

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

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra genetiky a mikrobiologie



**Příprava monoklonálních protilátek a expresních plazmidů pro
studium vlastností strukturních proteinů polyomaviru BK**

Kateřina Podolská

Praha 2008

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Jitka Forstová, Csc. (Laboratoř molekulární virologie, Katedra genetiky a mikrobiologie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Praha)

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



Kateřina Podolská

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

Děkuji svojí mamince, bez které bych nemohla studovat, za velkou podporu, obětavost, trpělivost a všestrannou pomoc nejen při studiu.

Děkuji Mgr. Aleně Morávkové, Ph.D za pomoc při práci se zvířaty, provedení imunizací a cenné rady týkající se technik přípravy monoklonálních protilátek.

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

Děkuji laborantkám Vlastě Sakařové a Ivaně Polívkové za poskytnutí dobrého technického zázemí.

Děkuji Vojtovi Žilovi za zhotovení elektron mikroskopických snímků.

Děkuji Lucce Klímové za vytvoření zdravého konkurenčního prostředí a za podporu při vypracovávání mé diplomové práce:)

Děkuji všem studentům z laboratoře 006 za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Tato práce vznikla v letech 2005-2008 za podpory výzkumného záměru MSM 0021620858.

SEZNAM ZKRATEK:

AF	Alexa Fluor
APS	Amonium PerSulfát
ATPáza-F1	ATP syntáza F1
BFM	BromFenolová Modř
BKV	BK Virus
bp	páry bazí (base pairs)
Bip	Binding protein (Chaperonový protein sídlící v ER)
BSA	Bovinní Sérum Albumin
CBBG(R)250	Coomassie Brilliant Blue G(R)250
CBP	CREB-Binding Protein
CRE	Cyclic-AMP Response Element
CT-B	Cholera Toxinová podjednotka B
DAPI	DiAmidino PhenylIndole Dihydrochlorid
dH ₂ O	destilovaná voda
ddH ₂ O	demineralizovaná voda
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	DiMethylSulfOxid
DNA	DeoxyriboNukleová kyselina (Acid)
DNáza	DeoxiriboNukleáza
dNTP	deoxy-nukleotid-trifosfát
ds	dvoj-vláknová („double strand“)
DTT	DiThioTreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	EthylenDiamin TetraAcetát disodný
EGFP	zelený fluorescenční protein (Enhance Green Fluorescent Protein)
ER	endoplazmatické retikulum (<i>Endoplasmic Reticulum</i>)
ERAD	ER-Associated Degradation (pathway)
ERE	Estrogen-Response-Element
Erp29	chaperonový protein 29 Endoplazmatického Retikula
EtBr	Ethidium Bromid
FCS	Fetální telecí sérum
GRE-PRE	Glukokortikoid-Progesteron-Response-Element
GRP94	Glucose Regulating Protein 94
GST	Gluthation-S-Transferáza
G418	Geneticin 418
H(A)T	Hypoxantin (Aminopterin) Thymidin
HEPES	(N-[2-Hydroxyethyl] piperazine-N'-[2ethansulfonic acid])
HCMV	Human CytoMegalovirus
HGPRT	Hypoxantin-Guanozin-PhosphoRibosyl-Transferáza
HIV-2	Human Immunodeficient Virus-2
hod	hodina
hpi	hodin po infekci
hpt	hodin po transfekci
HRP	HorseRadish Peroxidase
hsc 70	heat shock cognate (protein) 70
hsp	heat shock protein
HSV-1	Herpes Simplex Virus-1
HRP2C	lidské ledvinové proximální epiteliální buňky
IPTG	IzoPropyl-β-D-ThioGalaktozid
JCV	JC Virus
KAc	Octan draselný
kbp	tisíc párů bazí (kilo base pairs)
kDa	tisíc daltonů (kilo Daltons)

LT	velký (Large)T antigen
MβCD	Methyl-β-CykloDextrin
MCS	Multiple Cloning Site (polylinker)
MHC-1	Major Histocompatibility Complex I
min	minuta
M.O.I	multiplicita infekce
MPyV	Myší PolyomaVirus
mRNA	mediátorová RNA
miRNA	micro RNA
NA	NeurAminidáza
NaAc	octan sondy
NAD+	Nicotine Adenine Dinucleotide
NCCR	nekódující kontrolní oblast (NonCoding Control Region)
NK	Negativní Kontrola
NLS	jaderný lokalizační signál (Nuclear Localisation Signal)
NP-40	Nonidet P-40
OD	Optická Denzita
ORF	Otevřený čtecí rámec (Open Reading Frame)
Ori	počátek replikace (<i>origin</i>)
PARP	Poly(ADP-Ribose) Polymerase
PCR	polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
PDI	Protein Disulfide Isomerase
PEG	PolyEthylenGlykol
PFU	Plaque Forming Units
PK	Pozitivní Kontrola
PML	ProMyelocytic Leukaemia (protein)
PMSF	PhenylMethylSulfonylFluorid
pRb	Retinoblastomový protein
PVAN	PolyomaVirus–Associated Nephropathy
RI	Refraktometrický Index
RNA	RiboNukleová kyselina (Acid)
RNáza A	RiboNukleáza A
rpm	otáčky za minutu (Revolutions Per Minute)
RT	pokožová teplota (Room Temperature)
RTG	RenTGenový
s	sekunda
SDS	DodecylSulfát Sodný
SDS-PAAGE	SDS proteinová elektroforéza
ses	SV40 encapsidation signal
ss	jedno-řetězcová (single strand)
SV40	opičí polyomavirus SV40
TEMED	N, N,N',N'-TetraMethylEthylenDiamin
TK	Tkáňové Kultury
TLR	Toll Like Receptor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminometan
VLPs	psudokapsidy „Virus Like Particles“
VP1	Virový Protein 1 (hlavní kapsidový protein polyomavirů)
VP2, VP3	Virové Proteiny 2 a 3 (minoritní kapsidové proteiny polyomavirů)
VP2/3	společná oblast minoritních proteinů VP2 a VP3 polyomavirů
VP4	Virový Protein 4 (velmi pozdní minoritní protein viru SV40)
Wt	divoký typ (Wild type)
x-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid/ N,N-dimethylformamid
YY1	Yin Yang 1 (buněčný pleiotropní regulační protein)
ŽA2	Živný Agar č. 2
ŽB2	Živný Bujón č. 2

Preparation of monoclonal antibodies and expression plasmids for studies of properties of BK virus structural proteins

ABSTRACT:

The new aim of our laboratory is to solve mechanisms of individual steps of infection of human polyomavirus BK (BKV). BKV is a nonenveloped DNA virus that asymptotically infects 60 to 90 % of the human population. However, BKV is the primary etiological agent of polyomavirus-associated nephropathy, which causes irreversible graft loss in a part of kidney transplant patients. Moreover, recent results point toward a role for BKV in early prostate cancer progression. BKV is composed of the major structural protein VP1, minor structural proteins VP2 and VP3 and a nucleocore. Functions of the minor proteins, VP2 and VP3 in BKV life cycle are not clear but they might play roles in each step of BKV replication cycle. The major structural protein, VP1 is responsible for receptor binding but it may have other, yet unknown functions.

The aims of this study were: i) to prepare monoclonal antibodies against BKV structural proteins and ii) to construct recombinant expression plasmids ensuring production of EGFP-fused VP3 in mammalian cells for investigation of VP3 interactions with host cell structures.

Recombinant baculovirus for production VP2 BKV fused with HIS-tag in insect cells was constructed. Isolation of VP2 from insect cells by several methods failed, because of insolubility of VP2. As an antigen for mice immunization protein VP3 isolated from VLPs composed of VP1 and VP3 was finally used. VP3 was isolated by SDS-PAAGE of VLP lysate and by electroelution of separated VP3 from the gel.

Selected hybridomas producing monoclonal antibodies against VP3 appeared to be unstable and stopped production of anti VP3 antibody during passaging. Surprisingly, a stable hybridoma cell line secreting a monoclonal antibody against VP1 BKV was obtained, probably due to contamination of VP3 antigen with a degradation product of VP1. Anti VP1 monoclonal antibody recognizes denatured VP1 on western blots as well as native VP1 in cells by indirect immunofluorescence method.

Plasmids carrying sequence for VP3 fused with EGFP (VP3-EGFP and EGFP-VP3) were constructed. Production of fusion proteins in mammalian cells was verified. The constructs were used for monitoring of VP3 localisation in simian and mouse cells. It was shown, that both fused VP3 proteins were predominantly targeted into the cell nucleus below nuclear lamina. In the cell nucleus, fused proteins colocalised with cellular DNA cumulated in nucleus periphery. The lamina seemed to be damaged in VP3 producing cells.

Key words: BK virus, minor structural proteins VP2 and VP3, major structural protein VP1, baculovirus expression system, monoclonal antibody.

Klíčová slova: BK virus, minoritní strukturální proteiny VP2 a VP3, hlavní strukturální protein VP1, bakulovirový expresní systém, monoklonální protilátka.

1. ÚVOD	13
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	15
2.1. BK virus	16
2.1.1. Objev a zařazení BK viru	16
2.1.2. Epidemiologie BK viru	16
2.1.3. Onemocnění spojená s BK virem	16
2.1.4. Virion a organizace virového genomu	17
2.1.5. Nekódující kontrolní oblast virového genomu (NCCR)	18
2.1.6. Produkty časně virové genové exprese	19
2.1.6.1. Velký T antigen	19
2.1.6.2. Malý t-antigen	20
2.1.7. Produkty pozdní virové genové exprese	21
2.1.7.1. Hlavní strukturální protein VP1 a struktura kapsidy BKV	21
2.1.7.2. Minoritní strukturální proteiny VP2 a VP3	22
2.1.7.3. Agnoprotein	22
2.1.8. Genetická variabilita BK viru	23
2.1.9. Životní cyklus BK viru	24
2.1.9.1. Receptory pro BK virus	24
2.1.9.2. Mechanismus vstupu BK viru do buňky	25
2.1.9.3. Doprava genomu BK viru k jádru	26
2.1.9.4. Časná jaderná fáze infekce BK virem	28
2.1.9.5. Pozdní fáze infekce BK virem	29
2.2. Minoritní strukturální proteiny polyomavirů	30
2.2.1. Umístění minoritních proteinů v kapsidě	30
2.2.2. Unikátní N koncová část proteinu VP2 je myristylována	31
2.2.3. Jaderný lokalizační signál (NLS) proteinů VP2 a VP3	32
2.2.4. Interakce proteinů VP2 a VP3 s pentamery VP1	33
2.2.5. DNA vazebná doména proteinů VP2 a VP3	34
2.2.6. Role proteinu VP2 ve fosforylaci strukturálního proteinu VP1 MPyV	34
2.2.7. Možná role minoritních proteinů polyomavirů v adsorpci polyomavirů na buněčný povrch a při vstupu do buňky	35
2.2.8. Role minoritních proteinů polyomavirů v dopravě a vstupu virového genomu do jádra	37
2.2.9. Role minoritních proteinů polyomavirů v morfogenezi virionů	39
2.2.10. Role minoritních proteinů polyomavirů v indukci buněčné destrukce a v úniku nových virionů z hostitelské buňky	42
2.2.11. Závěr	44
3. CÍLE	45
4. MATERIÁL A METODY	47
4.1. MATERIÁL	48
4.1.1. Přístroje	48
4.1.2. Chemikálie a roztoky	49
4.1.3. Komerční soupravy (kity)	51
4.1.4. Použité enzymy	51
4.1.5. Vektory	51
4.1.6. Primery	52
4.1.7. Markery molekulových hmotností	53
4.1.8. Protilátky	54
4.1.8.1. Primární protilátky	54
4.1.8.2. Sekundární protilátky	54
4.1.9. Použité viry a jejich charakteristika	55
4.1.10. Hmyzí a savčí buněčné linie	55
4.1.11. Média a chemikálie pro tkáňové kultury	56
4.1.12. Bakteriální kmeny	56

4.1.13. Antibiotika	57
4.2. METODY	57
4.2.1. Sterilizace materiálu	57
4.2.2. Práce s kmeny <i>Escherichia coli</i>	57
4.2.2.1. Kultivace <i>E. coli</i>	57
4.2.2.2. Příprava konzerv <i>E. coli</i> pro dlouhodobé skladování	58
4.2.2.3. Transformace kmenů <i>E. coli</i>	58
4.2.2.3.1. Příprava buněk kompetentních pro transformaci elektroporací	58
4.2.2.3.2. Transformace <i>E. coli</i> kmene DH5 α elektroporací	58
4.2.2.3.3. Příprava buněk kompetentních pro transformaci teplotním šokem	59
4.2.2.3.4. Transformace <i>E. coli</i> kmene DH10Bac teplotním šokem	59
4.2.2.4. Kontrola sensitivity <i>E. coli</i> kmene DH5 α k ampicilinu a kanamycinu	59
4.2.3. Práce s tkáňovými kulturami	60
4.2.3.1. Práce s hmyzími buňkami	60
4.2.3.1.1. Pasážování hmyzích buněk	60
4.2.3.1.2. Infekce hmyzích buněk bakulovirem	60
4.2.3.1.3. Sklizení hmyzích buněk infikovaných bakulovirem	60
4.2.3.1.4. Analýza a izolace rekombinantních plaků	60
4.2.3.1.5. Transfekce hmyzích buněk bakulovirovou DNA	61
4.2.3.2. Práce se savčími buňkami	61
4.2.3.2.1. Pasážování savčích buněk	61
4.2.3.2.2. Synchronizace savčích buněk odstraněním séra z média	61
4.2.3.2.3. Infekce buněčné linie VERO pro imunofluorescenční značení kapsidových proteinů BKV	62
4.2.3.2.4. Počítání buněk v Bürkerově komůrce	62
4.2.3.2.5. Transfekce savčích buněk	62
4.2.4. Nepřímá imunofluorescence	63
4.2.4.1. Fixace a permeabilizace buněk	63
a) Fixace a permeabilizace savčích a hmyzích buněk metanol/acetone	63
b). Fixace a permeabilizace savčích buněk paraformaldehydem a tritonem-x-100	63
4.2.4.2. Imunofluorescenční detekce proteinů v buňkách	63
4.2.5. Práce s DNA	64
4.2.5.1. Techniky preparace DNA	64
4.2.5.1.1. Maxipreparace plazmidové DNA alkalickou metodou	64
4.2.5.1.2. Minipreparace plazmidové DNA	64
4.2.5.1.3. Izolace fragmentů DNA z agarózového gelu	64
4.2.5.1.4. Purifikace plazmidové DNA zbavené endotoxinů pro transfekci savčích buněk	65
4.2.5.1.5. Izolace bacmidové DNA (bacmidu)	65
4.2.5.1.6. Deproteinace DNA upraveným fenolem a chloroformem	65
4.2.5.1.7. Srážení DNA etanolem	66
4.2.5.1.8. Odstranění RNA ze vzorku izolované DNA	66
4.2.5.2. Separace a vizualizace DNA v agarózovém gelu	66
4.2.5.3. Amplifikace DNA	66
4.2.5.3.1. Polymerázová řetězová reakce (PCR)	66
4.2.5.3.2. Purifikace produktů PCR	67
4.2.5.3.3. Identifikace rekombinantních klonů pomocí PCR	67
4.2.5.4. Úprava molekul DNA	67
4.2.5.4.1. Štěpení DNA restrikčními endonukleázami	67
4.2.5.4.2. Defosforylace konců plazmidové DNA	67
4.2.5.4.3. Rekombinace <i>in vitro</i> -ligace	68
4.2.6. Základní práce s proteiny	68
4.2.6.1. SDS proteinová polyakrylamidová elektroforéza (SDS-PAAGE)	68

a) Příprava buněčného lyzátu	68
b) Příprava vzorku pro SDS-PAAGE	68
c) Příprava gelu	68
4.2.6.2. Fixace a bareven gelu po SDS-PAAGE	69
4.2.6.3. Imobilizace proteinů na membráně	69
4.2.6.3.1. Imunodot-blot	69
4.2.6.3.2. Western blot	69
4.2.6.4. Imunologická detekce proteinů imobilizovaných na membráně	70
4.2.6.5. Srážení proteinů acetonem	70
4.2.6.6. Měření koncentrace proteinů pomocí transmisního skeneru	70
4.2.6.7. Měření koncentrace proteinů metodou Bradfordové	70
4.2.6.8. Dialýza	71
4.2.6.9. Test rozpustnosti proteinu VP2 za různých podmínek	71
4.2.7. Bakulovirový expresní systém a příprava rekombinantního bakuloviru rBac-VP2 BKV	71
4.2.8. Izolace pseudokapsid (VLPs)	73
4.2.8.1. Příprava lyzátu z infikovaných hmyzích buněk	73
4.2.8.2. Centrifugace přes sacharózový polštář	73
4.2.8.3. Izopyknická centrifugace v CsCl gradientu	73
4.2.9. Izolace minoritního proteinu VP2 nebo VP3 BKV pro imunizaci myši	74
4.2.9.1. Izolace proteinu VP2 afinitní chromatografií	74
4.2.9.2. Izolace proteinu VP2 BKV fázovou separací membránových proteinů tritonem-x-114	74
a) Izolace membrán	74
b) Prekondenzace tritonu-x-114	75
c) Fázová separace membránových proteinů tritonem-x-114	75
d) Analýza frakcí tritonové separace	76
4.2.9.3. Izolace proteinu VP3 BKV z VP1/3 BKV VLPs	76
4.2.10. Příprava myši monoklonální protilátky proti minoritním kapsidovým proteinům BK viru	76
4.2.10.1. Imunizace myši	78
4.2.10.2. Odběr krve z ocasní žíly a příprava a testování séra	78
4.2.10.3. Příprava podpůrných buněk	79
4.2.10.4. Příprava myelomových buněk	79
4.2.10.5. Buněčná fúze	79
4.2.10.5.1. Příprava slezinných buněk	79
4.2.10.5.2. Promývání slezinných a myelomových buněk	80
4.2.10.5.3. Fúze buněk	80
4.2.10.6. Léčba geneticinem	80
4.2.10.7. Pasážování hybridomů	80
4.2.10.8. Klonování	81
4.2.10.9. Příprava konzerv hybridomových linií	81
4.2.10.10. Rozmrazování hybridomů	82
5. VÝSLEDKY	83
5.1. Příprava protilátek proti strukturálním antigenům BK viru	84
5.1.1. Příprava rekombinantního bakuloviru pro expresi proteinu VP2 BKV	84
5.1.1.1. Konstrukce transferového vektoru nesoucího gen pro protein VP2	84
5.1.1.2. Příprava rekombinantní bakulovirové DNA nesoucí gen pro protein VP2 BK viru	87
5.1.1.3. Příprava plakových izolátů rekombinantního bakuloviru „rBac-VP2 BKV“	89
5.1.2. Izolace proteinu VP2 BK viru (VP2 BKV) z hmyzích buněk pro imunizaci	91
5.1.2.1. Optimalizace infekce	91
5.1.2.2. Izolace proteinu VP2 BKV afinitní chromatografií	91
5.1.2.3. Test rozpustnosti proteinu VP2	92

5.1.2.4. Izolace proteinu vP2 BKV fázovou separací membránových proteinů tritonem-x-114	93
5.1.3. Izolace minoritního strukturálního proteinu VP3 BK viru z VLPs složených z proteinu VP1 a VP3	95
5.1.4. Imunizace myši antigenem VP3	97
5.1.5. Selektce monoklonálních protilátek	97
5.1.5.1. Testování myších monoklonálních protilátek proti minoritním kapsidovým proteinům VP2 a VP3 BK viru	100
5.1.5.2. Testování myších monoklonálních protilátek proti hlavnímu kapsidovému proteinu VP1 BK viru	102
5.2. Příprava expresních vektorů produkujících s EGFP fúzaný minoritní protein BK viru VP3 v savčích buňkách	106
5.2.1. Konstrukce expresního vektoru pro produkci fúzního proteinu EGFP-VP3, kde je EGFP fúzován k N konci VP3	106
5.2.2. Konstrukce expresního vektoru pro produkci fúzního proteinu VP3-EGFP, kde je EGFP fúzován k C konci VP3	109
5.2.3. Ověření konstrukce plazmidů pEGFP-C2-VP3 a pEGFP-N1-VP3 sekvenací	111
5.2.4. Ověření produkce fúzních proteinů EGFP-VP3 a VP3-EGFP v savčích buňkách	113
5.3. Cílení proteinu VP3 BK viru k buněčným strukturám	115
5.3.1. Sledování vzájemné lokalizace proteinu VP3 fúzaného s EGFP a cytoplazmatických membránových struktur	116
5.3.2. Lokalizace proteinu VP3 fúzaného s EGFP v buněčném jádře vzhledem k jaderné lamině a buněčné DNA	120
5.3.3. Lokalizace proteinu VP3 fúzaného s EGFP a PML tělísek	125
6. DISKUZE	127
6.1. Příprava protilátek proti strukturálním proteinům BK viru	128
6.1.1. Příprava rekombinantního bakuloviru pro expresi VP2 BKV	128
6.1.2. Izolace proteinu vP2 BK viru z hmyzích buněk	129
6.1.3. Příprava monoklonálních protilátek proti strukturálním proteinům	130
6.2. Příprava expresních vektorů produkujících VP3 BKV jako fúzní proteiny s EGFP	132
6.3. Cílení proteinu VP3 BKV k buněčným strukturám	133
7. SOUHRN	138
8. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY	141

1. ÚVOD

KAPITOLA 1: ÚVOD

Některé viry představují pro život na Zemi značné nebezpečí a čas od času nám ukazují, že bychom jejich patogenní účinky neměli podceňovat. I přes nové poznatky o mechanismech patogenese jednotlivých virů získaných intenzivním výzkumem v oborech medicíny i biologie, nemáme proti těmto infekčním agens mnohdy spolehlivou ochranu. Především v zemích s nižší životní úrovní umírají každoročně na různé virózy tisíce lidí. Nicméně v oblastech molekulární biologie a genového inženýrství se viry ukazují spíše jako užitečné nástroje pro poznávání vnitrobuněčných procesů.

V naší laboratoři se již dlouhá léta zabýváme výzkumem myšího polyomaviru a nedávno jsme zahájili i výzkum dalšího viru z čeledi *Polyomaviridae*, lidského BK viru. Polyomaviry patří mezi významné modelové nástroje v molekulární biologii a jejich studium přispělo k mnoha významným objevům. Mezi ně patří například: popis struktury DNA v nadšroubovicovém uspořádání, objasnění struktury a funkce enhancerů a promotorů fungujících při regulaci transkripce, porozumění iniciaci a průběhu replikace v eukaryotické buňce, pochopení mechanismu alternativního sestřihu pre-mRNA nebo objasnění negativní a pozitivní regulace genové exprese. Polyomaviry jsou objektem intenzivního studia i pro svůj onkogenní potenciál a přispěly k pochopení mechanismu nádorové transformace. Z hlediska medicínského využití je důležitá schopnost polyomavirových kapsidových proteinů uspořádat se spontánně do pseudokapsid (VLPs). Do nich je možné vnášet genetický materiál nebo peptidy, což je činí významným a nadějným nástrojem pro genovou terapii a vývoj preventivních a terapeutických vakcín.

Studium BK viru je významné především proto, že se jedná o lidský patogen. Ačkoli se prokázala bezpříznaková ko-existence BK viru s člověkem v průběhu evoluce, nedávno se ukázalo, že tento virus způsobuje časté komplikace při transplantacích ledvin a kostní dřeně. Následkem snížené imunity po podání imunosupresivních léčiv je BK virus schopen re-aktivovat a způsobovat hemoragickou cystitidu u recipientů kostní dřeně, nebo zúžení močových cest a nefritidu u pacientů po transplantaci ledvin. Tato onemocnění jsou bohužel u takto postižených pacientů častou příčinou odhojení transplantátu. Abychom se mohli chránit proti tomuto patogenu, je nutné porozumět jeho životnímu cyklu a objasnit funkce proteinů, které kóduje. Já jsem svou diplomovou práci zahájila studium strukturálních proteinů VP1, VP2 a VP3, jejichž role v replikačním cyklu polyomavirů jsou nejasné.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 BK virus

2.1.1 Objev a zařazení BK viru

V roce 1970 Sylvia Gardner poprvé identifikoval a popsal BK virus. Částice tohoto patogenu byly izolovány ze vzorku moči pacienta s iniciály „B. K.“, který podstoupil transplantaci ledvin a již půl roku po tomto zákroku měl příznaky zúžení močových cest (GARDNER *et al.*, 1971). Později se ukázalo, že nově objevené infekční agens je členem čeledi *Polyomaviridae*. BK virus je společně s JC virem nejznámějším polyomavirem, jehož přirozeným hostitelem je člověk.

2.1.2 Epidemiologie BK viru

Získaná data svědčí o ko-evoluci a adaptaci BK viru a člověka (HIRSCH & STEIGER, 2003). K většinou asymptomatické primární infekci dochází typicky v časném dětství po vymizení mateřských protilátek. Nízké hladiny replikace BK viru v lymfoidních tkáních společně s detekcí BK virové DNA v mandlích naznačují, že se primární infekce může zakládat právě v mandlích (GOUDSMIT *et al.*, 1982). Zde se infikují monocyty, které šíří virus do dalších tkání a orgánů, zejména do ledvin (PORTOLANI *et al.*, 1985). Následná infekce močového ústrojí je většinou bezpříznaková, nicméně po reaktivaci latentního viru nebo po reinfekci novým kmenem BK viru může dojít někdy k příznakové sekundární infekci (LIN *et al.*, 2001). Před 10. rokem života vzroste sérologická prevalence až na 50% a u dospělých jedinců dosahuje i více než 70% (KNOWLES *et al.*, 2003). Přirozená cesta přenosu BK viru ještě nebyla plně objasněna, ale předpokládá se, že je orální či respirační. O tom svědčí skutečnost, že byl BK virus, díky jeho značné rezistenci k inaktivaci prostředím, detekován také v lidských slinách. Stádium latence se zakládá v tubulárních epitelích ledvin a v uroteliálních buňkách. Reaktivace a nízká hladina replikace s asymptomatickou viremii se objevuje u 0,3% až 5% zdravých imunokompetentních jedinců (HIRSCH & STEIGER, 2003). Prevalence vzrůstá u těhotných žen, starších lidí a imunosuprimovaných jedinců po transplantaci ledvin (10 %-45 %), nebo po transplantaci kostní dřeně (50 %) (DEMETER, 2000). I přes nezanedbatelnou prevalenci BK virové infekce jsou onemocnění spojená s tímto virem poměrně vzácná, což svědčí o spolupráci dalších faktorů.

2.1.3 Onemocnění spojená s BK virem

Vysoká prevalence, latentní infekce a asymptomatická reaktivace BK viru komplikuje chápání jeho patogeneze, která se může projevovat různým způsobem. Zejména spojitost BK viru s autoimunitními onemocněními a s nádorovými onemocněními je sporná. Existuje hypotéza, že u autoimunitních onemocnění spouští replikace polyomavirů patologickou imunitní odpověď. V experimentálních studiích mohou být autoimunitní odpovědi indukovány DNA-proteinovými komplexy, jako komplexy DNA s histony nebo časným produktem BK virové infekce T-antigenem (VAN GHELUE, 2003). Existuje i spojitost mezi infekcí BKV a autoimunitním onemocněním zvaným „systémová lupus erythematosus“. Hypotetická role infekce BK virem v autoimunitních onemocněních není specifická a podobnou odpověď u náchylného pacienta mohou vyvolat i další infekční nebo neinfekční antigeny. Je tedy pravděpodobné, že jsou nezbytnými kofaktory autoimunitních

onemocnění i dosud neidentifikované okolnosti infekce (VAN GHELUE, 2003). Protože BK virus zakládá u lidí perzistentní infekci a je vylučován v moči jedinců, kteří nevykazují symptomy onemocnění, nedá se dobře zhodnotit jeho možná role v rozvoji lidské rakoviny. Nicméně se v posledních letech začaly množit důkazy o možné roli BK viru v indukci nádorů, hlavně díky citlivé PCR amplifikaci, která umožnila vědcům prozkoumat i malý vzorek tkáně a zhodnotit, zda neobsahuje BK virové sekvence. Ty byly zaznamenány v mnoha lidských nádorech jako je rhabdomyosarkom, Kaposiho sarkom, v nádorech plic, jater, slinivky, mozku a v mnoha neoplazmatických změnách močového ústrojí. Další vědecké skupiny však spojitost BK viru s těmito nádory nenašly (shrnuje FIORITY *et al.*, 2005). Neexistuje tedy žádný určitý důkaz, který by potvrdil, že je BK virus přímou příčinou vzniku nádorů u lidí, nebo že působí jako kofaktor v patogenezi některých typů lidské rakoviny. Nutno zdůraznit, že patogeneze autoimunitních a onkologických onemocnění nevyžaduje nepřerušenu replikaci BK viru. Na rozdíl od této skutečnosti, je vysoká hladina replikace BK viru vlastností onemocnění jako je PVAN („polyomavirus–associated nephropathy“) a hemoragická cystitida.

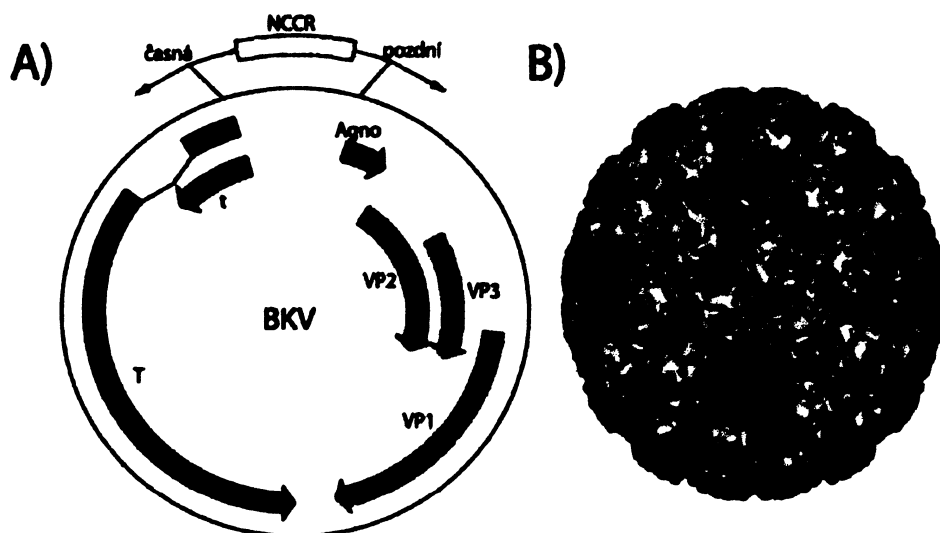
S BK virem jsou spojeny projevy onemocnění ledvin, močových cest, centrální nervové soustavy a dýchacího traktu. Nyní je BK virus spojován zejména s onemocněním „PVAN“, a to především v souvislosti s transplantacemi ledvin (HIRSCH *et al.*, 2002). Je alarmující, že PVAN je jednou z příčin odhojení transplantátu ledvin v prvních 2 letech po transplantaci až u 50% pacientů vykazující příznaky PVAN (HIRSCH & STEIGER, 2003). S replikací BK viru u pacientů po transplantaci ledvin je spojován i zánět močových cest. BK virus může být příčinou také symptomů podobných chřipce a infekci horních dýchacích cest u dětí, což svědčí o respiračním způsobu přenosu (GOUDSMIT *et al.*, 1982).

BK virus tedy vyžaduje specifické příležitosti, aby mohl projevit svůj rozličný patogenní potenciál. Imunosuprese, která je příčinou vysokých hladin BK virové replikace a tudíž i patologie orgánů je běžným charakteristickým znakem PVAN u pacientů po transplantaci ledvin a hemoragické cystitidy u pacientů po transplantaci kostní dřeně, ačkoli patogeneze těchto onemocnění je odlišná. Spojení BK viru s autoimunitními a nádorovými onemocněními je sporné a vyžaduje vývoj specifitějších diagnostických metod, nezávislých na testování replikace BK viru.

2.1.4 Virion a organizace virového genomu

Všechny členy čeledi *Polyomaviridae* mají genom tvořený kruhovou ds DNA. Úplná sekvence BK viru obsahuje 5 153 bp u kmene DUN (SEIF *et al.*, 1979), 4963 bp u kmene MM (YANG & WU, 1979) a 5 098 bp u kmene AS (YISHIIKE & TAKEMOTO, 1986). Kruhový virový genom je v komplexu s buněčnými histony H2A, H2B, H3 a H4. Genom BK viru má 75% homologii s genomem JCV a 70% homologii s genomem SV40 (SHAH, 1996). Genom BK viru je funkčně rozdělen do tří oblastí: časné, pozdní a nekódující kontrolní oblasti. Časná oblast, kóduje dva proteiny: velký-T (LT) a malý t-antigen, pozdní oblast kóduje virové kapsidové proteiny VP1, VP2 a VP3 a agnoprotein. Nekódující kontrolní oblast (NCCR) obsahuje replikační počátek (*ori*) a transkripční kontrolní elementy pro časnou a pozdní genovou expresi (SEIF *et al.*, 1979). Časná a pozdní transkripce běží z opačných DNA řetězců. Schéma genomu BK viru je

zobrazeno na obrázku 2.1.1. A. Strukturní kapsidové proteiny VP1, VP2 a VP3 tvoří neobalenou ikosahedrální kapsidu, která obklopuje „nucleocore“ obsahující jednu molekulu ds DNA genomu. Polyomavirová částice měří 40,5 až 44 nm v průměru. Viriony obsahují 88% proteinů a 12% DNA. Na obrázku 2.1.1. B je znázorněn virion BK viru.



Obr. 2.1.1: Organizace genomu a kapsidy BK viru. A) Schéma organizace genomu BK viru. Žlutě-nekódující kontrolní oblast (NCCR), zeleně-produkty časné kódující oblasti: malý (t) a velký (LT) antigen, černě-gen pro agnoprotein, červeně-gen pro protein VP2, oranžově-gen pro protein VP3 a modře-gen pro protein VP1. Směr exprese časné a pozdní kódující oblasti je znázorněn šipkami. B) (<http://www.cgl.ucsf.edu/Research/virus/capsids/1sva-5A-large.jpg>) Ikosahedrální kapsida BK viru. Tmavě modrou barvou jsou znázorněny pentavalentní kapsomery (kapsomery obklopené 5 sousedními kapsomery, viz dále).

2.1.5 Nekódující kontrolní oblast virového genomu (NCCR)

Virová nekódující regulační oblast (NCCR) je tvořena 300-500 bp a je umístěna mezi časnou a pozdní kódující oblastí. NCCR obsahuje počátek dvousměrné replikace virové DNA (*ori*) a sekvenční bloky označené O (142 bp), P (68bp), Q (39bp), R (63bp) a S (63bp), které slouží jako regulační oblasti a enhancer. Obsahují vazebná místa pro LT a pro buněčné transkripční faktory hrající roli v modulaci virové transkripce. V NCCR je také situován obousměrný promotor pro virovou transkripci časných a pozdních genů (MOENS & REKVIG, 2001). Pomocí počítačových přístupů a funkčních analýz sekvencí promotoru a enhancerů byl identifikován počet vazebných míst pro transkripční faktory v NCCR, jako je CRE („c-AMP-response-element“) v P bloku, dva vazebné elementy pro transkripční faktor „Sp-1“ v blocích Q a R a čtyři vazebná místa pro jaderný faktor-1 „NF-1“ v blocích P, Q, R a S (MOENS *et al.*, 1995).

NCCR různých BK virových kmenů se liší sekvencí (MOENS *et al.*, 1995). Existuje *in vitro* důkaz skutečnosti, že varianty NCCR určují permisivitu hostitelské buňky k viru a stupeň virové replikace (DANIEL *et al.*, 1996). Neví se, jestli jsou změny NCCR nezbytné pro patogenezi BK virové PVAN po transplantaci

KAPITOLA 2: LITERÁRNÍ PŘEHLED

ledvin, nicméně u nefropatie spojené s dalšími imunitními onemocněními byly BKV kmeny s přestavbami NCCR popsány (RANDHAWA *et al.*, 2003).

Navzdory vysoké heterogenitě NCCR, téměř všechny kmeny BKV obsahují sekvenci odpovídající na hormony. Ta se skládá z GRE/PRE („glukokortikoid/progesteron-response-element“) a z ERE („estrogen-response-element“) a oba motivy GRE/PRE a ERE zprostředkují zvýšení aktivity promotoru po stimulaci hormony (MOENS *et al.*, 1994). Přidání steroidních hormonů k buňkám infikovaným BK virem zvyšuje produkci pozdních virových kapsidových proteinů, které umožňují skládání většího počtu virových částic ve srovnání s neopůsobenými buňkami infikovanými BK virem. ERE a GRE/PRE jsou schopny zprostředkovat estrogen nebo glukokortikoid/progesteron aktivovanou transkripci, když jsou spojeny s heterologním promotorem a tyto elementy mohou vázat příslušný receptor *in vitro*. Aktivace promotoru BK viru estrogenovým receptorem může být zprostředkována buď ERE, nebo dvěma AP-1 vazebnými místy (MOENS *et al.*, 1999).

2.1.6 Produkty časné virové genové exprese

Časná oblast je velká 2,4 kbp a kóduje dva virové regulační proteiny známé jako tumorové nebo „T“ antigeny. Tyto proteiny jsou produkovány z mRNA vzniklých alternativním sestřihem primárních transkriptů a označují se jako velký T antigen (LT) a malý t antigen, na základě jejich velikosti (MOENS & REKVIG, 2001).

2.1.6.1 Velký T-antigen

Velký T antigen (LT) je velký jaderný fosfoprotein nezbytný pro replikaci virové DNA. Váže oblast počátku virové replikace (*ori*), kde indukuje rozvíjení dsDNA a rekrutuje buněčné proteiny vyžadované pro syntézu DNA. LT je hlavním virovým regulačním proteinem BK virové infekce. Díky jeho četným enzymovým aktivitám a schopnosti vázat DNA a řadu buněčných proteinů aktivuje produkci časných mRNA, iniciuje replikaci virové DNA a aktivuje pozdní genovou transkripci (LEE & LANGHOFF, 2002). LT je schopen interagovat s buněčnými tumorsupresorovými proteiny a optimalizovat prostředí pro virovou replikaci. Rekrutuje hostitelský komplex DNA polymerázy k počátku virové replikace pro zahájení obousměrné syntézy virové DNA (HARRIS *et al.*, 1998a). Aktivace pozdního virového promotoru pomocí LT a buněčných transkripčních faktorů vede k expresi pozdních genů BK viru (CASSIL *et al.*, 1989).

LT má také funkce, které deregulují normální fyziologický metabolismus buněk a navozuje imortalizaci a neoplastickou transformaci (IMPERIALE, 2000). Tím si také vysloužil pojmenování tumorový (T) antigen a je zařazován mezi onkoproteiny. LT je schopen transformovat hlodavčí buňky v tkáňové kultuře a v přítomnosti aktivovaných onkogenů jako je „*ras*“ nebo „*myc*“, může také imortalizovat lidské buňky (PORTOLANI & BORGATTI, 1978). LT BK viru váže proteiny z rodiny pRb a p53 (HARRIS *et al.*, 1996). Vazbou LT k p53 dochází k stabilizaci tohoto onkosupresoru, což interferuje s odpovědí p53 na poškození DNA (HARRIS *et al.*, 1998a). Protože jsou z časného promotoru BK viru exprimovány jen nízké hladiny LT, je obtížné detekovat významnější množství komplexů tohoto antigenu s pRb, p107 nebo p130. LT je schopen

vyvazovat hypofosforylovanou formu pRb z komplexu s transkripčním faktorem „E2F“, což umožňuje předčasné uvolnění E2F, který stimuluje buňky ke vstupu do S fáze buněčného cyklu (STUBDAL *et al.*, 1997) a umožňuje růst nezávisle na séru. Analýzy mutací LT ukázaly, že aktivace E2F vyžaduje nejen jeho pRb vazebnou doménu, ale také N koncovou doménu, zvanou J doména, podle strukturní a funkční homologie s rodinou DnaJ molekulárních chaperonů. Tato doména zprostředkuje mnoho důležitých funkcí LT spojených s transkripcí, replikací a transformací (HARRIS *et al.*, 1998b). Existuje hypotéza, že LT interaguje s proteiny rodiny pRb, vyvazuje je z komplexu s E2F a J doménou poté zprostředkovává degradaci pRb (IMPERIALE, 2000). LT navíc indukuje chromozomální aberace v tkáňové kultuře (TRABANELLI *et al.*, 1998).

