKCTKAC PRPAPVPKLL IKGGMEVLDL VTGPDSVTEI
 51   EAFLNPRMGQ PPTPESLTEG GQYYGWSRGI NLATSDTEDS PENNTLPTWS
101   MAKLQLPMLN EDLTCDTLQM WEAVSVKTEV VGSGSLLDVH GFNKPTDTVN
151   TKGISTPVEG SQYHVFAVGG EPLDLQGLVT DARTKYKEEG VVTIKTITKK
201   DMVNKDQVLN PISKAKLDKD GMYPVEIWHP DPAKNENTRY FGNYTGGTTT
251   PPVLQFTNTL TTVLLDENGV GPLCKGEGLY LSCVDIMGWR VTRNYDVHHW
301   RGLPRYFKIT LRKRWVKNPY PMASLISSLF NNMLPQVQGQ PMEGENTQVE
351   EVRVYDGTEP VPGDPDMTRY VDRFGKTKTV FPGN
```

Obr. 3 – Aminokyselinová sekvence majoritního kapsidového proteinu VP1. Červeně jsou vyznačeny aminokyseliny, které byly identifikovány jako místa pro fosforylaci. Fialově zvýrazněná je N-koncová sekvence VP1 zodpovědná za interakce s DNA. Převzato a upraveno dle Griffin a Clark, 2001 [AAL35610.1].

3 Proteomika

3.1 Úvod do proteomiky a její rozdělení

Studium proteinů je v současnosti jedna z oblastí vědy s největším a nejdynamičtějším rozvojem. Svými vlastnostmi, funkcemi a strukturou jsou proteiny zodpovědné za celou řadu buněčných procesů [37]. Všechny proteiny jsou tvořeny AMK, kterých existuje více než 200, nicméně existuje pouze 20 základních proteinogenních AMK, které mají majoritní zastoupení ve všech organismech [38]. Vědní obor zabývající se výzkumem a studiem proteinů se nazývá proteomika.

Během posledních 10 let získává analysa proteinů a celá proteomika na stále větším významu [39] a to převážně v biochemii a bioanalytice. Monitorování proteinů, jejich aktivit a interakcí je nezbytným nástrojem pro objasnění řady biochemických procesů na molekulární, ale i buněčné úrovni [37].

Obor proteomiky lze rozdělit na dvě základní části; na strukturní a funkční. Cílem strukturní proteomiky je primárně objasnění struktury proteinů nebo stanovení stechiometrie či identifikace vazebného místa pro jakýkoliv ligand [40], ale i charakterizace 3D struktury proteinů a biomakromolekul [41,42].

Úkolem funkční proteomiky je objasnění funkcí neznámých proteinů, buněčných mechanismů souvisejících s těmito proteiny na molekulární úrovni [43], určení prostorové a časové analysy vlastností molekulárních sítí studovaných proteinů v živých buňkách [43], studium interakcí protein – DNA/RNA nebo protein-protein [40]. Pro porozumění funkce proteinů na molekulární úrovni je často nezbytné porozumět jejich 3D struktuře, která odráží jejich funkci [41]. Oblasti strukturní a funkční proteomiky se často velmi překrývají, a tedy interdisciplinární proteomika a všechny její metody se mnohem častěji využívají ve spojení s dalšími vědními obory, jako jsou bioinformatika, genové inženýrství či genomika, pro lepší interpretaci získaných proteomických dat.

Součástí oboru proteomiky je také studium posttranslačních modifikací (kapitola 3.3).

3.2 Metody proteomiky a jejich využití

Základním předpokladem pro zjištění funkce, struktury a vlastností proteinů je jejich analysa. Z tohoto důvodu neustále dochází k optimalizaci a vývoji nových metod vhodných pro výzkum proteinů, které lze dělit na základě různých možností využití. Příkladem může být rozdělení na molekulární, separační, identifikační či strukturní proteomické metody.

Mezi molekulární metody patří DNA mikročipy [44,45], RNA interference, různé

otiskové metody (Northern/Southern Blot) či sériová analysa genové exprese, tzv. SAGE [46].

Separační techniky slouží k oddělení proteinů na základě jejich rozdílných vlastností. Typickým příkladem těchto technik jsou proteinové čipy [44,47,48], elektroforetické metody jako je 2D elektroforesa [49] nebo různé chromatografické metody [50].

Příkladem identifikačních metod využívaných k identifikaci proteinů či jejich sekvence jsou sekvenační techniky [51] a hmotnostní spektrometrie.

Metody zabývající se studiem struktury proteinů lze rozdělit na přímé a nepřímé. Mezi přímé metodiky patří rentgenová krystalografie [52], nukleární magnetická rezonance, elektronová či kryomikroskopie nebo hmotností spektrometrie využívající se pro analysu primární struktury proteinů. Do nepřímých metodik studia 3D struktury proteinů lze zařadit kromě „*in silico*“ výpočetních metod i kombinace řady technik s hmotnostní spektrometrií (např. H/D výměna, povrchové značení či chemické síťování).

Příkladem ostatních metod využívaných v proteomické analyse mohou být techniky založené na protilátkách [53,54] nebo radioaktivně značené techniky [55].

3.3 Proteomika a posttranslační modifikace

PTM jsou jakékoliv chemické modifikace proteinů probíhající po procesu translace, které mohou výrazně ovlivnit jejich fyzikálně-chemické vlastnosti, funkce a také vlastní struktury [56]. Předpokládá se, že 50 % všech proteinů má jednu nebo více PTM, která souvisí s jejich funkcí [57], reguluje aktivitu a stabilitu proteinů a slouží jako zásadní intermediát pro signální transdukci [37]. Kromě toho, PTM jsou nepostradatelné v regulaci, signalizaci a lokalizaci v buňkách [39].

Existuje celá řada PTM postihující například odštěpené C nebo N konce proteinů, modifikace specifické aminokyseliny či propojení mezi dvěma aminokyselinami v rámci proteinového řetězce. Fosforylace, acetylace, glykosylace, hydroxylace, methylace, lipidace či ubikvitinace jsou typickým příkladem běžně nalézaných modifikací postranního řetězce aminokyselin v proteinech [56]. Jednou z nejčastěji se vyskytujících modifikací je fosforylace.

Obecně existují čtyři typy fosforylací, kterými jsou O-fosforylace, N-fosforylace, S-fosforylace a acyl-fosforylace [58]. O-fosforylace je vazba fosfátové skupiny na kyslík hydroxylové skupiny za tvorby fosfodiesterové vazby. Z funkčního hlediska jsou fosforylace zodpovědné za velké množství procesů, jako jsou buněčná regulace či signalizace [39], nicméně má také vliv na strukturu proteinů. Vlivem nízkého zastoupení a vysoké variability PTM je nelze často stanovit přímo v biologickém materiálu, a proto je nutné před analytickou metodou (např. MS) použít purifikační, biochemický či jiný způsob nabohacení.

4 Hmotnostní spektrometrie

4.1 Úvod do hmotnostní spektrometrie

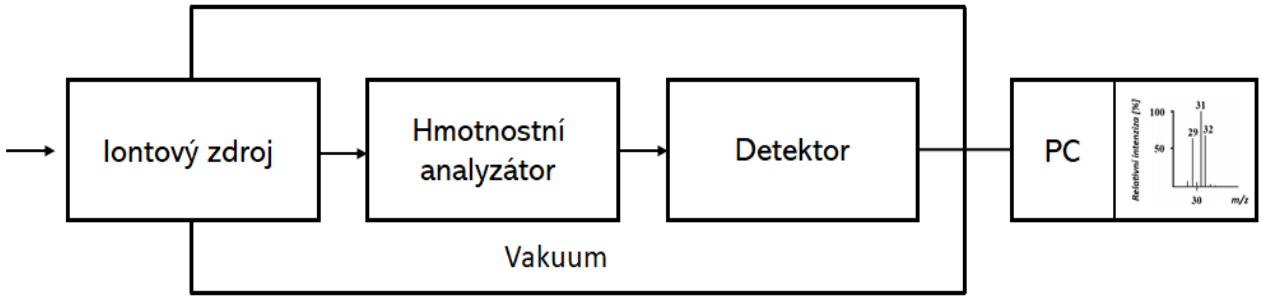
Hmotnostní spektrometrie (MS; z anglického „mass spectrometry“) je vysoce specifická a citlivá analytická metoda, která se využívá pro kvalitativní i kvantitativní identifikaci či ke stanovení struktury různých látek. Základním principem MS je analysa daných molekul ve formě jejich iontů na základě jejich rozdílného chování v magnetickém či elektrickém poli v závislosti na poměru jejich hmotnosti a náboje (*m/z*) s následnou kvantifikací intenzity těchto iontů na detektoru. Jejich zobrazení je nejčastější ve formě hmotnostního spektra (osa x – *m/z*, osa y – intenzita; [59,60]).

V současné době je MS jedna z nejvíce využívaných metod, která se uplatňuje pro analytickou a biochemickou analysu různých látek: proteiny a peptidy (proteomické studie), nízkomolekulární organické látky (např. sekundární metabolity, polutanty či léčiva), ale i stanovení struktury či funkce biomakromolekul (proteiny, RNA a DNA; [39,61]).

Počátky metody MS položily experimenty Lorda Kelvina [59,62], na jehož práci byla formulována základní metodika oboru [63]. Další rozvoj a různorodé využití MS ilustrují příklady od použití MS při vývoji atomové bomby [64] až po současné aplikace ve studiu živých systémů. Pro lepší využití možností různých typů MS jsou spojovány s další rozdělovací/separační analytickou metodou jako je například plynová chromatografie, vysokoúčinná kapalinová chromatografie nebo kapalinová chromatografie [61,65].

4.2 Princip a základní uspořádání MS

Přestože v současné době existují různé varianty a uspořádání hmotnostních spektrometrů, základní schéma a princip je u všech stejný. Každý spektrometr obsahuje tři základní části, kterými jsou iontový zdroj, hmotnostní analysátor a detektor (obr. 4, str. 10). Detektor bývá obvykle napojen na počítač, který převádí a vizualizuje získaná data ve formě spekter. Pro optimální funkci MS je třeba zajistit vysoké vakuum v analysátoru a detektoru. Některé typy iontových zdrojů tolerují i normální tlak a proto mezi zdrojem a analysátorem dochází k diferenčnímu snižování tlaku [60].



Obr. 4 – Základní uspořádání hmotnostního spektrometru: iontový zdroj, hmotnostní analysátor a detektor. V obrázku je vyznačena oblast vysokého vakua. Šipky značí směr dráhy analytu. Převzato a volně upraveno od Pasch and Schrepp, 2003.

Základní podmínkou pro MS měření a získání spektra analytů je převedení jejich molekul na ionty s následným rozdělením v MS analysátoru kvantifikací dopadajících iontů na detektoru poskytující hodnotu o *m/z* jednotlivých analytů.

Po vstupu analysovaného materiálu probíhá ionisace vzorků, která poskytuje jednotlivé ionty v plynné fázi. V dalším kroku se ionty dostávají do hmotnostního analysátoru, který je rozdělí na základě hodnoty *m/z* a po dopadu na detektor je určena absolutní intenzita (četnost) daných iontů, která je v PC následně přiřazena k jednotlivým hodnotám *m/z*. Případně je intenzita vztažena k nejvyšší dosažené hodnotě a pak je v MS spektru zobrazena jako relativní hodnota intenzity a pouze částice, které nesou náboj, mohou být analysované pomocí MS [59,60,66,67]. Správná volba typu ionisace pro daný analyt zaručí úspěšnost MS analysy. Ionisační proces je závislý na vlastnostech analytu jako je jeho těkavost, tepelná stabilita, interakce a uspořádání iontů či molekulová hmotnost daných sloučenin [59].

Na základě množství energie, která se podílí na ionisaci molekul, lze rozdělit ionisační techniky na měkké a tvrdé. Energetická bohatost a typ ionisace souvisí také s tvorbou fragmentů analysovaných molekul. Měkké techniky jsou charakteristické malým přebytkem energie s malým rizikem vzniku fragmentů rozpadem molekuly. Naopak tvrdá ionisační technika může relativně snadno vyvolat fragmentaci, protože přebytek dodané energie je velký.

Různými ionisačními technikami jsou například: a) ionisace nárazem elektronů, b) chemická ionisace, c) ionisace působením elektrického pole, d) ionisace nárazem nebo rychlými ionty, e) ionisace fotony, f) ionisace elektrosprejem anebo g) matricí asistovaná laserová desorpce/ionisace (MALDI). Správný výběr vhodné ionisace je důležitý pro rychlou a přesnou analysu, rozlišení a citlivost měření [68].

Kromě velkého množství různých druhů ionisace existuje také velké množství různých analysátorů, jejichž úkolem je rozdělit směs iontů ve vakuu podle jejich poměru hmotnosti

a náboje (*m/z*) v prostoru nebo v čase. Všechny analysátory využívají statické nebo dynamické elektrické a magnetické pole [59].

Jako analysátor se běžně využívá magnetický analysátor, iontová past, kvadrupólový analysátor, anebo průletový analysátor (TOF; z anglického „time of flight“), který je nejčastěji využíván právě ve spojení s MALDI ionisací.

Poslední významnou součástí MS jsou detektory. Ty slouží k detekci iontů a poskytují signál, který je úměrný intenzitě v analysátoru rozdělených a na detektor dopadajících iontů. Detektory lze rozdělit do dvou skupin: na násobičové detektory a detektory pro přímá měření. Násobičové detektory generují od dopadajících iontů proud elektronů, který je zesílen (dopadající ionty narážejí na povrch detektoru a svojí kinetickou energií generují sekundární elektrony, ty jsou následně stejným principem zesíleny). Výsledný elektrický proud je přímo úměrný intenzitě jednotlivých dopadajících iontů [59]. Výběr vhodného detektoru závisí na experimentálním uspořádání MS a analyse daných látek [59].

Kromě informace o *m/z* analysované látky může MS poskytnout částečně informaci i o její struktuře s využitím tandemového uspořádání (MS/MS). Při něm dochází k energetické aktivaci analysovaného a selektovaného mateřského iontu za vzniku tzv. fragmentových (dceřiných) iontů a neutrálních fragmentů [59].

4.3 MALDI-TOF MS

4.3.1 Ionisační zdroj MALDI

Matricí asistovaná laserová desorpce/ionisace neboli MALDI je měkká ionisační technika MS často využívaná pro analysu a identifikaci různých biomolekul, jako jsou proteiny, peptidy, biomakromolekuly nebo sacharidy a organické látky [60,66]. Kromě tohoto, MALDI je také skvělou metodou pro analysu posttranslačních modifikací [66].

Poprvé byla tato technika aplikována v roce 1988 K. Tanakou, který změřil jako první spektrum hovězího sérového albuminu (BSA; z anglického bovine serum albumin; [69]), nicméně již v roce 1987 Karas a Hillenkamp využili MALDI ke stanovení MS spektra lysosymu [70].

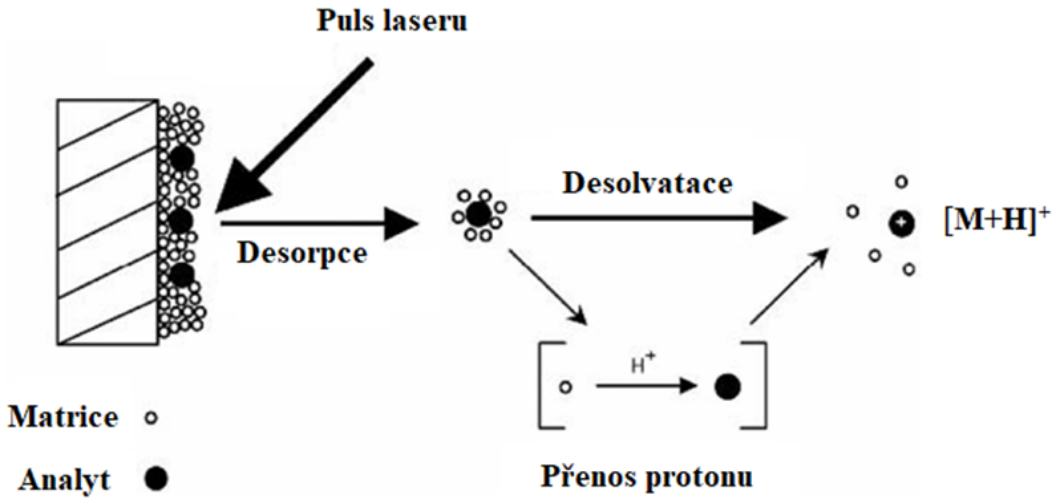
Důležitou součástí MALDI je matrice, která po absorpci energie laseru přechází do plynné fáze a spolu strhává analyt za jeho současné ionisace předáním protonu (obr. 5, str. 12).

Vhodná matrice je vybrána na základě zvoleného typu laseru a musí splňovat tyto vlastnosti: musí být stabilní ve vzorku, je mísitelná s analytem, musí s ním vytvářet pevnou fázi a musí být rozpustná v kompatibilních rozpouštědlech jako je analyt. Typicky se jako matrice

pro UV-lasery využívají malé aromatické organické kyseliny jako jsou 2,5-dihydroxybenzeová kyselina či α-kyano-4-hydroxyskořicová kyselina (HCCA; [66,71]).

Ionty jsou generovány během nebo krátce po laserovém pulsu [67] a jsou v plynné fázi urychlovány elektrostatickým polem, čímž se dostávají k analysátoru [59,60]. Chemická struktura matrice, hmotnost analysovaných proteinů nebo přítomnost postranních řetězců peptidů mohou ovlivnit přenos protonů a tedy i výtěžek ionisace [72].

Výhodou ionisace MALDI je velká citlivost, přesnost a rychlost analýzy, neboť spektrum je získáno během několika mikrosekund s možností proteomické analýzy nejen větších a termálně labilnějších biomolekul, ale i jejich směsí, tedy i PTM peptidů [61,73].



Obr. 5 – Schématické znázornění ionisace s využitím MALDI. Po laserovém ozáření destičky s nanesou matricí a analytem dochází k jejich desorpci a desolvataci s následným přenosem protonu na analyt. Převzato a upraveno od Hoffmann and Stroobant, 2007.

4.3.2 Ionisace elektrosprejem

Druhým nejčastěji využívaným zdrojem měkké ionisace pro analysu biomolekul je ionisace elektrosprejem (ESI), užívaná v tzv. „on-line“ spojení s plynovou nebo kapalinovou chromatografií. Základem ESI je kovová kapilára (sprejující tryska), kterou proudí kapalina s analytem a je na ní přivedeno vysoké napětí. Na konci kapiláry vzniká díky rozdílu potenciálu mezi koncem kapiláry a vstupem do MS pulsující Taylorův kužel, z jehož konce jsou uvolňovány nabité kapičky rozpouštědla s analytem směřující ke vstupu do MS. Odpařováním rozpouštědla z nabité kapky po dosažení Rayleighova limitu dochází ke Coulombickým explozím a zmenšování poloměru kapiček s rozděleným nábojem. Opakováním tohoto děje ve vyhřívané kapiláře, kterou proudí proti částicím proud teplého dusíku, dochází k úplnému

odpaření rozpouštědla a vzniku vícenásobně nabitých iontů analytu, které putují směrem k analysátoru [59].

4.3.3 Průletový analysátor

Průletový analysátor TOF je nejčastěji využívaný analysátor ve spojení s MALDI. Princip TOF je založen na měření doby letu jednotlivých iontů mezi iontovým zdrojem a detektorem. Jakmile ionty opustí iontový zdroj, získávají stejný moment hybnosti a díky rozdílné hodnotě *m/z* získají různou rychlost [59]. Ve vysokém vakuu letové trubice se tedy ionty s nejmenším poměrem *m/z* dostávají k detektoru nejrychleji, zatímco ionty s vyšší hodnotou *m/z* později. Letová trubice může být samostatně označována jako tzv. lineární mód, nebo její součástí může být i reflektor, tzv. reflektorový mód [59], který způsobí prodloužení letu iontů pomocí zakřivení. Změna jejich trajektorie způsobí kromě prodloužení dráhy výrazně vyšší rozlišení signálů *m/z* jednotlivých iontů a zároveň umožní analysovat látky ve větším hmotnostním rozsahu [59]. Výhodou spojení MALDI-TOF je velká rychlost, citlivost a přesnost s neomezeným rozsahem *m/z* analysovaných látek [69].

4.3.4 Kvadrupólový analysátor

Technicky nejjednodušším analysátorem je kvadrupólový analysátor, který separuje pohybující se paprsek iontů v radiofrekvenčním oscilujícím elektrickém poli ve čtyřech tyčích kruhového průřezu podle jejich poměru *m/z* odpovídající určité kinetické energii se stabilní drahou procházejících iontů. Kvadrupól, který může být umístěn před TOF, tak umožňuje rozšíření analytických možností TOF MS o tandemovou MS/MS. Nabité ionty jsou po vstupu do středu osy kvadrupólu rozkmitány a pouze ionty s konkrétní hodnotou *m/z* odpovídající stabilní dráze iontů mohou analysátorem proletět. Ionty, jejichž *m/z* neodpovídá danému napětí a kinetické energii, tedy jejichž rychlost je vyšší či nižší, jsou kvadrupólem zachyceny [59].

