

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

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra genetiky a mikrobiologie



**Využití pseudokapsid ke studiu funkcí minoritních strukturních
proteinů polyomaviru**

Michael Jelínek

Praha 2009

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

(Katedra genetiky a mikrobiologie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Praha)

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



Michael Jelínek

Tato diplomová práce vznikla v letech 2007 -2009 za podpory grantů „Centrum I“ ID 1M0508 a „Výzkumný záměr“ MSM 0021620858.

Poděkování:

Na tomto místě bych rád velmi poděkoval paní Doc. RNDr. Jitce Forstové, CSc. za její trpělivost, rady a vedení celé diplomové práce.

Také velmi děkuji RNDr. Aleně Morávkové, Ph.D. za všechnu pomoc, podporu, za pravidelné dodávky pracovní morálky a za to, že vůbec je.

Dále děkuji naší výborné logistické podpoře: Vlastě Sakařové, Ivaně Polívkové a Daně Beranové.

Děkuji navíc posádce 006, jmenovitě Mgr. Vojtovi Žílovi za zhotovení EM snímků, Mgr. Martinovi Fraiberkovi za I.T. služby, Pepovi Čáslavovi za paralelní dobrodružství a všem ostatním, neboť všichni se svým dílem podíleli na mém praktickém uvedení do síně vědy.

Navíc nesmím zapomenout na rodiče, prarodiče a vůbec, celou rodinu, neboť jejich podpora ať už materiální nebo morální byla obrovská. Velké díky!

Nakonec bych rád poděkoval všem, kteří mi až do úplného konce věřili. Díky všem.

Abstract

Exploitation of pseudocapsids for studies of functions of polyomavirus minor structural proteins VP2 and VP3

Polyomaviruses are non-enveloped DNA viruses with capsid composite of three proteins – the major VP1 and the minor VP2 and VP3. The function of minor structural proteins remains still unclear in spite of many years of researching. We studied possible function of these proteins in the early phase of infection by using virus-like particles (VLPs) of murine polyomavirus as competitive inhibitors of infectivity. Furthermore, we compared localization and cytotoxic properties of structural minor proteins of BK virus and murine polyomavirus (MPyV) fused with EGFP.

First we infected murine 3T3 fibroblasts by viral inocula mixed with VLPs composite of VP1 proteins only, VP1 and VP2 proteins or VP1 and VP3 proteins. To detect possible inhibition of viral infection by VLPs, we counted cells expressing LT antigen using indirect immunofluorescence and flow cytometry one day post infection. Surprisingly, we did not observe any evidential changes in rate of infection. This result implies there is probably no competition among VLPs and infective virions for extra and intracellular receptors.

Furthermore we compared localization and cytotoxicity of fusion variants of minor proteins VP2 and VP3 (fused C- or N-terminally with EGFP) and minor proteins alone of both viruses expressed in murine 3T3 and simian VERO fibroblasts. All forms of fusion variants have very similar localization like non-fused minor proteins, except for artificial nucleolar localization of BKV with EGFP added to C-terminus. Whereas the cytotoxicity of MPyV proteins fused with EGFP situated on C-terminus resembled non-fused proteins, cytotoxicity of non-fused BKV minor proteins resemble fusion variants with EGFP situated on N-terminus. Taken together, the BKV and MPyV minor proteins have different properties when expressed in cells dependent on protein type (non-fused or N- or C-terminal fused with EGFP), whereas the influence of used cell type was neglectable.

Klíčová slova: myší polyomavirus, BK virus, strukturní minoritní proteiny, kompetitivní inhibice, pseudokapsidy (VLPs), apoptóza

Key words: murine polyomavirus, BK virus, structural minor protein, competitive inhibition, virus-like particles (VLPs), apoptosis,

Seznam použitých zkratek:

AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
ATP	adenosintrifosfát
BB	Blokační pufr
BFDV	Virus napadající mláďata andulek
BKV	BK virus
BSA	Bovinní sérum albumin
BPyV	Bovinní polyomavirus
DAPI	4',6-diamidino-2-fenylindole, DNA specifické barvivo
DC	Dendritic cells, dendritické buňky
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EGFP	enhanced green fluorescent protein
ER	endoplazmatické retikulum
HAU	hemaglutinační jednotka
HaPyV	polyomavirus napadající křečky
HBV	hepatitis B virus
HIV	Human Immunodeficiency Virus
JCV	JC virus
Kbp	párů kilobází
kD	kilodaltony
LPV	Lymfotropní papovavirus (LPV)
LT	velký T antigen
MCCV	Merkel cell carcinoma virus, virus karcinomu Merklových buněk
MPyV	Mouse polyomavirus, Myší polyomavirus
MT	střední T antigen
MtV	murine pneumotropic virus
NLS	jaderný lokalizační signál
NPC	komplex proteinů jaderného póru
PAAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
PARP	poly (ADP) ribóza polymeráza
PBS	fosfátový pufr

PFA	paraformaldehyd
PI3	fosfoinositol – 3 - kináza
PML	progresivní multifokální leukoencefalopatie
PMSF	fenyl-methylsulfonylchlorid
PPA2	protein fosfatáza A2
RI	refraktometrický index
RKV	Virus vakuolující králíčí ledviny
RNA	ribonukleová kyselina
rpm	otáčky za minutu
SA	sialová kyselina
SDS	sodium dodecyl sulfát
ST	malý T antigen
SV40	simian virus 40, opičí virus 40
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
VLPs, CVLPS	virus like particles, chimerické VLPs
VP1	hlavní strukturní protein
VP2, VP3	minoritní strukturní proteiny
VP4	protein viru SV40

I. Úvod.....	10
Literární přehled	13
II. 1 Viry čeledi polyomaviridae.....	13
II. 1.1 Charakteristika čeledi Polyomaviridae	14
II. 1.2 Patogeneze virů čeledi Polyomaviridae	15
II. 1.3 Životní cyklus polyomavirů.....	15
II. 1.4 Proteiny polyomavirů.....	16
II. 1.4.1 Časné proteiny polyomavirů	16
II. 1.4.2 Strukturální proteiny polyomavirů.....	17
II. 2 Minoritní strukturální proteiny VP2 a VP3.....	19
II. 2.1 Struktura minoritních proteinů	19
II. 2.2 Lokalizace minoritních proteinů	20
II. 2.2.1 Lokalizace minoritních proteinů ve virionu	20
II. 2.2.2 Lokalizace minoritních proteinů v buňce	21
II. 2.3 Funkce minoritních proteinů	21
II. 2.3.1 Funkce minoritních proteinů v časně fázi infekce	21
II. 2.3.2 Funkce minoritních proteinů v pozdní fázi infekce	22
II. 3 Pseudokapsidy virů čeledi polyomaviridae.....	23
II. 3.1 Obecné vlastnosti a produkce VLPs	23
II. 3.2 Význam VLPs polyomavirů	24
II. 3.2.1 Genový přenos do buněk pomocí VLPs.....	24
II. 3.2.2 Využití VLPs – vyvolání imunitní odpovědi.....	25
II. 3.2.3 Protinádorová terapie – toxické CVLPs	27
II. 4 Časné fáze infekce polyomavirů – vstup virionů do buněk a jejich transport k jádru ...	29
II. 4.1 Vazba na receptor a internalizace polyomavirů	29
II. 4.2 Transport polyomavirů do buněčného jádra.....	32
II. 4.3 Využití VLPs pro výzkum transportu virionů	35
III. Cíle	35
IV. Metody.....	38
IV. 1 Materiál.....	39
IV. 1.1 Roztoky:	39
IV. 1.2 Přístroje:	40
IV. 1.3 Média a materiál pro tkáňové kultury:	41
IV. 1.5 Markery molekulových vah:	42
IV. 1.6 Protilátky	42
Primární protilátky:	41
M α VP1, MPyV: myší monoklonální protilátka proti VP1 myšího polyomaviru, izotyp IgG1 (FORSTOVÁ et al., 1993)	41
Sekundární protilátky:	42
IV. 1.7 Virové kmeny a buněčné linie	43
IV. 1.7. 1 Bakteriální a virové kmeny:.....	43
IV. 1.7. 2 Buněčné linie:	43
IV. 1.8 Vektory.....	44
IV. 2 Metody.....	45
IV. 2.1 Práce s buněčnými kulturami.....	45
IV. 2.1.1 Práce s hmyzími buňkami.....	45

IV. 2.1.1.1 Pasážování hmyzích buněk.....	45
IV. 2.1.1.2 Infekce hmyzích buněk.....	45
IV. 2.1.1.3 Sklizeň infikovaných buněk.....	45
IV. 2.1.2 Práce se savčími buňkami.....	45
IV. 2.1.2.1 Pasážování savčích buněk.....	45
IV. 2.1.2.2 Infekce savčích buněk.....	46
IV. 2.1.2.3 Fixace savčích buněk.....	46
IV. 2.1.2.4 Vysycení savčích buněk.....	46
IV. 2.1.2.5 Nepřímá imunofluorescence.....	46
IV. 2.1.2.6 Transfekce savčích buněk.....	47
IV. 2.1.2.7 Příprava savčích buněk na měření průtokovým cytometrem.....	47
IV. 2.1.2.8 Analýza dat z průtokové cytometrie.....	48
IV. 2.2. Plaková zkouška.....	47
IV. 2.3. Práce s proteiny.....	48
IV. 2.3.1 Příprava lyzátů pro imunologickou detekci.....	48
IV. 2.3.2 Dot blot.....	49
IV. 2.3.3 Příprava vzorků pro proteinovou elektroforézu a proteinová elektroforéza....	49
IV. 2.3.4 Western blot.....	49
IV. 2.3.5 Barvení Coomassie blue.....	50
IV. 2.3.6 Imunologická detekce.....	50
IV. 2.4. Izolace pseudokapsid z hmyzích buněk.....	51
IV. 2.4.1 Příprava lyzátu.....	51
IV. 2.4.2 Centrifugace přes sacharózový polštář a sonikace sedimentu.....	51
IV. 2.4.3 Centrifugace v CsCl gradientu a jeho analýza.....	51
IV. 2.4.4 Dialýza, uskladnění a analýza preparace pseudokapsid.....	52
IV. 2.4.5 Měření koncentrace proteinů podle Bredfordové.....	52
IV. 2.4.6 Hemaglutinace (Türler a Beard 1985).....	52
V. Výsledky.....	54
V. 1 Vyšetřování možné účasti strukturních proteinů VP2 a VP3 myšního polyomaviru ve velmi časně fázi infekčního cyklu.....	55
V. 1.1 Příprava pseudokapsid (VLPs) odvozených od strukturních proteinů polyomaviru.....	56
V. 1.1.1. Plaková izolace rekombinantního bakuloviru produkujícího MPyV VP1 a analýza buněčných lyzátů.....	56
IV.1.1.2 Příprava VP1-VLPs.....	58
V. 1.1.3. Plaková izolace rekombinantního bakuloviru produkujícího strukturní proteiny VP1 a VP3 MPyV a analýza buněčných lyzátů.....	60
V.1.1.4. Plaková izolace rekombinantního bakuloviru produkujícího strukturní proteiny VP1 a VP2 MPyV a analýza buněčných lyzátů.....	63
V. 1.1.5. Příprava VP1/VP3 a VP1/VP2 VLPs.....	63
V. 1.2 Analýza kompetice infekčních virionů a VLPs o receptory.....	67
V.1.2.1 Určení infekivity viru v přítomnosti VLPs metodou nepřímé imunofluorescence.....	68
V.1.2.2 Určení infekivity viru v přítomnosti různých koncentrací VLPs průtokovou cytometrií.....	72

V. 2. Studium vlastností strukturních minoritních proteinů během jejich samostatné produkce v savčích buňkách.....	77
V. 2.1 Transfekce savčích buněk plazmidy pro produkci minoritních strukturních proteinů myšího a BK polyomaviru fúzovaných s EGFP.....	78
V. 2.1.1 Produkce fúzních variant strukturních proteinů BK viru: VP2–EGFP, EGFP–VP2 a VP3–EGFP, EGFP–VP3 ve VERO buňkách.....	80
V. 2.1.2 Produkce fúzních variant minoritních proteinů BK viru: VP2–EGFP, EGFP–VP2 a VP3–EGFP, EGFP–VP3 v 3T3 fibroblastech.....	84
V. 2.1.3 Produkce fúzních minoritních proteinů myšího polyomaviru: VP2–EGFP a VP3–EGFP, EGFP–VP3 ve VERO buňkách.....	91
VI. Diskuze.....	94
VI. 1 Izolace pseudokapsid a provedení kompetičních testů.....	96
VI. 1.1 Příprava pseudokapsid VP1, VP1/VP2, VP1/VP3.....	95
VI. 1.2 Testy kompetitivní inhibice.....	96
VI. 2 Exprese strukturních minoritních proteinů BKV a MPyV fúzovaných s EGFP v myších a opičích buňkách.....	98
VII. Souhrn.....	101
VIII. Citace.....	103

I.

Úvod

Tato práce vznikla jako součást širšího dlouholetého výzkumu polyomavirů na Katedře genetiky a mikrobiologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy.

Polyomaviry jsou malé tumorogenní DNA viry, které jsou vzhledem k omezené velikosti jejich genomu (cca 5,2 kbp) ve velké míře závislé na funkcích hostitelské buňky. Díky tomu jejich studium v minulosti přineslo zásadní objevy buněčných mechanismů. Např. studium opičího polyomaviru SV40 pomohlo objasnit mechanismus replikace buněčné DNA, některé způsoby regulace genové exprese (enhancery), polyadenylaci mRNA, podstatu jaderného lokalizačního signálu nebo přítomnost nukleozomů na eukaryotních DNA. Významnou roli sehrály polyomaviry, zejména myší polyomavirus a SV40, ve výzkumu buněčné transformace. Jednou z funkcí časných proteinů polyomavirů je deregulovat buněčné procesy tak, aby hostitelská buňka byla připravena pro intenzivní replikaci virových genomů. Tyto proteiny indukují buněčnou proliferaci a aktivaci drah signální transdukce. Zatímco produktivně infikované buňky končí destrukcí, nepermissivní buňky, ve kterých jsou produkovány časné virové proteiny, avšak blokována replikace virové DNA nebo morfogeneze virionů, se mohou v důsledku konstitutivní exprese časných virových antigenů změnit na nádorově transformované. Díky studiu indukce transformace polyomaviry byl objeven protein p53 a poznána funkce p53 a pRb onkosupresorů.

Přestože polyomaviry byly a jsou intenzivně studovány, stále zbývá mnoho otázek neobjasněných: Není známo, jak je zajištěna doživotní perzistence virů v infikovaných organizmech, ani zdali a jak přispívají lidské (případně také jiné primáty) polyomaviry ke vzniku lidských nádorových onemocnění. Nedávno objevený nový lidský polyomavirus, jehož genom je integrován klonálně v karcinomech Merkelových buněk, napovídá, že by polyomaviry mohly být přímo zodpovědné za indukci některých nádorů. Navíc, dosud nejsou objasněny ani všechny mechanismy jednotlivých stádií replikačního cyklu polyomavirů, zejména interakce jejich strukturních proteinů s buněčnými strukturami během pohybu virionů od buněčné membrány k buněčnému jádru, místo a způsob jejich rozvolnění, ani způsob dopravy virových genomů do jádra. Nejsou také objasněny všechny funkce polyomavirových produktů, zejména strukturních proteinů.

Mnoho z těchto otázek bude třeba zodpovědět, aby mohlo být naplněno další potenciální využití polyomavirů – respektive jejich kapsidových struktur – pro vývoj nanostruktur využitelných v genové a protinádorové terapii. Uměle připravované kapsidy na bázi polyomavirů by mohly sloužit k přenosu terapeutické DNA, proteinů i nízkomolekulárních látek do cílových buněk a tkání.

Čím je virus menší, tím více funkcí bývá soustředěno v jeho jednotlivých genových produktech. Zatímco u hlavního strukturního proteinu polyomaviru VP1 je známa řada funkcí (i když jistě ne všechny), o funkci minoritních proteinů se stále neví mnoho. Přítomnost jejich nepřítomnost ve virionech vede ke ztrátě infekivity.

Tato práce je příspěvkem ke studiu vlastností minoritních proteinů polyomavirů a jejich možné účasti ve velmi časných stádiích virové infekce.

II.

Literární přehled

II. 1 Viry čeledi polyomaviridae

II. 1.1 Charakteristika čeledi *Polyomaviridae*

Čeď *Polyomaviridae* je ze systematického hlediska poměrně novou čeledí virů, přestože jsou její zástupci známí již mnoho let, např. virus SV (Simian virus) 40 - EDDY *et al.*, 1962, BK virus - GARDNER *et al.*, 1971, JC virus - PADGETT *et al.*, 1971, a další. Vznikla rozdělením čeledi *Papovaviridae*. Podčeledi *Polyomavirinae* a *Papilomavirinae* byly na základě nových poznatků o organizaci genomu a o replikačním cyklu povýšeny na samostatné čeledi. Hostitelé polyomavirů jsou ptáci a savci - Tab. II. 1 (převzato a upraveno z IMPERIAL a MAJOR 2007) shrnuje významné zástupce čeledi *Polyomaviridae*.

Hostitel	Virus
Člověk	BK virus (BKV), JC virus (JCV)
Opice	SV 40, Simian agent 12, Lymfotropní papovavirus (LPV)
Skot	Bovine polyomavirus (BPyV)
Králík	Virus vakuolující králíčí ledviny (RKV)
Myš	Myší polyomavirus (MPyV), K virus
Křeček	Papovavirus křečků (HPyV)
Papoušek	Virus napadající mláďata andulek (BFDV)

Tab. II. 1:
Významní
zástupci čeledi
polyomaviridae

Polyomaviry nesou v relativně malé (40 – 50 nm) neobalené kapsidě kruhovou dsDNA. Virový genom je kondenzován asociací s histony H2A, H2B, H3 a H4, histon H1 nebyl ve virionech nalezen. DNA polyomavirů, dlouhá kolem 5,2 kbp kóduje 6 – 7 vesměs

multifunkčních proteinů. Proteiny jsou kódovány v obou řetězcích a jsou translatovány z mRNA tvořených alternativním sestřihem dvou primárních transkriptů (IMPERIAL a MAJOR 2007).

Kapsidy polyomavirů jsou tvořeny 360 molekulami hlavního strukturního proteinu VP1, poskládaných do 72 pentamerů, 12 pentavalentních a 60 hexavalentních. Triangulační číslo kapsidy je 7 (SALUNKE et al., 1986). Virová inkulu obsahují mnoho prázdných kapsid nebo kapsid s inkorporovanými fragmenty buněčné DNA. Poměr hemaglutinačního a infekčního titru bývá často vysoký ($\geq 100 : 1$; TÜRLE A BEARD, 1985). Všechny polyomaviry mohou indukovat v nepermissivních hostitelích tumory. Infekce permissivních buněk končí jejich destrukcí. Za tumorigenezi jsou zodpovědné časné virové antigeny, podobně jako u zástupců dalších čeledí malých DNA virů (LEVIN, 2009).

II. 1.2 Patogeneze virů čeledi *Polyomaviridae*

Do čeledi *Polyomaviridae* patří perzistující viry, které v jinak zdravých jedincích nevyvolávají onemocnění. V imunosuprimovaných jedincích (novorozené myši, pacienti s AIDS nebo s imunosupresivní léčbou před transplantacemi) se teprve může projevit tumorogenní nebo patogenní efekt viru.

Primátí virus SV40 napadající především ledvinné buňky opic, nebyl diagnostikován jako původce konkrétních lidských nádorů. Ve výjimečných případech byla ale nalezena virová DNA nebo časné proteiny v nádorových buňkách.

BK virus způsobuje komplikaci léčby po transplantaci ledvin, napadá fibroblasty i epiteliální ledvinné buňky a může působit hemorhagické záněty močového měchýře i selhání ledvin. JC virus může způsobit u imunosuprimovaných jedinců fatální progresivní multifokální leukoencefalitidu (PML) (shrnuto v IMPERIAL a MAJOR, 2007).

Sekvence nedávno objeveného MCC viru byly nalezeny integrovány v karcinomech Merkelových buněk. Monoklonální charakter integrace virového genomu naznačuje, že by MCC virus mohl být původcem tohoto agresivního neuroendokrinního nádoru (shrnuto v ZHAN et al., 2009)

II. 1.3 Životní cyklus polyomavirů

Infekční viriony i prázdné kapsidy se vážou na specifické receptory na povrchu buněk a vstupují do buněk receptorem zprostředkovanou endocytózou. Viriony dále cestují přes

membránové váčky, endoplazmatické retikulum a zatím nevyjasněným způsobem dopraví virový genom do buněčného jádra. Rovněž transport prázdných kapsid i kapsid obsahujících fragmenty buněčné DNA zůstává otázkou, i když je pravděpodobné, že jsou degradovány v cytoplazmě (MACKAY a CONSIGLY, 1976; STEHLE et al., 1997; GILBERT a BENJAMIN, 2000; RICHTEROVÁ et al., 2001; LIEBL et al., 2006; DANIELS et al., 2006), viz. kapitola II. 4.

V jádře se nejprve z časného promotoru exprimují časné geny, jejichž genové produkty fungují jako transkripční faktory, iniciují replikaci a deregulují buněčný cyklus. Virová DNA je replikována buněčnými DNA polymerázami a již v průběhu replikace začíná produkce pozdních antigenů - strukturních proteinů (shrnutí ve FANNING a ZHAO, 2009). Strukturní proteiny jsou transportovány do jádra (STAMATOS et al., 1987). Zde probíhá morfogeneze virionů dosud neobjasněným mechanismem. Replikační cyklus končí smrtí infikované buňky nekrózou i apoptózou (NORKIN 1976, DANIELS et al., 2006). Některé práce uvádějí, že viriony jsou aktivně uvolňovány z buněk ještě před její smrtí (CLAYSON et al., 1989). Mechanismus transportu viru z jádra, cytoplasmou i způsob uvolnění se z buňky však není úplně prozkoumán.

II. 1.4 Proteiny polyomavirů

Proteiny polyomavirů můžeme rozdělit na časné (nestrukturní) a pozdní (strukturní) antigeny. Výjimku tvoří pozdní agnoprotein primátích polyomavirů (OKADA et al., 2001), a nově popsany protein VP4 viru SV40 (DANIELS et. al., 2007), které mají funkci v morfogenezi virionu a lyzi buňky.

II. 1.4.1 Časné proteiny polyomavirů

Nejdůležitějším časným proteinem všech polyomavirů je *velký tumorogenní antigen* (LT). LT je 100 – 200 kD velký multifunkční protein s DNA vazebnou aktivitou, který pozitivně i negativně ovlivňuje expresi ostatních virových proteinů. Po vazbě na replikační počátek tvoří LT hexamery, je aktivována LT ATPázová a helikázová aktivita. Dojde k rozvolnění DNA a na replikačním počátku virového genomu vytvoří buněčné proteiny replikon (LEVIN, 2009). LT má také roli v deregulaci buňky, neboť váže řadu buněčných proteinů, Rb onkosupresor, alfa podjednotku DNA polymerázy, p300 a LT primátích polyomavirů ještě onkosupresor p53.

Střední tumorogenní antigen (MT) je membránový protein typický pro polyomaviry napadající hlodavce a má funkci v deregulaci buněčného cyklu. Nemá katalytickou aktivitu, spíše ovlivňuje aktivitu proteinů drah signální transdukce. Inhibuje aktivitu protein fosfatázy 2 (PPA2), naopak aktivuje fosfoinositol kinázu 3 (PI3) a kinázy rodiny src (shrnutí v SCHAFFHAUSEN a ROBERTS, 2009).

Malý T antigen (ST) je cytoplazmatický protein, který rovněž dereguluje buněčný cyklus. Molekulární mechanismus spočívá ve snížení aktivity PPA2, což vede k hyperfosforylaci signálních protein kináz. (Shrnutí v SABLINA a HAHN, 2008).

II. 1.4.2 Strukturní proteiny polyomavirů

Kapsidy polyomavirů jsou tvořeny třemi strukturními proteiny, majoritním VP1 a minoritními VP2 a VP3. Geny pro tyto tři proteiny se překrývají, ale VP1 je kódován v jiné čtecí fázi než proteiny VP2 a VP3. Protein VP3 je překládán z vnitřního iniciačního kodónu genu pro VP2 – je zkrácenou formou proteinu VP2. U primátích virů jsou minoritní proteiny překládány z jedné mRNA, u hlodavčích ze dvou různých mRNA (BATT et al., 1994). Minoritní proteiny polyomavirů budou dále popsány v kap. II. 2. Obecné vlastnosti proteinu VP1 jsou demonstrovány na příkladu VP1 MPyV.

Hlavní strukturní protein myšího polyomaviru - VP1.

Protein VP1 (45 kD) je základním stavebním prvkem polyomavirové kapsidy. Na Obr. II. 1 je znázorněna jeho sekundární struktura. Smyčky mezi beta listy (viz Obr. II. 1) mají důležitou funkci ve vazbě gangliosidového receptoru zakončeného kyselinou sialovou, v hemaglutinaci, v protein - proteinových interakcích a také v protilátkové odpovědi (STEHLE et al., 1997, GEDVILAITE et al., 2004).

Obr. II. 1:
Struktura
proteinu VP1,
MPyV.

Protein VP1
(červeně): Na
obrázku jsou
označeny beta
listy, které
jsou spojeny
povrchovými
smyčkami,
Sousední
proteiny
v pentametu
(modře),
Sialová
kyselina
receptoru
(žlutě)
(převzato z
STEHLE et
al., 1997)



C-koncová doména je zodpovědná za *samouspořádávání pentamer* do kapsid (YOKOAMA et al., 2007).

Pentamery jsou transportovány do jádra prostřednictvím *jaderného lokalizačního signálu* (NLS) na N-konci proteinu VP1. Jedná se o aa 1 – 11, kritická je přítomnost lysinu v pozici 3 (CHANG et al., 1992). Protein VP1 váže rovněž svým N-koncem *nespecificky DNA*. Pro aktivitu k DNA jsou důležité aa 1 – 7 a lysin 28 (MORELAND et al., 1991). HAYNES a kolegové (1993) popsali také *vazebné místo pro vápník* (aa 232 – 364). Mutace v tomto místě znemožní produkci infekčních virionů (viz kap. II. 3) I když byl popsán u primátích virových genomů *enkapsidační signál* (OPENHEIM et al., 1992), u jiných je nespecifická vazba DNA zřejmě postačující pro enkapsidaci a tvorbu nových virionů. Byla popsána i schopnost VP1 vázat se na cytoskeletární mikrofilamenta (RICHTEROVÁ et al., 2001), na mitotický tubulin (PÁLKOVÁ et al., 2000) a také lamin (PLEVKA dipl. práce, 2002,

MANINOVÁ dipl. práce, 2007). Vztah proteinu VP1 a cytoskeletárního aparátu však zatím beze zbytku objasněn nebyl.

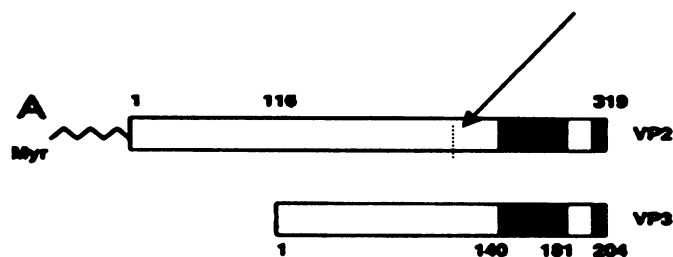
VP1 je *posttranslačně modifikován* – acetylován, fosforylován (BOLEN et al., 1981), sulfurylován a methylován (BURTON a CONSIGLI 1996). Podle typu modifikací je rozeznáváno až 11 izoforem proteinu VP1, u nichž nejsou prozatím známy rozdíly ve funkci. Nicméně byly popsány rozdíly v distribuci izoforem mezi infekčními viriony a prázdnými kapsidami, vliv různých izoforem na hemaglutinaci nebo na samouspořádávání se kapsid (BOLEN at al., 1981, GARCEA et al., 1985, FORSTOVÁ et al., 1993).

II. 2 Minoritní strukturní proteiny VP2 a VP3

V každém infekčním virionu je 72 molekul minoritních proteinů VP2 nebo VP3 – jeden na pentamer tvořený VP1 proteiny (BAROUCH A HARRISON 1994). O jejich významu a vzájemné nezastupitelnosti pro infektivitu viru svědčí nefunkčnost virionů s delecí některého z minoritních proteinů (MANNOVÁ et al., 2002).

II. 2.1 Struktura minoritních proteinů

Obr. II.2 ukazuje poměrnou délku a důležité domény proteinů VP2 a VP3 MPyV. Na C-konci je jaderný lokalizační signál (aa 307 - 318, CHANG et al., 1992b), po jehož odstranění jsou minoritní proteiny distribuovány v cytoplazmě. U minoritních proteinů viru SV40 je NLS také na C-konci (aa 317 – 323, WYCHOWSKI et l., 1987), který je prodloužen a obsahuje navíc (oproti minoritním proteinům hlodavčích polyomavirů) DNA vazebnou doménu (CLEVER et al., 1993). Blíže k N-konci je jediná sekundární struktura minoritních proteinů - hydrofobní α -helix, kterým jsou minoritní proteiny vázány ke středové prohlubni pentametrů proteinu VP1. VP2 a VP3 lze chápat jako delší a kratší formu téhož proteinu. VP2 je o 116 aminokyselin (z N-konce) delší (Obr. II. 2).



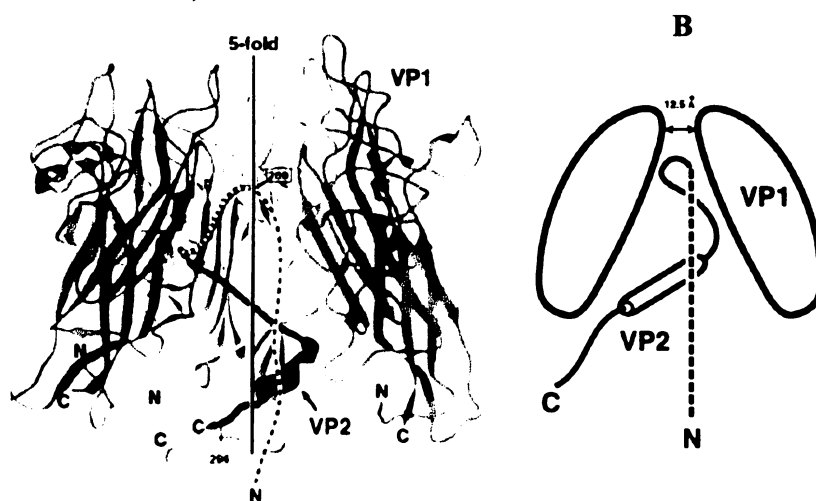
Obr. II. 2: Proteiny VP2 a VP3 MPyV a jejich domény. Myr: myristylová kotva. Šipka označuje variabilní doménu orientovanou k povrchu dutiny pentameru, červeně VP1 vazebná oblast včetně α helixu, černý proužek: NLS (Převzato a upraveno z Barouch a Harrison 1994)

N-konec proteinu VP2 je myristylován, což je jediná dosud známá posttranslační modifikace minoritních proteinů (STREULI A GRIFFIN, 1987). Funkce této myristylace byla zkoumána substitucí N-koncového glycinu za jinou aminokyselinu, což myristylaci zabránilo. Substituce za kyselinu glutamovou a glutamin snížila infektivitu, nicméně až po několika kolech infekce (KRAUZEWICZ et al., 1990, MANNOVÁ et al., 2002). Náhrada glycinu za alanin snížila infektivitu zhruba o 95% (SAHLI et al., 1993). Zajímavým jevem je drastické snížení infekivity při substituci glycinu za histidin. Je pravděpodobné, že na infektivitu viru má vliv nejen přítomnost či nepřítomnost myristylové kyseliny, ale také náboj koncové aa (MANNOVÁ et al., 2002). Protože VP2 tvoří v dutině pentameru vlásenku, předpokládala se určitá role myristilové kyseliny při internalizaci viru buňkou. V tomto modelu by byl N-konec s myristilovou kyselinou vystaven na povrch virionu po navázání VP1 na receptor a zanořoval by se do buněčné membrány (CHEN et al., 1998). Tato teorie zatím potvrzena nebyla.

II. 2.2 Lokalizace minoritních proteinů

II. 2.2.1 Lokalizace minoritních proteinů ve virionu

Lokalizaci proteinů VP2 a VP3 ve virionu ukazuje Obr. II. 3. Za VP1 vazebnou doménou směrem k N-konci se nachází hypervariabilní doména, která se prudce stáčí do vnitřního prostoru pentameru. V dutině pentameru přechází plynule do mírně konzervativní domény, která se pod otvorem v pentameru obrací zpátky k virovému core. Protein VP3 za tímto ohybem končí. V kompaktní kapsidě nejsou tedy minoritní proteiny exponovány na povrchu (LIDDINGTON et al 1991, GRIFFITH et al., 1992, BAROUCH A HARRISON 1994, CHEN et al., 1998).



Obr. II. 3:
Lokalizace
minoritních
proteinů
v pentameru.
Dvě různá
zobrazení. A:
Stuhový model,
B: Schematický
model.

II. 2.2.2 Lokalizace minoritních proteinů v buňce

Nově syntetizované strukturní proteiny SV 40 jsou transportovány díky svému NLS do jádra, dokonce i do izolovaných jader bez cytoplazmy (LIN et al., 1986, DEAN a KASAMATZU 1993). I minoritní proteiny myšího polyomaviru jsou v infikovaných savčích buňkách lokalizovány v buněčném jádře (CAI et al., 1994). V hmyzích buňkách infikovaných rekombinantním bakulovirem produkujícím samostatně minoritní proteiny myšího polyomaviru je VP2 asociován s jadernou membránou a VP3 je lokalizován v cytoplasmě. Ve všech typech buněk ale koexprese s proteinem VP1 podporuje transport minoritních proteinů do jádra (FORSTOVÁ et al., 1993, DELOS et al., 1993). V některých pokusech o samostatnou expresi minoritních strukturních proteinů v myších buňkách byly VP2 a VP3 pozorovány částečně v jádře a částečně též v cytoplasmě (KEČKÉŠOVÁ, dipl. práce, 2003, BOUŘA, dipl. práce, 2004).

II. 2.3 Funkce minoritních proteinů

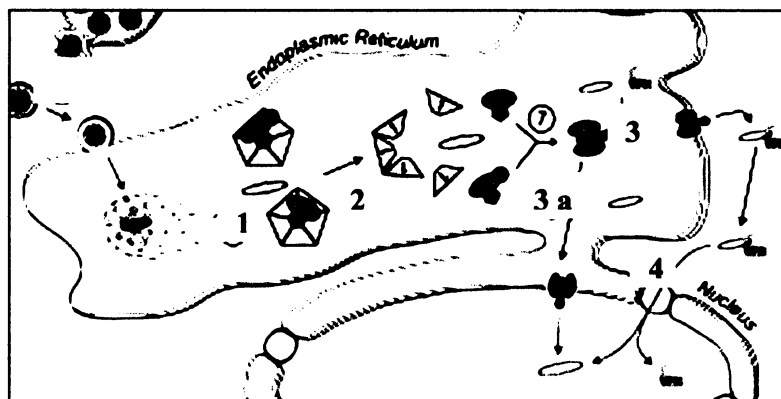
Jak již bylo dříve řečeno (II. 2) strukturní minoritní proteiny polyomavirů jsou nezbytné pro infekčnost virionů. Dosud byly popsány některé funkce VP2 a VP3 proteinů v životním cyklu viru, které souvisí s jaderným lokalizačním signálem, schopností perforovat membrány nebo působit v posttranslačních úpravách.