Jak již bylo řečeno, genom BK viru obsahuje ERE. Když je tento element izolován, váže příslušný receptor *in vitro* a je-li spojen s heterologním promotorem, může zprostředkovat 17- β -estradiolem indukovanou genovou expresi. MOENS *et al.*, (1999) zkoumali účinky obecného koaktivátoru CBP („CREB binding protein“), LT a malého t-antigenu na transkripci zprostředkovanou estrogenovým receptorem. Konstitutivně aktivovaný estrogenový receptor stimuloval aktivitu BK virového promotoru v HeLa buňkách. Simultánní exprese LT a malého t-antigenu silně aktivovala transkripci zprostředkovanou estrogenovým receptorem. Nicméně když byly tumorové antigeny exprimovány odděleně, pouze LT mírně stimuloval transkripci zprostředkovanou estrogenovým receptorem. Stimulační účinek LT na aktivitu estrogenového receptoru je pravděpodobně nepřímý, protože nebyla detekována žádná vzájemná přímá interakce obou proteinů. LT rušil synergický účinek na transkripci estrogenového receptoru a obecného koaktivátoru CBP. Shledání, že časně proteiny BK viru zesilují transkripci zprostředkovanou estrogenovým receptorem, může mít důležité biologické následky u jedinců se zvýšenými koncentracemi estrogenu. MOENS *et al.*, (1999) spekulují, že zvýšené hladiny estrogenu mohou mít za následek reaktivaci viru, a proto je pozorován vzrůst produkce BKV u těhotných žen. Zvýšené hladiny estrogenu mohou aktivovat estrogenový receptor, který spolupracuje s LT a malým t-antigenem a silně zvyšuje aktivitu promotoru, což může způsobit reaktivaci BK viru (MOENS *et al.*, 1999). Steroidní hormony hrají důležitou roli i v indukci karcinomu mléčné žlázy, a estrogenový a progesteronový receptor jsou nejdůležitějšími hormonovými receptory spojenými s rozvojem rakoviny prsu (CLARKE *et al.*, 1991). Transgení myši exprimující virové tumorové antigeny pod kontrolou promotoru indukovaného estrogenem vyvinuly rakovinu prsu (SANTARELLI *et al.*, 1996).

2.1.6.2 Malý t-antigen

Role malého t-antigenu v životním cyklu polyomavirů je nejasná. Analýzy delečních mutant SV40 odhalily, že t-antigen není nezbytný pro lytickou infekci v tkáňové kultuře (SCHENK *et al.*, 1976). Také virová replikace BK viru je úspěšná i bez přítomnosti tohoto proteinu (MOENS & REKVIG, 2001). Nicméně malý t-antigen spolupracuje s velkým LT v transformaci buněk virem SV40 a zvyšuje titr viru při infekci permissivních buněk (SLEIGH *et al.*, 1978, RUNDELL & PARAKATI, 2001).

2.1.7 Produkty pozdní virové genové exprese

Pozdní kódující oblast je velká 2,3 kbp a obsahuje geny pro hlavní strukturální protein VP1 a dva minoritní strukturální proteiny VP2 a VP3. mRNA pro všechny tři kapsidové proteiny se tvoří alternativním sestřihem z jedné pre-mRNA. Translace VP2 a VP3 běží z alternativních startovních kodonů jedné mRNA (MOENS & REKVIK, 2001). Pozdní oblast také kóduje pomocný agnoprotein.

2.1.7.1 Hlavní strukturální protein VP1 a struktura kapsidy BKV

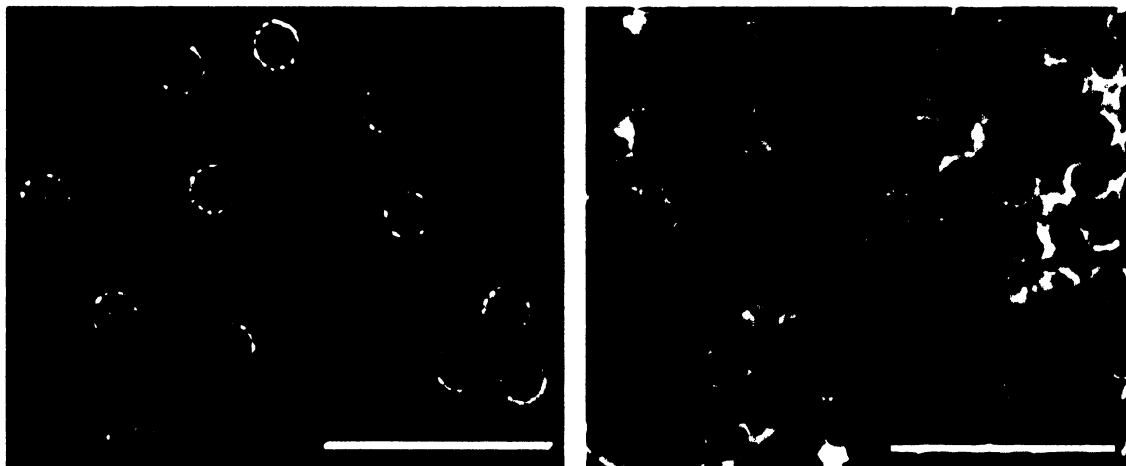
VP1 je 40 kDa protein tvořící strukturu virové kapsidy. Virion BK viru má podobnou strukturu jako virion SV40 nebo MPyV, jejichž struktura byla určena z krystalografických dat (BAKER *et al.*, 1989 LIDDINGTON *et al.*, 1991, STEHLE *et al.*, 1994, STEHLE *et al.*, 1996). Ikosahedrální kapsida (o průměru 45 nm) je složena ze 72 pentamerů proteinu VP1, z nichž 60 pentamerů je hexavalentních a 12 pentamerů (přítomných ve vrcholech ikosahedru) je pentavalentních (*obr. 2.1.1. B*). Pentamery proteinu VP1 viru SV40 a MPyV jsou sestaveny jako prstence pěti monomerů proteinu VP1, který má tvar β -barelu, ze kterého vyčnívají N-koncová a C-koncová ramena (LIDDINGTON *et al.*, 1991, STEHLE *et al.*, 1996). Monomery VP1 jsou těsně svázány v pentamery přes vzájemně propletené β -řetězce (CHEN *et al.*, 1998).

Protein VP1 lze rozdělit do 3 oblastí: N konec tohoto proteinu (prvních 15 aminokyselin) je orientován dovnitř dutiny pentameru, kde pravděpodobně interaguje s nukleoproteinovým jádrem. V N konci proteinu VP1 je obsažen i jaderný lokalizační signál (NLS) (prvních 11 aminokyselin) (CHANG *et al.*, 1992a) a DNA vazebná doména (prvních 5 aminokyselin) interagující s DNA nespecificky bez ohledu na její sekvenci (CHANG *et al.*, 1993). NLS na N-konci VP1 BK viru je zodpovědný za jeho transport do jádra, kde se skládají viriony. Střední část proteinu je tvořena α -helixy a β -listy, které jsou vzájemně spojeny smyčkami: BC, DE, HI, EF, a FG. Smyčka EF je součástí vazebného místa pro vápenaté ionty. Smyčky BC, DE a HI jsou na povrchu kapsidy a hrají roli při adsorpci viru na hostitelskou buňku. Dlouhá flexibilní C-koncová ramena proteinů VP1 vycházející z každého pentameru zprostředkovávají vazby mezi sousedícími pentamery (GARCEA *et al.*, 1987). Flexibilní C konce VP1 umožňují variabilitu v kontaktech mezi pentamery a tím i tvorbu 6 typů interpentamerních vazeb: α , α' , α'' , β , β' a γ (STEHLE *et al.*, 1996).

Za určitých podmínek se kapsida polyomavirů rozpadá na jednotlivé pentamery, které mohou být znovu složeny. Tyto znovu složené částice mohou mít odlišné uspořádání a velikosti v závislosti na složení pufru. To se ukázalo u rekombinantních kapsid viru SV40 (KANESASHI *et al.*, 2003) a rekombinantních VLPs myšího polyomaviru (SALUNKE *et al.*, 1989). SALUNKE *et al.*, (1989) demonstrovali, že je myší polyomavirus schopen tvořit tři druhy různě velikých VLPs na základě použitého pufru. Pomocí počítačového modelování došli k závěru, že dva druhy takových znovu složených VLPs mají ikosahedrální symetrii a jsou složeny z 12 (T=1) nebo 72 (T=7) pentamerů. Třetí druh částic byl složen z 24 pentamerů a měl oktahedrální symetrii.

Gen pro majoritní strukturální protein VP1 BK viru byl exprimován v hmyzích buňkách s použitím rekombinantního bakulovirového vektoru (LI *et al.*, 2003a). VP1 BK viru se v jádře těchto buněk sám skládal do VLPs a částice byly po destrukci hmyzích buněk uvolňovány do média v tkáňové kultuře. Tyto VLPs měly

podobné antigenní vlastnosti jako nativní BK virové částice a elektronovou mikroskopií metodou negativního barvení byly od sebe nerozeznatelné. Na obrázku 2.1.2. A. je elektron mikroskopický snímek virionů BK viru, na obrázku 2.2.1. B je elektron mikroskopický snímek prázdných VLPs složených v hmyzích buňkách z VP1 BK viru.



Obr. 2.1.2: Porovnání struktury virionů BK viru s prázdných VLPs složených z hlavního strukturního proteinu VP1 BK viru. A) Viriony BK viru izolované centrifugací v CsCl gradientu z buněk VERO infikovaných BK virem. B) VLPs složené z proteinu VP1 BK viru izolované centrifugací v CsCl gradientu z hmyzích buněk infikovaných rekombinantním bakulovirem produkujícím protein VP1. Měřítka odpovídá velikosti 200 nm. Elektromikroskopické snímky byly zhotoveny V. Žilou.

2.1.7.2 Minoritní strukturní proteiny VP2 a VP3

Minoritní proteiny VP2 (38 kDa) a VP3 (27 kDa) jsou, stejně jako majoritní protein VP1 (40 kDa), součástí virionu. Jejich role v životním cyklu polyomavirů je doposud nejasná. Mohou se účastnit prakticky všech fází virové infekce počínaje vstupem BK viru do buňky, dopravy virového genomu do jádra, skládání a uvolnění virionů z buňky i indukce buněčné destrukce. Podrobněji je těmto strukturním proteinům věnována kapitola 2.2.

2.1.7.3 Agnoprotein

Sekvenování genomu viru SV40 odhalilo přítomnost malého otevřeného čtecího rámce (ORF) v proximální části pozdní oblasti, která byla nazvána agnogen (DHAR *et al.*, 1977). Produkt SV40 agnogenu (agnoprotein) byl identifikován jako 7,9 kDa protein produkovaný v pozdní fázi infekce. Tento protein má krátký poločas života (cca 2h), je vysoce bazický ($pI=10,6$) a váže jak ssDNA, tak dsDNA (JAY *et al.*, 1981). Agnoprotein viru SV40 je asociován s virovými prekurzory, ale nikoli s maturovanými viriony (JACKSON & CHALKLEY, 1981). Při srovnání sekvence genomů virů SV40, BKV a JCV byla odhalena přítomnost proteinů kódovaných agnogenem o velikostech 62 aminokyselin u viru SV40, 71 aminokyselin u viru BK a 66 aminokyselin u viru JC (COLE, 1996). Agnoprotein BK viru (RINALDO *et al.*, 1998) je detekovatelný v perinukleární oblasti a cytoplasmě v pozdní fázi infekce. Tento protein je fosforylován *in vivo* a může být imunoprecipitován se skupinou hostitelských buněčných proteinů. Funkce agnoproteinu BK viru nebyla

KAPITOLA 2: LITERÁRNÍ PŘEHLED

přesně definována, ale doposud získaná data svědčí o jeho možné roli v morfogenezi virionů, úniku virionů z buňky, regulaci buněčného cyklu, virové replikaci a genové expresi (shrnuto v KHALILI *et al.*, 2005). Ačkoli C-konec agnoproteinu vykazuje významnou diverzitu aminokyselinové sekvence, N koncové a centrální domény agnoproteinů jsou v rámci čeledi *Polyomaviridae* vysoce konzervovány, což svědčí o jejich významné funkci (shrnuto v KHALILI *et al.*, 2005).

N-koncové a C-koncové domény agnoproteinu jsou hydrofilní, zatímco centrální část proteinu je relativně hydrofóbní (VON HEIJNE, 1981). Předpokládaná sekundární struktura svědčí o přítomnosti několika možných „helix-turn-helix“ domén, a o tom, že centrální doména může mít α -helikální konformaci (GARNIER *et al.*, 1978). Agnoproteiny jsou velmi bazické proteiny a obsahují možná místa pro fosforylaci serinu a threoninu. Metabolické značení buněk infikovaných BK virem opatřilo přímý důkaz fosforylace agnoproteinu (RINALDO *et al.*, 1998).

LEUENBERGER *et al* (2007) se snažili dokázat svou hypotézu, že agnoprotein může být důležitým antigenem, vzhledem k jeho vysoké konzervovanosti a hojné expresi *in vitro*. Proto se rozhodli zhodnotit expresi BK virového agnoproteinu *in vivo* z biopsií ledvin pacientů po transplantaci ledvin. Srovnávali humorální a buněčné odpovědi proti tomuto proteinu u pacientů po transplantaci ledvin a zdravých jedinců. LEUENBERGER *et al*, (2007) ukázali, že je agnoprotein exprimován v tubulárních epiteliálních buňkách ledvin u pacientů po transplantaci ledvin s histologicky definovanou PVAN. Exprese agnoproteinu *in vivo* a *in vitro* byla nalezena výhradně v buňkách pozitivních na LT. Oproti tomu LT byl detekovatelný v jádře buněk, ve kterých množství agnoproteinu kolísalo. Navzdory hojné expresi agnoproteinu BKV *in vivo*, LEUENBERGER *et al* (2007) nenašli odpovídající hladinu buněčné ani humorální odpovědi, na rozdíl od odpovědi na majoritní strukturální protein VP1 a LT. Buněčné a humorální imunitní odpovědi proti BK virovému agnoproteinu jsou vzácné a odráží jeho slabou imunogenicitu.

2.1.8 Genetická variabilita BK viru

Ačkoli je kódující oblast BK viru vysoce konzervovaná, existují zde minimální variace v pozdní oblasti kódující majoritní kapsidový protein VP1, podle nichž jsou kmeny BK viru rozděleny do genotypů (I-IV). Spojitost BKV genotypů s klinickými příznaky nebyla donedávna potvrzena (KNOWLES, 2001), ale nedávno se ukázalo, že je genotyp „I“ predominantním genotypem v moči u pacientů s hemoragickou cystitidou, a proto bývá spojován s rozvojem této nemoci u recipientů transplantátu kostní dřeně (FIORITI *et al.*, 2005).

Variabilita sekvencí genomu BK viru se projevuje i v NCCR oblasti. Genetické variace zde vznikají díky bodovým mutacím, delecím a duplikacím základních regulačních elementů a mohou mít dramatický vliv na transkripční, transformační a replikační potenciál variant BKV (MOENS *et al.*, 1995). CARR *et al.*, (2006) analyzovali vliv mutací a v genu pro VP1 na rozvoj hemoragické cystitidou u pacientů po transplantaci kostní dřeně. Došli k závěru, že samotné genetické změny nejsou za tento stav zodpovědné. Zároveň identifikovali pět nových kmenů BK viru a utvořili hypotézu, že delece a substituce u BKV variant mohou být tvořeny přestavbami mateřského kmene „WW“ BK viru.

CHEN *et al.*, (2004) charakterizovali sekvence 6 nových klonů BKV získaných z moči jedince pozitivního na HIV-2 a ze zdravého kontrolního jedince. Jejich výsledky svědčí o překvapivém množství variant „kvazidruhů“ BKV, existujících současně v jednom a tom samém hostiteli.

2.1.9 Životní cyklus BK viru

Časné stádium replikačního cyklu BKV začíná primárními interakcemi BK viru s povrchem hostitelské buňky a pokračuje až do počátku replikace virové DNA. Pozdní stádium zahrnuje všechny následující události vedoucí ke skládání nových virových částic a uvolnění virového potomstva z buňky.

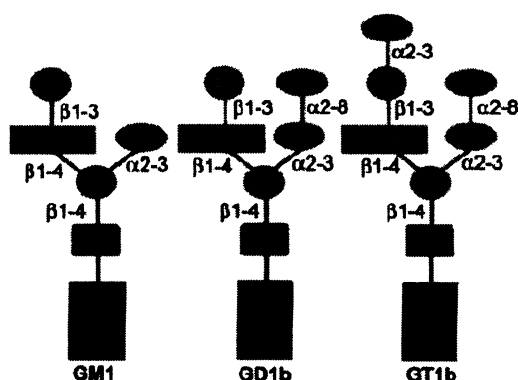
2.1.9.1 Receptory pro BK virus

Buněčný cyklus BK viru začíná adsorpcí virionů na povrch buňky. Identifikace buněčného receptoru pro BK virus je jednou z mnoha klíčových otázek, které si vědecké skupiny zabývající se BK virem pokládaly v předchozích letech. SEGANTI *et al.*, (1981) ukázali, že BK virus je schopen hemaglutinovat lidské erythrocyty, a že je tato aktivita citlivá k štěpení neuraminidázou. Další studie zjistily, že se hemaglutinace, zprostředkovaná BK virem, po přidání rozpustných gangliozidů k buňkám sníží (SINIBALDI *et al.*, 1987). Opůsobení VERO buněk neuraminidázou, která štěpila zbytky sialových kyselin u mnoha gangliozidů a glykoproteinů inhibovalo infekci BK virem a přidání gangliozidů k těmto asialovaným buňkám infekci opět obnovilo (SINIBALDI *et al.*, 1990). Navíc gangliozidy byly identifikovány jako receptory pro myši polyomavirus a virus SV40 (TSAI *et al.*, 2003, GILBERT & BENJAMIN, 2003, GILBERT & BENJAMIN, 2000). Časně studie receptorů tedy objasnily roli sialových kyselin a polysialovaných gangliozidů ve vstupu BK viru do buněk VERO a ve vazbě viru k erythrocytům, nicméně neidentifikovaly receptor.

DUGAN *et al.* (2005) ukázali, že N-glykoprotein obsahující koncovou $\alpha(2,3)$ sialovou kyselinu je kritický pro infekci VERO buněk virem BK. To dokázali enzymatickým odstraněním $\alpha(2,3)$ a $\alpha(2,6)$ sialových kyselin z povrchu buněk VERO. Použili enzym sialidázu-S „SAS“, která specificky odstraňuje $\alpha(2,3)$ sialové kyseliny z glykoproteinů a komplexu karbohydrátů a enzym neuraminidázu (NA). Když je „NA“ ve vysokých koncentracích, pak odstraňuje $\alpha(2,3)$ i $\alpha(2,6)$ sialové kyseliny z glykoproteinů, gangliozidů a z komplexu karbohydrátů, ale je-li v nízkých koncentracích, pak odstraňuje pouze $\alpha(2,3)$ sialovou kyselinu. Skutečnost, že obě koncentrace „NA“ inhibovaly infekci, svědčí o roli $\alpha(2,3)$ sialových kyselin v infekci buněk BK virem. Další důkaz role těchto sialových kyselin v infekci BK virem podali, když úplně odstranili sialové kyseliny z povrchu buněk a poté buňky opůsobili $\alpha(2,3)$ specifickou sialyl-transferázou, aby došlo k rekonstituci sialových kyselin na buněčném povrchu. Po této rekonstituci se buňky staly opět citlivými k infekci BK virem. Protože je tento enzym specifický pro $\alpha(2,3)$ sialyzaci na N-glykoproteinech, bylo zřejmé, že jsou pro zprostředkování infekce postačující $\alpha(2,3)$ sialové kyseliny na N-glykoproteinech. Další otázkou bylo, zda může být infekce obnovena v asialovaných buňkách po opůsobení $\alpha(2,6)$ specifickou sialyl-transferázou. Buňky s obnovenými $\alpha(2,6)$ sialovými kyselinami však zůstávaly rezistentní k infekci BK virem, což vyloučilo roli $\alpha(2,6)$ sialových kyselin v infekci BK virem. Aby podpořili roli N-glykoproteinů, jakožto receptorů pro BK virus, použili metabolické

inhibitory N glykosylace (tunikamycin) a O-glykosylace (benzyl-N-acetyl- α -D-galaktosaminid). Zatímco inhibice N-glykosylace tunikamycinem snižovala infekci, redukce O-glykosylace nikoliv. Navíc O-specifická $\alpha(2,3)$ sialyl-transferáza nebyla schopná obnovit infekci v buňkách zbavených sialových kyselin. DUGAN *et al.*, (2005) tedy ukázali, že N-glykoproteiny obsahující $\alpha(2,3)$ sialové kyseliny jsou nezbytnou složkou buněčného receptoru pro BK virus.

Protože všechny časně studie svědčily o tom, že gangliozidy mohou ovlivnit interakce BK viru s buňkou, LOW *et al.*, (2006) vytvořili hypotézu, že BK virus může interagovat na povrchu lidských buněk se specifickou skupinou gangliozidů. Jejich pokusy přinesly důkazy o tom, že gangliozidy GT1b a GD1b jsou molekuly, které vážou BK virus *in vitro* a slouží jako receptory pro virus na povrchu buněk. Protože se BK virus nebyl schopen vázat s dalšími gangliozidy, je pravděpodobné, že interaguje spíše se specifickými karbohydráty pro dané gangliozidy, než s lipidem ceramidem, který je u všech gangliozidů stejný. LOW *et al.* (2006) demonstrovali, že BK virus interaguje s membránami erytrocytů a určili, že je tato interakce závislá na molekule, která je citlivá k neuraminidáze, ale rezistentní k proteináze K. Interakce mezi BK virem a membránami tedy nebyla závislá na proteinové složce, ale na zbytku sialových kyselin. Ukázali také, že BK virus interaguje specificky s gangliozidy GD1b a GT1b a nikoliv s GM1, když inkorporovali tyto gangliozidy do lipozomů. Navíc BK virus nebyl schopen infikovat buňky, na kterých nebyly gangliozidy GD1b a GT1b přítomny beztoho, aniž by k nim tyto gangliozidy nebyly přidány. Interakce mezi BK virem a gangliozidy GD1b a GT1b, ale nikoliv s GM1 vede k závěru, že je interakce závislá na motivu disialové kyseliny. Schéma gangliozidů GT1b, GD1b a GM1 je na obrázku 2.1.3.



Obr. 2.1.3: Schéma gangliozidů GM1, GD1b a GT1b (Low *et al.*, 2006). SA-sialová kyselina, Gal-galaktóza, Glc-Glukóza, GalNAc-N-acetyl-galaktózamin, Cer-ceramid.

2.1.9.2 Mechanismus vstupu BK viru do buňky

Stejně jako další DNA viry i BK virus vstupuje do buňky pomocí endocytózy (KASAMATSU & NAKANISHI, 1998). Ačkoli existují elektromikroskopická pozorování lokalizace BKV virionů v hladkých lahvovitých cytoplasmatických invaginacích připomínajících caveolae (PETROGIANNIS-HALLOTIS *et al.*, 2001), studii charakterizující mechanismus endocytózy BK viru do buňky provedl až EASH *et al.*, (2004). EASH *et al.*, (2004) zkoumali kinetiku a mechanismus vstupu BK viru do buněk VERO. Protože endocytóza zprostředkovaná caveolae je definována citlivostí k cholesterolu, nezávislostí na clathrinu a závislostí na

caveolinu-1 a dynaminu (NABI & LE, 2003), zaměřili se právě na tyto charakteristiky. Jejich výsledky ukázaly, že je BK virus, na rozdíl od rychle internalizovaného JC viru, který vstupuje do buněk přes clathrinové váčky, internalizován relativně pomalu. Většina infekčního BK viru vstoupí do buněk, a unikne tak účinkům neutralizačního séra mezi 2 a 4 hodinou po začátku synchronizované infekce. Zpožděná internalizace byla připsána i viru SV40, který vstupuje do buňky přes caveolae (PHO *et al.*, 2000). Internalizace závislá na clathrinu umožňuje JC viru uniknout účinkům neutralizačního séra do 30 minut po začátku aktivní endocytózy (PHO *et al.*, 2000). EASH *et al.*, (2004) dále hodnotili potřebu cholesterolu na buněčném povrchu během časných kroků BK virové infekce. Zkoumali účinek látky methyl- β -cyklodextrinu (M β CD), která odčerpává cholesterol, na BK virovou infekci. Protože M β CD měl na infekci inhibiční účinek, je zřejmé, že membránové domény bohaté na cholesterol, jako jsou lipidové rafty, hrají roli v internalizaci BK viru. Další pokus této skupiny vyloučil úlohu clathrinové endocytózy BKV. V buňkách „VERO“ produkovali dominantně-negativní mutantu proteinu, který je vyžadován pro časné kroky na clathrinu závislé endocytózy, aby došlo k narušení internalizace tímto mechanismem. Nicméně i tyto buňky byl BK virus schopen infikovat. Redukce infekčnosti byla pozorována naopak v buňkách, které exprimovaly dominantně-negativní mutantu caveolinu-1. Inhibitor thyrozin-kinázy „genistein“ inhiboval infekci v raném stádiu infekčního cyklu BK viru, což svědčí o indukci vnitrobuněčné signalizace důležité pro produktivní infekci. Další pokusy odhalily ko-lokalizaci BK viru s markerem caveolinové endocytózy: podjednotkou B cholera toxinu (CT-B). Všechna tato data svědčí o skutečnosti, že během produktivní infekce vstupuje BK virus do buněk VERO přes caveolae.

MORIYAMA *et al.* (2007) zkoumali vstup BK viru do lidských ledvinových proximálních epiteliálních buněk (HRPETC). Používali methyl- β -cyklodextrin (M β CD) a nystatin (Nys) pro depleci cholesterolu. Obě látky inhibovaly infekci buněk HRPETC BK virem. Dále zkoumali, zdali je exprese caveolinu-1 nutná pro internalizaci BK viru. Proto MORIYAMA *et al.*, (2007) transfekovali buňky malými interferujícími RNA (siRNA) namířenými k degradaci mRNA pro caveolin-1 a také clathrin, jako negativní kontroly. Výsledky tohoto pokusu ukázaly, že siRNA zprostředkovaný „knockdown“ caveolinu-1 způsobuje inhibici infekce buněk HRPETC BK virem, zatímco „knockdown“ clathrinu neměl na infekci BK virem vliv. To byl další důkaz toho, že BK virus vstupuje do buněk přes caveolae. MORIYAMA *et al.* (2007) dále sledovali dynamiku ko-lokalizace barveného BK viru s caveolinem-1 a clathrinem. Barvené BKV částice ko-lokalizovaly s caveolinem-1 a ne s clathrinem, přičemž největší ko-lokalizace byla 4 hodiny po inkubaci.

2.1.9.3 Doprava genomu BKV k jádru

Dráhy, podél nichž cytolem putují endocytické váčky jsou tvořeny cytoskeletárními mikrotubuly (polymery globulárních tubulinových podjednotek), mikrofilamenty (polymery proteinu aktinu) a intermediálními filamenty.

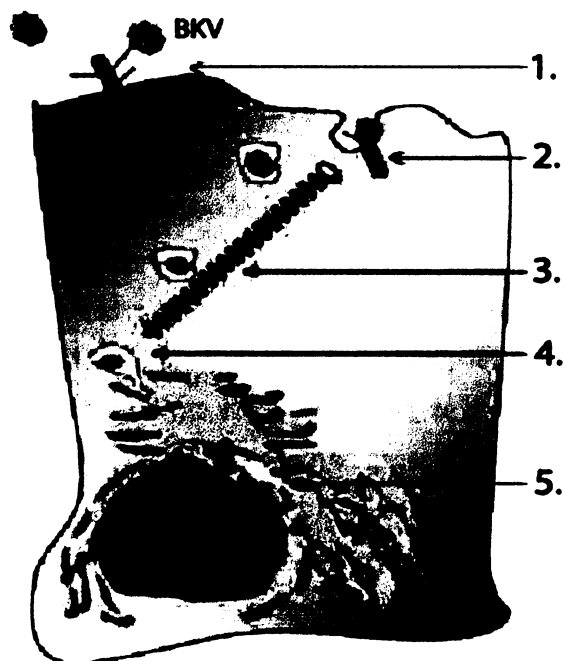
EASH *et al.*, (2005) zkoumali roli mikrofilament a mikrotubulů v transportu BK viru cytoplazmou pomocí látek, které selektivně narušovaly architekturu a dynamiku těchto hlavních složek cytoskeletu. Použití Latrunculinu A, jakožto látky rozrušující aktinová mikrofilamenta, nebránilo infekci BKV, zatímco stabilizace

KAPITOLA 2: LITERÁRNÍ PŘEHLED

aktinových vláken pomocí látky Jasplakinolidu vyvolalo inhibiční účinek na BK virovou infekci. Shledání EASHe *et al.*, (2005), že progresse časné infekce BK viru v buňkách není ovlivněna rozpadlou sítí mikrofilament, je v souladu s předchozími studiemi, které uvádí, že u dalších polyomavirů internalizovaných na clathrinu nezávislou endocytózou, není pro putování cytoplazmou potřeba neporušený aktinový cytoskelet (ASHOK & ATWOOD, 2003, GILBERT *et al.*, 2003, PELKMANS *et al.*, 2002).

EASH *et al.*, (2005) dále zkoumali roli mikrotubulů v časné infekci buněk „VERO“ BK virem. Za tímto účelem použili dvě látky: nocodazol a paclitaxel, které mají opačné účinky na stabilitu mikrotubulů. Reverzibilní inhibice polymerizace mikrotubulů nocodazolem značně snížila infekčnost BK viru. Infekčnost BKV byla obnovena po odmytí nocodazolu. EASH *et al.*, (2005) sledovali také vnitrobuněčný osud cholera toxinové podjednotky B (CT-B), využívající při vstupu do buňky dráhu závislou na caveolách, v buňkách VERO opůsobených nocodazolem a v kontrolních buňkách. Jejich výsledky ukázaly, že ačkoli byla CT-B úspěšně internalizována buňkou s depolymerizovanými mikrotubuly, nebyla schopna vstoupit do Golgiho aparátu tak, jako CT-B v buňkách s neporušenou sítí mikrotubulů. To svědčí o tom, že v nepřítomnosti polymerizovaných mikrotubulů je caveolární „cargo“ úspěšně internalizován buňkou, ale jeho následná vnitrobuněčná dráha je změněna. Viriony BKV vstupující do nocodazolem ovlivněné buňky mohou být vystaveny podobnému vnitrobuněčnému osudu jako CT-B a pohyb s využitím aktinu by je mohl navést na degradační dráhu. Inhibiční účinek porušených mikrotubulů na virovou infekčnost byl pozorován do osmé hodiny po infekci. Zastavení dynamiky mikrotubulů paclitaxelem neinterferovalo s infekčností BK viru. Virus tedy spíše využívá mikrotubuly jako dráhy k postupu do určených vnitrobuněčných kompartmentů (EASH *et al.*, 2005).

Putování BK viru k jádru nebylo prozatím zcela popsáno (*obr. 2.1.4*). BKV ko-lokalizuje s CT-B mezi 4 a 6 hodinou po infekci, což svědčí o tom, že by mohl cestovat přes Golgiho aparát do ER podobně jako CT-B (EASH *et al.*, 2004). Nebo se BKV může chovat podobně jako virus SV40, obcházet Golgiho aparát a akumulovat se v ER (PELKMAN *et al.*, 2001, NORKIN & KUKSIN, 2005, NORKIN *et al.*, 2002). Analýzy váčků obsahujících částice BKV odhalily jejich fúzi se strukturami podobnými ER a možná s Golgiho aparátem. Poté se tyto částice akumulovaly v perinukleární oblasti (DRACHENBERG *et al.*, 2003). Nicméně jak BK virus, a další členové čeledi *Polyomaviridae* vstupují do jádra, zůstává hlavní otázkou, kterou bezvýsledně vědecké skupiny řeší již řadu let.



Obr. 2.1.4: Dráha vstupu infekčního BK viru do hostitelské buňky (převzato z Dugan *et al.*, 2006). 1- Adsorpce na $\alpha(2,3)$ sialovou kyselinu N glykoproteinů a gangliosidů. 2-Internalizace BK viru pomocí caveolae zprostředkované endocytózy. 3-Pohyb BKV buňkou s využitím polymerizace mikrotubulů. 4- Fúze váčků nesoucích BKV s membránami Golgiho aparátu a ER. 5- Akumulace viru v perinukleární oblasti buňky.

2.1.9.4 Časná jaderná fáze infekce BK virem.

Po vstupu do jádra slouží genom BK viru jako templát pro transkripci časných virových genů kódujících LT a malý t-antigen. Tohoto procesu se účastní buněčná RNA polymeráza II. Oblast promotoru BKV nebyla doposud úplně charakterizována. Jako je tomu i u dalších polyomavirů, i zde archetypový kmen „WW“ podstupuje přestavby, které vedou k variabilitě transkripční aktivity. Předchozí studie poukázaly na vazebná místa pro buněčné transkripční faktory „NF-1“, „Sp-1“, „AP1“, „C/EBP β “ a „NF κ B“ v promotoru BKV, nicméně význam těchto transkripčních faktorů nebyl doposud zcela objasněn (shrnuto v EASH *et al.*, 2006). Faktory, které mohou řídit tkáňově specifickou transkripci časného promotoru BKV nejsou známy. Zatímco byl identifikován počet předpokládaných vazebných míst pro transkripční faktory, není zcela jasné, které z těchto faktorů mohou skutečně vázat regulační oblast BK viru. U viru SV40 se ukázalo, že je jeho časná exprese regulována také virovou microRNA (miRNA) (SULLIVAN *et al.*, 2005). Ta je kódována hned za pozdním poly(A) místem a odpovídá malé molekule RNA neznámé funkce, nazvané „SAS“ (SV40-associated small RNA). Tyto miRNA jsou komplementární k časně mRNA a akumulují se během pozdní fáze infekce, kde cílí časnou mRNA pro degradaci. Spekuluje se o tom, že rolí těchto miRNA je omezování produkce antigenů, které by mohly být rozpoznány imunitním systémem hostitele. Také další polyomaviry primátů mají podobně umístěné sekvence, které by mohly tvořit charakteristické vlásenkové struktury miRNA.

Když je hostitelská buňka indukována virovým LT k tomu, aby vstoupila do S fáze, navozuje LT primátích polyomavirů vhodné buněčné prostředí pro virovou replikaci. Aby iniciovaly replikaci DNA, vážou se dva hexamery tohoto virového proteinu k specifickým sekvencím v počátku replikace a rekrutují komplex hostitelské DNA polymerázy α a primázy k počátku pomocí přímých interakcí LT s enzymem. Poté působí LT jako helikáza, která rozvíjí molekulu DNA v počátku replikace. Se začátkem replikace virové DNA začíná i

pozdní transkripcí. I v tomto procesu má LT svou roli a působí jako silný aktivátor pozdního virového promotoru, ze kterého po zahájení replikace probíhá exprese pozdních virových genů VP1, VP2 a VP3 a pomocného agnoproteinu.

U viru SV40 i myšího polyomaviru se ukázalo, že jsou jejich genomy po vstupu do jádra cíleny k jaderným tělískům charakterizovanými přítomností PML proteinu (PML tělíska) (PLEVKA, 2002). Lokalizace genomů SV40 i MPyV na periférii PML-tělisek vyžaduje jak LT, tak neporušený počátek replikace DNA (TANG *et al.*, 2000). Také se ukázalo, že DNA je v blízkosti těchto tělísek transkribována a replikována. (TANG *et al.*, 2000, ISHOV & MAUL, 1996, PLEVKA, 2002 & RYABCHENKO-nepublikované výsledky). Je možné, že tyto viry využívají toho, že se v PML tělískách hromadí různé enzymy a transkripční faktory pro účinnou transkripci vlastních genomů. JUL-LARSEN *et al.*, (2004) ukázali, že PML tělíska akumulují nově syntetizovanou DNA v buňkách infikovaných lidskými polyomaviry. Významná část této DNA byla jednořetězcová a akumulace DNA vyžadovala aktivní syntézu virové DNA. Navrhli, že PML tělíska asociují s místy virové replikace, protože mohou fungovat v metabolismu DNA a možná i v opravách rekombinace DNA.

Funkce PML tělísek se intenzivně zkoumá a hromadí se důkazy o tom, že by mohla mít, mimo jiných funkcí, roli v obranných protivirových mechanismech. Tomu nasvědčuje skutečnost, že se v PML tělískách hromadí řada proteinů, jejichž produkce je indukována interferonem a také fakt, že některé časné proteiny větších DNA virů (adenovirů nebo herpesvirů) PML tělíska rozrušují (shrnuto v EVERETT, 2001). Je možné, že malé viry, jako jsou polyomaviry, zaujímají odlišnou strategii a možná prostřednictvím LT dovedou nějak protivirovou obranu tělísek překonat a dokonce z nich těžit.

2.1.9.5 Pozdní fáze infekce BK virem.

V pozdní fázi infekce BK virem dochází k morfogenezi virionů a jejich uvolnění z hostitelské buňky. Tyto procesy infekčního cyklu nejen BK viru, ale i dalších polyomavirů, jsou velmi nejasné. Morfogeneze polyomavirů začíná tvorbou kapsomer a transportem proteinů VP1, VP2 a VP3 do jádra. Interakce minoritních proteinů s proteinem VP1 je zprostředkována jejich C koncem. Všechny tři strukturální proteiny obsahují ve své sekvenci jaderný lokalizační signál (NLS). Rekombinantní proteiny VP1 produkované v *E. coli* nebo v hmyzích buňkách infikovaných rekombinantním bakulovirem se mohou samy skládat do kapsomer. Za vhodných podmínek mohou tyto kapsomery spontánně tvořit pseudokapsidy (VLPs). Pro tvorbu kapsidy tedy není zapotřebí virová DNA, ani minoritní proteiny (FIELDS, 2007). Také u BK viru jsou kapsidy schopné složit se pouze z proteinu VP1 bez pomoci dalších buněčných či virových proteinů, pokud jsou exprimovány v eukaryotických expresních systémech (LI *et al.*, 2003a)

Způsob jakým polyomaviry opouštějí hostitelskou buňku je nejasný. Zatímco některé studie předpokládají, že se virus uvolní až po destrukci buňky, jiné studie předpokládají, že se virus uvolňuje i z živých buněk (FIELDS, 2007). Také samotné uvolnění virionů z jádra může být procesem aktivním, závislým na rozrušení jaderné laminy, jak bylo pozorováno u myšího polyomaviru (MANINOVÁ, 2007).

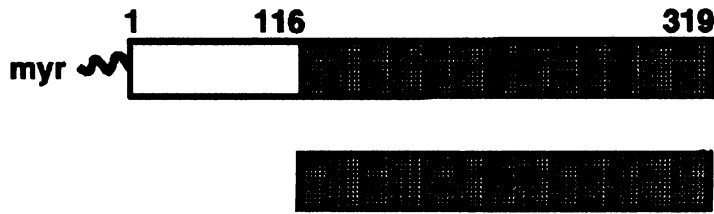
2. 2. Minoritní strukturní proteiny polyomavirů

Role minoritních strukturních proteinů v životním cyklu polyomavirů je doposud velmi nejasná. V této kapitole se, kromě charakterizace hlavních aminokyselinových úseků minoritních proteinů, věnuji možným funkcím těchto proteinů ve všech fázích replikačního cyklu polyomavirů. Protože existují rozdíly v minoritních proteinech hlodavčích a primátů polyomavirů, pokusila jsem se je vystihnout na nejvíce prostudovaném myším polyomaviru (MPyV) a na opičím polyomaviru SV40 (SV40).

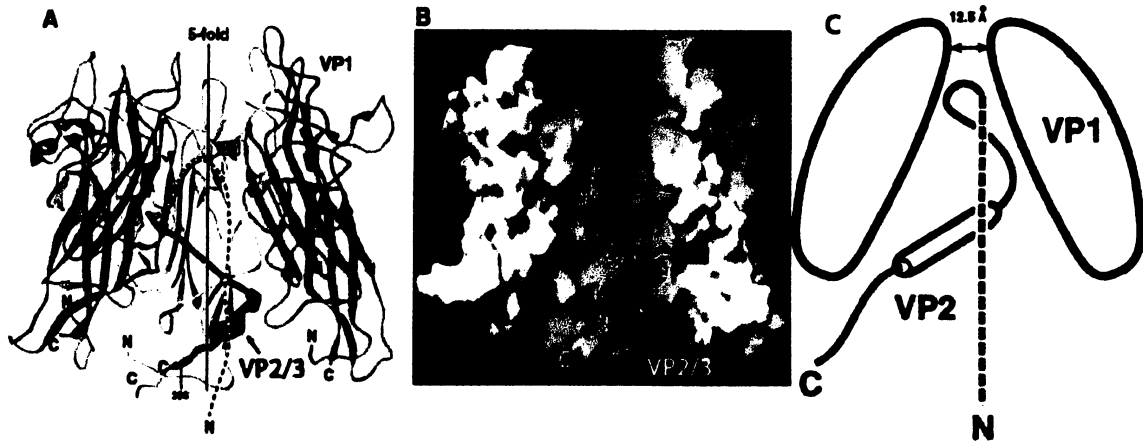
2.2.1 Umístění minoritních proteinů v kapsidě.