5 Cíle práce

Na základě hypotézy, že fosforylační „profil“ na virionu má vliv na infekci a morfogenesi virové částice MPyV je cílem mé bakalářské práce analysovat posttranslační modifikace majoritního kapsidového proteinu VP1 se zaměřením na fosforylace. Dílčí cíle jsou:

1) Porovnat jednotlivé kapsidové proteiny VP1 MPyV získaného z hostitelských savčích buněčných linií 3T6 a WOP. Zároveň mezi sebou porovnat divoký kmen, tzv. „wild-type“ (WT) virus s virovou mutantou nahrazujících geny časné oblasti genem pro luciferasu (pLUC).

2) Zjistit, zda fosforylace může mít efekt na funkční či biologické vlastnosti viru, například na jeho morfogenesi.

3) Optimalizovat příslušné metody pro izolaci viru a příprava těchto vzorků pro proteomickou analysu se zaměřením na PTM (cíleně fosforylace).

6 Materiál a metody

6.1 Materiál

6.1.1 Chemikálie

- Aceton HPLC grade (Merck, USA)
- Acetonitril HPLC grade (Merck, USA)
- Agarosa (Amresco, USA)
- Akrylamid (Sigma, Německo)
- Aprotinin (Sigma, Německo)
- Bromfenolová modř (Sigma, Německo)
- Bright-Glo^{TM} roztok pro luciferasovou assay (Promega, USA)
- Chlorid cesný (Sigma, Německo)
- Chloroform (Lachema, ČR)
- Coomassie Briliant Blue-R250 (CBB-R250; Fluka, Německo)
- DNA Loading Dye pufr (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Dodecylsíran sodný (SDS; Sigma, Německo)
- Ethanol (Lachema, ČR)
- Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA; Fluka, Německo)
- Ethylmorfolin, pH = 8,1 (Sigma, Německo)
- Fenol, pH = 8,0 (Lachema, ČR)
- Fosfowolframová kyselina (PTA; Fluka, Německo)
- Fluorescenční barva 4',6-diamidin-2-fenylindol (DAPI; Sigma, Německo)
- Glycerol (Lachema, ČR)
- Hovězí sérový albumin (Roth, Německo)
- Iodoacetamid (IAA; Sigma, Německo)
- Inhibitory fosfatas (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Isoamylalkohol (Lachema, ČR)
- Isopropanol (Lachema, ČR)
- Kyano-4-hydroxyskořicová kyselina (Bruker Daltonics, USA)
- Luminol (Sigma, Německo)
- Lysační reagent Cell Culture Lysis Reagent (Promega, USA)
- Midori green advance DNA stain barva (Nippon Genetics co. Ltd, Německo)
- Močovina (Carl Roth, Německo)
- Methanol (Lachema, ČR)
- Octan sodný, pH = 5,2 (Penta, ČR)
- Octová kyselina (Lachema, ČR)
- Parafinový olej (Carl Roth, Německo)
- Paraformaldehyd (Sigma, Německo)
- Peroxodisíran amonný (APS; Sigma, Německo)
- Sacharosa (Sigma, Německo)
- Sušené mléko (Sigma, Německo)
- TE pufr (Qiagen, Německo)

- Transfekční roztok Nucleofector Solution V-amaxa kit (Lonza, Švýcarsko)
- Trifluoroctová kyselina (TFA; Fluka, Německo)
- Tetramethylethylenediamin (TEMED; Merck, USA)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Sigma, Německo)
- Tris(2-carboxyethyl)fosfin (TCEP; Sigma, Německo)
- Triton X-100 (Sigma, Německo)
- TurboFect Transfection reagent (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Versen (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Želatina (Sigma, Německo)

6.1.2 Přístroje

- Abbého refraktometr (Carl Zeiss Jena, Německo)
- AMAXA (Lonza, Švýcarsko)
- Centrifuga Hettich universal 320R, úhlový rotor 1620A (Hettich, Německo)
- Centrifuga GS-15R, výkyvný rotor S4180 (Beckman, USA)
- Centrifuga MSE s výkyvným rotorem (MSE, UK)
- CO_2 termostat (Forma Scientific, USA)
- Elektroporátor Gene Pulser Apparatus (Biorad, USA)
- Fluorescenční mikroskop BX60 (Olympus, Japonsko)
- Fluorescenční mikroskop s iluminátorem HXP 120 C (Carl Zeiss Jena, Německo)
- Fluorometr Qubit (Invitrogen, USA)
- Hmotnostní spektrometr MALDI-TOF Ultraflex III (Bruker Daltonics, USA)
- Konfokální mikroskop TCS SP2 Laser Scanning (Leica, Německo)
- Laminární box (Forma Scientific, USA)
- Magnetická míchačka s magnetickým míchadlem IKA® Big Squid (IKA, Německo)
- Mikrocentrifuga MiniSpin plus, statický rotor IL 016 (Eppendorf, Německo)
- Minicentrifuga Microfuge R, statický rotor F241.5 (Beckman, USA)
- Optický mikroskop (Carl Zeiss Jena, Německo)
- Potterův-Eljehvemův homogenizátor (Lab Mark, ČR)
- Prosvěcovač HAMA LP 555 (Hama, Německo)
- Spektrofotometr (DeNovix, USA)
- Spektrofotometr Helios β (Thermo Electron, USA)
- Stolní kývačka/třepačka (Forma Scientific, USA)
- Transmisní elektronový mikroskop JEOL JEM 1200EX (Jeol, USA)
- Třepačka Orbital Shaker (Forma Scientific, USA)
- T_4 DNA ligační pufr (Thermo Fischer Scientific, USA)
- Ultracentrifuga Optima L-92k, výkyvné rotory SW 28, SW 41 (Beckman, USA)
- UV transluminátor (BioLum, USA)
- Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, USA)
- Vakuový koncentrátor SPEED-VAC (Labconco, USA)
- VarioSkan Flash (Thermo Scientific, USA)
- VILBER Fusion FX (Vilber, Německo)

6.1.3 Složení běžně užívaných roztoků

(Pokud není uvedeno jinak, jedná se o roztoky v dH_2O)

- **Fyziologický roztok (PBS):** 0,137M NaCl (Penta, ČR), 2,7mM KCl (Sigma, Německo), 10mM $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ (Sigma, Německo), 1,8mM KH_2PO_4 (Sigma, Německo)
- **Pufr-B**: 10mM Tris, pH = 7,4 (Sigma, Německo), 150mM NaCl , 0,01mM $CaCl_2$ (Sigma, Německo)
- **Roztok A pro bicinchoninovou kyselinu (BCA):** $NaHCO_3$ (Sigma, Německo), BCA v 0,1M NaOH (Sigma, Německo)
- **Roztok B pro BCA:** 4% $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (Sigma, Německo)
- **Tris-borátový pufr (TBE):** 45mM Tris (Sigma, Německo), 45mM kyselina boritá (Sigma, Německo), 1mM EDTA (Fluka, Německo), NaOH, pH = 8,0 (Merck, USA)

6.1.4 Protilátky a antibiotika

- **Ampicilin** (Sigma, Německo) – koncentrace v médiu 100 μg/mL
- **DαG-Ax488** – oslí protilátka proti kozím imunoglobulinům konjugovaná s fluorescenční barvou Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, USA), ředěna 1000x
- **DαM-Ax488** – oslí protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s fluorescenční barvou Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, USA), ředěna 1000x
- **DαRat-Ax488** – oslí protilátka proti krysím imunoglobulinům konjugovaná s fluorescenční barvou Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, USA), ředěna 1000x
- **GαLuc** – kozí protilátka proti luciferase (Molecular Probes, USA), ředěno 100x
- **GαM-Px** – kozí protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidasou (Biorad, USA), ředěna 1000x
- **Kanamycin** (Sigma, Německo) – koncentrace v médiu 100 μg/mL
- **MαVP1-D4** – myší monoklonální protilátka proti proteinu VP1 myšího polyomaviru (připravena RNDr. Alenou Drda Morávkovou, MBA, Ph.D.), ředěna 20x
- **MαVP1** – myší monoklonální protilátka proti denaturovanému VP1 proteinu myšího polyomaviru [74], ředěna 50x
- **RαLT** – krysí protilátka proti velkému T-antigenu (12/2019), ředěna 50x
- **Směs antibiotik pro tkáňové kultury** (Sigma, Německo), 100x koncentrovaný zásobní roztok obsahující 10000 jednotek ampicilinu, 10 mg streptomycinu a 25 mg amphotericinu B na 1 mL (Sigma, Německo).

6.1.5 Ensymy

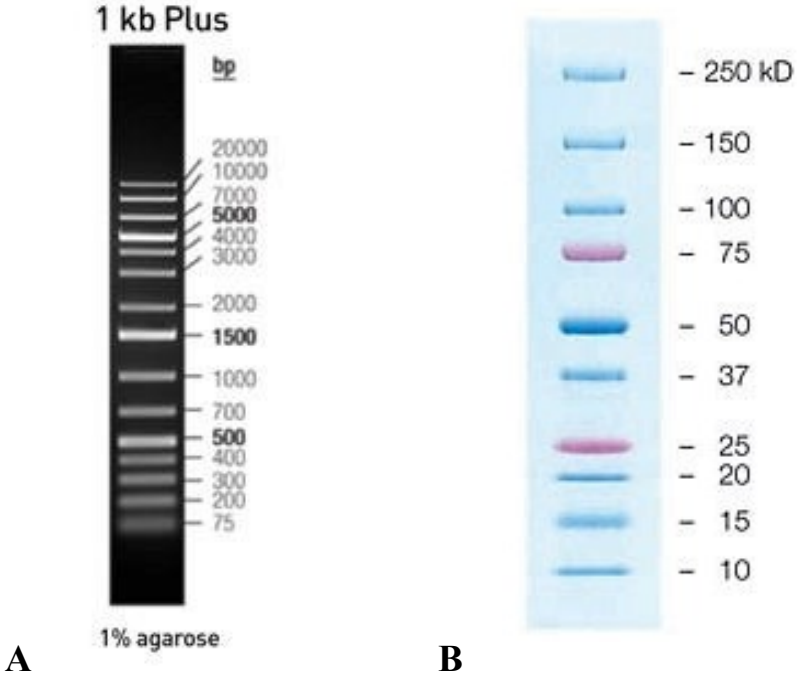
- Restrikční endonukleasy *EcoRI, PstI, NotI* (Fermentas, USA)
- Neuraminidasa z *Vibria cholerae* (Sigma, Německo)
- Trypsin (Promega, USA)
- T_4 DNA ligasa (Thermo Fisher Scientific, USA)

6.1.6 Použitá kultivační média

- **Bezsérové médium** (BSM; Sigma, Německo)
- **Luria-Bertani médium (LB médium):** 1% (w/v) pepton (Imuna, Slovensko), 0,5% (w/v) kvasničný extrakt (Imuna, Slovensko), 1% (w/v) NaCl (Penta, ČR)
- **Médium Dulbecco's Modified Eagle's Medium** (DMEM; Sigma, Německo)
- **DMEM s FBS sérem**: DMEM (Sigma), 10% (v/v) fetální sérum z telete (FBS; Sigma, Německo), 2mM L-glutamin (Gibco, USA)
- **DMEM s FBS a antibiotiky**: DMEM (Sigma, Německo), 10% (v/v) FBS (Sigma, Německo), 2mM L-glutamin (Gibco, USA) s antibiotiky (viz. kapitola 6.1.4, str. 17)
- **RPMI médium s FBS**: RPMI-1640 (Sigma, Německo), 5% (v/v) FBS (Sigma, Německo), 2mM L-glutamin (Gibco, USA)
- **SOC médium**: 2% (w/v) pepton pro bakteriologii (Imuna, Slovensko), 0,5% (w/v) kvasničný extrakt (Imuna, Slovensko), 10mM NaCl (Penta, ČR), 2,5mM KCl (Lachema, ČR), 20mM glukosa (Serva, Německo), 10mM $MgCl_2$ (Sigma, Německo), 10mM $MgSO_4$ (Sigma, Německo).

6.1.7 Standardy pro určení velikosti molekulových hmotností analytů

- DNA standard pro DNA elektroforesu: GeneRuler^{TM} 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Molekulový standard pro proteinovou elektroforesu: Precision Plus Protein standards (Biorad, USA)



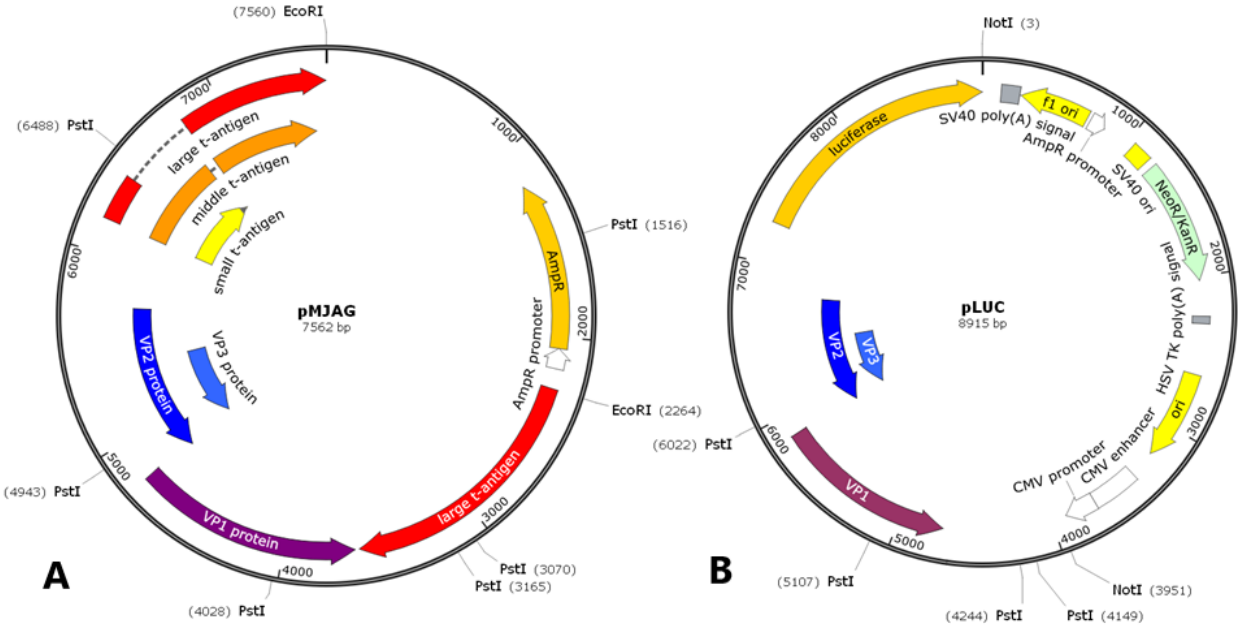
Obr. 6 – Použité standardy molekulových hmotností. A je marker pro DNA elektroforesu – GeneRuler^{TM} 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific). B je molekulový standard pro proteinovou elektroforesu – Precision Plus Protein standards (Biorad).

6.1.8 Ostatní materiál

- Aparatura pro SDS-PAGE SE 260 (Hoefer, USA)
- Dialysační membrána Servapor 21 mm a svorky (Serva, Německo)
- Laboratorní souprava Maxiprep Procedure pro izolaci proteinů (Qiagen, Německo)
- Nitrocelulosová membrána SERVA, NC 45 (Serva, Německo)
- Oligo R3 mikrokolonka (Thermo Fisher Scientific, USA)

6.2 Buněčné kultury a virová inokula

- Top10 bakteriální kmen
  Elektrokompetentní kmen bakterie *E. coli*
  Genotyp: F– mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara leu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG
- Myší polyomavirus, kmen BG (prof. Griffin, Royal Postgraduate School, London)
- NIH-3T6 – linie myších fibroblastů (ATCC; CCL-96)
- Plasmid pLUC (c = 420,0 ng/µL)
- Plasmid pMJAG (c = 364,0 ng/µL)
- Plasmid pGL3 (c = 516,6 ng/µL)
- Virové inokulum, izolát VS, 8/10/18 – odvozen od MPyV, kmen BG
- Virové inokulum, izolát KS, frakce jedna – odvozen od MPyV, kmen BG
- WOP – buněčná linie myších embryonálních fibroblastů (NIH-3T3) transformovaných myším polyomavirem (prof. Amati, Universita La Sapienza, Rome)



Obr. 7 - Mapa plasmidů pMJAG a pLUC. Obrázek A zobrazuje plasmid pMJAG, WT virus s geny pro LT, MT, ST a VP1, VP2 a VP3. Obrázek B zobrazuje plasmid pLUC, tedy virová mutanta s geny pro VP1, VP2 a VP3. Geny časné oblasti jsou zde nahrazeny genem pro luciferasu. Oba plasmidy zobrazují i místa pro štěpní daných restrikčních ensymů. Mapy plasmidů byly vytvořeny v programu SnapGene.

6.3 Práce s tkáňovými kulturami

Kultivace savčích buněk byla prováděna v CO_2 termostatu (Forma Scientific) při teplotě 37 °C s 5% atmosférou CO_2.

6.3.1 Elektroporace plasmidů do bakteriálních buněk a následná kultivace

Následují postup byl proveden pro každý z použitých plasmidů zvlášť, ale stejným způsobem. Bakteriální buňky z TOP10 konzervy a daný plasmid byly rozmrazeny na ledu. K 49 µL bakteriálních buněk byl přidán 1 µL příslušného plasmidu, buď pLUC nebo pMJAG. Tato suspenze byla převedena do vychlazené elektroporační kyvety, která byla vložena do elektroporátoru Gene Pulser Apparatus (Biorad). Po aplikování elektrického pulsu (25 µF, 2,5 kV, 200 Ω) o délce cca 5 ms byl k suspenzi přidán asepticky 1 mL SOC média. Směs byla převedena do Erlenmayerovy baňky (objem 100 mL) a byla provedena inkubace po dobu jedné hodiny při 37 °C a 250 rpm na třepačce (Forma Scientific). Bakteriální suspenze byla poté vyseta na agarosovou plotnu s příslušnými antibiotiky (viz. kapitola 6.1.4) a plotny byly inkubovány při teplotě 37 °C po dobu 16 hodin. Po inkubaci bylo ze sterilního LB média (*1% NaCl, 1% trypton, 0,5% kvasničný lysat, dH_2O*) s příslušnými antibiotiky (c = 100 µg/mL) odebráno 100 mL, ke kterým byla přidána bakteriální kolonie s elektroporovaným plasmidem. Suspense byla inkubována při 250 rpm na třepačce (Forma Scientific) po dobu 18 hod při 37 °C.

6.3.2 Izolace plasmidů pomocí Maxiprep procedury

Suspense bakterií byla centrifugována při 9000 rpm (rotor 1620A, centrifuga Hettich universal 320R) po dobu 5 min. Supernatant byl odstraněn a ze sedimentu byly izolovány plasmidy pomocí laboratorní soupravy Maxiprep Procedure (Qiagen) dle doporučeného návodu. Izolovaný plasmid ve formě sedimentu byl rozpuštěn v 250 µL TE pufru (Qiagen) a byla stanovena jeho koncentrace, tedy pLUC či pMJAG, spektrofotometricky.

6.3.3 Restrikční analysa plasmidů pLUC a pMJAG

Byla připravena restrikční směs pro každý plasmid o celkovém objemu 400 µL podle tab. 1 (str. 21), aby výsledná koncentrace plasmidů byla 80 µg ve 400µL. Po 3 hod inkubaci v CO_2 termostatu (Forma Scientific) při teplotě 37 °C byla provedena pro kontrolu štěpení agarosová elektroforesa (viz. kapitola 6.3.4).

Tab. 1 – Složení restrikčních směsí o celkovém objemu 400 µL

	pLUC	pMJAG
Plasmid	32,7 µL	61,3 µL
Restrikční ensym	5 µL *NotI*	6 µL *EcoRI*
10x pufr dle použitého ensymu	40 µL	40 µL
ddH_2O	322,3 µL	292,7 µL

6.3.4 Agarosová elektroforesa

Pro kontrolu molekul plasmidové DNA byl připraven 1% agarosový gel. Zahřátím byly rozpuštěny 0,3 g agarosy (Amresco) v 0,5% Tris-borátovém pufru (*45 mM Tris, 45 mM H_3BO_3, 1mM EDTA-NaOH, pH=8,0*). K tomuto roztoku bylo přidáno 1,5 µL barvícího činidla MIDORI (Nippon Genetics co. Ltd) a roztok byl nalit do plastové formy, do které byl zasunut vzorkový hřeben. Mezitím byla sestavena aparatura pro agarosovou elektroforesu. Tuhý gel byl následně přenesen do aparatury, zalit 0,5x koncentrovaným TBE pufrem a do jednotlivých jamek byl nanesen molekulový standard 1 kb Protein Gene Ruler Plus (Thermo Fisher Scientific) a ekvivalentní množství vzorků DNA s přídavkem 1 µL 6x koncentrovaného DNA Loading Dye pufru (Thermo Fisher Scientific). Elektroforesa probíhala při 70 V po dobu 60 min. Gel byl následně vizualizován pomocí přístroje VILBER Fusion FX (Vilber).