II. 2.3.1 Funkce minoritních proteinů v časně fázi infekce

Bylo publikováno, že VP2 SV40 se nějakým způsobem účastní velmi časně fáze infekce. Ačkoliv za vazbu na receptor je odpovědný VP1, nepřítomnost VP2 ve virionu snižuje adsorpci na buňku až třikrát. To je nicméně v rozporu se zjištěním, že jsou minoritní proteiny exponovány na povrch kapsidy až v ER (NORKIN et al., 2002).

DANIELS a kolegové (2006b) zjistili, že se VP2, ale hlavně VP3 inkorporuje do membrán ER v časných fázích infekce (Obr. II. 4). Vzniklými póry by mohlo virové core proniknout do jádra translokací přes komplex proteinů jaderného póru (NPC) (DANIELS et al., 2006b).

Obr. II. 4: Funkce VP2 a VP3 SV 40 v časných fázích infekce.
1: Rozvolnění kapsidy, **2:** Uvolnění VP2 a VP3 z pentamer, **3:** , tvorba pórů, **3 a,** **4:** Transport virového core póry. Převzato a upraveno z DANIELS et al., 2006b



U MPyV se do membrán ER v časných fázích infekce inkorporují oba dva minoritní proteiny, důležitější je ale zřejmě permeabilizační schopnost proteinu VP2 (RAINER – BERGER et al., 2007). Protein VP3 viru SV 40 váže s vysokou afinitou importin $\alpha 2/\beta$ a mutace importin vazebné domény prudce sníží infektivitu. Ukázalo se, že enkapsidační signál proteinu VP3 viru SV40 je dostatečně silný, aby dopravil do jádra pentamer proteinů VP1 s odstraněným NLS, nebo rozvolněné virové core (NAKANISHI et al., 2002).

II. 2.3.2 Funkce minoritních proteinů v pozdní fázi infekce

Protein VP2 (případně jeho myristylová kyselina) MPyV má dále funkci v posttranslačních modifikacích proteinu VP1. Izoformy proteinu VP1 nalezené v infekčních virionech byly fosforylovány stejně jako izoformy VP1 produkované v hmyzích buňkách spolu s proteinem VP2. V hmyzích buňkách produkujících protein VP1 samotný nebo spolu s proteinem VP3 byly proteiny VP1 fosforylovány odlišně (FORSTOVÁ et al. 1993, LI et al., 1995).

Bylo zjištěno, že protein VP3 viru SV40 reguluje na počátku pozdní fáze průběh virové infekce. Protein VP3 viru SV40 tvoří komplex s transkripčním faktorem Sp-1, který působí jako represor v oblasti promotorů časných proteinů (CLEVER et al., 1993).

V průběhu pozdní fáze infekce se uplatňuje DNA vazebná doména na C-konci strukturních minoritních proteinů primátích polyomavirů v morfogenezi virionů. Viriony nesoucí minoritní proteiny s delecemi této domény netvoří plaky, přestože jsou proteiny normálně transportovány do jádra (DEAN et al., 1995). Proteiny VP2 a VP3 MPyV tuto DNA vazebnou doménu nemají, ale vážou buněčné histony. Mohly by se tedy také podílet na tvorbě vazby mezi virovým core a proteinem VP1 (CAI et al., 1994).

DANIELS et al. (2006a) zjistili, že je protein VP3 viru SV40 schopen lyzovat prokaryotické buňky permeabilizací jejich membrán. Protein VP3 také indukuje specificky nekrozu savčích buněk aktivací jaderného enzymu poly (ADP ribóza) polymerázy (PARP). Na enzym PARP se váže C–koncová doména proteinu VP3 (GORDON – SHAAG et al., 2003).

II. 3 Pseudokapsidy virů čeledi polyomaviridae

V této práci je dále používán termín „viru podobné částice“ = „virus-like particles“ = „VLPs“, který se používá pro jakékoli kapsidy vytvořené *in vitro* nebo v heterologních systémech, neobsahující virovou DNA. Termín „pseudokapsidy“, který není podle všech prací významově totožný, je nicméně dále v textu používán synonymně s termínem VLPs (MONTROSS et al., 1991, PÁLKOVÁ et al., 2000 a další).

II. 3. 1 Obecné vlastnosti a produkce VLPs

VLPs polyomavirů mají podobné vlastnosti jako viriony z hlediska tvaru, velikosti a imunogenity. Jsou tedy dobrým nástrojem pro studium vlastností virových částic a pro aktivaci imunitního systému.

Pseudokapsidy polyomavirů jsou také mimořádně stabilní a vydrží mnoho týdnů při pokojové teplotě (CAPARRÓS – WANDERLEY et al., 2004).

Za optimálních podmínek (nízká iontová síla, neredukční prostředí, pH 7,4, přítomnost vápenatých iontů) se pentamery proteinu VP1 skládají do pseudokapsid (BRADY et al., 1977, SALUNKE et al., 1986, 1989), často samovolně bez interakcí s buněčnými nebo virovými proteiny nebo DNA (MONTROSS et al. 1991). Nicméně byl popsán vliv Hsp70 (CRIPE et al., 1995), minoritních proteinů (KAWANO et al., 2006) nebo virové DNA (TSUKAMOTO et al., 2007) na skládání VLPs. V nízkém pH nebo vysoké iontové síle vytváří protein VP1 celou škálu prostorových útvarů. Jsou to tubulární útvary, kapsidy s triangulačním číslem 1 nebo kapsidy s oktaedrální symetrií (SALUNKE et al., 1989).

VLPs je možné produkovat např. v bakteriích (LEAVITT et al., 1985), v kvasinkách (ŠTOKROVÁ et al., 1999) nebo pomocí rekombinantních bakulovirů v hmyzích buňkách (FORSTOVÁ et al., 1993, MONTROSS et al., 1991, KOSUKEGAWA et al., 1996, LI et al., 2003). Pseudokapsidy obsahující minoritní strukturní proteiny byly připraveny koinfekcí

hmyzích buněk rekombinantními bakuloviry (FORSTOVÁ et al. 1993, AN et al., 1999, SANDALON a OPPENHEIM 1997). Vzhledem redukčnímu prostředí a nedostatku vápníku v cytoplazmě se mohou VLPs skládat až v jádrech produkujících buněk. Nesložené pentamery VP1 z cytoplazmy se skládají po přidání vápníku (BRADY et al., 1977, MONTROSS et al., 1991, HAYNES et al., 1993). ADAMEC et al., 2005 naopak popsali, že pseudokapsidy nepotřebují vápník pro své složení, ale jako stabilizační prvek.

VLPs se také mohou skládat v extracelulárním prostoru, pokud je k proteinu VP1 připojen signální peptid. Ten transportuje protein VP1 k buněčné membráně. Tyto VLPs jsou ale na rozdíl od pseudokapsid izolovaných z buněčných jader glykosylované a jsou odlišně citlivé na trypsin (NG et al., 2007).

Izolované VLPs obsahují často heterologní buněčnou DNA (i s histony) o velikosti virového genomu (GILLOCK et al., 1997). V případě produkce VLPs v hmyzích buňkách se jedná o hmyzí i bakulovirovou DNA (GILLOCK et al., 1997, AN et al., 1999, ŘÍPOVÁ dipl. práce, 2002). Schopnosti VLPs nespecificky enkapsidovat DNA podnítily výzkum případného využití VLPs pro přenos terapeutické DNA v genové terapii.

II. 3.2 Význam VLPs polyomavirů

II. 3.2.1 Genový přenos do buněk pomocí VLPs

DNA až do velikosti 7,2 kbp interaguje s VLPs tvořených proteinem VP1 MPyV a může být dopravena kapsidami po „pseudoinfekci“ do buněk. Expresе takto přenesených genů je ale nízká, i když v některých případech vyšší než u jiných, běžně používaných metod (FORSTOVÁ et al., 1995, SOEDA et al., 1998, YANG a CHEN 2000). Polylysin chrání DNA před DNázami a proto byl použit pro zvýšení účinnosti genového přenosu. Přidání polylysinu k VLPs a DNA zvýšilo krátkodobou produkci proteinů, dlouhodobou ale neovlivnilo (SOEDA et al., 1998). Ta je totiž závislá na integraci transfekované DNA do chromozomů (FORSTOVÁ et al., 1995).

DNA v agregátech s MPyV VP1 VLPs byla přenesena do buněk přibližně s 50% úspěšností přenosu DNA infekčním virem nebo kalcium – fosfátovou metodou. Transfekované buňky ale produkovaly heterologní protein mnohem déle (KRAUEWICZ et al., 2000).

Možnost využití VLPs ke genového přenosu může být výrazně snížena skutečností, že VLPs jsou velmi imunogenní. CLARK et al., (2001) pozorovali imunitní protilátkovou

odpověď namířenou také proti proteinu překládanému z přenesené DNA. Jednou z možností opakovaného přenosu DNA je použití VLPs z různých virů. Např. VLPs MPyV a murine pneumotropic viru (MtV) nejsou rozpoznávány stejnými protilátkami a přenášejí DNA do buněk s podobnou účinností (TEGERSTEDT et al., 2003).

Vysoká imunogennost VLPs může být naopak výhodou pro využití pseudokapsid jako adjuvans pro DNA vakcíny (CLARK 2000). Jako adjuvans byly pseudokapsidy MPyV použity také v případě nukleokapsidového proteinu viru HIV. V polovině pokusných zvířat imunizovaných VLPs nesoucích gen pro p36 HIV byly detekovány protilátky proti HIV antigenu. Množství protilátek přitom bylo asi třikrát větší než po aplikaci samotné DNA (ROLLMAN et al., 2003).

Pro přenos genů byly využity i VLPs dalších polyomavirů, BKV, HPyV i JCV. Účinnost genového přenosu je ale pro všechny použité VLPs podobně nízká (GOLDMANN et al., 1999, TOUZÉ et al., 2001, VORONKOVA et al., 2007).

Zajímavá je schopnost VLPs viru SV 40 enkapsidovat až 17 kbp dlouhou DNA aniž by se výrazně měnil jejich tvar. Transfekované buňky produkovaly funkční multi drug receptor na svém povrchu (KIMCHI – SARFATY et al., 2003).

II. 3.2.2 Využití VLPs – vyvolání imunitní odpovědi

Jak bylo řečeno, pseudokapsidy jsou velmi imunogenní, převážně proto, že totožný strukturální motiv je mnohokrát opakován. Umístění cizorodého ligandu na povrch nebo dovnitř kapsidy může vyvolat imunitní odpověď proti tomuto ligandu (nejčastěji proteinu). Připojeným proteinem může být antigen patogenního agens nebo nádorový antigen. VLPs, do kterých byly inzertovány cizorodé struktury, označujeme jako chimerické VLPs (CVLPs).

Důležitými aspekty pro imunogennost CVLPs jsou: velikost připojeného proteinu, lokalizace připojení, použití nástavců (poly GS), stabilita vzniklých útvarů apod. (GLEITER et al., 1999). U polyomavirů jsou peptidy či proteiny připojovány nejčastěji k povrchovým smyčkám BC a HI, nebo ke koncům minoritních proteinů (GEDVILAITE et al., 2000, FRIČ et al., 2008).

CVLPs mohou vyvolávat imunitní odpověď pouze v případě, že buňky imunitního systému, dendritické buňky (DC) a B a T lymfocyty dozrávají a proliferují. VLPs a CVLPs

hlodavčích polyomavirů aktivují lidské imunitní buňky, VLPs lidských polyomavirů, aktivují tyto buňky mnohem méně (GEDVILAITE et al., 2006).

II. 3.2.2.1 Protilátková odpověď na CVLPs

Nahrazení nejvíce imunogenních epitopů na proteinu VP1 může vyvolat masivní protilátkovou odpověď proti připojenému proteinu. Důležitost velikosti proteinu a lokalizace připojení prokázali GEDVILAITE a kolegové (2000, 2004). Připojili několik aa povrchového proteinu viru HBV (hepatitis B virus) k BC smyčce HaPyV VP1. V další práci do stejné smyčky připojili 120 aa nukleoproteinu Puumala hantaviru (čeleď *Bunyaviridae*). V obou případech byla vyvolána silná protilátková odpověď. Přemístění hantavirového ligandu do HI smyčky protilátkovou odpověď ještě zvýšilo. Navíc byla indukována i Th1 odpověď (GEDVILAITE et al., 2000, 2004). Do obou smyček byl také připojen krátký fragment (několik aa) karcinoembryonálního antigenu. Výsledná protilátková odpověď byla nejvyšší, pokud byl fragment pouze v BC smyčce. Více ligandů na povrchu pseudokapsidy totiž pravděpodobně způsobuje její destabilizaci. Spojovací peptidy $(G,S)_x$ titr protilátek mírně zvyšovaly, hlavně však prodlužovaly účinek imunizace (LAWATSCHEK et al., 2007).

V případě HBV viru (hepadnaviridae) byla porovnáována protilátková odpověď proti povrchovému proteinu HBV na povrchu různých nosičů. I když MyPV VLPs VP1/preS1phil protilátkovou odpověď vyvolávaly, Tc odpověď indukovaly nosiče složené z kapsidového HBV proteinu (SKRASTINA et al., 2008).

II. 3.2.2.2 Cytotoxická odpověď na CVLPs

Nejdůležitějším imunitním procesem v přirozené obraně organismu proti nádorům je součinnost DC a cytotoxických T-lymfocytů. „Zralé“ Tc lymfocyty vyhledávají a zabíjejí nádorové buňky, které na svých MHC I glykoproteinech prezentují cizorodý (nebo nádorový) antigen.



Obr. II. 5: Model ligandu (EGFP) připojeného k minoritnímu proteinu, s výslednou lokalizací uvnitř kapsidy. Převzato z FRÍČ et al., 2008

Protože při umístění cizích epitopů na povrch kapsidy protilátková Th2 odpověď převažuje nad Th1 odpovědí, mohou být cizí epitopy umístěny dovnitř kapsidy.

BOUŘA s kolegy (2005) připravili a zkoumali chimerické VLPs - VP1/EGFPtVP3 myšího polyomaviru ve kterých byl EGFP protein fúzován s proteinem VP3 zkráceným na N-konci (Obr. II. 5). VLPs vstupovaly mimo jiné i do buněk imunitního systému, kde byly degradovány a prezentovány na povrchu. Přestože nedošlo k dozrávání DC, indukovaly VP1/EGFPtVP3 VLPs silnou protilátkovou odpověď proti proteinu VP1, protilátky proti EGFP však nebyly detekovány. Specifické Tc buňky proliferovaly a produkovaly interleukin 12, cílové buňky ale *in vitro* nezabýjely (BOUŘA et al., 2005, FRIČ et al., 2008). Poněkud úspěšnější byl tým TEGERSTEDT a kolegů (2005). K proteinu VP2 ve VP1/VP2 VLPs byl připojen fragment nádorového proteinu Her2 (1-683 aa). Imunizace výslednými VLPs – VP1/VP2Her₁₋₆₈₃ ochránila všechna pokusná zvířata proti letální dávce transformovaných buněk (TEGERSTEDT et al., 2005). Problémem ale byla výše zmíněná protilátková odpověď proti proteinu VP1. Chimerickými VLPs VP1/VP2Her₁₋₆₈₃ byly tedy opůsobeny DC a pokusná zvířata byla imunizována přímo DC, což protilátkovou odpověď snížilo šestkrát (TEGERSTEDT et al., 2007). V nedávné době byly také připraveny CVLPs s dvěma krátkými epitopy Tc buněk na povrchu. DC tyto VLPs fagocytovaly, dozrávaly a aktivovaly B-lymfocyty k produkci protilátek, které se vázaly na nádorové buňky. Zralé DC *in vitro* indukovaly proliferaci a dozrávání specifických T-buněk (DORN et al., 2008).

II. 3.2.3 Protinádorová terapie – toxické CVLPs

Chimerické toxické VLPs by mohly být použity pro onkolýzu. VLPs JC mohou být při disociaci/reasociaci naplněny toxinem, který mohou transportovat do buněk (GOLDMANN et al., 2000). Problémem takto připravených pseudokapsid je především volné šíření toxinu z degradovaných pseudokapsid. Připojením protinádorového jedu methotrexátu k C-konci proteinu VP2 lze tomuto volnému šíření zamezit (ABBING et al., 2004). Dovnitř kapsidy může být také umístěn enzym, konkrétně cytosin deamináza. V buňkách, které přijaly chimerické SV40 VLPs, je enzym stále funkční a je možné indukovat buněčnou smrt (INOUE et al., 2008).

Nebezpečí intoxikace zdravých tkání může být zabráněno specifitou chimerických VLPs. Specifický účinek může být zajištěn např. umístěním proteinu s afinitou pro specifický buněčný receptor na povrch kapsidy (SCHMIDT et al., 2001, SHIN a FOLK 2003).

S výhodou je možné použít protilátky, např. připojením vazebného fragmentu protilátky k místu vazby proteinu VP1 na receptor (Fv). CVLPs ztratí afinitu k přirozeným receptorům a jejich specifitu určí fragment protilátky (STUBENRAUCH et al., 2001). GLEITER A LILIE (2001) připravili pseudokapsidy s proteinem Z v povrchové smyčce důležité pro vazbu proteinu VP 1 s receptorem. S proteinem Z reagují takřka všechny protilátky svými Fc konci.

Do chimérických VLPs s epitopy na povrchu je navíc možné inkorporovat dovnitř např. epitop s afinitou pro léčivo. Mohly by tak vzniknout dvojité chimerické pseudokapsidy, specifické pro cílové buňky i použitá terapeutika (SCHMIDT et al., 2001). Specifické chimerické VLPs by mohly být samozřejmě použity i ve výše popsané genové terapii. Náročnost tohoto modelu je zřejmá a praktické výsledky jsou ještě daleko.

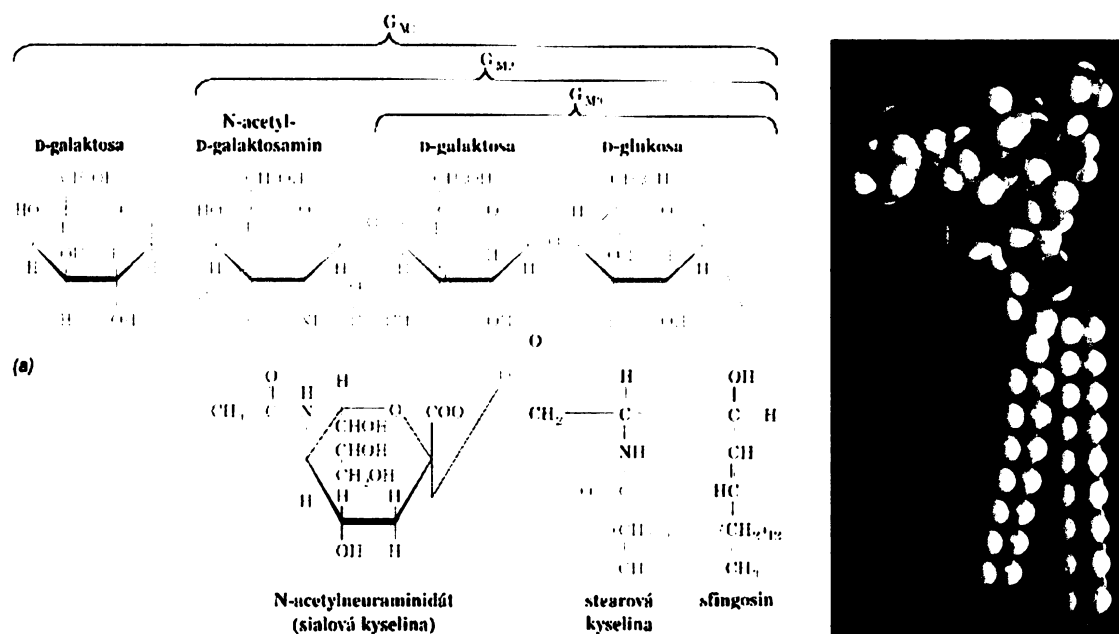
Zcela opačný směr ve výzkumu VLPs ukazuje práce BUTIN– ISRAELI et al., (2008) kteří použili VLPs SV 40 k ochraně myší před smrtí způsobenou otrávením ledvin rtutí. VLPs SV 40 totiž aktivovaly signální dráhy vedoucí k přežití buněk.

II. 4 Časné fáze infekce polyomavirů – vstup virionů do buněk a jejich transport k jádru

Podobně jako ostatní malé neobalené DNA viry, využívají i polyomaviry pro vstup do buněk receptorem zprostředkovanou endocytózu. Nejprve se viriony vážou na specifický receptor a poté je virová částice internalizována membránovou invaginací, která je nakonec odškrcena. Membránové váčky s virovými částicemi jsou dále transportovány od plazmatické membrány k buněčnému jádru.

II. 4.1 Vazba na receptor a internalizace polyomavirů

Ve vazbě všech polyomavirů na receptor má klíčovou funkci kyselina sialová (SA). Kyselina sialová (N-acetylneuraminová kyselina) je složitý monosacharid, který je součástí glykoproteinů a glykolipidů. Z glykoproteinů polyomaviry vážou nejčastěji N-vázané glykoproteiny a z glykolipidů gangliosidy. Gangliosidy třídíme podle počtu molekul sialové kyseliny a typů vazeb mezi monosacharidovými zbytky (GM, GD atd., Obr. II. 6).



Obr. II. 6: Chemický vzorec a model gangliosidu GM1. Převzato z VOET a VOET, 1990

MPyV

Jako receptory pro MPyV byly identifikovány gangliosidy GT1b a GD1a (TSAI et al., 2003). Autoři ale zmiňují předpokládanou vazbu na další glykolipidy a glykoproteiny buněčné membrány obsahující disacharid sialová kyselina (2,3) - galaktóza, například gangliosid GM1 (TSAI et al., 2003, SMITH et al., 2003). GILBERT a BENJAMIN (2004) později zjistili, že gangliosid GD1a se neuplatňuje přímo ve vazbě virionu, ale až v pozdějších fázích infekce. Viriony MPyV nepotřebují kompletní gangliosid, neboť pokud byla sialová kyselina vázána k virionu, vstupovaly viriony i do buněk ošetřených neuraminidázou (CARUSO et al., 2003a). VP1 MPyV reaguje také s rozvětvenými oligosacharidy na O-glykosylovaných proteinech. Na rozdíl od výše zmíněných gangliosidů, tyto glykoproteiny nevedou k produktivní infekci *in vitro* a zřejmě brzdí i šíření viru *in vivo* (BAUER et al., 1999).

Jako koreceptor MPyV byl v práci CARUSO et al., (2003a) navrhován integrin $\alpha 4\beta 1$. V DE smyčce VP1 proteinu byla totiž nalezena vazebná doména pro tento transmembránový protein. Vysycení integrinů $\alpha 4\beta 1$ přirozenými ligandy také způsobilo redukcii infekтивности (CARUSO et al., 2003a). Zvýšená exprese integrinu $\alpha 4\beta 1$ na druhou stranu infektivitu viru zvyšovala. Ani zvýšená exprese integrinu $\alpha 4\beta 1$ ale neobnovila infektivitu při absenci sialové kyseliny v buněčné membráně. Autoři tedy předpokládají, že se $\alpha 4\beta 1$ podílí i na následné internalizaci virionu (CARUSO et al., 2003b).

MPyV vstupuje do buněk v hladkých monopinocytických váčcích z nichž některé jsou odvozeny od kaveol, což jsou invaginace plazmatické membrány s vysokou koncentrací proteinu kaveolinu. Viriony zřejmě vstupují do buněk různými typy tzv. membránových raftů (membránových mikrodomén) s vyšším obsahem cholesterolu a signálních molekul (RICHTEROVÁ et al., 2001, GILBERT a BENJAMIN 2004). Kaveolin zřejmě není nutný pro internalizaci myšího polyomaviru, protože MPyV vstupuje i do buněk, které kaveolin neprodukují (LIEBL et al., 2006) a to hladkými váčky, které neobsahují ani klatrin ani kaveolin. GILBERT a BENJAMIN (2000) publikovali, že pro vstup MPyV není nutná činnost dynaminu, který odškrcuje klatrinové a kaveolinové váčky a že MPyV vstupuje do buněk neklatrinovou i nekaveolinovou endocytózou (GILBERT a BENJAMIN 2000). Nicméně později publikovali, že nadprodukce kaveolinu zvyšuje infektivitu MPyV (GILBERT et al., 2005).

SV 40

MHC I glykoproteiny jsou prezentovány na všech buňkách v organismu. ATWOOD a NORRIN (1989) určili tyto glykoproteiny jako receptory pro SV 40. Virus SV 40 vyžaduje kompaktní HLA molekuly, protože se neváže na MHC I, které nejsou v komplexu s beta 2 mikroglobulinem. Potvrzením úlohy MHC I bylo proteolytické odštěpení HLA molekul z buněk, které infekci zabránilo (BREAUX et al., 1992). SV 40 nicméně nenapadá všechny typy buněk, a někdy jen některé jejich oblasti (CLAYSON a COMPANS, 1988). Je tedy možné, že se na vstupu viru do buňky podílí i další molekuly. SV 40 vstupuje do buněk v caveolinových váčcích (ANDERSON et al., 1996). Molekuly MHC I glykoproteinů však nevstupují spolu s viriony do buněk a zůstávají nezměněné na buněčném povrchu (ANDERSON et al., 1998). Později TSAI a kolegové (2003) ukázali, že receptorem pro SV40 je patrně gangliosid GM1.

Internalizace caveolinových váčků je provázána fosforylací váčkových proteinů tyrozinkinázami. Pohyb váčku rozrušuje aktin a ten tvoří za váčkem aktinové „ocasy“ ve spolupráci s dynaminem. V pozdějších fázích infekce se aktinová vlákna znovu obnoví (PELKMANS et al., 2002).

BKV

V časných studiích hledajících receptor pro BKV se zjistilo, že se BKV váže na skupinu gangliosidů nesoucích α (2,3) nebo α (2,6) vázanou SA (SINIBALDI et al., 1990). Dále bylo zjištěno, že BKV váže se silnou afinitou α (2-8) disialovou kyselinu, která se nachází na gangliosidech GT1b a GD1b. V případě, že byly gangliosidy GT1b a GD1b inkorporovány do nesensitivních buněk, umožnily vazbu virionu na buněčnou membránu (LOW et al., 2006). V nedávné době se ale také objevily studie, které určily jako receptor specifické N-glykoproteiny. Zablokování N-glykosylace totiž snížilo infektivitu viru, zamezení O-glykosylace nemělo na infektivitu vliv (DUGAN et al., 2005). Je pravděpodobné, že GT1b a GD1b gangliosidy kooperují se specifickými glykoproteiny na vazbě a internalizaci BKV.

BKV je internalizován podobně jako SV40 a MPyV v monopinocytických váčcích obsahujících caveolin (EASH et al 2004).

JCV

Virus JCV se může množit v buňkách nervového systému, které mají v buněčných membránách mnoho receptorů pro neurotransmitery. Poté, co se ukázalo, že je pro vstup viru JCV do buněk nezbytná přítomnost α (2,6) SA (LIU et al., 1998) hledal se i mezi nervovými receptory vhodný kandidát. Blíže zkoumány byly dva receptory - pro dopamin a serotonin. Nakonec byl určen jako receptor pro JCV serotoninový receptor 5HT_{2A}, který exponuje na povrchu (2,6) vázanou sialovou kyselinu (ELPHICK et al., 2004). V relativně krátkém čase po adsorpci vstupuje JCV do buněk v klatrinových váčcích, stále navázaný na receptor (PHO et al., 2000). Internalizace klatrinovým váčkem je spuštěna tyrozin-kinázovou signální dráhou, která aktivuje kinázy ERK1 a ERK2. Expres dominantně negativních mutant těchto kináz zabránila internalizaci JCV (QUERBES et al., 2004).

II. 4.2 Transport polyomavirů do buněčného jádra

První pozorování ukazovala, že váčky s viry míří nejkratší cestou k jádru (MACKAY a CONSIGLY, 1976). V pozdějších studiích však autoři často ukazovali, že se vstupující virus objevuje v některých typech endozomů, v různých endocytických drahách a také je zřejmě buňkou degradován. Detailní popis virového transportu zatím neznáme.

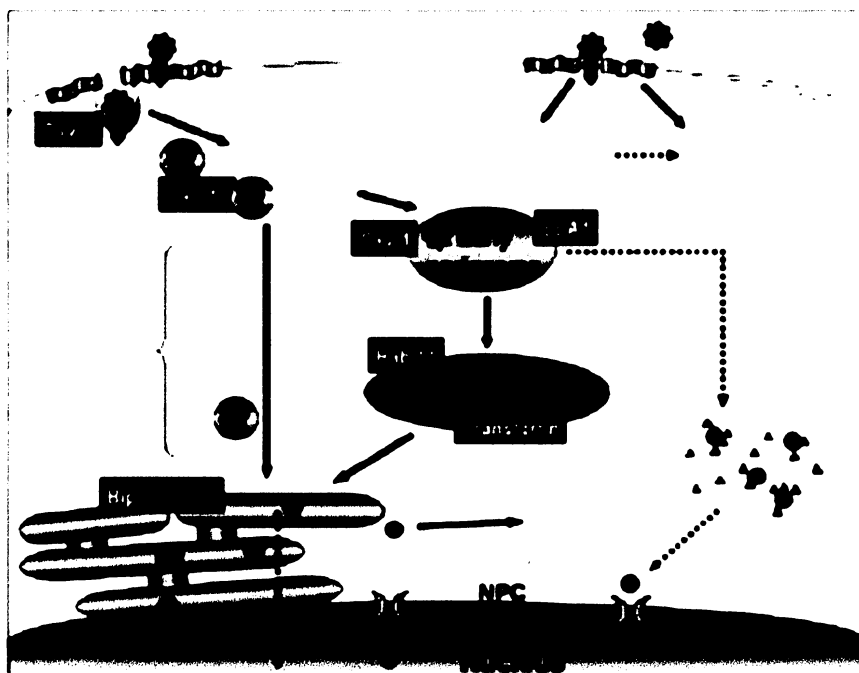
MPyV

Monopinocytické váčky s viriony MPyV fúzí s časnými endozomy, kde by mohly vlivem nízkého pH proběhnout změny v konformaci kapsidy. Ukázalo se, že zvýšení endozomálního pH během prvních dvou hodin po adsorpci viru zcela inhibuje infekci (LIEBL et al., 2006). Pro transport virionů jsou v časně fázi potřebná dynamická aktinová vlákna, podél kterých se pohybují váčky s viriony. Stabilizace mikrofilament prudce snižuje transport virionů, jejich rozrušení vliv na transport nemá. Rozrušení mikrotubul naopak transport snižuje, jejich stabilizace vliv nemá (GILBERT et al., 2003). V pozdější fázi je patrná kolokalizace neporušených mikrotubulů a proteinu VP1. Většina proteinu VP1 je po 3. hodině po adsorpci kumulována kolem jádra (KRAUZEWICZ et al., 2000, RICHTEROVÁ et al. 2001, GILBERT a BENJAMIN 2004). Pohyb virionů MPyV tedy vyžaduje stabilní mikrotubuly a je spojen s transientním rozrušením aktiniových filament. Někteří autoři (QIAN et al., 2009) předpokládají vstup virionů do pozdních endozomů a lyzozomů. Jiní autoři kolokalizaci MPyV s markery pozdních endozomů (Rab7), lyzozomů

(LAMP2) a Golgiho aparátu vyloučili (MANNOVÁ a FORSTOVÁ 2003, GILBERT a BENJAMIN 2004). Všichni výše jmenovaní autoři se shodli v tom, že je virus transportován do ER. Pomocí DNA sond je možné ukázat, že v době, kdy už v jádře začíná exprese virové DNA, zůstává protein VP1, ale i velké množství virové DNA v perinukleárním prostoru (MANNOVÁ A FORSTOVÁ 2003). Předpokládá se, že z ER je virus (resp. jeho genetická informace) dopravována do buněčného jádra.

Jednou z molekul, která zprostředkuje kontakt mezi endozomy a ER, je GD1a. QIAN et al. (2009) pozorovali zvýšenou kolokalizaci MPyV a ER po opůsobení buněk volným GD1a. Autoři předpokládají že se viriony dostávají do ER z pozdních endozomů pomocí GD1a (QIAN et al., 2009). V endoplazmatickém retikulu probíhají další změny konformace kapsidy. Alespoň některé jsou přímo závislé na proteinech ER s chaperonovou aktivitou. Protein ERp29, jeden z těchto proteinů, nejprve dimerizuje svými N-terminálními doménami a následně C-terminální domény rozvolňují viriony MPyV (RAINEY – BARGER et al., 2009). Na změnách konformace se také podílí protein disulfid izomeráza (PDI), která rozrušuje disulfidické můstky. V nepřítomnosti PDI se viriony nacházejí v ER, ale nejsou transportovány dál a virus se do jádra nedostane (GILBERT et al., 2006). Nejasnosti zůstávají v otázce v dalšího transportu.

Možností, že by viriony opouštěli ER dráhou pro špatně sbalené proteiny (ERAD dráha) se zabývali LILEY et al., (2006). Určili, že je-li snížena koncentrace Derlinu 2 (důležitý protein ERAD dráhy), klesá infektivita viru až o 50%. Přímá injekce DNA do cytoplazmy obnovila infektivitu i v nepřítomnosti Derlinu 2 (LILEY et al., 2006). Možná funkce minoritních proteinů v úniku z ER byla popsána v kap. II. 2.3. Na Obr. II. 7 jsou znázorněny potvrzené a předpokládané dráhy transportu MPyV. Hlavní nejasnosti panují stále v otázce, zda viriony v průběhu transportu opouštějí membránové struktury a vstupují do jádra jadernými póry, nebo jestli vstupují do jádra endoplazmatickým retikulem.



Obr. II. 7: Transport MPyV od plazmatické membrány k jádru. Cav – 1.
 Monopinocytické váčky s viriony MPyV - kaveoly, Cav -1 + EEA1: Časně endozomy, pravděpodobně kaveozomy, Rab 11 + Transferrin: recyklující COP váčky, Bip: Endoplazmatické retikulum. Plné šipky ukazují dokázané dráhy, tečkované šipky možné, zatím nepotvrzené dráhy (převzato z LIEBL et al., 2006)

Virus SV40 putuje z kaveolinových váček do kompartmentů zvaných kaveozomy. (Kaveozomy jsou relativně stálé organely s neutrálním pH a vysokým obsahem kaveolinu). Z kaveozomů jsou viriony transportovány retrográdní dráhou využívající COP váčky. Brefeldin, který zablokuje vznik COP I váček, blokuje i transport virionů do ER. V Golgiho systému viriony nikdy pozorovány nebyly. V ER byly detekovány viriony 5 hodin po infekci. V ER dochází ke konformačním změnám kapsidy, neboť je možné imunologicky detekovat minoritní proteiny, které jsou v kompaktní kapsidě protilátkám nepřístupné. (NORKIN et al., 2002, NORKIN a KUKSIN 2005). Virus SV40 může zřejmě použít jaderný nukleární komplex (NPC) ke vstupu do jádra (Viz Obr. II. 4). Injikovaný virus se objevil po dvou hodinách v jádře a injikované protilátky proti NPC v cytoplasmě transportu do jádra zabránily (YAMADA a KASAMATZU, 1993). Autoři však neřešili otázku, jak se virus při infekci dostane z endozomálních kompartmentů do cytoplasmy. Jiní autoři popsali přímo fúzi váčky s viriony s jadernou membránou dvě hodiny po navázání na receptor

(NISHIMURA et al., 1986). Úloha minoritních proteinů ve vstupu SV 40 a předpokládaný transport z ER do jádra byly popsány v kap. II. 2.3.

BKV

Pro pohyb BKV v kaveolách je nutný neporušený tubulin a dynamický aktin (EASH et al., 2005). Transport BKV je inhibován brefeldinem, inhibitorem tvorby COP váčků. Virus vstupuje do ER a nebyl detekován v Golgiho aparátu. Je tedy pravděpodobné, že využívá podobné dráhy jako MPyV a SV 40 (LOW et al., 2006).