Minoritní proteiny VP2 a VP3 jsou sekvenčně příbuzné. Protože se gen pro VP3 překrývá s C koncovou částí genu pro VP2 a příslušné mRNA jsou překládány ve stejném čtecím rámci, sekvence VP3 je zcela obsažena v C koncové části VP2. Protein VP2 navíc obsahuje unikátní N koncovou část, (BAROUCH & HARRISON, 1994), která je u všech polyomavirů myristylována (STREULI & GRIFFIN, 1987) (obrázek 2.2.1). V kapsidě je s každým pentamerem proteinů VP1 spojena buď jedna kopie proteinu VP2, nebo VP3. Sekvence poblíž společného C konce proteinu VP2 nebo VP3 je nezbytná a postačující pro tvorbu komplexu pentameru VP1 s minoritními proteiny. Struktura polyomavirové kapsidy byla určena pomocí rozptylu X-paprsků na krystalovaných virionech při rozlišení 25 Å. Tato studie ukázala, že se C koncová část VP2 a VP3 nachází v centrální dutině VP1 pentameru (GRIFFITH *et al.*, 1992). Ze srovnání map elektronových hustot získaných z difrakčních studií virionů a kapsid složených pouze z proteinu VP1 MPyV vyplynulo, že v pětičetné ose symetrie každého pentameru se směrem „dovnitř“ virionu nachází jedna molekula minoritního proteinu VP2, nebo VP3 (GRIFFITH *et al.*, 1992). Později (BAROUCH & HARRISON, 1994) potvrdili interakci VP2 a VP3 s pentamery VP1 *in vitro* a určili 42 aminokyselin dlouhou sekvenci na C konci proteinu VP3, která je nezbytná pro tuto vazbu. CHEN *et al.*, (1998) provedli detailní studie, když exprimovali společnou část proteinů VP2 a VP3 (VP2/3) MPyV společně s proteinem VP1 a poté krystalizovali komplex VP1 (aminokyseliny 32-316) s fragmentem obsahujícím 105 C-koncových aminokyselinových zbytků VP2/3 (aminokyseliny 214-318). Analýzy struktury ukázaly, že C konec fragmentu VP2/3 vstupuje neobvyklým vlneným způsobem do dutiny VP1 pentameru, kde je silně ukotven pomocí hydrofóbních interakcí, a že větší N koncová část tohoto fragmentu je výrazně flexibilnější a citlivá k proteolýze (obrázek 2.2.2) (CHEN *et al.*, 1998).

Ve společné C-koncové doméně proteinů VP2 a VP3 viru SV40 jsou obsaženy tři funkční domény: 1) jaderný lokalizační signál (CLEVER & KASAMATZU, 1991), 2) DNA vazebná doména (CLEVER *et al.*, 1993) a 3) VP1-interaktivní doména (GHARAKHANIAN *et al.*, 1988). U viru MPyV a ostatních hlodavčích polyomavirů je situace trochu odlišná. C konec VP2/3 MPyV je oproti viru SV40 a dalších polyomavirů primátů zkrácený o DNA vazebnou doménu (CHANG *et al.*, 1993) a s proteinem VP1 minoritní proteiny interagují přes jinou oblast společné části (BAROUCH & HARRISON, 1994).



Obr. 2.2.1: Lineární uspořádání proteinů VP2 a VP3 myšího polyomaviru (podle Chen *et al*, 1998). Šedě je znázorněna společná část proteinů VP2 a VP3. Bíle je znázorněna unikátní N koncová část proteinu VP2 s myristylovou skupinou.



Upraveno podle Barouch a Harrison (1994), Chen *et al* (1998)

Obr. 2.2.2: Struktura komplexu pentameru proteinů VP1 s minoritními proteiny VP2 nebo VP3. A) Schéma proteinu VP2 nebo VP3 (červeně) a tři monomerů proteinu VP1, které tvoří kontakty s minoritním proteinem. B) Povrchová reprezentace komplexu z obr. „A“. C) Schéma interakce mezi proteinem VP2 a dvěma podjednotkami pentameru proteinu VP1.

2.2.2 Unikátní N koncová část proteinu VP2 je myristylována.

Myristylace N konce je kotranslační modifikací širokého spektra proteinů. Její funkce není doposud zcela objasněna, nicméně je jisté, že nemusí pouze ukotvovat proteiny do vnitrobuněčných membrán. Existuje mnoho virových proteinů, většinou spojených s morfogenezí virionů a dalšími funkcemi pozdní fáze infekce, jejichž N konec je takto upraven. Myristová kyselina je, po odstranění iniciačního methioninu, ko-translačně kovalentně vázána pomocí N-myristyltransferázy k N koncovému glycinu, který je naprosto nezbytný pro tuto modifikaci. „Konsenzus“ sekvence důležitá pro myristylaci byla nalezena v N konci proteinu VP2 všech studovaných polyomavirů. Z toho lze usuzovat na významnou funkci myristylu VP2 v replikačním cyklu polyomavirů. Funkce této modifikace byla studována jak u viru SV40, tak u MPyV, a to mutováním kodonu pro glycin nezbytný pro myristylaci.

KRAUZEWICZ *et al.*, (1990) se snažili objasnit roli myristylu VP2 MPyV vytvořením myr mutanty viru, která měla N koncový glycin VP2 mutovaný na glutamovou kyselinu (mutanta E). Zjistili, že nemyristylovaný VP2 je inkorporován do virových kapsid a izolovali mutovaný virus. Zastoupení prázdných kapsid a virionů bylo obdobné u preparace mutantu i divokého viru. Nicméně elektronová mikroskopie

negativně barvených částic ukázala mírně odlišnou morfologii mutovaných virů v porovnání s částicemi divokého viru.

SAHLI *et al.*, (1993) studovali myr mutantu s N koncovým glycinem VP2 MPyV mutovaným na alanin. Tato mutanta vykazovala asi 20x nižší infekčnost při plakové titraci a zpoždění v zahájení replikace a syntézy VP1 o 9 hodin v porovnání s divokým virem. Sestavování virionů a jejich stabilita nebyly ovlivněny. Na základě těchto výsledků autoři vyvozují, že nepřítomnost myristylace VP2 má za následek defekt v časné fázi infekce myším polyomavirem. SAHLI *et al.*, (1993) dále zjistili vznik revertantů k divokému (wt) fenotypu při izolaci VP2- a VP3- virů.

MANNOVÁ *et al.*, (2002) vytvořili tři mutanty myristylu: první měl N koncový glycin MPyV změněný na glutamovou kyselinu (E), druhý na glutamin (Q) a třetí na histidin (H). Plakové analýzy prokázaly, že mutanta Q má sníženou infekčnost asi 20x, zatímco mutanta E asi 40x. Mutanta H netvořila plaky vůbec. Je tedy pravděpodobné, že jsou vlastnosti mutant ovlivněny nejen absencí myristylu, ale i charakterem N konce proteinu VP2. Tato studie neidentifikovala roli myristylu v časných událostech infekce. Mutanty byly schopny vstoupit do buňky a infikovat ji v prvním infekčním cyklu s tou samou účinností jako divoký virus. MANNOVÁ *et al.*, (2002) taktéž nepozorovali významné kvantitativní odlišnosti během replikace mutant ve srovnání s divokým virem. V buňkách infikovaných mutantou H bylo detekováno jen nepatrné množství proteinu VP2, tudíž měla tato mutanta fenotyp podobný spíše viru bez proteinu VP2. Ztráta infekčnosti v plakových zkouškách a v projevech cytopatického účinku během infekce těmito mutanty by mohla svědčit spíše o defektu v pozdním stádiu infekčního cyklu během skládání virionů nebo v úspěšné reinfekci sousedních buněk virovým potomstvem. MANNOVÁ *et al.*, (2002) uzavřeli, že myristylace proteinu VP2 MPyV není pro žádný krok infekce nezbytná. Tato modifikace by mohla spíše hrát roli v udržení biologicky aktivní konformace povrchu virionu. Nepřítomnost myristylu měla za následek mírné změny v interakci s povrchem buňky a ostatními buněčnými strukturami. Tyto účinky se akumulovaly během opakovaných reinfekcí.

2.2.3 Jaderný lokalizační signál (NLS) proteinů VP2 a VP3.

Ačkoli jsou kapsidové proteiny polyomavirů syntetizovány v cytoplazmě, jsou bezprostředně po dokončení syntézy transportovány do jádra, a to také díky jadernému lokalizačnímu signálu, který je přítomen ve společné části proteinů VP2 a VP3.

CHANG *et al.*, (1992b) pomocí studií delečních mutant a s využitím syntetických peptidů zjistili, že posledních 12 aminokyselin MPyV, obsahujících bazickou sekvenci (Lys-Lys-Lys-Arg-Arg), je zodpovědných za jadernou lokalizaci tohoto proteinu. Transfekční experimenty CHANG *et al.*, (1992b) ukázaly, že přítomnost NLS je dostatečná pro transport VP2 do jádra bez pomoci interakce s dalšími virovými proteiny.

Podobné pokusy byly provedeny i za účelem identifikace NLS viru SV40. WYCHOWSKI *et al.*, (1987) fúzovali gen pro protein VP2 SV40 s genem pro VP1 Polioviru a demonstrovali, že výsledný fúzní protein byl cílen do jádra. Pomocí delečních mutant VP2/3 SV40 poté stanovili, že minimální aminokyselinový úsek 317-323 (Pro-Asn-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys) umožňuje proteinům VP2 a VP3 jadernou lokalizaci. Jaderný lokalizační

signál viru SV40 byl potvrzen i dalšími skupinami (CLEVER & KASAMATZU, 1991, GHARAKHANIAN *et al.*, 1987).

Ačkoli minoritní proteiny MPyV obsahují vlastní NLS, v infikované buňce pravděpodobně nejprve interagují v cytoplazmě s proteinem VP1 a do jádra vstupují s ním v komplexu. Zatímco protein VP1 produkovaný v hmyzích buňkách je lokalizován v jádře, samostatně produkované minoritní proteiny jsou lokalizovány kolem jaderné membrány v případě VP2, nebo difúzně v cytoplazmě v případě VP3. Jadernou lokalizaci získávají, až když jsou exprimovány společně s VP1 (FORSTOVÁ *et al.*, 1993). STAMATOS *et al.*, (1987) pozorovali u MPyV, že při expresi proteinů z rekombinantních virů vaccinie v CV-1 buňkách, ko-exprese proteinu VP1 vedla k účinnějšímu transportu VP2 do jádra a byla nezbytná pro jadernou lokalizaci VP3. Naopak CAI *et al.*, (1994) zjistili, že zkrácený protein VP1 MPyV, který neobsahoval NLS, byl translokován do jádra, když byl exprimován společně s proteinem VP2. To svědčí o zastupitelnosti NLS strukturálních proteinů. CLEVER & KASAMATZU (1991) a GHARAKHANIAN *et al.*, (1987) ukázali, že NLS minoritních proteinů SV40 je schopen tyto proteiny transportovat do jádra nezávisle na proteinu VP1 v buňkách přirozených hostitelů.

2.2.4 Interakce proteinů VP2 a VP3 s pentamery VP1

Protože se proteiny VP2 a VP3 vážou k proteinu VP1, předpokládalo se, že musí obsahovat doménu, která je této interakce schopná. VP1 interaguje s VP2 a VP3 již v cytoplazmě infikované buňky a do jádra strukturální proteiny vstupují v komplexu. To udržuje správnou stechiometrii proteinů VP1, VP2 a VP3 v jádře a může usnadnit morfogenezi virionů (KASAMATSU & NEHORAYAN, 1979, LIN *et al.*, 1984, LIN *et al.*, 1986). Další indicií tvorby komplexů v cytoplazmě byla skutečnost, že například mutanta VP1, která měla funkční jaderný lokalizační signál, ale nebyla schopná sbalit se do správné konformace, zůstávala v cytoplazmě a blokovala vstup do jádra i proteinům VP2 a VP3 SV40 (LI *et al.*, 2005). GHARAKHANIAN *et al.*, (1988) určili, že u SV40 je za interakci minoritních proteinů s pentamery VP1 odpovědný jejich C konec, tedy sekvence, které chybí v C konci minoritních proteinů MPyV. Naopak NAKANISHI *et al.*, (2006) mutovali C konec VP2 a VP3 SV40 a identifikovali dva sekvenční elementy: vnitřní D1 element (aminokyseliny 155-190) a C-koncový D2 element (aminokyseliny 222-234). Ukázalo se, že D1 je nezbytný pro vazbu minoritních proteinů k pentameru VP1 v cytoplazmě a mutace v této oblasti značně ovlivní životaschopnost viru. „D1“ je element, který se u VP2/3 MPyV ještě nachází. Element D2, který u MPyV chybí, nebyl pro vazbu k VP1 *in vivo* nezbytný. O tom svědčí fakt, že proteiny VP2 a VP3 s mutacemi v NLS a oblasti D2 byly schopny vstoupit do jádra, když byly exprimovány společně s proteinem VP1, a to díky interakci VP2/3 D1-VP1. Navíc mutace v D2 oblasti významně neovlivní životaschopnost viru. NAKANISHI *et al.*, (2006) identifikovali také aminokyseliny v proteinu VP1 a v VP2/3 společné oblasti, které zprostředkují vzájemnou interakci. Mutace v interaktivní doméně minoritních proteinů inhibovaly vazbu k proteinu VP1, což snižovalo životaschopnost viru. Mutanty proteinu VP1, které eliminovaly navázání k VP2/3, byly neživotaschopné. Tyto výsledky ukazují, že zrušení interakce proteinu VP1 s VP2/3 vede k výraznému snížení infekčnosti viru.

Proteiny VP2 a VP3 MPyV interagují s proteinem VP1 také přes doménu nacházející se na jejich C-konci (aminokyseliny 140-188) (BAROUCH & HARRISON, 1994). K vzájemné interakci dochází i mezi proteiny rekombinantně produkovanými v prokaryotickém systému *E. coli*, kde nedochází k jejich posttranslačním modifikacím (BAROUCH & HARRISON, 1994, CAI *et al.*, 1994, DELOS *et al.*, 1995). Když DELOS *et al.*, (1995) exprimovali proteiny VP2 a VP3 v *E. coli*, demonstrovali, že rekombinantní proteiny VP2 a VP3 interagují s proteinem VP1 *in vitro*, a že tato interakce ovlivňuje biochemické vlastnosti VP1 kapsomer a mění dostupnost epitopu na pentamerách proteinu VP1 protilátkám specifickým pro určité domény VP1. Tyto změny mohou odrážet konformační změny v kapsomerech VP1 a také na povrchu virových částic.

2.2.5 DNA vazebná doména proteinů VP2 a VP3

Zatímco N konec proteinu VP1 všech známých polyomavirů má nespecifickou afinitu k DNA, DNA vazebná aktivita minoritních proteinů je specifická pouze pro polyomaviry primátů. Již časně experimenty ukázaly, že minoritní proteiny SV40 vážou DNA (GHARAKHANIAN *et al.*, 1988, CLEVER *et al.*, 1993). DNA vazebná doména se nachází v sekvenci posledních 13 aminokyselin na C konci VP2 a VP3 SV40 (CLEVER *et al.*, 1993), ale nepřekrývá se s NLS. Odstranění posledních 13 zbytků má za následek 93% redukci schopnosti vázat DNA a navíc ztrátu interakce VP2/3 s VP1 (GHARAKHANIAN & KASAMATSU, 1990). CLEVER *et al.*, (1993) vytvořili hypotézu, že by role proteinů VP2 a VP3 mohla souviset s kondenzací DNA během balení mini-chromozomu do virionu. K tomu je vedla skutečnost, že DNA vazebná doména proteinů VP2/3 je schopna kondenzovat DNA.

DEAN *et al.*, 1995 analyzovali tuto DNA vazebnou doménu. Proto exprimovali 40 C koncových zbytků VP2/3 fúzaných s histidinovou kotvou a mutovali některé bazické zbytky v tomto C konci. Mutanty s bodovými mutacemi v posledních 13 aminokyselinách VP2 a VP3 SV40 interagovaly s VP1, byly transportovány do jádra, ale v důsledku redukované vazby DNA minoritními proteiny neprobíhala morfogeneze virionů a mutanty byly neživotoschopné. To, že všechny mutanty byly schopny interagovat s VP1, svědčí o nezávislosti těchto dvou aktivit. DEAN *et al.*, 1995 uzavřeli, že proteiny VP2 a VP3 hrají důležitou roli při skládání nových virionů v jádře. Nicméně toto tvrzení ta samá vědecká skupina po několika letech přehodnotila, když zjistila, že tato DNA vazebná doména pro životaschopnost viru není nezbytná (NAKANISHI *et al.*, 2006).

2.2.6 Role proteinu VP2 ve fosforylaci strukturního proteinu VP1 MPyV

Ve virionech MPyV se protein VP1 nachází v nejméně deseti různých posttranslačně modifikovaných formách (FORSTOVÁ *et al.*, 1993). Během infekce myším polyomavirem je fosforylován majoritní kapsidový protein VP1 na threoninu a na serinu. Fosforylovány jsou threonin-63 přítomný v BC smyčce a threonin-156 přítomný v DE smyčce (STEHLE *et al.*, 1994). FORSTOVÁ *et al.*, (1993) zjistili, že k syntéze všech forem VP1 v bakulovirovém expresním systému je nezbytná ko-exprese s VP2, a že pokud je v hmyzích buňkách produkován pouze protein VP1, chybí mu oproti proteinu VP1 v infikovaných myších buňkách některé

KAPITOLA 2: LITERÁRNÍ PŘEHLED

modifikované kyslejší formy. Kyselé fosforylované formy jsou nezbytné pro enkapsidační proces a vznik virionů (GARCEA & BENJAMIN, 1983, LI & GARCEA, 1994). Důsledkem mutace threoninu-156 na alanin byl defekt v morfogenezi virionů. Fosforylace VP1 však nemůže být nezbytná pro tvorbu prázdných kapsid, protože i nemodifikovaný protein VP1 se může *in vitro* skládat do kapsid (SALUNKE *et al.*, 1986).

LI *et al.*, (1995) zkoumali fosforylaci proteinu VP1 exprimovaného společně s minoritními proteiny v hmyzích buňkách, aby zhodnotili, zda změna ve fosforylaci může být důsledkem jejich interakce. Zjistili, že VP1 produkován buď samotný, nebo společně s proteinem VP3, je fosforylován na serinu. Tento serin však nebyl modifikován během přirozené infekce myších buněk myším polyomavirem. Nicméně když byl protein VP1 produkován společně s proteinem VP2, byla nefyziologická fosforylace serinu, pozorovaná v předchozím případě, snížena. Naopak došlo k fosforylaci threoninu-63, který je takto modifikován i průběhu infekce MPyV. Pouze protein VP2, a ne VP3, byl schopen ovlivnit fosforylaci proteinu VP1. To svědčí o roli unikátní sekvence VP2 ve zprostředkování této modifikace. Protože myristylová skupina proteinu VP2 neměla na fosforylaci VP1 vliv, nehraje pravděpodobně v této interakci roli. To, že během exprese proteinu VP1 společně s proteinem VP2 neproběhla fosforylace na threoninu-156 si LI *et al.*, (1995) vysvětlují nepřítomností specifické kinázy v hmyzích buňkách, absencí ko-aktivátoru fosforylace, nebo tím, že protein VP2 ovlivňuje pouze fosforylaci threoninu-63. Interakce proteinů VP1 a VP2 podle těchto autorů pravděpodobně stabilizuje konformaci VP1 vhodnou pro fosforylaci specifických threoninů v molekule VP1.

2.2.7 Možná role minoritních proteinů v adsorpci polyomavirů na buněčný povrch a při vstupu do buňky.

Pro vstup do hostitelské buňky viry využívají receptory na buněčném povrchu. Receptory mohou nejen viry vázat, ale mohou je také navádět na správnou endocytickou dráhu nebo mohou sloužit i v indukci konformačních změn, které vedou k membránové fúzi a penetraci. Polyomaviry vstupují do buňky receptorem zprostředkovanou endocytózou, BKV a MPyV prostřednictvím hladkých monopinocytických váčků. Receptory pro MPyV, SV40 i BKV jsou gangliozidy obsahující kyselinu sialovou. Pro myší polyomavirus slouží jako receptor gangliozid GD1a a GT1b (TSAI *et al.*, 2003).

STEHLE *et al.*, (1994) dokázali, že aminokyseliny důležité pro interakci s buněčným receptorem leží v molekule majoritního kapsidového proteinu VP1 a i rekombinantní VLPs obsahující pouze protein VP1 jsou schopné vázat se na sialovou kyselinu a vstoupit do myších buněk (FORSTOVÁ *et al.*, 1995, RICHTEROVÁ *et al.*, 2001). Specifičnost vstupu do buňky a další osud VLPs však může být ovlivněn absencí minoritních kapsidových proteinů. Přítomnost minoritních antigenů (zvláště VP2) může umožnit specifickou interakci VP1 s receptorem (nebo možná následně i s ko-receptorem), vedoucí k produktivní virové infekci.

Již STREULI & GRIFFIN (1987) se při identifikaci myristové kyseliny na N konci proteinu VP2 domnívali, že tato modifikace hraje pravděpodobně roli při vstupu do buňky. Také KRAUZEWICZ *et al.*, (1990) zaznamenali, že myristylace je významná pro adsorpci viru na povrch buňky a pro vstup do buňky. Naopak MANNOVÁ *et al.*, (2002) neidentifikovali roli myristové skupiny v časných událostech infekce, protože

KAPITOLA 2: LITERÁRNÍ PŘEHLED

zjistili, že mutanty, postrádajících tuto modifikaci, jsou schopné vstoupit do buňky a infikovat buňku s tou samou účinností jako divoký MPyV. Nicméně MANNOVÁ *et al.*, (2002) shledali, že mutanty bez VP2 nebo VP3 jsou defektní již v časných fázích virové infekce. AN *et al.*, (1999) zjistili, že pseudokapsidy složené z rekombinantně exprimovaného VP1 a VP2 neúčinněji kompetitivně inhibovaly infekci divokým MPyV (wt), v porovnání s VP1 a VP1/VP3 pseudokapsidami.

CARUSO *et al.*, (2003a) publikovali, že by $\alpha 4\beta 1$ integrin mohl být ko-receptorem po adsorpci MPyV na buněčný povrch. Interakce integrinu s VP1 je zřejmě zajištěna přítomností LDV motivu v DE smyčce VP1, vazebným místem pro $\alpha 4\beta 1$ -ligand (CARUSO *et al.*, 2003a, CARUSO *et al.*, 2003b). Tato data je vedla k hypotéze, že prvotní interakce se sialovou kyselinou může indukovat změnu konformace kapsidy, která je nezbytná pro rozpoznání post-vazebných buněčných ko-receptorů a následnou internalizaci buňkou. V navazující práci CAVADELSI *et al.*, (2004) zaznamenali strukturální změny kapsid MPyV po vazbě na sialovou kyselinu. CAVADELSI *et al.*, (2004) analyzovali účinek rozpustných složek receptoru na vazbu MPyV k buňce a infekčnost viru. Výsledky dokázaly, že prvotní vazba MPyV ke koncové sialové kyselině indukuje konformační změny ve VP1, které se přenášejí na změnu konformace minoritních proteinů.

Receptorem pro virus SV40 je gangliozid GM1 (GILBERT & BENJAMIN, 2004). Přesto že se v gangliozidu GM1 také vyskytuje sialová kyselina, není zřejmě zapojena do interakce s SV40. Tento virus totiž nehemaglutinuje. Ko-receptorem by, podle některých prací (ATWOOD & NORKIN, 1989), mohla být molekula MHC-I. Hlavní kapsidový protein VP1 viru SV40 je nezbytný a postačující pro vstup viru do buňky. V proteinu VP1 jsou dvě vazebná místa pro Ca^{2+} . Bylo pozorováno, že jedno z nich, „vazebné místo 1“, může hrát roli ve vytvoření správné konformace virionu. Mutace v tomto místě neovlivní morfogenezi virionů ani enkapsidaci, ale mutované částice se nejsou schopné adsorbovat na buněčný povrch ani vstoupit do buňky (LI *et al.*, 2003b).

DANIELS *et al.*, (2006b) využili mutované genomy SV40, které neexprimovaly VP2 nebo VP3 k prozkoumání role minoritních proteinů ve vstupu do buňky a penetraci buněčných membrán (membrány ER). Demonstrovali, že proteiny VP2 a VP3 jsou nezbytné pro infekci. V nepřítomnosti VP2 nebo VP3 ztrácely mutanty životaschopnost, což bylo způsobeno defekty v účinné absorpci viru na buněčný povrch (v případě absence VP2) a v transportu virového genomu od buněčného povrchu k jádru (v případě absence VP3). Přítomnost proteinu VP2 významně zvyšovala schopnost virionu vázat povrch hostitelské buňky a částice postrádající tento protein interagovaly méně účinně s buněčným povrchem. To svědčí o tom, že protein VP2 hraje také roli v adsorpci virionů na buněčný povrch. Po odstranění VP3 měly částice naopak až dvojnásobnou schopnost vázat se k povrchu buňky ve srovnání s divokým virem. Částice se zvýšenou schopností vázat buňku (Δ VP3) obsahovaly vyšší poměr VP2:VP1 ve srovnání s divokým virem. Tato data demonstrovala, že VP2 hraje roli ve vazbě virových částic na buňku.

2.2.8 Role minoritních proteinů polyomavirů v dopravě a vstupu virového genomu do jádra.

Malé viry (do 39 nm v průměru) mohou vstupovat do jádra přes komplex jaderného póru, aniž by měnily konformaci či se rozpadly. Větší viry musí naopak umožnit vstup do jádra pouze genomu nebo se alespoň částečně rozvolnit, mají-li využít pro vstup do jádra komplex jaderného póru. Tabulka 2.2.3, která shrnuje mechanismy vstupu jednotlivých polyomavirů do buňky a využití vnitrobuněčných organel a cytoskeletu při dopravě virového genomu JC viru, BK viru, viru SV40 a myšího polyomaviru směrem k buněčnému jádru ukazuje, že tyto viry směřují do endoplazmatického retikula. Aby mohl virus pokračovat do jádra přes jaderné póry, musí se nějak uvolnit z lumen ER.

Chaperon ERp29, člen rodiny proteinů PDI, který je lokalizován v ER, indukuje konformační změnu C konce proteinu VP1, což přispívá k hydrofobicitě virové částice. Ta je poté schopná vázat lipozómy a rušit integritu membránové dvojvrstvy (MAGNUSON *et al.*, 2005, RAINEY-BARGER *et al.*, 2007a). RAINEY-BARGER *et al.*, (2007b) ukázali, že částice MPyV aktivovaná ERp29 narušuje membrány ER. Biochemické analýzy dále odhalily, že tato aktivace je provázána změnou konformace kapsidy a aniž by aktivovaná virová částice byla rozpadlá, protein VP2 se exponuje na povrch částice. Vystavený protein VP2 se poté váže na membrány ER a perforuje je. Protein VP3 se také váže na membrány ER a integruje se do nich, ale není schopen je perforovat, a proto může jen přispívat k prvotní adsorpci aktivované virové částice na membránu ER. Jestli je VP3 vystaven následně po aktivaci chaperonem ERp29 je nejasné. Protože C konec VP1 je odpovědný za stabilizaci interpentamerních interakcí, RAINEY-BARGER *et al.*, (2007b) vytvořili hypotézu, podle které konformační změny VP1 destabilizují kapsidu a vystaví se flexibilní N konec VP2 molekul. Obnažení této oblasti, která obsahuje myristyl a transmembránové domény VP2, učiní hydrofóbní virovou částici kompetentní k penetraci membrán a vstupu do cytosolu.

Nedávno DANIELS *et al.*, (2006a) demonstrovali, že exprese strukturálních proteinů VP2 a VP3 SV40 v bakteriích *E. coli*, činí bakterie propustné pro membránově-impermeabilní inhibitor proteosyntézy Hygromycin B. Toto zjištění podporuje hypotézu, že proteiny VP2 a VP3 mají roli v penetraci viru do cytozolu.

DANIELS *et al.*, (2006b) zkoumali schopnost VP1, VP2 a VP3 vázat se na membrány ER a inkorporovat se do nich. Vazba a integrace byla studována při produkci strukturálních proteinů v buňce (integrace nově syntetizovaných proteinů do ER) a při infekci virem (cestou, kterou by měl využívat virus po vstupu do buňky). Minoritní proteiny byly schopny vázat na membrány ER a integrovat se do nich v obou případech. DANIELS *et al.*, (2006b) demonstrovali, že přestože proteiny VP2 a VP3 existují v rozpustné formě, jsou-li vázány s VP1, absence proteinu VP1 má za následek posttranslační inzerci minoritních proteinů do membrán ER. Tyto proteiny by tedy mohly mít funkci v translokaci virového genomu přes membránu ER.

DANIELS *et al.*, (2006b) určili, že se protein VP3 integruje do ER pomocí několika transmembránových segmentů. Protože je tato konformace charakteristická pro proteiny tvořící kanály nebo pro viroporiny, určovali, zda jsou minoritní proteiny schopny tvořit oligomery prozkoumáním schopnosti VP2 a VP3 vázat GST-VP3. Zjistili, že minoritní proteiny mají schopnost oligomerizovat, což podpořilo hypotézu, že

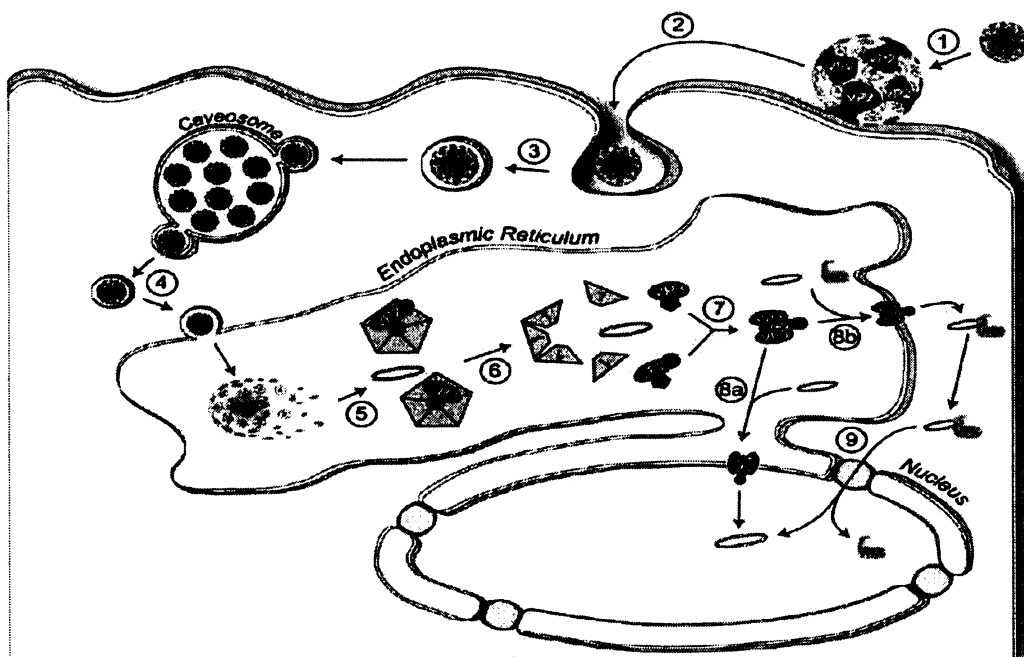
KAPITOLA 2: LITERÁRNÍ PŘEHLED

by minoritní proteiny mohly být viroporiny, které se inzertují do membrán ER a pomáhají při dopravě virového genomu z lumen ER k jádru.

	BKV	JCV	SV40	MPyV
Receptory	$\alpha(2,3)$ sialová kyselina, GD1b a GT1b	koncová $\alpha(2,6)$ sialová kyselina, GT1b	gangliozid GM1	$\alpha(2,3)$ sialová kyselina, GD1a, GT1b
Ko-receptory	?	serotoninový receptor 5HT-2a	MHC I	$\alpha4\beta1$ integrin
Mechanismus vstupu	zprostředkovaný caveolae	zprostředkovaný clathrinem	Primárně zprostředkovaný caveolae	caveolae ?
Transport cytoplazmou	váčky lokalizovány v ER nebo GA	???	COPI váčky, Fúze s caveosomem, ER	Endozómy s caveolinem-1, recyklující endosomy, ER
pH	Závislá	Závislá	Nezávislá	závislá
požadavky na cytoskelet	neporušené MT, rozpad mikrofilament	neporušené MT a IF, dynamická mikrofilamenta	neporušené MT, dynamická mikrofilamenta	neporušené MT, dynamická mikrofilamenta

Obr. 2.2.3: Unikátní dráhy vstupu polyomavirů do buňky (Upraveno podle DUGAN *et al.*, 2006). ER=endoplazmatické retikulum, MT=mikrotubuly, IF=intermediální filamenta.

Membrána ER je nepropustná pro molekuly větší než 500 Da, a protože lyze ER může mít za následek smrt hostitelské buňky, transfer genomu SV40 pravděpodobně vyžaduje membránový pór nebo kanál (LE GALL *et al.*, 2004). Potencionální kanál ER, kterého se může SV40 zmocnit pro transfer svého genomu z ER je komplex „dislocon“, který transportuje špatně sbalené proteiny z ER do cytoplazmy pro degradaci, jakožto součást s ER asociované degradační dráhy ERAD, zapojené v kontrole kvality proteinů (TSAI *et al.*, 2002). Strukturální proteiny by mohly napodobovat substrát pro ERAD ve snaze projít membránou ER do cytoplazmy s genomem vázaným přes DNA vazebnou doménu strukturálního proteinu. Tato přirozená cesta z ER do cytosolu je ale málo pravděpodobná, vzhledem k velikosti kanálku, kterým jsou špatně sbalené proteiny transportovány. Proto je pravděpodobnější, že průniku rozvolněného viru by napomohly výše popsané vlastnosti minoritních proteinů. Podle DANIELSE *et al.*, (2006b) existují dvě možné cesty dopravy virové DNA z ER do jádra. V první hraje roli translokace do cytoplazmy následovaná klasickým transportem z cytoplazmy do jádra přes jaderný pór. Druhá dráha vyžaduje zapojení transportního řetězce z ER lumen do jádra přes vnitřní jadernou membránu. Kterou z těchto drah ve skutečnosti virus SV40 využívá je doposud nejasné.



Obr. 2.2.4: Model vstupu viru SV40 do buňky a penetrace membrán ER (podle Daniels *et al.*, 2006). 1) Vazba viru SV40 na hostitelskou buňku je spoluržena kapsidou a proteinem VP2. 2) Navázaný virus projde přes plazmatickou membránu a vstoupí do caveolae. 3) Virus je endocytován a transportován v caveolinem obalených váčcích do caveozómu. 4) Částice viru SV40 pučí z caveozómu a cestuje k ER. 5) Když se virová částice octne v lumen ER, kapsida se s pomocí buněčných chaperonů sídlících v ER rozpadne, a uvolní se virový genom a pentamery proteinu VP1 asociované s VP2 a VP3. 6) Další disociace pentamer VP1 uvolní navázané proteiny VP2 a VP3. 7) Proteiny VP2 a VP3 oligomerizují a vstupují do membrány ER, aby vytvořily multimerní komplexy, které umožní transport genomu přes membránu ER. 8a) Komplex proteinů VP2 a VP3 interaguje s kontinuální membránou ER a jádra, aby mohl genom vstoupit do jádra přímo z ER. 8b) Komplex proteinů VP2 a VP3 interaguje s membránou ER, která nenavazuje na membránu jádra, což umožní transport genomu z lumenu ER do cytoplazmy. 9) V cytoplazmě jeden ze strukturálních proteinů využije svou NLS a DNA vazebnou doménu a přenesení genomu do jádra.

2.2.9 Role minoritních proteinů polyomavirů v morfogenezi virionů

Komplexy pentameru VP1 a VP2, nebo VP1 a VP3, vzniklé v cytoplazmě a translokované do jádra, následně vážou genomovou DNA viru, která je v podobě mini-chromozomu asociovaná s histony hostitele. Tento proces pravděpodobně probíhá postupným uspořádáním kapsidových proteinů na mini-chromozom. Detailní mechanismus rozpoznávání virové DNA a vazby kapsidových proteinů je nejasný. Proteiny VP2 a VP3 MPyV mohou asociovat s histony a navádět komplexy strukturálních proteinů během maturace virionu MPyV (FORSTOVÁ *et al.*, 1993).

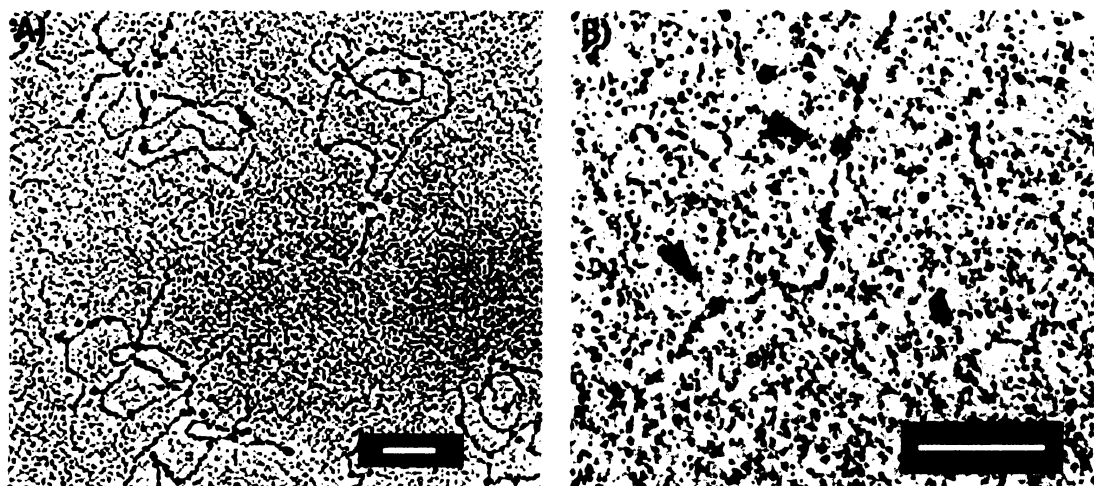
Již dlouho je známo, že jsou proteiny VP1 polyomavirů schopny tvořit pseudokapsidy (VLPs), když jsou exprimovány v hmyzích buňkách z rekombinantních bakulovirů (FORSTOVÁ *et al.*, 1993). KANESASHI *et al.*, (2003) ukázali, že jsou pentamery proteinu VP1 SV40 schopny skládat se za různých nefyziologických podmínek do morfologicky různých VLPs. Nicméně za fyziologických podmínek VLPs *in vitro* nevznikaly. KAWANO *et al.*, (2006) pozorovali, že pentametry VP1 SV40 nebo komplexy VP1 a VP2 tvoří různé typy částic za různých pH. Např. pentamery složené pouze z proteinu VP1 se skládaly do dlouhých tubulárních struktur při pH=5. Protože protein VP1 s záměnami aminokyselin v C koncovém rameni se v hmyzích buňkách přednostně skládá do tubulárních struktur (ISHIZU *et al.*, 2001), je pravděpodobné, že struktura C

KAPITOLA 2: LITERÁRNÍ PŘEHLED

koncového ramene VP1 umožňuje tvorbu takových struktur za specifických podmínek. Při $\text{pH}=7$ VP1 pentamery VLPs netvořily (KANESASHI *et al.*, 2003). Pentamery VP1 spolu s proteinem VP2 tvořily kapsidové struktury VLPs. Stimulační účinek proteinu VP2 byl maximální, když byl poměr pentamerů VP1:VP2-1:1. Molekula proteinu VP2 interagující s pentamerem VP1 indukuje zřejmě interakci pentamer-pentamer. Navíc se zdá, že protein VP2 navozuje takovou konformaci C koncového ramene proteinu VP1, která napomáhá tvořit VLPs. Protein VP2 nejspíš zprostředkuje dostatečné změny v pentameru VP1, aby navodil tvorbu kulatých částic namísto dlouhých tubulárních částic při $\text{pH}=5$ (KANESASHI *et al.*, 2003). KAWANO *et al.*, (2006) demonstrovali, že je protein VP2 inkorporován do VLPs stejně jako u nativních virionů, přičemž interakce mezi dvěma proteiny VP2 uvnitř částice by se také mohly podílet na vzniku kulaté struktury. Při $\text{pH}=8$ a vyšším, VP1 pentamery mohou *in vitro* tvořit VLPs, ačkoli s nižší účinností a nepravidelnou morfologií. Při tomto pH protein VP2 nestimuluje skládání VLPs, ačkoli interaguje s VP1 pentamery. KAWANO *et al.*, (2006) dále ukázali, že C konec VP2/3 (aminokyseliny 119-352) je dostačující pro stimulaci skládání VP1 VLPs *in vitro*. Protože unikátní oblast VP2 (aminokyseliny 1-118) má také afinitu k pentamerům VP1, může mít tato oblast zatím neznámou roli v skládání virionů *in vivo*. Při tvorbě virionů *in vivo* by se mohly uplatňovat další složky. Správné skládání virových částic by mohlo vyžadovat chaperony (GENEVAUX *et al.*, 2003, SULLIVAN *et al.*, 2001).