6.3.5 Přečištění plasmidové DNA pomocí fenol-chloroformové extrakce

Ke 250 µL roztoku s daným plasmidem bylo přidáno 150 µL TE pufru (Qiagen). K této suspenzi bylo přidáno 400 µL fenolu (Lachema) a směs byla důkladně resuspendována, promíchána a centrifugována při 13400 rpm (rotor F241.5, Beckman Microfuge R) po dobu 5 min. Horní vodná fáze byla odebrána do nové zkumavky, ke které bylo přidáno 400 µL fenolu (Lachema), chloroformu (Lachema) a isoamylalkoholu (Lachema) v poměru 25:24:1 (v/v/v). Směs byla znovu resuspendována, promíchána a centrifugována při 13400 rpm (rotor F241.5, Beckman Microfuge R) po dobu 5 min. Horní vodná fáze byla odebrána do sterilní zkumavky, ke které bylo přidáno 400 µL směsi chloroformu (Lachema) a isoamylalkoholu (Lachema) v poměru 24:1 (v/v). Suspenze byla promíchána a centrifugována při 13400 rpm (rotor F241.5, Beckman Microfuge R) po dobu 5 min. Horní vodná fáze byla odebrána do čisté zkumavky, ke které byl přidán 3M octan sodný (Penta) odpovídající desetině objemu vodné fáze a 96% ethanol (Lachema) odpovídající dvou a půl násobku objemu vodné fáze. Směs byla srážena po dobu 16 hod při teplotě -20 °C. Po centrifugaci při 12000 rpm po dobu 5 min (rotor F241.5, Beckman Microfuge R) byl odstraněn přebytečný ethanol a peleta byla propláchnuta 70%

ethanolem (Lachema). Po centrifugaci při 13000 rpm (rotor F241.5, Beckman Microfuge R) po dobu 45 min při 4 °C byla peleta vysoušena na vzduchu při pokojové teplotě od zbytku 70% ethanolu. Následně byla peleta rozpuštěna ve 100 µL ddH_2O (Merck) a byla stanovena spektrofotometricky hodnota $A_{260\,nm}$ a vypočítána koncentrace dsDNA.

6.3.6 Ligace štěpených plasmidů pMJAG a pLUC

Po restrikčním štěpení plasmidů byla provedena ligace jejich genomu. Byla připravena ligační směs podle tab. 2 tak, aby výsledná hmotnost plasmidů v ligační směsi byla 70 µg. Ligační směs byla inkubována po dobu 16 hodin při 14 °C. Ke směsi byl přidán 96% ethanol (Lachema) odpovídající dvou a půl násobku objemu vodné fáze a 3M octan sodný (Penta) odpovídající desetině objemu vodné fáze. Ligační směs byla ponechána přes noc při teplotě -20 °C. Poté následovala centrifugace při 9000 rpm (rotor 1620A, centrifuga Hettich universal 320R) po dobu 60 minut při teplotě 4 °C. Po odstranění supernatantu byla peleta rozpuštěna ve 100 µL ddH_2O a byla provedena agarosová elektroforesa pro kontrolu (viz. kapitola 6.3.4).

Tab. 2 – Složení ligačních směsí a jejich množství

	pLUC	pMJAG
Plasmid	95 µL	95 µL
T_4 DNA ligasa	1,71 µL	1,49 µL
T_4 DNA ligační pufr	0,8 mL	0,69 mL
ddH_2O	7,5 mL	6,5 mL

6.3.7 Transfekce plasmidů do 3T6 a WOP buněčných linií

Z připravených misek s kultivovanými buněčnými kulturami (viz. kapitola 6.4.1) bylo odsáto médium, přidán 1 mL 0,25% (v/v) trypsinu (Sigma) v PBS a 3 mL DMEM s 10% FBS (Sigma) s antibiotiky (viz. kapitola 6.1.4). Médium s trypsinem a uvolněnými buňkami bylo odebráno do čisté ultracentrifugační mikrozkumavky. Pomocí Bürkerovy komůrky a optického mikroskopu (Carl Zeiss) byl stanoven celkový počet buněk v médiu, který činil $4 \cdot 10^7$ buněk. Pro optimální účinnost jedné transfekce bylo potřeba cca $4 \cdot 10^6$ buněk. Pro transfekci pLUC bylo vzato 10 mL DMEM s buňkami a pro transfekci pMJAG bylo vzato 5 mL DMEM s buňkami. Tyto objemy byly převedeny do 20mL centrifugačních plastových zkumavek a byla provedena centrifugace při 1500 rpm (výkyvný rotor, centrifuga MSE) po dobu 10 min při laboratorní teplotě. Supernatant byl odstraněn, k peletě bylo přidáno 100 µL transfekčního roztoku Nucleofector Solution V-amaxa kit (Lonza) a 10 µL daného plasmidu o koncentraci

400 ng/µL dsDNA. Celkové množství 110 µL suspenze bylo převedeno do elektroporační kyvety, která byla umístěna do přístroje AMAXA. Pro WOP buněčnou linii byl použit program U-030 a pro 3T6 buněčnou linii byl použit program T-030. Oba tyto programy poskytují optimální množství pulsů pro dané buněčné linie pro maximální účinnost transfekce. K suspenzi v elektroporační kyvetě bylo přidáno 500 µL RPMI s 5% FBS (Sigma). Po 15 min inkubaci při 37 °C v CO_2 termostatu (Forma Scientific) s 5% atmosférou CO_2 byl na Petriho misku vyset 1 mL transfekovaných buněčných linií s příslušným plasmidem s přídavkem 9 ml DMEM s 10% FBS (Sigma) s antibiotiky (viz. kapitola 6.1.4). Po čtyřhodinové inkubaci při 37 °C s 5% atmosférou CO_2 bylo vyměněno médium a buňky byly dále inkubovány za stejných podmínek.

6.4 Kultivace 3T6 a WOP buněk

6.4.1 Kultivace savčích 3T6 a WOP buněk

Od savčích buněk na Petriho misce bylo odstraněno médium. Buňky byly propláchnuty 2,5 mL 0,25% (v/v) roztokem versenu (Thermo Fisher Scientific) v PBS, byly inkubovány na kývačce (Forma Scientific) a roztok versenu byl odstraněn. K buňkám byl přidán 1 mL 0,25% (w/v) trypsinu (Sigma) v PBS a následně 3 mL DMEM s 10% FBS (Sigma). Buňky byly v daném médiu důkladně resuspendovány a v alikvótech byly rozděleny do nových Petriho misek. 3T6 buňky byly rozděleny v poměru 1:3 až 1:8, WOP buňky byly rozděleny v poměru 1:3 až 1:12 na základě jejich hustoty na Petriho misce. K tomuto množství buněk bylo dále přidáno 8 mL DMEM s 10% FBS (Sigma). Buňky byly ponechány na kývačce po dobu 5 min pro jejich rovnoměrné rozprostření a byly inkubovány v CO_2 termostatu (Forma Scientific) s 5% atmosférou CO_2 při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Na základě hustoty byly buňky sklizeny a převedeny do nového média jednou za 3-4 dny.

6.4.2 Infekce savčích 3T6 a WOP buněk

Po 24 hodinách od pasážování byla provedena kontrola hustoty buněk pod optickým mikroskopem (Carl Zeiss). Po odsátí média byly buňky opláchnuty 3 mL BSM (Sigma) a byl k nim přidán 1 mL BSM (Sigma) spolu s 250 µL virového inokula (MPyV, BG strain). Buňky byly ponechány na kývačce po dobu 5 min pro rovnoměrné rozprostření virového inokula mezi buňky a poté byly inkubovány v CO_2 termostatu (Forma Scientific) s 5% atmosférou CO_2 při teplotě 37 °C po dobu 60 min. Během této doby byly misky každých 20 minut promíchány. Poté bylo k buňkám přidáno 8 mL DMEM s 10% FBS (Sigma) a směs antibiotik (viz. kapitola 6.1.4) a misky s buňkami byly vráceny zpět do CO_2 termostatu.

6.5 Izolace viru MPyV

Pracovní postup od kapitoly 6.5.1 byl stejný pro všechny buněčné linie 3T6 a WOP s přídavkem i bez přítomnosti inhibitorů fosfatas. Jediným rozdílem bylo, že všechny použité roztoky využívané pro izolaci buněk s inhibitory fosfatas obsahovaly tyto inhibitory fosfatas připravené rozpouštěním jedné tablety inhibitoru fosfatas (Thermo Fisher Scientific) do 10 mL příslušného roztoku.

6.5.1 Izolace 3T6 a WOP buněčných linií

Buňky 3T6 a WOP na Petriho miskách, ke kterým byl přidán MPyV, byly třikrát zamraženy na teplotu -4 °C a poté rozmrazeny zpět na laboratorní teplotu z důvodu lyse buněk a uvolnění virionů ze savčích buněk. Po posledním rozmrazení byly buňky z Petriho misek kvantitativně převedeny do sterilních centrifugačních zkumavek.

Buňky, které byly transfekovány plasmidy pMJAG a pLUC a měl k nim být přidán inhibitor fosfatas (Thermo Fisher Scientific), byly kvantitativně převedeny do sterilní centrifugační kyvety. Buněčná suspenze s médiem byla centrifugována při 2000 rpm (rotor S4180, centrifuga Beckman GS-15R) po dobu 10 min při 4 °C. Supernatant byl slit do nové sterilní centrifugační kyvety, ze které bylo odebráno 10 mL, ve kterých byla rozpuštěna jedna tableta inhibitorů fosfatas (Thermo Fisher Scientific). Těchto 10 mL s inhibitorem fosfatas bylo vráceno zpět k peletě, která byla důkladně resuspendována. Centrifugační kyvety byly třikrát zamraženy na teplotu -4 °C a poté byly rozmrazeny při teplotě 4 °C.

6.5.2 Isokinetická centrifugace v sacharosovém gradientu

Rozmražená suspenze virů a savčích buněk byla centrifugována při 4800 rpm (rotor S4180, centrifuga Beckman GS-15R) po dobu 40 minut při teplotě 4 °C. Supernatant byl odebrán do sterilní nádoby a uschován při 4 °C. Sediment byl důkladně resuspendován v 1 mL pufru-B a byl inkubován přes noc při 4 °C. Poté následovala homogenizace v Potter-Eljehvem homogenizátoru, který byl předem propláchnut ethanolem (Lachema) a pufrem-B. Sediment resuspendovaný v 1 mL pufru-B byl kvantitativně převeden do homogenizátoru, resuspendován a homogenizován na ledu, a následně kvantitativně převeden do sterilní 50mL centrifugační zkumavky s přídavkem 6 μL neuraminidasy (Sigma) o koncentraci 25U/mL a 6 μL aprotininu (Sigma) o koncentraci 1μL/mL na základě objemu suspenze. Na 1 mL suspenze připadá 1 μL neuraminidasy a 1 μL aprotininu. Suspenze s přidanými roztoky byla inkubována přes noc při laboratorní teplotě na kývačce (Forma Scientific). Následně byla provedena centrifugace za již uvedených podmínek. Vzniklý supernatant byl spojen s předchozím a uskladněn při 4 °C.

K sedimentu byl přidán 1 mL 10mM Tris (Sigma) a vzniklý roztok byl ponechán na kývačce (Forma Scientific) po dobu 4 hod při laboratorní teplotě. Suspenze byla znovu centrifugována za stejných podmínek a odebraný supernatant byl spojen s předchozími. Spojené supernatanty v ultracentrifugačních kyvetách byly podvrstveny 3 mL 10% (w/v) roztokem sacharosy (Lach-Ner) a byly centrifugovány při 25000 rpm po dobu tří hodin při teplotě 4 °C (rotor SW28, ultracentrifuga BECKMAN optima L-90K). Supernatant byl odstraněn a sediment byl resuspendován v 1 mL pufru-B při teplotě 4 °C.

6.5.3 Isopiknická centrifugace v rovnovážném CsCl gradientu

Resuspendované sedimenty (viz. kapitola 6.5.2), které byly kvantitativně převedeny do předem propláchnutého Potter-Eljehvem homogenizátoru ethanolem (Lachema) a pufrem-B, byly resuspendovány a homogenizovány na ledu. Homogenní suspenze byla rozdělena v ekvivalentním množství do tří ultracentrifugačních kyvet, byla doplněna pufrem-B do celkového objemu 8 mL a do každé kyvety bylo přidáno 3,7 g CsCl (BDH). Pomocí Abbého refraktometru (Carl Zeiss) byl zjištěn index lomu tak, aby odpovídal hodnotám mezi 1,363-1,366, popřípadě bylo přidáno nezbytné množství CsCl. Suspenze v ultracentrifugační kyvetě byla převrstvena parafinovým olejem (Carl Roth) a byla provedena centrifugace při 35000 rpm (rotor SW41, centrifuga BECKMAN optima L-90K) po dobu 24 hodin při teplotě 18 °C. Po ukončení centrifugace byl parafinový olej odebrán a byly jímány jednotlivé frakce pro rozdělní gradientů podle obsahu virových partikulí.

6.5.4 Dialysa a finální úprava vzorků

Na základě refraktometrického stanovení (viz. kapitola 6.6.1) a Dot Blot (viz. kapitola 6.6.2) byly vhodné frakce obsahující virové partikule (plné a prázdné částice) převedeny a uzavřeny v jednotlivých dialysačních membránách (Serva), které byly předem vařeny ve vodě po dobu 10 min. Dialysa probíhala dvoukrokově, nejprve 30 min při teplotě 10 °C za stálého míchání proti jednomu litru 10% (v/v) pufru-B v dH_2O (Merck) a následně po dobu 72 hodin v 1,5 L nového podílu 10% (v/v) pufru-B za stejných podmínek. Jednotlivé dialysované frakce virových částic byly kvantitativně převedeny do ultracentrifugačních kyvet, podvrstveny 3 mL 10% (w/v) sacharosovým roztokem (Lach-Ner) a vzorky byly centrifugovány při 35000 rpm (rotor SW41, ultracentrifuga BECKMAN optima L-90K) po dobu 3 hodin při teplotě 4 °C. Supernatant byl odstraněn a sediment byl rozpuštěn v 300 µL pufru-B a uskladněn při -20 °C.

6.6 Charakterizace MPyV ve vzorcích

6.6.1 Refraktometrie

Pomocí Abbého refraktometru (Carl Zeiss) byly zjištěny a zaznamenány indexy lomu jednotlivých frakcí z důvodu zjištění hustoty virových partikulí a pro následné rozdělení jednotlivých frakcí pro další analysu. Z každé frakce bylo odebráno 10 µL roztoku, který byl nanesen na měřící plošku Abbého refraktometru (Carl Zeiss) a byl změřen index lomu. Pro interpretaci získaných výsledků lze využít experimentálně získaná data: plné virové partikule mají hustotu 1,33 g/mL, čemuž odpovídá refraktometrický index v rozmezí přibližně 1,364 – 1,366. Prázdné virové partikule mají hustotu 1,29 g/mL, čemuž odpovídá refraktometrický index 1,362 – 1,363 [75].

6.6.2 Dot Blot

Jako další diagnostická metoda pro kvalitativní charakteristiku jednotlivých frakcí byl proveden Dot Blot. Na nitrocelulosovou membránu NC 45 (SERVA) byly naneseny 2 µL z každé frakce s následnou blokací roztokem 5% (w/v) nízkotučného sušeného mléka v PBS po dobu 60 minut. Poté byla membrána inkubována 1 mL 5% (w/v) sušeného mléka v PBS s MαVP1 primární protilátkou, ředěnou v poměru 1:50, po dobu 60 minut při laboratorní teplotě. Po vazbě byla membrána s primární protilátkou promyta třikrát 10 minut v PBS. Poté byla membrána inkubována 1 mL 5% (w/v) nízkotučného sušeného mléka v PBS s GαM sekundární protilátkou značenou křenovou peroxidasou po dobu 30 minut. Po vazbě byla membrána promyta třikrát 10 minut v PBS. Membrána byla vizualizována suspenzí smíchanou roztokem A *(0,1M Tris-HCl, (pH = 8,5), 250mM luminol, 90mM (v/v) kyselina p-kumarová v dH_2O)* a roztokem B *(0,1M Tris-HCl, (pH = 8,5), 0,02% (v/v) H_2O_2 v dH_2O v poměru 1:1*) v poměru 1:1 po dobu 20 s při laboratorní teplotě. Po vyvolání byla nitrocelulosová membrána vizualizována pomocí přístroje VILBER Fusion FX (Vilber).

6.6.3 Elektronová mikroskopie

Pro kvalitativní stanovení a detekci virových partikulí byl použit transmisní elektronový mikroskop (TEM).

Z důvodu práce v bezprašném a čistém prostředí, byl nejprve rozložen parafilmový proužek na pracovní stůl. Aktivovaná elektron-mikroskopická (EM) síťka byla přenesena do 5 µL virové suspenze po dobu 10 minut při laboratorní teplotě na parafilm. Poté byla EM síťka přenesena na 100 µL ddH_2O (Merck), po 30 s byla přenesena do dalších 100 µL ddH_2O (Merck). EM síťka byla následně přenesena na kapku 50 µL roztoku 2% (v/v) kyseliny

fosfowolframové (Fluka), ze které byla po jednominutové inkubaci přenesena na nový alikvót 50 µL roztoku 2% (v/v) PTA (Fluka). Přebytečná kapalina z EM síťky byla odsáta filtračním papírem s následným zaschnutím při laboratorní teplotě. Vzorky na EM síťkách byly pozorovány pomocí elektronové mikroskopu JEOL JEM 1200EX (Jeol).

6.6.4 Imunofluorescence buněčných linií

Imunofluorescenční sklíčko bylo opláchnuto ethanolem (Lachema), protaženo plamenem a bylo umístěno do 24-jamkové destičky. Ke každému sklíčku byl přidán 1 mL DMEM s 10% FBS (Sigma) a 50 µL buněk transfekovaných plasmidy, buď pMJAG anebo pLUC. Po čtyřhodinové inkubaci při teplotě 37 °C v CO_2 termostatu (Thermo Scientific) bylo vyměněno médium. Po další 24-hod inkubaci byly buňky kontrolovány pod optickým mikroskopem (Carl Zeiss), bylo od nich odstraněno médium a sklíčka se zachycenými buňkami byla propláchnuta 1 mL PBS pufru.

Po fixaci buněk na povrch sklíček v 3,7% (v/v) paraformaldehydu (Sigma) v PBS po dobu 20 min při laboratorní teplotě byla sklíčka s buňkami opláchnuta 1 mL PBS pufru po dobu 5 min. Byla provedena permeabilizace membrány buněk přídavkem 500 µL 0,5% (v/v) Tritonu X-100 (Sigma) po dobu 5 min při laboratorní teplotě. Poté bylo třikrát provedeno opláchnutí buněk 1 mL PBS pufru, kde po třetím opláchnutí byla prodloužena inkubace na 10 min při laboratorní teplotě. Sklíčka s buňkami byla opláchnuta 500 µL 0,25% (v/v) BSA (Roth) a 0,25% (v/v) želatiny (Sigma) v PBS pufru po dobu 30 min. Po odstranění roztoku bylo do každé jamky přidáno 200 µL roztoku primární protilátky ředěné v 0,25% (v/v) BSA/želatina v PBS pufru o koncentraci 2 mg/mL. U virů obsahující plasmid pMJAG byla použita MαVP1 primární protilátka, ředěná v poměru 1:50, zatímco pro viry s plasmidem pLUC byla použita GαLuc primární protilátka, ředěna v poměru 1:100. Po odstranění roztoku primární protilátky byla sklíčka s buňkami opláchnuta třikrát jedním mL PBS pufru a bylo přidáno 200 µL roztoku sekundární protilátky ředěné v 0,25% (v/v) BSA/želatina v PBS pufru, které byly inkubovány po dobu 30 minut ve tmě při laboratorní teplotě. Pro viry s plasmidem pMJAG byla použita DαM-Ax488 sekundární protilátka, ředěna v poměru 1:1000, zatímco pro viry s plasmidy pLUC byla použita DαG-Ax488 sekundární protilátka, ředěna v poměru 1:1000. Po odstranění roztoků sekundárních protilátek byla sklíčka s buňkami opět třikrát propláchnuta 1 mL PBS pufru, 500 µL dH_2O (Merck) a byla umístěna do 2 µL 70% (v/v) glycerolu (Lachema) s fluorescenční barvou DAPI (Sigma). Takto připravená sklíčka byla vizualizována na fluorescenčním mikroskopu BX-60 (Olympus).