JCV

Transport klatrinových váčků s viriony je závislý na kyselém pH. Navíc jako jediný známý zástupce čeledi vyžaduje neporušené všechny tři složky cytoskeletu - aktin, mikrotubuly i intermediální filamenta (ASHOK a ATWOOD 2003). Funkce aktinu je zřejmě v dopravě klatrinového váčku k intermediálním filamentům, případně k mikrotubulům, které dopraví viriony do blízkosti jádra (ASHOK a ATWOOD 2003). Předpokládá se, že se viriony dostanou dosud neznámým mechanismem do cytoplasmy. V tomto stadiu zřejmě dochází k reakci s importiny a importu do jádra (QU et al., 2004).

II. 4.3 Využití VLPs pro výzkum transportu virionů

V některých studiích bylo popsáno, že pseudokapsidy vstupují do buněk podobně jako viriony, jejich intracelulární dráhy jsou ale odlišné. Poznání a přesný sled shodného a rozdílného chování VLPs a virionů může být velmi přínosné nejen pro výzkum životního cyklu polyomavirů, ale také pro další použití VLPs jako vektoru nebo adjuvans (viz kap. II. 3).

MPyV VLPs vstupují do myších buněk podobně jako viriony divokého typu – přes receptory se SA (KRAUZEWICZ et al., 2000). Důležitost vazby VLPs na gangliosidy GD1a a GT1b prokázali také SMITH a kolegové (2003), kteří pro své pokusy použili VP1 VLPs. Tito autoři ale úplně nevyloučili ani GM1 gangliosid jako jeden z receptorů pro pseudokapsidy (SMITH et al., 2003).

III.

Cîle

A. Prvním cílem práce bylo zjistit, zdali uměle připravené kapsidy (pseudokapsidy; VLPs) nesoucí jeden nebo druhý minoritní protein budou silnějšími kompetitivními inhibitory vstupu virionů (případně jejich transportu k jádru) než pseudokapsidy složené pouze z proteinu VP1.

Konkrétní cíle:

- **Izolovat tři typy VLPs myšího polyomaviru – složené buď pouze z proteinu VP1, nebo obsahující proteiny VP1 a VP2 nebo proteiny VP1 a VP3 – z hmyzích buněk infikovaných rekombinantními bakuloviry nesoucími geny pro příslušné proteiny.**
- **Provést testy kompetitivní inhibice polyomavirové infekce.**

B. Druhým cílem bylo doplnit probíhající analýzy chování minoritních proteinů MPyV a lidského BKV během jejich transientní exprese v savčích buňkách. Protože se nedařilo exprimovat geny pro VP2 a VP3 bez přítomnosti ostatních virových produktů, byly v laboratoři připraveny jejich varianty fúzované s EGFP.

Konkrétním cílem bylo:

- **Konfokální mikroskopií porovnat buněčnou lokalizaci fúzních variant minoritních proteinů s EGFP fúzovaným k C- nebo N-konci proteinů VP2 a VP3 BK virů.**
- **Porovnat výsledky s podobnými analýzami VP2 a VP3 myšího polyomaviru, které mají gen kratší o DNA vazebnou doménu.**
- **Zjistit vliv typu buněk, ve kterých byly proteiny MPyV a BKV produkovány na případné odlišnosti v lokalizaci a cytotoxicitě VP2 a VP3 MPyV a BKV.**

IV.

Metody

IV.

Materiál a metody

IV. 1 Materiál

IV. 1.1 Roztoky:

Blotovací pufr:

- 25 mM Tris
- 195 mM glycin
- 20% methanol

B pufr:

- 10 mM Tris - HCl (vodný roztok, pH 7,4)
- 150 mM NaCl
- 0,01 mM CaCl₂

Činidlo Bradfordové:

- 100mg Coomassie Brilliant Blue G250
- 50 ml 96% ethanolu
- rozpouštění přes noc
- 100ml H₃PO₄
- 850 ml demi vody

Elektroforetický pufr:

- 25 mM Tris
- 192 mM glycin
- 1% SDS

PBS (Phosphate buffer saline):

- 4,09g NaCl
- 0,1 g KCl
- 1,79 Na₂HPO₄.12H₂O

Lyzační pufr:

- 100 µl 0,5M EDTA

- 500 μ l 1M Tris- HCl (vodný roztok pH 7,4)
- 1,5 ml 1M NaCl
- 100 μ l 10% SDS
- 100 μ l Triton X -100
- 5 μ l NP – 40
- 2 μ l 5% deoxycholát sodný

SDS loading buffer:

- 5% SDS
- 50 mM Tris – HCl (vodný roztok pH 6,8)
- 50% glycerol
- 25% β -merkaptoethanol
- 0,005% bromfenolová modř

Roztok pro spodní gel pro PAAGE:

- 4 ml (29% akrylamid + 1% bisakrylamid)
- 4 ml 1M Tris- HCl (vodný roztok pH 8,8)
- 120 μ l 10% SDS
- 3,25 ml demineralizované vody
- 40 μ l 10% persíranu sodného
- 8,5 μ l TEMED (Sigma)

Roztok pro horní gel pro PAAGE:

- 0,5 ml (29% akrylamid + 1% bisakrylamid)
- 0,375 ml 1M Tris-HCl (vodný roztok pH 6,8)
- 30 μ l 10% SDS
- 2,11 demineralizované vody
- 20 μ l 10% persíranu sodného
- 5 μ l TEMED

Upravený fenol:

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

IV. 1.2 Přístroje:

Aparatura pro SDS – PAAGE (Hofer)

Aparatura pro western blotting (Biorad)
Centrifuga GS -15 R, rotor S4180 (Beckman)
Centrifuga 3K- 30 rotor 12771
CO₂ termostat (Forma Scientific - Biotech)
Centrifuga MPW 300
Elektroporátor Nucleofector II (Amaxa)
Flow box (Forma Scientific - Biotech)
Optický mikroskop (Carl Zeiss, Jena)
Invertovaný mikroskop Olympus CK 40
Fluorescenční mikroskop Olympus BX 60
Fluorescenční mikroskop Olympus IX 71
Konfokální mikroskop Leica TCS
Binolupa (Olympus)
Mikrocentrifuga Beckman Mikrofuge Centrifuge, rotor F 241,5
Mikrocentrifuga Beckman Mikrofuge Centrifuge, rotor F 1802
Megafuga 1.0R, rotor 2704
Spektrofotometr Helios beta (Thermo)
Stolní centrifuga MSE
Sonikátor Soniprep 150 (Schoeller Pharmacia Praha)
Termostat TCH 100 (laboratorní přístroje Praha)
Třepačka stolní (Heidolph)
Třepačka (Labnet)
Ultracentrifuga L5 – 50B, rotor SW 41, SW 28 (Beckman)
UV transluminátor (Biolum)
Vodní lázeň (Grant)
Vodní sonikátor (Cole- Parmer Instrumental Company)
Vortex – Genie 2 (Scientific Industries)

IV. 1.3 Média a materiál pro tkáňové kultury:

DMEM (Sigma) – médium pro savčí buňky
RPMI 1640 medium
10% FCS (Sigma)

2 mM glutamin (Sigma)

Antibiotika pro TK (Sigma)

Versen (Sevac)

Trypsin (Sigma)

TNM – FH insect medium (Sigma) – médium pro hmyzí buňky

IV. 1.5 Markery molekulových vah:

Proteinový marker SDS (Sigma)

Proteinový marker Spectra Multicolour Broade Range Protein Ladder (Fermentas)

IV. 1.6 Protilátky

Primární protilátky:

M α VP1, MPyV: myší monoklonální protilátka proti VP1 myšího polyomaviru, izotyp IgG1 (FORSTOVÁ et al., 1993)

M α VP2/VP3, MPyV: klon 1A2, myší monoklonální protilátka proti VP2/VP3 myšího polyomaviru, izotyp IgG1 (FORSTOVÁ et al., 1993)

M α VP2/VP3: klon 2C8, myší monoklonální protilátka proti VP2/VP3 myšího polyomaviru, izotyp IgG1 (FORSTOVÁ et al., 1993)

Rt α LT (velký T antigen), MPyV: krysí monoklonální protilátka proti velkému antigenu myšího polyomaviru

Rb α SV40 VP2/VP3 králičí polyklonální protilátka proti společné části minoritních strukturních proteinů viru SV40 (Abcam). Tato protilátka křížově reaguje s minoritními proteiny BKV.

G α lamin B kozí monoklonální protilátka proti laminu B (Santa Cruz)

M α Histon H1 myší monoklonální protilátka proti histonu H1 (AE-4; Santa Cruz Biotechnology)

Sekundární protilátky:

G α M Px: Kozí polyklonální protilátka proti myšimu IgG konjugovaná s křenovou peroxidázou (BioRad)

D α R AF 488: Oslí polyklonální protilátka proti krysím imunoglobulinům konjugovaná s fluorescenční barvou Alexa fluor 488

Rb α GFP AF 488: Králičí polyklonální protilátka proti GFP konjugovaná s fluorescenční barvou Alexa fluor 488

D α G AF 546: Oslí polyklonální protilátka proti kozím imunoglobulinům konjugovaná s fluorescenční barvou Alexa fluor 546

D α M AF 546: Oslí polyklonální protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s fluorescenční barvou Alexa fluor 546

Ch α Rb AF 488: Kuřecí polyklonální protilátka proti králičím imunoglobulinům konjugovaná s fluorescenční barvou Alexa fluor 488

IV. 1.7 Virové kmeny a buněčné linie

IV. 1.7. 1 Bakteriální a virové kmeny:

Myší polyomavirus, kmen A2

AcMNPV/ VP1

AcMNPV/ VP1/3

AcMNPV/ VP1/2 – rekombinantní bakuloviry produkující hlavní strukturní protein myšího polyomaviru VP1, nebo VP1 s jedním ze strukturních minoritních proteinů (VP2/VP3)

IV. 1.7. 2 Buněčné linie:

Swiss 3T6: Myší fibroblasty odvozené z embryonálních tkání. Tato buněčná linie byla získána z German Collection of Microorganisms and Cell Cultures Dept. Human and Animal Cell Cultures“. Označení ACC 202.

Swiss 3T3: Myší fibroblasty odvozené z embryonálních tkání. Tato buněčná linie byla poskytnuta Dr. J. Hejnarem, ÚMG AV ČR, Praha.

VERO: Buněčná linie heteroploidních fibroblastoidních buněk odvozená z ledvin Afrického kočkodana (*Cercopithecus aethiops*) Získána z univerzity ve Wurzbürgu od prof .K. Dorries.

Sf9: Hmyzí buněčná linie odvozená z tkáně ovarií můry *Spodoptera frugiperda*. Buněčná linie byla získána z americké sbírky buněčných linií (*angl. American Type Cell Collection, označení ATCC CRL 1711*).

IV. 1.8 Vektory

pEGFP-C2: Plazmidový vektor určený pro expresi proteinu zájmu fúzovaného k C–konci proteinu EGFP v savčích buňkách. MCS je v tomto vektoru umístěno mezi genem pro EGFP a polyadenylačním signálem viru SV40. Vektor dále obsahuje origin SV40 pro replikaci v savčích buňkách exprimujících LT antigen viru SV40, časný promotor SV40, gen pro rezistenci k neomycinu a kanamycinu a polyadenylační signál z genu pro tymidin kinázu viru Herpes simplex, umožňující stabilně transfekovaným buňkám selekci na G418. Součástí vektoru je i bakteriální promotor pro expresi genu pro kanamycin v *E. coli*, origin replikace pro propagaci v *E. coli* (pUC) a origin replikace pro produkci ssDNA (f1). Protein fúzovaný s EGFP je exprimován z časného promotoru lidského cytomegaloviru (HCMV) (*Clontech*)

pEGFP-N1: Plazmidový vektor určený pro expresi proteinu zájmu fúzovaného k N–konci proteinu EGFP v savčích buňkách. Protein zájmu je v tomto vektoru vkládán před gen pro EGFP. Další složky vektoru se shodují se složkami obsaženými ve vektoru pEGFP-C2 (*Clontech*).

pEGFP-N1, pEGFP - C2 nesoucí geny pro strukturní minoritní proteiny MPyV a BKV:
příprava: E. Bouřa a V. Žíla – minoritní proteiny myšího polyomaviru, M. Stančíková, K. Podolská a L. Klímová – minoritní proteiny BK viru

IV. 2 Metody

IV. 2.1 Práce s buněčnými kulturami

IV. 2.1.1 Práce s hmyzími buňkami

IV. 2.1.1.1 Pasážování hmyzích buněk

Buňky byly pasážovány na Petriho misky o průměru 6 nebo 10 cm. Před pasážováním byly buňky seškrábány do média škrabátkem, buněčná suspenze byla dobře promíchána ve sterilní zkumavce s médiem vyhřátým na 37°C s 10% FCS sérem. Nakonec byly buňky pipetovány do sterilních misek (na misku o průměru 6 cm – 5 ml buněčné suspenze a na misku o průměru 10 cm – 10 ml buněčné suspenze) a umístěny do termoboxu (28 °C). Výsledné ředění bylo vždy 1:4. Při vyšších pasážích byly buňky před pasáží opláchnuty čerstvým médiem. Před infekcí byly buňky pasážovány 1:2.

IV. 2.1.1.2 Infekce hmyzích buněk

Z každé Petriho misky narostlé do 50% konfluency buněk bylo odsáto médium, k buňkám bylo přidáno 1 ml bakulovirového inokula (asi 10 pfu/buňku), misky byly inkubovány za mírného kolébání při pokojové teplotě 60 – 75 min. Poté bylo do každé misky přidáno 9 ml hmyzího média s 10% FCS sérem vyhřátým na 37 °C a buňky umístěny do termoboxu (28°C)

IV. 2.1.1.3 Sklizeň infikovaných buněk

Infikované buňky byly seškrábány škrabátkem do média, suspenze byla centrifugována 5 – 7 min při 1500 rpm na stolní centrifuze s výkyvnými rotory MSE, po propláchnutí vychlazeným PBS určeným pro tkáňové kultury byly stejným způsobem centrifugovány znovu, buněčný sediment byl skladován ve zkumavkách v -20°C.

IV. 2.1.2 Práce se savčími buňkami

IV. 2.1.2.1 Pasážování savčích buněk

Z konfluentně narostlých buněk bylo odsáto médium. Buňky byly opláchnuty Versenem. Po vyvázání dvojmocných iontů byly buňky vystaveny účinku trypsinu tak dlouho, dokud

nedošlo k zakulacení a uvolnění buněk ze dna misky. Pokud nedošlo k zakulacení a buňky se neuvolnily ze dna, byly uvolněny poklepáním, nebo prudkým oplachem médiem se sérem. Uvolněné buňky byly resuspendovány v médiu s 10% sérem vyhřátým na 37°C. Suspenze buněk byla naředěna 1:6, do každé sterilní misky o průměru 6 cm bylo napipetováno příslušné množství buněk a doplněno médium s 10% sérem vyhřáté na 37°C do výsledných 5 – 6 ml. Buňky byly inkubovány při 37°C, v CO₂ termoboxu.

IV. 2.1.2.2 Infekce savčích buněk

Ze savčích buněk, narostlých do 40 – 60% konfluence bylo odsáto médium. Buňky byly opláchnuty bezsérovým médiem. Virové inokulum bylo sonikováno na vodním sonikátoru a zvortexováno. Do jamky v 24 jamkové destičce bylo přidáno 200 µl a na Petriho misku o průměru 6 cm 500 µl naředěného virového inokula (podle požadované multiplicity infekce). Buňky byly inkubovány s virovým inokulem na kývačce, nebo na ledu 45 – 60 min. Nakonec bylo přidáno 5 ml média s 10% sérem vyhřátého na 37°C na Petriho misku o průměru 6 cm nebo 1 ml do jamky na 24 jamkové destičce. Infekce probíhala v CO₂ termoboxu při 37°C.

IV. 2.1.2.3 Fixace savčích buněk

Ze savčích buněk na sklíčkách v 24 jamkové destičce bylo odsáto médium a byly opláchnuty PBS. Jako fixační činidlo byl použit 3 – 5% PFA (15 -20 min), nebo ledový methanol (5 min). Pokud byl použit paraformaldehyd, byly buňky perforovány 0,5% Tritonem X 100 (4-5 min.).

IV. 2.1.2.4 Vysycení savčích buněk

Fixované buňky byly opláchnuty PBS (3 x 3 min). Buňky byly syceny **Blokačním roztokem** (2% BSA). V případě silného pozadí sekundární protilátky byly buňky syceny stejným blokačním roztokem ještě 10 min. před inkubací se sekundární protilátkou.

IV. 2.1.2.5 Nepřímá imunofluorescence

Primární protilátka byla ředěna v PBS. V případě, že protilátka vykazovala silnou nespecifickou reakci, byla ředěna v **blokačním roztoku** (viz IV. 2.1.2.4). Inkubace v **primární protilátce** probíhala 60- 90 min na kývačce při laboratorní teplotě nebo při 4°C přes noc. Protilátka, která se nenavázala na antigen byla odmyta PBS (3x 10 min). **Sekundární protilátka** byla ředěna v PBS nebo v blokačním roztoku (viz primární

protílátka) a přidána na 30 min. Inkubace v **sekundární protílátce** probíhala na kývačce ve tmě. Buňky byly promyty **3 x PBS** (5 -10 min.). Sklíčka byla opláchnuta destilovanou vodou a vysušena na Whatmanově papíře ve tmě. Suchá sklíčka byla montována na podložní sklíčko do 5 μ l **50% glycerolu s DAPI**. Podložní sklíčka byla skladována v -15°C . Na detekci označených antigenů byl použit mikroskop Olympus BX 60.

IV. 2.1.2.6 Transfekce savčích buněk

Buňky byly převedeny do suspenze (viz IV. 2.1.2.1). Počet buněk v jednom ml byl stanoven pomocí Bürkerovy komůrky. Buňky (10^6) byly stočeny při 1500 rpm na stolní centrifuze MSE. Supernatant byl pečlivě odstraněn a pelet byl resuspendován ve 100 μ l **Nucleofector Solution V** (dodáno výrobcem). Suspenze byla neprodleně smíchána s 2 – 4 μ g DNA. Poté byla umístěna do výrobcem dodané kyvety a umístěna do **Nucleofectoru II**. Pro VERO buňky byl následně použit program **V001**. Do kyvety bylo okamžitě přidáno 0,5 ml **RPMI média** a suspenze byla převedena do mikrozkuřavky. Po 15 min. inkubace v 37°C v CO_2 termoboxu byly buňky převedeny do jamkových destiček (se 6, 12 nebo 24 jamkami). Do jamek byla předem položena sklíčka, na kterých byly buňky po 4 – 24 hodinách fixovány (viz 1.2.3). Po odsátí media byly živé buňky pozorovány na mikroskopu **Olympus IX 71**. Transfekované proteiny bylo možné detekovat většinou po 4 hodinách po transfekci. V případě slabé produkce byla doba exprese transfekovaných proteinů prodloužena až na 24 hod.

IV. 2.1.2.7 Příprava savčích buněk na měření průtokovým cytometrem

Infikované savčí buňky narostlé na 6 cm miskách (přibližně 30 % konfluence) byly převedeny do suspenze (viz IV. 2.1.2.1). Suspenze buněk byla centrifugována (**1500 rpm, 8°C , 10 min**) na megafuze 1.0R. Hodnoty na centrifuze nebyly v průběhu metody měněny. Pelet buněk byl opláchnut **PBS** a centrifugován. K peletu bylo přidáno 1,5 ml **96% ledového ethanolu** – výsledná koncentrace cca 70%. Po 30 min. inkubace v lednici byly buňky centrifugovány. Pelet byl opláchnut **PBS** a syncen **0,25 % želatinou a 5% FCS (BB)**. Po 30 min inkubace v lednici byla suspenze buněk centrifugována. K peletu bylo přidáno 300 μ l primární protílátky a suspenze byla inkubována 30 min. v lednici. K suspenzi bylo poté přidáno 5 ml **PBS** (první promytí) a byla centrifugována. Sediment byl dvakrát propláchnut **PBS** a k výslednému peletu bylo přidáno 300 μ l sekundární protílátky ředěné v **BB**. Po 30 min.

inkubace v lednici bylo k suspenzi přidáno 5 ml PBS (první promytí). Buňky byly centrifugovány a pelet jednou propláchnut PBS. Výsledný sediment byl resuspendován v 0,5 ml PBS a analyzován na průtokovém cytometru LSR II (Becton Dickinson).

IV. 2.1.2.8 Analýza dat z průtokové cytometrie

Získaná data byla analyzována pomocí software Diva, verze 6.1.2. Nejprve byla vybrána množina (gate) jednotlivých případů (events), které velikostí (FSC parametr) a granularitou (SSC parametr) odpovídají intaktním myším fibroblastům. U buněk z této množiny byla analyzována intenzita fluorescence (AF 488 – filtr BF02 530/30). Hranice mezi negativními a pozitivními buňkami byla nastavena pomocí pozitivní (buňky infikované divokým typem viru) a negativní (neinfikované buňky) kontroly.

IV. 2.2. Plaková zkouška

Hmyzí buňky Sf9 byly infikovány na Petriho miskách o průměru 6 cm 0,5 ml různě ředěného bakulovirového inokula. Po hodině absorpce viru na kývačce bylo na každou misku přidáno 4 ml **1% agarozového média s 10% FCS**. Po ztuhnutí agarózy byly buňky inkubovány v termostatu 6 dní při 28°C. Po šesti dnech byly na miskách s vhodným ředěním označeny velké plaky. Jednotlivé plaky byly přeneseny žlutou špičkou na Petriho misky o průměru 6 cm s 5 ml média s 10% sérem a buňkami Sf9 s narostlými do 50% konfluence. Po 72 hod. byly infikované buňky centrifugovány (viz IV. 2.1.1.3). Supernatant byl uschován a dále použit jako bakulovirové inokulum a sediment hmyzích buněk byl lyzován a analyzován (viz IV. 2.3.1).

IV. 2.3. Práce s proteiny

IV. 2.3.1 Příprava lyzátů pro imunologickou detekci

K sedimentu byl přidán pufr **RIPA** v poměru asi 100μl **RIPA** pufru (s **1% PMSF** a **1% aprotininu**) k buňkám z jedné Petriho misky o průměru 6 cm. Sediment byl řádně resuspendován a ponechán 20 min na ledu, potom byly vzorky centrifugovány **5 min., 4800 rpm, 4°C** na centrifuze Sigma, rotor 12171. Nakonec byl supernatant přenesen do mikrozkumavek a skladován při -20°C.

IV. 2.3.2 Dot blot

Na membránu bylo naneseno podle koncentrace proteinů ve vzorku 1 nebo 2 μ l vzorku a po zaschnutí byla membrána vysycena 1-2 hod. v 7% odtučněném mléce ředěném v PBS. Dále probíhala imunodetekce popsaná níže (viz IV. 2.3.6).

IV. 2.3.3 Příprava vzorků pro proteinovou elektroforézu a proteinová elektroforéza

Ke každému lyzátu byl přidán 5 krát koncentrovaný **Laemmliho pufr** tak, aby výsledná koncentrace byla 1x. Vzorky byly povařeny 5-7 min.

Elektroforetická skla byla umyta detergentem a destilovanou vodou. Do sestavené aparatury pro tuhnutí gelů byl nanesen spodní (separační) gel, který byl převrstven demi vodou. Po 30 – 40 min. tuhnutí byl nanesen horní gel, do kterého byl umístěn hřeben. Po 30 – 40 min. tuhnutí byl hřeben odstraněn, skla s gely byla umístěna do aparatury pro elektroforézu a přelita elektroforetickým pufrem. Do jamek byly naneseny vzorky.

Vzorky putovaly vrchním gelem 30 min. při napětí **80V**. Poté bylo napětí zvýšeno na **140 V** a vzorky putovaly separačním gelem přibližně 2 hod

IV. 2.3.4 Western blot

Před přípravou blotovacího sendviče byl gel inkubován 5 – 10 min. v blotovacím pufru. Blotovací sendvič pro mokrý blot se skládal z těchto složek v tomto pořadí:

- Mřížka směřovaná ke katodě
- Houbička
- Filtrační papíry
- Whatman
- Gel
- Membrána
- Whatman
- Filtrační papíry
- Houbička
- Mřížka směřovaná k anodě

Sendviče byly umístěny do blotovací aparatury a zality pufrem. Blotování probíhalo při **250mA** 3 hod.

Blotovací sendvič pro semi dry blot měl toto složení:

- Spodní část aparatury
- Folie s vystříženým místem pro sendvič
- Whatman
- Filtrační papíry
- Membrána
- Gel
- Filtrační papíry
- Whatman
- Horní část aparatury

Sendvič byl umístěn do otvoru ve fólii a spodní část aparatury byla přelita blotovacím pufrem do úrovně fólie. Blotování probíhalo při **0,8mA na cm²** membrány 1 hod.

Všechny části sendviče byly krátce inkubovány v blotovacím pufru, ve všech případech se používaly 3 nebo 4 filtrační papíry. Po skončení blotování byl sendvič rozebrán a membrána byla sycena 1-2 hod. v **7% odtučněném mléce v PBS**.

IV. 2.3.5 Barvení Coomassie blue

Gel byl fixován **fixačním roztokem** 1 – 2 hod. Barvení probíhalo přes noc při laboratorní teplotě. Nenavázané barvivo bylo odmyto dH₂O přibližně 5x v intervalu 2- 3 hod.

IV. 2.3.6 Imunologická detekce

Vysycená membrána byla zatavena do folie s **primární protilátkou**. Po 60 minutách byla membrána propláchnuta 3 – 6x (po 15 min) v **PBS s 0,1% Tween 20** na třepačce, zatavena do folie se **sekundární protilátkou s** navázanou peroxidázou, nakonec byla propláchnuta 3-6x (po 15 min) v **PBS s 0,1% Tween 20** na třepačce. Membrána byla vyvolávána roztokem **luminolu, kys. kumarové a peroxidu vodíku**. Doba expozice se pohybovala od 30s do 10 min., podle intenzity signálu.

IV. 2.4. Izolace pseudokapsid z hmyzích buněk

IV. 2.4.1 Příprava lyzátu

Hmyzí buňky byly 72 – 96 hodin po infekci příslušným inokulem seškrábány do média a centrifugovány na centrifuze MSE při **1500 rpm 5 min.** Pelet byl propláchnut PBS a znovu centrifugován při **1500 rpm 5 min.** Propláchnutý pelet byl resuspendován v **B pufu**. Suspenze hmyzích buněk v **B pufu** byla sonikována 3 x 30s na Soniprepu 150 při maximální amplitudě, na ledu, a centrifugována **10 min při 2000 rpm a 4°C** na centrifuze Sigma a rotoru 19776 H. Pokud se v supernatantu stále vyskytovaly neporušené buňky, byla sonikace a centrifugace opakována. Supernatant - suspenze rozrušených buněk po sonikaci byla nanášena na sacharózový polštář a centrifugována.

IV. 2.4.2 Centrifugace přes sacharózový polštář a sonikace sedimentu

Suspenze byla převedena do centrifugační kyvety. Zde byla podvrstvena **10% sacharózou** tak, aby výsledný polštář zabíral přibližně 0,05 objemu zkumavky. Kyvety byly vyvažovány **B pufrem**. Centrifugace probíhala **3 hod. při 35 000 a 4°C** na ultracentrifuze Beckmann (rotor SW 41). Sediment byl resuspendován v **B pufu** a sonikován: 3-6x po 30s na Soniprepu 150 při max. amplitudě, na ledu. Suspenze byla dále centrifugována v CsCl gradientu.

IV. 2.4.3 Centrifugace v CsCl gradientu a jeho analýza

Izopyknická centrifugace v CsCl gradientu probíhala v průhledných centrifugačních kyvetách. V centrifugační kyvetě bylo smícháno 8g suspenze v **B pufu** a 3,84g CsCl. Kyvety byly překryty parafilmem a směs vzorku a CsCl promíchána otáčením kyvety. Po rozpuštění CsCl byla směs převrstvena **parafinovým olejem**. Tím byly také zkumavky v kyvetách vyváženy. Centrifugace probíhala při **20h při 35000 rpm a 18°C** na ultracentrifuze Beckmann (rotor SW 41).

CsCl gradient byl rozebírán a analyzován dvěma způsoby:

1) V případě, že byl vidět silný proužek vznášejících se pseudokapsid, byl odebrán pomocí injekční stříkačky a převeden do sterilní lékovky. Dále byl vzorek dialyzován proti B pufu.

2) Jinak byl gradient rozebrán na frakce peristaltickou pumpou a jednotlivé frakce byly jímány do mikrozkuumavek. Každé frakci byl změřen refraktometrický index (RI). Navíc byly frakce imunologicky analyzovány metodou dot blot. Frakce v mikrozkuumavkách byly spojeny podle známých hodnot RI (1,363 – 5), případně podle výsledků imunodetekce do tří velkých frakcí. Ty byly dialyzovány proti **B pufru**.

IV. 2.4.4 Dialýza, uskladnění a analýza preparace pseudokapsid

Dialyzační membrána byla povařena 10 min. v destilované vodě. Vzorky byly převedeny do dialyzační membrány. Dialýza probíhala ve dvou krocích (1 hod ve 2 l B pufru a přes noc v 1 l čerstvého B pufru při 4°C).

Po dialýze byly pseudokapsidy zahuštěny přes sacharózový polštář (viz IV. 2.4.2), čímž vznikl špatně rozpustný kompaktní sediment na dně centrifugační zkuumavky.

Sediment byl resuspendován ve 100 µl **B pufru**. Pro delší skladování byl do vzorku přidán **glycerol** (výsledná koncentrace 5%). Pseudokapsidy byly skladovány při – 80°C.

Pro další práci byla změřena koncentrace VLPs měřením Bredfordové a hemaglutinací. VLPs byly navíc negativně barveny a pozorovány elektronovým mikroskopem (EM).

IV. 2.4.5 Měření koncentrace proteinů podle Bredfordové

Nejprve byla připravena ředící řada **BSA** v **B pufru**, po 200 µl od 0 do 1mg/ml. 2 µl z každého vzorku byly přidány do 1 ml činidla **Bredfordové**. Při vlnové délce 595 nm byla naměřena absorbance a sestrojena kalibrační řada. Z každého preparátu VLPs byly přidány 2 µl do 1 ml činidla **Bredfordové**. Naměřené hodnoty absorbance byly použity pro výpočet koncentrace proteinů v jednotlivých preparátech. Pro výpočet byl použit program **Microsoft Excel**.

IV.2.4.6 Hemaglutinace (Türler a Beard 1985)

Morčecí krev byla promyta v roztoku **0,2% BSA** v **PBS**. Poté byl změřen hematokrit (centrifuga MPW 300) a krev byla zředěna na výslednou koncentraci **0,4%** červených krvinek. K určení hemaglutinačního titru byla použita 96 jamková mikrotitrační destička s kulatými dny. Do každé jamky bylo nanášeno 50 µl **0,2% BSA** v **PBS**. Podle koncentrace proteinů (viz 4.6), byly VLPs zředěny. Do prvních jamek bylo nanášeno 50 µl zředěných pseudokapsid a směs byla zamíchána. Následně 50 µl z takto rozmíchané směsi bylo nanášeno do druhých jamek. Tento postup byl opakován až do posledních jamek. Do každé

jamky bylo nanášeno 50 μ l 0,4% roztoku červených krvinek. Po několika hodinách inkubace při 4°C byl odečítán hemaglutinační titr a podle vztahu 1HAU = 10^7 částic byl určen počet VLPs v 1 ml suspenze pseudokapsid.

V.

Výsledky

V. 1 Vyšetřování možné účasti strukturních proteinů VP2 a VP3 myšího polyomaviru ve velmi časně fázi infekčního cyklu.

Funkce minoritních proteinů myšího polyomaviru VP2 a VP3 není objasněna. Studie s mutovanými viry, v jejichž genomu byl mutován iniciační kodón pro VP2 nebo pro VP3 a v jejichž virionu chyběl jeden nebo druhý minoritní protein ukázaly, že takové viriony nejsou infekční a že absence VP2 nebo VP3 působí viru problém ve velmi časně fázi MPyV infekce, tj. během vstupu a/nebo transportu viru buňkou anebo při rozvolnění viru a dopravě genomu do buněčného jádra. Přitom hlavní strukturní protein MPyV –VP1– interaguje se sialovou kyselinou gangliosidových receptorů na povrchu buněk a pseudokapsidy tvořené výhradně proteinem VP1 jsou internalizovány buňkou s podobnou účinností jako wt viriony. V naší laboratoři bylo ale také zjištěno, že většina vstupujících virionů a také VP1 pseudokapsid nedopraví jimi nesenou DNA do buněčného jádra kde by byla exprimována, ale jsou buď degradovány, nebo cíleny k exocytóze.

Jednou z možností, jak by se některý z minoritních proteinů mohl uplatňovat při produktivním vstupu viru do buňky, by byla jeho interakce s putativním koreceptorem po konformačních změnách, které by nastaly po interakci VP1 s receptorem, v případě, že by tyto konformační změny dovolily části jednoho nebo druhého minoritního proteinu se vystavit na povrch virionu. Viriony, které interagují pouze s receptorem, by mohly být sortovány buněčným endocytickým systémem odlišně od těch, které by interagovaly i s putativním koreceptorem. V této souvislosti nás zajímalo, zdali bude účinnost infekce MPyV snížena vysokým přebytkem pseudokapsid složených pouze z VP1 nebo pseudokapsid obsahujících vedle VP1 i jeden z minoritních strukturních proteinů, neboli, jestli některé z pseudokapsid budou sloužit jako kompetitivní inhibitor polyomavirové infekce. Proto jsme přistoupili k izolaci tří druhů pseudokapsid: VP1 pseudokapsidy, pseudokapsidy složené z proteinů VP1 a VP2 a pseudokapsidy složené z VP1 a VP3.

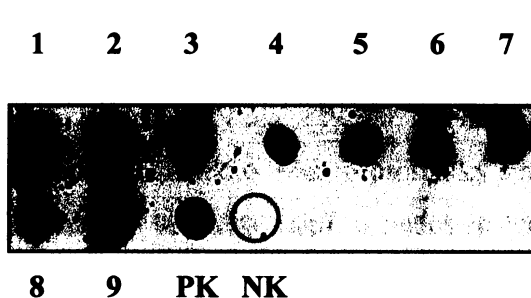
V. 1.1 Příprava pseudokapsid (VLPs) odvozených od strukturních proteinů polyomaviru.

Pro přípravu pseudokapsid jsme využili v naší laboratoři již dříve konstruovaných rekombinantních bakulovirů nesoucích buď – i) gen pro VP1 (VP1-VLPs) nebo ii) gen pro VP1 a gen pro VP2 (VP1/VP2-VLPs nebo iii) gen pro VP1 a gen pro VP3 (VP1/VP3-VLPs). Každý z polyomavirových genů byl pod kontrolou separátního pozdního bakulovirového promotoru. Rekombinantní bakuloviry byly připraveny J. Forstovou (FORSTOVÁ et al., 1993) a Z. Richterovou (RICHTEROVÁ dipl. práce, 1996).

V. 1.1.1. Plaková izolace rekombinantního bakuloviru produkujícího MPyV VP1 a analýza buněčných lyzátů

Pro přípravu VP1-VLPs bylo nutné nejprve připravit kvalitní inokulum rekombinantního bakuloviru nesoucího pod silným pozdním promotorem gen pro hlavní strukturní protein myšího polyomaviru VP1. Jedním ze způsobů, jak připravit kvalitní inokulum, které by poskytlo vysoké výtěžky produkovaného heterologního proteinu, je provedení plakové zkoušky, pomnožení viru z jednotlivých plaků a ověření produkce požadovaného proteinu jednotlivými plakovými izoláty. Principem plakové zkoušky je zamezení volnému šíření viru pomnoženého z jediné virové částice tím, že se buňky čerstvě infikované různě koncentrovaným virovým inokulem přelijí médiem s agarózou. Pod tuhým médiem se virus rozšíří jen do buněk v blízkém okolí infikované buňky, což má za následek tvorbu plaků.