Všechny tři kapsidové proteiny u polyomavirů primátů vážou DNA nespecificky a s vysokou afinitou (LI *et al.*, 2001, CLEVER *et al.*, 1993). To vzbuzuje otázku, jak rozpoznávají virový minichromozom v jádře v přítomnosti obrovského nadbytku buněčného chromatinu. Specifické rozpoznání SV40 minichromozomu by mohlo být dosaženo díky proteinu „Sp1“, který se váže na enkapsidační signál „ses“ (OPPENHEIM *et al.*, 1992) obsahující GC boxy v regulační oblasti genomu SV40 (DALYOT-HERMAN *et al.*, 1996). Faktor Sp-1 by mohl rekrutovat kapsidové proteiny ke specifickému místu virového minichromozomu (GORDON-SHAAG *et al.*, 1998, GORDON-SHAAG *et al.*, 2002). Vazba komplexu VP1₅VP2/3+Sp-1 na „ses“ vede k zastavení tvorby jak časných, tak pozdních genů (GORDON-SHAAG *et al.*, 1998), a tak indukuje přeměnu z fáze replikace a transkripce k fázi morfogeneze virionů. Komplex Sp-1-VP1₅VP2/3-ses by tak mohl sloužit jako zárodečné centrum pro morfogenezi virionů SV40.

ROITMAN-SHEMER *et al.*, (2007) zkoumali *in vitro* interakce VP1₅VP2/3 kapsomer s genomem SV40. Používali mutantu VP1 s deletovaným C-koncovým ramenem, která nebyla schopna tvořit virové částice, ale měla zachovanou schopnost vazby DNA. Analýzy elektron mikroskopických snímků odhalily, že se komplexy VP1₅VP2/3 váží nespecificky do náhodných míst DNA, ale přítomnost Sp-1, který se ke komplexu VP1₅VP2/3 váže, nasměruje tento komplex do sekvence specifické pro Sp-1 (obr. 2.2.5). Faktor Sp1 nebyl součástí maturovaných virionů. Výsledky této skupiny svědčí o tom, že se kapsomery díky Sp-1 vážou do určitého místa virovému genomu, což zvyšuje jejich lokální koncentraci a usnadňuje rychlou soustředěnou „assembly“ reakci a odstranění Sp1.



Obr. 2.2.5: Vizualizace interakce DNA se strukturálními proteiny viru SV40 (Roitman-Shemer *et al.*, 2007) A) Interakce komplexů VP1 Δ C₅VP3 (VP1 s deletovaným C koncovým ramenem) s kruhovou DNA viru SV40 v přítomnosti poly (dI-dC). Měřítka značí 100nm. B) Interakce proteinu Sp1 a VP1 Δ C₅VP3 s lineární DNA viru SV40 v přítomnosti poly (dI-dC). Měřítka značí 100 nm. Šipky směřují k proteinovým komplexům navázaným na DNA.

Protože minoritní proteiny myšího polyomaviru mají oproti minoritním proteinům polyomavirů primátů zkrácený C konec, a postrádají tak DNA vazebnou doménu, je zřejmé, že by skládání virových částic MPyV mohlo probíhat odlišně, než u viru SV40.

Tvorba komplexů proteinu VP1 s minoritními proteiny v cytoplasmě před vstupem do jádra udržuje optimální stechiometrii strukturálních proteinů v jádře, a proto by mohla usnadňovat účinnou morfogenezi virionů (KASAMATSU & NEHORAYAN, 1979, LIN *et al.*, 1984, LIN *et al.*, 1986). Podíl minoritních proteinů na morfogenezi virionů v jádře je však zpochybněn. Při expresi VP1 MPyV v hmyzích buňkách jsou v jejich jádrech tvořeny kromě VLPs také virionům podobné struktury, u kterých se v kapsidách nachází „pseudocore“ obsahující cca 5 kbp dlouhé fragmenty DNA hmyzích buněk nebo bakulovirů spolu s buněčnými histony (PALKOVÁ *et al.*, 2000) Zdá se tedy, že samotný protein VP1 může řídit tvorbu virionům podobných částic. Jestli takovéto částice mohou vznikat i v myších buňkách je nejasné. Možná vzniku takovýchto částic pomáhá nějaká bakulovirová funkce.

Jedna z teorií mechanismu procesu morfogeneze je, že VP1 pentamery s minoritním proteinem mohou kondenzovat kolem virového minichromozomu, kam jsou pravděpodobně směřovány minoritním proteinem (GRIFFITH *et al.*, 1992). Během tohoto procesu by mohlo dojít k vytěsnění histonu H1, který se, na rozdíl od ostatních buněčných histonů, ve virionech nenachází.

Podle YUEN & CONSIGLI (1983) je morfogeneze virionů založena na postupném vzniku virionu. Virový minichromozóm je uspořádaný do nucleocore, které je obaleno kapsomerami. V závěru dojde ke konformační změně, která je odpovědná za vytvoření stabilního zralého virionu. Byly izolovány jednotlivé prekurzory virionů: virový mini-chromozóm, pre-virion (200S) a virion (240S).

Je zajímavé, že konstitutivně exprimovaný gen pro eukaryotický chaperon: „heat shock cognate protein“ (hsc70), asociuje posttranslačně s proteinem VP1 a poté s ním kolokalizuje v jádře virem infikovaných

myších buněk (CRIPE *et al.*, 1995). Bakteriální člen rodiny Hsp70-DnaK také asociuje s proteinem VP1, který je rekombinantně exprimován v *E. coli* (CRIPE *et al.*, 1995). Hsp70 chaperony mohou být faktory, které kooperují při skládání polyomavírových kapsid *in vivo* a kontrolují přesnost a možná i buněčnou lokalizaci. CHROMY *et al.*, (2003) shledali, že po produkci rekombinantního proteinu VP1 v *E. coli*, DnaK provází VP1 při purifikaci a asociuje s jeho C koncovou doménou, která spojuje pentamery v kapsidě. Když se stabilně naváže k proteinu VP1, DnaK inhibuje *in vitro* skládání virových částic indukované vápníkovými kationty. Nicméně *in vitro*, v přítomnosti ATP, chaperonový systém, zahrnující DnaK, DnaJ (hsp 40 ko-chaperon v *E. coli*) a GrpE (ko-chaperon sloužící jako „nucleotide exchange factor“), pomáhá skládat proteiny VP1 do uniformní kapsidy bez pomoci vápníku. Chaperonem zprostředkované skládání virových částic bylo podobně pozorováno s eukaryotickým hsc70 v kombinaci s funkcí J domény SV40 LT.

SHISHIDO-HARA *et al.*, (2004) produkovali zároveň proteiny VP1, VP2, VP3 a agnoprotein JC viru v COS-7 buňkách za účelem zkoumání skládání virových částic. Jejich výsledky svědčí o tom, že protein VP1 a minoritní kapsidové proteiny se kooperativně akumulují v PML tělískách, kde dochází ke skládání do virionů. Kooperace VP1 s VP2 a VP3 je pro lokalizaci v PML tělískách nezbytná, protože ani VP1 ani VP2/3 se neakumulovaly v PML tělískách, pokud byly produkovány samostatně. V přítomnosti agnoproteinu vykazovalo vyšší procento buněk čistě jadernou lokalizaci VP1, nicméně role tohoto agnoproteinu při skládání virionů pravděpodobně není esenciální (SHISHIDO-HARA *et al.*, 2004).

2. 2. 10 Role minoritních proteinů polyomavirů v indukci buněčné destrukce a v úniku nových virionů z hostitelské buňky.

Ke skládání virionů většiny DNA virů, včetně polyomavirů, dochází v jádře. Neobalené viry se často uvolní z buněk navozením nekrózy. U eukaryotických buněk existují dvě cesty navození buněčné smrti. Apoptóza je programovaná buněčná smrt, vyvolaná aktivním buněčným procesem, která má za následek řadu morfologických změn, aktivaci proteáz, fragmentaci DNA a uzavření buněčných složek do membránou obklopených kulatých tělísek při procesu zvaném „blebbing“. Nekróza je charakterizována zduřením buňky, permeabilizací buněčných membrán, což má za následek degradaci buněčných struktur lytickými enzymy a uvolnění cytozolických složek do extracelulárního prostoru.

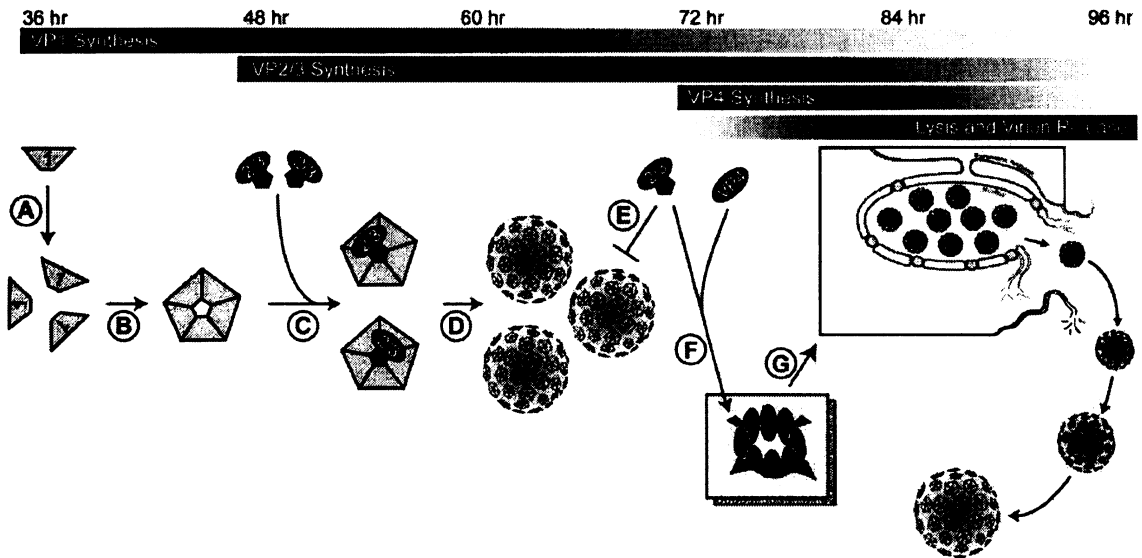
GORDON-SHAAG *et al.*, (2003) zkoumali spojitost mezi minoritními proteiny viru SV40 a enzymem Poly (ADP-ribóza) polymerázou (PARP). PARP je enzym, který je ve velkém množství exprimován v jádře většiny eukaryotických buněk. Tento enzym modifikuje proteiny tvorbou rozvětvených polymerů poly (ADP-ribózy) s využitím NAD⁺ jako substrátu. PARP modifikuje převážně DNA vázající proteiny, jako jsou transkripční faktory Sp-1 nebo YY1, ale jeho největší aktivita spočívá v automodifikaci. PARP hraje roli v několika klíčových buněčných procesech, jako je oprava DNA zlomů, rekombinace, prodlužování telomér, regulace transkripce, apoptóza a další. Stimulace PARP vede k ireverzibilnímu vyčerpání NAD⁺, což má za následek buněčnou nekrózu. V časných fázích apoptózy modifikuje PARP protein „p53“ a následná degradace poly (ADP-ribózových) řetězců je spojena s aktivací kaspázy 3, která štěpí PARP, čímž se PARP

KAPITOLA 2: LITERÁRNÍ PŘEHLED

inaktivuje (SIMBULAN-ROSENTHAL *et al.*, 1998). Štěpení PARP je charakteristickým znakem apoptózy. GORDON-SHAAG *et al.*, (2003) ukázali, že se PARP váže ke kapsidovým proteinům VP1 a VP3 viru SV40. Její enzymatická aktivita je stimulována proteinem VP3, ale ne proteinem VP1. Jejich experimenty demonstrovaly, že doména proteinu VP3 vázající PARP je lokalizována v C koncových 35 aminokyselinách, zatímco delší peptid (49 aminokyselin) byl vyžadován pro plnou stimulaci její aktivity. Přidání kompetitivního inhibitoru PARP ukázalo, že se PARP účastní životního cyklu viru SV40, protože za účasti tohoto inhibitoru byl jeho titr redukován. Nicméně přidání tohoto inhibitoru neovlivnilo replikaci viru, ani produkci kapsidových proteinů. Další experimenty naznačily, že stimulace aktivity PARP proteinem VP3 vede infikované buňky k nekróze, která by mohla usnadnit uvolnění virového potomstva SV40 z buňky. Studie GORDON-SHAAG *et al.*, (2003) identifikovali novou funkci proteinu VP3 v rekrutování enzymu PARP k indukci lytického procesu v závěru infekčního cyklu SV40.

DANIELS *et al.*, (2006a) shledali, že permeabilizace jaderné, ER a plazmatické membrány, charakteristické znaky nekrózy, korelují s objevením se pozdních genových produktů viru SV40. Jejich experimenty poukázaly na možnost, že jeden nebo více pozdních genových produktů má skutečnou schopnost navodit pozorované změny v permeabilitě membrán hostitelské buňky. Tento předpoklad testovali oddělenou expresí proteinů VP1, VP2 a VP3 v *E. coli*. Jejich výsledky demonstrovaly, že proteiny VP2 a VP3, ale nikoli protein VP1, mají schopnost permeabilizovat membrány prokaryotických buněk. Navíc protein VP3 měl jedinečnou schopnost indukovat bakteriální lyzi. Výsledky DANIELS *et al.*, (2006a) nejsou v rozporu s předchozími studiemi, ale ukázaly, že lytická aktivita proteinu VP3, a možná i VP2, je skutečnou vlastností samotných proteinů bez ohledu na buněčnou signalizaci nebo apoptózu, protože tyto proteiny projevovaly lytickou aktivitu i u *E. coli*, kde chybí PARP nebo podobné dráhy signální transdukce. DANIELS *et al.*, (2006a) demonstrovali, že uvolnění zralých virionů může být regulováno lytickými vlastnostmi pozdních minoritních proteinů.

S tímto tvrzením je v souladu i jejich další studie, ve které DANIELS *et al.*, (2007) identifikovali nový genový produkt viru SV40, zvaný VP4. Stejně tak jako protein VP3, je i protein VP4 syntetizován z vnitřního AUG kodonu v mRNA pro VP2 a poté je lokalizován v jádře. Produkce proteinu VP4 začíná až 24 hodin po začátku produkce proteinů VP2 a VP3, v čase který se kryje s buněčnou lyzí. Protein VP4 není inkorporován do maturovaných virionů. DANIELS *et al.*, (2007) zjistili, že mutace v iniciačním kodonu pro transkripci proteinu VP4 zpožďuje buněčnou lyzi o 2 dny a snižuje uvolnění infekčních částic. Navíc koprodukce proteinů VP4 a VP3, ale ne jejich individuální produkce, navozuje buněčnou lyzi i u bakterií. DANIELS *et al.*, (2007) usoudili, že je protein VP4 nezbytný pro včasné lytické uvolnění nových virionů. Protein VP4 oligomerizuje s proteinem VP3 a když jsou tyto proteiny produkovány společně, mají letální lytické vlastnosti. Tato data demonstrují, že pozdě v replikačním cyklu viru SV40, ještě po složení nových virionů, je exprimován protein VP4, aby inicioval smrt hostitelské buňky a účinné uvolnění virového potomstva.



Obr. 2.2.6: Model zobrazující regulaci lytického cyklu viru SV40 (DANIELS *et al.*, 2007). Nejprve se syntetizuje protein VP1 tvořící pentamery, které vyvazují nově syntetizované proteiny VP2 a VP3 (A-C). Skládání virionů (D) se stechiometrií pěti proteinů VP1 na jeden protein VP2, nebo VP3 zabraňuje inkorporaci dalších proteinů VP2 a VP3 do virových částic (E). Nakonec je syntetizován protein VP4, který oligomerizuje s proteinem VP3, a možná i s proteinem VP2, a cílí hostitelské membrány, do kterých dělá póry (F). Tak je iniciována lytická smrt hostitelské buňky a uvolnění virového potomstva (G).

2.2.11 Závěr

Jak je vidět z předchozích kapitol, minoritní proteiny se mohou uplatňovat v každé fázi replikačního cyklu polyomavirů. Nicméně přes všechny snahy vědeckých skupin, žádná z rolí minoritních proteinů nebyla dostatečně prokázána. Navíc názory vědeckých skupin se v některých případech rozcházejí. Mnohé experimenty však dokazují nezbytnost minoritních proteinů VP2 a VP3 pro infekčnost myšního polyomaviru nebo viru SV40. Role minoritních proteinů lidských polyomavirů JC a BK nebyla dosud prakticky prozkoumána.

3. CÍLE

V laboratoři molekulární virologie již dlouho studujeme životní cyklus myšího polyomaviru. Navíc jsme nedávno začali zkoumat další virus z čeledi *Polyomaviridae*, lidský BK virus. Ačkoli je infekce tímto virem, přítomným u většiny celosvětové populace, většinou bezpříznaková, u imunosuprimovaných pacientů po transplantaci ledvin nebo kostní dřeně bývá častou příčinou odhojení transplantátu a následného úmrtí. Protože je studium BK viru z molekulárního a buněčného hlediska, oproti studovanějším polyomavirům MPyV a SV40 zpožděno, o molekulárních mechanismech jeho patogeneze a funkcích strukturních proteinů, které kóduje, se ví jen málo. Abychom mohli začít studovat funkce strukturních proteinů tohoto lidského patogenu, bylo nezbytné proti nim připravit specifické protilátky. Dále bylo nezbytné připravit několik konstruktů pro produkci strukturních proteinů BKV v savčích a v hmyzích buňkách.

Cíle mé diplomové práce jsou tyto:

1. Příprava myší monoklonální protilátky alespoň proti některému ze strukturních proteinů:

- i) příprava rekombinantního bakuloviru pro produkci proteinu VP2 BKV fúzovaného s histidinovou kotvou v hmyzích buňkách
- ii) produkce a purifikace hlavního a minoritního strukturního proteinu BK viru
- iii) imunizace myší purifikovaným antigenem
- iv) selekce specifických monoklonálních protilátek

2. Konstrukce expresních vektorů pro produkci minoritního proteinu VP3 BKV fúzovaného s EGFP v savčích buňkách:

- i) EGFP-VP3 s EGFP fúzovaným na N konci VP3.
- ii) VP3-EGFP s EGFP fúzovaným na C konci VP3.

Díky fúzi proteinu VP3 s EGFP bude možné pozorovat interakce proteinu VP3 s buněčnými strukturami nejen na fixovaných, ale i na živých buňkách. Další výhodou bude možnost imunoprecipitace proteinových komplexů interagujících s VP3 pomocí primární protilátky proti EGFP v případě, že by použití protilátky proti VP3 nebylo možné.

4. MATERIÁL A METODY

4.1 MATERIÁL

4.1.1 Přístroje

- Aparatura pro SDS-PAAGE (*Hofer*).
- Aparatura pro western blotting TE22 (*Amersham Biosciences*).
- Centrifuga „Beckman Centrifuge GS-15R“, rotor S4180 (*Beckman*), centrifuga „Microfuge Lite Centrifuge“ (*Beckman*), centrifuga „3K30“ (*Sigma Laboratory Centrifuges*).
- CO₂ termostat (*Forma Scientific*).
- Elektroforéza E-C Apparatus corporation (*Hofer*).
- Elektronový mikroskop JEOL JEM 1200EX.
- Elektroporátor Gene Pulser Apparatus (*Biorad*), elektroporátor Amaxa Nucleofector® (*Amaxa biosystems*.)
- Fluorescenční mikroskop BX-60 (*Olympus*), fluorescenční invertovaný mikroskop IX71 (*Olympus*).
- Invertovaný mikroskop (*Carl Zeiss-Jena*), invertovaný mikroskop CK40 (*Olympus*).
- Konfokální mikroskop LCS SP2 Laser scanning confocal microscope (*Leica*).
- Kultivační třepačky Orbital Shaker (*Forma Scientific*), ORBI-SAFE TS (*Gallenkamp*).
- Laminární box (*Forma Scientific*).
- Lupa s bočním osvětlením (*Olympus*).
- Magnetická míchačka- B212 (*BIBBY*).
- Mikrocentrifuga „Becman Mikrofuge Centrifuge“, rotor F241,5 (*Beckman*).
- PCR aparatura MiniCycler TM (*MJ Research*).
- Refraktometr „ABBE“ (*Carl ZEISS JENA*).
- Scanner Power Look III (*UMAX*).
- Sonikátor Branson 5 (*Cole-Parmer Instrument Company*), sonikátor Soniprep 150 (*Schoeller Pharmacia Praha*), sonikátor UP50H (*Schoeller Pharmacia Praha*).
- Spektrofotometr- Heλios β (*Thermo Electron Corporation*).
- Termostat TCH 100 (*laboratorní přístroje Praha*), Termostat ThermoBox LBT169 (*Zanussi*).
- Třepačky- Labnet, Duomax 1030 (*Heidolph*).
- Ultracentrifuga „Optima TM L-90K Ultracentrifuge“ (*Beckman*).
- UV transluminátor (*BioLum*).
- Vortex-Genie 2 (*Scientific Industries*).
- Vodní lázeň-SUB (*Grant*).
- Zdroje elektrického napětí -Giene line TM Power Supply (*Beckman*), OSP-250L Power Supply (*Lightning Volt*).

4.1.2 Chemikálie a roztoky

Používané chemikálie:

- Agaróza pro elektroforézu, bovinní sérum-albumin (BSA), ethylendiamintetraacetát disodný (EDTA), deoxy nukleotid trifosfát (dNTP), fetální telecí sérum (FCS), chlorid sodný (NaCl), chlorid vápenatý (CaCl₂), kyselina p-kumarová, L-glutamin, nonidet P-40 (NP-40), phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), dodecylsulfát sodný (SDS), N, N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED), Tris-(hydroxymethyl)-aminometan (Tris), Triton-x-100, peroxid vodíku (H₂O₂), Triton-x-114, Coomassie Brilliant Blue R250 (CBBR250), fosforečnan sodný, angl. (N-[2-Hydroxyethyl] piperazine-N'-[2ethansulfonic acid]) HEPES, fenol (destilovaný, pufrovaný 1M Tris-HCl pH=8, s přidáním 0,1% 8-hydroxycholínu - upraveno výrobcem), sodium-pyruvát, trichostatin A z *Streptomyces sp.*, paraformaldehyd, želatina (angl. Gelatin from porcine skin, Typ A), dimethylsulfoxid (DMSO), polyethylenglykol (PEG) 3350 (**Sigma**).
- Akrylamid, amonium persulfát (APS), Cesium chlorid (CsCl), Coomassie Brilliant Blue G250 (CBBG250), Glycin, Glukóza, kyselina boritá, luminol, β-merkaptóetanol, polyethylenglykol 20 000 (PEG 20 000), Imidazol (**Serva**).
- Bacto-pepton, kvasničný autolyzát, živný agar, č. 2, živný bujón č. 2. (**Imuna**).
- Bromfenolová modř (BFM), dihydrogenfosforečnan draselný (KH₂PO₄), etanol, ethidium bromid (EtBr), glycerol, hydrogenfosforečnan disodný (dodekahydrát) (Na₂HPO₄), hydroxid sodný (NaOH), chlorid draselný (KCl), chlorid manganatý (MgCl₂), chloroform, izopropanol, kyselina chloristá (HClO₄), kyselina chlorovodíková (HCl), kyselina octová, kyselina peroctová, metanol, octan draselný (KAc), octan sodný (NaAc), síran hořečnatý (MgSO₄). Izoamylalkohol, močovina, sacharóza, aceton, kyselina fosforečná (H₃PO₄) (**Lachema**).
- Dithiotreitol (DTT), Koktejl inhibitorů proteáz „Complete Mini, EDTA-free“ (**Roche Diagnostics**)
- Izopropyl-β-D-thiogalaktosid (IPTG), 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid/ N,N-dimethylformamid (X-gal) (**Fermantas**)

Roztoky:

(Pokud není uvedeno jinak, jedná se o roztoky v dH₂O)

B pufr	10 mM Tris-HCl (pH=7,4), 150 mM NaCl, 10 μM CaCl ₂
Barvicí roztok	0,5% CBBG250, 3,5% HClO ₄
BFM	130 mM EDTA-NaOH (H=8,0), 0,12% BFM ve vodném roztoku 50% glycerolu
Blotovací pufr	25 mM Tris, 185 mM glycin, 20% metanol (pH=8,3)
Bradfordové roztok	V 50 ml 96% etanolu rozpustit 100 mg CBB-G250 (9-12h), poté přidat 100 ml H ₃ PO ₄ a doplnit ddH ₂ O do 1000ml. Výsledný roztok zfiltrovat přes 0,22 μl filtr (<i>Milipore</i>)

KAPITOLA 4: MATERIÁL A METODY

<u>Elektroforetický pufr</u>	250 mM Tris, 1,92 M glycin, 1% SDS, pH=8,3
<u>Eluční pufr</u>	20 mM fosforečnan sodný, 0,5 M NaCl, 500 mM imidazol. Upravit pomocí HCl na pH=7,4. v ddH ₂ O
<u>Fixační roztok</u>	5% HClO ₄ , 50% metanol
<u>HEBS (10x)</u>	1,37 M NaCl, 0,06 M glukóza, 0,05 M KCl, 0,007 M Na ₂ HPO ₄ , 0,2 M HEPES
<u>Chloroform</u>	Upravená směs chloroformu s izoamylalkoholem (v/v 24:1). Izoamylalkohol se přidává, aby zamezil pění směsi při organické extrakci.
<u>Laemmli pufr (5x)</u>	5% SDS, 50 mM Tris-HCl (pH=6,8), 50% (v/v) glycerol, 25% β-merkaptoetanol, 0,005% (w/v) BFM.
<u>Luminol</u>	A) 18 ml ddH ₂ O, 2 ml Tris-HCl (pH=8,5), 200 μl luminolu a 88 μl kumarové kyseliny B) 18 ml ddH ₂ O, 2 ml Tris-HCl (pH=8,5), 20 μl H ₂ O ₂ . Složky A a B smíchat bezprostředně před aplikací na membránu.
<u>NaAc</u>	3M octan sodný, pH=5,2
<u>PBS</u>	8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na ₂ HPO ₄ , 0,24 g KH ₂ PO ₄ , doplnit ddH ₂ O do 1000 ml, upravit pH na 7,4
<u>RIPA</u>	150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH=7,4), 0,05% NP-40, 1% deoxycholát sodný, 1% Triton-x-100, 0,1% SDS.
<u>Roztok I</u>	50 mM glukóza, 25 mM Tris-HCl (pH=8,0), 10 mM EDTA, RNáza A (0,1 mg/ml)
<u>Roztok II</u>	0,2 M NaOH, 1% (w/v) SDS
<u>Roztok III</u>	60 ml 5M KAc (pH=5,2), 29,5 ml ledové kyseliny octové, doplnit dH ₂ O do 100 ml
<u>SOC médium</u>	20 g bacto-pepton, 5 g kvasničný autolyzát, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM glukóza. Roztoky MgCl ₂ , MgSO ₄ a glukózu sterilizovat samostatně a k médiu přidat bezprostředně před použitím.
<u>STET</u>	10% sacharóza, 50 mM Tris-HCl (pH=8), 50 mM NaOH-EDTA (pH=8), 1% Triton-X-100.
<u>5x TBE</u>	54g Tris, 27,5g kyselina boritá, 20 ml 0,5 M EDTA-NaOH (pH=8,0) doplnit dH ₂ O do 1l
<u>TBS</u>	0,15 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH=7,6
<u>TE</u>	(Tris/EDTA) pufr-10 mM Tris-HCl (pH=8,0), 10 mM EDTA
<u>TPN médium</u>	20 g bacto-pepton, 5 g kvasničný autolyzát, 10 g NaCl, doplnit dH ₂ O do 1000 ml, (121 C, 15 min)
<u>Vazebný pufr</u>	20 mM fosforečnan sodný, 0,5 M NaCl, 20 mM imidazol. Upravit pomocí HCl na pH=7,4. V ddH ₂ O.
<u>ŽA2</u>	4% živný agar č. 2, sterilizovat 15 minut při 121°C.
<u>ŽB2</u>	2% živný bujón č. 2, sterilizovat 15 minut při 121°C.



4.1.3 Komerční soupravy (kity)

Nucleospin Extract II (*Macherey Nagel*)

Endotoxin Maxi Free kit (*Quiagene*)

Cell line Nucleofector kit v Solution Box (*AMAXA*)

4.1.4 Použité enzymy

Restrikční endonukleázy (*Fermentas*):

Alw 441, Bam HI, Eco RI, Eco RV, Nco I, Nde I, Pst I, Pvu II, Ssp I, Xho I.

Vent DNA polymeráza (*Fermentas*)

T4 DNA ligáza (*Fermentas*)

Alkalická fosfatáza (CIAP) (*Boehringer Mannheim*)

Výše uvedené enzymy byly kombinovány pouze s komerčními pufrý doporučenými výrobcem.

RNáza A (*Sigma*): 10 mg/ml, zbavená DNázy (5min/100 °C), v ddH₂O

Lysozym (*Sigma*): 5%, v ddH₂O

Proteináza K (*Sigma*): 10 mg/ml, v ddH₂O

4.1.5 Vektory

pFast Bac HTA

Donorový vektor plazmidového typu, do kterého je možné vložit cizí gen za histidinovou kotvu (6 x His) za účelem exprese rekombinantních proteinů v bakulovirovém systému „Bac-to-Bac“. Vektor obsahuje polyhedrinový promotor (P_{PH}), který umožňuje účinnou expresi rekombinantního proteinu v hmyzích buňkách, přičemž hladina exprese je vysoká. Součástí vektoru je „multiple cloning site“ (MCS) umožňující klonování genu zájmu, polyadenylační signál viru SV40 pro účinnou terminaci transkripce a polyadenylaci mRNA, originy f1 a pUC a transpoziční místa Tn7L a Tn7R pro místně specifickou transpozici genu zájmu do bakulovirového genomu. Vektor obsahuje také gen pro rezistenci k ampicilinu umožňující selekci plazmidu v *E. coli* a gen pro rezistenci ke gentamycinu umožňující selekci rekombinantního bacmidu v DH10Bac™ *E. coli*. (viz obr. 5.1.1) (*Invitrogen*).

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

KAPITOLA 4: MATERIÁL A METODY

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 fúzaný s EGFP je exprimován z časného promotoru lidského cytomegaloviru (HCMV) (viz Obr. 5.2.1) (*Clontech*)

pEGFP-N1

Plazmidový vektor určený pro expresi proteinu zájmu fúzaného 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 (viz Obr. 5.2.5) (*Clontech*).

p734A

Plazmidový vektor nesoucí celý genom BK viru klonovaný v místech *Bam* *HI*, *Pst* *I*. Plazmid byl použit jako templát pro získání genu pro protein VP2 a VP3 BKV metodou PCR amplifikace. (Plazmid poskytla *Dr. Kristina Dorries, SRN*)

4.1.6 Primery (KRD)

pFBHTA-1 pro klonování genu pro protein VP2 BK viru do vektoru pFastBac HTA:

5' CAGGTCGAATTCGGTGCTGCTCTAGCAC 3'

Podtržené je restrikční místo pro *Eco* *RI*. Tučně je komplementární sekvence k amplifikovanému genu.

pFBHTA-2 pro klonování genu pro protein VP2 BK viru do vektoru pFastBac HTA:

5' GCGACCCTGCAGTAACTTCTAGAACTTCTAC 3'

Podtržené je restrikční místo pro *Pst* *I*. Tučně je komplementární sekvence k amplifikovanému genu.

pSVL-VP2-B pro klonování genu pro protein VP3 BK viru do vektoru pEGFP-C2:

5' GTCCCAGGATCCTTAACTTCTAGAACTTCTACTCC 3'

Podtržené je restrikční místo pro *Bam* *HI*. Tučně je komplementární sekvence k amplifikovanému genu.

KAPITOLA 4: MATERIÁL A METODY

pEGFP-C2-VP3(BKV) pro klonování genu pro protein VP3 BK viru do vektoru pEGFP-C2 a pEGFP-N1:

5'CGAAGCGAATTCATGGCTTTGGAATTGTTAACC 3'

Podtržené je restriční místo pro *Eco RI*. Tučně je komplementární sekvence k amplifikovanému genu.

pEGFP-N1-VP3(BKV) pro klonování genu pro protein VP3 BK viru do vektoru pEGFP-N1:

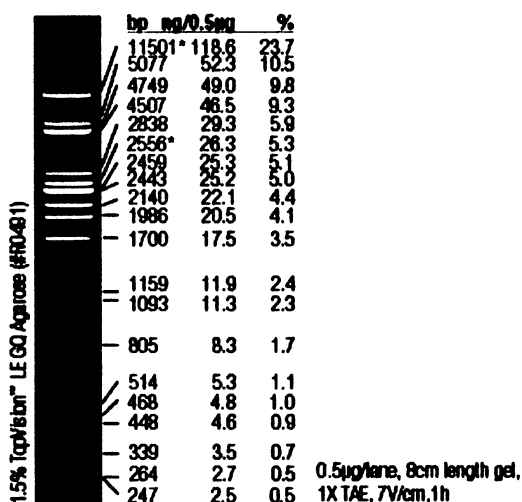
5'GTCCCAGGATCCAGACTTCTAGAACTTCTACTCCTC

Podtržené je restriční místo pro *Bam HI*. Tučně je komplementární sekvence k amplifikovanému genu.

4.1.7 Markery molekulových hmotností

DNA marker λ /Pst I

Marker byl připraven restričním štěpením DNA bakteriofága λ restriční endonukleázou *Pst I*. (Reakce probíhala podle kapitoly 4.2.5.4.1). Enzym *Pst I* byl inaktivován inkubací reakční směsi 20 min při 80 °C. Nakonec bylo k markeru přidáno 20 μ l BFM. Na obrázku 4.1.1 je ukázka rozložení jednotlivých fragmentů DNA vzniklých štěpením pomocí *Pst I*.



Obr. 4.1.1: Velikosti fragmentů DNA bakteriofága λ , po štěpení restriční endonukleázou *Pst I*, používané jako marker molekulových hmotností DNA při separaci v 1,5% agaróze. (převzato z www.fermentas.cz). Zkratka bp znamená páry bázi, hvězdičkami (*) jsou označeny kohezivní konce o přesahu 12 bp fragmentů 11 501 a 2 556, které mohou asociovat a vytvářet další fragment o velikosti 14 057 bp.

Proteinové markery (kDa):

A) 229, 120, 87, 50, 33, 26, 17,9 (*Genetica*)

B) 175, 116, 93, 65, 57, 36,31 (*Sigma*) (Molekulová hmotnost fragmentů se může lišit o +/- 1 kDa).

C) 94, 67, 43, 30 (80 μ g/100 μ l), 20 (*Pierce*)

4.1.8 Protilátky

4.1.8.1 Primární protilátky

- Králičí polyklonální protilátka proti minoritním proteinům VP2 a VP3 viru SV40. Použité ředění 5000 x pro nepřímou imunofluorescenci a 1000 x pro western blot. *Malé množství protilátky bylo získáno z laboratoře prof. Ariely Oppenheim.*
- Králičí polyklonální protilátka proti proteinu VP1 BK viru. Použité ředění 250 x pro nepřímou imunofluorescenci a 50 x pro western blot. *Protilátka byla připravena v naší laboratoři M. Stančíkovou a V. Hruškovou.*
- Kuřecí protilátka proti zelenému fluorescenčnímu proteinu (EGFP). Použité ředění 500x pro nepřímou imunofluorescenci (*Abcam*).
- Králičí polyklonální protilátka proti zelenému fluorescenčnímu proteinu (EGFP). Použité ředění 1000 x pro nepřímou imunofluorescenci a pro western blot (*Abcam*).
- Kozí polyklonální protilátka „F₁-ATPáze (C-20)“ namířená proti peptidu na C konci lidské F₁-ATPázy. Použité ředění 50x. Fixace metanol/aceton!. (*SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC*).
- Kozí polyklonální protilátka proti laminu B. Použité ředění 100 x na nepřímou imunofluorescenci. (*SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC*).
- Krysí monoklonální protilátka proti GRP94 (Glukose regulated protein 94). Použité ředění 250 x na nepřímou imunofluorescenci. Fixace metanol/aceton! (*Abcam*).
- Myší monoklonální protilátka proti PML tělískům. Použité ředění 1000x na nepřímou imunofluorescenci (*Alexis*).

4.1.8.2 Sekundární protilátky

- Kozí protilátka proti králičím imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou (HRP) (*Pierce*).
- Kozí protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou (HRP) (*Bio Rad*).
- Oslí protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s alexa fluor (AF) 488 (*Molecular Probes*).
- Kozí protilátka proti králičím imunoglobulinům konjugovaná s AF546 (*Molecular Probes*).
- Kuřecí protilátka proti králičím imunoglobulinům konjugovaná s AF488 (*Molecular Probes*).
- Kozí protilátka proti kuřecím imunoglobulinům konjugovaná s AF488 (*Molecular Probes*).
- Oslí protilátka proti kozím imunoglobulinům konjugovaná s AF546 (*Molecular Probes*).
- Kozí protilátka proti krysím imunoglobulinům konjugovaná s AF546 (*Molecular Probes*).
- Kozí protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s AF594 (*Molecular Probes*).

(Všechny sekundární protilátky byly použity v ředění 1000 x pro nepřímou imunofluorescenci i pro western blot.)

4.1.9 Použité viry a jejich charakteristika

r-Bac-VP1 BKV: Tento rekombinantní bakulovirus byl připraven za účelem produkce pseudokapsid (VLPs) složených pouze z molekul hlavního strukturního proteinu VP1 viru BK. Gen pro protein VP1 byl vložen pod polyhedrinový promotor genomu bakuloviru. (V. Hrušková, 2004)

r-Bac-VP1/VP2 BKV: Rekombinantní bakulovirus, který nese pod polyhedrinovým promotorem gen pro protein VP1 BKV a pod dalším silným promotorem pro protein p10 gen pro minoritní strukturní protein VP2 BKV. Simultánní produkci těchto dvou proteinů dochází v jádrech hmyzích buněk k formování pseudokapsid (VLPs) složených z obou strukturních proteinů BK viru. (V. Hrušková & M. Stančíková, 2004)

r-Bac-VP1/VP3 BKV: Rekombinantní bakulovirus, který nese pod polyhedrinovým promotorem gen pro strukturní protein VP1 BK viru a pod dalším silným promotorem pro protein p10 gen pro minoritní strukturní protein VP3 BKV. Po produkci těchto dvou proteinů se v hmyzích buňkách tvoří pseudokapsidy (VLPs) složené z molekul proteinu VP1 a VP3 BK viru. (V. Hrušková & I. Moserová, 2006).

r-Bac-VP2 BKV: Tento rekombinantní bakulovirus jsem připravila v rámci své diplomové práce pro produkci minoritního strukturního proteinu VP2 BK viru v hmyzích buňkách. Do bakulovirového genomu byl gen pro protein VP2 BK viru vložen pod silný polyhedrinový promotor

Wt-Bac Divoký bakulovirus produkující polyhedrin.

BKV BK virus (Získáný z univerzity ve Würzburgu od prof. K. Dorries).