6.6.5 Kontrola virem infikovaných buněk

Pro testování kontroly částic a kontaminace bylo použito imunofluorescenční stanovení, tedy obdobný pracovní postup jako v kapitole 6.6.4.

Imunofluorescenční sklíčko bylo opláchnuto ethanolem (Lachema), protaženo plamenem a bylo umístěno do 24-jamkové destičky. Do každé jamky bylo přidáno 500 µL DMEM s 10% FBS (Sigma) a buněčnou suspenzí o celkové koncentraci $3 \cdot 10^4$ buněk/jamka. Jako pozitivní kontrola byl použit virus MPyV (izolát KS virus, BG strain). Destička se sklíčky byla umístěna do CO_2 termostatu (Thermo Scientific) s 5% atmosférou CO_2 po dobu 12 hod při 37 °C. Poté byl roztok odsát a sklíčka s buňkami byla opláchnuta 500 µL BSM (Sigma). Do jednotlivých jamek bylo přidáno 150 µL BSM (Sigma) a na základě koncentrací proteinů příslušné množství dané virové suspenze tak, aby výsledné množství bylo $3 \cdot 10^8$ virionů/jamka. Destička se sklíčky a buňkami byla inkubována v CO_2 termostatu (Thermo Scientific) s 5% atmosférou CO_2 po dobu 1 hod při 37 °C. Po odstranění roztoku byl do jednotlivých jamek přidán 1 mL DMEM s 10% FBS (Sigma) a směs antibiotik (viz. kapitola 6.1.4) a buňky byly inkubovány po dobu 36 hodin za již zmíněných podmínek. Poté byly buňky zkontrolovány pod optickým mikroskopem a byl použit stejný pracovní postup, jaký je popsán ve druhém odstavci kapitoly 6.6.4. Nicméně v tomto postupu byly využity jiné protilátky, a to RαLT primární protilátka, ředěná 1:50, GαLuc primární protilátka, ředěna 1:100, DαRat-Ax488 sekundární protilátka, ředěná 1:1000 a DαGoat-Ax488 sekundární protilátka, ředěna 1:1000. Všechny byly ředěny v 0,25% (v/v) BSA/želatina v PBS pufru o koncentraci 2 mg/mL.

6.6.6 Stanovení aktivity luciferasy v buněčné linii

Do jednotlivých jamek mikrotitrační destičky bylo naneseno 100 µL suspenze savčích 3T6 buněk spolu s DMEM s 10% FBS (Sigma) o koncentraci 8000 buněk/jamka. Destička s buňkami byla inkubována v CO_2 termostatu (Thermo Scientific) s 5% atmosférou CO_2 při 37 °C po dobu pěti hodin. Po inkubaci bylo odstraněno médium a jamky byly opláchnuty 200 µL BSM (Sigma). Savčí 3T6 buňky byly infikovány virovými částice ze vzorků 3T6_WT, 3T6_pLUC, WOP_WT a WOP_pLUC. Virus, jehož koncentrace byla zjištěna metodou bicinchoninové kyseliny (viz. kapitola 6.7.1, str. 29), byl naředěn BSM (Sigma) do výsledné koncentrace 200 ng virus/jamka. Do jednotlivých jamek bylo pipetováno 100 µL virové suspenze v kvadruplikátech a buňky byly inkubovány v CO_2 termostatu (Forma Scientific) s 5% atmosférou CO_2 při 37 °C po dobu 60 min. Poté bylo k buňkám přidáno 100 µL DMEM s 10% FBS (Sigma) a antibiotiky (viz. kapitola 6.1.4).

Jako pozitivní kontrola byl použit plasmid pGL3, který byl připraven smícháním 80 µL BSM (Sigma) spolu s 0,8 µg tohoto plasmidu. Po důkladném promíchání bylo přidáno 1,6 µL transfekčního roztoku TurboFect (Thermo Fisher Scientific) do celkového objemu. Po 20 min inkubaci při laboratorní teplotě bylo přidáno 20 µL této virové suspenze k buňkám do vybraných jamek mikrotitrační destičky. Jako negativní kontrola byly použity samotné savčí 3T6 buňky s DMEM a 10% FBS (Sigma). Po 48 hodinové inkubaci v CO_2 termostatu (Thermo Scientific) s 5% atmosférou CO_2 při 37 °C byly jamky s buňkami opláchnuty 100 µL PBS pufru, do jamek bylo přidáno 40 µL (v/v) 5x koncentrovaného Cell Culture Lysis Reagent (Promega) pro lysi buněk a destička byla umístěna do -80 °C po dobu 5 min. Poté bylo z destičky odebráno 20 µL infikovaných buněk, pozitivní a negativní kontroly do nové destičky, ke vzorkům bylo přidáno 20 µL roztoku Bright-Glo™ (Promega) a bylo provedeno stanovení aktivity luciferasy na přístroji VarioSkan Flash (Thermo Scientific). Snímáno bylo v 200ms časových intervalech.

6.7 Práce s proteiny

Z hodnoty absorbance vzorků proteinů při vlnové délce λ = 280 nm byl získán odhad koncentrace proteinů ve vzorcích [λ = 280 nm diagnostická vlnová délka, λ = 600 nm pro odečtení pozadí UV-VIS].

6.7.1 Stanovení koncentrace proteinů spektrofotometricky a metodou bicinchoninové kyseliny

Vzorky, se kterými bylo pracováno, byly rozmrazeny na ledu při laboratorní teplotě. 2 µL byly naneseny na měřící plošku spektrofotometru DeNovix (Thermo Fisher Scientific). Po zvolení vhodného programu byla zjištěna absorbance proteinů při vlnové délce λ = 280 nm a následně koncentrace.

Pro stanovení koncentrace metodou BCA bylo do příslušných jamek mikrotitrační destičky pipetováno 5 µL vody (blank), 5 µL standardů (BSA o koncentraci 0,2, 0,5 a 1 mg/mL; Sigma) a 5 µL daných vzorků v ředění dle odhadu koncentrace z hodnoty absorbované při vlnové délce λ = 280 nm. Následně bylo přidáno 95 µL roztoku, který vznikl smícháním roztoku A (*$NaHCO_3$, Na_2CO_3, BCA v 0,1M NaOH*) a roztoku B (*4% $CuSO_4 \cdot 5H_2O$*) v poměru 1:49. Mikrotitrační destička s nanesenými roztoky byla inkubována po dobu 60 min při 37 °C. Výsledné zabarvení bylo kvantifikováno spektrofotometricky – stanovení absorbance vzorků při vlnové délce λ = 562 nm. Ze získaných hodnot standardů byla sestavena kalibrační přímka a byla zjištěna koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích.

6.7.2 Příprava vzorku na SDS elektroforesu v polyakrylamidovém gelu

Po optimalizaci vhodné přípravy vzorků byl každý vzorek rozmrazen na ledu při laboratorní teplotě. Následně byl důkladně resuspendován a inkubován na stolní sonikační lázni (Elma) po dobu 5 min. Po sonikaci byl vzorek centrifugován při 14500 rpm (rotor IL 016, centrifuga Eppendorf) po dobu 2 min. Poté bylo odebráno 5 nebo 10 µL supernatantu z daného vzorku. K tomuto množství bylo přidáno pro testování vlivu denaturačních činidel příslušné množství 5 µL 8M močoviny (*8M močovina, 50mM Tris, 1mM EDTA)* nebo ekvivalentní množství dH_2O (Merck). Před nanesením byly všechny vzorky inkubovány s přídavkem vzorkového pufru *(glycerol, dH_2O, 0,5M TrisCl (pH = 6,8), 0,01% bromfenolová modř)* po dobu 5 min při 98 °C. Z výsledného množství bylo naneseno 20 µL do jamek v polyakrylamidovém gelu.

6.7.3 Precipitace proteinů

Vzorek byl rozmrazen na ledu při laboratorní teplotě, důkladně resuspendován a inkubován v sonikační lázni (Elma) po dobu 5 min. Po centrifugaci při 14500 rpm (rotor IL 016, centrifuga Eppendorf) po dobu 2 min bylo odebráno 100 µL supernatantu do nové zkumavky, následně přidáno 900 µL předchlazeného (-20 °C) acetonu (Merck) nebo acetonitrilu (Merck) a vzorky byly inkubovány při teplotě -20 °C přes noc. Po centrifugaci při 14500 rpm (rotor IL 016, centrifuga Eppendorf) po dobu 20 min byl odstraněn supernatant a peleta vysušena pomocí vakuového koncentrátoru SPEED-VAC (Labconco). Následně byla peleta rozpuštěna v 10 µL 8M močoviny (*8M močovina, 50mM Tris, 1mM EDTA)* a suspenze byla inkubována v sonikační lázni (Elma) po dobu 5 min. Ke vzorku bylo následně přidáno 5 µL ddH_2O (Merck), 5 µL vzorkového pufru *(glycerol, dH_2O, 0,5M TrisCl (pH = 6,8), 0,01% bromfenolová modř)* a po povaření 5 min při teplotě 98 °C byl vzorek přenesen do jamek polyakrylamidového gelu.

6.7.4 SDS elektroforesa v polyakrylamidovém gelu

Pro SDS elektroforesu v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE) byl připraven 10% separační gel (*30% akrylamid, dH_2O, 1,5M Tris (pH = 6,8), 10% SDS, 10% APS, TEMED*), který byl převrstven dH_2O. Po sestavení aparatury na SDS-PAGE a ztuhnutí separačního gelu byl namíchán 10% zaostřovací gel (*30% akrylamid, dH_2O, 1M Tris (pH= 8,8), 10% SDS, 10% APS, TEMED*). Po zaschnutí byl gel umístěn do aparatury na SDS-PAGE, která byla naplněna elektrodovým pufrem *(5g/L Tris, glycin, 10% SDS)*. Po nanesení molekulového

standardu dle návodu výrobce (Precision Plus standards, Biorad) a příslušných vzorků probíhala vlastní elektroforesa při konstantním proudu 20 mA.

6.7.5 Fixace a barvení po SDS-PAGE

Po ukončení SDS-PAGE byl gel barven Coomassie Briliant Blue R250 (*45% CH_3OH, 45% dH_2O, 10% CH_3COOH, 3g/L CBB-R50*) na třepačce (Forma Scientific) po dobu minimálně 60 min s následným odbarvením pozadí pomocí 50% ethanolu a 10% (v/v) kyselina octová (Lachema).

6.8 Příprava vzorku na MALDI-TOF

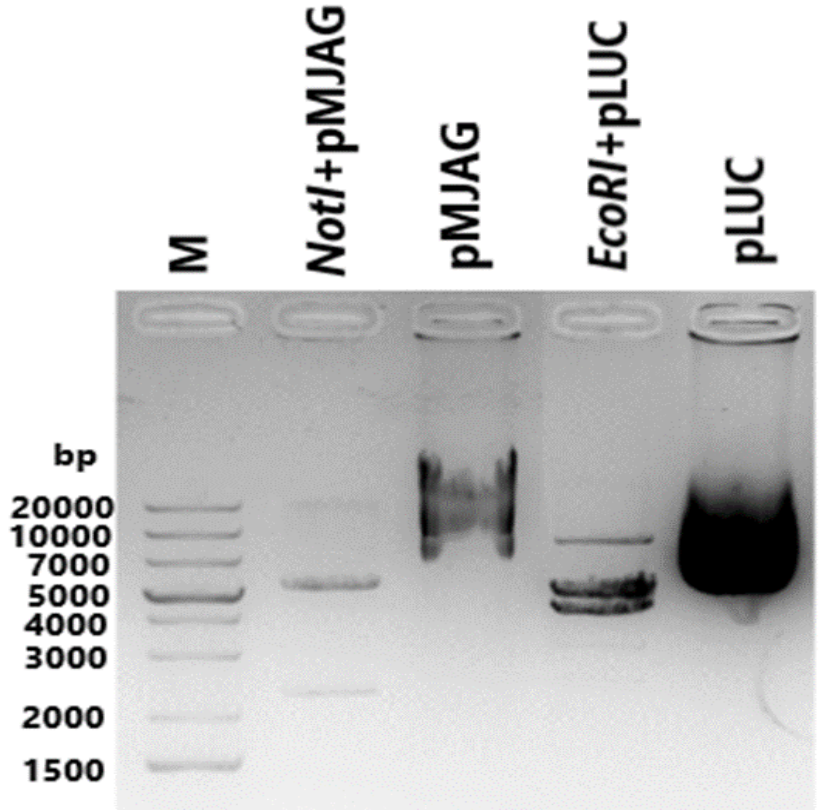
Z gelu SDS-PAGE byly na prosvěcovači (Hama) vyříznuty požadované proužky gelu s proteiny a následně rozřezány na malé kousky o objemu přibližně 1 mm^3. Ty byly odbarveny pomocí 50mM EtMf (pH = 8,1) v 50% ACN v sonikační lázni (Elma). Po odstranění supernatantu bylo ke vzorku přidáno 100 µL ACN, který byl po sonikaci odstraněn. Postranní řetězce cysteinu byly redukovány přídavkem 30mM TCEP ve 100 mM EtMf (pH = 8,1) po dobu 20 minut při teplotě 70 °C. Ke vzorku bylo přidáno 100 µL ACN, supernatant byl odstraněn a ke kouskům gelu bylo přidáno 20 µL 30mM IAA/ 100mM EtMf (pH = 8,1). Po 60 min inkubaci ve tmě při laboratorní teplotě bylo ke vzorku přidáno 100 µL ACN, byla provedena sonikace a supernatant byl odstraněn. Následně byly kousky gelu postupně promyty opakovaně (dvakrát) 100 µL dH_2O a 100 µL ACN v sonikační lázni (Elma) po dobu 5 min s finálním promytím 50% ACN (v/v). Po odstranění supernatantu byl gel vysušen v rotačním vakuovém koncentrátoru SPEED-VAC (Labconco) po dobu 10 minut a ke vzorku bylo přidáno 30 µL 50mM EtMf/ 100% ACN s přídavkem proteasy (50 ng/µL). Po 12 hodinové inkubaci při teplotě 37 °C byl ke vzorku přidán ACN a TFA do finální koncentrace 30% ACN a 0,1% TFA (v/v) a byla provedena sonikace po dobu 20 minut. Výsledné peptidové směsi byly analysovány pomocí MALDI-TOF MS (Ultraflex III , Bruker Daltonics) v reflektorovém modu přímo po převrstvení 0,5 µL vzorku na terčíku roztokem matrice (0,5 µL 3 mg/mL HCCA v 50% ACN 0,1% TFA (v/v). Před nanesením na terčík byly vzorky předem odsoleny pomocí „home-made“ mikrokolonky s nosičem Oligo R3 (Thermo Fisher Scientific).

7 Výsledky a diskuse

Během této práce byla provedena celá řada kontrolních experimentů ať již z důvodu optimalizace vhodného postupu či kontroly vzorků. Z tohoto důvodu jsou v této kapitole uvedeny pouze nejrelevantnější z nich.

7.1 Restrikční analysa, izolace plasmidů a transfekce

Před zahájením vlastního experimentu bylo pro kontrolu správnosti použitých plasmidů pMJAG a pLUC provedeno několik restrikčních štěpení pomocí různých restrikčních endonukleas (*PstI, EcoRI, NotI)*, po kterých vždy následovala agarosová elektroforesa. Místa, kde dané endonukleasy štěpí jsou zobrazena na obr. 7 (str. 19). Obr. 8 zobrazuje agarosovou elektroforesu směsí plasmidů a restrikčních ensymů po kontrolním štěpení. pMJAG štěpen ensymem *EcoRI* za vzniku teoretických fragmentů velkých 5296 bp a 2264 bp a plasmid pLUC štěpen *NotI* za vzniku fragmentů o velikosti 4967 bp a 3948 bp. Z obrázku je patrné, že se jedná o požadované plasmidy, neboť oba, pMJAG a pLUC, byly rozštěpeny na fragmenty o dané velikosti.



Obr. 8 – Kontrolní gel s porovnáním štěpených a neštěpených plasmidů pMJAG a pLUC. M je marker molekulových hmotností, pMJAG a pLUC jsou neštěpené plasmidy. NotI+pLUC a EcoRI+pMJAG jsou restrikční štěpení těchto plasmidů.

Po ověření byla provedena elektroporace pMJAG a pLUC do *E. coli* TOP10 kompetentních buněk, které byly následně kultivovány. Z buněčné suspenze byly plasmidy izolovány pomocí Maxiprep procedury (Qiagen) dle doporučeného návodu. Následovalo restrikční štěpení s cílem odstranit z genomů plasmidů nadbytečné geny a elementy tak, aby plasmid pMJAG obsahoval pouze časné a pozdní geny a plasmid pLUC pouze pozdní geny a gen pro luciferasu. Pro plasmid pMJAG byla použita *EcoRI* a pro plasmid pLUC *NotI* restrikční endonukleasa (viz. kapitola 6.3.3, str. 20). Štěpené lineární plasmidy byly přečištěny od proteinů a jiných nečistot fenol-chloroformovou extrakcí, po které následovala ligace do kruhové formy. Byla stanovena koncentrace plasmidů spektrofotometricky; 0,364 μg/μL pMJAG s A_{260}/A_{280} 1,86 a 0,42 μg/μL pLUC s A_{260}/A_{280} 1,61. S takto získanými plasmidy byla provedena transfekce do připravených savčích buněčných linií 3T6 a WOP. Vzorky jednotlivých buněčných linií byly nazvány 3T6_pMJAG (neboli 3T6_WT, protože se jedná o „divoký“ virus), 3T6_pLUC, WOP_WT a WOP_pLUC.

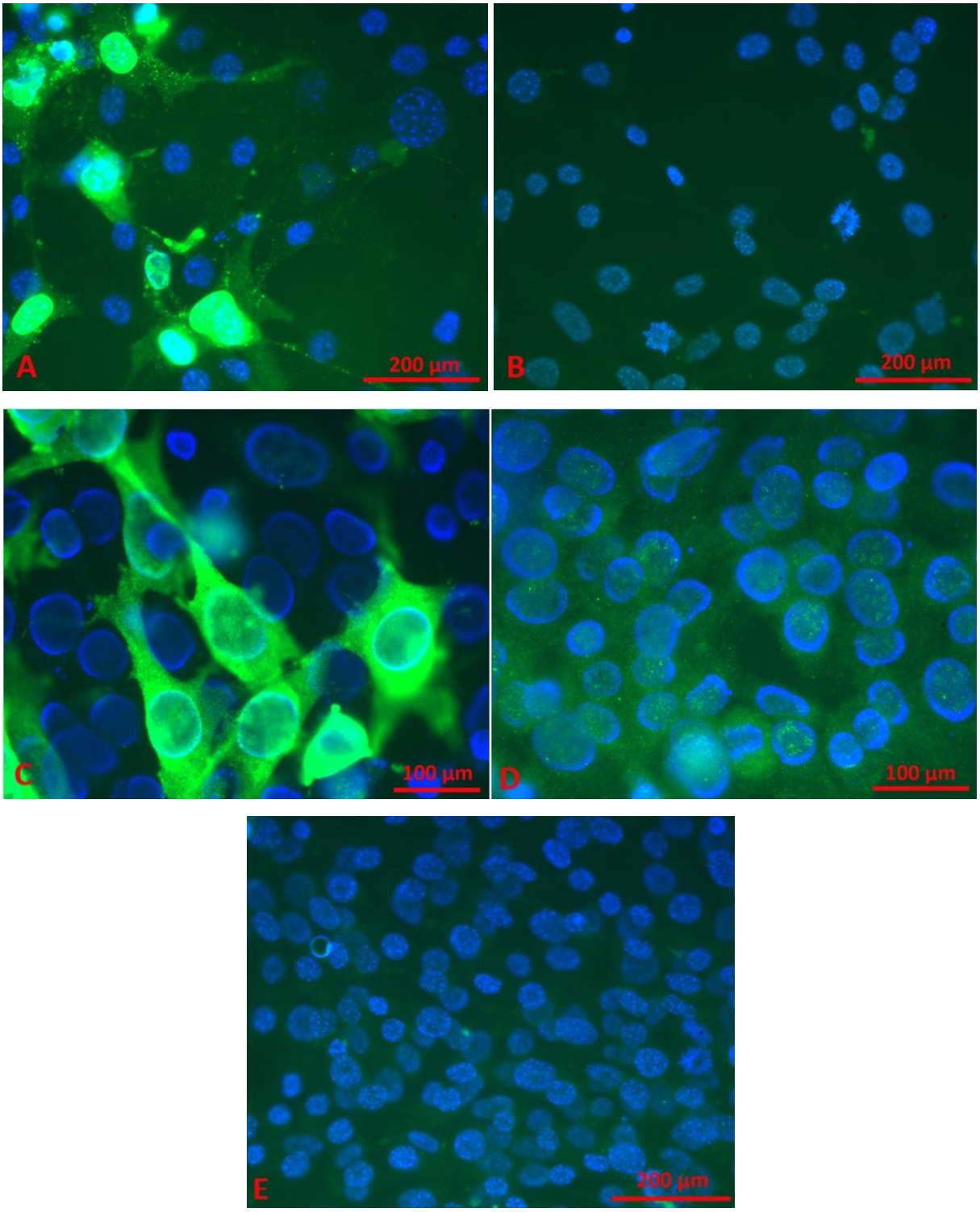
7.2 Imunofluorescence infikovaných savčích buněk

Za 72 hodin po transfekci byla provedena kontrolní imunofluorescence (viz. kapitola 6.6.4, str. 27) z důvodu stanovení přítomnosti virionů v savčích buňkách. Obr. 9 (str. 34) zobrazuje toto imunofluorescenční stanovení. Je zde negativní kontrola (NK), WT virus z plasmidu pMJAG a virová mutanta s delecí genů pro T-antigeny a náhradou za geny pro luciferasu (pLUC) v obou savčích buněčných liniích 3T6 a WOP. Negativní kontrola, shodná pro všechny experimenty, zobrazuje buňky bez virové infekce (obr. 9 E). Viditelné je převážně modré barvení buněčných jader.