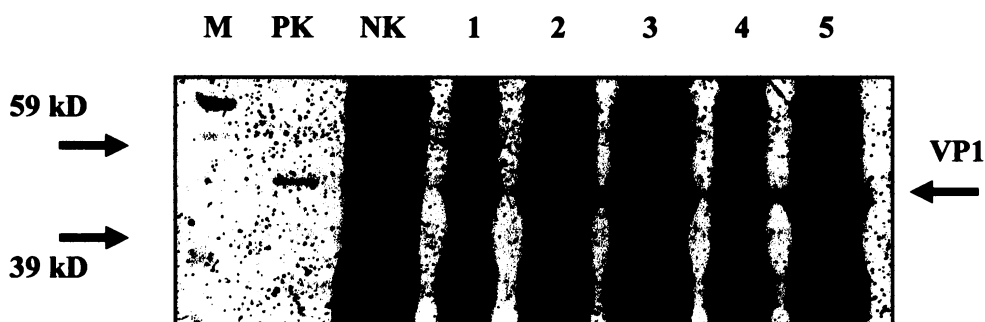
Bakulovirové inokulum bylo naředěno v ředící řadě 10^{-2} , 10^{-3} až 10^{-7} . Každým ředěním byly infikovány dvě 6 cm misky (viz metody IV. 2.2). Po 6 dnech inkubace byla vybrána miska s optimální koncentrací plaků (infikována inokulem ředěným 10^{-4}), ve které bylo možno vypíchnout agarózu (obsahující virus) nad označenými plaky aniž by došlo ke kontaminaci okolními plaky. Z misky bylo vypíchnuto 12 plaků, které byly přidány do 12 misek s buňkami Sf9 a médiem se sérem. Po 72 hodinové inkubaci byly buňky seškrábány do média a centrifugovány. Supernatanty (médiu) byly uchovány jako primární virová inokula a infikované buňky byly lyzovány v lyzačním pufu. Vybrané lyzáty byly testovány na přítomnost proteinu VP1. Nejprve byla provedena imunologická detekce pomocí metody dot blot (Obr. V.1.).



Obr. V. 1: Produkce VP1 v buňkách infikovaných plakovými izoláty bakuloviru.

1 - 9: lyzáty hmyzích buněk infikovaných jednotlivými plakovými izoláty bakuloviru nesoucího gen pro VP1. PK: pozitivní kontrola (lyzát buněk 3T6 infikovaných MPyV). NK: negativní kontrola (lyzát buněk Sf9 infikovaný divokým typem bakuloviru). Protilátka: Myší proti proteinu VP1, kozí polyklonální protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou.

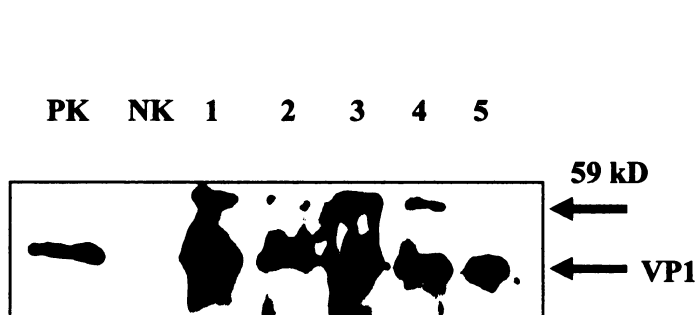
Dot blot prokázal produkci proteinu VP1 z bakuloviru všech zkoumaných plakových izolátů. Primárními inokuly z pěti prvních testovaných plaků byly infikovány buňky (každým inokulem jedna 6 cm miska). Po 72 hodinách inkubace byly z infikovaných buněk připraveny lyzáty pro elektroforetickou analýzu a imunodetekci metodou Western blot. Elektroforetický byly tedy analyzovány lyzáty „druhé generace viru“. Lyzáty rozdělené na SDS PAAGE elektroforéze obarvené Coomassie blue jsou na obrázku V. 2. Z výsledku je vidět, že při použití všech pěti plakových izolátů je v buňkách tvořen převážně protein, jenž elektroforetickou pohyblivostí odpovídá proteinu VP1.



Obr. V. 2: SDS PAAGE lyzátů hmyzích buněk Sf9 infikovaných inokuly z pěti plakových izolátů. Proteiny jsou obarveny Coomassie blue. 1-5: lyzáty hmyzích buněk infikovaných plakovými izoláty bakuloviru nesoucího gen pro VP1. PK: pozitivní kontrola (viriony polyomaviru). NK: negativní kontrola (lyzát buněk infikovaných wt bakulovirem). Černé šipky označují polohu markerů mol.vah (hodnoty uvedené v kilodaltonech), červená šipka označuje protein VP1 (45 kD).

Další část pěti lyzátů byla po elektroforetickém rozdělení proteinů blotována na nitrocelulozovou membránu a VP1 protein byl detekován metodou Western blot. Výsledek imunodetekce proteinů na nitrocelulozové membráně (Obr. V. 3) prokazuje, že nadprodukovaným proteinem je protein VP1. Na imunoblotu (Obr. V. 3) je také možno pozorovat v lyzátech hmyzích buněk proužek odpovídající svou pohyblivostí proteinu o

velikosti asi 60 kD. Tato velikost neodpovídá diméru VP1. Vzhledem k tomu, že se tento proužek nevyskytuje v lyzátu hmyzích buněk infikovaných bakulovitým divokého typu, nejedná se patrně o reakci protilátky s nějakým bakulovirovým nebo buněčným proteinem. Mohlo by se jednat např. o nedostatečně disociovaný komplex VP1 s nějakým buněčným nebo bakulovirovým proteinem.



Obr. V. 3: Western blot lyzátů hmyzích buněk infikovaných monoplakovými izoláty bakuloviru nesoucího gen pro VP1. PK: pozitivní kontrola (lyzát buněk 3T6 infikovaných MPyV). NK: negativní kontrola (lyzát buněk infikovaných wt bakuloviru). Černá šipka označuje pozici proteinu markeru, červená šipka protein VP1. Protilátka: Myší proti denat. proteinu VP1, kozí polyklonální protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou.

Po ověření produkce proteinu VP1 byla vybrána tři inokula (3,4,5), s kterými bylo dále pracováno. Protože nebyly nalezeny výrazné rozdíly v produkci VP1 u těchto tří inokul, používalo se dále inokulum, vzniklé jejich spojením. Tímto spojeným inokulem byly infikovány buňky Sf9 na třech 10 cm miskách. Z těchto buněk bylo 72 hod po infekci odebráno medium a dále používáno jako bakulovirové inokulum pro infekci buněk k produkci VP1 VLPs.

IV.1.1.2 Příprava VP1 VLPs

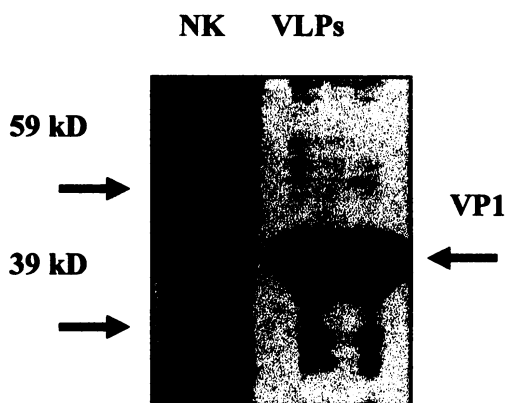
Ověřeným inokulem byly infikovány buňky Sf9 pro produkci a izolaci VP1 VLPs. Infekce probíhala v třiceti 10 cm miskách. Po 72 hodinách byly buňky sklizeny, resuspendovány v B pufru a sonikovány (viz IV. 2.4.1). Pseudokapsidy byly zahuštěny sedimentací přes sacharózový polštář (viz IV. 2.4.2) a izolovány centrifugací ve třech hustotních gradientech CsCl (viz IV. 2.4.3). Po centrifugaci byly patrné v centrifugačních zkumavkách silné opalizující proužky. Ty byly vyjmuty injekční stříkačkou, spojeny, dialyzovány v B pufru, zahuštěny přes sacharózový polštář a resuspendovány v B – pufru. VP1 pseudokapsidy byly

nejprve analyzovány metodou dot blot (Obr. V. 4) a poté analyzovány proteinovou SDS PAAGE elektroforézou (Obr. V. 5).

NK VZ PK

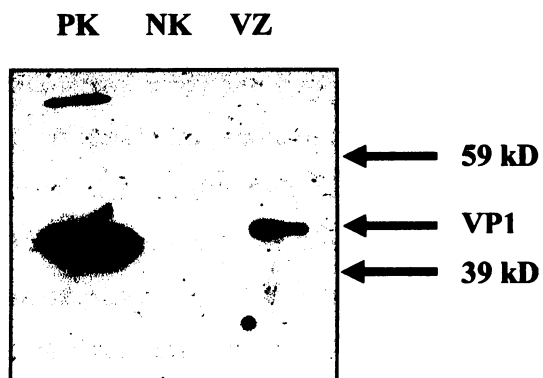


Obr. V. 4: Dot blot izolovaných VP1 VLPs . NK: Negativní kontrola (lyzát buněk Sf9), PK: Pozitivní kontrola (lyzát buněk 3T6 infikovaných MPyV). VZ: VP1 VLPs. Vyvoláno myší protilátkou proti proteinu VP1 a kozí polyklonální protilátkou proti myším imunoglobulinům konjugovanou s křenovou peroxidázou.



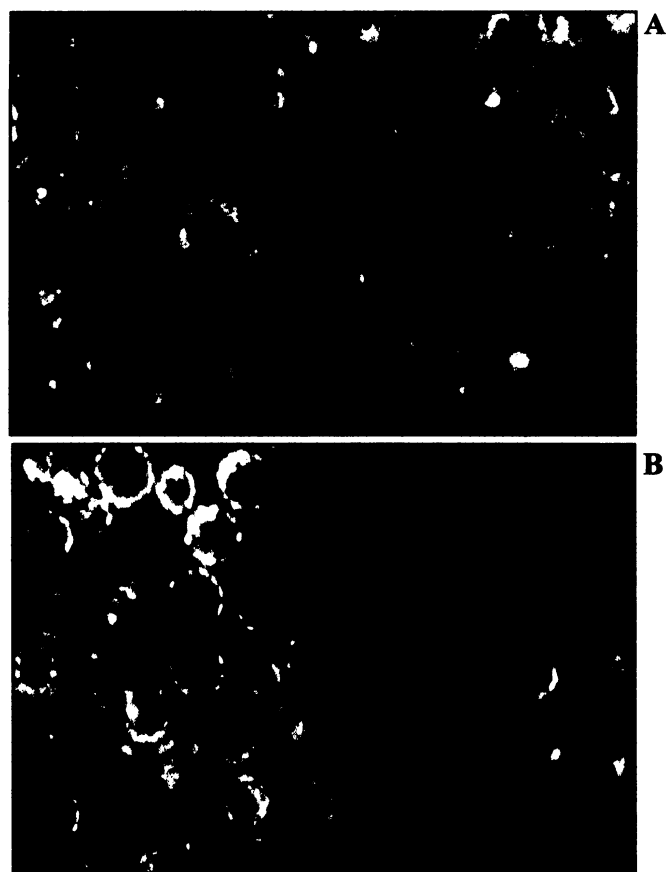
Obr. V. 5: Izolované VP1 VLPs na SDS PAAGE obarvené Coomassie blue. NK: negativní kontrola (lyzát buněk Sf9). VLPs: VP1-VLPs izolované z hmyzích buněk centrifugací v CsCl gradientu. Černé šipky označují pozici proteinů markeru, červená šipka protein VP1

Podle obrázku V. 5 je zřejmé, že vzorek pseudokapsid obsahoval převážně protein odpovídající svou mobilitou proteinu VP1 a pouze minoritní kontaminace jinými proteiny. Analýza zředěného vzorku metodou Western blot detekovala protein VP1 (Obr. V. 6). Koncentrace proteinu ve vzorku byla změřena podle Bredfordové a byla stanovena na 15 mg/ml. Takováto koncentrace byla pro další práci příliš vysoká, proto byly pseudokapsidy naředěny přibližně třicetkrát na výslednou koncentraci 0,5 mg/ml. Abychom ověřili, že protein VP1 je uspořádán do struktury pseudokapsid, byl VP1 vzorek dále analyzován hemaglutinací a elektronovou mikroskopií. Hemaglutinační titr byl $4,09 \times 10^5$ hemaglutinačních jednotek, což odpovídá koncentraci 4×10^{12} částic/ml. Na Obr. V. 7 je elektronmikroskopický snímek neředěných a zředěných VP1 VLPs. VP1 VLPs byly skladovány v hlubokomrazícím boxu v 5% glycerolu, připravené k dalším pokusům.



Obr. V. 6: Imunodetekce VP1 v preparaci VP1 VLPs metodou Western blot.

PK: Pozitivní kontrola (lyzát buněk 3T6 infikovaných MPyV), NK: Negativní kontrola (lyzát buněk Sf9 infikovaných wt bakuloviru), VZ: Denaturované VP1 VLPs, černé šipky označují pozici proteinů markeru, červená šipka protein VP1. Protilátky: Myší proti denaturované formě proteinu VP1, kozí polyklonální protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou.



Obr. V. 7:

Elektronová mikroskopie VP1 VLPs po CsCl gradientu.

Negativní barvení. Úsečka označuje 200 nm.

A: Neředěné VP1 VLPs (15 mg/ml)

B: Zředěné VP1 VLPs (0,3 mg/ml)

V. 1.1.3. Plaková izolace rekombinantního bakuloviru produkujícího strukturální proteiny VP1 a VP3 MPyV a analýza buněčných lyzátů

Stejným způsobem jako u inokula pro produkci VP1 byla ověřena i kvalita inokula pro produkci proteinů VP1 a VP3 (viz IV. 2.2). Nejprve byla provedena plaková zkouška inokula

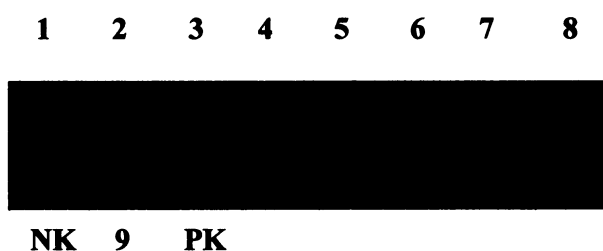
a potom byly ověřeným plakovým izolátem infikovány buňky Sf9, z kterých byly izolovány pseudokapsidy složené z proteinů VP1 a VP3.

Bakulovirové inokulum bylo naředěno 10^{-2} – 10^{-7} . Plaková zkouška byla provedena stejně jako v případě viru produkujícího pouze protein VP1 (viz IV.2. a V.1.1.1.). Po 6 dnech byla zvolena miska infikovaná ředěním 10^{-6} . Z té bylo odebráno 16 plaků, které byly převedeny do 16 misek s médiem se sérem a buňkami. Po 96 hodinách bylo sterilně odebráno médium (inokula plakových izolátů) a buňky byly lyzovány v lyzačním pufru. Vybrané lyzáty byly dále analyzovány. Proteiny VP1 a VP3 byly detekovány v lyzátech metodou dot blot. V lyzátech buněk infikovaných všemi devíti analyzovanými plakovými izoláty se vyskytovaly oba proteiny VP1 i VP3 (obrázky V. 8 a V. 9).



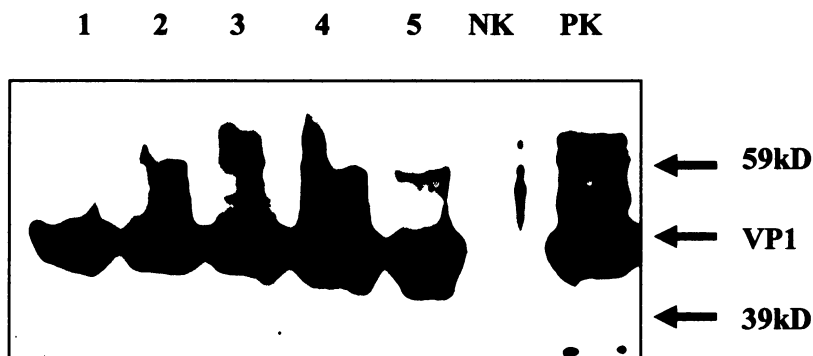
Obr. V. 8: Detekce VP1 v lyzátech hmyzích buněk infikovaných plakovými izoláty bakuloviru nesoucího geny pro VP1 a VP3. 1 – 9: Lyzáty infikované jednotlivými plakovými izoláty. PK: Pozitivní kontrola (lyzát buněk 3T6 infikovaných MPyV) NK: Negativní kontrola (lyzát buněk Sf9 infikovaných wt bakuloviru). Protilátky: myší proti proteinu VP1, kozí polyklonální protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou..

Obr. V. 9: Detekce VP3 v lyzátech hmyzích buněk infikovaných plakovými izoláty bakuloviru nesoucího geny pro VP1 a VP3). 1 – 9: Lyzáty infikované jednotlivými plakovými izoláty. PK: Pozitivní kontrola (lyzát buněk 3T6 infikovaných MPyV) NK: Negativní kontrola (lyzát buněk Sf9 infikovaných wt bakuloviru). Použita myší protilátka proti společné části proteinů VP2/VP3 a kozí polyklonální protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou

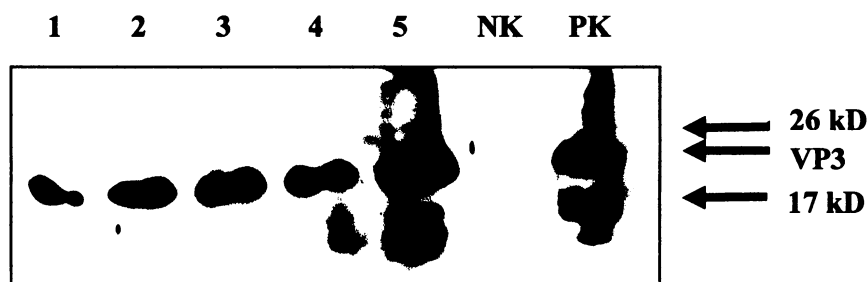


Primárními inokuly z pěti testovaných plaků byly infikovány buňky (každým inokulem jedna 6 cm miska). Po 72 hodinách inkubace byly z infikovaných buněk připraveny lyzáty pro elektroforetickou analýzu a imunodetekci metodou Western blot. Na Obr. V. 10 je výsledek

imunodetekce VP1 metodou Western blot. Na Obr. V. 11 je stejná analýza ale s použitím protilátky proti VP3.

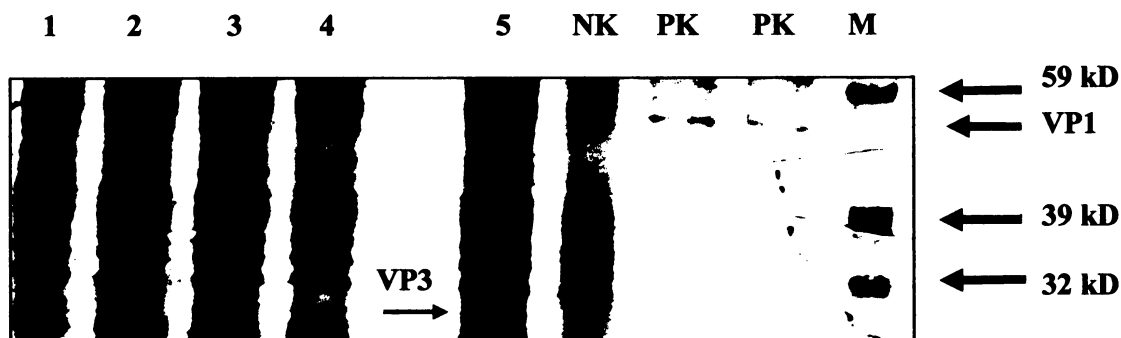


Obr. V. 10: Imunodetekce proteinu VP1 metodou Western blot v lyzátech hmyzích buněk infikovaných plakovými izoláty bakuloviru nesoucího geny pro VP1 a VP3 . 1-5: Lyzáty hmyzích buněk infikovaných nezávislými plakovými izoláty bakuloviru pro produkci VP1 a VP3. NK: Negativní kontrola (lyzát buněk Sf9 infikovaných wt bakuloviru). PK: Pozitivní kontrola (Lyzát buněk 3T6 infikovaných MPyV). Černé šipky ukazují pozici proteinů markeru, červená šipka pozici proteinu VP1. Protilátky: Myší proti denaturovanému proteinu VP1, kozí polyklonální protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou.



Obr. V. 11: Imunodetekce proteinu metodou Western blot v lyzátech hmyzích buněk infikovaných plakovými izoláty bakuloviru nesoucího geny pro VP1 a VP3. 1-5: Lyzáty hmyzích buněk infikovaných nezávislými plakovými izoláty bakuloviru pro produkci VP1 a VP3. NK: Negativní kontrola (lyzát buněk Sf9 infikovaných wt bakuloviru). PK: Pozitivní kontrola (ověřené inokulum produkující proteiny VP1 a VP3 MPyV). Černé šipky ukazují pozici proteinů markeru, červená šipka pozici proteinu VP3, Protilátka: myší proti společné části proteinů VP2 a VP3, kozí polyklonální protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou.

Lyzáty byly také analyzovány na SDS PAAGE obarvené Coomassie blue. Výsledek (Obr. V. 12) ukazuje poměrně slabé zastoupení VP1 i VP3 a přítomnost mnoha bakulovirových proteinů. Pozitivní kontrola, viriony MPyV, byla patrně příliš ředěna, takže nejsou vidět minoritní strukturní proteiny.



Obr. V. 12 Rozdělení proteinů na SDS elfo a barvení Coomassie blue lyzátů hmyzích buněk produkujících proteiny VP1 a VP3. 1-5: Lyzáty hmyzích buněk infikovaných nezávislými plakovými izoláty bakuloviru s produkcí VP1 a VP3. NK: lyzát buněk infikovaných wt formou bakuloviru. PK: Pozitivní kontrola (viriony MPyV). M: Marker, černé šipky ukazují pozici jednotlivých proteinů markeru molekulových vah, červené šipky pozici proteinů VP1 a VP3.

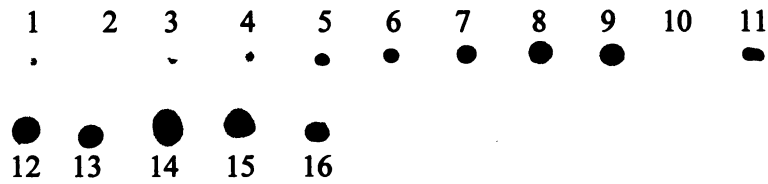
V.1.1.4. Plaková izolace rekombinantního bakuloviru produkujícího strukturní proteiny VP1 a VP2 MPyV a analýza buněčných lyzátů

Inokulum bakuloviru nesoucího geny pro hlavní strukturní protein VP1 a minoritní strukturní protein VP2 bylo připraveno z monoplakového izolátu viru a ověřeno již dříve v naší laboratoři. (I. Polívkovou).

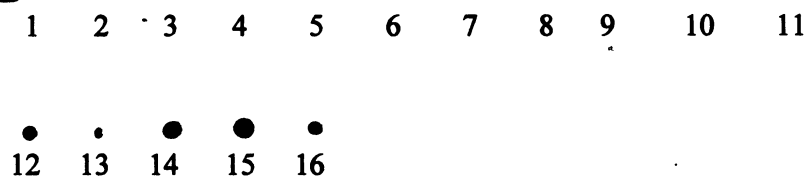
V. 1.1.5. Příprava VP1/VP3 a VP1/VP2 VLPs.

Ověřeným bakulovirovým inokulem pro produkci proteinů VP1 a VP3 byly infikovány buňky Sf9 na dvaceti 9-ti cm miskách. Ověřeným inokulem bakuloviru pro produkci proteinů VP1 a VP2 byly dále infikovány hmyzí buňky na 20 miskách (o průměru 9 cm). Po 72 hodinách byly buňky seškrábány do media, centrifugovány a lyzovány sonikací v B pufru. Výsledné suspenze byly zahuštěny přes sacharózový polštář. Sedimenty byly resuspendovány v B pufru, sonikovány a centrifugovány v CsCl gradientu. Protože opalizující proužky nebyly příliš silné, byly frakce CsCl gradientu odebrány peristaltickou pumpou. U jednotlivých frakcí byly změřeny refraktometrické indexy (Obr. V. 13 C a V. 14. C) a provedena imunodetekce metodou dot blot (Obr. V. 13 A, B a V. 14 A, B).

A



B



C

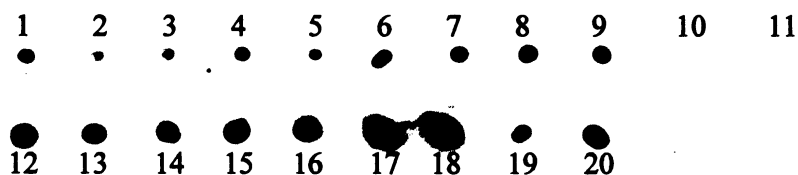
Frakce	1	2	3	4	5	6	
RI	1,376	1,375	1,371	1,369	1,368	1,367	
Frakce		10	11				16
RI		1,365	1,364				1,36

Obr. V. 13: VP1/VP3 pseudokapsidy – frakce CsCl gradientu 1-16: Jednotlivé frakce CsCl gradientu.

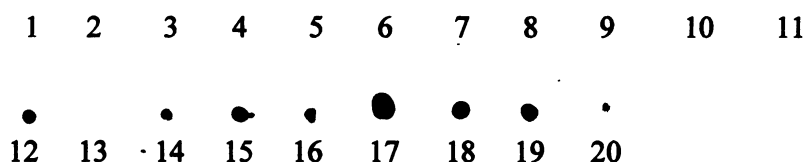
A, B: Analýza jednotlivých frakcí metodou dot blot. **A:** vyvoláno myší protilátkou proti VP1 **B:** Použita myší protilátka proti společné části proteinů VP2/VP3, v obou případech sekundární protilátka koží polyklonální protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou.

C: Refraktometrické indexy (RI) jednotlivých frakcí. Červeně označené frakce 7 – 9 a 12 – 15 byly spojeny a dialyzovány.

A



B



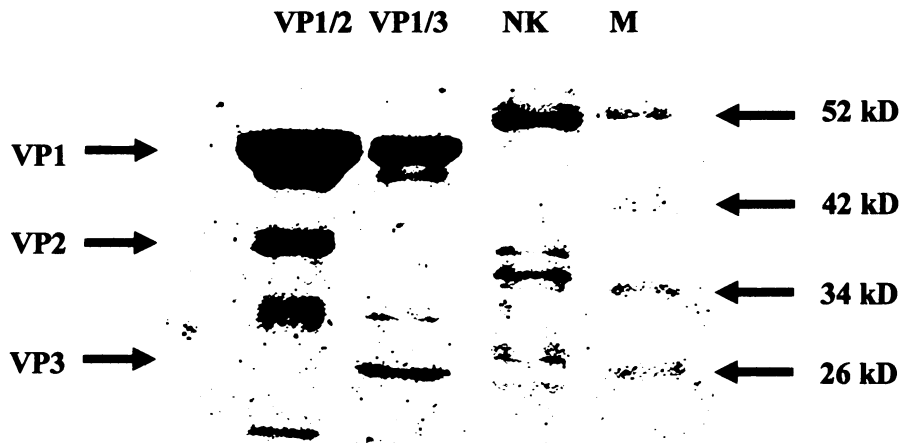
C

Frakce	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
RI	1,376	1,376	1,374	1,371	1,37	1,368	1,367	1,366	1,365	1,365
Frakce	11									20
RI	1,365									1,357

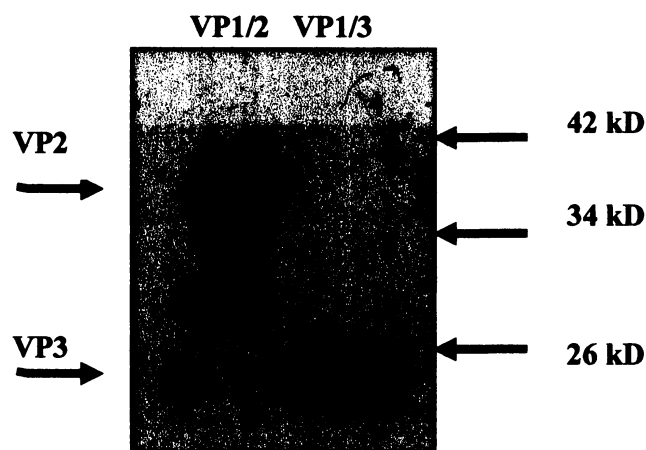
Obr. V. 14: VP1/VP2 pseudokapsidy – frakce CsCl gradientu. 1-20: Jednotlivé frakce CsCl gradientu. **A, B:** Analýza jednotlivých frakcí metodou dot blot. **A:** myší protilátka proti VP1, **B:** myší protilátka proti společné části proteinů VP2/VP3, sekundární protilátka v obou případech kozi polyklonální protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou. **C:** Refraktometrické indexy (RI) jednotlivých frakcí. Červeně označené frakce 12 – 19 byly spojeny a dialyzovány.

Podle výsledku dot blotu a měření RI byly označené frakce obou typů pseudokapsid spojeny a odděleně dialyzovány v B pufru. Dialyzované preparace pseudokapsid byly zahuštěny centrifugací přes sacharózový polštář a resuspendovány v B pufru. Čistota a kvalita izolovaných pseudokapsid byla dále analyzována na SDS elektroforéze, metodou Western blot, hemaglutinačním testem a elektronovou mikroskopií. Obr. V.15 ukazuje, že protein VP1 je dominantním proteinem preparace. V preparaci VP1/VP2 VLPs je vidět dvouproužek odpovídající svou pohyblivostí proteinu VP2. I v preparátech virionů je možno rozlišit dvě formy proteinu VP2 i VP3 lišící se poněkud pohyblivostí. (Po modifikacích minoritních proteinů se v současné době pátrá.) Další proužky v preparaci mohou být degradačními produkty. V preparátu VP1/VP3 pseudokapsid je druhým nejsilnějším proužkem protein s pohyblivostí odpovídající proteinu VP3. Imunodetekce preparátů metodou Western blot

dokazuje přítomnost odpovídajících minoritních proteinů v preparaci VP1/VP2 a VP1/VP3 VLPs (Obr. V. 16)



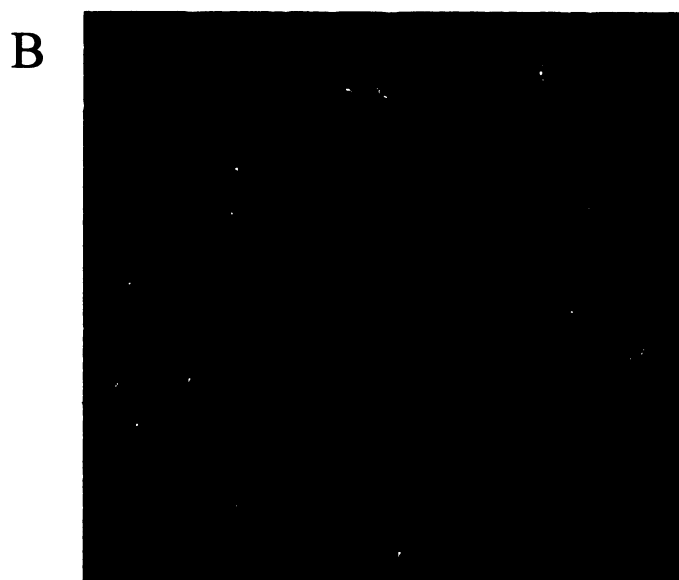
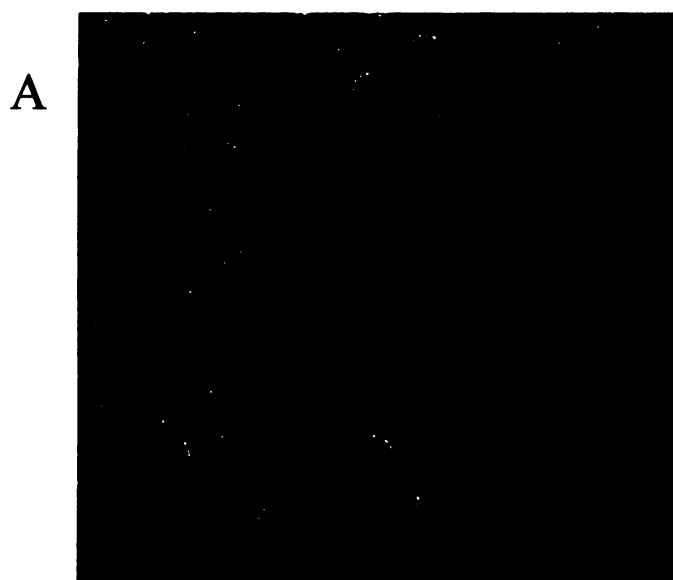
Obr V. 15: SDS PAAGE preparace VP1/VP2 a VP1/VP3 VLPs obarvená Coomassie blue. NK: negativní kontrola (lyzát buněk Sf9) , M: marker molekulových vah, Červené šipky ukazují polohu VP1, VP2 nebo VP3, černé šipky hodnoty markeru molekulových vah



Obr. V. 16: Detekce minoritních proteinů v preparaci VP1/VP2 a VP1/VP3 VLPs. Western blot pseudokapsid. Červené šipky označují minoritní proteiny VP2 a VP3, černé šipky hodnoty markeru mol. vah. Použitá myší protilátka proti společné části VP2 a VP3 a kozí polyklonální protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou.

Množství proteinů ve vzorcích bylo změřeno metodou podle Bredfordové. Koncentrace proteinu byla 1 mg/ml pro VP1/VP2 pseudokapsidy a 0,7 mg/ml pro VP1/VP3

pseudokapsidy. To byla optimální množství pro další pokusy, nebylo je tedy nutné ředit. Hemaglutinační titr byl určen na $7,3 \times 10^5$ HAU, což odpovídá koncentraci $7,3 \times 10^{12}$ částic/ml pro VP1/VP3 VLPs a $2,2 \times 10^6$ HAU, respektive $2,2 \times 10^{13}$ částic/ml pro VP1/VP2 VLPs (Tab. V. 1.). Elektronová mikroskopie (Obr. V. 17) potvrzuje, že v preparacích je naprostá většina proteinů uspořádána do pravidelných kapsidových struktur. Preparace byly skladovány v 5% glycerolu v -80°C k dalším pokusům.



Obr. V. 17 :
Elektronmikroskopické snímky preparace VP1/VP2 a VP1/VP3 VLPs.

Negativní barvení, úsečka označuje 200 nm.

A: VP1/VP2 VLPs,

B: VP1/VP3 VLPs.

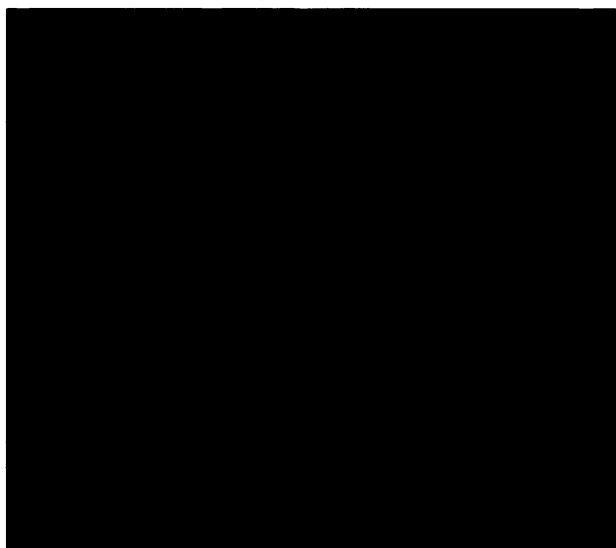
V. 1.2 Analýza kompetice infekčních virionů a VLPs o receptory

Schopnost VLPs soutěžit s infekčními viriony v časných fázích infekce byla zjišťována testem kompetitivní inhibice. V tomto testu jsou buňky infikovány viriony s přidáním známým množstvím VLPs. Zajímalo nás, zdali přítomnost přebytků VLPs ovlivní hladiny infekce. Změny v infektivitě jsme měřili počtem infikovaných buněk produkujících velký T antigen.