4.1.10 Hmyzí a savčí buněčné linie

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

KAPITOLA 4: MATERIÁL A METODY

<u>Swiss 3T3</u>	Myší fibroblasty odvozené z embryonálních tkání. Použité pro transfekci expresními vektory pro produkci minoritních proteinů BK viru. Tato buněčná linie byla poskytnuta <i>Dr. J. Hejnarem, ÚMG AV ČR, Praha</i> .
<u>Swiss 3T6</u>	Myší fibroblasty odvozené z embryonálních tkání. Použité pro transfekci expresními vektory pro produkci minoritních proteinů BK viru. Tato buněčná linie byla získána z <i>German Collection of Microorganisms and Cell Cultures Dept. Human and Animal Cell Cultures</i> . Označení ACC 202.
<u>VERO</u>	Buněčná linie heteroploidních fibroblastoidních buněk odvozená z ledvin Afrického kočkodana (<i>Cercopithecus aethiops</i>) Získaná z <i>univerzity ve Wurzbürgu od prof. K. Dorries</i> .
<u>Sp 2/0</u>	Klonální linie myších buněk odvozená z myelomové tkáně myšeho kmene Balb/c. Linie byla získána od <i>Prof. Hořejšího (UMG AV ČR, Praha)</i> . Linie původně pochází z <i>americké sbírky buněčných linií (angl. American Type Cell Collection, Rockville, Maryland)</i> . Tato myelomová linie je rezistentní vůči geneticinu a produkuje interleukin-6 (IL-6).

4.1.11 Média a chemikálie pro tkáňové kultury

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (*Sigma*), RPMI 1640 (*Sigma*), „TNM-FH“ insect medium (*Sigma*)

H(A)T: RPMI 1640 médium s 10% FCS, 10 mM HEPES v ddH₂O pro tkáňové kultury, 1 mM pyruvát, 50 µM β-merkaptotanol, směs antibiotik pro TK, 2mM glutamin, směs hypoxantinu, (aminopterinu) a thymidinu „H (A)T“, (*Sigma*)

Mrazíci médium: RPMI 1640 médium s 20% FCS, 10 mM HEPES v ddH₂O pro tkáňové kultury,

1 mM pyruvát, 50 µM β-merkaptotanol, směs antibiotik pro TK, 2mM glutamin

FCS (*Sigma*), Verzén (*Sevac*), Trypsin (*Sigma*), 2 mM Glutamin (*Sigma*), Antibiotika pro TK (*Sigma*)

4.1.12 Bakteriální kmeny

Escherichia coli DH5α [rec A1 endA1 thi-1 hsdR17 supE44, gyrA95 relA1 φ80 lacZΔM15] (*Stratagene*)

KAPITOLA 4: MATERIÁL A METODY

Escherichia coli DH10 Bac [F-*mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1 endA1 araD139* Δ (*ara, leu*)7697 *galU galK* λ - *rpsL nupG* /pMON14272] (Invitrogen)

4.1.13 Antibiotika

Ampicilin Používán v konečné koncentraci 100 μ g/ml (*Léčiva*).

Kanamycin Používán v konečné koncentraci 50 μ g/ml (*Sigma*).

Gentamycin Používán v konečné koncentraci 7 μ g/ml (*Gibco*).

Geneticin (G418) Používán v konečné koncentraci 400 μ g/ml (*Sigma*).

Tetracyklin Používán v konečné koncentraci 10 μ g/ml (*Sigma*).

Směs antibiotik pro TK Používán 100x koncentrovaný roztok obsahující na 1 ml 10000 jednotek ampicilinu, 10 mg streptomycinu a 25 mg amphotericinu B (*KRD*).

4.2 METODY

4.2.1 Sterilizace materiálu

Roztoky, mikrozkušavky a špičky k mikropipetám byly sterilizovány autoklávováním 30 min/ 120 kPa /127°C. Roztoky, které se nedaly sterilizovat autoklávováním, byly filtrovány přes 0,2 μ m filtr. Umělohmotné centrifugační zkumavky byly sterilizovány parami kyseliny peroctové 24 hodin. Pinzety, mikrobiologické hokejky a klíčky byly sterilizovány žiháním nad plamenem (po namočení do 96 % etanolu).

4.2.2 Práce s kmeny *Escherichia coli*

4.2.2.1 Kultivace *E. coli*

Bakterie byly kultivovány požadovanou dobu buď na pevném médiu ŽA2 staticky v termostatu při 37°C, nebo v tekutém médiu ŽB2 v termostátové třepačce při 37°C. Při kultivaci bakterií rezistentních na některá antibiotika byla tato antibiotika přidána v doporučené koncentraci do ŽB2.

4.2.2.2 Příprava konzerv *E. coli* pro dlouhodobé skladování

Bakterie byly kultivovány v ŽB2 při 37 °C přes noc za stálého třepání. Suspenze buněk byla rozdělena do mikrozkušavek a byl k ní přidán glycerol tak, aby jeho výsledná koncentrace byla 15-20%. Konzervy byly uchovány při -75°C.

4.2.2.3 Transformace kmenů *E. coli*

Transformací se rozumí vnesení molekuly DNA do bakteriální buňky. Tento proces se děje u buněk, které jsou ve stavu kompetence. Stav kompetence tedy značí schopnost buněk transportovat DNA z vnějšího prostředí do buňky. Bylo vyvinuto několik metod přípravy kompetentních buněk pro různé způsoby transformace. Já jsem ve své diplomové práci aplikovala transformaci pomocí elektroporace a pomocí teplotního šoku.

4.2.2.3.1 Příprava buněk kompetentních pro transformaci elektroporací

(DOWER *et al*, 1988)

Bakterie *E. coli* kmene DH5 α byly naočkovány do 10 ml ŽB2 a kultivovány přes noc při 37 °C za stálého třepání. Druhý den byla suspenze buněk naředěna ŽB2 přibližně 25 krát tak, aby výsledná optická denzita při 560 nm (OD) v 500 ml média činila 0,1. Suspenze buněk byla kultivována aerobně při 37 °C a průběžně byla měřena OD₅₆₀, až do hodnoty 0,5-0,7. Poté byla suspenze buněk centrifugována (4150 x g/ 10 min/4 °C) a pelet byl resuspendován v 500 ml ddH₂O vychlazené na 4 °C. Následně byla suspenze buněk opět centrifugována (4150 x g/10 min/4 °C), pelet byl resuspendován v 250 ml ddH₂O vychlazené na 4 °C a opět centrifugován (4150 x g/10 min/4 °C). Poté byl sediment buněk znovu resuspendován, tentokrát v 20 ml 10% glycerolu vychlazeného na 4 °C a centrifugován (4150 x g/10 min/4 °C). Na závěr byl buněčný sediment resuspendován v 10 ml 10% glycerolu vychlazeného na 4 °C a centrifugován (4150 x g/10 min/4 °C) Finální pelet byl resuspendován v 1 ml 10% glycerolu vychlazeného na 4 °C, buňky byly rozděleny po 50 μ l do mikrozkušavek, zmrazeny v tekutém dusíku a uchovány při -75°C.

4.2.2.3.2 Transformace *E. coli* kmene DH5 α elektroporací

(DOWER *et al*, 1988)

Buňky kompetentní pro elektroporaci byly rozmrazeny na ledu. K 40 μ l kompetentních buněk bylo přidáno 1-5 μ l plazmidové DNA a směs byla promíchána. Poté byla směs převedena do elektroporační kyvety vychlazené na 0 °C. Na elektroporátoru byly nastaveny hodnoty 25 μ F, 2,5 kV a 200 Ω , elektroporační kyveta byla umístěna do elektroporátoru a byl aplikován puls. Optimální délka pulsu byla 4-5 ms. K transformovaným bakteriím byl ihned přidán 1 ml SOC média a byly převedeny do sterilní kultivační nádoby. Bakterie byly kultivovány aerobně po dobu jedné hodiny při 37 °C a poté vysety v různých koncentracích na misku s ŽA2 a selekčními antibiotiky a kultivovány přes noc při 37 °C v termostatu.

4.2.2.3.3 Příprava buněk kompetentních pro transformaci teplotním šokem

Bakterie *E. coli* DH10Bac byly naočkovány do 5 ml ŽB2 obsahujícího selekční antibiotika tetracyklin (10µg/ml) a kanamycin (50 µg /ml) a inkubovány přes noc při 37°C aerobně. Narostlé inokulum (4ml) bylo převedeno do 400 ml ŽB2 se selekčními antibiotiky a kultivováno při 37 ° C za stálého třepání, dokud bakteriální kultura nedosáhla optické hustoty 0,4 při 600 nm. Bakteriální biomasa byla sedimentována centrifugací (4150 x g/10 min/4°C) a sediment buněk byl dvakrát promyt 10 ml vychlazeného 50 mM CaCl₂, přičemž při druhém promývání byly bakterie inkubovány 30 minut na ledu. Po poslední centrifugaci byly bakterie resuspendovány ve 2 ml vychlazeného 50 mM CaCl₂ s 15-20% glycerolem a rozděleny po 400 µl do předchlazených mikrozkušavek a uchovány při -75°C.

4.2.2.3.4 Transformace *E. coli* kmene DH10Bac teplotním šokem

Před transformací byly kompetentní buňky inkubovány minimálně 2 hod/ledu. Ve zkumavce bylo smícháno 200 µl kompetentních buněk a 10 µl plazmidové DNA donorového plazmidu. Následně byla směs inkubována 30 minut na ledu. Směs byla vystavena teplotnímu šoku inkubací ve vodní lázni (42°C/45 s) a bezprostředním ochlazením na ledu 2 min. Poté byl k buňkám přidán 1 ml SOC média a buňky byly inkubovány aerobně 2 hod/ 37°C. Bakterie byly vysety v různých koncentracích na misky s ŽA2, selekčními antibiotiky: kanamycin (50µg/ml), gentamycin (7µg/ml) a tetracyklin (10µg/ml), chromogenním substrátem β-galaktosidázy X-gal (100µg/ml) a induktorem IPTG (40 µg/ml) a kultivovány 48 hod/37 ° C v termostatu. Narostlé bílé rekombinantní kolonie byly sterilně odebrány a inokulovány na čerstvou plotnu s ŽA2, selekčními antibiotiky, X-gal a IPTG. Po 24 hodinové inkubaci při 37°C byly bakteriální klony s bílým fenotypem kontrolovány na přítomnost transgenů pomocí detekce PCR.

4.2.2.4 Kontrola senzitivity *E. coli* kmene DH5α k ampicilinu a kanamycinu

Byla provedena kontrola případné kontaminace kmene DH5α. Bakterie DH5α byly naočkovány na plotnu s ŽA2 bez selekčních antibiotik tak, aby se po kultivaci vytvořily jednotlivé monokolonie. Misky byly inkubovány přes noc při 37 ° C v termostatu. Po kultivaci byla vybrána jedna monokolonie, která byla zaočkována do 5 ml ŽB2 bez selekčních antibiotik. Směs byla kultivována přes noc při 37°C aerobně. Poté byla kultura rozetřena mikrobiologickou hokejkou na plotnu s ŽA2 obsahujícím kanamycin, nebo ampicilin a inkubována přes noc při 37 ° C v termostatu. Jestliže se na miskách s kanamycinem nebo ampicilem nevytvořily kolonie buněk, byla vybrána monokolonie senzitivní na daná antibiotika a byla z ní zhotovena konzerva. Jestliže se alespoň na jedné z misek vytvořily kolonie, byla celá procedura zopakována s jinou monokolonií.

4.2.3 Práce s tkáňovými kulturami

4.2.3.1 Práce s hmyzími buňkami

4.2.3.1.1 Pasážování hmyzích buněk

(SUMMERS *et al*, 1987)

V naší laboratoři pracujeme s hmyzí buněčnou linií odvozenou z tkáně vaječníků můry *Spodoptera frugiperda*. Hmyzí buňky narostlé na Petriho misce o Ø 9 cm určené pro tkáňové kultury byly po dosažení 100% konfluence šetrně seškrabány škrabátkem do TNM-FH hmyzího média, ve kterém byly pěstovány, a poté byla buněčná suspenze převedena do sterilní 50 ml zkumavky. K buňkám bylo přidáno TNM-FH hmyzí médium s 10% FCS v poměru 1:4. Buňky byly resuspendovány prosátím pipetou, rozděleny po 10 ml na čtyři nové Petriho misky o Ø 9 cm a uchovány při 28°C.

4.2.3.1.2 Infekce hmyzích buněk bakulovirem

(SUMMERS *et al*, 1987)

Buňky byly pasážovány do bez-sérového TNM-FH hmyzího média tak, aby byla jejich konfluence 50%, a to na Petriho misky o Ø 9 cm nebo na mikroskopická sklíčka. Po přichycení buněk na dno (cca 30 min) bylo odsáto médium a bylo přidáno bakulovirové inokulum (10 PFU na buňku) v objemu 1ml na Petriho misku Ø 9 cm respektive 200 µl na sklíčko. Buňky byly za stálého kolébání inkubovány 1 hod/RT. K buňkám bylo přidáno TNM-FH hmyzí médium s 10% FCS a infikované buňky byly inkubovány 72 hod/28 °C pro rozšíření infekce.

4.2.3.1.3 Sklizení hmyzích buněk infikovaných bakulovirem

Hmyzí buňky byly šetrně seškrabány do TNM-FH hmyzího média, ve kterém probíhala infekce 72 hpi bakulovirem. Suspenze byla přenesena do 50 ml zkumavky a centrifugována (405 x g/5 min). Supernatant byl sterilně odebrán a uchován při 4 °C jako bakulovirové inokulum. Sediment hmyzích buněk byl promyt vychlazeným PBS pro odstranění sérových proteinů a uchován při -20°C pro další použití.

4.2.3.1.4 Analýza a izolace rekombinantních plaků

(SUMMERS *et al*, 1987)

Hmyzí buňky byly pasážovány do bez-sérového TNM-FH hmyzího média na kultivační misky (Ø 6 cm) tak, aby jejich konfluence byla 30-40%. Po přichycení buněk na dno misky bylo odsáto médium a bylo přidáno 0,5 ml bakulovirového inokula v ředění 10⁻⁴ až 10⁻⁷. Poté byly buňky za stálého kolébání inkubovány 1 hod/RT. Po inkubaci bylo inokulum z buněk odsáto a buňky byly přelity 4 ml sterilní 1,5% Sea Plaque agarózy (FMC BioProducts) v 1x TNM-FH hmyzím médiu s 10% FCS a antibiotiky pro TK. Po ztuhnutí

agarózy byly buňky inkubovány v humidním prostředí při 28 °C po dobu 6 až 8 dní. Poté byly vybrány rekombinantní plaky pod lupou v bočním světle na základě absence polyheder vyskytujících se u divokého typu bakuloviru. Rekombinantní bakuloviry produkující minoritní protein VP2 BKV byly vybrány na základě přítomnosti buněk s protáhlou morfologií, protože již při studiu myšího polyomaviru jsme si všimli takové morfologie u buněk, v kterých byl produkován protein VP2. Vybrané rekombinantní plaky byly označeny, vypíchnuty sterilní špičkou a přeneseny na Petriho misku o Ø 6 cm s hmyzími buňkami a TNM-FH hmyzím médiem s 10% FCS. Po pomnožení klonu rekombinantního bakuloviru (cca 4-7 dní) byl supernatant použit jako inokulum pro další analýzu plaků. Tento postup byl opakován do té doby, než byl získán pouze rekombinantní bakulovirus nekontaminovaný bakulovirem divokého typu.

4.2.3.1.5 Transfekce hmyzích buněk bakulovirovou DNA

(SUMMERS *et al*, 1987)

Hmyzí buňky byly pasážovány na kultivační misky (Ø 6 cm). Po přichycení buněk na dno bylo odsáto médium a byly přidány 2 ml čerstvého TNM-FH hmyzího média s 10% FCS. Poté byla připravena transfekční směs, která obsahovala 10 µl bakulovirové DNA, 950 µl pufru HEBS a 50 µl 2,5 M CaCl₂. Směs byla promíchána a inkubována 30 min/RT. Transfekční směs byla poté po kapkách přidána k hmyzím buňkám, které byly následně inkubovány 4 hod/28°C. Nakonec bylo médium z buněk odsáto, buňky byly opláchnuty TNM-FH hmyzím médiem s 10% FCS a poté inkubovány 4-6 dní při 28 °C v TNM-FH hmyzím médiu se sérem.

4.2.3.2 Práce se savčími buňkami

4.2.3.2.1 Pasážování savčích buněk

Z konfluentně narostlé kultivační misky (Ø 6 cm) bylo odsáto médium. Poté byly buňky opláchnuty 5 ml Verzénu a bylo přidáno 300 µl 0,25% roztoku trypsinu ve Verzénu a buňky byly inkubovány 1-5 minut při 37 °C. Po uvolnění buněk ode dna misky byla trypsinizace zastavena přidáním na 37 °C ohřátého DMEM média s 5% (v případě buněk VERO) nebo 10% (v případě buněk 3T6 nebo 3T3) FCS a buňky byly v médiu důkladně resuspendovány. Nakonec byla suspenze buněk naředěna do čerstvého DMEM média se sérem ohřátého na 37°C. Buňky VERO byly pasážovány v poměru 1:12 do DMEM média s 5% FCS, zatímco buňky 3T6 a 3T3 byly pasážovány v poměru 1:6 do DMEM média s 10% FCS. Buňky byly uchovávány při 37 °C v CO₂ inkubátoru.

4.2.3.2.2 Synchronizace savčích buněk odstraněním séra z média

Savčí buňky byly pasážovány do DMEM média se sérem v požadovaném poměru, a to na mikroskopická sklíčka nebo na kultivační misky (Ø 6 cm). Po přichycení buněk na dno (cca 3 -5 hod) bylo

médium se sérem z buněk odsáto a vyměněno za médium DMEM bez séra ohřátého na 37°C. Buňky byly v bez-sérovém médiu synchronizovány po dobu 20 až 24 hodin při 37°C v CO₂ inkubátoru.

4.2.3.2.3 Infekce buněčné linie VERO pro imunofluorescenční značení kapsidových proteinů BKV

Buňky VERO byly pasážovány do DMEM média s 5% FCS na mikroskopická sklička tak, aby jejich konfluence činila asi 30%. Po přichycení buněk na dno byly buňky 20 hod synchronizovány v bez-sérovém médiu a poté byl k buňkám přidán virus naředěný v bez-sérovém médiu. Buňky byly infikovány s multiplicitou infekce 10 (M.O.I=10) ve 200 µl média, a poté inkubovány 1-1,5 hod/37°C v CO₂ inkubátoru. Po inkubaci k nim bylo přidáno DMEM médium s 2 % FCS ohřáté na 37°C a buňky byly inkubovány 50 až 60 hodin při 37°C v CO₂ inkubátoru a následně fixovány.

4.2.3.2.4 Počítání buněk v Bürkerově komůrce

Homogenní buněčná suspenze (50 µl) byla nanášena pod mikroskopické skličko na Bürkerově komůrce. Buňky byly počítány s použitím invertovaného mikroskopu po diagonále mřížky Bürkerovy komůrky. Bylo spočítáno minimálně 24 polí tak, aby žádná z buněk nebyla vynechána ani počítána 2x. Počet buněk na 1 ml v suspenzi byl spočítán podle vzorce: $\text{buňky/ml} = n \times 2,5 \times 10^5$, přičemž „n“ je průměrný počet buněk.

4.2.3.2.5 Transfekce savčích buněk

Na transfekci savčích buněk byl použit elektroporátor Amaxa Nucleofector® a reagentie „Cell line Nucleofector kit v Solution Box“ (AMAXA biosystems).

Buňky byly pasážovány na kultivační misky (Ø 6 cm) tak, aby jejich konfluence dosáhla druhý den 70% a poté byly synchronizovány 20 hodin. Druhý den byly synchronizované buňky vyhladověním v bez-sérovém médiu převedeny trypsinizací do suspenze a poté spočítány v Bürkerově komůrce. Z homogenní buněčné suspenze byl odebrán takový počet µl, aby obsahoval 2 x 10⁶ buněk (v případě Swis 3T3), 1 x 10⁶ buněk (v případě Swiss 3T6), nebo 2-4 x 10⁶ buněk (v případě VERO). Buňky byly centrifugovány (1750 x g/ 5 min/RT a buněčný sediment byl resuspendován ve 100 µl transfekčním roztoku, který byl součástí kitu „Cell line Nucleofector kit v Solution Box“ (Amata), temperovaného na pokojovou teplotu. K suspenzi buněk byla přidána plazmidová DNA zbavená endotoxinů, a to o množství: 3 µg v případě Swis 3T3 a Swiss 3T6 a 4 µg v případě VERO. Směs byla ihned převedena do kyvety a buňky byly transfekovány pomocí elektroporátoru Nucleofector™II (Amata) a programu U-030 v případě Swis 3T3, T-030 v případě Swis 3T6 a V-001 v případě VERO. Po transfekci byl k buňkám ihned přidán 1 ml média RPMI 1640 s 5% FCS ohřátého na 37°C a buňky byly inkubovány 15 minut při 37°C. Poté byly buňky rozděleny po 100 µl na sklička s připravenými 100µl DMEM média se sérem, nebo po 1 ml na kultivační misku (Ø 2 cm) s připraveným 1ml DMEM média se sérem. V případě buněk „VERO“ byl do média přidán trichostatin A (inhibitor deacetylase) o

koncentraci 200 ng/ml pro zvýšení exprese. Buňky byly inkubovány při 37 °C v CO₂ inkubátoru po různou dobu, přičemž 2 hpt bylo médium obsahující transfekční směs vyměněno za čerstvé médium.

4.2.4 Nepřímá imunofluorescence

4.2.4.1 Fixace a permeabilizace buněk

a) Fixace a permeabilizace savčích a hmyzích buněk metanol/acetone

Hmyzí nebo savčí buňky narostlé na mikroskopickém sklíčku byly po odsátí média opláchnuty PBS a fixovány a permeabilizovány 5 minut roztokem vychlazeného metanol/acetonu v poměru 1:1. Po uplynutí 5 minut byl fixační roztok z buněk odsán a buňky byly sušeny od zbytků roztoku.

b) Fixace a permeabilizace savčích buněk paraformaldehydem a Tritonem-x-100

(FORSTOVÁ, 1993)

Savčí buňky narostlé na mikroskopickém sklíčku byly po odsátí média opláchnuty PBS. a fixovány 15 až 30 minut 3% paraformaldehydem v PBS. Poté byly opláchnuty PBS a permeabilizovány 5 minut roztokem 0,5% Tritonu-x-100 v PBS. Nakonec byly buňky opláchnuty 3 krát 10 minut roztokem PBS.

4.2.4.2 Imunofluorescenční detekce proteinů v buňkách

Fixované a permeabilizované buňky byly vysyceny inkubací v roztoku 0,25% želatiny (angl. Gelatin from porcine skin, Typ A) s 0,25% BSA v PBS po dobu 30 minut a poté inkubovány s primární protilátkou (25-250 μ l) naředěné v požadovaném poměru v roztoku 0,25% želatiny s 0,25% BSA v PBS po dobu 1 hodiny. Nenavázaná primární protilátka byla odmyta roztokem PBS 3 krát 10 minut. Poté byly buňky inkubovány s 250 μ l sekundární protilátky naředěné v požadovaném poměru v roztoku 0,25% želatiny s 0,25% BSA v PBS po dobu 30 minut ve tmě a promyty od nenavázané sekundární protilátky roztokem PBS 3 krát 10 minut. Mikroskopická sklíčka s buňkami byla opláchnuta v ddH₂O a montována do kapek glycerolu na podložním skle. V případě potřeby barvení buněčné DNA bylo do glycerolu přidáno DAPI o koncentraci 0,1 μ g/ml. Preparáty byly prohlíženy fluorescenčním mikroskopem BX-60 (*Olympus*) nebo konfokálním mikroskopem LCS SP2 Laser scanning confocal microscope (*Leica*).

4.2.5. Práce s DNA

4.2.5.1 Techniky preparace DNA

4.2.5.1.1 Maxipreparace plazmidové DNA alkalickou metodou

(BIRNBOIM & DOLY, 1989)

50 ml kultury *E. coli* kultivované v ŽB2 přes noc při 37°C za stálého třepání bylo centrifugováno (4150 x g/10 min/4°C) a buněčný sediment byl resuspendován v 2 ml „roztoku I“ na ledu. Poté byly buňky lyzovány přidáním 4 ml čerstvého „roztoku II“, suspenze byla opatrně promíchána převrácením zkumavky a inkubována 5 min/RT. Nakonec byly přidány 3 ml neutralizačního „roztoku III“, suspenze byla opatrně promíchána převrácením zkumavky a inkubována 20 min/na ledu. Po inkubaci byla suspenze centrifugována (4150 x g/10 min/4°C). Supernatant byl filtrován přes gázu do nové zkumavky a byl k němu přidán 0,7 objemu izopropanolu. Roztok byl mírně promíchán, inkubován 10 min/4°C a centrifugován (4150 x g/10 min/4°C). Sediment byl promyt 70% etanolem, vysušen od zbytků etanolu při laboratorní teplotě a rozpuštěn ve 300 µl TE pufru. Z takto získané DNA byly nejprve odstraněny proteiny extrakcí směsí fenol/chloroformu a poté RNA inkubací s RNázou A. Kvalita získané DNA byla ověřena elektroforeticky.

4.2.5.1.2 Minipreparace plazmidové DNA

Kolonie *E. coli* vzniklé po rekombinaci *in vitro* byly naneseny na plotny s ŽA2 a selekčním antibiotikem tak, aby se vytvořily širší čáry nebo čtverce o ploše 1 cm² z bakteriálních kolonií. Misky byly poté inkubovány přes noc při 37°C v termostatu. Narostlá biomasa jednotlivého klonu byla přenesena sterilním párátkem do mikrozkušavky a resuspendována v 400 µl roztoku STET. Poté bylo přidáno 5 µl 5% lysozymu a suspenze byla inkubována 40 sekund ve vroucí lázni a centrifugována (11 000 x g/1 min). Sediment byl odstraněn párátkem a k supernatantu byl přidán 1 objem izopropanolu. Poté byl roztok inkubován 30 min/-20°C a centrifugován (11 000 x g/10 min). Sediment byl promyt 70% etanolem, vysušen od zbytků etanolu při laboratorní teplotě a rozpuštěn ve 30 µl TE pufru s 10 µg/ml RNázy A. Izolovaná plazmidová DNA byla ověřena elektroforeticky.

4.2.5.1.3 Izolace fragmentů DNA z agarózového gelu

Pro izolaci fragmentů DNA z agarózového gelu se s výhodou používají některé komerčně dodávané kity. Ty jsou většinou založené na skutečnosti, že se za přítomnosti chaotropních solí váže DNA na křemičité částice. Já jsem pro izolaci fragmentů DNA z gelu používala soupravu NucleoSpin Extract II (*Macherey Nagel*) a postupovala jsem podle manuálu navrženého výrobcem. Všechny použité pufrы byly součástí tohoto kitu. DNA byla rozdělena v agarózovém gelu a proužek agarózy obsahující požadovanou DNA byl vyříznut skalpelem pod UV transluminátorem a převeden do mikrozkušavky. Gel byl lyzován přidáním 200 µl „NT“

pufu na 100 mg gelu a inkubací 5 až 10 min/ve vodní lázni vytemperované na 50 ° C za občasných protřepání. Do sběrací zkumavky byla umístěna kolona se silikonovou membránou „Nucleo Spin Extract II“, do které byl přidán vzorek rozpuštěného gelu. Ten byl poté centrifugován (11 000 x g/1 min). Silikonová membrána kolony s navázanou DNA byla promyta 600 µl pufu „NT3“ obsahujícím etanol a opět centrifugována (11 000 x g/1 min). Silikonová membrána byla vysušena od zbytků etanolu centrifugací (11 000 x g/2 min). Poté byla kolonka s navázanou a promytou DNA umístěna do čisté mikrozkuavky, odmyta přidáním 15-50 µl elučního pufu „NE“ a inkubací 5 min/RT a centrifugována (11 000 x g/1 min). Množství izolovaných fragmentů DNA bylo odhadnuto elektroforeticky.

4.2.5.1.4 Purifikace plazmidové DNA zbavené endotoxinů pro transfekci savčích buněk

Pro účely transfekce savčích buněk, které vyžadují templát ve velmi vysoké čistotě, bez endotoxinů a o vysoké koncentraci byla plazmidová DNA preparována a purifikována komerčně dodávanou soupravou Endotoxin Maxi Free kit (*Qiagen*). DNA byla izolována přesně dle manuálu navrženého výrobce.

4.2.5.1.5 Izolace bacmidové DNA (bacmidu)

(SUMMERS *et al*, 1987)

Bílé rekombinantní kolonie bakterií DH10Bac nesoucí příslušný bacmid byly naočkovány do 5 ml ŽB2 s kanamycinem (50 µg/ml), gentamycinem (7 µg/ml) a tetracyklinem (10 µg/ml) a kultivovány aerobně přes noc při 37 °C. Narostlá kultura (1,5 ml) byla centrifugována (11 000 x g/2 min) a buněčný sediment byl resuspendován v 567 µl TE pufu. K resuspendovaným buňkám bylo přidáno 30 µl 10% SDS a 6 µl proteinázy K (10 mg/ml) a směs byla inkubována 1 hod/37 °C. Poté bylo přidáno 100 µl 5M NaCl a směs byla inkubována 10 min/65 °C. DNA byla extrahována 1 objemem upraveného chloroformu a centrifugována (11 000 x g/4 min). Vrchní vodná fáze byla vždy odebrána a znovu extrahována upraveným chloroformem. Tento krok byl opakován celkem 3 krát. Poté bylo k směsi přidáno 0,6 objemu izopropanolu a směs byla opatrně promíchána. Vysrážená DNA byla namotána na kličku, opláchnuta 80 % etanolem a rozpuštěna v 50 až 100 µl TE pufu. Takto získaná DNA byla uchována při 4 °C. Přítomnost vkládaného genu byla ověřena pomocí PCR.

4.2.5.1.6 Deproteinace DNA upraveným fenolem a chloroformem

K roztoku DNA byl přidán 1 objem upraveného fenolu (*Sigma*), směs byla dobře promíchána a centrifugována (11 000 x g/5 min). Po centrifugaci se vytvořila spodní fenolová fáze, horní vodná fáze a mezifáze tvořená vysráženými proteiny. Vodná fáze byla opatrně odebrána a extrahována 0,5 objemem upraveného fenolu a 0,5 objemem upraveného chloroformu. Směs byla opět promíchána a centrifugována (11 000 x g/5 min). Vodná fáze byla opět odebrána a předchozí krok byl opakován do té doby, než zmizela mezifáze tvořená vysráženými proteiny. Poté byl k odebrané vodné fázi přidán 1 objem upraveného

chloroformu, směs byla opět promíchána a centrifugována (11 000 x g/5 min). Horní vodná fáze byla odebrána a DNA byla srážena vychlazeným etanolem.

4.2.5.1.7 Srážení DNA etanolem

K roztoku DNA byl přidán 0,1 objem 3M octanu sodného (pH=5,2) a 2,5tinásobný objem 96% etanolu vychlazeného při -20 ° C. Směs byla promíchána a inkubována 30 min/-75 ° C. Vysrážená DNA byla sedimentována centrifugací (11 000 x g/30 min/4 ° C), sediment byl promyt 80% etanolem, vysušen od jeho zbytků při laboratorní teplotě a rozpuštěn ve vhodném množství TE pufru.

4.2.5.1.8 Odstranění RNA ze vzorku izolované DNA

(SAMBROOK *et al*, 1989)

K DNA bylo přidáno 0,1 objemu RNázy A a vzorek byl inkubován minimálně 1 hod/RT. RNáza A byla ze vzorku odstraněna deproteinací DNA upraveným fenolem a chloroformem a srážena vychlazeným etanolem.

4.2.5.2 Separace a vizualizace DNA v agarózovém gelu

(SAMBROOK *et al*, 1989)

Pro separaci fragmentů DNA byla použita aparatura pro horizontální elektroforézu. K separaci byla použita 1,5% agaróza pro elektroforézu rozeřtá v 0,5 x pufru TBE. Separace probíhala při napětí 4-7 V/cm. Před separací byly vzorky řádně promíchány a smíchány s BFM v poměru 5:1. DNA byla obarvena etidium bromidem (EtBr-1mg/ml). A prohlížena pod UV světlem (310 nm). Velikost separovaných fragmentů byla porovnávána s markerem molekulových hmotností připraveným štěpením genomové DNA bakteriofága λ enzymem *Pst I*.

4.2.5.3 Amplifikace DNA

4.2.5.3.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

PCR reakce byla prováděna vždy v objemu 50 μ l. Reakční směs obsahovala 5 μ l 10x koncentrovaného pufru pro Vent polymerázu, 1,5 μ l (12,5 pmol) každého primeru, 1 μ l dNTP (10 μ M), 1 μ l templátové DNA (100 ng/ μ l), 39,5 μ l dd H₂O a 0,5 μ l (1,5 jednotky) Vent DNA polymerázy. Optimalizovaný PCR program zahrnoval následující po sobě jdoucí kroky: denaturace DNA (94 °C/ 3 min), denaturace DNA (94 °C/40 s), nasednutí primerů (x* °C/ 50 s) (*reasociační teploty se lišily pro každý pár primerů a jsou uvedeny v kapitole 5), polymerační reakce (72 °C/1 min), opakování kroků 2 až 4 – 30 krát (30 cyklů) a dokončení polymerace (72 °C/7 min).

4.2.5.3.2 Purifikace produktů PCR

PCR produkty byly purifikovány pomocí komerčně dodávané soupravy NucleoSpin Extract II (*Macherey Nagel*). Všechny použité pufrы byly součástí tohoto kitu. K 100 μ l PCR produktu bylo přidáno 200 μ l pufru „NT“ a směs byla promíchána. Poté byla směs aplikována na chromatografickou kolonku „NucleoSpin“ vloženou do sběrné zkumavky a centrifugována (11 000 x g/1 min). DNA navázaná na kolonci byla následně promyta přidáním 600 μ l pufru „NT3“ obsahujícím etanol a centrifugací (11 000 x g/1 min). Kolonka byla vysušena od zbytků etanolu centrifugací (11 000 x g/2 min) a kolonka s navázanou DNA byla přenesena do čisté mikrozukavky. Eluce DNA bylo docíleno přidáním 15-50 μ l pufru „NE“, inkubací (5 min/RT) a konečnou centrifugací (11 000 x g/1 min). PCR produkt byl ověřen elektroforeticky a použit pro restriční štěpení.

4.2.5.3.3 Identifikace rekombinantních klonů pomocí PCR

Tato metoda byla použita při detekci genu pro protein VP2 BKV v lyzátu bílých rekombinantních kolonií vzniklých po transformaci *E. coli* DH10Bac transferovým vektorem, do kterého byl klonován gen pro protein VP2 BKV. PCR reakce probíhala za stejných podmínek jako v kapitole 4.2.5.3.1. Templátová DNA byla připravena následujícím způsobem: Z plotny byly odebrány sterilním párátkem jednotlivé bílé kolonie do 100 μ l sterilní dd H₂O. Suspenze byla inkubována (10 min/96 °C) a centrifugována (11 000 x g/10 min). Jako templát pro PCR reakci byl použit 1 μ l takto připraveného supematantu.

4.2.5.4 Úprava molekul DNA

4.2.5.4.1 Štěpení DNA restričními endonukleázami

(SAMBROOK *et al*, 1989)

Při používání restričních enzymů jsem se vždy řídila instrukcemi výrobcem, co se týče optimálních podmínek (teplota, stabilita, doba štěpení) pro práci enzymu. Enzym jsem vždy ředila jen pufrem, který zajišťoval optimální podmínky pro maximální aktivitu daného enzymu. Reakční směs byla namíchána následovně: x μ l DNA (0,1-10 μ g DNA v TE pufru), 1,5 μ l 10x pufru pro příslušnou restriční endonukleázu, ddH₂O na takový objem, aby po přidání enzymu měla restriční směs objem 15 μ l. Na závěr byla přidána restriční endonukleáza (cca 1U/ μ g DNA) a směs byla inkubována 3 h (až přes noc) při teplotě doporučené výrobcem příslušného enzymu (většinou při 37 °C). Štěpená DNA byla srážena vychlazeným etanolem a rozpuštěna ve vhodném množství TE pufru. Kvalita štěpení byla ověřena elektroforeticky. Fragment štěpené DNA, který nás zajímal, byl izolován z gelu.

4.2.5.4.2 Defosforylace konců plazmidové DNA

Reakční směs pro defosforylaci konců DNA byla připravena následovně: Bylo smícháno 50 μ l štěpené vektorové DNA, 10 μ l 10 x pufru pro alkalickou fosfatázu CIAP, 2 μ l alkalické fosfatázy CIAP a 38 μ l

dd H₂O. Směs byla inkubována 30 min/37°C, poté byly přidány opět 2 µl alkalické fosfatázy CIAP a směs byl opět inkubována 30 min/37°C. Alkalická fosfatáza byla inaktivována přidáním 10 µl 10% SDS, 1 µl 0,5 M EDTA (pH 8.0) a 1 µl proteinázy K (10 mg/ml) a inkubací 10 min/75°C. DNA byla od alkalické fosfatázy přečištěna upraveným fenolem a chloroformem a srážena vychlazeným etanolem. Sražená DNA byla rozpuštěna v 30 až v 50 µl dd H₂O.

4.2.5.4.3 Rekombinace *in vitro*-ligace

(SAMBROOK *et al*, 1989)

Enzym DNA ligáza bakteriofága T4 katalyzuje opravu jedno-vláknových zlomů DNA a v genovém inženýrství se používá ke spojování tupých nebo kohezních konců molekul DNA. Ligační směs byla připravena tak, aby byl poměr linearizovaného plazmidu a fragmentu 1:3. Příklad ligační směsi pro konstrukci pFastBac HT A-VP2 BKV je následující: vektorová DNA a DNA fragmentu v poměru 1:3, 10 x koncentrovaný pufr pro T4 ligázu, T4 ligáza (5 U/µl) a popř. doplnit dd H₂O. Ligační reakce probíhala přes noc při pokojové teplotě.

4.2.6 Základní práce s proteiny

4.2.6.1 SDS polyakrylamidová proteinová elektroforéza (SDS-PAAGE)

(SAMBROOK *et al*, 1989)

a) Příprava buněčného lyzátu

Sediment hmyzích nebo savčích buněk byl resuspendován ve vhodném množství RIPA pufru (50-500µl) a byla přidána směs inhibitorů proteáz. Suspenze byla inkubována 20 minut na ledu. Pokud byl vzorek viskózní, byl krátce sonikován. Poté byla suspenze centrifugována (11 000 x g/15 min/4°C), supernatant byl převeden do mikrozkuřavky a byl použit pro další experimenty.

b) Příprava vzorku pro SDS-PAAGE

Vzorky byly smíchány s 5 krát koncentrovaným Leamliho pufrem v poměru 4:1 a 5 minut povařeny ve vodní lázni. Pokud byl vzorek viskózní, byl krátce sonikován a centrifugován (11 000 x g/1 min/4°C).

c) Příprava gelu

Elektroforetická skla byla dobře omyta a usušena a byla sestavena aparatura pro nalévání gelu. Těsnost aparatury byla zkontrolována nalitím 5 ml dd H₂O a následně byla skla osušena filtračním papírem. Do aparatury byl přechodně vložen hřeben a bylo poznamenáno, kam sahají zuby hřebenu. Po vyjmutí hřebenu byl cca 0,5 cm pod úroveň zubů nalit 10% separační gel připravený smícháním 4 ml 30% akrylamidu (29% akrylamid+1% bis-akrylamid/100 ml ddH₂O), 4,5 ml Tris-HCl (pH=8,8), 120 µl 10% SDS, 3,25 ml dd

H₂O, 40 µl 10% APS a 8,5 µl TEMED. APS a TEMED byly do gelu přidány těsně před naléváním gelu. Nalítý separační roztok byl převrstven dd H₂O a ponechán cca 30 minut. Po ztuhnutí gelu byla dd H₂O odstraněna a byl nalit 5% zaostřovací gel připravený smícháním 0,5 ml 30% akrylamidu, 0,375 ml Tris-HCl (pH=6,8), 30 µl 10% SDS, 2,11 ml dd H₂O, 20 µl 10% APS a 5 µl TEMED. Do nalitého zaostřovacího gelu byl vložen hřeben. Gel tuhnul cca 10-15 minut. Po ztuhnutí zaostřovacího gelu byl hřeben vyjmut, skla s gelem byla vložena do elektroforetické aparatury a gel převrstven elektroforetickým pufrem. Před nanášením vzorku byly jamky vypláchnuty od zbytků nepolymerizovaného akrylamidu elektroforetickým pufrem a do jamek bylo nanášeno 5-30 µl vzorku. Před nanášením na gel byl vzorek centrifugován (11 000xg/1min/4 °C). Vlastní elektroforéza probíhala v elektroforetickém pufru nejprve při napětí 8V/cm² (30 min) a poté při napětí 10 V/cm² 1-3 hodiny. Molekulové hmotnosti proteinů rozdělených na gelu byly porovnávány s molekulovými hmotnostmi standardu.