Snímky s WT viry, obsahující plasmid pMJAG, zobrazují úspěšné provedení transfekce, neboť dochází k replikaci virionů v hostitelských buňkách v relativně velkém množství z důvodu přítomnosti proteinů LT ve virových částicích. Světlezelené fluorescenční zabarvení v celém obsahu buněk značí přítomnost virionů značených použitím protilátek proti VP1 (obr. 9 A, C).

Světle zelené fluorescenční zabarvení v hostitelských buňkách v případě buněčné linie 3T6 a virové mutanty pLUC, ve které by s ohledem na dosavadní poznatky nemělo docházet k tvorbě virionů, nebylo vizualizováno, stejně jako u experimentu transfekce buněčné linie WOP s virovou mutantou s pLUC. Absence světlezeleného fluorescenčního zabarvení značí úspěšné provedení transfekce, protože ve WOP buněčných liniích byly produkovány pouze virové částice obsahující geny pro luciferasu, nikoliv WT virus, a proto nedochází k virové infekci v hostitelských buňkách (obr. 9 B, D). Na obou snímcích se přesto nachází slabý

světlezelený signál, nicméně jedná se o signál pro pozadí způsobený nastavením fluorescenčního mikroskopu.



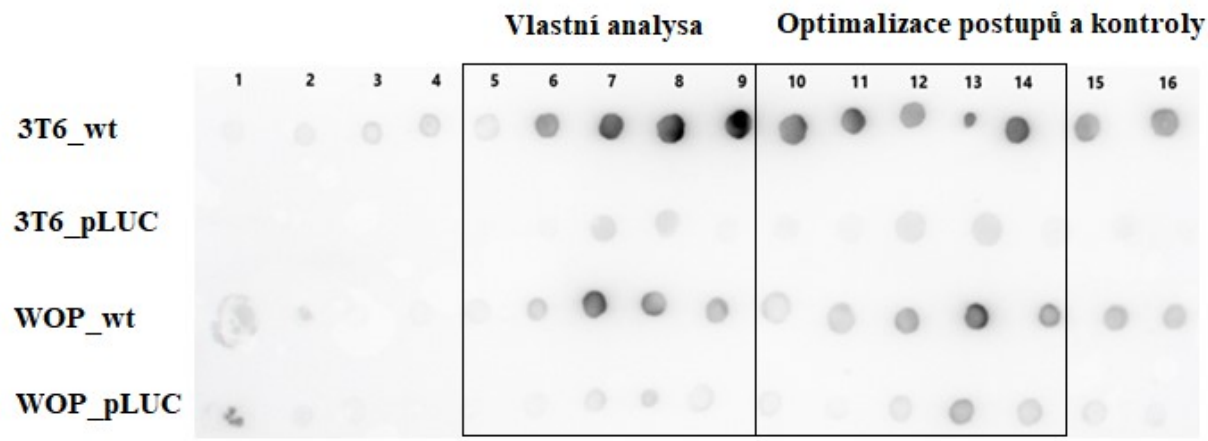
Obr. 9 – Kontrolní snímky z imunofluorescence 3T6 a WOP buněčných liniích po provedení transfekce. Snímek A) zobrazuje WT virus ve WOP b. linii, B) zobrazuje virovou mutantu s pLUC ve WOP b. linii, C) zobrazuje WT virus ve 3T6 b. linii, D) zobrazuje virovou mutantu s pLUC ve 3T6 b. linii a E) zobrazuje negativní kontrolu, která je pro 3T6 a WOP b. linii stejná.

7.3 Izolace virů ze savčích buněčných linií

Viriony byly získány ze savčích buněčných linií metodami izolace popsanými v kapitole 6.5. Na základě refraktometrické analysy (tab. 3, str. 35) a Dot Blot (obr. 10, str. 36) jednotlivých frakcí byly identifikovány takové frakce, jejichž refraktometrický index se nachází v rozsahu hodnot 1,364 – 1,366 a přibližnou hustotou 1,33 g/mL. Na základě stanovení hustoty virionů a přítomnosti proteinu lze detekovat frakce s nejvyšším zastoupením virových částic [75], které by měly zůstat plné a nerozpadlé, tedy vhodné pro další analysu. Tyto virové částice by měly být přítomné ve frakcích 5-9, využitých pro vlastní analysu. Frakce 10-14 byly využity pro optimalizaci postupů a kontroly, jako bylo například zvolení vhodného srážecího činidla či pro rozpouštění vzorků v roztoku močoviny pro správné stanovení koncentrace. Ze spojených frakcí byla provedena finální izolace (viz. kapitola 6.5).

Tab. 3 – Refraktometrický index jednotlivých frakcí. Frakce 5-9 u všech buněčných linií (WOP_WT, WOP_pLUC, 3T6_WT, 3T6_pLUC) byly využity pro vlastní analysu. Frakce 10-14 byly využity pro optimalizaci postupů a kontroly.

Frakce	WOP_WT	WOP_pLUC	3T6_WT	3T6_pLUC
1	1,369	1,376	1,370	1,376
2	1,376	1,376	1,375	1,375
3	1,372	1,374	1,374	1,372
4	1,370	1,370	1,370	1,369
5	1,368	1,368	1,369	1,368
6	1,366	1,367	1,366	1,367
7	1,366	1,367	1,366	1,365
8	1,365	1,365	1,365	1,365
9	1,365	1,364	1,364	1,365
10	1,363	1,364	1,363	1,364
11	1,363	1,363	1,362	1,363
12	1,363	1,363	1,362	1,362
13	1,361	1,362	1,361	1,361
14	1,360	1,360	1,360	1,360
15	1,358	1,359	1,359	1,358
16	1,358	1,358	1,358	1,358

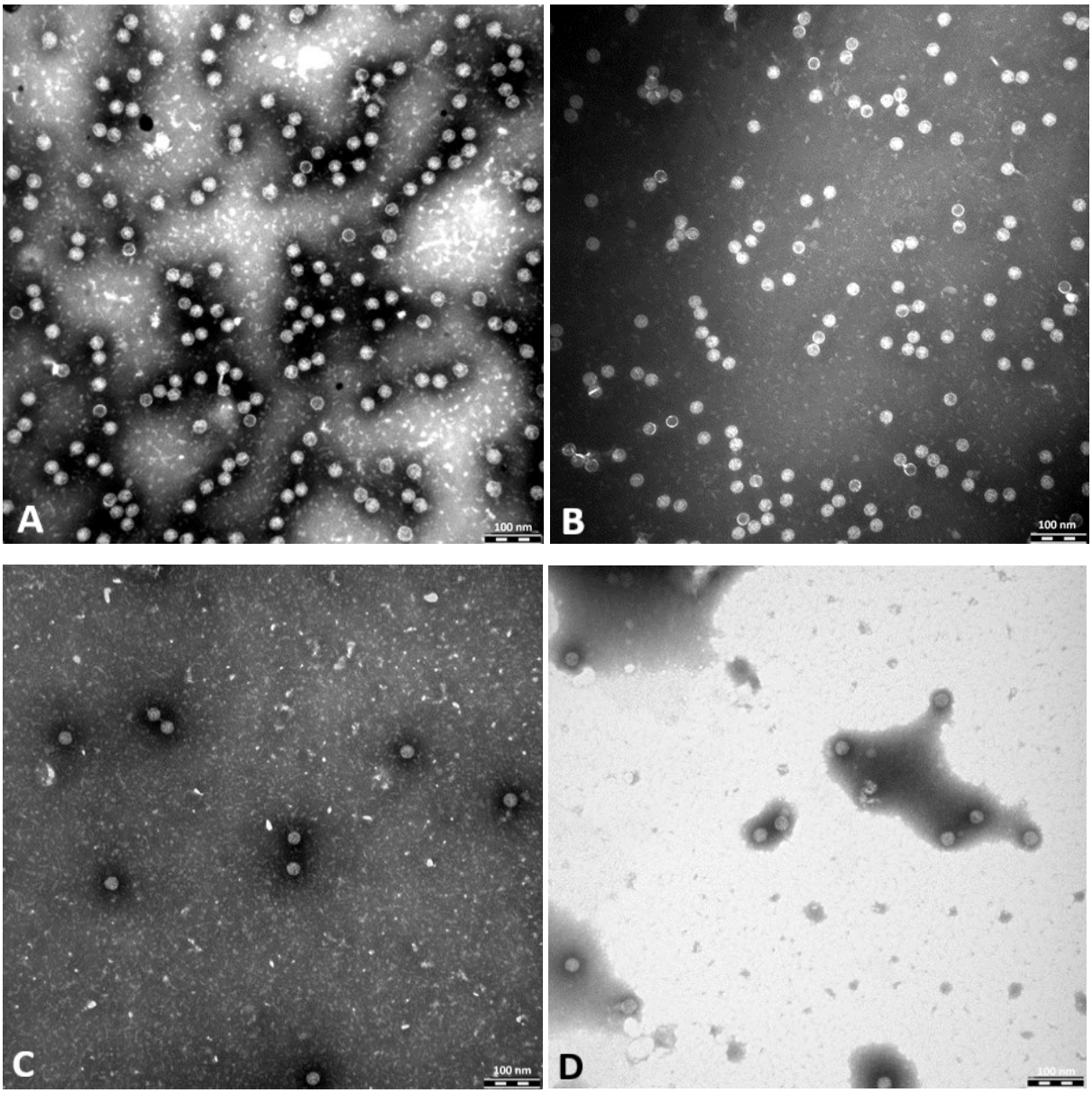


Obr. 10 – Dot Blot prokazující množství proteinu virových částic v jednotlivých frakcích. Frakce 7 a 8 obsahují velké množství virových částic.

7.4 Vizualizace virů pomocí elektronové mikroskopie

Jednotlivé vzorky purifikovaných virových částic byly vizualizovány pomocí transmisní elektronové mikroskopie (obr. 11, str. 37). Podle očekávání, vzorky 3T6_WT, WOP_WT a WOP_pLUC obsahují plné a nepoškozené viriony. Tyto plné částice byly v malém množství vizualizovány také ve vzorku 3T6_pLUC, přestože by se viriony v těchto buňkách produkovat neměly z důvodu absence genů a buněčných proteinů nutných pro replikaci těchto virových částic. Na základě tohoto zjištění bylo provedeno kontrolní testování vzorků založené na imunofluorescenční analyse, pro ověření, zda se nejedná o kontaminaci tohoto vzorku jiným vzorkem a zda dochází k produkci virových částic i v buňkách, kde by se dané částice produkovat neměly. Výsledky této kontroly jsou popsány v kapitole 7.5. (str. 37).

Snímky získané TEM zobrazují velké množství virových částic ve vzorcích 3T6_WT, WOP_WT a WOP_pLUC. Tento vysoký výtěžek byl získán na základě purifikačního pracovního postupu, který je již jako optimalizovaný popsán v kapitole 6.5. (str. 23). Původní postup a jeho optimalizace byl proveden na částicích 3T6_WT- a WOP_WT-, ke kterým nebyl přidán inhibitor fosfatas, a který není popsán v rámci této bakalářské práce, neboť optimalizace této metody nebyla hlavním cílem práce. U všech vzorků byla také připravena ředící řada pro získání representativních snímků tak, aby množství jednotlivých virových částic na snímcích z elektronového mikroskopu odpovídalo relativnímu zastoupení virionů v jednotlivých vzorcích.



Obr. 11 – Snímky virových částic v jednotlivých vzorcích získaných z elektronového mikroskopu. Snímek A) neředěný vzorek WT viru ve 3T6 b. linii, snímek B) neředěný vzorek WT viru ve WOP b. linii, snímek C) neředěný vzorek obsahující virové mutanty s pLUC ve 3T6 b. linii, snímek D) virové mutanty s pLUC ve WOP b. linii, ředěné v poměru 1:10 s dH_2O. Snímky byly pořízeny Mgr. et Mgr. Alžbětou Hejtmánkovou a Bc. Dominikem Musilem.

7.5 Kontrola infekce buněk jednotlivými preparacemi virů

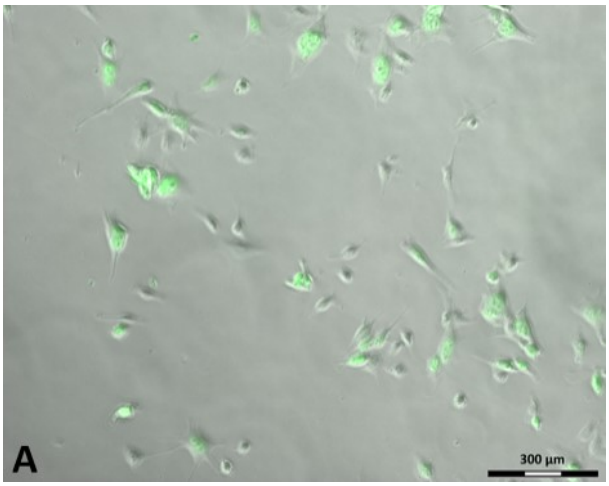
Z důvodu detekce přítomnosti virových částic ve vzorku 3T6_pLUC, které by se zde nacházet neměly, protože plasmid pLUC neobsahuje geny pro T-antigeny nutné pro replikaci, a navíc ani 3T6 savčí buněčná linie by neměla mít geny a buněčné proteiny nahrazující vlastnosti T-antigenů, byla provedena kontrola infekce 3T6 buněk jednotlivými preparacemi virů, zda dané vzorky nejsou kontaminovány jiným virem. Výsledky této kontroly zobrazuje obr. 12 (str. 39, 40).

Ze snímků z fluorescenčního mikroskopu je patrné, že všechny vzorky inkubovány protilátkami proti LT jsou pozitivní. Vzorek 3T6_WT a WOP_WT, jenž byly inkubovány touto protilátkou proti LT, obsahují velké množství správných virových částic s geny a tedy i proteiny T-antigenů, protože snímky zobrazují velké množství infikovaných buněk (obr. 12 A, G). U vzorku 3T6_pLUC by nemělo docházet k produkci virových částic, přesto jsou zde kvůli virové replikaci a přítomnosti proteinů LT patrné infikované buňky (obr. 12 C). Z tohoto vyplývá, že vzorek 3T6_pLUC je pravděpodobně kontaminován WT virem. Nicméně nelze přesně určit, jakým způsobem ke kontaminaci došlo.

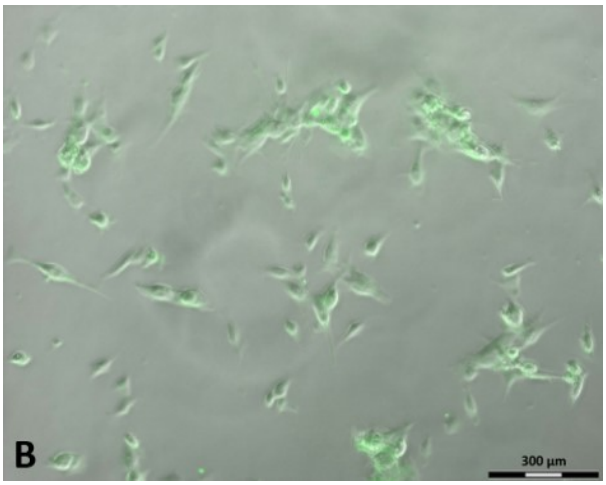
Zajímavější je detekce infikovaných hostitelských buněk u vzorku WOP_pLUC inkubovaného protilátkou proti LT (obr. 12 E), které indikují jeho přítomnost. Je pravděpodobné, že se jedná o kontaminaci WT virem stejně jako u vzorku 3T6_pLUC. K produkci virových mutant s delecí dochází méně ochotněji než k produkci WT virů, proto v případě přítomnosti WT viru např. ve vzorku, kde by se měly produkovat pouze virové mutanty, bude mnohem snáze docházet k produkci WT, než-li této virové mutantě s delecí časných genů. Navíc, k replikaci a následné produkci WT viru stačí nižší množství virových částic než v případě delečních mutant. Nutno zmínit, že ve virologické laboratoři je práce s infekčními viry častá a takto způsobená kontaminace relativně běžná. Na druhou stranu, v případě WOP buněčné linie je pravděpodobné, že se jedná o přirozený vznik virových WT částic v této linii vzniklých rekombinací polyomavirových genů integrovaných v genomu WOP buněčné linie a tedy i k produkci virionů obsahujících T-antigeny. WOP buněčná linie obsahuje geny a buněčné proteiny, které mohou kompletovat funkce i virovým mutantám jako jsou právě viriony vzniklé z pLUC, které neobsahují časné geny nezbytné pro vznik virových částic. Pokud došlo k náhodné rekombinaci genů, je možné, že vznikly právě viriony s geny pro LT a tedy přítomnost časných proteinů v buněčném jádře je důsledkem této rekombinace a nejedná se o kontaminaci. Nicméně nelze nijak ověřit, zda k tomuto opravdu došlo a z důvodu vyšší pravděpodobnosti je nutné předpokládat, že se jedná o kontaminaci.

U všech vzorků, které byly inkubovány protilátkami proti luciferase, není viditelné očekávané fluorescenční zabarvení. Slabý světlezelený signál je patrně pozadí nastavení fluorescenčního mikroskopu a tedy přítomnost luciferasy ve vzorku nelze detekovat. Použitá protilátka proti luciferase nebyla dlouho používána a pravděpodobně ztratila detekční aktivitu. Z tohoto důvodu bylo provedeno stanovení luciferasové aktivity ve vzorcích, která potvrdila přítomnost luciferasy v požadovaných vzorcích (viz. kapitola 7.6, str. 40).

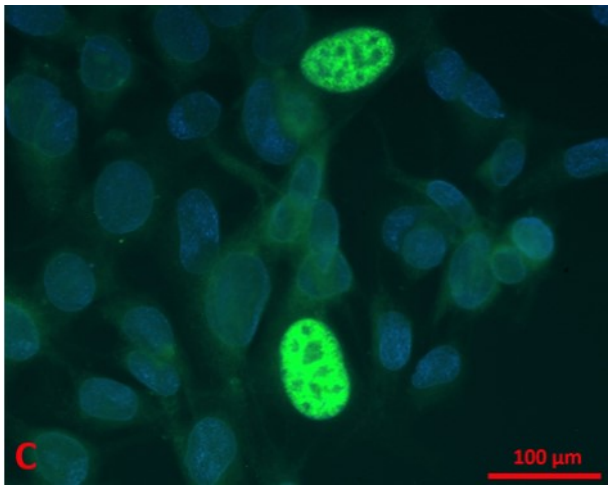
Negativní kontrola je shodná s negativní kontrolou pro imunofluorescenční stanovení virionů v savčích buňkách (obr. 10 E, str. 34).