V.1.2.1 Určení infekivity viru v přítomnosti VLPs metodou nepřímé imunofluorescence

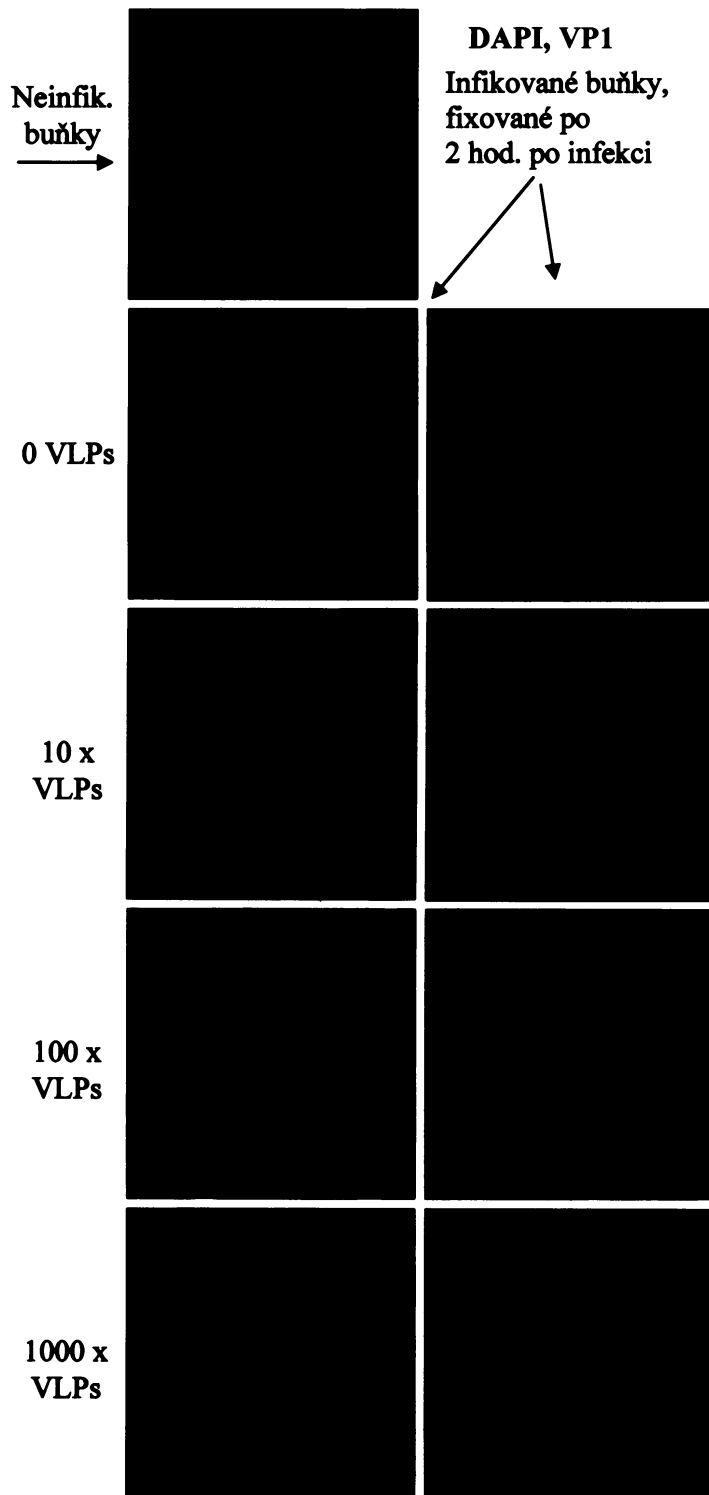
Na sklíčka umístěná v 24 jamkové destičce bylo naneseno přibližně 75 000 buněk (30% konfluence), které byly 20 hodin synchronizovány inkubací v bezsérovém médiu. Byla připravena virové inokula s multiplicitou infekce přibližně 0,5 pfu/cell (infekční titr $1,9 \times 10^5$ /ml) a různou koncentrací VLPs. Množství pseudokapsid převyšovalo hemaglutinační titr virového inokula ($4,7 \times 10^7$) 1x, 10x, 100x, u VP1 pseudokapsid ještě 1000x.

Vzhledem ke zkušenosti, že MPyV ztrácí skladováním infektivitu, bylo nejprve znovu ověřeno nastavení multiplicity infekce tak, aby bylo možno dobře počítat jádra pozitivní na LT v zorném poli a aby byly buňky infikovány ne více než asi z 40 – 50 %. Na Obr. V. 18 je ukázka hladiny infekce ve vzorku bez přidání VLPs.



Obr. V. 18:
**Imunodetekce LT proteinu 24hod.
p.i. nepřímou imunofluorescencí.**
Protilátky: krysí proti LT antigenu,
oslí polyklonální protilátka proti
krysím imunoglobulinům
konjugovaná s AF 488. Zvětšení 100x

Po té jsme ještě ověřili připravená inokula s různými přebytky VLPs (Obr. V.20).



Obr. V. 19: Ověření stoupající koncentrace proteinu VP1 v buňkách infikovaných inokuly polyomaviru obsahujícími různé koncentrace VLPs.

VLPs jsou ve virovém inokulu v 0, 10, 100 a 1000 násobných přebytečných HAU vzhledem k viru. Primární protilátka myší proti proteinu VP1, sekundární kozí polyklonální protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s AF 546. Zvětšení 400x.

Synchronizované buňky narostlé na sklíčkách byly infikovány inokuly infekčních virionů smíchaných s různými přebytky pseudokapsid (celkem 200 μ l inokula). Adsorpce virových částic probíhala na ledu (60 minut) a po dvou hodinách inkubace při 37°C byly buňky fixovány. Protein VP1 byl detekován nepřímou imunofluorescencí. Z obrázku je patrná stoupající koncentrace proteinu VP1.

Pro vlastní pokus kompetitivní inhibice byly podobně viriony spolu VLPs (200 μ l) přidány k buňkám (viz kap. IV. 2.1.2.2). Po 24 hodinách byly buňky fixovány a nepřímou imunofluorescencí (IV. 2.1.2.3 - 5) s použitím protilátky proti LT antigenu byly detekovány infikované buňky. Na každém sklíčku bylo spočítáno nejméně 11 zorných polí (a 300 buněk) při zvětšení 100x. Buňky byly počítány pouze v polích, která neobsahovala neměřitelné shluky buněk, výrazné svítící nečistoty, apod. V každém poli byly spočítány všechny buňky a buňky produkující LT antigen. V tabulce V. 1 jsou shrnuty výsledky. Buňky infikované směsí virionů a nejnižší koncentrací VP1/VP3 VLPs nebylo možné podle výše uvedených kritérií spočítat, neboť jich bylo na sklíčkách velmi málo (odmyly se v průběhu imunoznačení).

VLPs	Počet polí	N buněk	Ni buněk	Ni/N (%)	Rozdíl (%)
žádné	18	1192	372	31,2	0
VP1 1x	20	1252	370	29,6	-1,6
VP1 10x	14	471	139	29,5	-1,7
VP1 100x	11	309	117	37,9	+6,7
VP1 1000x	12	1459	336	23	-8,2
VP1/VP2 1x	15	1732	561	32,4	+1,2
VP1/VP2 10x	18	734	225	30,7	-0,5
VP1/VP2 100x	15	788	321	40,7	+9,5
VP1/VP3 1x	-	-	-	-	-
VP1/VP3 10x	14	698	230	33	+1,8
VP1/VP3 100x	15	901	271	30,1	-1,1

Tab. V. 1: Výsledky testu kompetitivní inhibice infekivity MPyV různými typy a koncentracemi VLPs.

VLPs: typ pseudokapsid a jejich poměr k HAU wt virionů. N: počet všech buněk počítaných v zorných polích sklíčka, Ni: počet všech infikovaných buněk počítaných v zorných polích sklíčka; **Zeleně, Ni/N**: Míra infekivity - % infikovaných buněk z celkového počtu počítaných buněk; **Rozdíl (%)**: Rozdíl v procentech mezi Ni/N jednotlivých směsí VLPs wt viriony a Ni/N kontrolní infekce bez přidavku VLPs (hodnoty kontrolní infekce v zeleném rámečku).

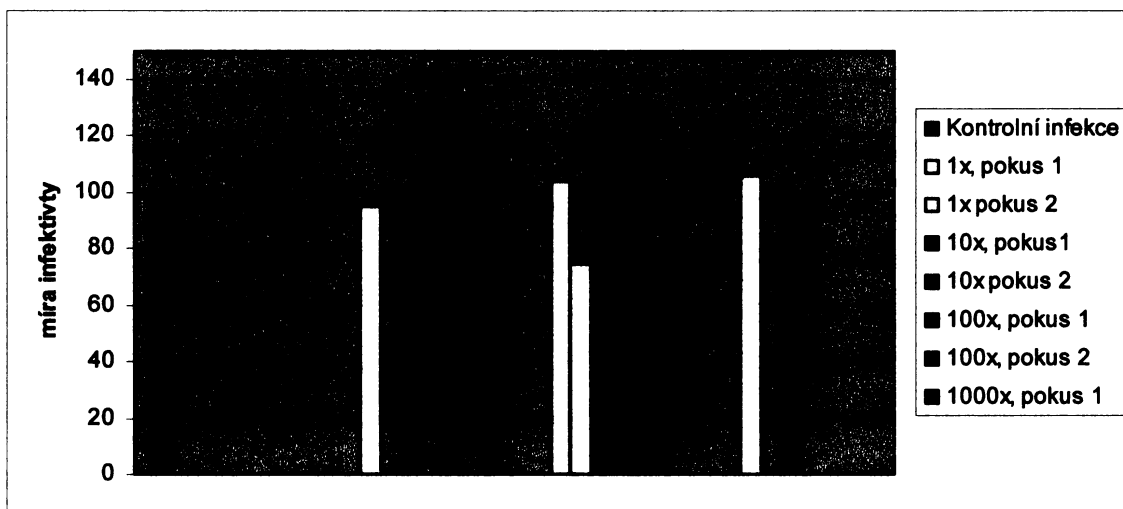
Pokus s pseudokapsidami VP1/VP2 byl stejným postupem zopakován. Výsledek je v tab.V. 2.

VLPs	Počet polí	N buněk	Ni buněk	Ni/N (%)	Rozdíl (%)
žádné	14	383	151	39,4	0
VP1/VP2 1x	17	1209	355	29,3	-10,1
VP1/VP2 10x	8	367	128	34,8	-4,6
VP1/VP2 100x	17	632	195	30,9	-8,5

Tab. V. 2: Výsledky kompetičního testu pseudokapsid VP1/VP2, zhodnocení druhé imunofluorescence. VLPs: poměr přidaných pseudokapsid VP1/VP2 k HAU wt virionům.

N: počet všech buněk počítaných v zorných polích sklíčka, Ni: počet všech infikovaných buněk počítaných v zorných polích sklíčka **Zeleně**, Ni/N: Míra infekitivity - % infikovaných buněk z celkového počtu počítaných buněk; **Rozdíl (%)**: Rozdíl v procentech mezi Ni/N jednotlivých směsí pseudokapsid s wt viriony a Ni/N kontrolní infekce bez přídavku VLPs (hodnoty kontrolní infekce v zeleném rámečku).

Výsledky obou pilotních experimentů shrnuje Graf V.1.



Graf V. 1: Míry infekitivity jednotlivých směsí infekčních virionů a pseudokapsid, imunofluorescence.

Osa X: Typ pseudokapsid, barevně odlišena míra přebytku HAU VLPs nad HAU virionů.

Osa Y: Procenta infikovaných buněk po infekci jednotlivými směsmi virionů a VLPs vztahených ke kontrolám (bez VLPs), stanoveným jako 100% buněk

Překvapivě žádný typ VLPs výrazně neovlivňoval infektivitu virionů a naměřené hodnoty nesledovaly trend zvyšující se koncentrace přidaných VLPs. V průběhu práce na testech kompetitivní inhibice byl na fakultě zakoupen FACS analyzátor. Vzhledem k tomu, že metodou FACS je možno analyzovat řádově větší množství buněk, opakovali jsme kompetiční testy s použitím průtokové cytometrie .

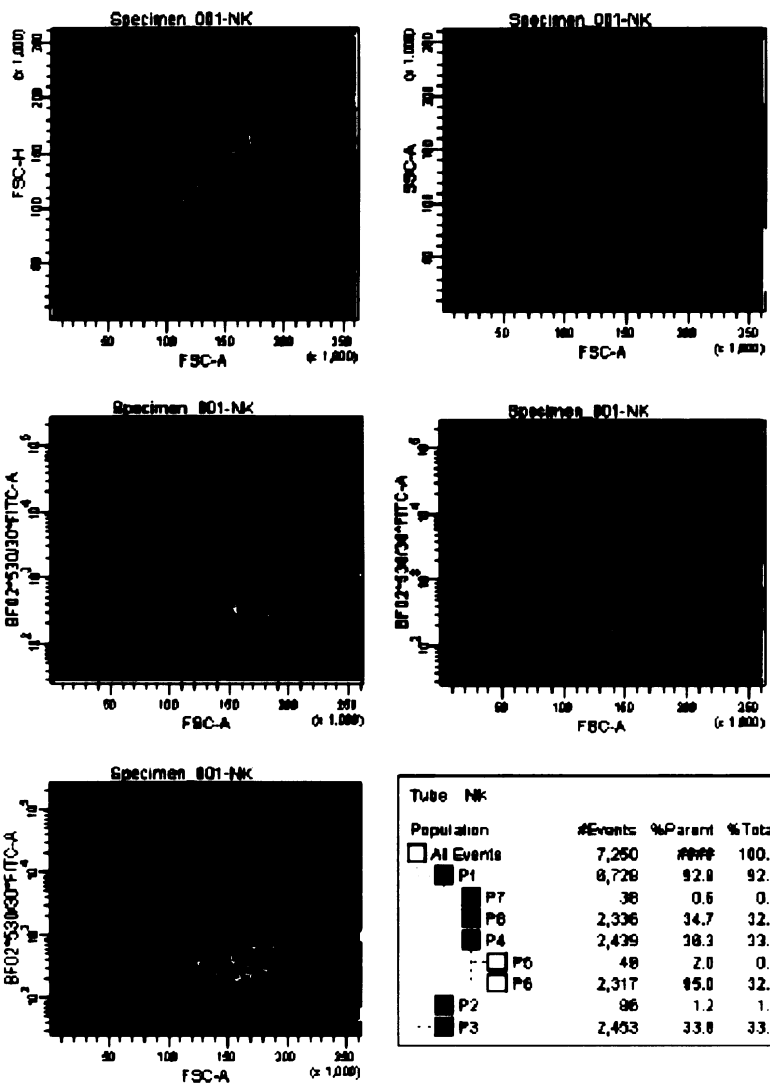
V.1.2.2 Určení infekтивности viru v přítomnosti různých koncentrací VLPs průtokovou cytometrií

Buňky narostlé na miskách o průměru 6 cm do přibližné konfluence 30% (přibližně $1-2 \times 10^6$ buněk) byly 20 hodin synchronizovány hladověním v bezsérovém médiu. Poté byly připraveny směsi virionů a VLPs popsané v kap.V.1.2.1. Navíc byla také připravena směs obsahující 1000 násobný přebytek pseudokapsid VP1/VP2. Koncentrace virionů byla volena tak, aby bylo přibližně 50% buněk infikovaných (multiplicita infekce optimalizovaná pro průtokovou cytometrii, HAU titr $9,4 \times 10^7$ /ml) a VLPs byly přidávány v 1x, 10x, 100x a 1000x (pro VP1 a VP1/VP2 VLPs) .

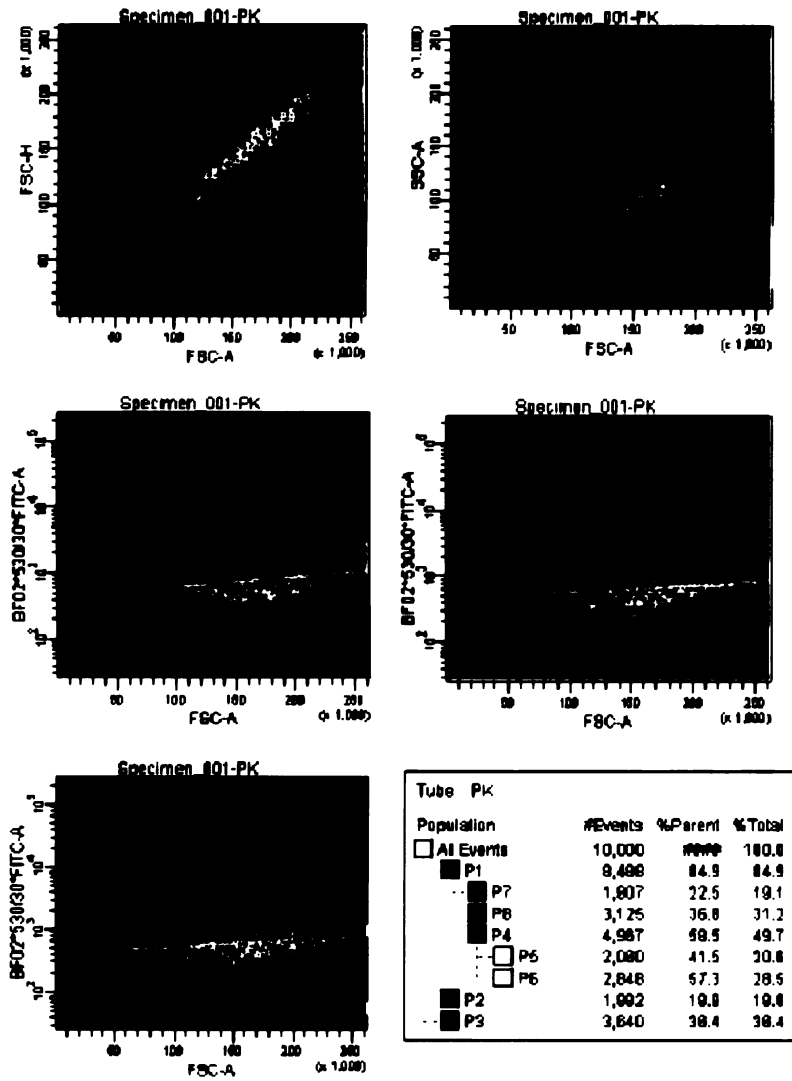
Po 24 hodinách byly buňky převedeny do centrifugačních zkumavek a připraveny pro analýzu na průtokovém cytometru (viz kap. IV. 2.1.2.7). Označené buňky byly měřeny průtokovým cytometrem LSRII a získaná data byla analyzována pomocí software Diva pod vedením Dr. A. Morávkové. Pokus byl proveden dvakrát nezávisle. V prvním experimentu došlo ke ztrátě vzorku, ve kterém byly viriony a VP1/VP3 v poměru 1:1.

Příklady softwarové analýzy průtokové cytometrie pro negativní kontrolu (neinfikované buňky) a kontrolní vzorek infikovaných buněk bez VLPs jsou ukázány na str. 73 a 74. Výsledky FACS analýz obou nezávislých pokusů jsou v tabulkách V. 3. A a V. 3. B .

FACSDiva Version 6.1.2



B



Obr. V. 19. Ukázka softwarové analýzy dat získaných v průtokovém cytometru. Detailní průběh analýzy je popsán v kapitole Metody IV.2.1.2.8.

A

VLPs	N buněk (%)	Ni buněk (%)	Ni/N (%)	Rozdíl (%)
žádné	96,45	43,35	44,95	0,00
VP1 1x	98,20	61,8	62,93	+17,98
VP1 10x	94,30	33,6	35,63	-9,32
VP1 100x	98,00	57,8	58,98	+14,03
VP1/VP2 1x	97,10	69,9	71,99	+27,04
VP1/VP2 10x	98,20	74	75,36	+30,41
VP1/VP2 100x	95,50	60,4	63,25	+18,30
VP1/VP2 1000x	98,40	48,9	49,70	+4,75
VP1/VP3 1x	-	-	-	-
VP1/VP3 10x	98,80	57,3	58,00	+13,05
VP1/VP3 100x	98,20	76,3	77,70	+32,75

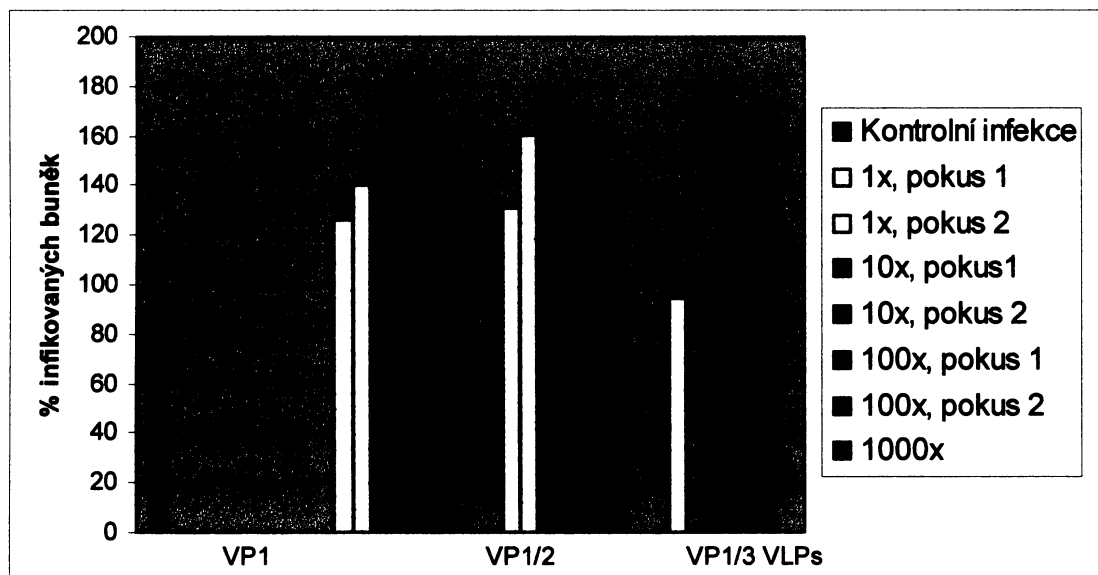
B

VLPs	N buněk (%)	Ni buněk (%)	Ni/N (%)	Rozdíl (%)
žádné	98,80	41,5	42,00	0,00
VP1 1x	94,60	50,3	53,17	+11,17
VP1 10x	98,30	48,4	49,24	+7,24
VP1 100x	91,90	70,4	76,61	+34,61
VP1 1000x	98,50	66,3	67,31	+25,31
VP1/VP2 1x	98,90	54,5	55,11	+13,11
VP1/VP2 10x	98,70	74,2	75,18	+33,18
VP1/VP2 100x	98,10	66	67,28	+25,28
VP1/VP3 1x	98,60	39,1	39,66	-2,34
VP1/VP3 10x	98,70	43,7	44,28	+2,28
VP1/VP3 100x	98,40	64,5	65,55	+23,55

Tab. V. 3 : Výsledky testu kompetitivní inhibice MPyV infekce různými koncentracemi VLPs získané průtokovou cytometrií ve dvou nezávislých pokusech (A, B) VLPs: typ přidávaných VLPs a poměr jejich koncentrací ke koncentraci virionů (v HAU jednotkách).

N: procenta signálů vyhodnocených jako buňka; **Ni:** % signálů vyhodnocených jako buňky produkující protein LT; **Zeleně, Ni/N:** Míra infekтивности - % infikovaných buněk z celkového počtu analyzovaných buněk; **Rozdíl (%):** Rozdíl v procentech mezi Ni/N jednotlivých směsí VLPs s wt virionů a Ni/N kontrolní infekce bez přidavku VLPs (hodnoty kontrolní infekce v zeleném rámečku).

Graf V. 2 ukazuje hodnoty infekтивности viru v obou pokusech. Překvapivě v obou experimentech přidávané pseudokapsidy s výjimkou dvou hodnot zvyšovaly míru infekтивности.



Graf V.2: Míry infekitivity jednotlivých směsí infekčních virionů a pseudokapsid, průtoková cytometrie. Osa X: Typ pseudokapsid. Zleva doprava vzrůstající přebytky VLPs rozlišené barvami. Osa Y: Procenta infikovaných buněk po infekci jednotlivými směsmi virionů a VLPs vztahených ke kontrolám (bez VLPs), stanoveným jako 100%.

Bohužel rozdíly mezi paralelními hodnotami obou pokusů jsou u VP1 vysoké. Přesto je možno říci, že v našich pokusech ani VP1 VLPs ani VLPs obsahující jeden nebo druhý minoritní protein nefungovaly jako kompetitivní inhibitory polyomavirové infekce. Závislost infekitivity na množství nebo typu pseudokapsid nebyla ale nalezena ani touto metodou.

V. 2. Studium vlastností strukturních minoritních proteinů během jejich samostatné produkce v savčích buňkách.

Minoritní strukturní proteiny polyomavirů VP2 a VP3 jsou ve virionech umístěny uvnitř virové částice, takže nejsou přístupny možným interakcím s buněčnými strukturami. V průběhu infekce však mohou nastat případy, kdy je významná část, nebo dokonce celý minoritní protein buněčným interakcím přístupný. Už během internalizace a pohybu viru buňkou v různých endozomálních kompartmentech může dojít (v důsledku interakce VP1 s receptorem a/nebo vlivem kyselého prostředí endozómu) k částečnému rozvolnění virionů a odkrytí částí molekul minoritních proteinů. Další příležitost pro interakce minoritních proteinů může nastat v ER během dosud nejasného mechanismu vstupu polyomavirového genomu do jádra. V další fázi virové infekce, po proteosyntéze, vstupují minoritní proteiny do buněčného jádra každý v komplexu s pěti molekulami hlavního strukturního proteinu VP1. Zatímco C-konec obou proteinů se nachází v centrální prohlubni pentameru VP1, N-koncová část by mohla být interakcím přístupná a to jak v průběhu transportu do buněčného jádra, tak i v jádře během morfogeneze virionu. Další prostor pro uplatnění VP2 a VP3 poskytuje velmi pozdní fáze infekce, kdy jsou strukturní proteiny hromaděny v buňkách ve velkých množstvích a během závěrečné buněčné destrukce. V naší laboratoři bylo nedávno zjištěno při samostatné expresi VP2 nebo VP3 myšího polyomaviru, že oba tyto proteiny jsou schopny velmi účinně navodit apoptózu buněk ve kterých se produkují (HUERFANO et al., zasláno do tisku). Přitom byla pozorována afinita obou proteinů k buněčným membránám (zvláště membrány jaderného obalu, ER a mitochondrii). V této práci jsme se snažili pomocí konfokální mikroskopie porovnat (v nepřítomnosti VP1) cílení minoritních proteinů myšího polyomaviru s lokalizací VP2 a VP3 lidského BK viru, které mají, tak jako všechny známé minoritní proteiny primátů, a na rozdíl od minoritních proteinů hlodavců, navíc C-koncovou bazickou, DNA vazebnou doménu (viz kap. II. 2.1). Zároveň jsme chtěli zjistit vliv typu buněk na vlastnosti proteinů VP2 a VP3 při heterologní expresi. Proto jsme BKV i myší minoritní proteiny produkovali jak v myších 3T3 fibroblastech, tak v opičích VERO buňkách. Protože produkce samotných strukturních proteinů polyomavirů z běžných promotorů je velmi nízká, využili jsme pro studium jejich EGFP fúzní varianty.

V. 2.1 Transfekce savčích buněk plazmidy pro produkci minoritních strukturních proteinů myšího a BK polyomaviru fúzaných s EGFP.

Opičí buňky VERO a myší buňky 3T3 (4 miliony buněk) byly transfekovány (kap. IV. 2.1.2.6) 6 µg plazmidové DNA nesoucí geny pro minoritní strukturní proteiny. Na všech plazmidech byly ke genům pro minoritní proteiny připojeny buď na 5'-konci nebo 3'-konci sekvence kódující EGFP (viz kap. IV. 1.8.). V čase 24 hodin po transfekci byly buňky fixovány. Imunofluorescencí byly detekovány příslušné minoritní proteiny. U každého transfekovaného konstruktů byla pozorována konfokální mikroskopií lokalizace minoritních proteinů v buňkách. V buňkách byly rovněž obarveny DNA (DAPI) a histon H1 nebo lamin B. Schéma transfekcí je uvedeno v Tab. V. 4. Některé transfekce byly provedeny spolupracovníky (uvedeno v tabulce V. 4).

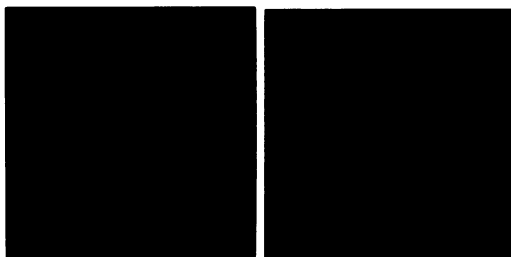
Virus	Buňky	Fúzní varianty minoritních proteinů	Provedeno
BKV	VERO	VP2- EGFP	M. Fraiberk
		EGFP-VP2	
		VP3-EGFP	
		EGFP-VP3	
	3T3	VP2 –EGFP	
		EGFP-VP2	
		VP3-EGFP	
		EGFP-VP3	
MPyV	VERO	VP2- EGFP	S. Huerfano, V. Zila
		EGFP-VP2	
		VP3-EGFP	
		EGFP-VP3	
	3T3	VP2 –EGFP	
		EGFP-VP2	
		VP3-EGFP	
		EGFP-VP3	

Tab V. 4:
Schéma transfekcí

Aby bylo možno posoudit, která z fúzních variant jednotlivých minoritních proteinů odráží vlastnosti wt minoritních proteinů (bez EGFP), byly již dříve učiněny pokusy získat jejich samostatnou produkci v savčích buňkách. Přes velmi nízkou účinnost exprese se podařilo jejich lokalizace v buňkách dokumentovat (S. Huerfano, V. Žila a M. Stančíková). Jako kontrola byl také v buňkách produkován samotný EGFP. Pro možnost srovnání uvádím tyto kontrolní výsledky, se souhlasem autorů zde, na Obr. V. 20 :

A

VERO buňky, EGFP



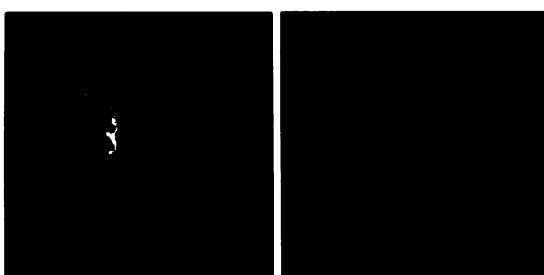
Histon H1, DAPI

Myší 3T6 fibroblasty, EGFP, DAPI



B

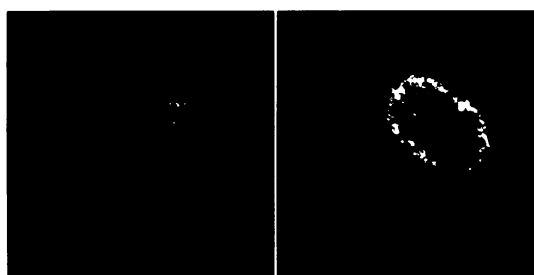
VERO buňky, BKV VP2, DAPI



Histon 1

Lamin B

VERO buňky, BKV VP3, DAPI



Histon 1

Lamin B

C

Myší 3T3 buňky, MPyV VP2



GRP 94 (ER)

Lamin B

Myší 3T3 buňky, MPyV VP3



GRP 94 (ER)

Lamin B

Obr. V. 20: Lokalizace EGFP produkovaného ve VERO a myších 3T3 buňkách (A) a nefúzovaných VP2 a VP3 BKV ve VERO (B) a MPyV v myších 3T3 buňkách (C).. Konfokální řez buňkami 24 hod. P.i. Laskavě poskytl S. Huerfano, M. Stančíková, V. Žíla

V. 2.1.1 Produkce fúzních variant strukturních proteinů BK viru: VP2–EGFP, EGFP–VP2 a VP3–EGFP, EGFP–VP3 ve VERO buňkách

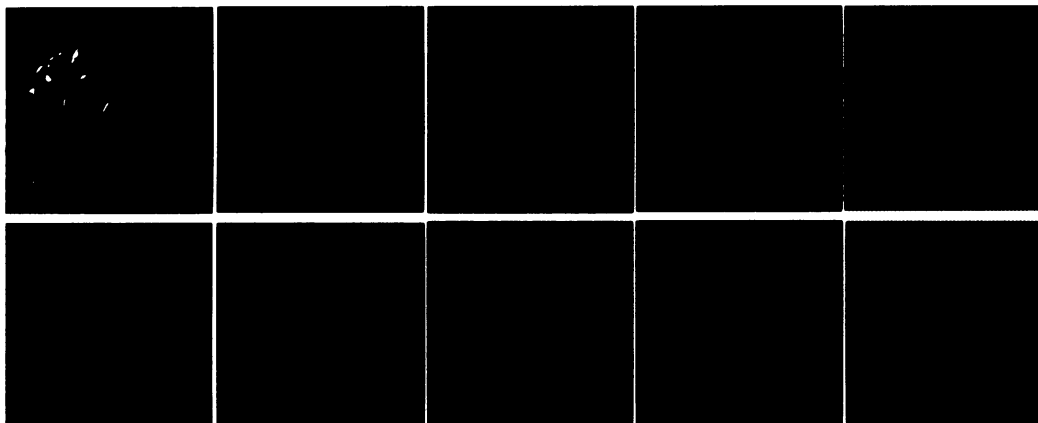
Nejprve jsme produkovali fúzní varianty VP2 proteinu lidského BK viru ve VERO buňkách (Obr. V. 21 -24).

Protein VP2 BK viru, spojený s EGFP na svém C–konci (VP2-EGFP), byl překvapivě cílen především do jadérek a částečně též do ostatního prostoru buněčného jádra. Srovnáme-li lokalizaci této fúzní varianty (Obr. V. 21, V.22) s lokalizací samotného VP2 (Obr. V. 20 B), je zřejmé, že cílení VP2–EGFP do jadérek je způsobeno fúzí obou proteinů, a že tedy tato fúzní varianta neodráží vlastnosti proteinu VP2. Ze srovnání je též zřejmé, že zatímco produkce nefúzovaného VP2 zjevně narušovala buněčné jádro, buňky produkující tuto fúzní variantu nejevily známky výrazného poškození.

Obr. V. 23 a V. 24 zobrazují VERO buňky produkující fúzní protein VP2 s proteinem EGFP fúzovaným k jeho N–konci (EGFP–VP2). EGFP–VP2 lokalizuje v buněčném jádře a, podobně jako VP2 samotný, výrazně poškozuje jadernou strukturu. Na Obr. V. 23 (dolní panel) je vidět poškození laminy, na Obr. V. 24 jsou zničené buňky s kondenzovanou DNA. Buňky produkující EGFP–VP2 se buď vůbec nebo jen slabě barvily protilátkou proti histonu H1 (na rozdíl od okolních netransfekovaných buněk). Většina buněk produkujících tento protein měla zakulacený tvar, řada buněk jevila známky apoptózy. Distribuce této fúzní varianty se v různých buňkách poněkud lišila, v jádrech některých buněk tvořil fúzní protein shluky (Obr. V. 23), v některých buňkách byl rozptýlen v celém prostoru jádra. Na rozdíl od předchozí fúzní varianty EGFP–VP2, podobně jako samotný VP2, nebyl cílen do jadérek.