4.2.6.2 Fixace a barvení gelu po SDS-PAAGE

Akrylamidový gel s rozdělenými proteiny byl nejprve 1-2 hodiny fixován ve fixačním roztoku poté byl gel opláchnut v 3,5% HClO₄. Gel byl následně převrstven barvicím roztokem a barven při RT přes noc. Další den byl barvicí roztok slit a gel byl odbarvován v destilované vodě několik hodin. Po odbarvení gelu byl gel analyzován a skenován pomocí transmisního skeneru.

4.2.6.3 Imobilizace proteinů na membráně

4.2.6.3.1 Imunodot-blot

(SAMBROOK *et al*, 1989)

Vzorky denaturovaných či nativních proteinů byly nakapány (0,5-5µl) na nitrocelulózovou membránu a po zaschnutí kapek byla nitrocelulózová membrána s imobilizovanými proteiny připravena k imunologické detekci proteinů.

4.2.6.3.2 Western blot

(SAMBROOK *et al*, 1989)

Byla nastříhána 1x nitrocelulózová membrána, 8x filtrační papír a 2x Whatman, vše o rozměrech 8 cm/8,5 cm. Na blotovací mřížce byl utvořen blotovací sendvič v tomto pořadí: 1x podložka ze savé hmoty, 4x filtrační papír, 1x Whatman, akrylamidový gel se separovanými proteiny, nitrocelulózová membrána, 1x Whatman, 4x filtrační papír, 1x podložka ze savé hmoty. Sendvič byl navlhčen blotovacím pufrem, zbaven bublin a uzavřen v blotovací mřížce. Takto připravená mřížka byla vložena do blotovací aparatury a přelita blotovacím pufrem. Přenos probíhal 3 hodiny při 99 V a 250 mA, přičemž strana mřížky, na které byl umístěn gel, byla na straně záporné elektrody. Po ukončení blotování byla membrána opláchnuta v dd H₂O a připravena k imunologické detekci proteinů.

4.2.6.4 Imunologická detekce proteinů imobilizovaných na membráně.

(SAMBROOK *et al*, 1989)

Nitrocelulózová membrána s imobilizovanými proteiny byla inkubována 30 min v 5 % odtučněném mléce v PBS. Poté byla membrána opláchnuta PBS a inkubována 1 hodinu s primární protilátkou naředěnou PBS. Od nenavázané primární protilátky byla membrána promyta 3 x 10 min PBS a poté inkubována 30 min v sekundární protilátce naředěné v PBS. Membrána byla opět promyta 3 x 10 min PBS. Proteiny byly detekovány v temné komoře inkubací membrány (30 s) v roztoku luminolu, vložením membrány do průhledné fólie a přiložením RTG filmu. Doby expozice byly od 1 do 15 minut. Film byl vyvolán inkubací ve vývojce a ustalovači (*Foma*).

4.2.6.5 Srážení proteinů acetonem

Do vzorku s proteiny bylo přidáno 4x množství acetonu vychlazeného na -20 °C. Vzorek byl promíchán, inkubován 30 minut na ledu a vysrážené proteiny byly sedimentovány centrifugací (11 000 x g/15 min/4°C). Vysrážené proteiny byly rozpuštěny v PBS.

4.2.6.6 Měření koncentrace proteinů pomocí transmisního skeneru

Vzorku proteinu (10 µl) o neznámé koncentraci naředěného podle potřeby bylo nanášeno do jamky na akrylamidový gel a 10 µl vzorku proteinu o známé koncentraci naředěného podle potřeby bylo nanášeno do vedlejší jamky na stejný akrylamidový gel. Po skončení SDS-PAAGE byl gel fixován a barven. Množství barvených proteinů přibližně stejných hmotností bylo analyzováno pomocí transmisního skeneru a programu *Quantiti 1* a vzájemně porovnáno.

4.2.6.7 Měření koncentrace proteinů metodou Bradfordové

(BRADFORD *et al*, 1976)

Metoda je založena na interakci barvičky CBB-G250 s bazickými a aromatickými aminokyselinami v proteinech. Byly připraveny kalibrační standardy BSA o koncentraci v rozmezí 0-1 mg/ml do stejného pufru, který byl použit při přípravě vzorku. Do mikrozkušavek byl připraven 1 ml činidla Bradfordové, ke kterému bylo přidáno vždy po 10 µl od každého ředění i od vzorku o neznámé koncentraci. Po krátké inkubaci při pokojové teplotě (cca 2 min) byly změřeny absorbance standardů a vzorku při 595 nm. Z absorbancí získaných při měření standardů byl sestaven graf a rovnice regrese pomocí programu Microsoft Excel. Podle této rovnice byla dopočítána koncentrace neznámého vzorku v mg/ml.

4.2.6.8 Dialýza

Před dialýzou byly připraveny dialyzační membrány (Serva) povařením 10 minut v dH₂O. Vzorek byl přenesen do dialyzační membrány a uzavřen po obou stranách svorkami. Vzorek proteinu, nebo virových kapsid byl dialyzován proti vhodnému pufru přes noc za stálého míchání v lednici. Během dialýzy byl příslušný pufr minimálně 1 x vyměněn za nový. Po skončení dialýzy byl vzorek koncentrován buď centrifugací přes sacharózový polštář, v případě virových kapsid, nebo přímo v dialyzační membráně pomocí vysokomolekulárního polyetylglykolu „PEG“ (M_r = 20 000), v případě proteinů.

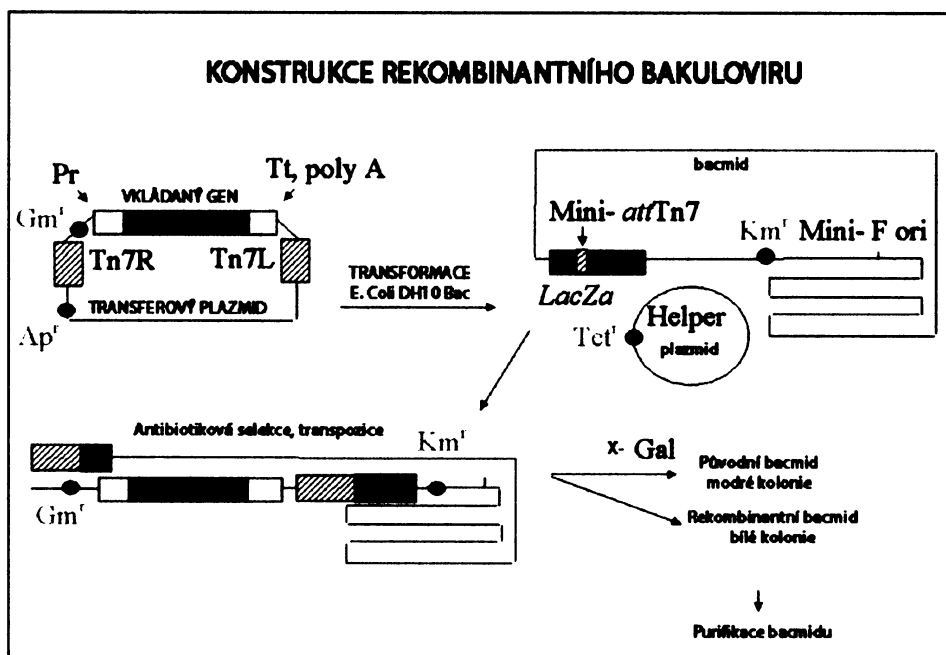
4.2.6.9 Test rozpustnosti proteinu VP2 za různých podmínek

Hmyzí buňky infikované rBac-VP2 BKV byly sklizeny z 2 Petriho misek (Ø9 cm) (viz. 4.2.3.1.3) 72 hpi a rozděleny na 4 stejné díly (aby bylo výchozí množství buněk u všech vzorků porovnatelné). Buňky byly resuspendovány v 500 µl: i) pufru PBS, ii) pufru RIPA, iii) 4M močoviny v PBS, iv) 8M močoviny v PBS a krátce sonikovány (3 x 10s/10 mikronů) na ledu (v případě PBS a RIPA), nebo za pokojové teploty (v případě 4M a 8M močoviny) už za přítomnosti inhibitorů proteáz. Buňky byly lyzovány 20 min na ledu (v případě PBS a RIPA) nebo za RT (v případě 4M a 8M močoviny) a centrifugovány (11 000 x g/15 min). Pelety a supernatanty byly naředěny lyzačním Leamlis pufrům na stejný objem. Množství proteinu VP2 přítomného v nerozpustné frakci (v peletu) a v supernatantu bylo analyzováno imunologickou detekcí. Na gel bylo nanášeno vždy stejné množství vzorku (10 µl).

4.2.7 Bakulovirový expresní systém a příprava rekombinantního bakuloviru “r-Bac-VP2 BKV“

Bakulovirový expresní systém je jedním z eukaryotických expresních systémů vytvořených za účelem produkce rekombinantních proteinů. V současnosti je jedním z nejvíce využívaných virů čeledi *Baculoviridae* virus AcMNPV (*Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus) původně izolovaný z housenek můry *Autographa californica*. Do dnešní doby bylo vyvinuto několik typů bakulovirových expresních systémů založených na unikátních vlastnostech polyhedrinového proteinu. Ten je totiž masivně produkován v pozdní fázi infekce z pozdního silného promotoru a jeho hladina dosahuje až 50% buněčné hmoty. Není nutný pro infekci a replikaci viru v tkáňové kultuře a virové částice, které nenesou v genomu gen pro polyhedrin, vykazují odlišnou morfologii plaků v tkáňové kultuře ve srovnání s divokým typem bakuloviru. Sekvenci kódující polyhedrin, nebo jiný velmi pozdní protein (p10) je možné nahradit cizorodým genem, který je pod silným pozdním promotorem exprimován ve vysokých hladinách. Hlavními složkami bakulovirových expresních systémů používaných v současné době je sada donorových plazmidů a speciální kmen recipientního mikroorganismu *E. coli*. K přípravě rekombinantního bakuloviru pro produkci proteinu VP2 BKV v hmyzích buňkách byl použit Bac-to-Bac expression system (*Invitrogen*), jehož výhodou je rychlost přípravy rekombinantního bakuloviru, protože není nutná jeho purifikace pomocí plakových zkoušek. Prvním krokem je

vždy klonování genu zájmu do donorového plazmidu, kde je rekombinanční gen umístěn pod kontrolou silných bakulovirových promotorů, polyhedrinového nebo p10. Za genem je umístěn některý z eukaryotických poly-A signálů. Tato expresní kazeta rovněž obsahuje selekční geny (rezistence vůči gentamycinu) a je z obou stran obklopena sekvencemi pro místně specifickou transpozici (Tn7). V případě přípravy r-Bac-VP2 BKV byl gen pro protein VP2 klonován do donorového plazmidu pFastBac HT A (4.2.5) za histidinovou kotvu. Po přípravě donorového plazmidu následovalo jeho vnesení do speciálního kmene *E. coli* DH10Bac nesoucího bakulovirový kyvadlový vektor (bacmid) s mini-attTn7 transpozičním místem a dále pomocný „helper“ plazmid. Jakmile byl vnesen donorový plazmid do buněk, došlo k transpozici mezi mini-Tn7 elementem donorového plazmidu a cílovým mini-attTn7 místem v bacmidu, čímž se vytvořil VP2-rekombinanční bacmid. Transpozice je zajištěna enzymem transponázou dodávanou pomocným plazmidem. Donorový plazmid pFastBac HT A-VP2 byl vnesen do bakterií kmene DH10Bac transformací teplotním šokem (4.2.2.3.4). Mini-attTn7 místo je v bacmidu umístěno v segmentu kódujícím LacZa protein ve stejném čtecím rámci. Inzerce genu VP2 do tohoto místa naruší čtecí rámec LacZa, a tak v bakteriích v nichž dojde k úspěšné transpozici, není produkována funkční β -galaktozidáza. Takové bakterie byly snadno identifikovány na agarových deskách obsahujících analog laktózy, izopropyl- β -thiogalaktopyranosid (IPTG) a chromogenní substrát X-gal, protože změnila barvu z modré na bílou. Bílé rekombinanční kolonie byly kontrolovány na přítomnost genu pro protein VP2 pomocí PCR (4.2.6.3.3). Dalším krokem v přípravě r-Bac-VP2 BKV byla izolace vysokomolekulární bacmidové DNA z rekombinančních bakteriálních klonů (4.2.6.1.5). Přítomnost transgenu v izolované bacmidové DNA byla znovu ověřena pomocí PCR (4.2.6.3.1). Po získání rekombinanční bacmidové DNA byla tato DNA použita k transfekci hmyzích buněk Sf9 (4.2.3.1.5) a rekombinanční bakuloviry byly izolovány (4.2.3.1.4).



Obr. 4.2.1: Schéma konstrukce rekombinantního bakuloviru (*Bac-to-Bac expression system*). Upraveno podle strubiol.icr.ac.uk/.../introduction.html.

4.2.8 Izolace pseudokapsid (VLPs)

(FORSTOVÁ *et al.*, 1993)

4.2.8.1 Příprava lyzátů z infikovaných hmyzích buněk

Hmyzí buňky infikované rekombinantním bakulovirem pro produkci kapsidového proteinu VP1 BKV nebo bakulovirem exprimujícím gen pro VP1 a gen pro VP2 nebo VP3 byly sklizeny (4.2.3.1.3) a buněčný sediment byl resuspendován v B pufru (1 ml B pufru na 2×10^7 buněk). Buňky byly rozrušeny sonikací (3 x 30s/10 mikronů) a centrifugovány (4150 x g/5 min). Supernatant byl uchován na ledu a sediment byl prohlédnut pod mikroskopem. V případě, že obsahoval ještě neporušené buňky, byla celá procedura opakována a supernatanty byly spojeny.

4.2.8.2 Centrifugace přes sacharózový polštář

Centrifugace lyzátu obsahujícího virové částice přes polštář 10% sacharózy se s výhodou aplikuje před utracentrifugacemi v hustotních gradientech. Do centrifugačních zkumavek byl nanesen buněčný lyzát obsahující VLPs v B pufru a analyzovaný vzorek byl podvrstven 10% sacharózou v B pufru (1-1,5 cm). Centrifugační kyvety byly vyváženy B pufrem na přesnost dvou desetinných míst a centrifugovány (3 hod, 30 000 rpm, 4°C, rotor SW41). Sedimenty byly resuspendovány v B pufru a homogenizovány sonikací.

4.2.8.3 Izopyknická centrifugace v CsCl gradientu

(TÜLLER & BARD, 1985)

Do centrifugační zkumavky bylo nanášeno 7,9 g vzorku virových částic v B pufru a smícháno s 3,79 g CsCl. Po rozpuštění CsCl byl změřen refraktometrický index (RI) vzorku, který musel být v rozmezí 1,363 až 1,365. Jestliže v tomto rozmezí nebyl, byl vzorek buďto naředěn B pufrem, nebo byl přidán CsCl. Vzorek byl převrstven parafinovým olejem, kyvety byly důkladně vyváženy a centrifugovány (20 hod/35 000 rpm/18°C/rotor SW41). Vytvořený gradient CsCl byl rozebrán pomocí peristaltické pumpy na frakce (cca 800 μ l). U jednotlivých frakcí byl změřen RI (frakce obsahující VLPs měly být v rozmezí 1,365-1,366-tzv. plné VLPs, které v buňkách enkapsidovaly fragmenty DNA bakuloviru a hmyzích buněk nebo 1,362-1,363-tzv. prázdné VLPs bez enkapsidované DNA). Frakce byly analyzovány metodou imunodot-blot na přítomnost proteinu VP1 BKV. Na základě těchto analýz byly frakce pospojovány do dvou frakcí. Takto získané frakce byly odsoleny dialýzou proti B pufru a zahuštěny centrifugací přes sacharózový polštář (4.2.8.2).

4.2.9 Izolace minoritního proteinu VP2 nebo VP3 BKV pro imunizaci myší

4.2.9.1 Izolace proteinu VP2 afinitní chromatografií

Protože protein VP2 produkovaný v bakulovirovém expresním systému nesl na N konci histidinovou kotvu bylo ho možné izolovat pomocí afinitní chromatografie. Hmyzí buňky byly infikovány bakulovirem r-Bac-VP2 BKV a 72 hpi sklizeny. Buněčný sediment byl resuspendován ve 3 ml vazebného pufru (pH=7,4) buď s močovinou, nebo bez močoviny, obsahujícího koktejl inhibitorů proteáz. Poté byl krátce sonikován ručním sonikátorem a centrifugován (11 000 x g/15 min/4 °C). Supernatant byl nanesen na kolonu „HiTrap™“ (GE Healthcare) obsahující agarózu s imobilizovanými Ni²⁺, sestavenou podle manuálu a 15 µl bylo uchováno pro kontrolu množství proteinu VP2 vstupujícího do experimentu. Nejprve byla kolona promyta 10 ml ddH₂O a

10 ml vazebného pufru a poté byly nanесeny celé 3 ml vzorku. Frakce, která protekla, byla uchována pro analýzu účinnosti vazby proteinu VP2 na kolonu. Poté byla kolona promyta 10 ml vazebného pufru s 4M močovinou, nebo bez ní a frakce, která protekla, byla opět uchována pro analýzu účinnosti vazby proteinu VP2 na kolonu. Protein VP2 byl vymýván 10x 1 ml elučního pufru s 4M močovinou, nebo bez ní, přičemž všech 10 frakcí bylo uchováno pro další analýzu. Nakonec byla kolona promyta 10 ml ddH₂O a 10 ml 20% etanolu v ddH₂O. Jednotlivé frakce byly zbaveny imidazolu obsaženého ve vazebném a elučním pufru dialýzou přes noc proti pufru PBS a následně zahuštěny pomocí PEG 20 000 (4.2.6.8). Experiment byl analyzován pomocí SDS-PAAGE a imunologické detekce proteinu VP2 imobilizovaného na membráně metodou western blot.

4.2.9.2 Izolace proteinu VP2 BKV fázovou separací membránových proteinů tritonem-x-114.

a) Izolace membrán

(SALZET & VERGER-BOCQUET, 2001)

Membrány byly izolovány z hmyzích buněk (cca 4,8 x 10¹⁰) infikovaných bakulovirem r-Bac-VP2 BKV a sklizených 72 hpi. Sediment buněk byl promyt puftrem TBS, centrifugován (4150 x g/10 min/4 °C) a resuspendován v 10 ml pufru TBS obsahujícím koktejl inhibitorů proteáz. Suspenze byla homogenizována v skleněném homogenizátoru na ledu a destrukce buněk i jader byla zkontrolována mikroskopicky. Suspenze byla poté centrifugována (5445 x g, 40 min, 4 °C), supernatant byl uchován na ledu a pelet byl znovu resuspendován v pufru TBS obsahujícím koktejl inhibitorů proteáz, centrifugován (5445 x g, 40 min, 4 °C) a supernatant byl spojen s předchozím a uchován na ledu Tyto kroky byly opakovány celkem 5x. Kombinované supernatanty (50 ml) byly centrifugovány (20 000 x g/1 hod/ 4°C), pelet (membrány) byl promyt puftrem TBS a centrifugován (20 000 x g/20 min/ 4°C). Koncentrace membránových proteinů byla změřena metodou podle Bradfordové.

b) Prekondenzace tritonu-x-114

(BORDIER, 1980)

Bylo smícháno 10 g tritonu-x-114, 8 mg butynylovaného hydroxytoluenu (*Fluka*), 490 ml 10 mM Tris-HCl (pH=7,4) a 150 mM NaCl. Tento roztok byl inkubován 2 hodiny v chladové místnosti při 4 °C, aby se detergentová a vodná fáze spojily. Poté byl roztok inkubován přes noc při 30 °C, aby se detergentová a vodná fáze od sebe oddělily. Druhý den byla vodná fáze odstraněna a detergentová fáze opět přelita 490 ml 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) a 150 mM NaCl. Celý postup byl opakován ještě 2 x. Třetí detergentová fáze (prekondenzovaný triton-x-114) byla odebrána a uchována při pokojové teplotě.

c) Fázová separace membránových proteinů Tritonem-x-114

(BORDIER, 1980, PRYDE & PHYLLIPS, 1986)

Vstupním materiálem byly izolované membrány o koncentraci proteinů 4 mg/ml. Prekondenzovaný triton-x-114 byl ve všech případech použit jako 10 % vodný roztok. Membrány byly promyty v 10 mM Tris-HCl (pH=7,6) s 0,15 M NaCl, homogenizovány a byl k nim přidán triton-x-114 tak, aby jeho finální koncentrace byla 2%. Membrány byly inkubovány s tritonem-x-114 na ledu a asi po 5 minutách byl vytvořen bílý precipitát, který byl sedimentován centrifugací (58 000 x g/30 min/4 °C). Supernatant byl uchován pro další kroky experimentu. Pelet byl 2 krát promyt resuspendováním v původním objemu 10 mM Tris-HCl (pH 7,6) s 0,15 M NaCl, následnou krátkou inkubací na ledu a centrifugací (58 000 x g/30 min/4 °C). První promývání v 10 mM Tris-HCl (pH 7,6) s 0,15 M NaCl bylo za přítomnosti tritonu-x-114 o výsledné koncentraci 2%, při druhém promývání již triton-x-114 nebyl přítomen. Supernatanty byly v obou případech uchovány pro další krok experimentu a pelet, který zbyl po této trojnásobné extrakci membránových proteinů do fáze tritonu-x-114, měl být z větší části tvořen jen fosfolipidy (analyzován jako membrány po extrakci). Supernatanty z předchozích kroků byly spojeny a navrstveny na polštář tvořený 0,25 M sacharózou v 2ml 10 mM Tris-HCl (pH 7,6) s 0,15 M NaCl obsahujícím 0,06% tritonu-x-114. Suspenze byla inkubována 5 min/30 °C až se zakalila, a následně centrifugována (2500 x g/5 min/RT), přičemž detergentová fáze byla sedimentována pod sacharózový polštář. Vodná fáze vyskytující se nad sacharózovým polštářem byla odebrána a smíchána s tritonem-x-114 na výslednou koncentraci 0,5%. Vodná a detergentová fáze byly smíchány na ledu a poté navrstveny stejný sacharózový polštář, jako byl použit v předešlém kroku. Suspenze byla inkubována 5 min/30 °C a následně centrifugována (2500 x g/5 min/RT), přičemž detergentová fáze byla sedimentována pod sacharózový polštář. Výsledný supernatant byl ochlazen na 0 °C na ledu a byl přidán triton-x-114 na výslednou koncentraci 2% a inkubován na ledu pro smíchání detergentové a vodné fáze. Poté byla suspenze inkubována 5 minut při 30 °C a následně centrifugována (2500 x g/5 min/RT), přičemž detergentová fáze byla sedimentována pod sacharózový polštář a odstraněna. Konečným supernatantem byla výsledná vodná fáze obsahující proteiny rozpustné ve vodné fázi. Viskózní detergentová fáze byla naředěna do původního objemu 10 mM Tris-HCl (pH 7,6) s 0,15 M NaCl a ochlazená na 0 °C k rozpuštění detergentu. Poté byla suspenze inkubována 5 minut při 30 °C a následně centrifugována (2500 x g/5 min/RT) přes nový 0,25 M sacharózový

polštář. Výsledná promytá tritonová fáze s extrahovanými membránovými proteiny rozpustnými v detergentu byla odebrána, naředěna jedním objemem 10 mM Tris-HCl (pH 7,6) s 0,15 M NaCl a uchována při -20°C.

d) **Analýza frakcí tritonové separace**

Frakce vstupních membrán, membrán po extrakci (o stejném objemu) a vodná a detergentová fáze byly a analyzovány pomocí SDS-PAAGE provedené v duplikátu. První gel byl obarven pomocí barvicího roztoku pro vizualizaci proteinů a druhý gel byl podroben imunologické detekci proteinu VP2 imobilizovaného na membráně metodou western blot.

4.2.9.3 **Izolace proteinu VP3 BKV z VP1/3 BKV VLPs.**

VP1/3 VLPs byly izolovány podle kapitoly 4.2.8 a analyzovány elektronovou mikroskopií, negativním barvením a imunologickou detekcí proteinu VP1 a VP3 imobilizovaných na membráně metodou imunodot-blot a western blot. Aby mohl být protein VP3 oddělen od proteinu VP1, byly proteiny rozděleny na SDS-PAAGE. Proteiny byly v gelu vizualizovány barvením v 0,05% CBB-R250 rozpuštěné v d H₂O po dobu 10 minut a proužek gelu obsahující protein VP3 byl skalpelem vyříznut. Protein VP3 z gelu dostán elektroelucí: Proužek gelu s proteinem VP3 byl vložen do dialyzační membrány naplněné elektroforetickým pufrům a uzavřen v membráně po obou stranách svorkami. Poté byla dialyzační membrána vložena do aparatury pro horizontální elektroforézu naplněné elektroforetickým pufrům. Poté probíhala elektroeluce proteinu VP3 při napětí 10 V/cm² do té doby než byl protein obarvený CBB-R250 z gelu uvolněn (cca 1,5 hod). Protein VP3 rozpuštěný v elektroforetickém pufru byl dialyzován přes noc proti 0,2 M uhličitanu sodnému s 0,02% SDS v dH₂O za pokojové teploty a koncentrován pomocí PEG 20 000. Nakonec byl protein VP3 srážen vychlazeným acetonem a jeho koncentrace byla změřena pomocí transmisního skeneru. Takto izolovaný protein VP3 byl použit pro imunizaci myši.

4. 2. 10 **Příprava myši monoklonální protilátky proti minoritním kapsidovým proteinům BK viru**

Techniky převzaty a upraveny podle: (HARLOW & LANE, 1988)

Monoklonální protilátky jsou sekretovány ve velkých množstvích jedním B lymfocytárním klonem a rozpoznávají specificky jeden konkrétní epitop antigenu. Počátky techniky přípravy monoklonálních protilátek sahají až do roku 1975, kdy C. Milstein a G. Köller (KÖLLER & MILSTEIN, 1975) poprvé provedli fúzi myelomové buňky se slezinným B lymfocytům a výsledný produkt nazvali hybridom. V hybridomových buňkách jsou spojeny výhodné vlastnosti obou typů rodičovských buněk: B lymfocyty mají totiž v tkáňové kultuře krátký poločas života a fúzí s transformovanou myelomovou buňkou získají schopnost neomezeného růstu v tkáňové kultuře. Zároveň si však zachovávají schopnost produkce protilátek. Technika přípravy monoklonálních protilátek má několik kroků a skrývá četná úskalí.

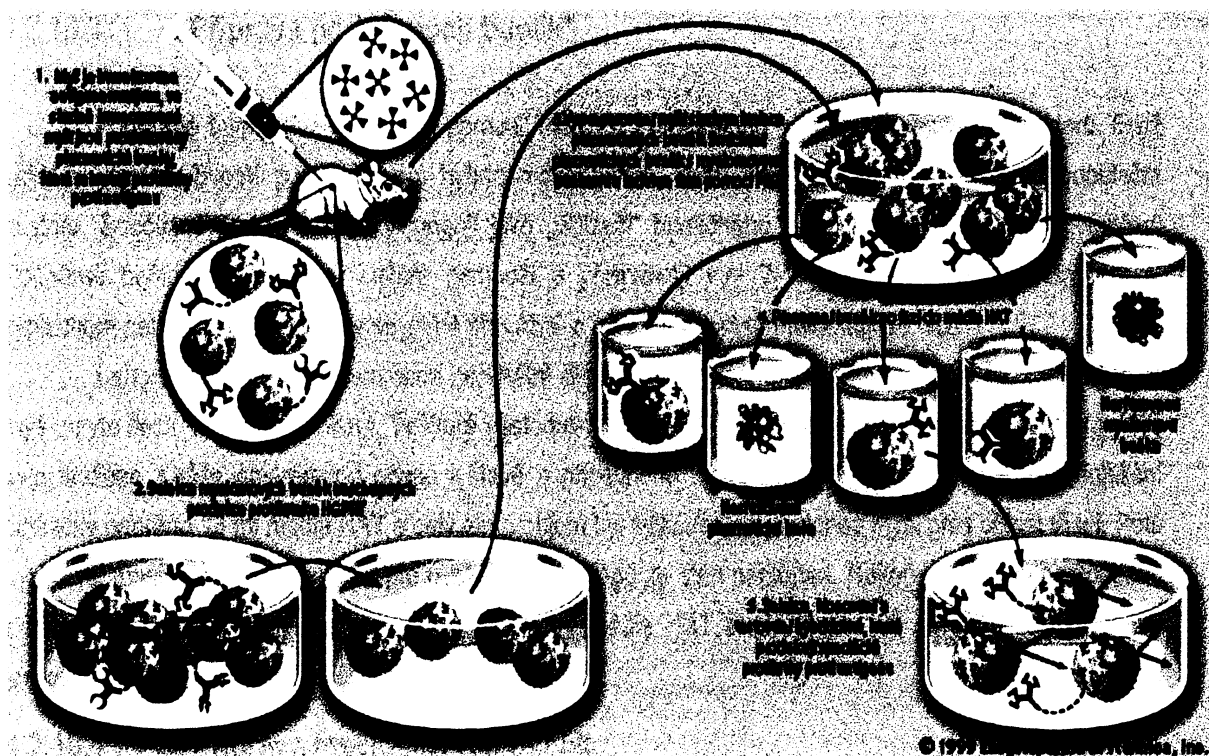
KAPITOLA 4: MATERIÁL A METODY

Prvním krokem je imunizace zvířete zvoleným antigenem. Nejčastěji se pro přípravu monoklonálních protilátek využívají drobnější laboratorní zvířata, jako je myš nebo potkan. Zvířata můžeme imunizovat několika cestami, obvykle subkutánně, intraperitoneálně nebo intravenózně. Imunizační schémata mohou být různá a liší se podle povahy zvoleného antigenu, zpravidla bývá podáno několik imunizačních dávek v intervalu 7 až 14 dnů. Spolu s antigenem se podává adjuvant, které zesílí imunitní reakci. Jedním z používaných adjuvant je Freundovo adjuvant. Kompletní Freundovo adjuvant je minerální olej obsahující buněčný extrakt bakterie *Mycobacterium tuberculosis*, nekompletní Freundovo adjuvant je složeno pouze z minerálního oleje. Buněčný extrakt aktivuje dendritické buňky (přes TLR). Minerální olej slouží jako matrice, z níž je antigen pomalu a postupně uvolňován. Tím dochází k prodloužené stimulaci imunitního systému. Kvalita imunitní reakce je kontrolována stanovením titru sérových protilátek proti cílovému antigenu v průběhu imunizace.

Tři dny po poslední imunizaci („boost“), která bývá podána nejčastěji intravenózně (bez adjuvant), je zvířeti odebrána slezina. Slezinné buňky jsou fúzovány s buňkami myeloidními často pomocí 50 % PEG. Nejpoužívanějším způsobem selekce buněk je Littlefieldova technika (LITTLEFIELD, 1966). Vychází se při ní z těchto předpokladů: i) u buněk kultivovaných *in vitro* lze navodit určité enzymové defekty, ii) buňky s enzymovými defekty nejsou schopny růst v médiích obsahujících tzv. selekční komponenty, iii) u hybridních buněk může být enzymový defekt jedné buňky kompenzován přítomností enzymů druhé buňky. K syntéze nukleotidů v eukaryotní buňce vedou dvě dráhy: hlavní a boční. V hlavní cestě jsou nukleotidy syntetizovány *de novo* z cukrů a aminokyselin. Tento způsob syntézy lze blokovat aminopterinem, přítomným v médiu HAT. Boční cesta využívá k syntéze preformovaných purinových bází a nukleosidů. Tento způsob syntézy je závislý na aktivitě dvou enzymů: hypoxantin-guanozin-fosforybozyl-transferázy (HGPRT) a thymidin kinázy. Při fúzi myelomovým buňkám schází enzym HGPRT (tj. jsou neschopné využít hypoxantin jako externí zdroj purinových bází- adeninu a guaninu) i thymidin-kináza (tj. jsou neschopné využít thymidin jako externí zdroj pyrimidinových bází-cytosinu a thyminu). Naopak B lymfocyt má funkční oba tyto enzymy. Po selekci v médiu HAT obsahujícím aminopterin tedy přežívají pouze hybridomy vzniklé spojením obou partnerů (B- lymfocytu a myelomu), nikoli hybridi vzniklí spojením dvou stejnocenných s funkční TK i HGPRT. Pokud ani jedna ze dvou drah není funkční, nemůže se buňka dále množit, jedna jí však k tomu postačí. Buňka, která se nemůže množit, tedy posléze z buněčné kultury zmizí.

Vzniklé hybridomy jsou geneticky nestabilní (tetraploidní 4n) a musí být dále selektovány a klonovány. Jen klon skutečně vzniklý z jediné mateřské buňky zaručuje, že se bude tvořit monoklonální protilátka. Technik klonování je několik. Obvykle je nutné hybridomy znovu klonovat (reklonovat) alespoň třikrát abychom získali stabilní klony produkující žádoucí protilátku.

Klonované hybridomy jsou dále testovány na přítomnost žádoucí protilátky několika metodami. Nejobvyklejší metodou je ELISA. Hybridomy ale můžeme testovat i metodou imunodot-blot, nepřímou imunofluorescencí nebo western blot. Na obrázku 4.2.1 je schéma přípravy hybridomů produkujících monoklonální protilátky proti konkrétnímu antigenu.



Obr. 4.2.1: Schéma přípravy hybridomů produkujících monoklonální protilátky proti konkrétnímu antigenu. 1) Myš je imunizována antigenem zájmu a ve slezině imunizované myši jsou produkovány plazmatické buňky, které sekretují protilátky proti tomuto antigenu, 2) Selektce myelomových buněk neschopných produkce protilátek a HGPRT, Vypreparován myši sleziny a izolace plazmatických buněk. Smíchání plazmatických buněk s myelomovými buňkami a indukce fúze pomocí PEG. 4) Přenesení buněk po fúzi do média HAT 5) Selektce, klonování a testování hybridomů, které produkují specifické protilátky proti antigenu zájmu. (Upraveno podle © Encyclopaedia Britannica, Inc.)

4.2.10.1 Imunizace myši*

Připraveným antigenem (4.2.10.3) byly imunizovány dvě myši, a to samice imbredního kmene BALB/c. Byly provedeny celkem 4 imunizace antigenem vždy po 14 dnech. Zvířata byla imunizována ve všech případech subkutánně, přičemž dávka podaného antigenu byla 20 μ g antigenu v celkovém objemu 100 μ l PBS a Freundova adjuvant 1:1. Pro první imunizaci bylo použito kompletní Freundovo adjuvant, pro druhou a třetí imunizaci bylo použito nekompletní Freundovo adjuvant a poslední imunizace byla provedena bez adjuvant. Poslední dávka byla aplikována taktéž subkutánně.

4.2.10.2 Odběr krve z ocasní žíly a příprava a testování séra*

Po první a druhé imunizaci byl u obou myši proveden kontrolní odběr krve (5 μ l krve naředěné do 100 μ l PBS) z ocasní žíly za použití mikrokapiláry. Odebraná krev ředěná v PBS byla inkubována 10 minut /RT a poté 1 hodinu/4 $^{\circ}$ C za občasného protřepání. Poté byla sražená krev sedimentována centrifugací (4150g/1 min). Takto získané sérum bylo testováno na přítomnost protilátek proti antigenu VP2/3 BKV metodou imunodot-blot.

*Veškeré manipulace s živými zvířaty včetně imunizací byly provedeny Mgr. Alenou Morávkovou Ph.D.

4.2.10.3 Příprava podpůrných buněk*

Podpůrné buňky (feeder layers) upravují médium vypouštěním buněčných sekrečních faktorů, čímž zajišťují vhodné životní podmínky pro hybridomové buňky, které mají zpočátku velmi malou populační hustotu. Současně podpůrné buňky fungují jako „uklízeči“ buněčného detritu díky schopnosti fagocytózy. Podpůrné buňky se v tkáňové kultuře nemnoží a přetrvávají v ní 7-10 dní. Jsou připravovány z myši výplachem peritonea. Histologicky se jedná převážně o buňky monocyto-makrofágové řady.

Laboratorní myš byla usmrcena cervikální dislokací a vykrvena proříznutím krční tepny. Poté byla myš omyta dezinfekčním roztokem. Veškeré následující kroky byly dělány asepticky v laminárním boxu. Myš byla stažena z kůže směrem od ocasu k hlavě a připevněna k operační podložce. Poté bylo do injekční stříkačky nabráno 10 ml média HAT a celý tento objem byl injikován do peritonea myši přes oblast třísel. Poté byla myši masírována břišní oblast pro uvolnění makrofágů ze stěn peritonea. Nakonec byl přes peritoneální stěnu celý objem tekutiny vysán, zředěn do 50 ml média HAT a plněn po 100 μ l do připravených 96 jamkových mikrotitračních destiček.

4.2.10.4 Příprava myelomových buněk

Myelomové buňky byly vyjmuty z tekutého dusíku, kde byly skladovány, týden před fúzí a rychle rozmrazeny ve vodní lázni při 37°C. Poté byly myelomové buňky naředěny do 10 ml média RPMI 1640 s 15% FCS. Suspenze buněk byla centrifugována (1750 x g/5 min) a buněčný sediment byl resuspendován v médiu RPMI 1640 s 15% FCS. Buňky byly kultivovány na kultivačních miskách (\varnothing 6 cm) až do dne fúze. Dobrá kondice a hustota myelomových buněk byla kontrolována průběžně pod invertovaným mikroskopem. Jestliže dosáhly buňky 100% konfluence, byly pasážovány do kompletního média RPMI 1640 s 15% FCS v poměru 1:4 způsobem, jaký byl použit při pasážování hmyzích buněk v kapitole 4.2.3.1.1.

4.2.10.5 Buněčná fúze

4.2.10.5.1 Příprava slezinných buněk*

Myš byla 3 dny po poslední imunizaci usmrcena cervikální dislokací a vykrvena přestřížením krční tepny. Poté byla myš omyta dezinfekčním roztokem a veškeré následující kroky byly dělány asepticky v laminárním boxu. Myš byla stažena z kůže směrem od ocasu k hlavě a připevněna k operační podložce. Pomocí nůžek a skalpelu bylo otevřeno peritoneum a byla odebrána slezina. Ta byla poté položena na Petriho misku s propíracím médiem a kouskem sterilního silonu. Slezina byla homogenizována nejprve rozstříháním na malé kousky a poté protlačením slezinných buněk přes oka silonu do propíracího média. Buňky byly přefiltrovány do 50 ml zkumavky přes další vrstvu silonu.

*Veškeré manipulace s živými zvířaty včetně imunizací byly provedeny Mgr. Alenou Morávkovou Ph.D.

4.2.10.5.2 Promývání slezinných a myelomových buněk

Slezinné a myelomové buňky byly nejprve spočítány v Bürkerově komůrce. V případě slezinných buněk byly počítány jen lymfocyty. Slezinné a myelomové buňky byly promývány nejdříve 2x odděleně a poté společně v žádaném poměru v propíracím médiu (RPMI 1640 s antibiotiky pro TK a 2 mM glutaminem, bez séra) následujícím způsobem: Suspenze buněk byla doplněna propíracím médiem do 50 ml a centrifugována (405 g/10 min). Při třetím promývání byly slezinné a myeloidní buňky smíchány v poměru 5:1 ve prospěch slezinných buněk a opět doplněny do 50 ml a centrifugovány (405 g/10 min). Takto získaný a promytý sediment buněk byla připraven pro fúzi.

4.2.10.5.3 Fúze buněk

Sediment tvořený slezinnými a myeloidními buňkami smíchanými ve vhodném poměru byl nejprve jemně protřepán a poté k němu byl přidán pomalu během 1 minuty a za současného protřepávání 1 ml 50% PEG (Mw. 3350). Následně bylo přidáno RPMI 1640 médium s 2 mM glutaminem a antibiotiky pro TK ohřáté na 37°C, a to: v druhé minutě 1 ml média, v třetí minutě 1 ml média a ve čtvrté minutě 8 ml média. Poté byly fúzované buňky centrifugovány (295 g/10 min), sediment buněk byl resuspendován v 50 ml média HAT a po 100 μ l plněn do 96 jamkových mikrotitračních destiček, ve kterých bylo již připraveno 100 μ l podpůrných buněk.

4.2.10.6 Léčba geneticinem

Dva až tři dny po fúzi byl ke kultuře hybridomů přidán roztok geneticinu G418 (400 μ g/ml), což je antibiotikum účinné proti mykoplasmě. Myelomové buňky, a tedy i hybridomy, jsou vůči geneticinu rezistentní. Geneticin byl z kultury hybridomů odstraněn výměnou za čerstvé médium HAT bez geneticinu před testováním na produkci žádané protilátky (3-5 dnů po jeho působení v kultuře), protože by mohl interferovat s dalšími experimenty.