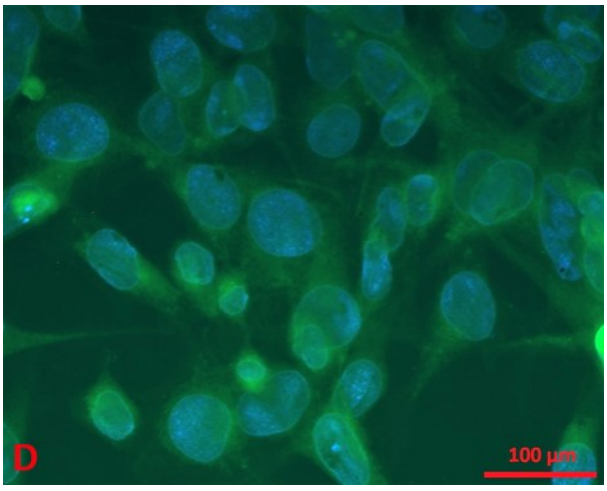
3T6_WT_αLT



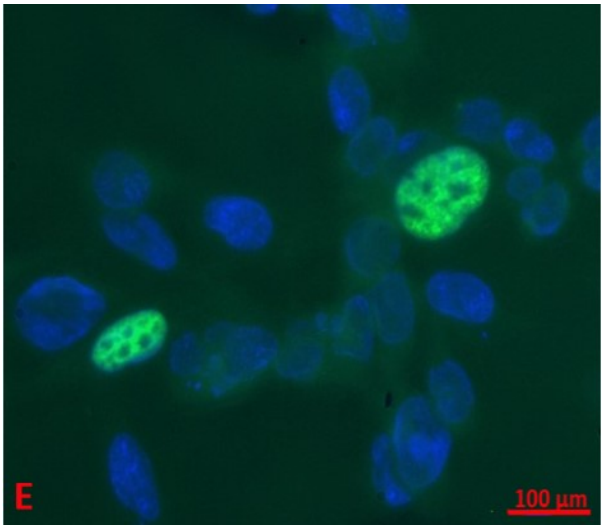
3T6_WT_αLuc



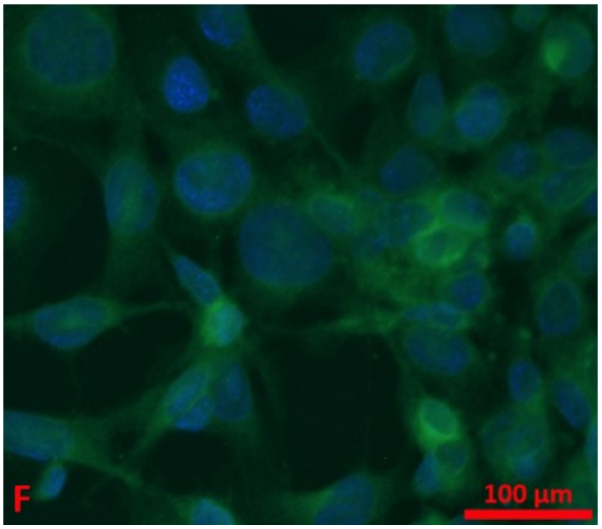
3T6_pLUC_αLT



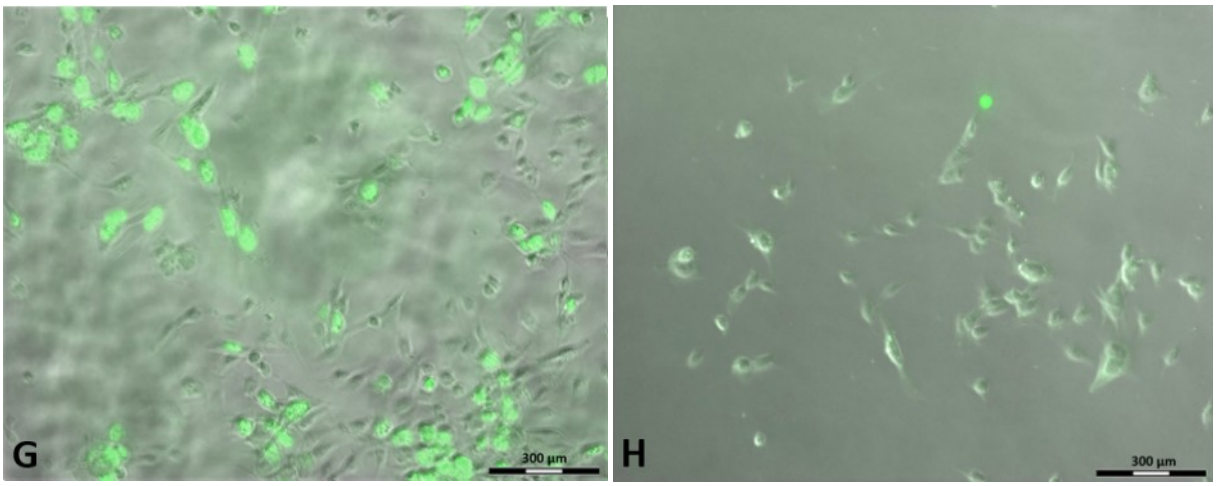
3T6_pLUC_αLuc



WOP_pLUC_αLT



WOP_pLUC_αLuc



WOP_WT_αLT **WOP_WT_αLuc**

Obr. 12 – Kontrolní imunofluorescence po infekci 3T6 buněk jednotlivými preparacemi virů. Snímky A, C, E a G zobrazují savčí 3T6 buňky s virem inkubované protilátkou proti LT. Snímky B, D, F a H zobrazují savčí 3T6 buňky s virem inkubované protilátkou proti luciferase. Snímky byly pořízeny 48 hodin po infekci na fluorescenčním mikroskopu BX60 (Olympus) a fluorescenčním mikroskopu s iluminátorem HXP 120 C (Carl Zeiss).

7.6 Luciferasová assay

Z důvodu absence fluorescenčního signálu pro luciferasu na snímcích kontrolní imunofluorescence po infekci 3T6 buněk purifikovanými vzorky virů (obr. 12, str. 39, 40) byla stanovena aktivita luciferasy a celkové množství proteinu v buněčných lysátech metodou BCA. Získaná data jsou uvedena v tab. 4 (str. 41).

Stanovení luciferasové aktivity poskytlo převážně kvalitativní výsledek. Kvantitativní zastoupení luciferasy v jednotlivých virových vzorcích bylo zjištěno ze stanovení koncentrace celkového proteinu v buněčných lysátech pomocí metody BCA, množství luciferasy v jednotlivých vzorcích bylo poté normalizováno na toto množství celkového proteinu buněčných lysátů.

Výsledky vykazují luciferasovou aktivitu pouze ve vzorku WOP_pLUC, ve kterém byla očekávána její vysoká produkce. Její aktivita zde dosahuje velmi vysokých hodnot a relativně koreluje s hodnotou luciferasové aktivity pozitivní kontroly (PK), v tomto případě plasmid pGL3 s geny pro luciferasu transfekovaný pomocí turbofektu do 3T6 buněk. Vysvětlením, proč luciferasová aktivita u tohoto vzorku nenabývá stejných hodnot jako u PK může být přítomnost malého množství WT virových částic nebo naopak samotná savčí buněčná linie WOP. Přestože v této linii dochází k produkci virových mutant s delecí časných genů, nelze určit, zda je toto množství dostatečné a přímo úměrné produkci luciferasy jako u viru pozitivní kontroly.

Ve vzorku WOP_WT se dle předpokladu nenachází žádná luciferasa. U vzorku

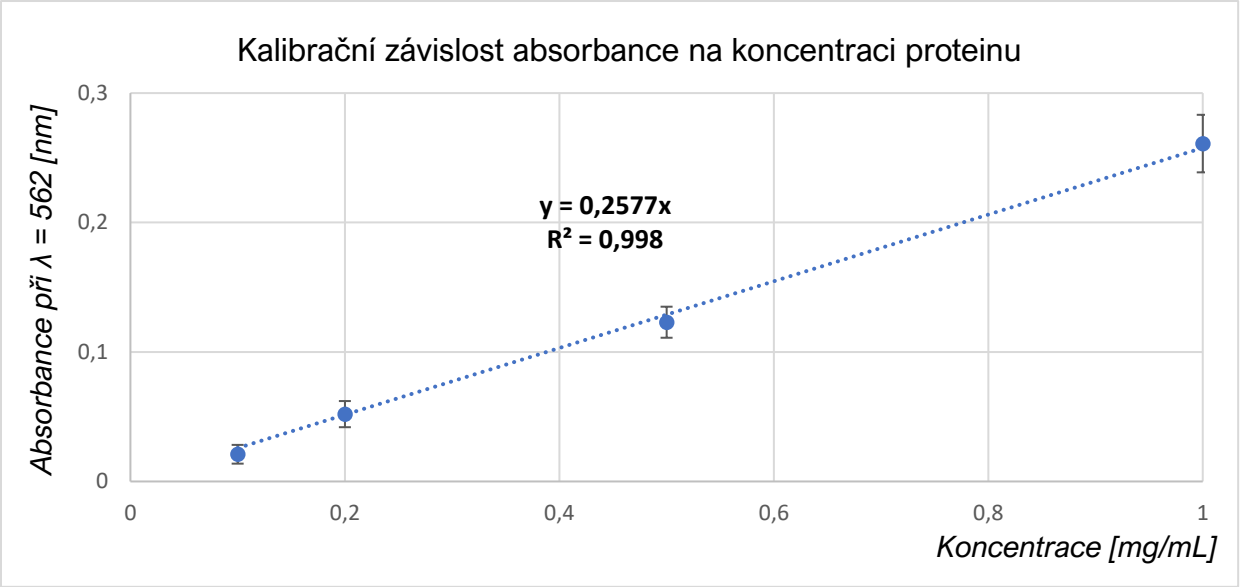
3T6_WT je luciferasová aktivita téměř minimální, a to v řádu jednotek. Na základě normalizace jejího množství a porovnání této hodnoty s hodnotou PK je zde její zastoupení v rámci desetiny procenta, tedy zanedbatelné.

U vzorku 3T6_pLUC je luciferasová aktivita stejně jako její množství v rámci desetiny procenta v porovnání s PK. Množství virových částic obsahujících gen pro luciferasu je v tomto vzorku zanedbatelné. Savčí buněčná linie 3T6 nemá geny a buněčné proteiny, které by umožnily replikaci virových mutant s pLUC, a tedy by nemělo docházet k produkci žádných virových částic v této buněčné linii. Luciferasová assay tedy poskytla důkaz, že virové částice ve vzorku 3T6_pLUC vizualizované na snímku z TEM nejsou schopny po infekci zajistit produkci luciferasy a vznikly tedy pravděpodobně v důsledku kontaminace WT. Nicméně, protože tento vzorek sloužil pouze jako samotná kontrola ke vzorkům ostatním, přítomnost kontaminace v tomto vzorku není překážkou, která by ovlivnila vlastní analysu proteinů pomocí MS.

Z výše uvedeného vyplývá, že vzorky 3T6_WT a WOP_WT nejsou kontaminovány mutantou nesoucí gen pro luciferasu a vzorek WOP_pLUC je jedinou virovou preparací, která tento gen obsahuje. Lze tedy konstatovat, že majoritně tyto vzorky obsahují správné částice a nemělo by tedy dojít k ovlivnění MS analysy z důvodu kontaminace.

Tab. 4 – Stanovení luciferasové aktivity a normalizace množství luciferasy na koncentraci celkového proteinu v buněčných lysátech. Stanovení byla provedena pro virové částice ve vzorcích 3T6_WT/pLUC a WOP_WT/pLUC. Jako pozitivní kontrola byl pomocí turbofektu použit plasmid pGL3 obsahující gen pro luciferasu. Negativní kontrolou byly samotné savčí 3T6 buňky bez virových částic. $A_{průměr}$ je průměrná hodnota absorbance vzorků, $c_{protein}$ [mg/mL] je koncentrace proteinů v buněčných lysátech. Normalizovaná množství luciferasy ve vzorcích byla stanovena v [mg] a v [%].

	Stanovení luciferasové aktivity		**Stanovení koncentrace buněčných lysátů a normalizace množství luciferasy**				
Vzorek	$A_{průměr}$	$A_{průměr\ po\ odečtení\ blanku}$	$A_{průměr}$	$A_{průměr\ po\ odečtení\ blanku}$	$C_{protein}$ [mg/ml]	***množství luciferasy* [mg]**	***množství luciferasy* [%]**
3T6_WT	83,984	29,834	0,211	0,069	0,532	56,114	0,17
3T6_pLUC	75,866	21,716	0,245	0,102	0,794	27,363	0,08
WOP_WT	43,797	-10,353	0,214	0,071	0,552	0,000	0,00
WOP_pLUC	23305,781	23251,630	0,275	0,132	1,027	22646,730	67,01
PK	34273,304	34219,152	0,274	0,131	1,014	33796,800	100,00
NK	54,148	-0,002	0,381	0,238	1,845	0,008	0,01
BLANK	54,15	-	0,143	-	-	-	-



Graf 1 - Kalibrační závislost absorbance na koncentraci proteinu v buněčných lysátech metodou BCA pro následné stanovení množství luciferasy v jednotlivých vzorcích

7.7 Stanovení koncentrace jednotlivých vzorků

Z důvodu přesného stanovení koncentrace virových částic ve vzorcích byla koncentrace stanovena různými metodami; spektrofotometricky, pomocí metody BCA a pomocí Qubit.

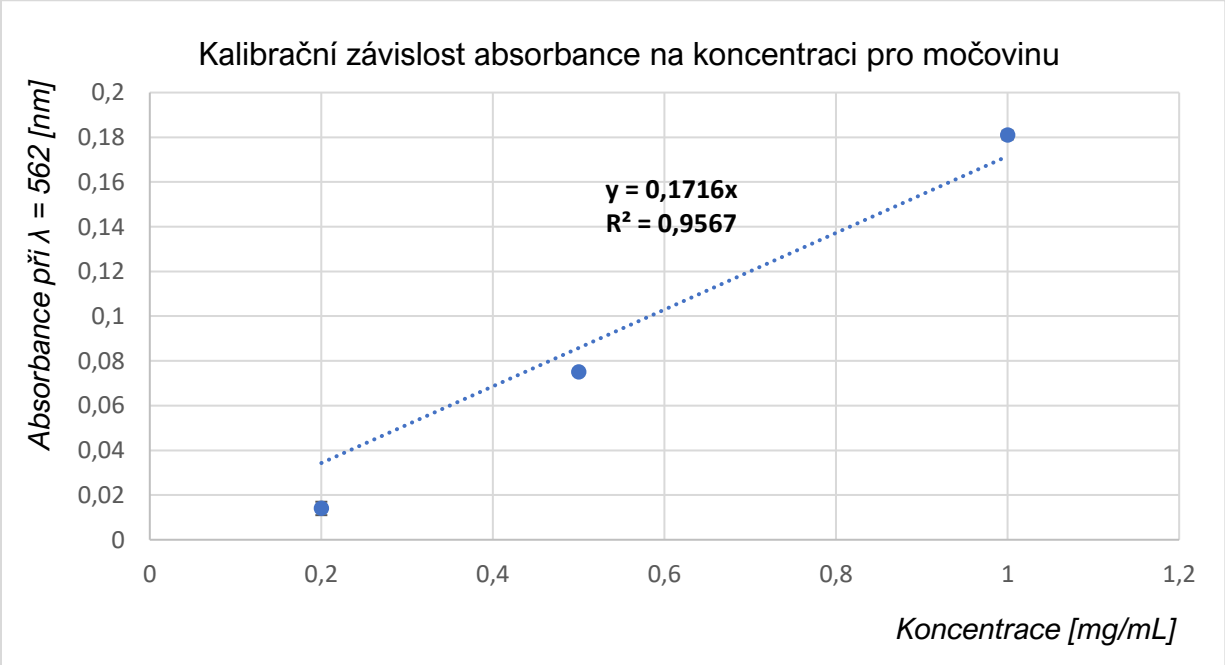
Na základě spektrofotometrického stanovení byly získány průměrné koncentrace s absorbancí při λ = 280 nm (Tab. 5, str. 43). Zjištěné hodnoty koncentrací jednotlivých vzorků jsou na základě této metody relativně náhodné, a navíc se také neshodují se zastoupením proteinových proužků v jednotlivých drahách gelů SDS-PAGE (obr. 13, str. 45 a 46). Naopak průměrné koncentrace vzorků stanovené pomocí Qubit se pohybují okolo hodnoty 0,340 mg/mL. Tato metoda také není zcela přesná a také neodpovídá relativnímu zastoupení proteinových proužků na gelu SDS-PAGE. Je velice pravděpodobné, že mezi jednotlivými proteiny mohou být přítomné disulfidické můstky [21], které mohou zkreslovat výsledné koncentrace. Z tohoto důvodu bylo provedeno stanovení koncentrace metodou bicinchoninové kyseliny.

Nejprve bylo provedeno několik stanovení pro optimalizaci metody a koncentrování vybraných vzorků z důvodu zvýšení jejich koncentrace. Po optimalizaci byla stanovena jejich koncentrace na základě kalibrační přímky (graf. 2, str. 43). V případě využití metody BCA bylo provedeno stanovení koncentrace vzorků ve vodě, nicméně pro přesnější stanovení bylo také provedeno stanovení koncentrace vzorků v roztoku močoviny. Vzorky rozpuštěné v roztoku močoviny poskytly přesnější hodnoty koncentrací jednotlivých vzorků než předchozí kontrolní stanovení ve vodě, protože došlo k redukci disulfidických můstků mezi jednotlivými virovými

proteiny. Došlo k redukci polymerů převážně přímo na monomerní kapsidové proteiny VP1, a tedy i k lepšímu přístupu měďnatých iontů k proteinům. Výsledné hodnoty koncentrací vzorků jsou uvedeny v tab. 5 (str. 43). Koncentrace zjištěná na základě stanovení BCA a rozpuštění vzorků v močovině odpovídá relativnímu množství virových částic ve vzorcích zobrazených v proužcích gelů SDS-PAGE (Obr. 13, str. 45 a 46). Stanovení koncentrací uvedených v tab. 6 bylo provedeno v duplikátech.

Tab. 5 – Stanovení koncentrace virových částic ve vzorcích spektrofotometricky a pomocí přístroje Qubit. $c_{průměrná}$ [mg/mL] je průměrná koncentrace vzorků, A_{280} je absorbance při λ = 280 nm. Vzorky 3T6_WT/LUC, WOP_WT/LUC jsou vzorky s přidaným inhibitorem fosfatas, vzorky 3T6_WT- a WOP_WT- jsou vzorky bez inhibitoru fosfatas, které byly využity převážně pro optimalizace měření.

	Spektrofotometr		Qubit
Vzorek	$C_{průměr}$ [mg/mL]	A_{280}	$C_{průměr}$ [mg/mL]
3T6_WT	4,022	2,68	0,349
3T6_LUC	2,546	1,69	0,337
WOP_WT	2,990	1,99	0,351
WOP_LUC	1,566	1,05	0,326
3T6_WT-	0,639	1,83	0,343
WOP_WT-	2,497	1,67	0,339



Graf 2 – Kalibrační závislost absorbance na koncentraci virových vzorků v roztoku močoviny stanovené metodou BCA

Tab. 6 – Výsledné hodnoty koncentrace vzorků získaných pomocí BCA. Vzorky byly rozpuštěny v roztoku močoviny a bylo s nimi pracováno v duplikátech. $A_{průměr}$ je průměrná hodnota absorbance vzorků, $c_{průměr}$ [mg/mL] je výsledná hodnota koncentrace vzorků. Vzorky 3T6_WT/LUC, WOP_WT/LUC jsou vzorky s přidaným inhibitorem fosfatas, vzorky 3T6_WT- a WOP_WT- jsou vzorky bez inhibitoru fosfatas, které byly využity převážně pro optimalizace měření.

Vzorky v roztoku močoviny			
Vzorek	$A_{průměr}$	$A_{průměr\ po\ odečtení\ blanku}$	$C_{průměr}$ [mg/mL]
3T6_WT	0,187	0,042	0,245
3T6_LUC	0,142	0,003	0,017
WOP_WT	0,176	0,031	0,178
WOP_LUC	0,152	0,006	0,038
3T6_WT-	0,208	0,063	0,367
WOP_WT-	0,193	0,048	0,277

7.8 Výsledné zobrazení virových částic na gelu SDS-PAGE

Zastoupení jednotlivých virových proteinů stejně jako jejich množství v jednotlivých drahách gelů SDS-PAGE zobrazuje obr. 13 A, B a C.

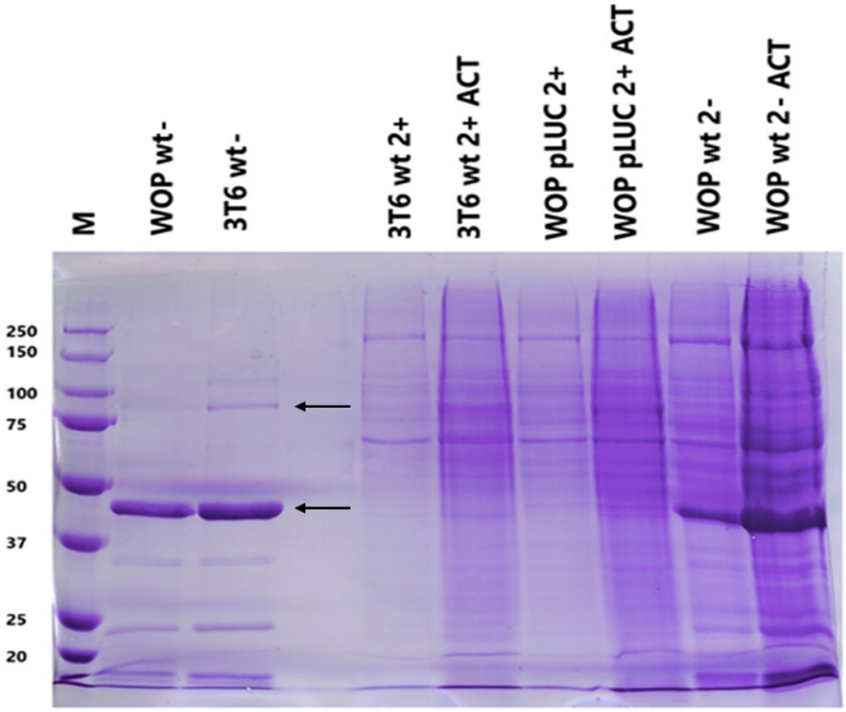
Obr. 13 A zobrazuje jeden z prvně připravených gelů, který byl vytvořen z důvodu vizualizace jednotlivých virových proteinů na gelu, stejně jako z důvodu optimalizace nabohacení proteinů. Na gelu jsou vzorky WOP_WT- a 3T6_WT-, oba bez inhibitoru fosfatas. Tyto vzorky, použity převážně pro optimalizace a kontroly zobrazují uspořádání a velikosti jednotlivých proteinů, které lze na gelu SDS-PAGE očekávat. Tyto virové proteiny jsou zde zobrazeny jako proužky. Nejsilnější signál okolo 40 kDa odpovídá kapsidovému proteinu VP1, který je hlavním cílem této analysy. Jeho skutečná velikost je 45 kDa. Mezi 75–100 kDa je pozorována „dimerizace“ kapsidových proteinů VP1, které byly také využity pro MS analysu. Kromě toho, ve všech drahách je velké množství proteinových proužků, které mohou být různé buněčné či virové proteiny jako např. časné T-antigeny, nebo například různé shluky či zkrácené verze proteinu VP1. Tyto proteiny nebyly analysovány pomocí MS v rámci této práce, nicméně byly připraveny pro potencionální budoucí analysu.