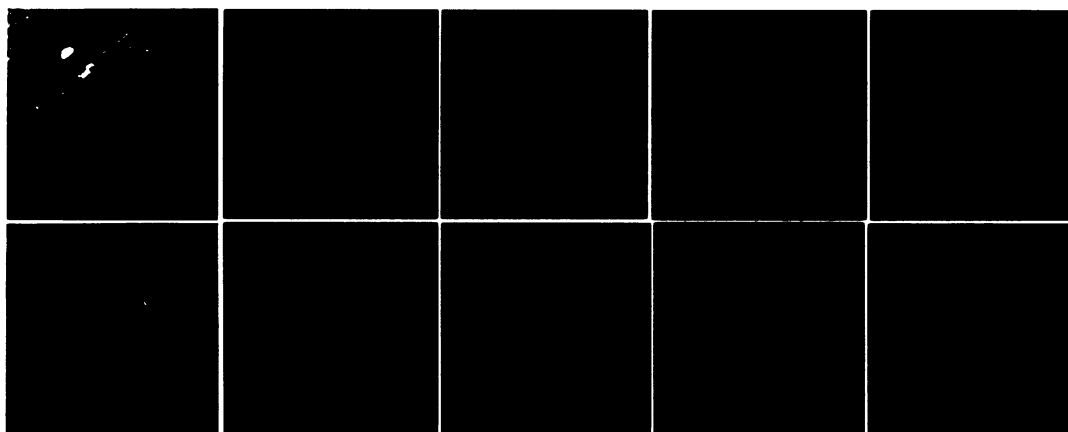
Pro úplnost uvádíme i výsledky konfokální analýzy fúzních variant proteinu VP3 BK viru provedené spolupracovníkem M. Fraiberkem (Obr. V. 25, 26). Podobně jako v případě VP2, varianta VP3–EGFP byla cílena do jadérek a neodrážela vlastnosti wt typu BKV VP3. U opačné varianty EGFP–VP3 byla pozorována výrazná kolokalizace s DNA (Obr. V. 26), stejně jako u samotného VP3 proteinu (Obr. V. 20, B, pravý panel). Jádra buněk byla produkcí EGFP–VP3 poškozena podobně jako při produkci samotného VP3 nebo EGFP–VP2. Tyto výsledky naznačují, že fúzní varianty EGFP–VP2 a EGFP–VP3 mají vlastnosti podobné wt VP2 nebo VP3 proteinu. Tento výsledek je velmi překvapivý, protože v případě minoritních proteinů myšího polyomaviru je tomu naopak, jako proteiny divokého typu se chovají varianty VP2–EGFP a VP3–EGFP (HUERFANO et al., manuskript zaslán do tisku).

VERO buňky / BKV VP2-EGFP / lamin B / DAPI



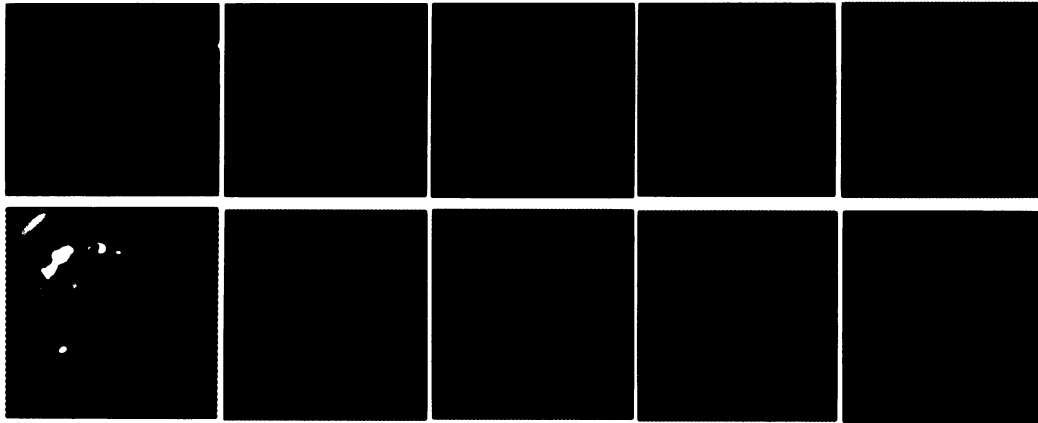
Obr. V. 21: Exprese VP2-EGFP ve VERO buňkách. Konfokální řez dvěma různými buňkami. Fixace 24 hod. po transfekci. VP2-EGFP zeleně, lamin B červeně, DNA modře. Použity protilátky: kozí proti laminu B, králičí proti společné části proteinů VP2 a VP3, sekundární oslí proti kozím imunoglobulinům konjugovaná s AF 546, kuřecí proti králičím imunoglobulinům konjugovaná s AF 488, nalevo kontrast Nomarského.

VERO buňky / BKV VP2 EGFP / histon H1 / DAPI



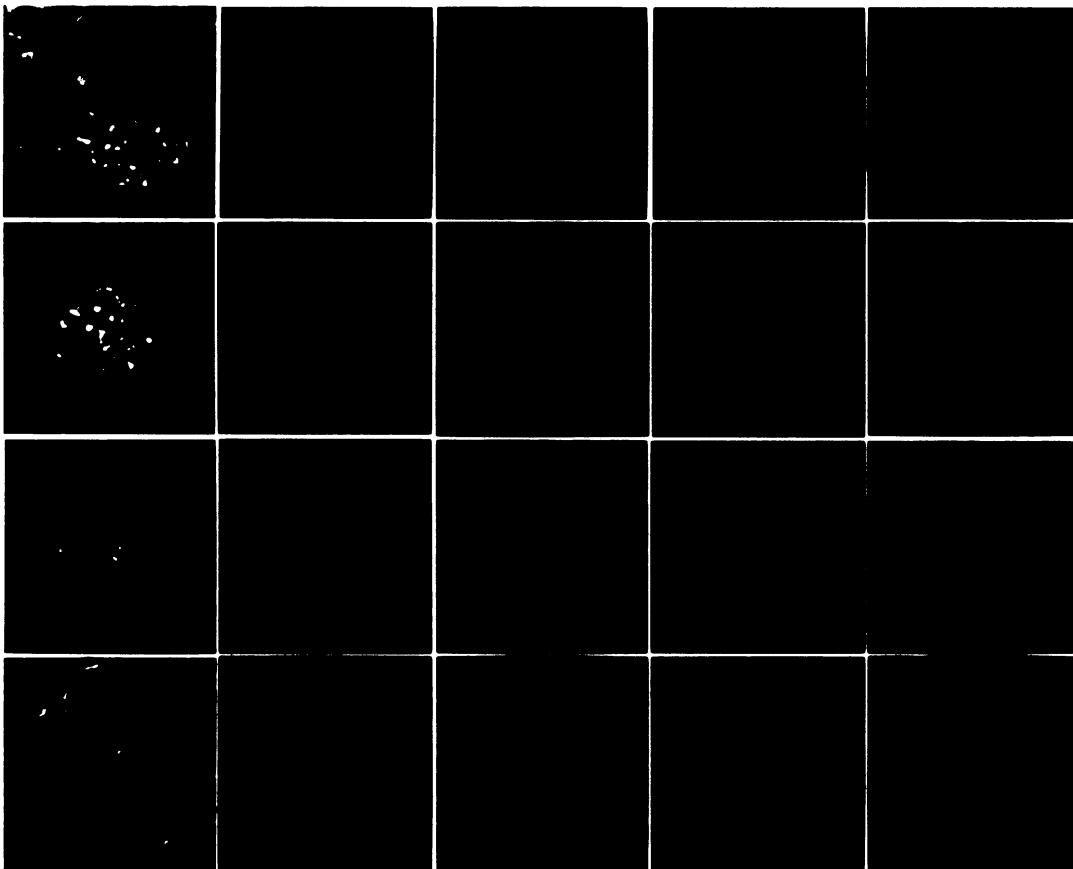
Obr. V. 22: Exprese VP2-EGFP ve VERO buňkách. Konfokální řez dvěma různými buňkami 24 hod. po transfekci. EGFP-VP2 zeleně, histon H1 červeně, DNA modře. Použity protilátky: myší proti histonu H1, králičí proti společné části proteinů VP2 a VP3, sekundární kuřecí proti králičím imunoglobulinům konjugovaná s AF 488 a oslí proti myším imunoglobulinům konjugovaná s AF 546, nalevo kontrast Nomarského.

VERO buňky / BKV EGFP VP2 / lamin B / DAPI



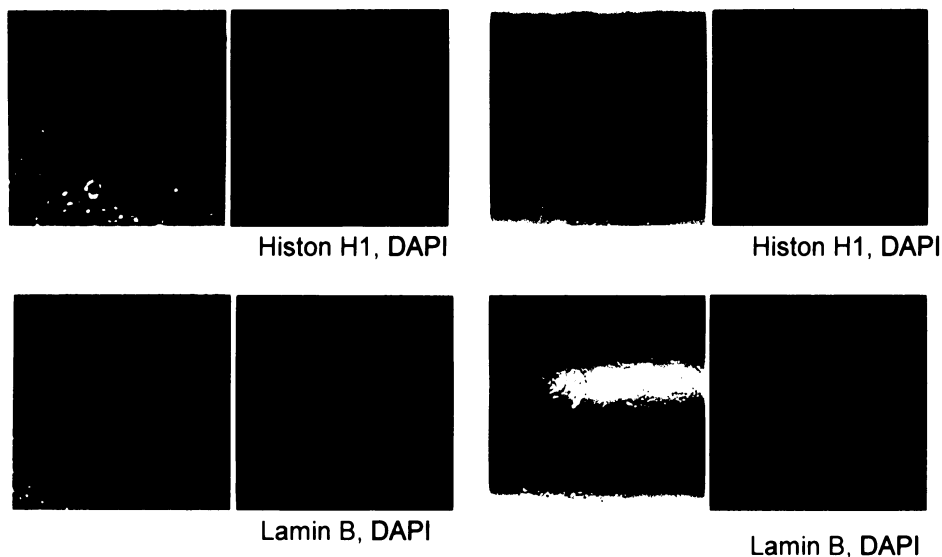
Obr. V. 23. Expres EGFP-VP2 ve VERO buňkách. Konfokální řez dvěma různými buňkami 24 hod. po transfekci. EGFP-VP2 zeleně, lamin B červeně, DNA modře. Použity protilátky: kozí proti laminu B, králičí proti společné části proteinů VP2 a VP3, sekundární oslí proti kozím imunoglobulinům konjugovaná s AF 546, kuřecí proti králičím imunoglobulinům konjugovaná s AF 488, nalevo kontrast Nomarského

VERO buňky/ BKV EGFP-VP2 / histon H1 / DAPI



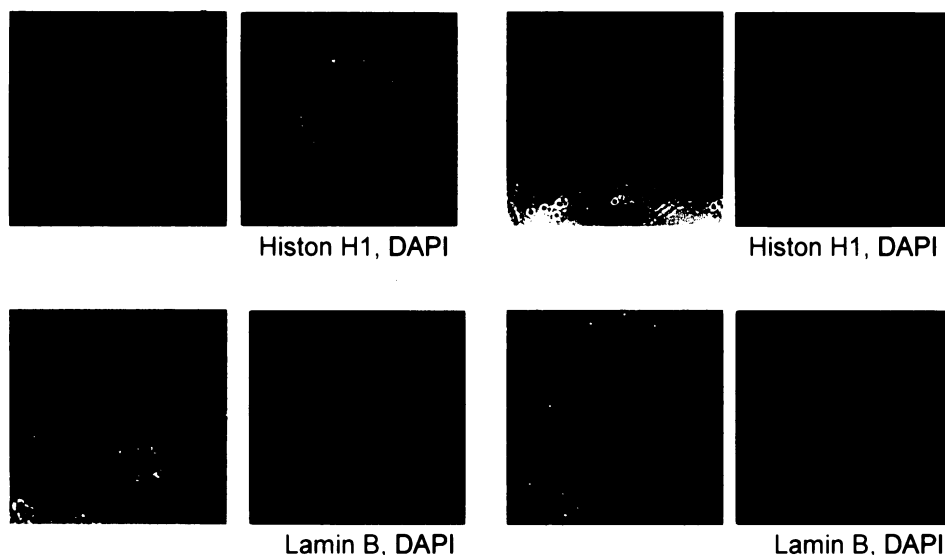
Obr. V. 24: Expres EGFP-VP2 ve VERO. Konfokální řezy různými buňkami 24 hod. po transfekci. EGFP-VP2 zeleně, Histon H1 červeně, DNA modře. Použity protilátky: myší proti histonu H1, králičí proti společné části proteinů VP2 a VP3, sekundární kuřecí proti králičím imunoglobulinům konjugovaná s AF 488 a oslí proti myším imunoglobulinům konjugovaná s AF 546, nalevo kontrast Nomarského.

VERO buňky / BKV VP3-EGFP



Obr. V. 25: Expresse VP3-EGFP ve VERO buňkách. Konfokální řez buňkami 24 hod. po transfekci. VP3-EGFP zeleně, lamin B červeně, Histon H1 červeně, DNA modře. Použity protilátky: myší proti histonu H1, králičí proti společné části proteinů VP2 a VP3, kozí proti laminu B, sekundární: kuřecí proti králičím imunoglobulinům konjugovaná s AF 488, oslí proti kozím imunoglobulinům konjugovaná s AF 546 a oslí proti myším imunoglobulinům konjugovaná s AF 546, nalevo kontrast Nomarského. Provedeno M. Fraiberkem

VERO buňky / BKV EGFP-VP3



Obr. V. 26: Expresse EGFP-VP3 ve VERO buňkách. Konfokální řez buňkami 24 hod. po transfekci. VP3-EGFP zeleně, lamin B červeně, histon H1 červeně, DNA modře. Použity protilátky: myší proti histonu H1, králičí proti společné části proteinů VP2 a VP3, kozí proti laminu B, sekundární: kuřecí proti králičím imunoglobulinům konjugovaná a AF 488, oslí proti kozím imunoglobulinům konjugovaná s AF 546 a oslí proti myším imunoglobulinům konjugovaná s AF 546, nalevo kontrast Nomarského. Provedeno M. Fraiberkem

V. 2.1.2 Produkce fúzních variant minoritních proteinů BK viru: VP2–EGFP, EGFP–VP2 a VP3–EGFP, EGFP–VP3 v 3T3 myších fibroblastech.

Abychom zjistili, zdali chování a lokalizace minoritních proteinů a pozorované rozdíly mezi minoritními proteiny myšího polyomaviru a BK viru nejsou dány typem buněk, přistoupili jsme k produkci těchto proteinů ve stejných buňkách (to jest k produkci variant fúzních proteinů BK viru v myších fibroblastech a variant minoritních proteinů MPyV v opičích VERO buňkách).

Na Obr. V. 27 a V. 28 je vidět, že VP2–EGFP se chová v myších fibroblastech podobně jako ve VERO buňkách a je cílen především do jadérek. Ani tyto buňky nejsou (24 hod. po transfekci) produkcí proteinu výrazně poškozeny.

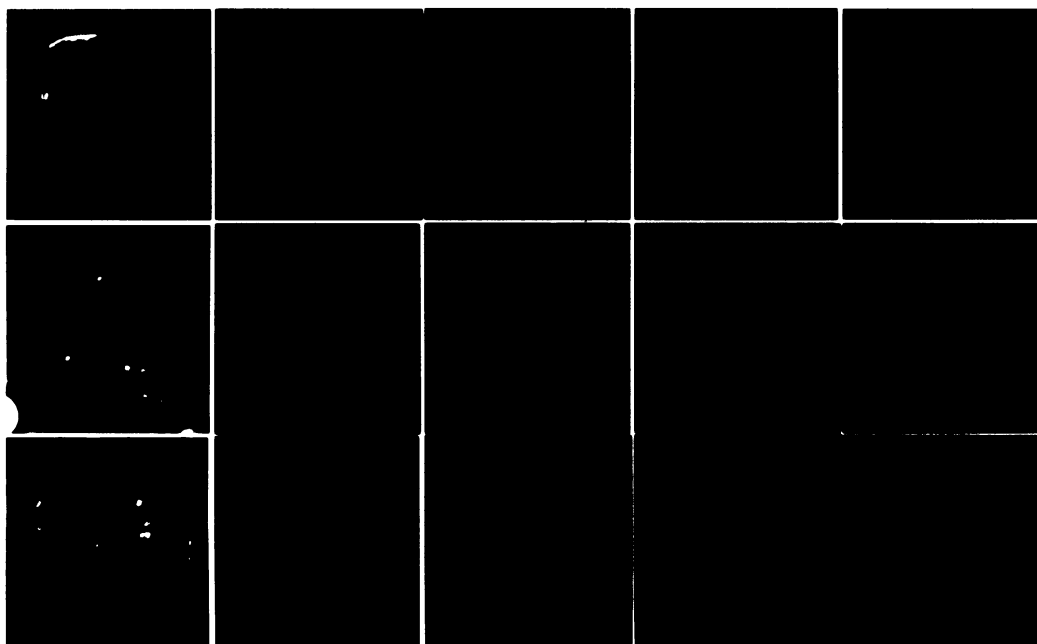
Opačná fúzní varianta EGFP–VP2 (Obr.V. 29 a V. 30) má v myších fibroblastech podobnou lokalizaci v buněčném jádře jako ve VERO buňkách.

Z tohoto pozorování vyplývá, že cílení fúzních variant VP2 a jejich cytotoxicita vychází z vlastností virových proteinů a není příliš ovlivněna typem buněk.

Na druhé straně, u proteinu VP3–EGFP jsme v myších 3T3 fibroblastech nepozorovali cílení do jadérek (Obr. V. 31) a v některých buňkách byla pozorována výrazná kolokalizace tohoto proteinu s histonem H1 (Obr. V. 32).

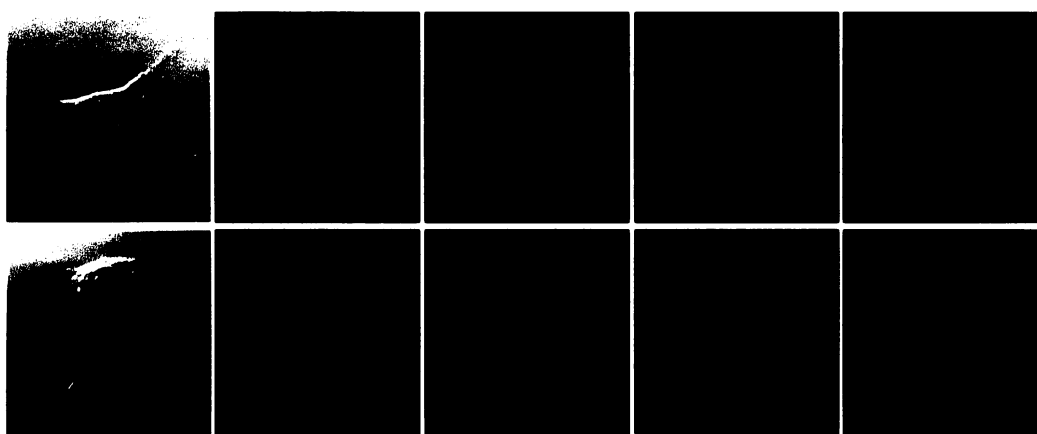
Fúzní varianta EGFP–VP3 je však i v myších 3T3 fibroblastech mnohem více cytotoxická než opačný fúzní konstrukt. Podobně jako wt VP3 kolokalizuje s histonem H1 (Obr. V. 34) a v některých buňkách i s DNA (Obr. V. 33).

3T3 buňky / BKV VP2-EGFP / lamin B / DAPI



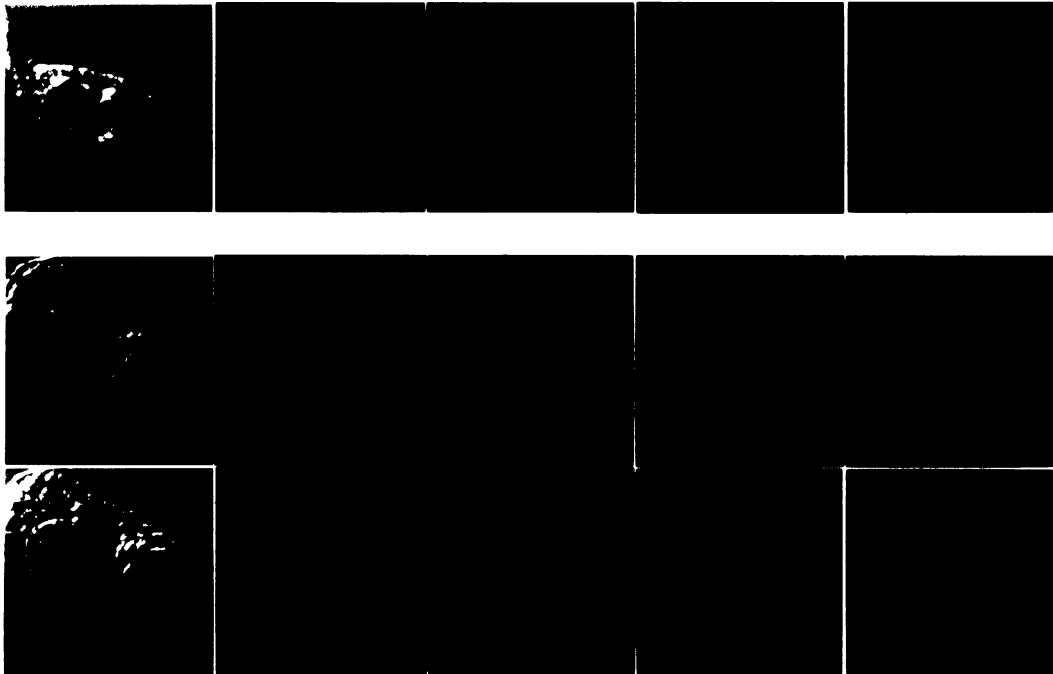
Obr. V. 27 Exprese BKV VP2-EGFP v myších 3T3 fibroblastech. Konfokální řezy 2 hod. po transfekci. VP2-EGFP zeleně, lamin B červeně, DNA modře. Použity protilátky: králičí proti společné části proteinů VP2 a VP3, kozí proti laminu B, sekundární: kuřecí proti králičím imunoglobulinům konjugovaná s AF 488, oslí proti kozím imunoglobulinům konjugovaná s AF546, nalevo kontrast Nomarského.

3T3 buňky / BKV VP2-EGFP / histon H1 / DAPI



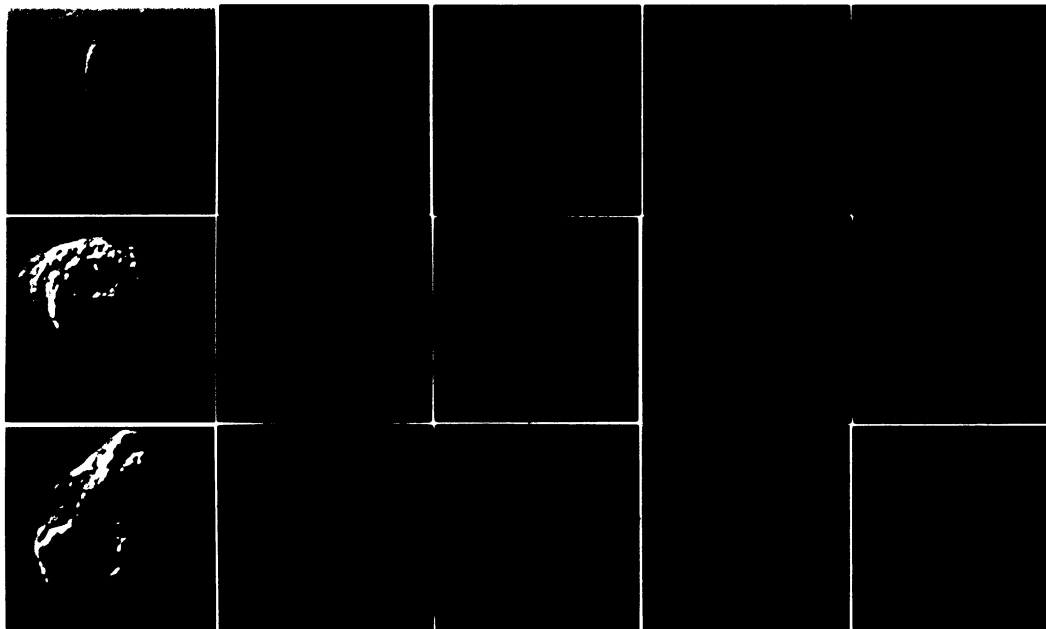
Obr. V. 28 Exprese BKV VP2-EGFP v myších 3T3 fibroblastech. Konfokální řezy 24 hod. po transfekci. VP2-EGFP zeleně, histon H1 červeně, DNA modře. Použity protilátky: myší proti histonu H1, králičí proti společné části proteinů VP2 a VP3, sekundární: kuřecí proti králičím imunoglobulinům konjugovaná a AF 488, oslí proti myším imunoglobulinům konjugovaná s AF 546, nalevo kontrast Nomarského.

3T3 buňky / BKV EGFP-VP2 / lamin B / DAPI



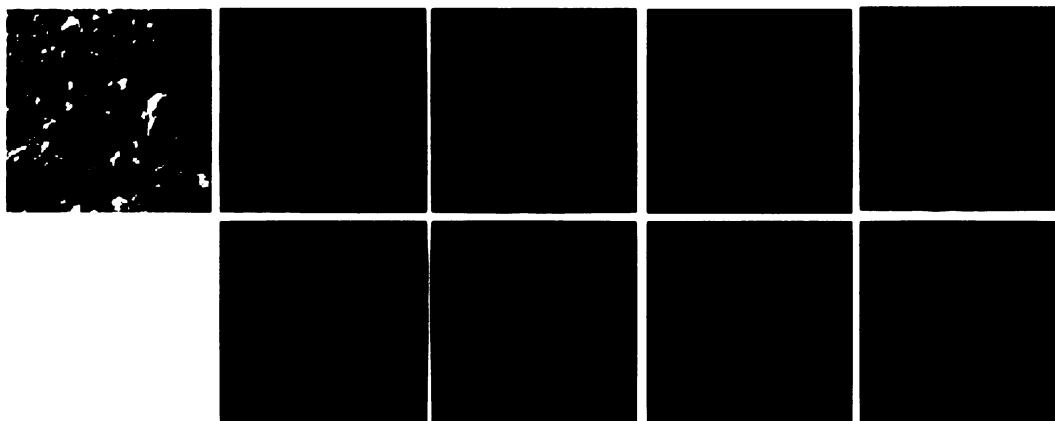
Obr. V. 29: Expres EGFP-VP2 v myších 3T3 fibroblastech 24 hod. po transfekci. EGFP-VP2 zeleně, lamin B červeně, DNA modře. A – konfokální řez buňkou; B – dva konfokální řezy stejnými buňkami. Použity protilátky: králičí proti společné části proteinů VP2 a VP3, kozí proti laminu B, sekundární: kuřecí proti králičím imunoglobulinům konjugovaná a AF 488, oslí proti kozím imunoglobulinům konjugovaná s AF 546, nalevo kontrast Nomarského.

3T3 buňky / BKV EGFP-VP2 / histon H1 / DAPI



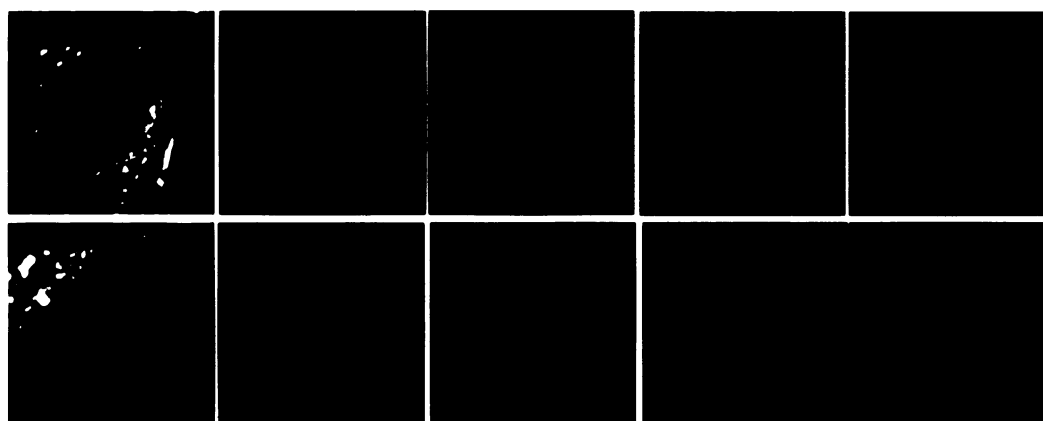
Obr. V. 30: Expese EGFP-VP2 v 3T3 buňkách. Konfokální řez třemi různými buňkami 24 hod. po transfekci. EGFP-VP2 zeleně, histon H1 červeně, DNA modře. Použity protilátky: myší proti histonu H1, králičí proti společné části proteinů VP2 a VP3, sekundární: kuřecí proti králičím imunoglobulinům konjugovaná s AF 488, oslí proti myším imunoglobulinům konjugovaná s AF 546, nalevo kontrast Nomarského.

3T3 buňky / BKV VP3-EGFP / lamin B / DAPI



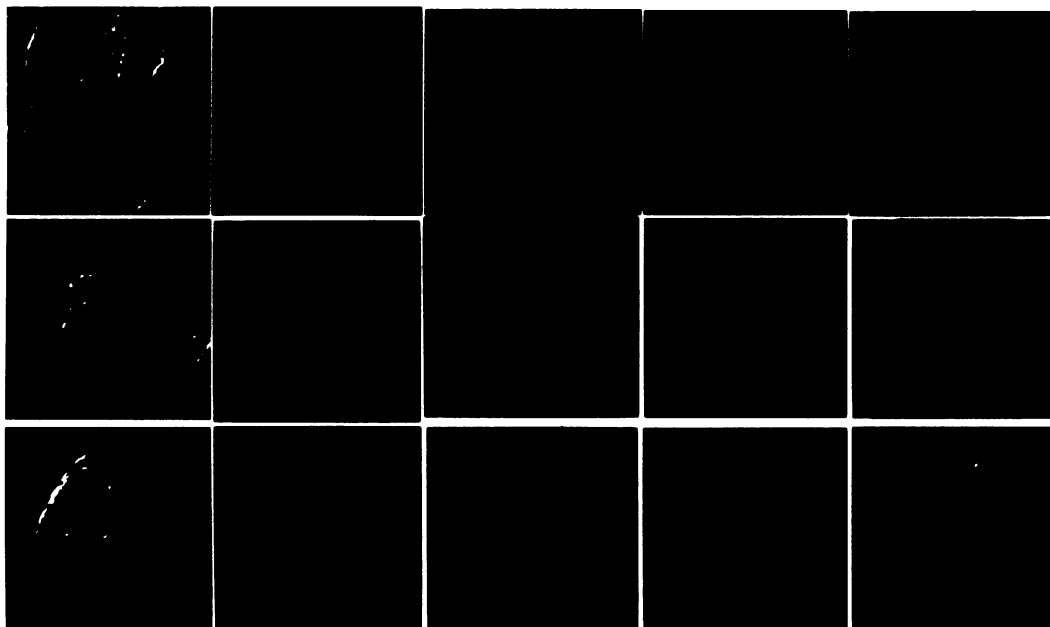
Obr. V. 31: Expres VP3-EGFP BK viru v 3T3 buňkách. Konfokální řez buňkou 24 hod. po transfekci. VP3-EGFP zeleně, lamin B červeně, DNA modře. Použity protilátky: králičí proti společné části proteinů VP2 a VP3, kozí proti laminu B, sekundární: kuřecí proti králičím imunoglobulinům konjugovaná s AF 488, oslí proti kozím imunoglobulinům konjugovaná s AF546, nalevo kontrast Nomarského.

3T3 buňky / BKV VP3-EGFP / Histon H1 / DAPI



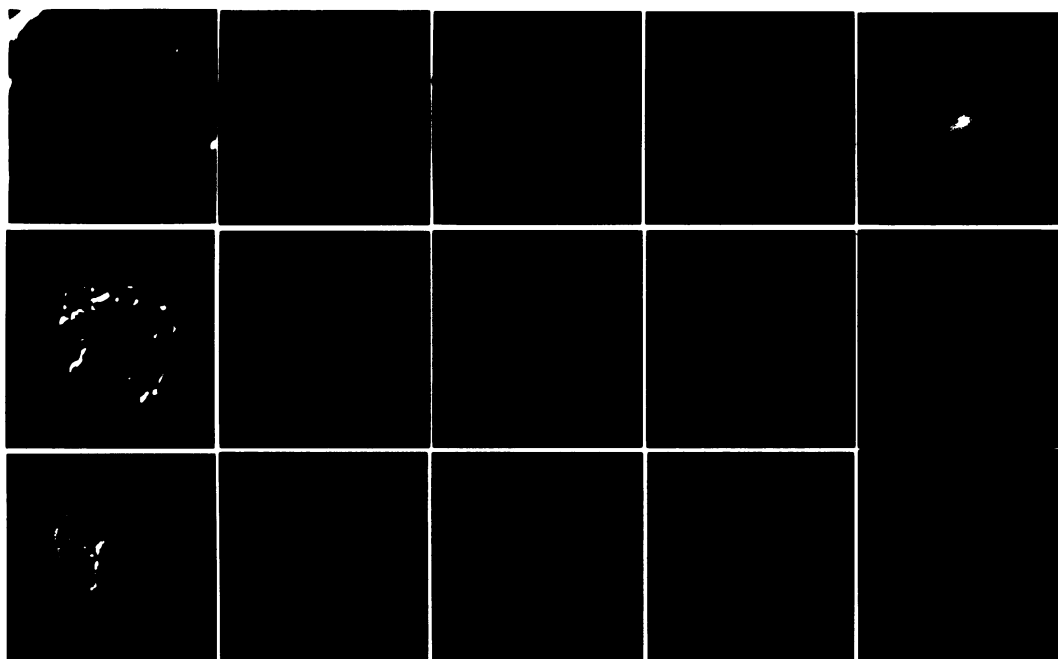
Obr. V. 32: Expres VP3-EGFP BK viru v 3T3 buňkách. Konfokální řez dvěma různými buňkami 24 hod. po transfekci. VP3-EGFP zeleně, histon H1 červeně, DNA modře. Použity protilátky: myší proti histonu H1, králičí proti společné části proteinů VP2 a VP3, sekundární: kuřecí proti králičím imunoglobulinům konjugovaná s AF 488, oslí proti myším imunoglobulinům konjugovaná s AF 546, nalevo kontrast Nomarského.

3T3 buňky / BKV EGFP-VP3 / lamin B / DAPI



Obr. V. 33: Expres EGFP-VP3 BK viru v 3T3 buňkách. Konfokální řez třemi různými buňkami 24 hod. po transfekci. EGFP-VP2 zeleně, lamin B červeně, DNA modře. Použity protilátky: králičí proti společné části proteinů VP2 a VP3, kozí proti laminu B, sekundární: kuřecí proti králičím imunoglobulinům konjugovaná s AF 488, oslí proti kozím imunoglobulinům konjugovaná s AF546, nalevo kontrast Nomarského.