4.2.10.7 Pasážování hybridomů

Jakmile hybridomy dosáhly 80-100% konfluency, byly pasážovány z jamky 96 jamkové mikrotitrační destičky do jamky 24jamkové mikrotitrační destičky. Hybridomy byly nejprve uvolněny od podkladu několikanásobným prosátím pomocí mikropipety a sterilní špičky a poté byl celý obsah jamky (200 μ l) přenesen do jamky 24 jamkové mikrotitrační desky s připravenými 800 μ l čerstvého média HAT popř. HT. (Jestliže již hybridomy prošly minimálně 1x procesem klonování, byly pěstovány v médiu HT, které neobsahovalo aminopterin). Následně bylo i do původní jamky 96 jamkové mikrotitrační destičky, z které byly hybridomy přeneseny, dáno 200 μ l čerstvého média HAT popř. HT. Při pasážování se totiž nikdy nepodaří uvolnit všechny hybridomy od podkladu, a proto se i v původní jamce hybridomy opět namnoží. Jestliže již nebylo potřeba hybridomy množit za účelem např. zhotovení konzervy nebo klonování, byly hybridomy

z jamky vždy uvolněny několikanásobným prosátím mikropipetou se sterilní špičkou, odebrané médium bylo centrifugováno (405 g/10 min), aby bylo zbaveno buněk, testováno na přítomnost žádané protilátky a nahrazeno čerstvým médiem HAT. Hybridomy byly uchovávány při 37 °C v CO₂ termostatu. Pro produkci většího množství protilátky byly hybridomy pasážovány na Petriho misky o Ø 9 cm. Nejprve bylo médium HT s protilátkami odebráno z Petriho misky, ve které hybridomy rostly a centrifugováno od zbytků buněk (405g/10 min). Poté bylo do misky s hybridomy přidáno čerstvé médium HT, do kterého byly hybridomy jemně seškrabány škrabátkem. Buněčná suspenze byla rozdělena na nové Petriho misky v poměru 1:2 až 1:4 podle potřeby.

4.2.10.8 Klonování

Abychom si byly jisti, že získaná protilátka je tvořena pouze hybridomy vzniklými rozmnožením jedné buňky, je třeba hybridomy klonovat. Teprve po získání jednotlivých klonů lze produkovat jednoznačně definovanou monoklonální protilátku namířenou proti určitému epitopu a tvořenou hybridomy odvozenými z jediné původní fúzované buňky. Klonováním se zároveň stabilizuje již získaná buněčná linie. Linie hybridomů je vhodné minimálně 3x klonovat a testovat na produkci žádané protilátky. Obecně se tvrdí, že jestliže je po klonování 95% klonů pozitivních na produkci žádané protilátky, můžeme hovořit o stabilní hybridomové linii. Hybridomy byly klonovány následujícím způsobem: do 4 zkumavek bylo připraveno HAT médium o objemu 4 ml (1 zkumavka), a 3,7 ml (2-4 zkumavka)-(ředění 10x až 1000x). Poté bylo do první zkumavky s připraveným médiem přeneseno 10-100 µl homogenní hybridomové suspenze (v závislosti na množství a kondici hybridomových buněk). Suspenze hybridomů v první zkumavce byla promíchána prosátím pipetou a 300 µl z této homogenní suspenze bylo přeneseno do zkumavky 2 s připraveným médiem HAT. Tento postup byl opakován až do té doby, kdy byla ve všech 4 zkumavkách suspenze hybridomů se snižující se koncentrací. Poté byla suspenze buněk o 4 různých koncentracích rozdělena po 100 µl do 96 jamkové mikrotitrační destičky s již připravenými 100 µl podpůrných buněk. (Když byly hybridomy před klonováním v dobré kondici a vyšší hustoty, nebyly podpůrné buňky zapotřebí). Destička byla rozdělena na 4 části po 3 řadách (24 jamek), přičemž v každé části byly hybridomy o různém ředění. Jamky byly po uplynutí 5-7 dnů kontrolovány pod invertovaným mikroskopem a médium z jamek, ve kterých se nacházela pouze jedna kolonie vzniklá rozmnožením pouze jediné buňky, bylo testováno na přítomnost žádané protilátky.

4.2.10.9 Příprava konzerv hybridomových linií

Hybridomy byly nejprve uvolněny od podkladu prosátím pipetou, popř. pomocí škrabátka, přemístěny do mikrozukavky a centrifugovány (295 g/10 min) Poté byl buněčný sediment resuspendován v mrazicím médiu (viz 4. 1. 11) a bylo přidáno DMSO na výslednou koncentraci 10%. Takto připravená buněčná suspenze byla přenesena do kryozukavky a mražena tak, aby se teplota snižovala o 1°C/1min v mrazicím krabíčce. Dále byly hybridomy skladovány v tekutém dusíku při -198°C neomezeně dlouhou dobu. Stejným způsobem byly mraženy i slezinné buňky nevyužité při fúzi a myelomové buněčné linie.

4.2.10.10 Rozmrazování hybridomů

Konzerva s hybridomy byla vyjmuta z tekutého dusíku, a ihned rozeřána ve vodní lázni při 37 °C. Obsah kryo-zkumavky byl přenesen do 10 ml média HAT. Poté byla suspenze centrifugována (295 g/10 min), aby byla zbavena DMSO buněčný sediment byl resuspendován v HAT médiu. Buňky byly vysety na kultivační destičky a inkubovány v termostatu při 37 C° v 5% atmosféře CO₂.

5. VÝSLEDKY

5.1 Příprava protilátek proti strukturním antigenům BK viru

Abychom mohli v naší laboratoři zahájit výzkum lidského polyomaviru BK (BKV), bylo potřeba získat protilátky proti strukturním kapsidovým proteinům tohoto patogenu. Ačkoliv již byla v naší laboratoři připravena králíčí polyklonální protilátka proti hlavnímu kapsidovému proteinu VP1, pro výzkum funkcí VP1 a minoritních proteinů VP2 a VP3 bylo nutné zaměřit se na přípravu monoklonálních protilátek proti všem zmíněným strukturním proteinům BKV. Protože protein VP2 obsahuje na svém C konci celou sekvenci proteinu VP3, předpokládali jsme, že pňnejmenším některé protilátky by mohly být zaměřeny proti oběma minoritním proteinům. Možná by se podařilo připravit i protilátky interagující pouze s epitopy vyskytujícími se na unikátní N koncové části proteinu VP2. Nejprve jsem se zaměřila na přípravu protilátky proti minoritním proteinům BKV, z důvodu předpokládané složitější přípravy antigenu.

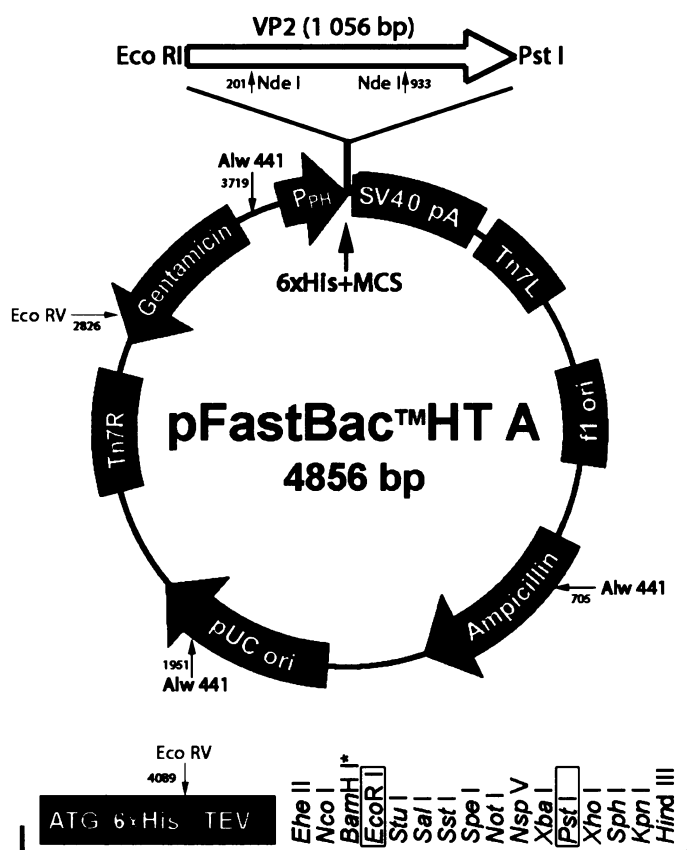
Pro účel studia funkcí strukturních proteinů BKV byly již dříve v naší laboratoři připraveny rekombinantní bakuloviry pro produkci samotného proteinu VP1 (rBac-VP1 BKV) a pro simultánní produkci VP1 a minoritního proteinu VP2 (rBac-VP1/2 BKV), nebo VP3 (rBac-VP1/3 BKV) v hmyzích buňkách. Já jsem se ve své diplomové práci zaměřila na přípravu rekombinantního bakuloviru pro produkci minoritního kapsidového proteinu VP2 k přípravě antigenu VP2 pro imunizaci myši a ke studiu vlastností tohoto minoritního kapsidového proteinu.

5.1.1 Příprava rekombinantního bakuloviru pro expresi VP2 BKV

5.1.1.1 Konstrukce transferového vektoru nesoucího gen pro protein VP2

Prvním dílčím úkolem bylo vytvořit pomocí transferového vektoru pFastBac HT A (*Bac-to-Bac Expression system, Invitrogen*) plazmid, ve kterém bude pod silným polyhedrinovým promotorem umístěn gen pro protein VP2 BKV. Konstrukce transferového plazmidu pFastBac HT A-VP2, nesoucího gen pro protein VP2 BKV, je znázorněna na obr. 5.1.1. Do tohoto vektoru je možné vložit cizí gen za sekvenci pro histidinovou kotvu (6xHis). Histidinová kotva by měla usnadnit izolaci rekombinantního proteinu afinitní chromatografií.

Nejprve byl PCR amplifikací (viz. 4.2.5.3.1) s využitím primerů „pFBHTA-1“ a „pFBHTA-2“ (viz. 4.1.6), zavádějících restrikční místa pro restrikční endonukleázy *Eco RI* a *Pst I*, připraven gen pro protein VP2. Jako templát byl použit plazmid „p734a“ nesoucí genom BK viru. Teplota hybridizace primerů byla stanovena pomocí vztahu: 2°C za každou bázi A nebo T a 4°C za každou bázi G nebo C, počítáno z oblasti primerů komplementárních k templátu. U obou použitých primerů byla teplota 52°C. Takto amplifikovaný gen (VP2) byl poté přečištěn pomocí soupravy „NucleoSpin Extract II“ (*Macherey Nagel*) (viz 4.2.5.3.2) a štěpen restrikčními endonukleázami *Eco RI* a *Pst I*, aby byly vytvořeny kohezni konce, umožňující snazší ligaci (viz. 4.2.5.4.1).



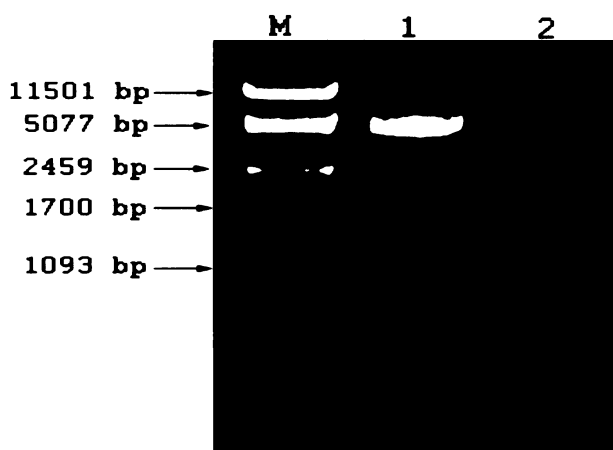
Obr. 5.1.1: Schéma konstrukce transferového vektoru pFastBac HT A-VP2. Popis transferového vektoru pFast Bac HT A: f1 origin (2-457 bp), gen pro rezistenci k ampicilinu (589-1449 bp), pUC origin (1594-2267 bp), transpoziční místo „Tn7R“ (2511-2735 bp), gen pro rezistenci ke gentamycinu (2802-3335 bp), polyhedrinový promotor „P_{PH}“ (3904-4032 bp), iniciační kodon ATG (4050-4052 bp), 6xHis kotva (4062-4079 bp), rozpoznávací místo „TEV“ (4101-4121 bp), „multiple cloning site“, „MCS“ (4119-4222 bp), polyadenylační signál SV40 (4240-4480 bp) a transpoziční místo „Tn7L“ (4509-4674 bp). Gen pro protein VP2 byl do vektoru pFast Bac HT A vnášen za restrikční místa pro *Eco RI* (4135 bp) a *Pst I* (4197 bp), které jsou součástí MCS. Při ověřování transferového vektoru pFast Bac HT A a vytvořeného konstruktů pFast Bac HT A-VP2 byly použity ještě tyto restrikční endonukleázy: *Eco RV* (štěpící v donorovém vektoru v místech 2826 bp, 4089 bp), *Alw 441* (štěpící v donorovém vektoru v místech 705 bp, 1951 bp, 3719 bp) a *Nde I* (štěpící v genu pro protein VP2 v místech 201 bp, 933 bp).

Štěpený fragment VP2 byl izolován z agarózového gelu pomocí soupravy „NucleoSpin Extract II“ (*Macherey Nagel*) (viz 4.2.5.1.3). Restrikční štěpení fragmentu bylo ověřeno ligačním testem (neukázáno). Plazmidový vektor pFastBac HT A byl nejprve izolován z bakteriální kultury alkalickou maxipreparací (viz 4.2.5.1.1) a jeho identita ověřena štěpením restrikčními endonukleázami *Eco RI*, *Eco RV* a *Alw 441*. Na obrázku 5.1.2 je zobrazena elektroforéza restrikčního ověření donorového plazmidu. Všechny použité restrikční endonukleázy štěpily vektor podle očekávání. Enzymem *Eco RI* byl vektor linearizován (4856 bp), enzym *Eco RV* štěpil plazmid na dvě části o velikosti 3593 bp a 1263 bp a enzym *Alw 441* štěpil plazmidovou DNA na 3 části o velikosti 1246 bp, 1768 bp a 1842 bp. Proučky o velikosti 1768 bp a 1842 bp na obrázku splývají v jeden. Ověřený vektor byl štěpen restrikčními endonukleázami *Eco RI* a *Pst I* a 5' konce upraveny defosforylací (viz 4.2.5.4.2). Linearizovaný a defosforylovaný plazmid byl připraven pro ligaci se štěpeným a izolovaným genem

pro VP2. Na obrázku 5.1.3 je kontrolní agarózová elektroforéza připraveného fragmentu VP2 a donorového plazmidu.



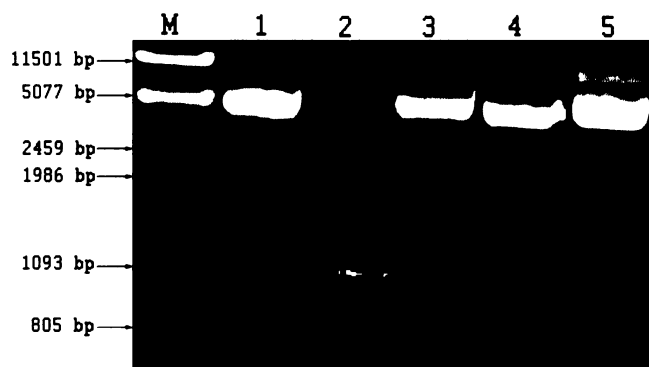
Obr. 5.1.2: Elektroforéza restričního ověření donorového plazmidu Fast Bac HT A. V dráze „1“ je plazmid linearizovaný pomocí restriční endonukleázy *Eco RI*, v dráze „2“ je plazmid štěpený enzymem *Eco RV* a v dráze „3“ štěpený enzymem *Aflw 441*.



Obr 5.1.3: Kontrolní elektroforéza štěpeného (*Eco RI*, *Pst I*) a defosforylovaného plazmidu pFastBac HT A (dráha „1“) a amplifikovaného, restričně štěpeného (*Eco RI*, *Pst I*) a izolovaného fragmentu, nesoucího gen pro protein VP2 (dráha „2“).

Byla připravena ligační směs obsahující plazmidovou DNA a fragment VP2 v poměru 1:6. Ligace probíhala při laboratorní teplotě přes noc s použitím T4 ligázy (viz 4.2.5.4.3). Ligační směs byla následně transformována metodou elektroporace do kompetentních buněk *E. coli DH5α* (viz 4.2.2.3.2). Po elektroporaci byly bakterie třepány 1 hodinu při 37°C a poté vysety v různých ředěních na pevné médium s ampicilinem a inkubovány 12-16 hodin staticky při 37°C. Z narostlé kolonie byly minipreparací izolovány plazmidové DNA (viz 4.2.5.1.2). Správný konstrukt byl vyhledáván restričním štěpením pomocí restričních endonukleáz *Eco RV*, *Nde I* a kombinací enzymů *Eco RI* a *Pst I*. Restriční endonukleáza *Eco RV* štěpila DNA donorového plazmidu v místech 2826 bp a 4089 bp, a tak se ověřovaný plazmid rozštěpil na 2 části o velikosti 4649bp a 1263 bp. Restriční endonukleáza *Nde I* štěpila gen pro protein VP2 v místech 201 bp a 933 bp, a tak se ověřovaný plazmid rozštěpil na 2 části o velikosti 5179bp a 733bp. Kombinací restričních endonukleáz

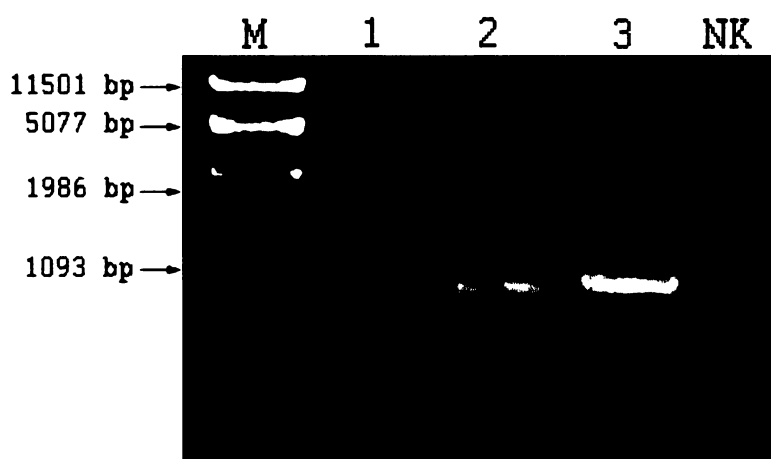
Eco RI a *Pst I* bylo docíleno vyštěpení genu pro protein VP2 (1056bp) z donorového plazmidu pFastBac HT A (4856 bp). Elektroforéza tohoto restrikčního ověření plazmidové DNA je zobrazena na obr. 5.1.4.



Obr. 5.1.4: Elektroforéza restrikčního ověření plazmidové DNA. V dráze „1“ je plazmid pFastBac HT A štěpený *Eco RI* a *Pst I*, v dráze „2“ je fragment VP2. Restrikční ověření přítomnosti inzertu VP2 bylo provedeno kombinací restrikčních endonukleáz *Eco RI* a *Pst I* (dráha „3“), dále pak enzymem *Eco RV* (dráha „4“) a enzymem *Nde I* (dráha „5“).

5.1.1.2 Příprava rekombinantní bakulovirové DNA nesoucí gen pro protein VP2 BK viru

Připraveným konstruktem pFastBac HT A-VP2 byly metodou teplotního šoku transformovány kompetentní bakterie kmene *DH10Bac* (viz 4.2.2.3.4), nesoucí bacmid a pomocný plazmid. Na základě inzerce genu pro protein VP2 do genu *LacZ α* byly selektovány bílé kolonie, u nichž došlo k úspěšné transpozici genu VP2 do bakulovirové DNA, z pozadí modrých kolonií, u nichž k úspěšné transpozici nedošlo. Přítomnost genu pro protein VP2 v bílých koloniích byla ověřena metodou PCR amplifikace. Templátem pro tuto reakci byla DNA z bílých kolonií (viz 4.2.5.3.3). Templátem pro pozitivní kontrolu byla použita plazmidová DNA p734a nesoucí genom BKV. Templátem pro negativní kontrolu byla DNA z modrých kolonií. Pro PCR amplifikaci byly použity primery pFBHTA-1 a pFBHTA-2. Výsledek PCR amplifikace z kolonií je znázorněn na obrázku 5.1.5.

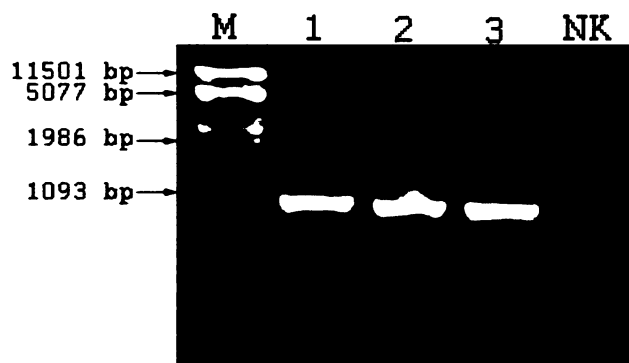


Obr. 5.1.5: Ověření přítomnosti genu pro protein VP2 BKV v bílých koloniích metodou PCR amplifikace. V drahách „1“ až „3“ je amplifikovaný fragment o velikosti genu pro protein VP2 (1056 bp). Templátem byla DNA z bílých kolonií. Jako negativní kontrola (NK) byla použita DNA získaná z modré kolonie.

Vybrané pozitivní kolonie byly zaočkovány do 5ml ŽB2 s antibiotiky a inkubovány přes noc při 37°C za stálého třepání. Z narostlých kultur byla izolována bacmidová DNA (viz 4.2.5.1.5) a přítomnost genu pro protein VP2 v izolované DNA byla opět ověřena pomocí PCR amplifikace. Templátem pro pozitivní kontrolu

KAPITOLA 5: VÝSLEDKY

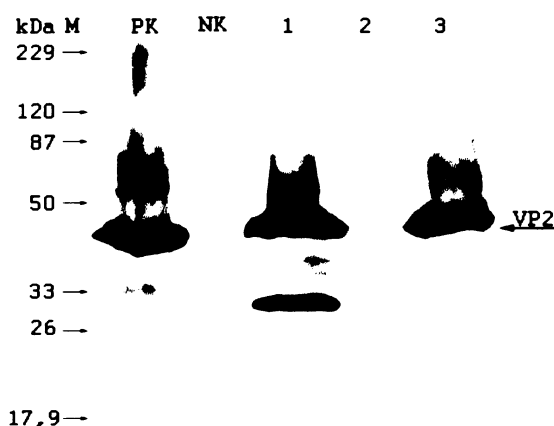
byla použita plazmidová DNA p734a. Negativní kontrolou byla reakční směs pro PCR amplifikaci bez templátové DNA. Výsledek PCR amplifikace z bacmidové DNA je znázorněn na obr. 5.1.6.



Obr. 5.1.6: PCR amplifikace bacmidové DNA. V drahách „1“ až „3“ je amplifikovaný fragment o velikosti genu pro protein VP2 (1056 bp). Templátem byla bacmidová DNA. Negativní kontrolou byla reakční směs bez templátové DNA.

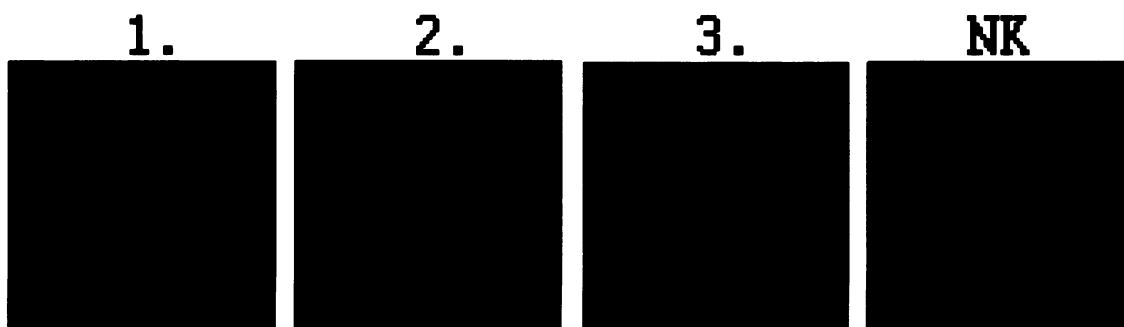
Izolovanou bacmidovou DNA byly transfekovány hmyzí buňky Sf9 (viz 4.2.3.1.5) a inkubovány 6 dní při 28°C. Poté bylo z Petriho misek s transfekovanými buňkami odebráno médium, které bylo použito jako inokulum bakuloviru r-Bac-VP2 BKV pro infekci dalších hmyzích buněk Sf9. 72 hodin po infekci byly infikované buňky Sf9 sklizeny a byly z nich připraveny lyzáty. Odebrané médium z nich bylo uchováno jako inokulum bakuloviru r-Bac-VP2 BKV.

Lyzáty infikovaných buněk Sf9 byly analyzovány SDS proteinovou elektroforézou (SDS-PAAGE) (viz 4.2.6.1) a následně imunologickou detekcí proteinů imobilizovaných na membráně metodou western blot (viz 4.2.6.3.2) pro ověření produkce proteinu VP2 v infikovaných buňkách. Na detekci proteinu VP2 BKV byla použita králičí polyklonální protilátka proti minoritním strukturálním proteinům VP2 a VP3 SV40 získaná z laboratoře prof. Ariely Oppenheim. Homologie aminokyselinové sekvence BKV a viru SV40 je totiž 69% (FRISQUE *et al.*, 1984), a tak tato protilátka reaguje i s minoritními proteiny VP2 a VP3 BK viru. Výsledek metody imunologické detekce proteinu VP2 v lyzátech buněk infikovaných bakulovirem r-Bac-VP2 BKV je znázorněn na obrázku 5.1.7. Zatímco v dráze „1“ a „3“ je zřejmá produkce proteinu VP2 v lyzátu naneseném do dráhy „2“ protein VP2 produkován nebyl.



Obr. 5.1.7: Imunologická detekce proteinu VP2 BK viru. Westem blot byl vyvolán primární polyklonální protilátkou proti minoritním proteinům VP2 a VP3 viru SV40 a koží sekundární protilátkou proti králičím imunoglobulinům konjugovanou s peroxidázou (HRP). Jako pozitivní kontrola (PK) byly použity VLPs obsahující kapsidové proteiny VP1 a VP2. Jako negativní kontrola (NK) byl použit lyzát z buněk infikovaných divokým bakulovirem. Do drah „1“ až „3“ byl nanesen lyzát hmyzích buněk infikovaných rekombinantním bakulovirem rBac-VP2 BKV.

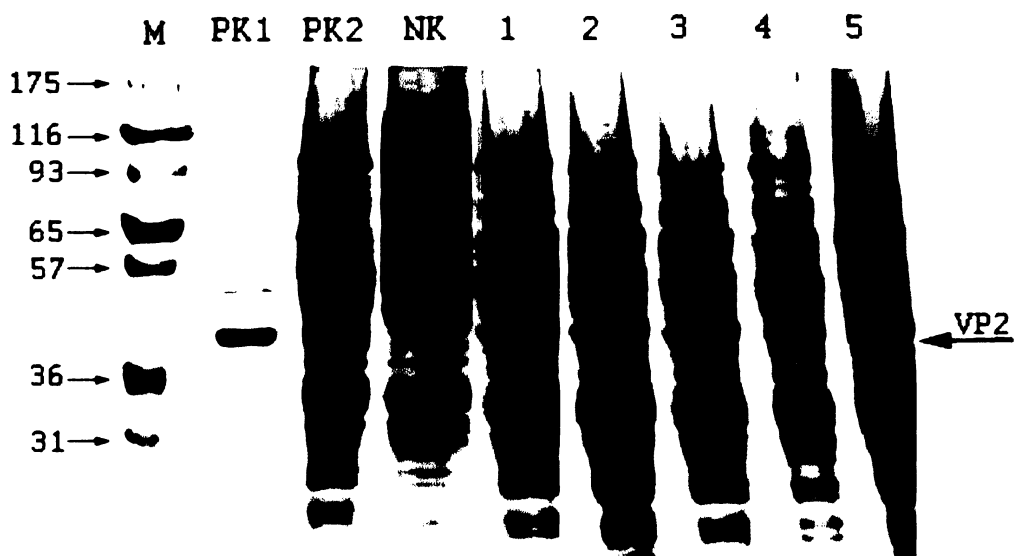
Produkce proteinu VP2 rekombinantním bakulovirem byla ověřena i metodou nepřímé imunofluorescence (viz 4.2.4). Na obrázku 5.1.8 je nepřímé imunofluorescenční značení proteinu VP2 v hmyzích buňkách infikovaných připraveným rekombinantním bakulovirem („1“ z obr. 5.1.7). Jako negativní kontrola byly použity hmyzí buňky infikované divokým bakulovirem. Z obrázku je patrné, že připravený rekombinantní bakulovirus skutečně produkuje protein VP2 BK viru.



Obr. 5.1.8: Ověření produkce VP2 v hmyzích buňkách infikovaných připraveným rekombinantním bakulovirem metodou nepřímé imunofluorescence. V experimentu byla použita králičí polyklonální protilátka proti proteinům VP2 a VP3 viru SV40 a kuřecí sekundární protilátka proti králičím imunoglobulinům značená AF488. 1-3: hmyzí buňky infikované bakulovirem r-Bac-VP2 BKV z dráhy „1“ na obr. 5.1.7. NK: hmyzí buňky infikované divokým bakulovirem. Měřítko značí 10 μm .

5.1.1.3 Příprava plakových izolátů rekombinantního bakuloviru „rBac-VP2 BKV“

Pro přípravu konzerv bakuloviru r-Bac-VP2 BKV, který by byl zaručeně homogenní a neobsahoval neprodukcující formy, jsme se rozhodli připravit plakové izoláty (viz 4.2.3.1.4). K plakové zkoušce bylo použito inokulum bakuloviru r-Bac-VP2 BKV (z dráhy „1“, obr. 5.1.7). Již dříve bylo v naší laboratoři pozorováno, že buňky, ve kterých se produkuje protein VP2, a to jak myšího polyomaviru, tak BK viru, mají změněnou morfologii z kulatého na podlouhlý tvar. Vzniklé plaky byly tedy selektovány s použitím invertovaného mikroskopu. Plaky obsahující buňky podlouhlého tvaru byly (i s agarem nad nimi a virem, který obsahovaly) sterilně vypíchnuty a byly jimi infikovány buňky Sf9. Z buněk infikovaných bakuloviry z jednotlivých plakových izolátů byly připraveny lyzáty, přičemž médium bylo sterilně odebráno a uchováno při 4°C. Lyzáty buněk byly podrobeny analýze na SDS-PAAGE a imunologické detekci proteinu VP2. Výsledek SDS proteinové elektroforézy po barvení Coomassie Brilliant Blue G250 (CBBG250) a výsledek imunologické detekce proteinu VP2 BKV na paralelní SDS-PAAGE je znázorněn na obr. 5.1.9.a a 5.1.9.b. Ve všech lyzátech buněk infikovaných jednotlivými plakovými izoláty byl detekován proužek o elektromobilitě proteinu VP2 (40 kDa). Ve 4 z 5 lyzátů byl detekován i výrazný proužek menší velikosti. Virové inokulum bylo ještě jednou použito k infekci nových buněk Sf9. Po 72 hodinové inkubaci infikovaných buněk bylo sterilně odebráno médium a byly z něj zhotoveny konzervy přidáním glycerolu do výsledné koncentrace 15%. Konzervy jsou uchovány při -78°C.



Obr. 5.1.9.a: Proteinová SDS elektroforéza lyzátů hmyzích buněk infikovaných plakovými izoláty bakuloviru r-Bac-VP2 BKV. Jako pozitivní kontrola 1 (PK1) byly použity VLPs obsahující kapsidové proteiny VP1 a VP2. Jako PK2 byl použit lyzát z hmyzích buněk infikovaných rekombinantním bakulovirem rBac-VP1/2 BKV. Jako negativní kontrola (NK) byl použit lyzát z neinfikovaných hmyzích buněk. Do drah „1“ až „5“ byl nanesen lyzát z hmyzích buněk infikovaných jednotlivými plakovými izoláty bakuloviru r-Bac-VP2 BKV.

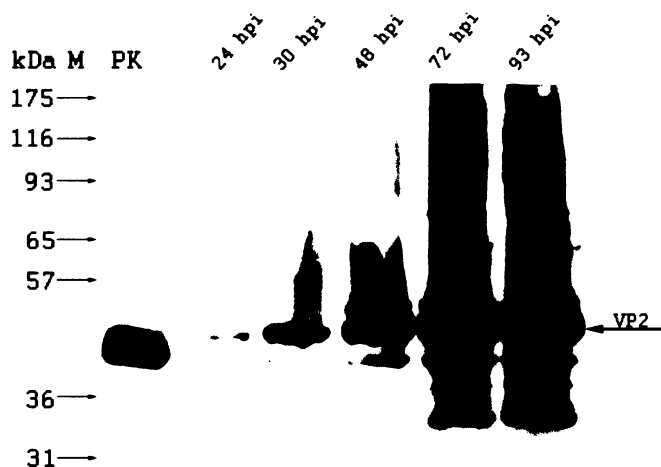


Obr. 5.1.9.b: Imunologická detekce proteinu VP2 v lyzátech hmyzích buněk infikovaných plakovými izoláty bakuloviru r-Bac-VP2 BKV. Western blot byl vyvolán králičí primární polyklonální protilátkou proti minoritním proteinům VP2 a VP3 viru SV40 a kozí sekundární protilátkou proti králičím imunoglobulinům konjugovanou s peroxidázou (HRP). Jako pozitivní kontrola 1 (PK1) byly použity VLPs obsahující kapsidové proteiny VP1 a VP2. Jako PK2 byl použit lyzát z hmyzích buněk infikovaných bakulovirem r-Bac-VP1/2 BKV. Jako negativní kontrola (NK) byl použit lyzát z neinfikovaných hmyzích buněk. Do drah „1“ až „5“ byl nanesen lyzát z hmyzích buněk infikovaných jednotlivými plakovými izoláty bakuloviru r-Bac-VP2 BKV.

5.1.2 Izolace proteinu VP2 BKV viru (VP2 BKV) z hmyzích buněk pro imunizaci

5.1.2.1 Optimalizace infekce

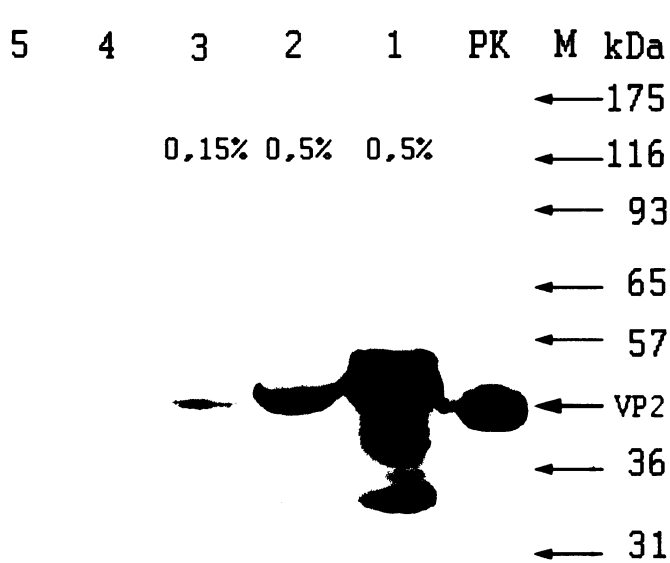
Prvním krokem izolace proteinu VP2 BKV z lyzátu buněk Sf9 infikovaných bakulovirem r-Bac-VP2 BKV byla optimalizace délky infekce. Důležité bylo najít kompromis požadavků, aby bylo v buňkách přítomno co nejvíce proteinu VP2 a současně, aby tento protein nebyl degradován vlivem dlouhodobé infekce. Buňky Sf9 byly lyzovány v různých časech po infekci, a to 24 hpi, 30 hpi, 48 hpi, 72 hpi a 93 hpi. Buněčný lyzát byl analyzován SDS-proteinovou elektroforézou a imunologickou detekcí proteinu VP2. Bylo zjištěno, že je nejvhodnější sklízet buňky Sf9 infikované bakulovirem r-Bac-VP2 BKV v čase 72 hpi, kdy je v buněčném lyzátu přítomno množství proteinu VP2 srovnatelné s množstvím proteinu pozorovaným v čase 93 hpi, ale degradace proteinu ještě není tak znatelná (obr. 5.1.10).



Obr. 5.1.10: Imunologická detekce proteinu VP2 BKV viru v různých časech po infekci. Western blot lyzátů hmyzích buněk infikovaných bakulovirem r-Bac-VP2 BKV produkujícím protein VP2 v uvedených časech po infekci. Western blot byl vyvolán primární králičí polyklonální protilátkou proti minoritním proteinům VP2 a VP3 viru SV40 a koží sekundární protilátkou proti králičím imunoglobulinům konjugovanou s peroxidázou (HRP). Jako pozitivní kontrola (PK) byly použity VLPs obsahující kapsidové proteiny VP1 a VP2.

5.1.2.2 Izolace proteinu VP2 BKV afinitní chromatografií

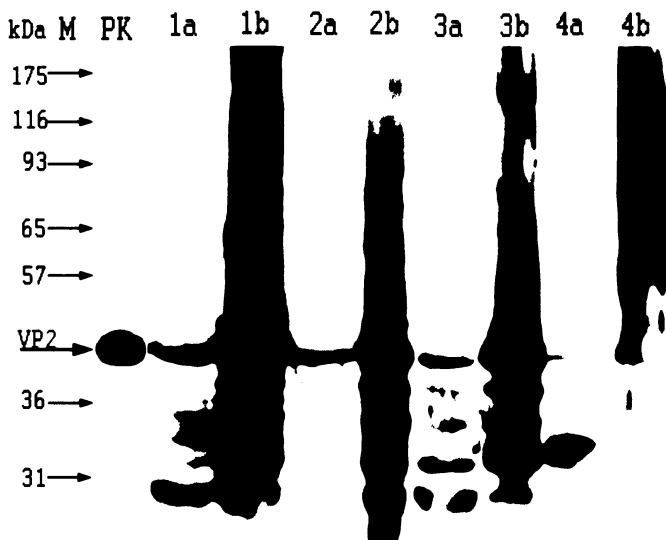
Pro použití proteinu VP2 jako antigenu pro imunizaci myši bylo nutné jej z lyzátu infikovaných buněk Sf9 izolovat. Protein VP2 je fúzován s histidinovou kotvou, a proto byl izolován afinitní chromatografií (viz 4.2.9.1). Jednotlivé frakce byly analyzovány SDS-PAAGE a imunologickou detekcí proteinu VP2. Z obrázku 5.1.11 je patrné, že se část proteinu nezachytila na kolonu po nanesení vzorku a po promytí vazebným pufrům, a že velká část proteinu zůstala patrně v koloně i po postupném promytí 10 ml elučního pufru. Na obrázku 5.1.11 jsou ukázány jen první 2 dráhy (dráha „4“ a „5“) z 10 drah po promytí elučním pufrům. V žádné z frakcí při eluci však nebyl protein VP2 detekovatelný.



Obr. 5.1.11: Imunologická detekce proteinu VP2 BK viru po afinitní chromatografii. Western blot byl vyvolán primární králičí polyklonální protilátkou proti minoritním proteinům VP2 a VP3 viru SV40 a koží sekundární protilátkou proti králičím imunoglobulinům konjugovanou s peroxidázou (HRP). Jako pozitivní kontrola (PK) byly použity VLPs obsahující kapsidové proteiny VP1 a VP2. V dráze „1“ je výchozí množství proteinu vstupujícího do pokusu. V dráze „2“ je frakce získaná během nanášení lyzátu na kolonu, v dráze „3“ je frakce po promytí vazebným pufrém. V drahách „4“ a „5“ jsou frakce po promývání elučním pufrém. Procenta vyjadřují podíl vzorku z celkového množství lyzátu naneseného na kolonu.