Obr. 13 A zároveň zobrazuje vzorky vzniklé spojením frakcí obsahujících nejenom plné částice, ale i částice prázdné, rozpadlé nebo které mohly být různým způsobem poškozené. Tyto vzorky byly využity pro optimalizaci přípravy a kontroly, jako je v tomto případě nabohacení acetonem o virové částice. Gel zobrazuje tyto vzorky s a bez přidaného acetonu, jehož koncentrační vlastnosti byly mnohem účinnější než v případě acetonitrilu. U vzorků, ke kterým byl přidán aceton, došlo k nabohacení koncentrace virových částic, a tedy i

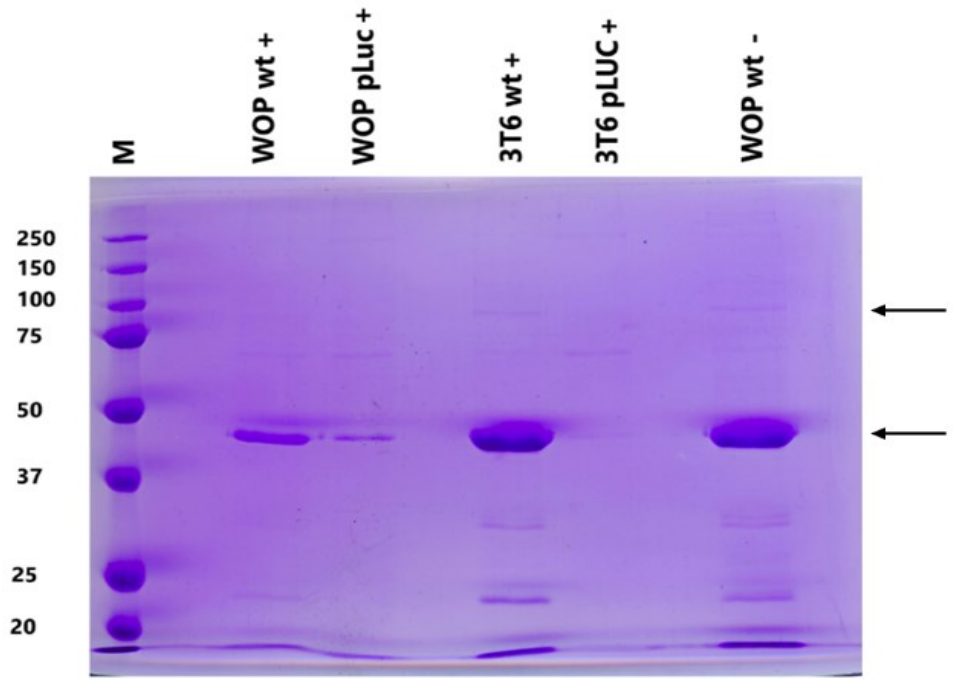
k silnějšímu signálu ve formě proužků na gelu SDS-PAGE. Kromě toho, po přidání acetonu došlo také k jasnější vizualizaci i dalších proteinů přítomných ve vzorku, ať už buněčných či virových. Těmito proteiny mohly být například již zmíněné T-antigeny, shluky či zkrácené formy VP1, nebo nějaké jiné buněčné proteiny. Díky takto získaným informacím byla provedena optimální příprava vzorku pro SDS-PAGE a následnou MS analysu.

Obr. 13 B zobrazuje vzorky 3T6_WT, 3T6_pLUC, WOP_WT a WOP_pLUC, s přidanými inhibitory fosfatas. Je zde také vzorek WOP_WT-, bez inhibitoru fosfatas. Označené proužky jsou ty, které byly využity pro následnou analysu na MALDI-TOF MS. Jednalo se o především kapsidové proteiny VP1, ale také o jejich dimery.

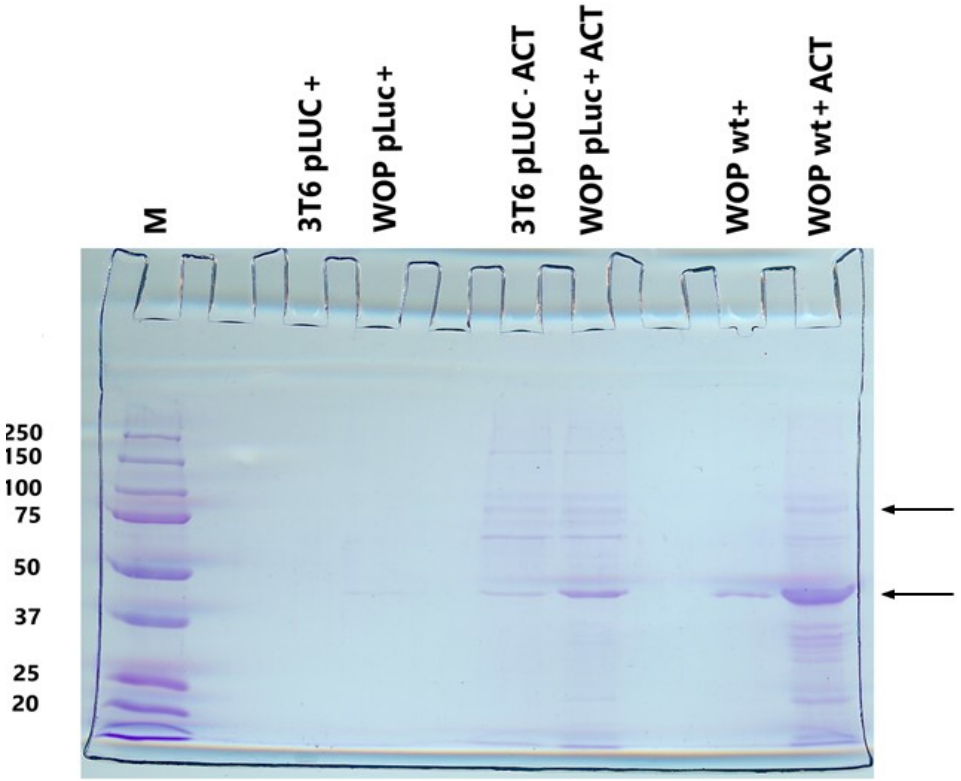
Obr. 13 C zobrazuje vzorky nanesené již optimalizovaným postupem, tedy ty, ke kterým bylo nezbytné přidat aceton pro jejich nabohacení z důvodu jasnější vizualizace VP1 pro MS analysu. Na tento gel byly také naneseny i vzorky bez acetonu z důvodu porovnání jednotlivých vzorků. Příkladem je vzorek WOP_WT+ a jeho analog s přidaným acetonem. U vzorku bez acetonu je vidět pouze protein VP1, zatímco u vzorku s acetonem byly detekovány i jiné proteiny. Na gely byly naneseny i vzorky 3T6_pLUC a WOP_pLUC pro porovnání velikosti proužků s koncentrovanými vzorky, nicméně z neznámých důvodů nebyla provedena jejich vizualizace.



Obr. 13 A) – Vzorky na polyakrylamidovém gelu po SDS-PAGE. M je standard molekulových hmotností [kDa], + značí vzorky, ke kterým byl přidán inhibitor fosfatas, - značí vzorky, ke kterým inhibitor fosfatas přidán nebyl. ACT značí vzorky, které byly koncentrovány acetonem. Šipky zobrazují proužky proteinů, které byly použity pro analysu MALDI-TOF MS (všechny proužky na úrovni ve směru těchto šipek).



Obr. 13 B) – Vzorky na polyakrylamidovém gelu po SDS-PAGE. M je standard molekulových hmotností [kDa], + značí vzorky, ke kterým byl přidán inhibitor fosfatas, - značí vzorky, ke kterým inhibitor fosfatas přidán nebyl. Šipky označují proužky proteinů, které byly použity pro analysu MALDI-TOF MS (všechny proužky na úrovni ve směru těchto šipek).



Obr. 13 C) – Vzorky na polyakrylamidovém gelu po SDS-PAGE. M je standard molekulových hmotností [kDa], + značí vzorky, ke kterým byl přidán inhibitor fosfatas, - značí vzorky, ke kterým inhibitor fosfatas přidán nebyl. ACT značí vzorky, které byly koncentrovány acetonem. Šipky označují proužky proteinů, které byly použity pro analysu MALDI-TOF MS (všechny proužky na úrovni ve směru těchto šipek).

7.9 Analysa fosforylace pomocí MALDI-TOF MS

Z vybraných proužků gelů SDS-PAGE byly připraveny vzorky pro MALDI-TOF. Výsledky hmotnostní spektrometrie zobrazují graf 3 a 4 (str. 48 a 49) spolu s obr. 14. (str. 49).

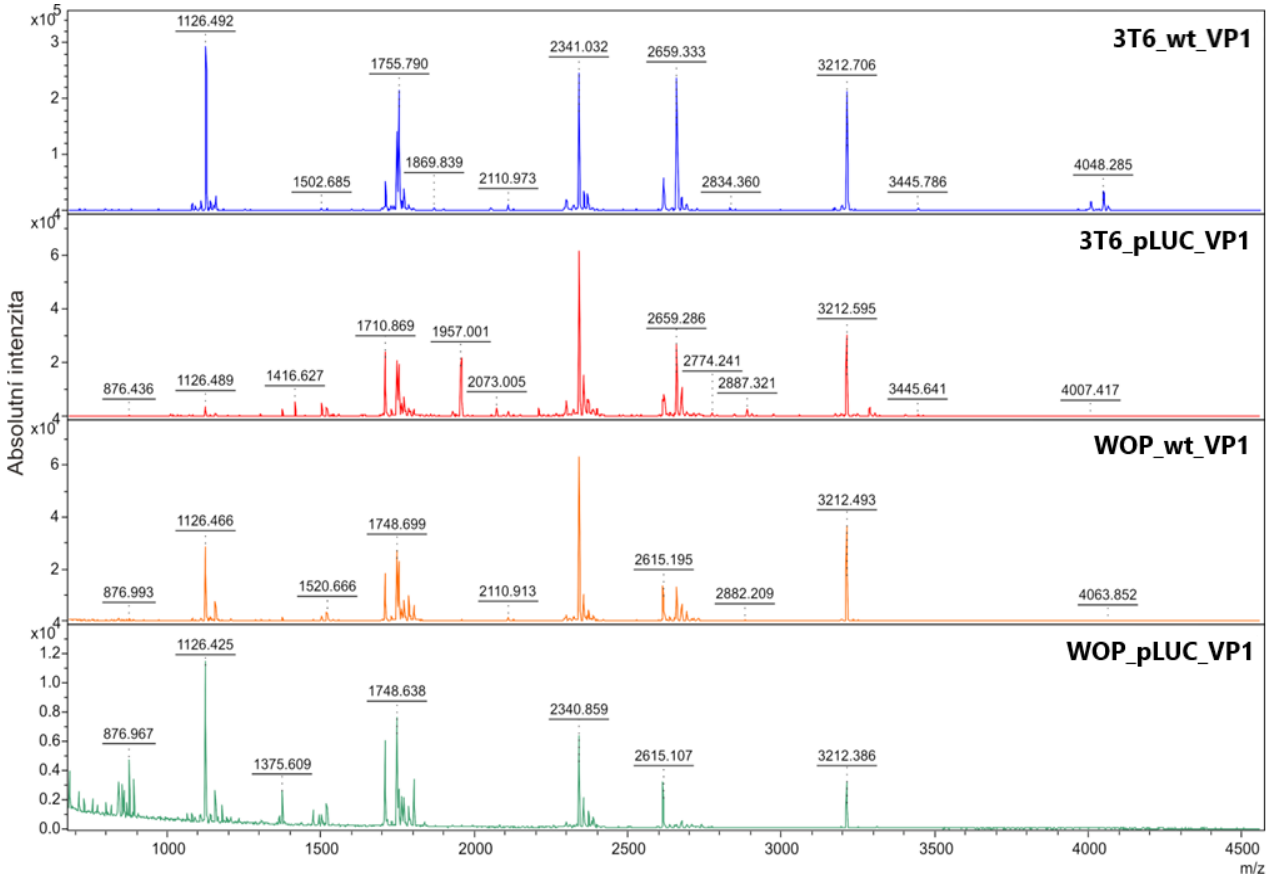
U všech vzorků byly identifikovány fosforylace na stejných pozicích AMK kapsidového proteinu VP1 MPyV. Všechny vzorky obsahují fosforylovaný VP1 na T-63 a T-156. Fosforylace těchto dvou AMK je pravděpodobně nezbytná pro morfogenesi virionů a infektivitu virových částic [1,29,31]. Lze tedy předpokládat, že fosforylace ovlivňují funkci virových částic.

Je zajímavé, že tyto PTM se vyskytují u všech vzorků, nejen u WT virů, ale i virových mutant s geny pro luciferasu produkovaných v obou savčích buněčných liniích. Částice WT virů vzniklých z plasmidu pMJAG v obou savčích buněčných liniích 3T6 a WOP obsahují stejné fosforylace, protože v obou případech se jedná o stejný virus, a tedy fosforylace by měly být shodné. Nicméně je překvapivé, že virové částice ve vzorku WOP_pLUC jsou fosforylovány na stejných aminokyselinách, jako v případě WT viru (graf 4, str. 49). Předpokládal jsem, že mutantní virové částice s nahrazenými geny pro T-antigeny za gen pro luciferasu budou obsahovat jinak fosforylované AMK. Tato má hypotéza vyplývala také z předpokladu, že buněčná linie WOP obsahuje odlišné geny, buněčný aparát a mechanismy pro tvorbu virových částic než 3T6 buněčné linie, a tedy že tato odlišnost v kombinaci s produkcí virů s genem pro luciferasu povede k odlišné fosforylaci. Nicméně na základě získaných dat je tedy pravděpodobné, že aby proběhla správně morfogenese a aby virové částice mohly být dále infekční, je nezbytná fosforylace těchto konkrétních AMK proteinu VP1. Kromě toho je ale také možné předpokládat, že by přítomnost fosforylace v jiných pozicích nebo například absence fosforylace kapsidového proteinu VP1 mohla způsobit různé defekty virových funkcí či poškození struktury virových částic [32]. Z tohoto lze usuzovat, že fosforylace shodné mezi jednotlivými virovými vzorky jsou nezbytné pro jejich funkce. Pro potvrzení této hypotézy je ale nezbytné provést další experimenty zaměřené převážně na vlastnosti a vliv fosforylací, například porovnat infektivitu mezi viriony zbavených všech fosforylací se vzorky připravenými v rámci této práce. Jiným příkladem je příprava a testování částic s cílenou fosforylací/defosforylací konkrétních AMK.

Je důležité zmínit, že tento experiment byl zaměřen převážně na kvalitativní analysu virového kapsidového proteinu VP1. Je tedy možné, že mezi jednotlivými virovými vzorky použitých v rámci této práce je odlišné kvantitativní zastoupení fosforylace. Na základě získaných dat toto kvantitativní zastoupení zjistit nelze, protože pro toto vyhodnocení je

potřebný odlišný postup pro přípravu virových vzorků. Kromě toho, tím že se neliší kvalitativní analysa fosforylace mezi jednotlivými vzorky, je možné, že se naopak liší zastoupení jiných PTM ve vzorcích, jako je například methylace, acetylace či hydroxylace. V rámci budoucích experimentů by bylo vhodné zaměřit se i na tyto další modifikace proteinu VP1.

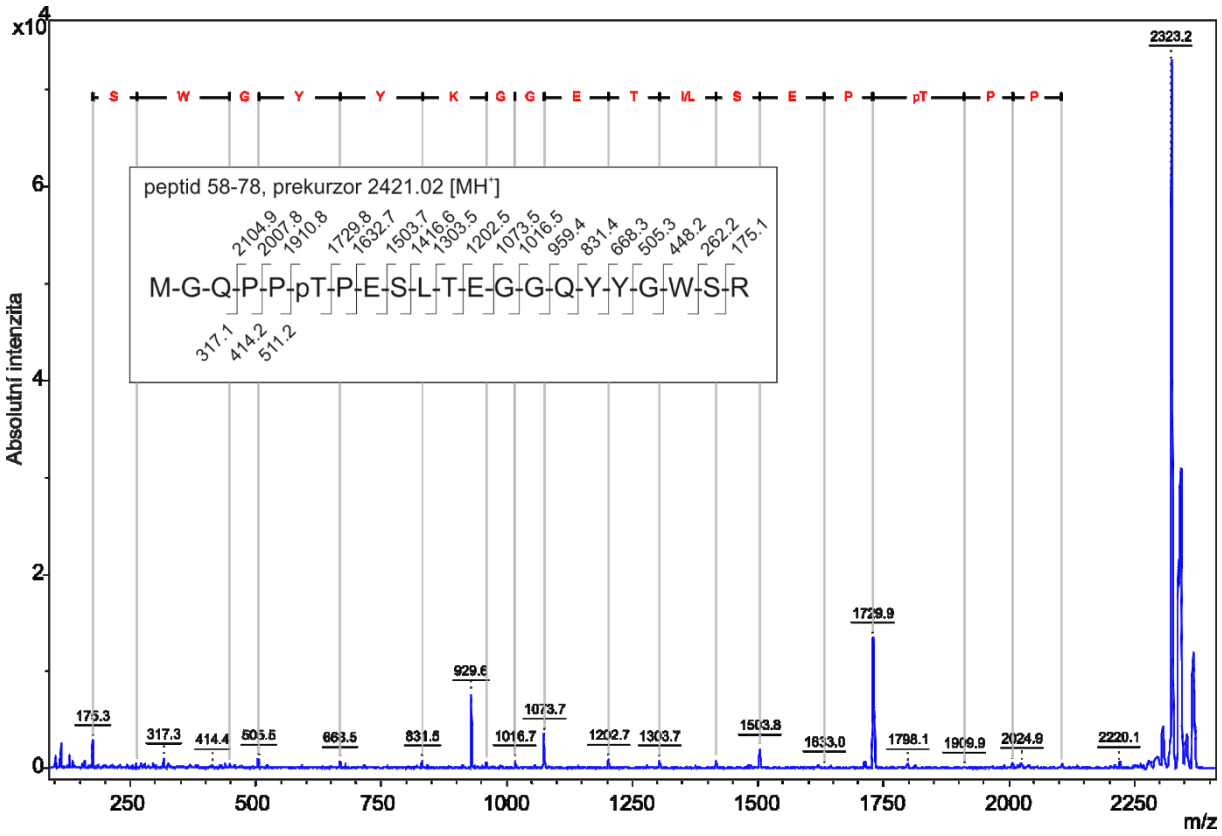
U vzorku 3T6_pLUC došlo k produkci virových částic a jak již bylo prokázáno (viz. kapitola 7.5, str. 37), jedná se o kontaminaci WT virem. Tento závěr potvrzuje i MS analysa (graf 3, str. 48). Z grafu je patrné, že vzorky 3T6_WT a 3T6_pLUC obsahují téměř shodné hmotnostní spektrum, a tedy i fosforylace majoritního kapsidového proteinu VP1.



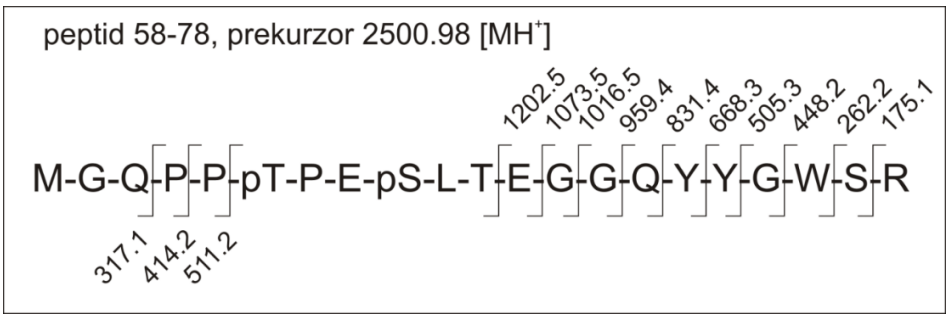
Graf 3 – Srovnání proteinových proužků VP1 MPyV pomocí MALDI-TOF. Graf zobrazuje výsledné MS spektrum pro celý protein VP1 u všech analysovaných vzorků s virovými částicemi. Proteiny byly štěpeny trypsinem. Práce s MS byla provedena panem doc. RNDr. Miroslavem Šulcem, Ph.D.