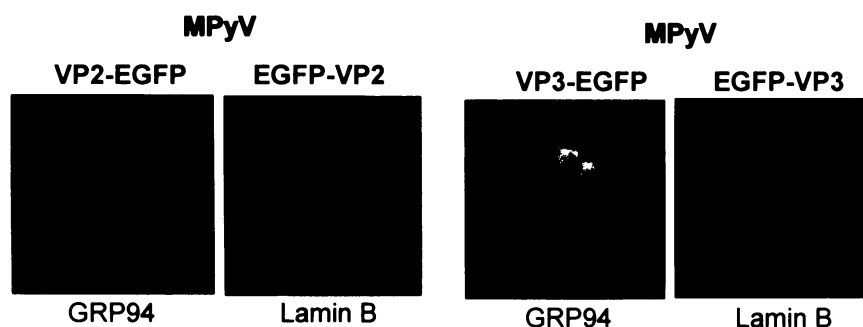
3T3 buňky / BKV EGFP-VP3 / Histon H1 / DAPI



Obr. V. 34: Exprese EGFP-VP3 v 3T3 buňkách. Konfokální řez třemi různými buňkami 24 hod. po transfekci. EGFP-VP3 zeleně, histon H1 červeně, DNA modře. Použity protilátky: myší proti histonu H1, králičí proti společné části proteinů VP2 a VP3, sekundární kuřecí proti králičím imunoglobulinům konjugovaná s AF 488, oslí proti myším imunoglobulinům konjugovaná s AF 546, nalevo kontrast Nomarského.

V. 2.1.3 Produkce fúzních minoritních proteinů myšího polyomaviru: VP2–EGFP a VP3–EGFP, EGFP–VP3 ve VERO buňkách.

Předchozí studium produkce a lokalizace minoritních strukturních proteinů myšího polyomaviru v myších 3T3 fibroblastech ukázalo, že část VP2 a zvláště pak VP3 se nachází v cytoplazmě asociovaná s vnitrobuněčnými membránami (Obr. V. 20 C). Oba proteiny byly velmi cytotoxické (HUERFANO, manuskript odeslán do tisku). Při produkci EGFP fúzních variant těchto proteinů měly tyto vlastnosti plně zachovány varianty VP2–EGFP a VP3–EGFP. Opačné varianty byly mnohem méně cytotoxické a jejich lokalizace byla převážně jaderná.



Obr. V. 35.: Lokalizace EGFP fúzních variant VP2 a VP3 myšího polyomaviru v myších 3T3 fibroblastech, 5 hod. po transfekci. Přejato z HUERFANO et al., manuskrip poslán do tisku

Chtěli jsme se přesvědčit, zda vlastnosti těchto proteinů a jejich rozdíly ve srovnání s minoritními proteiny BK viru zůstanou zachovány i při produkci ve VERO buňkách.

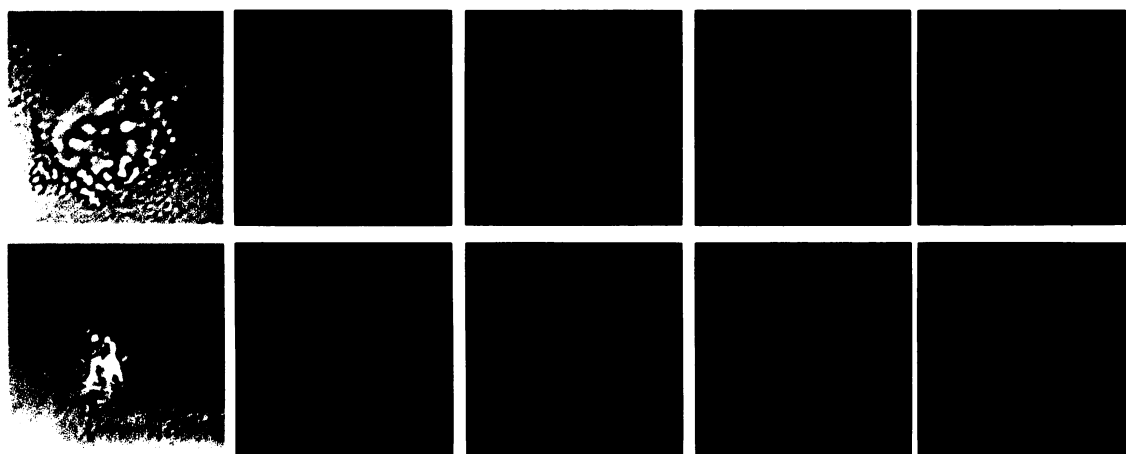
Obrázky V. 37 a V. 38 ukazují produkci VP3–EGFP ve VERO buňkách 24 hod. po transfekci. V souladu s výsledky výše uvedené práce velká část VP3–EGFP je lokalizována v cytoplazmě a i ve VERO buňkách se projevuje jejich silný cytotoxický efekt.

Opačná fúzní varianta EGFP–VP3 má i ve VERO buňkách převážně jadernou lokalizaci a indukce buněčné smrti je u této varianty zpomalena. Analýzy fúzních variant VP2 myšího polyomaviru ve VERO buňkách bude nutné opakovat v kratším čase po transfekci, neboť v čase 24 hod. po transfekci byly v podstatě všechny buňky produkující VP2–EGFP mrtvé.

Výsledky analýzy ukazují výrazné rozdíly ve vlastnostech strukturních minoritních proteinů VP2 a VP3 myšího polyomaviru a BK viru. Jsou-li VP2 a VP3 myšího polyomaviru produkovány bez proteinu VP1, mají vysokou afinitu k vnitrobuněčným membránám, zatímco VP2 a VP3 BK viru jsou téměř výlučně lokalizovány v buněčném jádře. Zajímavé zjištění je, že zatímco vlastnosti VP2 a VP3 myšího polyomaviru sdílejí fúzní proteiny, ve kterých je EGFP připojen k jejich C–koncům, u VP2 a VP3 lidského

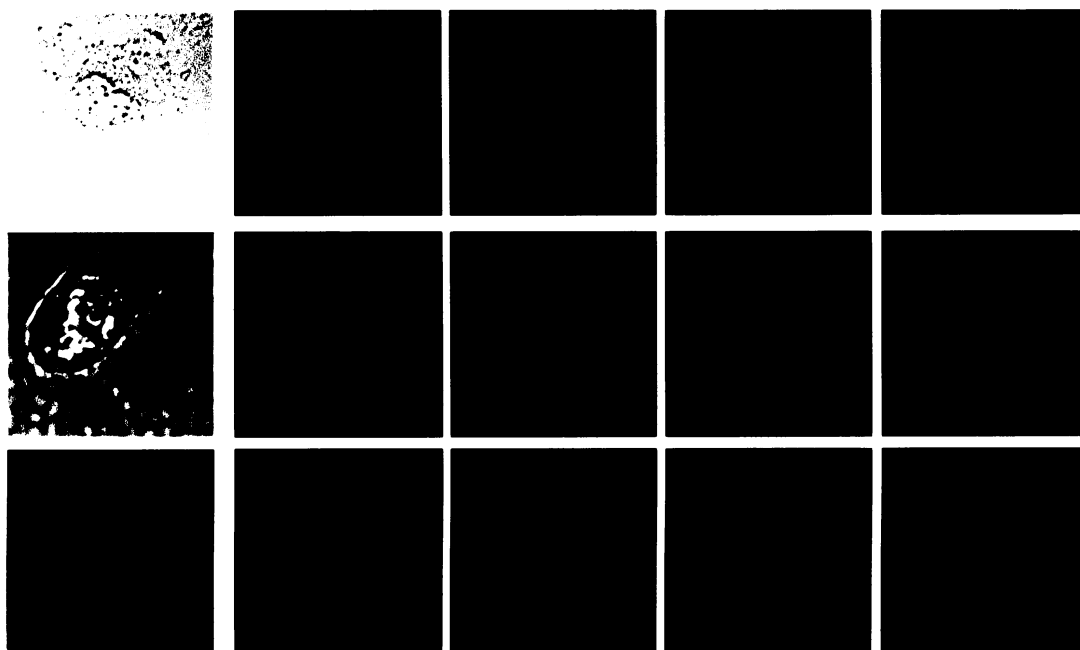
viru BK se podobně jako divoký typ chovají opačné fúzní varianty (EGFP–VP2,EGFP–VP3).

VERO buňky / MPyV VP2 EGFP / Histon H1 / DAPI



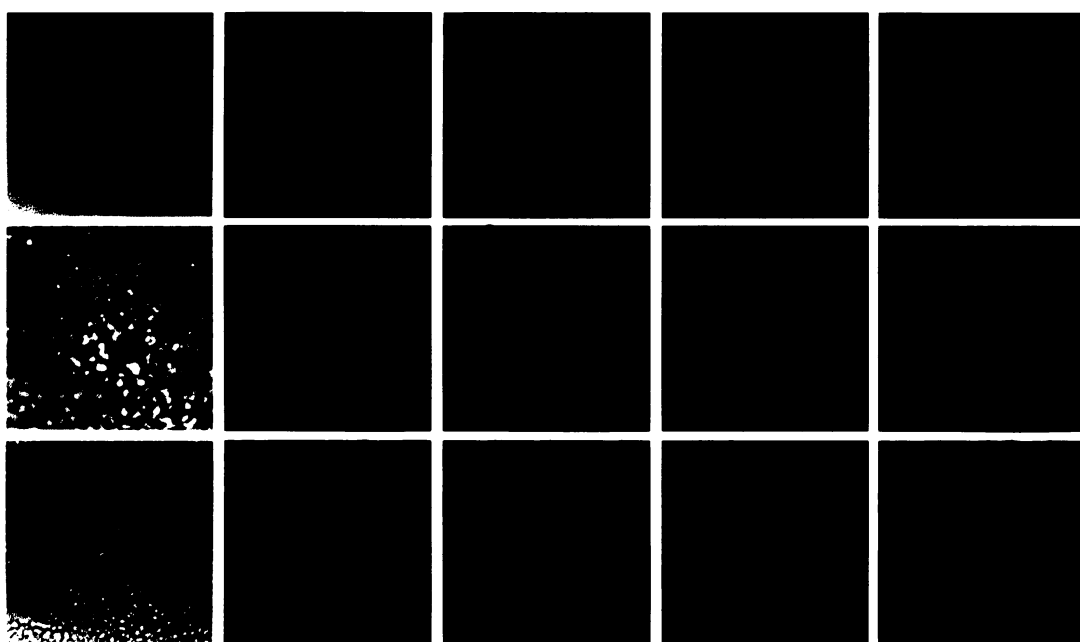
Obr. V. 36: Expresse myšího VP2–EGFP ve VERO buňkách. Konfokální řez dvěma různými buňkami 24 hod. po transfekci. VP2–EGFP zeleně, histon H1 červeně, DNA modře. Použity protilátky: myší proti histonu H1, králičí proti EGFP konjugovaná s AF 488, oslí proti myším imunoglobulinům konjugovaná s AF 546, vlevo kontrast Nomarského

VERO buňky / MPyV VP3-EGFP / laminB / DAPI



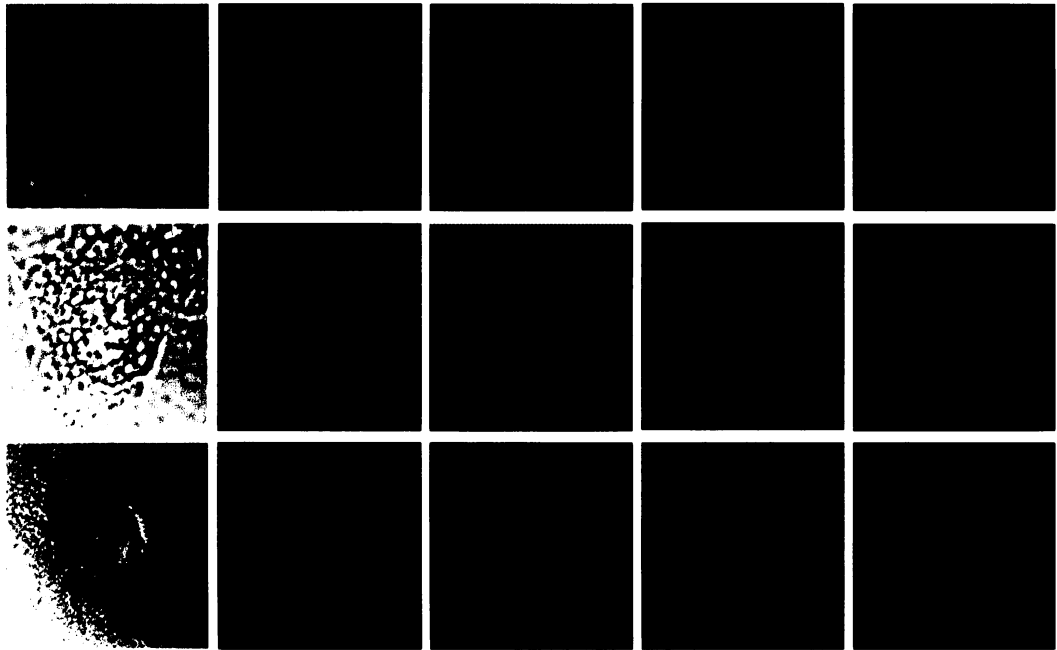
Obr. V. 37: Expres VP3-EGFP myšího polyomaviru ve VERO buňkách. Konfokální řez třemi různými buňkami 24 hod. po transfekci. VP3-EGFP zeleně, lamin B červeně, DNA modře. Použity protilátky: kozí proti laminu B, oslí proti kozím imunoglobulinům konjugovaná s AF 546, králičí proti EGFP konjugovaná s AF 488

VERO buňky / MPyV VP3-EGFP / Histon H1 / DAPI



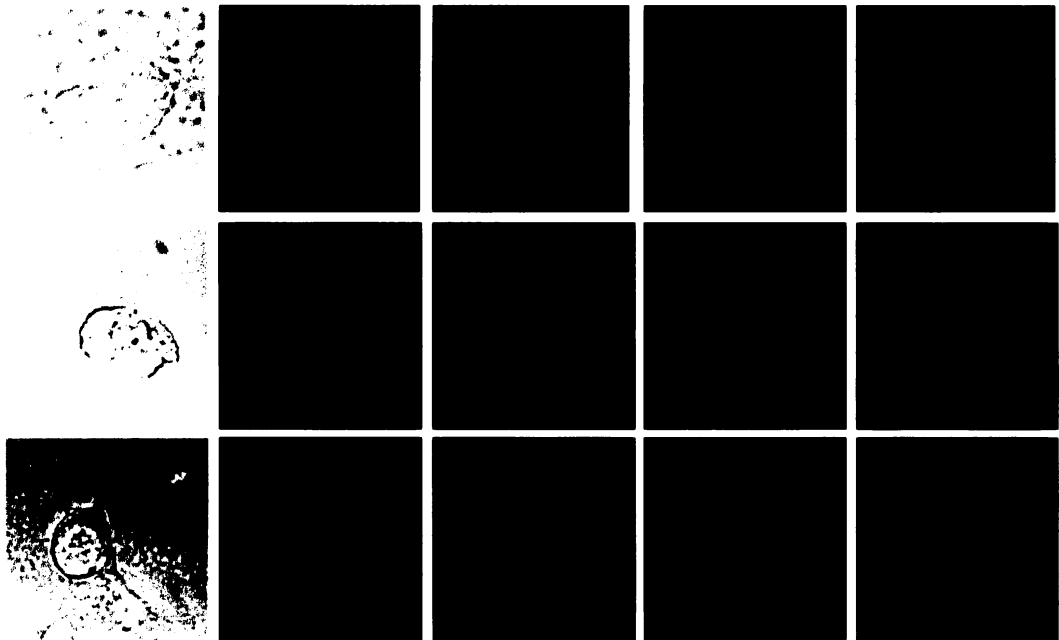
Obr. V. 38: Expres VP3-EGFP myšího polyomaviru ve VERO buňkách. Konfokální řez třemi různými buňkami 24 hod. po transfekci. VP3-EGFP zeleně, histon H1 červeně, DNA modře. Použity protilátky: myší proti histonu H1, králičí proti EGFP konjugovaná s AF 488, oslí proti myším imunoglobulinům konjugovaná s AF 546, vlevo kontrast Nomarského

VERO buňky / MPyV EGFP-VP3 / lamin B / DAPI



Obr. V. 39: Exprese EGFP-VP3 ve VERO buňkách. Konfokální řez třemi různými buňkami 24 hod. po transfekci. EGFP-VP3 zeleně, lamin červeně, DNA modře. Použity protilátky: kozí proti laminu B, oslí proti kozím imunoglobulinům konjugovaná s AF 546, králičí proti EGFP konjugovaná s AF 488, vlevo kontrast Nomarského

VERO buňky / MPyV EGFP-VP3 / Histon H1 / DAPI



Obr. V. 40: Exprese EGFP-VP3 ve VERO buňkách. Konfokální řez třemi různými buňkami 24 hod. po transfekci. EGFP-VP3 zeleně, histon H1 červeně, DNA modře. Použité protilátky: myší proti histonu H1, králičí proti EGFP konjugovaná s AF 488, oslí proti myším imunoglobulinům konjugovaná s AF 546, vlevo kontrast Nomarského

VI.

Diskuze

Tato diplomová práce měla za cíl přispět k poznání vlastností minoritních strukturních proteinů polyomavirů, které by vedly k odhalení jejich funkcí.

Přestože minoritní strukturní proteiny VP2 a VP3 byly a jsou studovány v řadě laboratoří, jejich funkce v replikačním cyklu viru není jasná. Přítomnost nebo nepřítomnost jednoho nebo druhého proteinu ve virionech vede ke ztrátě infekivity a takové viriony mají zřejmě problém dopravit genomy do buněčného jádra.

V této práci jsme chtěli využít VLPs složených z VP1 nebo obsahujících jeden z minoritních proteinů, abychom zjistili, zdali tyto částice budou působit jako kompetitivní inhibitory virové infekce. Pokud by umělé virové částice, obsahující některý z minoritních proteinů, přidány ve velkém přebytku k infekčním virionům, ovlivňovaly hladinu virové infekce jinak než VLPs složené pouze z VP1, ukazovalo by to na možnou účast minoritních proteinů v interakcích v průběhu adsorpce, internalizace či následného pohybu k buněčnému jádru.

VI. 1 Izolace pseudokapsid a provedení kompetičních testů

Bakuloviry pro produkci VLPs všech tří typů v hmyzích buňkách byly připraveny v naší laboratoři již dříve (FORSTOVÁ et al., 1993; RICHTEROVÁ dipl. práce, 1996).

VI. 1.1 Příprava pseudokapsid VP1, VP1/VP2, VP1/VP3

Při izolaci VLPs z hmyzích buněk ultracentrifugací v CsCl gradientu jsme získali dvě frakce pseudokapsid – „prázdné“ a „plné“, které nesespecificky enkapsidovaly různě velké fragmenty DNA, případně i s histony hmyzích buněk. Protože RICHTEROVÁ et al., (2001) nepozorovali při analýze pohybu VLPs buňkou rozdíly mezi plnými a prázdnými VLPs, neseparovali jsme tyto dvě frakce, jak je patrné např. z obrázku V. 7. V preparaci VP1 VLPs jsme také pozorovali menší útvary, pravděpodobně kapsidy s oktaedrální symetrií (SALUNKE et al., 1989). Koncentrace pseudokapsid na obr. V. 7.B je vhodnější pro další práci, protože v původní koncentrované preparaci by mohly vznikat těžko rozdělitelné agregáty.

Pseudokapsidy s inkorporovanými minoritními proteiny byly produkovány v bakulovirových expresních systémech nejprve koinfekcí hmyzích buněk rekombinantními bakuloviry nesoucími geny pro jednotlivé virové proteiny (FORSTOVÁ et al., 1993), později také přímou reakcí pentamer s minoritními proteiny (RICHTEROVÁ dipl. práce, 1996). Účinnost inkorporace byla ale v obou případech nízká. Nakonec byl pro přípravu použit expresní

system, ve kterém jsou geny pro VP1 a jeden z minoritních proteinů nesený jedním rekombinantním bakulovirem, každý pod jiným silným bakulovirovým pozdním promotorem. Lyzáty hmyzích buněk jsme nejprve centrifugovali přes sacharózový polštář, abychom odstranili nesložené proteiny, takže v CsCl gradientu se VP1 a minoritní protein nacházely v nejvyšší koncentraci ve frakcích, kde byly očekávány kapsidové struktury (Obr. V. 13.B a V. 14.B). Analýza VP1/VP2 VLPs potvrdila přítomnost obou proteinů ve VLPs preparaci. Výsledky barvení gelu Coomassie Blue i imunodetekce minoritních proteinů (Obr. V. 15, V. 16) odhalily v preparaci VLPs navíc přítomnost proteinu, který velikostí neodpovídá ani jednomu z minoritních proteinů. Reakce specifické protilátky napovídá, že se jedná pravděpodobně o degradační produkt proteinu VP2. Mimo to bylo na gelu patrné malé množství proteinu velikostí odpovídající proteinu VP3, který interagoval se specifickou protilátkou (Obr. V. 15). V bakulovirovém expresním systému jsou zřejmě příležitostně překládány i proteiny z vnitřních iniciačních kodónů (BATT et al., 1994, ŘÍPOVÁ dipl. práce, 2002). VP1/VP2 VLPs se nám podařilo připravit převážně prázdné a pravidelné (Obr. V. 17.A), v preparaci pseudokapsid VP1/VP3 bylo mnoho VLPs s enkapsidovanou DNA, často jsme pozorovali méně pravidelné, nebo dokonce tubulární útvary (Obr. V. 17 B). Tyto „rod like structure“, jsou nicméně běžné při produkci pseudokapsid nejen v bakulovirovém expresním systému, ale i v preparacích infekčních virionů.

Jak elektroforetické, tak elektronmikroskopické analýzy prokázaly, že jsme připravili téměř homogenní preparace všech tří typů VLPs.

VI. 1.2 Testy kompetitivní inhibice

Míra kompetice VLPs s infekčními viriony byla zjišťována porovnáním infekivity samotných virionů s infektivitou stejného množství virionů, ke kterým byly přidávány vzrůstající koncentrace VLPs různých typů. Infektivita byla měřena počtem buněk produkujících virový velký T antigen 24 hod. p.i. Přebytky VLPs (1, 10, 100 až 1000 násobné) byly vztahovány k hemaglutinačnímu titru použitého viru. Tím jsme zohlednili skutečnost, že rozdíl mezi infekčním a hemaglutinačním titrem polyomaviru se pohybuje mezi $10^2 - 10^3$. První test jsme prováděli počítáním buněk v zorných polích fluorescenčního mikroskopu. Rozptyl v poměru infikovaných a neinfikovaných buněk byl značný, avšak nevykazoval žádný trend se zvyšujícím se množstvím přidávaných VLPs. Abychom zvýšili statistickou relevanci výsledků, využili jsme skutečnosti, že na fakultu byl zakoupen

průtokový cytometr LSRII, s jehož pomocí lze v krátkém čase zanalyzovat desetitisíce fluorescenčních signálů. Tato metoda nebyla pro podobné účely při studiu polyomaviru dosud použita a bylo jí tedy nutné nejprve optimalizovat.

K našemu překvapení téměř všechny naměřené hodnoty infekivity inokul obsahujících VLPs byly vyšší než infekivita samotného viru (graf V. 2). Navíc v případě inokul obsahujících VP1 VLPs je při jedné koncentraci velký rozdíl mezi paralelami. Přesto ze získaných výsledků můžeme uzavřít, že ke kompetitivní inhibici nedochází. Pro ověření a kvalitní statistické vyhodnocení bude nutné přidat další experimenty.

Naše výsledky jsme porovnávali s výsledky AN et al., (1999). Tito autoři použili stejné typy VLPs v přebytku 10x a provedli třikrát analýzu imunofluorescencí, při níž počítali celkem 600 buněk (infekčních i neinfekčních) v jednom pokusu. VP1 a VP1/VP3 VLPs mírně snížily míru infekivity, VP1/VP2 snížily infekivitu zhruba na polovinu. Zásadní rozpor tedy je v míře infekivity viru v přítomnosti VLPs VP1/VP2. Dle ústního sdělení jiné laboratoře, (M. PAWLITA, Heidelberg) v jejich pokusech se, podobně jako v našich, ani jeden ze tří typů VLPs neprojevoval jako kompetitivní inhibitor virové infekce.

Jedním z vysvětlení těchto rozporů je možnost inkorporace různého množství minoritních proteinů zabudovaných v pseudokapsidách. CHEN et al., (1998) popsali ideální poměr proteinů VP1 a součtu obou minoritních proteinů 5:1. Reálně je poměr majoritních a minoritních proteinů ovlivněn enkapsidovanou DNA, použitým expresním systémem, časem izolace atd. (GILLOCK et al., 1997). V práci AN a kolegů VLPs také enkapsidovaly DNA, přičemž množství enkapsidované DNA mohlo být značně odlišné od naší preparace.

Momentálně není možné určit, jestli pseudokapsidy míru infekivity zvyšují (naše práce), snižují (AN et al., 1999), nebo nemají žádný vliv (PAWLITA et al., 1997).

Je možné, že by se interakce VP2 nemusela projevit při použití VLPs i kdyby u nativních virionů existovala, protože konformační stavy a možnost konformačních změn může být odlišná u virionů obsahujících nucleocore od VLPs prázdných, nebo obsahujících jen fragmenty DNA. Při elektronové tomografii bylo pozorováno, že viriony mají dokonalý izometrický tvar, zatímco VLPs připomínají tvarem ne zcela nafouknutý míč (LIEBL, nepublikované výsledky). Navíc některé monoklonální protilátky proti VP1 proteinu získané v naší laboratoři (MORÁVKOVÁ dipl. práce, 2001) interagovaly výrazně silněji s pseudokapsidami než s infekčními viriony a naopak.

Další možností je, že by VLPs jako kompetitivní inhibitory nepůsobily, protože putují jinou drahou než infekční viriony, i když konfokální a elektronmikroskopická analýza takové rozdíly nedetekovala (RICHTEROVÁ et al., 2001).

Virové proteiny produkované v hmyzích buňkách rekombinantními bakuloviry jsou upravovány posttranslačně poněkud jinak než v přirozených hostitelích. Přítomnost proteinu VP2 tak ovlivňuje posttranslační úpravy proteinu VP1 při koexpresi v hmyzích buňkách (FORSTOVÁ et al., 1993, LI et al., 1995). Teoreticky by tedy mohly mít námi produkované VLPs jinou konformaci např. kvůli rozdílné fosforylaci proteinu VP1 a to by mohlo ovlivnit i konformační změny vedoucí k zpřístupnění minoritních proteinů interakcím.

Zajímavou zůstává možnost, že by přítomnost VLPs (s minoritními proteiny) zvyšovala míru infekce. Přebytek VLPs by mohl zahltnout obranné systémy buňky, nebo narušit některé důležité transportní dráhy. VLPs by tedy mohly narušovat aktinový kortex pod plazmatickou membránou a umožnit vstup dalším infekčním virionům. Navíc, internalizace virových částic je spojena se aktivací tyrozinových kináz. Aktivace těchto drah VLPs by mohla vytvořit příznivější podmínky pro produktivní transport viru.

VI. 2 Exprese strukturních minoritních proteinů BKV a MPyV fúzaných s EGFP v myších a opičích buňkách

V této práci jsme dále sledovali vlastnosti strukturních minoritních proteinů lidského BK viru a myšího polyomaviru tranzientně produkovaných v savčích buňkách bez přítomnosti VP1 proteinu a jakýchkoliv jiných virových komponent, abychom postihli jejich vlastnosti. Všechny tři strukturní proteiny jsou cytotoxické a není možné vytvořit stabilní buněčnou linii s jejich konstitutivní produkcí. Selhaly i pokusy vytvořit buňky s jejich indukibilní expresí (vzhledem k neúplnému zablokování jejich exprese). Bohužel, ukázalo se že i tranzientní exprese VP2 nebo VP3 je velmi nízká. Použití trichostatinu, inhibitoru histon deacetyláz, expresi nezvýšilo. Tímto problémem se zabývá v naší laboratoři S. Huerfano a kolegové (manuskript odeslán do tisku). Předpokládá se, že problém s nízkou produkcí proteinu představuje virová mRNA, která může být nestabilní, ať už v jádře, nebo v cytoplazmě. Narušen může být také transport mRNA přes jaderné póry, nebo může být inhibována

translace v důsledku nedostatečně pevné vazby tRNA na mRNA, což může být vyřešeno překódováním, jak bylo ukázáno u papilomavirů (ZHOU et al., 1999).

V naší laboratoři byly dříve připraveny konstrukty pro produkci minoritních proteinů myšího i BK polyomaviru fúzovaných na N-konci nebo C-konci s EGFP (E. BOUŘA, V.ŽÍLA, K. PODOLSKÁ, L. KLÍMOVÁ, M. STANČÍKOVÁ). Takovéto proteiny byly tranzientně produkovány s uspokojivou účinností.

V několika buňkách byly samotné minoritní proteiny přesto produkovány a my jsme tedy mohli porovnat vlastnosti fúzních variant a samotných proteinů (kap V. 2.1). HUERFANO et al., (manuskript odeslán do tisku), zkoumali lokalizaci a cytotoxické vlastnosti fúzních variant VP2 a VP3 během tranzientní produkce v myších fibroblastech. Zjistili, že varianty, ve kterých byl EGFP připojen k C-konci minoritních proteinů měly vlastnosti podobné nefúzovaným VP2 a VP3. Zabíjely buňky, v kterých byly exprimovány rychlou indukcí apoptózy. Přestože oba proteiny mají jaderný lokalizační signál, jak VP2 a VP3, tak i zmíněné fúzní varianty byly často lokalizovány na vnitrobuněčných membránách. Opačně orientované fúzní varianty EGFP-VP2 a EGFP-VP3 byly mnohem méně cytotoxické, jejich afinita k membránám byla výrazně snížena a lokalizace v buňce byla převážně jaderná.

V této práci jsme chtěli studovat vlastnosti minoritních proteinů BK viru a porovnat je s vlastnostmi VP2 a VP3 myšího polyomaviru. Jak bylo již uvedeno v kap. II. 2.1, minoritní proteiny primátích polyomavirů mají na C-konci navíc asi třicet aminokyselin, které jsou odpovědné za jejich schopnost vázat nespecificky DNA (CLEVER et al., 1993). Minoritní proteiny hlodavčích polyomavirů DNA vazebnou schopnost nemají.

Konfokální analýza obou fúzních variant VP2 a VP3 BKV přinesla překvapení. Připojení EGFP na jejich C-konec způsobilo jejich atypickou lokalizaci. Ve většině buněk byly tyto proteiny cíleny převážně do jadérek a nevykazovaly výrazné známky cytotoxicity. Naopak připojení EGFP k jejich N-konci dalo vznik proteinům, jejichž lokalizace i míra toxicity více odrážela vlastnosti nefúzovaných virových produktů. Další pozorovaný rozdíl mezi BK a MPy VP2, VP3 byl v tom, že ani přirozené formy ani žádná z fúzních variant BKV VP2 a VP3 neměla výraznější cytoplazmatickou lokalizaci. Jak u nefúzních variant, tak EGFP-VP2 nebo VP3 byla, v souladu s očekáváním, pozorována kolokalizace s DNA.

Abychom se ujistili, že pozorované rozdíly mezi minoritními proteiny obou virů nejsou způsobeny typem buněk ve kterých byly fúzní varianty produkovány (myší 3T3 fibroblasty

pro MPyV a opičí epitelální buňky VERO pro BKV), provedli jsme analýzu chování minoritních proteinů obou virů v obou typech buněk. Rozdíly mezi BKV a MPyV minoritními proteiny se shodně potvrdily v obou typech buněk, jediným pozorovatelným rozdílem bylo, že fúzní varianta VP3-EGFP BKV se vyskytovala v jadérkách pouze ve VERO buňkách, nikoli v myších fibroblastech.

U proteinů fúzových s EGFP se často stává, že jedna varianta funguje jako nefúzovaný přirozený protein, zatímco opačná varianta funguje jako dominantně negativní mutanta. V tomto případě u příbuzných proteinů si vlastnosti přirozeného proteinu udržuje vždy opačná fúzní varianta. Obecně bylo pozorováno, že více proteinů si zachovává přirozené cílení uvnitř buňky, je-li EGFP připojen k jejich C-konci (PALMER and FREEMAN 2004). Je možné, že cílení BKV VP2 a VP3 je ovlivněno právě aditivní C-koncovou DNA vazebnou doménou. Ta může též posilovat jaderný lokalizační signál. Proto cílení do jádra u těchto proteinů může být účinnější než je tomu u odpovídajících proteinů myšího polyomaviru a proto také EGFP přidané do bezprostřední blízkosti za tuto doménu by mohlo interferovat s přirozeným chováním těchto proteinů.

V této aditivní C-koncové doméně minoritních proteinů primátích polyomavirů se nachází také PARP vazebná doména, která interakcí s PARP spouští buněčnou smrt nekrozou (GORDON-SHAAG et al., 2003), zatímco minoritní proteiny myšího polyomaviru indukují apoptózu (HUERFANO et al., manuskript odeslán do tisku).

Při virové infekci se cytotoxické vlastnosti minoritních proteinů neprojevují tak silně jako při jejich samostatné expresi, protože většina minoritních proteinů je vykryta buď zčásti VP1 pentamerami, nebo zcela v nově vznikajících virionech. Přesto by mohly najít uplatnění ve velmi pozdní fázi infekce v navození destrukce buněk pro uvolnění virionů k další infekci. Jejich afinita k membránám by naopak mohla participovat v mechanismech uvolnění se virové informace z endozomálních kompartmentů anebo přímo při translokaci do jádra. Expresi fúzních variant plánujeme dále využít k vyhledávání interakcí minoritních proteinů polyomavirů metodou imunoprecipitace.

Pro osvětlení účasti minoritních proteinů v časných fázích polyomavirové infekce se budeme snažit získat baterie protilátek, s jejichž pomocí bychom mohli identifikovat konformační změny virionů a vystavené epitopy minoritních proteinů i buněčný kompartment v němž k těmto zatím putativním změnám mohlo docházet.

VII.

Souhrn

V první části práce jsme zjišťovali, zda různé koncentrace VLPs (obsahující buď minoritní protein VP2 nebo VP3) myšího polyomaviru po přidání k infekčnímu viru ovlivní jeho infektivitu, neboli, zda se minoritní proteiny uplatňují už ve velmi časných fázích infekce.

- Proto jsme nejprve vyizolovali tři typy VLPs myšího polyomaviru z hmyzích buněk infikovaných specifickými rekombinantními bakuloviry. Získali jsme tak částice složené z proteinu VP1, VP1 a VP2 a nakonec VP1 a VP3.
- Nepřímou imunofluorescencí jsme detekovali buňky produkující LT 24 hodin po infekci virovým inokulem s přidanými VLPs. Touto metodou jsme nezjistili výrazný vliv žádného typu pseudokapsid na infektivitu viru.
- Měřením počtu buněk pozitivních na LT 24 hodin po infekci virovým inokulem s přidanými VLPs metodou průtokové cytometrie jsme zjistili, že VLPs s inkorporovanými minoritními proteiny mírně zvyšují infektivitu viru.
- Naše výsledky ukazují, že přítomnost VLPs, složených ať už ze samotného proteinu VP1 nebo obsahujících minoritní proteiny VP2 či VP3, virovou infektivitu zřejmě neovlivňuje.

V druhé části práce jsme porovnávali konfokální mikroskopií lokalizaci a cytotoxicitu strukturních minoritních proteinů lidského BK viru a myšího polyomaviru, fúzaných s EGFP na C– nebo N–konci, produkovaných v myších 3T3 a opičích VERO buňkách.

- Lokalizace fúzních variant proteinů VP2 a VP3 BK viru s proteinem EGFP připojeným k C–konci byla jáderková, pravděpodobně arteficiální a jejich cytotoxicita byla nízká.
- Opačné fúzní varianty, EGFP–VP2 a EGFP–VP3 BKV vykazovaly velmi podobné chování jako nefúzané minoritní proteiny. Nalézaly se v jádře buněk a poškozovaly je.
- Fúzní varianty VP2 a VP3 myšího polyomaviru s EGFP na C–konci byly velmi toxické, stejně jako jejich přirozené protějšky, a měly téměř stejnou jadernou i cytoplazmatickou lokalizaci.
- Opačné fúzní varianty (EGFP–VP2 a EGFP–VP3) byly lokalizovány spíše v jádře a jejich cytotoxicita byla oproti wt proteinům snížena.

VIII.

Citace

Abbing, A., Blaschke, U.K., Grein, S., Kretschmar, M., Stark, C.M., Thies, M.J., Walter, J., Weigand, M., Woith, D.C., Hess, J., Reiser, C.O. (2004): Efficient intracellular delivery of a protein and a low molecular weight substance via recombinant polyomavirus-like particles. *Journal of Biological chemistry* 279 (26): 27410-21.

Adamec, T., Palková, Z., Velková, K., Stokrová, J., Forstová, J. (2005): Point mutation in calcium-binding domain of mouse polyomavirus VP1 protein does not prevent virus-like particle formation, but changes VP1 interactions with *Saccharomyces cerevisiae* cell structures. *FEMS Yeast Research* 5/4-5: 331-40.

An, K., Gillock E.T., Sweat J. A., Reeves, W.M., and Consigli, R.A. (1999): Use of the baculovirus system to assemble polyomavirus capsid-like particles with different polyomavirus structural proteins: analysis of the recombinant assembled capsid-like particles. *Journal of General Virology* 80: 1009–1016.

Anderson, H.A., Chen, Y., Norkin, L.C. (1996): Bound simian virus 40 translocates to caveolin-enriched membrane domains, and its entry is inhibited by drugs that selectively disrupt caveolae. *Molecular biology of the cell* 7 (11): 1825-34.

Anderson, H.A., Chen, Y., Norkin, L.C. (1998) MHC class I molecules are enriched in caveolae but do not enter with simian virus 40. *Journal of general virology* 79/6: 1469-77.

Ashok, A., Atwood, W.J. (2003): Contrasting roles of endosomal pH and the cytoskeleton in infection of human glial cells by JC virus and simian virus 40. *Journal of Virology* 77 (2):1347-56.

Atwood, W.J., Norkin, L.C. (1989): Class I major histocompatibility proteins as cell surface receptors for simian virus 40. *Journal of Virology* 63 (10): 4474-7.

Barouch, D.H. and Harrison, S.C. (1994): Interactions among the Major and Minor Coat Proteins of Polyomavirus. *Journal of virology* 68/6: 3982-3989.

Batt, D.B., Luo, Y., Carmichael G.G. (1994): Polyadenylation and transcription termination in gene constructs containing multiple tandem polyadenylation signals. *Nucleic Acids Research* 22 (14): 2811-6.

Bauer, P.H., Cui, C., Liu, W.R., Stehle, T., Harrison, S.C., DeCaprio, J.A., Benjamin, T.L. (1999): Discrimination between sialic acid-containing receptors and pseudoreceptors regulates polyomavirus spread in the mouse. *Journal of virology* 73 (7): 5826-32.

Bolen, J.B., Anders, D.G., Trempey, J. And Consigli, R.A. (1981): 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.

Bouřa, dipl. práce, 2004.

Bouřa, E., Liebl, D., Spíšek, R., Frič, J., Marek, M., Štokrová, J., Holáň, V., Forstová, J. (2005): Polyomavirus EGFP-pseudocapsids: analysis of model particles for introduction of proteins and peptides into mammalian cells. *FEBS Letters* 579 (29): 6549-58.

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

- Breau, W.C., Atwood, W.J., Norkin, L.C.** (1992): Class I major histocompatibility proteins are an essential component of the simian virus 40 receptor. *Journal of Virology* 66 (4): 2037-45.
- Burton, K.S., Consigli, R.A.** (1996): Methylation of the polyomavirus major capsid protein VP1. *Virus Research* 40/2: 141-7.
- Butin-Israeli, V., Uzi, D., Abd-El-Latif, M., Pizov, G., Eden, A., Haviv, Y.S., Oppenheim, A.** (2008): DNA-free recombinant SV40 capsids protect mice from acute renal failure by inducing stress response, survival pathway and apoptotic arrest. *PLoS One* 3 (8): e2998.
- Cai, X., Chang, D., Rottinghaus, S. and Consigli, R.A.** (1994): Expression and purification of recombinant polyomavirus vp2 protein and its interactions with polyomavirus proteins. *Journal of Virology* 68/11: 7609-7613.
- Caparrós-Wanderley, W., Clark, B., Griffin, B.E.** (2004): Effect of dose and long-term storage on the immunogenicity of murine polyomavirus VP1 virus-like particles. *Vaccine* 22: 352-361.
- Caruso, M., Belloni, L., Sthandier, O., Amati, P. and Garcia, M.** (2003a): $\alpha 4\beta 1$ Integrin Acts as a Cell Receptor for Murine Polyomavirus at the Postattachment Level. *Journal of Virology* 77/7: 3913-3921.
- Caruso, M., Cavaldesi, M., Gentile, M., Sthandier, O., Amati, P. and Garcia, M.** (2003b): Role of sialic acid-containing molecules and the $\alpha 4\beta 1$ integrin receptor in the early steps of polyomavirus infection. *Journal of General Virology* 84: 2927-2936.
- Clark, B., Caparrós-Wanderley, W., Musselwhite, G., Kotecha, M., Griffin, B.E.** (2000): Immunity against both polyomavirus VP1 and a transgene product induced following intranasal delivery of VP1 pseudocapsid-DNA complexes. *The journal of general virology* 82/11: 2791-7.
- Clayson, E.T., Compans, R.W.** (1988): Entry of simian virus 40 is restricted to apical surfaces of polarized epithelial cells. *Molecular and cellular biology* 8 (8): 3391-6.
- Clayson, E.T., Brando, L.V., Compans, R.W.** (1989): Release of simian virus 40 virions from epithelial cells is polarized and occurs without cell lysis. *Journal of virology* 63(5): 2278-88.
- Clever, J., Dean, D.A., Kasamatsu, H.** (1993): Identification of a DNA binding domain in simian virus 40 capsid proteins Vp2 and Vp3. *Journal of biological chemistry* 268/28: 20877-83.
- Cripe, T.P., Delos, S.E., Estes, P.A., Garcea, R.L.** (1995): In vivo and in vitro association of hsc70 with polyomavirus capsid proteins. *Journal of Virology* 69/12: 7807-13.
- Daniels, R., Rusan, M.N., Wilbuer, A., Norkin, L.C., Wadsworth, P. and Hebert, D.N.** (2006): Simian virus 40 late proteins possess lytic properties that render them capable of permeabilizing cellular membranes. *Journal of Virology* 80/13: 6575-6587.
- Daniels, R., Rusan, N.M., Wadsworth, P., Hebert, D.N.** (2006 b): SV40 VP2 and VP3 insertion into ER membranes is controlled by the capsid protein VP1: implications for DNA translocation out of the ER. *Molecular Cell* 24 (6): 955-66.
- Daniels, R., Sadowicz, D., Hebert, D.N.** (2007): A Very Late Viral Protein Triggers the Lytic Release of SV40. *Plos Pathogens* 3 (7): 928-938.

- Dean, D.A., Kasamatsu, H.** (1994): Signal- and energy-dependent nuclear transport of SV40 Vp3 by isolated nuclei. *Journal of Biological Chemistry* 269 (7): 4910-6.
- Delos, S. E., Montross, L., Moreland, R.D., and R.L., Garcea** (1993): Expression of the Polyomavirus VP2 and VP3 protein in insect cells: Coexpression with the major capsid protein VP1 alters VP2/VP3 subcellular localization. *Virology* 194: 393 -398.
- Dorn, D.C., Lawatscheck, R., Zvirbliene, A., Aleksaite, E., Pecher, G., Sasnauskas, K., Ozel, M., Raftery, M., Schönrich, G., Ulrich, R.G., Gedvilaite, A.** (2008): Cellular and humoral immunogenicity of hamster polyomavirus-derived virus-like particles harboring a mucin 1 cytotoxic T-cell epitope. *Viral Immunology* 21 (1): 12-27.
- Dugan, A.S., Eash, S., Atwood, W.J.** (2005): An N-linked glycoprotein with alpha(2,3)-linked sialic acid is a receptor for BK virus. *Journal of virology* 79 (22): 14442-5.
- Eash, S., Querbes, W., Atwood, W.J.** (2004): Infection of vero cells by BK virus is dependent on caveolae. *Journal of Virology* 78 (21): 11583-90.
- Eash, S., Atwood, W.J.** (2005): Involvement of cytoskeletal components in BK virus infectious entry. *Journal of Virology* 79 (18): 11734-41.
- Eddy, B.E., Borman, G.S., Grubbs, G.E., Young, R.D.**(1962): Identification of the oncogenic substance in rhesus monkey kidney cell culture as simian virus 40. *Virology* 17:65-75.
- Elphick, G.F., Querbes, W., Jordan, J.A., Gee, G.V., Eash, S., Manley, K., Dugan, A., Stanifer, M., Bhatnagar, A., Kroeze, W.K., Roth, B.L., Atwood, W.J.** (2004): The human polyomavirus, JCV, uses serotonin receptors to infect cells. *Science* 306/5700: 1380-3.
- Fanning, E., Zhao, K.**(2009): SV40 DNA replication: from the A gene to a nanomachine. *Virology* 384 (2): 352-9.
- Forstová, J., Krauzewicz, N., Wallace, S., Street, A. J., Dilworth S. M., Beard, S., Griffin, B. E** (1993): Cooperation of Structural Proteins during Late Events in the Life Cycle of Polyomavirus. *Journal of Virology* 67/3: 1405-1413.
- Forstová, J., Krauzewicz, N., Sandig, V., Elliott, J., Palková, Z., Strauss, M., Griffin, B.E.** (1995): Polyoma virus pseudocapsids as efficient carriers of heterologous DNA into mammalian cells. *Human gene therapy* 6/3: 297-306.
- Frič, J., Marek, M., Hrušková, V., Holáň, V. Forstová, J.** (2008): Cellular and humoral immune responses to chimeric EGFP-pseudocapsids derived from the mouse polyomavirus after their intranasal administration. *Vaccine* 26: 3242–3251.
- Garcea, R.L., Ballmer-Hofer, K., Benjamin, T.L.** (1985): Virion assembly defect of polyomavirus hr-t mutants: underphosphorylation of major capsid protein VP1 before viral DNA encapsidation. *Journal of Virology* 54/2: 311-6.
- Gardner, S.D., Field, A.M., Coleman, D.V., Hulme, B.** (1971): New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet* 1 (7712): 1253-7.
- Gedvilaite, A., Frömmel, C., Sasnauskas, K., Micheel, B., Ozel, M., Behrsing, O., Staniulis, J., Jandrig, B., Scherneck, S., Ulrich R.** (2000): Formation of immunogenic virus-like particles by

inserting epitopes into surface-exposed regions of hamster polyomavirus major capsid protein. *Virology* 273 (1): 21-35.

Gedvilaite, A., Zvirbliene, A., Staniulis, J., Sasnauskas, K., Krüger, D.H. And Ulrich, R. (2004): Segments of Puumala Hantavirus Nucleocapsid Protein Inserted into Chimeric Polyomavirus-Derived Virus-Like Particles Induce a Strong Immune Response in Mice. *Viral Immunology* 17/1: 51-68.

Gedvilaite, A., Dorn, D.C., Sasnauskas, K., Pecher, G., Bulavaite, A., Lawatscheck, R., Staniulis, J., Dalianis, T., Ramqvist, T., Schönrich, G., Raftery, M.J., Ulrich, R. (2006): Virus-like particles derived from major capsid protein VP1 of different polyomaviruses differ in their ability to induce maturation in human dendritic cells. *Virology* 354(2): 252-60.

Gilbert, J.M. and Benjamin, T.L. (2000): Early Steps of Polyomavirus Entry into Cells. *Journal of Virology* 74/18: 8582–8588.

Gilbert, J.M., Goldberg, I.G., Benjamin, T.L. (2003): Cell penetration and trafficking of polyomavirus. *Journal of Virology* 77 (4): 2615-22.

Gilbert, J. and Benjamin, T. (2004): Uptake Pathway of Polyomavirus via Ganglioside GD1a. *Journal of Virology* 78/22: 12259–12267.

Gilbert, J., Dahl J., Riney, C., You, J., Cui, C., Holmes, R., Lencer, W. and Benjamin, T., (2005): Ganglioside GD1a Restores Infectibility to Mouse Cells Lacking Functional Receptors for Polyomavirus. *Journal of virology* 79/1: 615–618.

Gilbert, J., Ou, W., Silver, J., Benjamin, T. (2006): Downregulation of protein disulfide isomerase inhibits infection by the mouse polyomavirus. *Journal of Virology* 80 (21): 10868-70.

Gillock, E.T., Rottinghaus, S., Chang, D., Cai, X., Miley, S.A., An, K. and Consigli, R. A. (1997): Polyomavirus Major Capsid Protein VP1 Is Capable of Packaging Cellular DNA When Expressed in the Baculovirus System. *Journal of Virology* 71/4: 2857–2865.

Gleiter, S., Stubenrauch, K., Lilie, H. (1999): Changing the surface of a virus shell fusion of an enzyme to polyoma VP1. *Protein science: a publication of the Protein Society* 8 (12):2562-9.

Gleiter, S., Lilie, H. (2001): Coupling of antibodies via protein Z on modified polyoma virus-like particles. *Protein science : a publication of the Protein Society* 10 (2): 434-44.

Goldmann, C., Stolte, N., Nisslein, T., Hunsmann, G., Luke, W., Petry, H. (2000): Packaging of small molecules into VP1-virus-like particles of the human polyomavirus JC virus. *Journal of Virological Methods* 90: 85–90.

Gordon-Shaag, A., Yosef, Y., Abd El-Latif, M. and Oppenheim, A. (2003): The Abundant Nuclear Enzyme PARP Participates in the Life Cycle of Simian Virus 40 and Is Stimulated by Minor Capsid Protein VP3. *Journal of Virology* 77/7: 4273–4282.

Griffith, J.P., Griffith, D.L., Rayment, I., Murakami, W.T., Caspar, D.L. (1992): Inside polyomavirus at 25-A resolution. *Nature* 355 (6361): 652-4.

Haynes, J.I., Chang, D. and Consigli, R.A. (1993): Mutations in the Putative Calcium-Binding Domain of Polyomavirus VP1 Affect Capsid Assembly. *Journal Of Virology* 67/5: 2486-2495.

Huerfano, S., Žíla, V., Bouřa, E., Štokrová, J., Forstová, J., (2009) manuskript zaslán do tisku

Chang D., Haynes J.I., Brady, J.N., And Consigli, R.A. (1992): The Use of Additive and Subtractive Approaches to Examine the Nuclear Localization Sequence of the Polyomavirus Major Capsid Protein VP1. *Virology* 189: 821-827.

Chang, D., Haynes, J.I., Brady, J.N., Consigli, R.A. (1992b): Identification of a nuclear localization sequence in the polyomavirus capsid protein VP2. *Virology* 191/2: 978-83.

Chen, X. S., Stehle, T. and Harrison, S.C. (1998): Interaction of polyomavirus internal protein VP2 with the major capsid protein VP1 and implications for participation of VP2 in viral entry. *The EMBO Journal* 17/12: 3233–3240.

Inoue, T., Kawano, M.A., Takahashi, R.U., Tsukamoto, H., Enomoto, T., Imai, T., Kataoka, K., Handa, H. (2008): Engineering of SV40-based nano-capsules for delivery of heterologous proteins as fusions with the minor capsid proteins VP2/3. *Journal of biotechnology* 134 (1-2):181-92.

Imperiale, M.J., Major, E.O., (2007) Polyomaviruses. In: Knipe, David M.; Howley, Peter M. (eds): *Fields Virology, 5th Edition*, Lippincott Williams & Wilkins, 2264 - 2290

Kawano, M.A., Inoue, T., Tsukamoto, H., Takaya, T., Enomoto, T., Takahashi, R.U., Yokoyama, N., Yamamoto, N., Nakanishi, A., Imai, T., Wada, T., Kataoka, K., Handa, H. (2006): The VP2/VP3 minor capsid protein of simian virus 40 promotes the in vitro assembly of the major capsid protein VP1 into particles. *Journal of biological chemistry* 281/15:10164-73.

Kečkéšová, dipl. práce, 2003.

Kimchi-Sarfaty, C., Arora, M., Sandalon, Z., Oppenheim, A., Gottesman, M.M. (2003): High cloning capacity of in vitro packaged SV40 vectors with no SV40 virus sequences. *Human Gene Therapy* 14/2: 167-77.

Kosukegawa, A., Arisaka, F., Takayama, M., Tajima, H., Kaidow, A., Handa, H. (1996): Purification and characterization of virus-like particles and pentamers produced by the expression of SV40 capsid proteins in insect cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1290: 37-45.

Krauzewicz, N., Streuli, C. H., Stuart-Smith, N., Jones, M. D., Wallace, S. and Griffin, B.E. (1990): Myristylated Polyomavirus Vp2: Role In The Life Cycle Of The Virus. *Journal Of Virology* 64/9 4414-4420.

Krauzewicz, N., Štokrová, J., Jenkins, C., Elliott, M., Higgins, C.F. and Griffin, B.F. (2000): Virus-like gene transfer into cells mediated by polyomavirus pseudocapsids. *Gene Therapy* 7: 2122 – 2131.

Lawatscheck, R., Aleksaite, E., Schenk, J.A., Micheel, B., Jandrig, B., Holland, G., Sasnauskas, K., Gedvilaite, A., Ulrich, R.G. (2007): Chimeric polyomavirus-derived virus-like particles: the immunogenicity of an inserted peptide applied without adjuvant to mice depends on its insertion site and its flanking linker sequence. *Viral Immunology* 20 (3): 453-60.

Levine, A.J. (2009): The common mechanisms of transformation by the small DNA tumor viruses: The inactivation of tumor suppressor gene products: p53. *Virology* 384(2): 285-93.

- Leavitt, A.D., Roberts, T.M. and Garcea, R.A. (1985):** Polyoma Virus Major Capsid Protein, VP1, Purification After High Level Expression In Escherichia Coli. *The Journal Of Biological Chemistry* 260/23: 12803-12809.
- Liddington, R.C., Yan, Y., Moulai, J., Sahli, R., Benjamin, T.L., Harrison, SC. (1991):** Structure of simian virus 40 at 3.8-A resolution. *Nature* 354 (6351):278-84.
- Liebl, D., Difato, F., Horníková, L., Mannová, P., Štokrová, J., and Forstová, J. (2006):** Mouse Polyomavirus Enters Early Endosomes, Requires Their Acidic pH for Productive Infection, and Meets Transferrin Cargo in Rab11-Positive Endosomes. *Journal of Virology* 80/9: 4610–4622.
- Li, M., Delos, S.E., Montross, L. and Garcea, R.L. (1995):** Polyomavirus VP1 phosphorylation: Coexpression with the VP2 capsid protein modulates VP1 phosphorylation in Sf9 insect cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 5992-5996.
- Li, T., Takeda, N., Kato, K., Nilsson, J., Xing, Li., Haag, L., Cheng, R., H., and Miyamura, T. (2003):** Characterization of self-assembled virus-like particles of human polyomavirus BK generated by recombinant baculoviruses. *Virology* 311: 115–124.
- Lilley, B.N., Gilbert, J.M., Ploegh, H.L., Benjamin, T.L. (2006):** Murine polyomavirus requires the endoplasmic reticulum protein Derlin-2 to initiate infection. *Journal of Virology* 80 (17): 8739-44.
- Lin, W., Shurgot, J.L., Kasamatsu, H. (1986):** The synthesis and transport of SV40 structural proteins. *Virology* 154 (1): 108-20.
- Liu, C.K., Wei, G., Atwood, W.J. (1998):** Infection of glial cells by the human polyomavirus JC is mediated by an N-linked glycoprotein containing terminal alpha(2-6)-linked sialic acids. *Journal of Virology* 72 (6): 4643-9.
- Low, J.A., Magnuson, B., Tsai, B., Imperiale, M.J. (2006):** Identification of gangliosides GD1b and GT1b as receptors for BK virus. *Journal of Virology* 80(3):1361-6.
- Mackay R.L, Consigli R.A. (1976):** Early events in polyoma virus infection: attachment, penetration, and nuclear entry. *Journal of Virology* 19 (2): 620-36.
- Maninová, dipl. práce, 2007.**
- Mannová, P., Liebl, D., Krauzewicz, N., Fejtová A., Štokrová, J., Pálková, Z., Griffin, B.E. and Forstová, J. (2002):** Analysis of mouse polyomavirus mutants with lesions in the minor capsid proteins. *Journal of General Virology* 83: 2309–2319.
- Mannová, P. and Forstová, J. (2003):** Mouse Polyomavirus Utilizes Recycling Endosomes for a Traffic Pathway Independent of COPI Vesicle Transport. *Journal of virology* 77/3: 1672–1681..
- Moreland, R.B., Montross, L. and Garcea, R.L. (1991)** Characterization of the DNA-Binding Properties of the Polyomavirus Capsid Protein VP1. *Journal Of Virology* 65/3: 1168-1176.
- Montross, L., Watkins, S., Moreland, R.B, Mamon, H., Caspar, D.L.D. and Garcea, R.L.(1991):** Nuclear Assembly of Polyomavirus Capsids in Insect Cells Expressing the Major Capsid Protein VP1. *Journal of Virology* 65/9: 4991-4998.

- Nakanishi, A., Shum, D., Morioka, H., Otsuka, E. and Kasamatsu H. (2002):** Interaction of the Vp3 Nuclear Localization Signal with the Importin α 2/ β Heterodimer Directs Nuclear Entry of Infecting Simian Virus 40. *Journal of Virology* 76/18: 9368–9377.
- Nishimura, T., Kawai, N., Kawai, M., Notake, K., Ichihara, I.(1986):** Fusion of SV40-induced endocytotic vacuoles with the nuclear membrane. *Cell Structure and Function* 11(2):135-41.
- Ng, J., Koechlin, O., Ramalho, M., Raman, D. and Krauzewicz, N. (2007):** Extracellular self-assembly of virus-like particles from secreted recombinant polyoma virus major coat protein. *Protein Engineering, Design & Selection* 20/12: 591–598.
- Norkin, L.C. and Ouellette, J. (1976):** Cell killing by simian virus 40: variation in the pattern of lysosomal enzyme release, cellular enzyme release, and cell death during productive infection of normal and simian virus 40-transformed simian cell lines. *Journal of Virology* 18(1): 48-57.
- Norkin, L.C., Anderson, H.A., Wolfrom, S.A., Oppenheim, A. (2002):** Caveolar endocytosis of simian virus 40 is followed by brefeldin A-sensitive transport to the endoplasmic reticulum, where the virus disassembles. *Journal of Virology* 76 (10): 5156-66.
- Norkin, L.C., Kuksin, D. (2005):** The caveolae-mediated sv40 entry pathway bypasses the golgi complex en route to the endoplasmic reticulum. *Virological Journal* 2: 38.
- Okada, Y., Endo, S., Takahashi, H., Sawa, H., Umemura, T., Nagashima, K.(2001):** Distribution and function of JCV agnoprotein. *Journal of Neurovirology*: 7 (4): 302-6.
- Oppenheim, A., Sandalon, Z., Peleg, A., Shaul, O., Nicolis, S., Ottolenghi, S. (1992):** A cis-acting DNA signal for encapsidation of simian virus 40. *Journal of Virology* 66/9: 5320-8.
- Padgett, B.L., Walker, D.L., ZuRhein, G.M., Eckroade, R.J., Dessel, B.H. (1971):** Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *Lancet* 1(7712): 1257-60.
- Pálková, Z., Adamec, T., Liebl, D., Štokrová, J., Forstová, J. (2000):** Production of polyomavirus structural protein VP1 in yeast cells and its interaction with cell structures. *FEBS Letters* 478: 281 – 289.
- Palmer, E., Freeman, T. (2004):** Investigation Into the use of C- and N-terminal GFP Fusion Proteins for Subcellular Localization Studies Using Reverse Transfection Microarrays. *Comperative and functional Genomics* 5 (4):342-53.
- Pelkmans, L., Püntener, D., Helenius, A. (2002):** Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science* 296 (5567): 535-9.
- Pho, M.T., Ashok, A., Atwood, W.J. (2000):** JC virus enters human glial cells by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. *Journal of Virology* 74 (5): 2288-92.
- Plevka, dipl. práce, 2002.**
- Qian, M., Cai, D., Verhey, K.J. and Tsai, B. (2009):** A Lipid Receptor Sorts Polyomavirus from the Endolysosome to the Endoplasmic Reticulum to Cause Infection. *PLoS Pathogens* 5 (6): e1000465. doi:10.1371.

Querbes, W., Benmerah, A., Tosoni, D., Di Fiore, P.P., Atwood, W.J. (2004): A JC virus-induced signal is required for infection of glial cells by a clathrin-and eps15-dependent pathway. *Journal of Virology* 78 (1):250-6.

Qu, Q., Sawa, H., Suzuki, T., Semba, S., Henmi, C., Okada, Y., Tsuda, M., Tanaka, S., Atwood, W.J., Nagashima, K. (2004): Nuclear entry mechanism of the human polyomavirus JC virus-like particle: role of importins and the nuclear pore complex. *Journal of Biological Chemistry* 279 (26): 27735-42.

Rainey-Barger, E.K., Magnuson, B. and Tsai B. (2007): A Chaperone-Activated Nonenveloped Virus Perforates the Physiologically Relevant Endoplasmic Reticulum Membrane. *Journal of Virology* 81(23): 12996–13004.

Rainey-Barger, E.K., Mkrтчian, S., Tsai, B. (2009): The C-terminal domain of ERp29 mediates polyomavirus binding, unfolding, and infection. *Journal of Virology* 83(3): 1483-91.

Richterová, Z., Liebl, D., Horák, M., Pálková, Z., Štokrová, J., Hozák, P., Korb, J., Forstová, J. (2001): Caveolae Are Involved in the Trafficking of Mouse Polyomavirus Virions and Artificial VP1 Pseudocapsids toward Cell Nuclei. *Journal of virology* 75/22: 10880–10891.

Rollman, E., Ramqvist, T., Zuber, B., Tegerstedt, K., Kjerrström Zuber, A., Klingström, J., Ericsson, L., Ljungberg, K., Hinkula, J., Wahren, B., Dalianis T. (2003): Genetic immunization is augmented by murine polyomavirus VP1 pseudocapsids. *Vaccine* 21: 2263–2267.

Řípová, dipl. práce, 2002

Sablina, A.A., Hahn W.C. (2008): SV40 small T antigen and PP2A phosphatase in cell transformation. *Cancer Metastasis Review* 27 (2):137-46.

Sahli, R., Freund, R., Dubensky, T., Garcea, R., Bronson, R. and Benjamin, T. (1993): Defect in entry and altered pathogenicity of a polyoma virus mutant blocked in VP2 myristylation. *Virology* 192: 142 – 153.

Salunke D.M., Caspar D.L., Garcea R.L., (1986): Self-assembly of purified polyomavirus capsid protein VP1. *Cell*: 46 (6): 895-904.

Salunke, D.M., Caspar, D.L.D., Garcea, R.L. (1989): Polymorphism in the assembly of polyomavirus capsid protein VP1. *Biophysical Journal* 56: 887-900.

Sandalon, Z., Oppenheim, A. (1997): Self-assembly and protein-protein interactions between the SV40 capsid proteins produced in insect cells. *Virology* 237/2: 414-21.

Shin, Y.C., Folk, W.R. (2003): Formation of polyomavirus-like particles with different VP1 molecules that bind the urokinase plasminogen activator receptor. *Journal of Virology* 77 (21):11491-8.

Schaffhausen, B.S. Roberts, T.M. (2009): Lessons from polyoma middle T antigen on signaling and transformation: A DNA tumor virus contribution to the war on cancer. *Virology* 384 (2):304-16.

Schmidt, U., Rudolph, R., Böhm, G. (2001): Binding of external ligands onto an engineered virus capsid. *Protein Engineering* 14 (10):769-74.

- Sinibaldi, L.,** Goldoni, P., Pietropaolo, V., Longhi, C., Orsi, N. (1990): Involvement of gangliosides in the interaction between BK virus and Vero cells. *Archives of virology* 113/(3-4): 291-6.
- Smith, A.E.,** Lilie, H. and Helenius, A. (2003): Ganglioside-dependent cell attachment and endocytosis of murine polyomavirus-like particles. *FEBS Letters* 555 199-203.
- Skrastina, D.,** Bulavaite, A., Sominskaya, I., Kovalevska, L., Ose, V., Priede, D., Pumpens, P., Sasnauskas, K. (2008): High immunogenicity of a hydrophilic component of the hepatitis B virus preS1 sequence exposed on the surface of three virus-like particle carriers. *Vaccine* 26 (16): 1972-81.
- Soeda, E.,** Krauzewicz, N., Cox, C., Štokrová, J., Forstová, J. and Griffin, B.E. (1998): Enhancement by polylysine of transient, but not stable, expression of genes carried into cells by polyoma VP1 pseudocapsids. *Gene Therapy* 5: 1410–1419.
- Stamatos, N.M,** Chakrabarti, S., Moss, B., Hare, J.D. (1987): Expression of polyomavirus virion proteins by a vaccinia virus vector: association of VP1 and VP2 with the nuclear framework. *Journal of Virology* 61 (2): 516-25.
- Stehle, T. and Harrison, S.C.** (1997): High-resolution structure of a polyomavirus VP1–oligosaccharide complex: implications for assembly and receptor binding. *The EMBO Journal* 16/16 : 5139–5148.
- Streuli, C.H., Griffin, B.E.** (1987): Myristic acid is coupled to a structural protein of polyoma virus and SV40. *Nature* 326/6113: 619-22.
- Stubenrauch, K.,** Gleiter, S., Brinkmann, U., Rudolph, R., Lilie, H.(2001): Conjugation of an antibody Fv fragment to a virus coat protein: cell-specific targeting of recombinant polyoma-virus-like particles. *The Biochem Journal* 356/3: 867-73.
- Štokrová, J.,** Palková, Z., Fischer, L., Richterová, Z, Korb, J , Griffin, B.E., Forstová, J. (1999): Interactions of heterologous DNA with polyomavirus major structural protein, VP1. *FEBS Letters* 445: 119-125.
- Tegerstedt, K. ,** Andreasson, K., Vlastos, A., Hedlund, K.O., Dalianis, T. and Ramqvist, T. (2003): Murine pneumotropic virus VP1 virus-like particles (VLPs) bind to several cell types independent of sialic acid residues and do not serologically gross react with murine polyomavirus VP1 VLPs. *Journal of General Virology* 84: 3443–3452.
- Tegerstedt, K.,** Lindencrona, J.A., Curcio, C., Andreasson, K., Tullus, C., Forni, G., Dalianis, T., Kiessling, R., Ramqvist, T. (2005): A single vaccination with polyomavirus VP1/VP2Her2 virus-like particles prevents outgrowth of HER-2/neu-expressing tumors. *Cancer Research* 65 (13):5953-7.
- Tegerstedt K,** Franzén A, Ramqvist T, Dalianis T. (2007): Dendritic cells loaded with polyomavirus VP1/VP2Her2 virus-like particles efficiently prevent outgrowth of a Her2/neu expressing tumor. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII.* 56 (9):1335-44.
- Touzé, A.,** Bousarghin, L., Ster, C., Combita, A.L., Roingeard, P., Coursaget, P. (2001): Gene transfer using human polyomavirus BK virus-like particles expressed in insect cells. *The Journal of general virology* 82/12: 3005-9.

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

Tsukamoto, H., Kawano, M.A., Inoue, T., Enomoto, T., Takahashi, R.U., Yokoyama, N., Yamamoto, N., Imai, T., Kataoka, K., Yamaguchi, Y., Handa, H. (2007): Evidence that SV40 VP1-DNA interactions contribute to the assembly of 40-nm spherical viral particles. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 12/11: 1267-79.

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

Voet, D., Voet, J.G., (1995): *Biochemie*, Victoria Publishing a.s., Praha: 303

Voronkova, T., Kazaks, A., Ose, V, Ozel, M., Scherneck, S., Pumpens, P., Ulrich, R. (2007): Hamster polyomavirus-derived virus-like particles are able to transfer in vitro encapsidated plasmid DNA to mammalian cells. *Virus Genes* 34/3:303-14.

Wychowski, C., Benichou, D., Girard, M. (1987): The intranuclear location of simian virus 40 polypeptides VP2 and VP3 depends on a specific amino acid sequence. *Journal of Virology* 61/12: 3862-9.

Yang, Y.W, Chen, L.H. (2000): Gene delivery via polyomavirus major capsid protein VP(1), isolated from recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 32/1:73-9.

Yamada, M., Kasamatsu, H. (1993): Role of nuclear pore complex in simian virus 40 nuclear targeting. *Journal of Virology* 67 (1): 119-30.

Yokoyama, N., Kawano, M.A., Tsukamoto, H., Enomoto, T., Inoue, T., Takahashi, R.U., Nakanishi, A., Imai, T., Wada, T., Handa, H. (2007): Mutational analysis of the carboxyl-terminal region of the SV40 major capsid protein VP1. *Journal of biochemistry* 141(2):279-86.

Zhan F.Q., Packianathan V.S., Zeitouni N.C. (2009): Merkel cell carcinoma: a review of current advances. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network* 7 (3): 333 – 9.

Errata – Diplomová práce Michael Jelínek, (2009)

Str. 45: ...suspenze byla centrifugována 5 – 7 min, 400g, při pokojové teplotě...

Str. 49: Membrána *Serva Nitrocellulose membrane* NC 45, cat no.71208

Str. 50: IV. 2.3.5 Barvení Coomassie blue

Gel byl fixován **fixačním roztokem** (*Fixační roztok = 5% HClO₄, 50% methanol*) 1 – 2 hod. Barvení (*barvicího roztok = 0,5% CBBG250, 3,5% HClO₄*) probíhalo přes noc při laboratorní teplotě. Nenavázané barvivo bylo odmyto dH₂O přibližně 5x v intervalu 2- 3 hod.

Kap. V. 1.2 infikované buňky: myší fibroblasty 3T6

Str. 72 (a další):

Primární protilátky:

M α VP1, MPyV: myší monoklonální protilátka proti VP1 myšího polyomaviru, izotyp IgG1 (FORSTOVÁ et al., 1993), *hybridomový supernatant - neředí se*

M α VP2/VP3, MPyV: klon 1A2, myší monoklonální protilátka proti VP2/VP3 myšího polyomaviru, izotyp IgG1 (FORSTOVÁ et al., 1993), *hybridomový supernatant- neředí se*

M α VP2/VP3: klon 2C8, myší monoklonální protilátka proti VP2/VP3 myšího polyomaviru, izotyp IgG1 (FORSTOVÁ et al., 1993), *hybridomový supernatant - neředí se*

Rt α LT (velký T antigen), MPyV: kryší monoklonální protilátka proti velkému antigenu myšího polyomaviru, *hybridomový supernatant - neředí se*

Rb α SV40 VP2/VP3 králíčí polyklonální protilátka proti společné části minoritních strukturních proteinů viru SV40 (Abcam). Tato protilátka křížově reaguje s minoritními proteiny BKV., *1:5000*

G α lamin B kozí monoklonální protilátka proti laminu B (Santa Cruz), *1:100*

M α Histon H1 myší monoklonální protilátka proti histonu H1 (AE-4; Santa Cruz Biotechnology) *1:200*

Sekundární protilátky: všechny 1:1000

Str. 89: Obr. V. 33: Expres EGFP-VP3 BK viru v 3T3 buňkách. Konfokální řez třemi různými buňkami 24 hod. po transfekci. *EGFP-VP3 zeleně*, lamin B červeně, DNA modře. Použity protilátky: králíčí proti společné části proteinů VP2 a VP3, kozí proti laminu B, sekundární: kuřecí proti králíčím imunoglobulinům konjugovaná s AF 488, oslí proti kozím imunoglobulinům konjugovaná s AF546, nalevo kontrast Nomarského.

Str. 97: Tím jsme zohlednili skutečnost, že *poměr* mezi infekčním a hemaglutinačním titrem polyomaviru se pohybuje mezi 10² – 10³.