Na základě tandemové hmotnostní spektrometrie byla identifikována dvojitá fosforylace na VP1 mezi 58–78 aminokyselinami. Tato dvojitá fosforylace byla detekována pouze v případě, že došlo k „dimerizaci“ majoritního kapsidového proteinu VP1. Tato dvojitá fosforylace byla identifikována na T-63 a S-66 u všech analysovaných vzorků. V případě monomeru VP1 nebyla fosforylace na S-66 nalezena. Získané výsledky, stejně jako fragmentační schéma jsou uvedeny v grafu 4 (str. 49) a obr. 14 (str. 49). Na základě těchto výsledků lze předpokládat, že fosforylace S-66 je esenciální pro správnou morfogenesi

a maturaci virových částic. Je možné, že pS66 napomáhá interakci mezi monomery VP1 a jejich vazbě, což má za následek snazší uspořádání proteinů do virové kapsidy. Podobnou hypotézu přednesli Li et al., kteří tvrdí, že pS66 je esenciální pro růst virů [31].



Graf 4 – Výsledné schéma tandemové hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF MS a fragmentační schéma analysy peptidu s m/z 2421,02 (58-78 aminokyselina) VP1 monomeru, který je fosforylovaný na T-63. Peptid byl štěpen trypsinem.



Obr. 14 – Identifikace fragmentů MS/MS peptidu s m/z 2500,98 (58-78 aminokyselina) VP1 dimeru, který je fosforylovaný na T-63 a S-66. Peptid byl štěpen trypsinem.

MS analysa zároveň poskytla identifikaci i dalších látek, které byly ve vzorcích přítomné. Tyto proteiny jsou uvedeny v tab. 7 (str. 50). Jedná se převážně o hovězí sérový albumin, α-2-makroglobulin a různé lidské cytokeratiny. Přestože tyto proteiny kontaminovaly

vzorky a snížily jejich čistotu, nijak neovlivnily analysu, neboť v majoritním množství byl ve vzorcích zastoupen virový kapsidový protein VP1. Vysvětlením, jak se tyto proteiny do vzorků dostaly, byla pravděpodobně nesterilní příprava a manipulace se vzorky a laboratorním náčiním, stejně jako nedostatečně zvolené ochranné laboratorní pomůcky.

Tab. 7 – Identifikace dalších proteinů ve virových vzorcích

Název proteinu [proteinové číslo]	Molekulová hmotnost [kDa]
ALB protein [Bos taurus, AAI02743.1]	71186 kDa
α-2-makroglobulin [Bos taurus, AGC26508.1]	134613
Hovězí sérový albumin, řetězec A [3V03_A]	68416
Cytokeratin 1, type II [00220327.3]	66149
Cytokeratin 9, type I [00019359.3]	62092
Cytokeratin 10, type I [00009865.2]	59703

Na obr. 15 je zobrazené dosažené pokrytí proteinu VP1 v rámci MS analysy. Je patrné, že fosforylované AMK byly plně pokryty.

```
  1   MAPKRKSGVS KCETKCTKAC PRPAPVPKLL IKGGMEVLDL VTGPDSVTEI
 51   EAFLNPRMGQ PPTPESLTEG GQYYGWSRGI NLATSDTEDS PENNTLPTWS
101   MAKLQLPMLN EDLTCDTLQM WEAVSVKTEV VGSGSLLDVH GFNKPTDTVN
151   TKGISTPVEG SQYHVFAVGG EPLDLQGLVT DARTKYKEEG VVTIKTITKK
201   DMVNKDQVLN PISKAKLDKD GMYPVEIWHP DPAKNENTRY FGNYTGGTTT
251   PPVLQFTNTL TTVLLDENGV GPLCKGEGLY LSCVDIMGWR VTRNYDVHHW
301   RGLPRYFKIT LRKRWVKNPY PMASLISSLF NNMLPQVQGQ PMEGENTQVE
351   EVRVYDGTEP VPGDPDMTRY VDRFGKTKTV FPGN
```

Obr. 15 – Dosažené pokrytí protein VP1 (červeně) v rámci MS analysy po štěpení trypsinem.

V rámci potencionální diplomové práce by bylo vhodné provést kvalitativní i kvantitativní analysu nejenom další PTM, ale zároveň detekovat i rozdíly mezi nimi. Také by bylo vhodné zaměřit se na infekční vlastnosti virových částic, a případně jakou roli zde hrají právě T-antigeny. Kromě toho, v budoucí práci by bylo nezbytné provádět více kontrolních experimentů mezi jednotlivými dílčími kroky z důvodu zamezení možné kontaminace a kontroly, zda jsou vzorky v pořádku.

8 Závěr

V rámci této bakalářské práce byly analysovány posttranslační modifikace majoritního kapsidového proteinu VP1 MPyV se zaměřením na fosforylace. Na základě získaných dat z hmotnostního spektrometru bylo zjištěno, že hlavní strukturní protein VP1, který tvoří virovou kapsidu, je fosforylovaný na threoninech a serinu shodně s údaji uváděnými literaturou. Konkrétně na samotném proteinů VP1 se nachází fosforylace v pozici T-63 a T-156. Pokud byla detekována „dimerizace“ VP1, byla na tomto proteinu detekována také fosforylace v pozici S-66.

Ve všech analysovaných vzorcích byly shodně detekovány fosforylace majoritních virových proteinů v těchto pozicích bez rozdílu, tedy na WT virech produkovaných nejen v savčích buněčných liniích 3T6 a WOP, ale i na virových mutantech jejichž časné geny byly nahrazeny genem pro luciferasu. Přestože byla ve vzorcích zjištěna drobná kontaminace, je velmi pravděpodobné, že neměla vliv na samotnou analysu fosforylovaných proteinů.

Ze získaných výsledků lze tedy usuzovat, že fosforylace může mít efekt na funkční a biologické vlastnosti virů, jako je morfogenese virionů, a ve spolupráci s MT mohou být zodpovědné i za jejich infektivitu [32]. Nicméně je nezbytné navrhnout a provést konkrétní experimenty, které by byly zaměřené na tyto virové vlastnosti MPyV, a které by potvrdily a rozšířily dosavadní znalosti. Současně tato práce také přispěla k optimalizaci pracovního postupu pro purifikaci nepoškozených virových částic v dostatečně vysokém množství pro následnou analysu. Kromě toho se také podařilo optimalizovat pracovní postup pro relativně přesné stanovení koncentrace proteinů ve virionech stejně jako jejich nabohacení.

Přehled použité literatury:

1. Bolen J.B.; Anders D.G.; Trempy J.; Consigli R.A.: Differences in the subpopulations of the structural proteins of polyoma virions and capsids: biological functions of the multiple VP1 species. *Journal of Virology* 37:1, 80–91 (1984).

2. Schaffhausen B.S.; Roberts T.M.; Lessons from polyoma middle T antigen on signalling and transformation: A DNA tumor virus contribution to the war on cancer. *Virology* 384:2, 304–316 (2004).

3. Weihua X.; Ramanujam S.; Lindner D.J.; Kudaravalli R.D.; Freund R.; Kalvakolanu D.V.: The polyoma virus T antigen interferes with interferon-inducible gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:3, 1085–1090 (1998).

4. Atkin S.J.L.; Griffin B.E.; Dilworth S.M.: Polyoma virus and simian virus 40 as cancer models: history and perspectives. *Seminars in Cancer Biology* 19:4, 211–217 (2009).

5. Horníková L.; Žíla V.; Španielová H.; Forstová J.: Mouse polyomavirus: propagation, purification, quantification, and storage. *Current Protocols in Microbiology* 38:14, 1-26 (2015).

6. Gross L.: A filterable agent, recovered from ak leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 83:2, 414–421 (1953).

7. Tsai B.; Gilbert J.M.; Stehle T.; Lencer W.; Benjamin T.L.; Rapoport T.A.: Gangliosides are receptors for murine polyoma virus and SV40. *The EMBO Journal* 22:17, 4346–4355 (2003).

8. Döhner K.; Sodeik B.: The role of the cytoskeleton during viral infection. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 285, 67–108 (2005).

9. Griffin B.E.; Clark B.E.: *Murine polyomavirus strain BG, complete genome.* Viral Oncology, Imperial College, Norfolk Place, London, England. Dostupné z URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AF442959.1> [cit. 9.6.2019]

10. Liu Z.; Carmichael GG.: Polyoma virus early-late switch: regulation of late RNA accumulation by DNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:18, 8494–8498 (1993).

11. Moreland R.B.; Montross L.; Garcea R.L.: Characterization of the DNA-binding properties of the polyomavirus capsid protein VP1. *Journal of Virology* 65:3, 1168–1176 (1991).

12. Montross L.; Watkins S.; Moreland R.B.; Mamon H.; Caspar D.L.; Garcea R.L.: Nuclear assembly of polyomavirus capsids in insect cells expressing the major capsid protein VP1. *Journal of Virology* 65:9, 4991–4998 (1991).

13. Fields B.N.; Knipe D.M.; Howley P.M.: *Fields virology. 6th ed*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins 2013.

14. Triezenberg S.J.; Folk W.R.: Essential nucleotides in the polyomavirus origin region. *Journal of Virology* 51:2, 437–444 (1984).

15. Dailey L.; Basilico C.: Sequences in the polyomavirus DNA regulatory region involved in viral DNA replication and early gene expression. *Journal of Virology* 54:3, 739–749 (1985).

16. Carmichael G.G.: Gene regulation and quality control in murine polyomavirus infection. *Viruses* 8:10, 17 (2016).

17. Schüchner S.; Wintersberger E.: Binding of polyomavirus small T antigen to protein phosphatase 2A is required for elimination of p27 and support of S-phase induction in concert with large T antigen. *Journal of Virology* 73:11, 9266–9273 (1999).

18. Doherty J.; Freund R.: Polyomavirus large T antigen overcomes p53 dependent growth arrest. *Oncogene* 14:16, 1923–1931 (1997).

19. Hyde-DeRuyscher R.; Carmichael G.G.: Polyomavirus early-late switch is not regulated at the level of transcription initiation and is associated with changes in RNA processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85:23, 8993–8997 (1988).

20. Carmichael G.G.; Schaffhausen B.S.; Dorsky D.I.; Oliver D.B., Benjamin T.L.: Carboxy terminus of polyoma middle-sized tumor antigen is required for attachment to membranes, associated protein kinase activities, and cell transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79:11, 3579–3583 (1982).

21. Liddington R.C.; Yan Y.; Moulai J.; Sahli R.; Benjamin T.L.; Harrison S.C.: Structure of simian virus 40 at 3.8-A resolution. *Nature* 354:6351, 278–284 (1991).

22. Rayment I.; Baker T.S.; Caspar D.L.D.; Murakami W.T.: Polyoma virus capsid structure at 22.5 Å resolution. *Nature* 295:5845, 110–115 (1982).

23. Griffith J.P.; Griffith D.L.; Rayment I.; Murakami W.T.; Caspar D.L.; Inside polyomavirus at 25-A resolution. *Nature* 355:6361, 652–654 (1992).

24. Brady J.N.; Winston V.D.; Consigli R.A.; Dissociation of polyoma virus by the chelation of calcium ions found associated with purified virions. *Journal of Virology* 23:3, 717–724 (1977).

25. Chang D.; Cai X.; Consigli R.A.: Characterization of the DNA binding properties of polyomavirus capsid protein. *Journal of Virology* 67:10, 6327–6331 (1993).

26. Chang D.; Haynes J.I.; Brady J.N.; Consigli R.A.: The use of additive and subtractive approaches to examine the nuclear localization sequence of the polyomavirus major capsid protein VP1. *Virology* 189:2, 821–827 (1992).

27. Burton K.S.; Consigli R.A.: Methylation of the polyomavirus major capsid protein VP1. *Virus Research* 40:2, 141–147 (1996).

28. Ludlow J.W.; Consigli R.A.: Polyomavirus major capsid protein VP1 is modified by tyrosine sulfuration. *Journal of Virology* 61:5, 1708–1711 (1987).

29. Garcea R.L.; Ballmer-Hofer K.; Benjamin T.L.: Virion assembly defect of polyomavirus hr-t mutants: underphosphorylation of major capsid protein VP1 before viral DNA encapsidation. *Journal of Virology* 54:2, 311–316 (1985).

30. Haynes J.I.; Consigli R.A.: Phosphorylation of the budgerigar fledgling disease virus major capsid protein VP1. *Journal of Virology* 66:7, 4551–4555 (1992).

31. Li M.; Lyon M.K.; Garcea R.L.: In vitro phosphorylation of the polyomavirus major capsid protein VP1 on serine 66 by casein kinase II. *The Journal of Biological Chemistry* 270:43, 26006–26011 (1995).

32. Li M.; Garcea R.L.: Identification of the threonine phosphorylation sites on the polyomavirus major capsid protein VP1: relationship to the activity of middle T antigen. *Journal of Virology* 68:1, 320–327 (1994).

33. Ponder B.A.; Robbins A.K.; Crawford L.V.: Phosphorylation of polyoma and SV40 virus proteins. *The Journal of General Virology* 37:1, 75–83 (1977).

34. Tan K.B.; Sokol F.: Structural proteins of simian virus 40: phosphoproteins. *Journal of Virology* 10:5, 985–994 (1972).

35. Hurdiss D.L.; Frank M.; Snowden J.S.; Macdonald A.; Ranson N.A.: The structure of an infectious human polyomavirus and its interactions with cellular receptors. *Structure (London, England: 1993)* 26:6, 839-847 (2018).

36. RCSB Protein Data, Harrison S.C.; Stehle T.: *RCSB PDB - 1VPN. Unassembled polyomavirus VP1 pentamer (1997)*, Dostupné z URL: <http://www.rcsb.org/3d-view/1VPN/1> [cit. 9.5.2019]

37. Li X.; Wang W.; Chen J.: Recent progress in mass spectrometry proteomics for biomedical research. *Science China. Life Sciences* 60:10, 1093–1113 (2017).

38. Kodíček M.; Olga V.; Hynek R.: *Biochemie: chemický pohled na biologický svět*. 5. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická (VŠCHT); 2015.

39. Reinders J.; Lewandrowski U.; Moebius J.; Wagner Y.; Sickmann A.: Challenges in mass spectrometry-based proteomics. *Proteomics* 4:12, 3686–3703 (2004).

40. Naylor S.; Kumar R.: Emerging role of mass spectrometry in structural and functional proteomics. *Advances in Protein Chemistry* 65, 217–248 (2003).

41. Manjasetty B.A.; Büssow K.; Panjikar S.; Turnbull A.P.: Current methods in structural proteomics and its applications in biological sciences. *Biotech* 2:2, 89–113 (2012).

42. Norin M.; Sundström M.: Structural proteomics: developments in structure-to-function predictions. *Trends in Biotechnology* 20:2, 79–84 (2002).

43. Monti M.; Orrù S.; Pagnozzi D.; Pucci P.: Functional proteomics. *Clinica Chimica Acta* 357:2, 140–150 (2005).

44. Hall D.A.; Ptacek J.; Snyder M.: Protein microarray technology. *Mechanisms of ageing and development* 128:1, 161–167 (2007).

45. Joos T.: Protein microarray technology. *Expert Review of Proteomics* 1:1, 1–3 (2004).

46. Yamamoto M.; Wakatsuki T.; Hada A.; Ryo A.: Use of serial analysis of gene expression (SAGE) technology. *Journal of Immunological Methods* 250:1–2, 45–66 (2001).

47. Paweletz C.P.; Charboneau L.; Bichsel V.E.; Simone N.L.; Chen T.; Gillespie J.W.: Reverse phase protein microarrays which capture disease progression show activation of pro-survival pathways at the cancer invasion front. *Oncogene* 20:16, 1981–1989 (2001).

48. Zhu H.; Bilgin M.; Bangham R.; Hall D.; Casamayor A.; Bertone P.: Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science* 293:5537, 2101–2105 (2001).

49. O'Farrell P.H.: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 250:10, 4007–4021 (1975).

50. Gedela S.; Medicherla N.R.: Chromatographic techniques for the separation of peptides: application to proteomics. *Chromatographia* 65:9, 511–518 (2007).

51. Hughes C.; Ma B.; Lajoie G.A.: De novo sequencing methods in proteomics. *Methods in Molecular Biology* 604, 105–121 (2010).

52. Ilari A.; Savino C.; Protein structure determination by x-ray crystallography. *Methods in Molecular Biology* 452, 63–87 (2008).

53. Quintero-Ronderos P.; Arango M-T.; Castiblanco J.; Correa N.E.; Montoya-Ortíz G.; *Analysis of proteins and antibodies*. El Rosario University Press; 2013 Dostupné z URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459443/> [cit. 26.5.2019]

54. Uhlen M.; Oksvold P.; Fagerberg L.; Lundberg E.; Jonasson K.; Forsberg M.: Towards a knowledge-based human protein atlas. *Nature Biotechnology* 28:12, 1248–1250 (2010).

55. Aponte A.M.; Phillips D.; Harris R.A.; Blinova K.; French S.; Johnson D.T.; 32P labelling of protein phosphorylation and metabolite association in the mitochondria matrix. *Methods in Enzymology* 457, 63–80 (2009).

56. Khoury G.A.; Baliban R.C.; Floudas C.A.; *Proteome-wide post-translational modification statistics: frequency analysis and curation of the swiss-prot database*, *2011*. Dostupné z URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3201773/> [cit. 10.5.2019]

57. Apweiler R.; Hermjakob H.; Sharon N.: On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1473:1, 4–8 (1999).

58. Sickmann A.; Meyer H.E.: Phosphoamino acid analysis. *Proteomics* 1:2, 200–206 (2001).

59. Hoffmann E. de; Stroobant V.: *Mass spectrometry: principles and applications*, *3rd ed*. Chichester, West Sussex, England; Hoboken, NJ: J. Wiley 2007.

60. Pasch H.; Schrepp W.: *MALDI-TOF Mass Spectrometry of Synthetic Polymers*. Springer 2003.

61. Naylor S.; Kumar R.: Emerging role of mass spectrometry in structural and functional proteomics. *Advances in Protein Chemistry 18:2* 217–48 (2003).

62. Beynon J.H.; Morgan R.P.: The development of mass spectroscopy: An historical account. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics* 27:1, 1–30 (1978).

63. Dempster A.J.: A new method of positive ray analysis. *Physical Review* 11:4, 316–325 (1918).

64. Parkins W.E.: The uranium bomb, the calutron, and the space-charge problem. *Physics Today* 58:5, 45–51 (2005).

65. Arpino P.; Baldwin M.A.; McLafferty F.W.: Liquid chromatography-mass spectrometry II—continuous monitoring. *Biomedical Mass Spectrometry* 1:1, 80–2 (1974).

66. Stump J.; Fleming M. C.; Gong R. Jaber W-H.; Jones A. J. Surber W.: Matrix-assisted laser desorption mass spectrometry. *Applied Spectroscopy Reviews* 37, 275–303 (2002).

67. Knochenmuss R.: A quantitative model of ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization. *Journal of Mass Spectrometry: JMS JMS.* 37:8, 867–877 (2002).

68. Wiley W.C.; McLaren I.H.: Time-of-Flight mass spectrometer with improved resolution. *Review of Scientific Instruments* 26:12, 1150 (2004).

69. Tanaka K.; Waki H.; Ido Y.; Akita S.; Yoshida Y.; Yoshida T.: Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2:8, 151–153 (1988).

70. Karas M.; Hillenkamp F.: Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical Chemistry* 60:20, 2299–2301 (1988).

71. Kaufmann R.: Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) mass spectrometry: a novel analytical tool in molecular biology and biotechnology. *Journal of Biotechnology.* 41:2, 155–175 (1995).

72. Chen X.; Carroll J.A.; Beavis R.C.: Near-ultraviolet-induced matrix-assisted laser desorption/ionization as a function of wavelength. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 9:9, 885–891 (1998).

73. Karas M.; Bachmann D.; Bahr U.; Hillenkamp F.: Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* 78, 53–68 (1987).

74. Forstová J.; Krauzewicz N.; Wallace S.; Street A.J.; Dilworth S.M.; Beard S.: Cooperation of structural proteins during late events in the life cycle of polyomavirus. *Journal of Virology* 67:3, 1405–1413 (1993).

75. Osterman L.A.: *Methods of protein and nucleic acid research: immunoelectrophoresis, application of radioisotopes.* Springer-Verlag 1984.