5.1.2.3 Test rozpustnosti proteinu VP2

Afinitní chromatografie nevedla k úspěšné izolaci proteinu VP2 viru BK z lyzátu buněk Sf9 infikovaných bakulovirem r-Bac-VP2 BKV. Proto jsme testovali rozpustnost proteinu VP2 BKV za různých podmínek: v PBS, v RIPA pufru, v 4M močovíně a v 8M močovíně (viz 4.2.6.9). Jednotlivé lyzáty byly testovány SDS-PAAGE následovanou imunologickou detekcí proteinu VP2 metodou western blot. Z obrázku 5.1.12 je patrné, že ve všech případech většina proteinu zůstávala v peletu. Nejlepší rozpustnost proteinu VP2 je v 4M a 8M močovíně. Ač byly do vzorků již na počátku experimentu přidány inhibitory proteáz, degradace proteinu VP2 byla značná. Na základě těchto výsledků byl zopakován experiment izolace proteinu VP2 afinitní chromatografií. Experiment byl proveden stejným způsobem, ale buňky byly tentokrát lyzovány ve vazebném pufru, do kterého byla přidána močovina tak, aby byla 4M. I tentokrát ale část proteinu VP2 protekla po nanesení vzorku na kolonu a po promývání vazebným pufrém a část zůstala v koloně i po mnohonásobném promytí elučním pufrém.

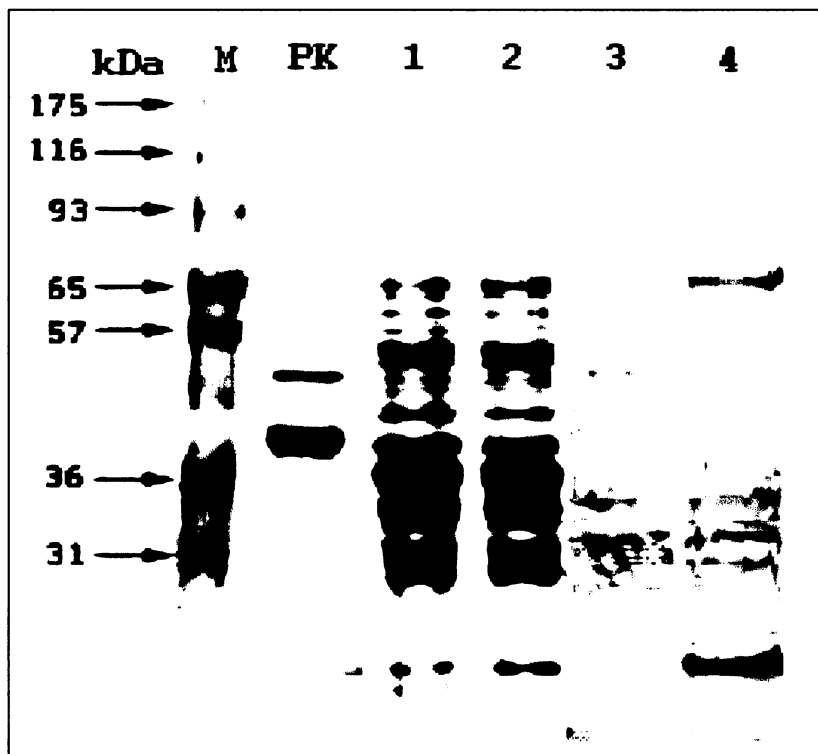


Obr. 5.1.12: Imunologická detekce proteinu VP2 BK viru v pufrách PBS a RIPA a v 4M a 8M močovíně. Western blot byl vyvolán primární králičí polyklonální protilátkou proti minoritním proteinům VP2 a VP3 viru SV40 a koží sekundární protilátkou proti králičím imunoglobulinům konjugovanou s peroxidázou (HRP). Jako pozitivní kontrola (PK) byly použity VLPs obsahující kapsidové proteiny VP1 a VP2. a=supernatant, b= sediment1=PBS, 2=RIPA, 3= 4M močovina v PBS, 4= 8M močovina v PBS. Jednotlivé dráhy jsou co do množství naneseného vzorku vzájemně porovnatelné.

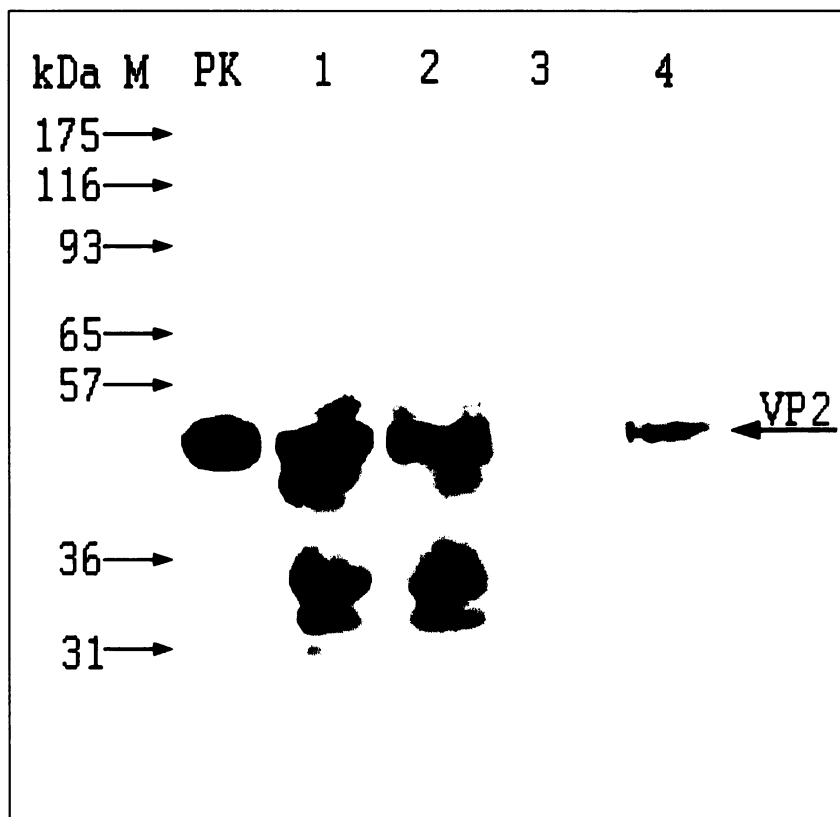
5.1.2.4 Izolace proteinu VP2 BKV fázovou separací membránových proteinů tritonem-x-114

Jelikož metoda afinitní chromatografie s použitím kolonky připravené k izolaci proteinů s histidinovou kotvou nebyla v případě izolace proteinu VP2 úspěšná, rozhodla jsem se vyzkoušet metodu fázové separace membránových proteinů tritonem-x-114 (viz 4.2.9.2). Ačkoli protein VP2 byl, podobně jako ostatní strukturální proteiny polyomavirů MPyV a SV40, označován jako jaderný protein, v naší laboratoři bylo zjištěno, že je velká část tohoto proteinu u MPyV vázána na vnitrobuněčné membrány, především na membrány ER. Z buněk Sf9 infikovaných rBac-VP2 BKV byly tedy izolovány cytoplasmatické a vnitrobuněčné membrány, které byly použity pro fázovou separaci membránových proteinů s použitím pre-kondenzovaného tritonu-x-114. Tato metoda je založena na skutečnosti, že vodný roztok neiontového detergentu tritonu-x-114 je homogenní při 0°C, ale při 20°C se rozdělí na vodnou a detergentovou fázi. Hydrofilní proteiny jsou poté nalezeny výhradně ve vodné fázi, zatímco integrální membránové proteiny jsou detekovány v detergentové fázi.

Buňky byly sklizeny 72 hpi (cca $4,8 \times 10^{10}$ buněk) a byly z nich izolovány membrány. Koncentrace proteinů obsažených v izolovaných membránách byla změřena metodou podle Bradfordové. V pokusu fázové separace tritonem-x-114 byla použita koncentrace membránových proteinů 4mg/ml. Fázovou separací měly být nejprve z membrán odstraněny fosfolipidy a poté se měly postupně oddělit hydrofilní proteiny rozpustné ve vodné fázi od membránových proteinů rozpustných v tritonu-x-114. Experiment byl vyhodnocen SDS-proteinovou elektroforézou, barvením gelu Coomassie Brilliant Blue G250 a imunologickou detekcí proteinu VP2 BKV v jednotlivých frakcích. Výsledek pokusu je znázorněn na obr. „5.1.13.a“ a „5.1.13.b“. Z obr. „5.1.13.a“ je patrné, že se metodou fázové separace tritonem-x-114 podařilo oddělit některé slabě viditelné proužky proteinů obsažených ve vodné fázi od proteinů obsažených ve fázi tritonu-x-114. Nicméně extrakce proteinu VP2 do tritonové fáze byla natolik slabá, že se nám jej podařilo detekovat až s použitím citlivější imunologické detekce, jak znázorňuje obr. „5.1.13.b“. Pro úspěšnou izolaci proteinu VP2 z membrán buněk Sf9 infikovaných bakulovirem r-Bac-VP2 BKV by bylo nutné tuto metodu optimalizovat, nicméně toto nebylo hlavním cílem mé diplomové práce, a proto jsme se optimalizací této metody prozatím nezabývali.



Obr. 5.1.13.a: Proteinová SDS elektroforéza fázové separace membránových proteinů tritonem-x-114: Elektroforeticky rozdělené proteiny byly detekovány barvením gelu pomocí Coomassie Brilliant Blue G250. V dráze „1“ je vzorek izolovaných membrán. V dráze „2“ je frakce membrán, které prošly procesem extrakce membránových proteinů tritonem-x-114. V dráze „3“ je frakce vodné fáze. V dráze „4“ je frakce detergentové fáze. Jako pozitivní kontrola (PK) byly použity VLPs obsahující kapsidové proteiny VP1 a VP2.



Obr. 5.1.13.b: Imunologická detekce proteinu VP2 BK viru po fázové separaci membránových proteinů tritonem-x-114: Western blot byl vyvolán primární králičí polyklonální protilátkou proti minoritním proteinům VP2 a VP3 viru SV40 a kozí sekundární protilátkou proti králičím imunoglobulinům konjugovanou s peroxidázou (HRP). Jako pozitivní kontrola (PK) byly použity VLPs obsahující kapsidové proteiny VP1 a VP2. V dráze „1“ je vzorek izolovaných membrán. V dráze „2“ je frakce membrán, které prošly procesem extrakce membránových proteinů tritonem-x-114. V dráze „3“ je frakce vodné fáze. V dráze „4“ je frakce detergentové fáze (signál proteinu VP2 v dráze „4“ je zesílen).

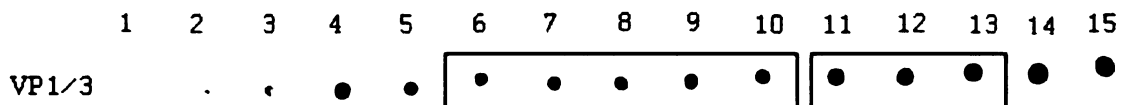
5.1.3 Izolace minoritního strukturního proteinu VP3 BK viru z VLPs složených z proteinů VP1 a VP3.

Protože ani metoda fázové separace membránových proteinů tritonem-x-114 nevedla k úspěšné izolaci dostatečného množství proteinu VP2 BKV, rozhodli jsme se pro získání antigenu pro imunizaci myši využít bakulovirus r-Bac-VP1/3 BKV simultánně produkující proteiny VP1 a VP3 BK viru. V jádrech hmyzích buněk se VP1 a VP3 skládají do VLPs (VP1/VP3 VLPs). Imunizací proteinem VP3 je možno obdržet i protilátku proti proteinu VP2, protože, jak již bylo řečeno, protein VP3 je pouze zkrácenou formou proteinu VP2 a většina imunogenních epitopů se nachází ve společné části.

Z buněk Sf9 infikovaných bakulovirem r-Bac-VP1/3 BKV byly izolovány VP1/3 VLPs (viz 4.2.8) centrifugací přes sacharózový polštář a centrifugací v CsCl gradientu. Gradient byl rozebrán na frakce, byl změřen jejich refraktometrický index a metodou imunodot-blot byl v jednotlivých frakcích detekován protein VP1 BKV (tab. „5.1.14.a“ a obr. „5.1.14.b“). Čistota izolovaných VLPs byla zkontrolována s použitím elektronové mikroskopie (obr. „5.1.15.a“) a SDS proteinové elektroforézy (obr. „5.1.15.b“). Z obr. „5.1.15.b“ je patrné, že spolu s VP1/3 VLPs (proužky VP1 a VP3), ko-purifikovaly ještě další proteiny buněčného nebo bakulovirového původu. Identita proteinů VP1 a VP3 byla zkontrolována imunologickou detekcí proteinů VP1 a VP3 na western blotu (obr. „5.1.15.c“).

1378	1375	1372	1370	1368		
					1360	1359

Obr. 5.1.14.a: Tabulka naměřených refraktometrických indexů v jednotlivých frakcích CsCl gradientu při izolaci VP1/3 VLPs. Oranžově (frakce 6-10) jsou plné VLPs, obsahující fragmenty DNA buněčného nebo bakulovirového původu, zeleně (frakce 11-13) jsou prázdné VLPs neobsahující DNA.



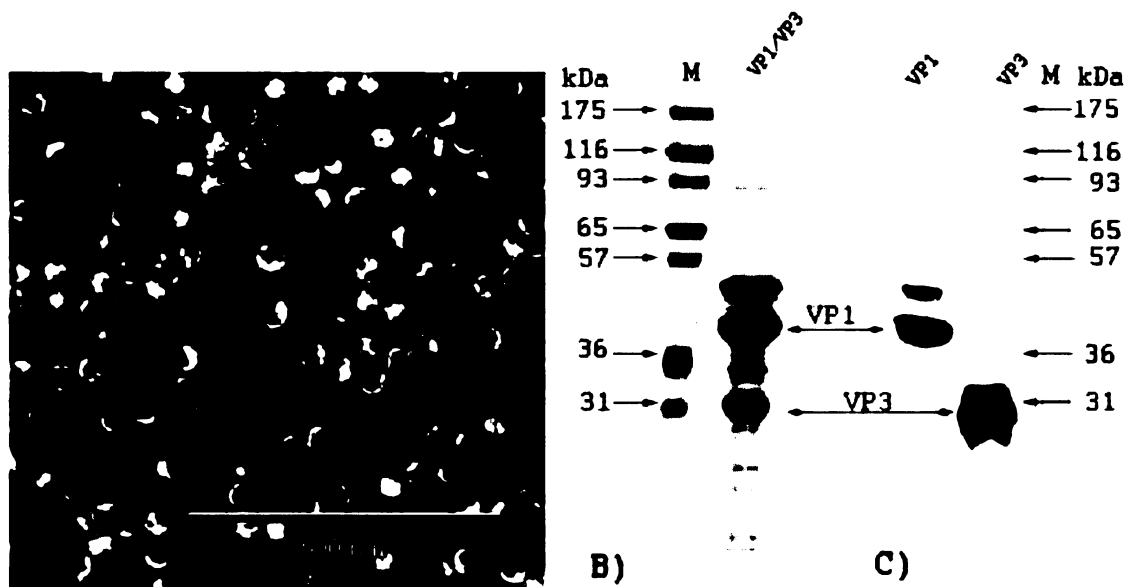
Obr. 5.1.14.b: Imunodot-blot jednotlivých frakcí CsCl gradientu při izolaci VP1/3 VLPs. Imunodot-blot byl vyvolán primární králičí polyklonální protilátkou proti proteinu VP1 BKV a kozí sekundární protilátkou proti králičím imunoglobulinům konjugovanou s peroxidázou (HRP). Frakce 6-10, odpovídající vznášivé hustotě 1,343-1,316 g/cm³, jsou plné VLPs, frakce 11-13, odpovídající vznášivé hustotě 1,310-1,294 g/cm³, jsou prázdné VLPs.

Protein VP3 byl izolován z frakce VP1/VP3 VLPs *, podle kapitoly 4.2.9.3, rozdělením proteinů VP1 a VP3 na SDS-proteinové elektroforéze a elektroelucí vyřiznutého proteinu VP3 z polyakrylamidového gelu.

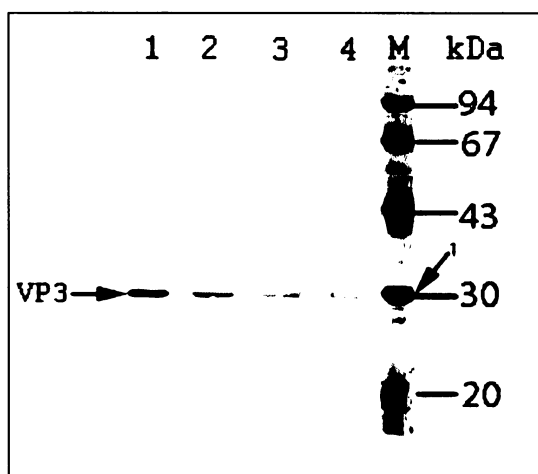
* Frakce zbylých prázdných VP1/VP3 VLPs byla smíchána s glycerolem v pufru B tak, aby výsledná koncentrace glycerolu byla 5%, a uchována při -20°C pro případné použití v dalších experimentech.

KAPITOLA 5: VÝSLEDKY

Konzentraci proteinu VP3 jsme stanovovali pouze přibližně, srovnáním s proteinem o známé koncentraci na SDS-proteinové elektroforéze s použitím transmisního skeneru a programu „*Quantiti 1*“ (obr. 5.1.16). Výtěžek proteinu VP3 byl cca 5 μg na jednu SDS-proteinovou elektroforézu, přičemž jedna imunizační dávka pro jednu myš byla 20 μg .



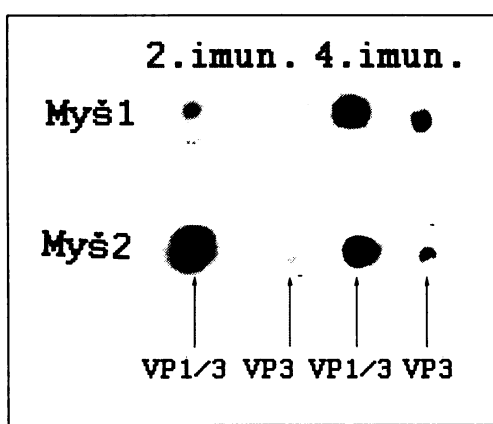
Obr. 5.1.15: Kontrola čistoty a identity izolovaných frakcí VP1/3 VLPs. Elektronová mikroskopie (negativní barvení) (A), a SDS proteinová elektroforéza (B). Elektroforeticky rozdělené proteiny byly detekovány barvením gelu pomocí Coomassie Brilliant Blue G250. Identita proteinů v izolovaných VLPs byla určena metodou imunologické detekce proteinu VP1 (dráha „VP1“) a VP3 (dráha „VP3“) na western blotu (C). Western bloty byly vyvolány primární králičí polyklonální protilátkou proti proteinu VP1 BKV a kozí sekundární protilátkou proti králičím imunoglobulinům konjugovanou s peroxidázou (HRP) v případě VP1, nebo primární polyklonální králičí protilátkou proti minoritním proteinům VP2 a VP3 viru SV40 a kozí sekundární protilátkou proti králičím imunoglobulinům konjugovanou s peroxidázou (HRP).



Obr. 5.1.16: Ukázka jednoho ze skenovaných gelů při určování koncentrace proteinu VP3. Elektroforeticky rozdělené proteiny byly detekovány barvením gelu pomocí CBB-G250. V drahách „1“ až „4“ je izolovaný protein VP3 BK viru. Šipka „1“ ukazuje na proužek proteinu o velikosti 30 kDa a známé koncentraci, s kterým bylo množství proteinu v jednotlivých vzorcích porovnáváno.

5.1.4 Imunizace myší antigenem VP3

Dvě samičky myší kmene Balb/c byly imunizovány přibližně 20 µg antigenu VP3 získaného podle kapitoly 5.1.3. Proběhly celkem 4 imunizace po 14 dnech (viz 4.2.10.1). Po druhé a poslední imunizaci byl myším odebrán vzorek krve. Z této krve bylo připraveno sérum, které bylo testováno na přítomnost protilátky proti proteinu VP3 metodou imunodot-blot (viz 4.2.10.2). Na obrázku 5.1.17 je příklad jednoho z imunodot-blotů testujícího přítomnost protilátky proti proteinu VP3 v séru myši „1“ a „2“ po druhé a po čtvrté imunizaci. Z obrázku je patrné, že obě myši začaly již po 2 imunizaci tvořit protilátky proti VP3, přičemž myš „2“ odpovídala na antigen intenzivněji než myš „1“.



Obr. 5.1.17: Testování séra na přítomnost protilátek proti antigenu VP3 BKV: Antigenem pro imunodot-blot byly denaturované VP1/3 VLPs (VP1/3) nebo antigen VP3 připravený izolací z gelu a následnou elektroelucí. Na membránu byly nakapány 3 µl antigenu. Na obrázku je ukázka reakce séra myši 1 a 2 po druhé a čtvrté imunizaci. Použité sérum bylo ředěno celkem 2100 x. Jako sekundární protilátka byly použity kozí protilátky proti myším imunoglobulinům konjugované s peroxidázou (HRP).

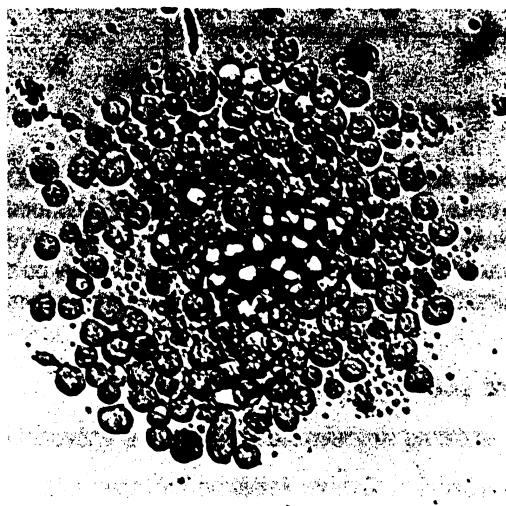
5.1.5 Selektce monoklonálních protilátek

Tři dny po poslední imunizaci byla myším odebrána slezina a byla provedena fúze slezinných buněk s připravenými myeloidními buňkami (viz 4.2.10.5). Pro fúzi byly použity slezinné buňky z myši „2“, která lépe odpovídala na antigen, přičemž slezinné buňky z myši „1“ byly použity na přípravu konzervy a uchovány v tekutém dusíku pro možnou potřebu opakování fúze. Tři dny po fúzi byl do kultivačního média HAT přidán genocidin G418 v koncentraci 400 µg/ml, jako prevence proti mykoplasmě (viz 4.2.10.6). Po třech dnech bylo médium vyměněno, aby se odstranil G418. Od sedmého dne po fúzi byl opticky pod mikroskopem hodnocen nárůst kolonií hybridomových buněk v jednotlivých jamkách. Výsledek byl zapisován do schematické mřížky, kde každé jamce odpovídalo jedno políčko (obr. 5.1.18). Médium HAT bylo v jamkách pravidelně odebíráno a hybridomy byly pasážovány (viz 4.2.10.7). Odebrané médium bylo testováno na přítomnost protilátky proti antigenu VP2/3 metodou imunodot-blot. Vybrané hybridomy reagující pozitivně s antigenem VP3 byly klonovány (viz 4.2.10.8) a testovány na přítomnost protilátky proti antigenu VP3, rovněž metodou imunodot-blot. Na obrázku 5.1.19 je fotografie jedné z hybridomových kolonií klonů hybridomů z jamky I1C7.

KAPITOLA 5: VÝSLEDKY

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	/	/	/	/	/	/	/	/		/	/	/
B	/	/		/	/	/		/		/	/	
C	/	/	/	/	/	/	2	/	/	/		
D		/	/		/	/	/	/	/	/	/	
E	/	/		/	/	/	/	/	/	/	/	/
F	/	/	/	/	/	/	/	/	/		/	
G		/	/		/	/	/			/	/	/
H	/		/	/	/	/	/	/	/	/	/	/

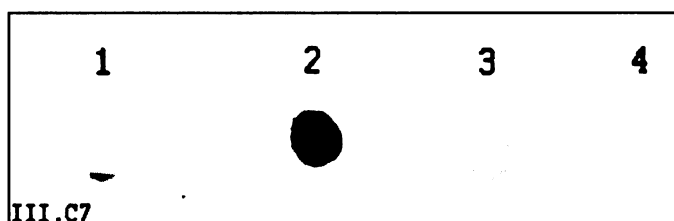
Obr. 5.1.18: Příklad záznamu nárůstu kolonií hybridomů v jednotlivých jamkách III. mikrotitrační destičky provedený osmý den po fúzi. Číslo značí počet kolonií jednotlivých hybridomů v jamce 96-jamkové mikrotitrační destičky. Symbolem „/“ jsou označeny jamky, v kterých nebyl nárůst kolonie zaznamenán. Červenou barvou jsou označeny jamky, kde kolonie pokrývaly téměř celou plochu jamky, zeleně jsou označeny jamky se středně velkými koloniemi a modře jamky s malými koloniemi čítajícími do 15 buněk na kolonii.



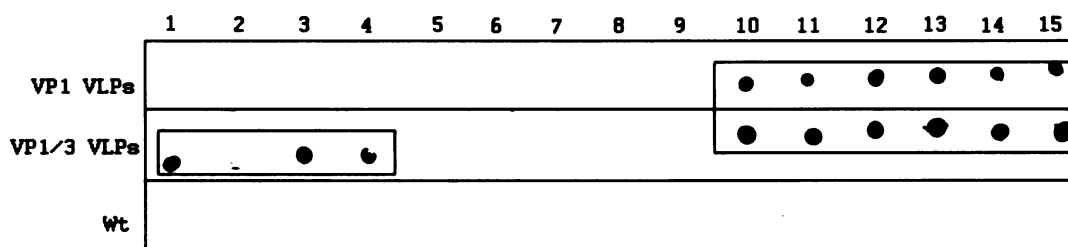
5.1.19: Ukázka jedné z hybridomových kolonií klonu hybridomů z jamky „III C7“.

Na obrázku „5.1.20.a“ a „5.1.20.b“ je ukázka testování protilátek produkovaných hybridomem v jamce C7 třetí mikrotitrační destičky (III C7). Z obrázku „5.1.20.a“ je patrné, že protilátky produkované hybridomem v jamce III C7 interagovaly nejen s proteinem VP2 (3), ale i s proteinem VP1 (2). Po klonování protilátky produkované jednotlivými klony reagovaly buď s proteinem VP3, nebo s proteinem VP1, jak ukazuje obrázek „5.1.20.b“. Antigenem pro tento experiment byly VP1 VLPs a VP1/3 VLPs. Protilátky produkované klony 1 až 4 reagovaly pouze s antigenem VP1/3 a nikoliv s antigenem VP1, což svědčí o přítomnosti protilátek proti proteinu VP3. Protilátky produkované klony 10 až 15 interagovaly jak s antigenem VP1/3, tak s antigenem VP1, což svědčí o přítomnosti protilátek proti proteinu VP1. Žádný z klonů nereagoval s lysátem hmyzích buněk infikovaných divokým bakulovirem.

KAPITOLA 5: VÝSLEDKY

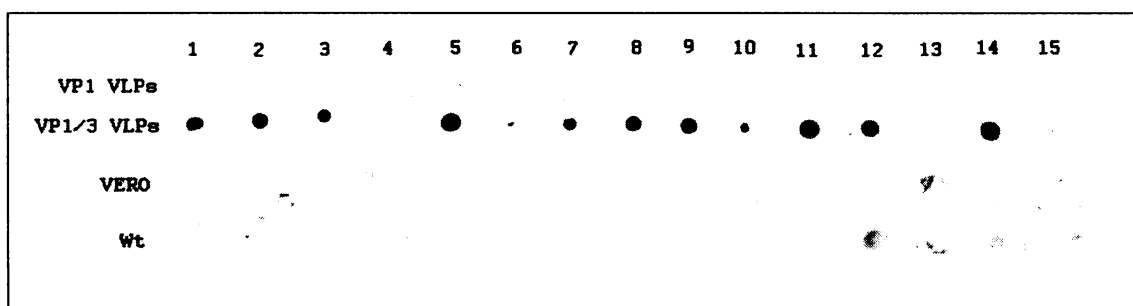


Obr. 5.1.20.a: Testování protilátky produkované hybridomy v jamce IIC7 metodou imunodot-blot. Jako antigen byly použity denaturované VP1/3 VLPs („1“), denaturované VP1 VLPs („2“), lyzát hmyzích buněk infikovaných bakulovirem r-Bac-VP2 BKV produkujícím protein VP2 BK viru („3“), lyzát hmyzích buněk infikovaných divokým bakulovirem („4“). Jako primární protilátka bylo použito médium odebrané z jamky C7 třetí mikrotitrační destičky (IIC7). Jako sekundární protilátka byly použity kozi protilátky proti myším imunoglobulinům konjugované s peroxidázou (HRP).

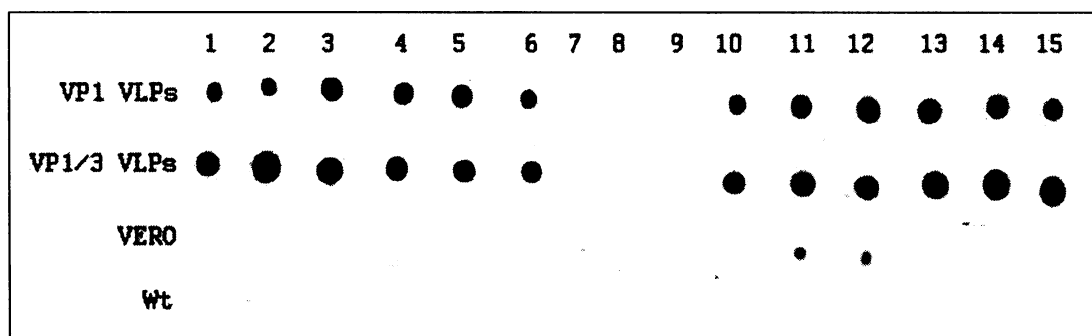


Obr. 5.1.20.b: Ukázka testování protilátek produkovaných klonů 1 až 15 hybridomů z jamky IIC7 metodou imunodot-blot. Jako antigen byly použity denaturované VP1 VLPs a denaturované VP1/3 VLPs. Jako negativní kontrola byly použity hmyzí buňky infikované divokým bakulovirem (Wt). Jako primární protilátka bylo použito médium odebrané z od jednotlivých klonů „1“ až „15“ hybridomů v jamce IIC7. Jako sekundární protilátka byly použity kozi protilátky proti myším imunoglobulinům konjugované s peroxidázou (HRP).

Získané klonů produkující protilátky proti VP3 a klonů produkující protilátky proti VP1 byly dvakrát re-klonovány a identita produkovaných protilátek byla testována metodou imunodot-blot. Na obrázku 5.1.21 je ukázka testování protilátek dvakrát re-klonovaného hybridomu „3“ z obr. 5.1.20.b. Pozitivním antigenem pro tento experiment byly VP1/3 VLPs. Jako negativní kontrola byly použity VP1 VLPs, lyzát hmyzích buněk infikovaných divokým bakulovirem (Wt) a lyzát neinfikovaných opičích fibroblastů „VERO“. Z obrázku je patrné, že získané re-klonované hybridomy reagovaly specificky pouze s proteinem VP3 z VP1/3 VLPs, nikoliv s použitými negativními kontrolami. Jen u re-klonovaných hybridomů 12, 14 a 15 je znatelná mírná, spíše nespecifická interakce s lyzátem hmyzích buněk infikovaných divokým bakulovirem. Na obrázku 5.1.22 je ukázka testování protilátek dvakrát re-klonovaného klonu „10“ z obr. 5.1.20.b. Pozitivním antigenem pro tento experiment byly VP1 VLPs a VP1/3 VLPs. Jako negativní kontrola byl použit lyzát hmyzích buněk infikovaných divokým bakulovirem (Wt) a lyzát z neinfikovaných opičích fibroblastů „VERO“. Z obrázku je patrné, že získané re-klonované hybridomy reagovaly specificky pouze s proteinem VP1 z VP1 VLPs a z VP1/3 VLPs, nikoliv s použitými negativními kontrolami. Pouze re-klonované hybridomy 11 a 12 vykazovaly slabou reakci s antigenem vyskytujícím se v lyzáte neinfikovaných opičích fibroblastů VERO.



Obr. 5.1.21: Ukázka testování protilátek produkovaných re-klonovaných hybridomů 1 až 15 klonu z původního klonu „3“ metodou imunodot-blot. Jako pozitivní antigen byly použity denaturované VP1/3 VLPs. Jako negativní kontrola byly použity denaturované VP1 VLPs, lyzát hmyzích buněk infikovaných divokým bakulovirem (Wt) a lyzát neinfikovaných opičích fibroblastů VERO. Jako primární protilátka bylo použito médium odebrané od jednotlivých re-klonovaných hybridomů 1 až 15. Jako sekundární protilátka byly použity kozi protilátky proti myším imunoglobulinům konjugované s peroxidázou (HRP).



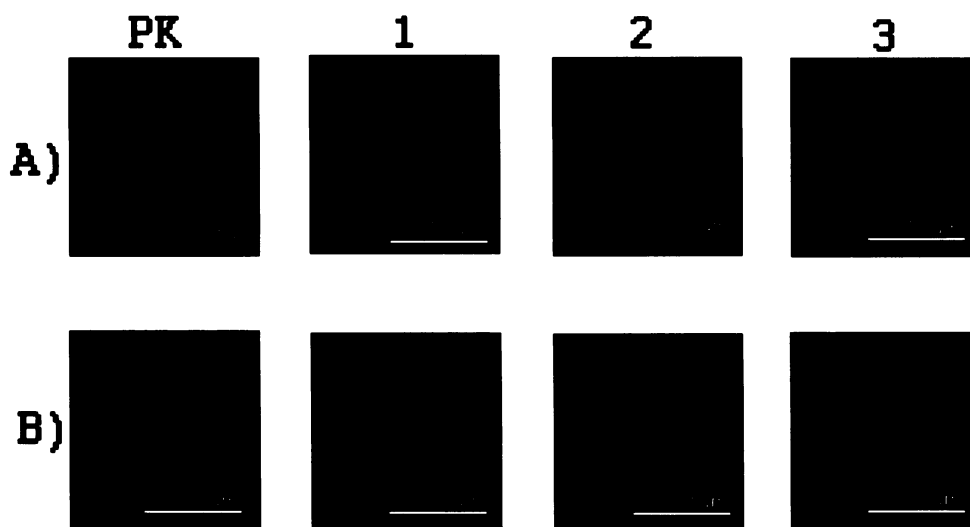
Obr. 5.1.22: Ukázka testování protilátek produkovaných re-klonovaných hybridomů 1 až 15 z původního klonu „10“ metodou imunodot-blot. Jako pozitivní antigen byly použity denaturované VP1 VLPs a denaturované VP1/3 VLPs. Jako negativní kontrola byl použit lyzát hmyzích buněk infikovaných divokým bakulovirem (Wt) a lyzát neinfikovaných opičích fibroblastů VERO. Jako primární protilátka bylo použito médium odebrané z jednotlivých re-klonovaných hybridomů 1 až 15. Jako sekundární protilátka byly použity kozi protilátky proti myším imunoglobulinům konjugované s peroxidázou (HRP).

Pro další testy byly použity re-klonované hybridomy 1, 2 a 3 z obrázku 5.1.21 pro selekci myší monoklonální protilátky proti antigenu VP2/3 a re-klonované hybridomy 1, 2 a 3 z obrázku 5.1.22 pro selekci myší monoklonální protilátky proti antigenu VP1.

5.1.5.1 Testování myších monoklonálních protilátek proti minoritním kapsidovým proteinům VP2 a VP3 BK viru.

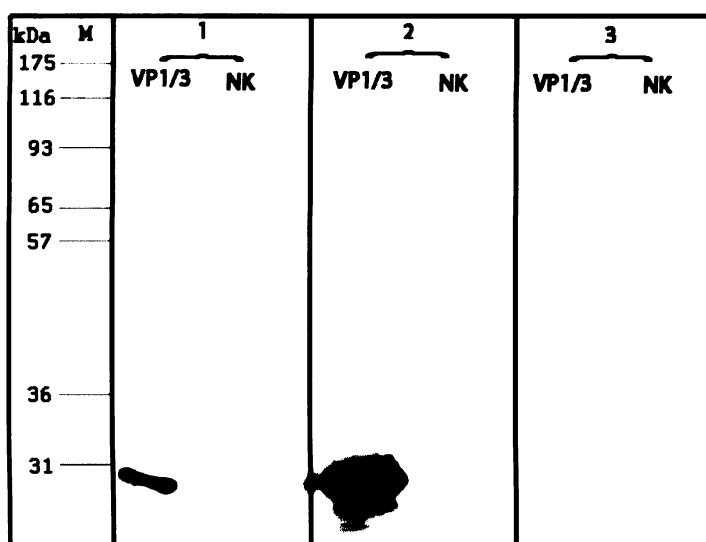
Protilátky produkované jednotlivými re-klonovanými hybridomy byly dále testovány metodou nepřímé imunofluorescence a metodou western-blot. Na obrázku 5.1.23 je nepřímé imunofluorescenční značení proteinu VP2 v hmyzích buňkách infikovaných bakulovirem r-Bac-VP2 BKV produkujícím protein VP2 BK viru. Jako negativní kontrola byly použity hmyzí buňky infikované divokým bakulovirem. Jako primární protilátka bylo použito médium odebrané od re-klonovaných hybridomů 1, 2 a 3 z obr. 5.1.21. Pro pozitivní kontrolu byla použita ověřená králičí polyklonální protilátka proti proteinům VP2 a VP3 viru SV40. Z obrázku je

patrné, že protilátky produkované jednotlivými re-klonovanými hybridomy 1, 2 a 3 reagovaly, stejně jako kontrolní protilátka, specificky s proteinem VP2.



Obr. 5.1.23: Testování protilátek produkovaných re-klonovanými hybridomy 1, 2 a 3-nepřímá imunofluorescence proteinu VP2 v hmyzích buňkách infikovaných rekombinantním bakulovirem rBac-VP2 BKV. A) Hmyzí buňky infikované rekombinantním bakulovirem rBac-VP2 BKV. B) hmyzí buňky infikované divokým bakulovirem. Jako primární protilátka bylo použito médium odebrané od re-klonovaných hybridomů „1“, „2“ a „3“. Jako sekundární protilátka byly použity oslí protilátky proti myším imunoglobulinům značené AF488. Pro pozitivní kontrolu (PK) byla použita ověřená králičí polyklonální protilátka proti proteinům VP2 a VP3 viru SV40 a kozí sekundární protilátka proti králičím imunoglobulinům značená AF546. Měřítka značí 10 μ m.

Na obrázku 5.1.24 je western blot lyzátu z VP1/3 VLPs. Jako negativní kontrola byl použit lyzát hmyzích buněk infikovaný divokým bakulovirem. Jako primární protilátka bylo použito médium odebrané od re-klonovaných hybridomů 1, 2 a 3 z obr 5.1.21. Z obrázku je patrné, že protilátky produkované re-klonovanými hybridomy „1“ a „2“ interagovaly s proteinem o elektromobilitě, která odpovídala elektromobilitě proteinu VP3 BK viru. Protilátka produkovaná re-klonem „3“ neinteragovala ani s VP1/3 VLPs ani s hmyzími buňkami infikovanými divokým bakulovirem.



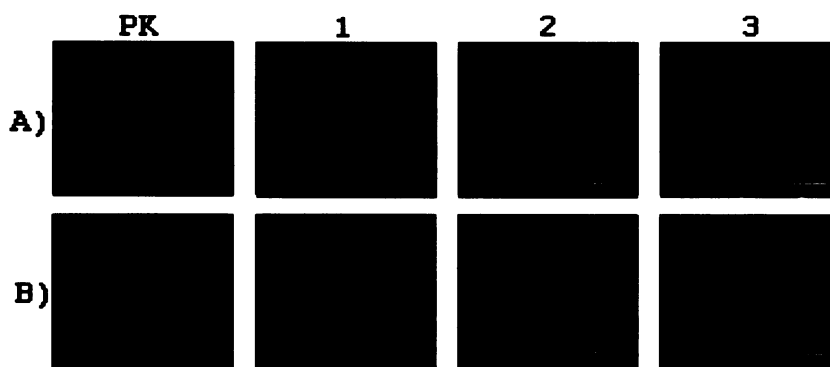
Obr. 5.1.24: Testování protilátek produkovaných re-klonovanými hybridomy 1, 2 a 3-western blot proteinu VP3 z lyzátu VP1/3 VLPs. Jako primární protilátka bylo použito médium odebrané od re-klonovaných hybridomů „1“, „2“ a „3“. Jako sekundární protilátka byly použity kozí protilátky proti myším imunoglobulinům konjugované s HRP. Jako negativní kontrola byl použit lyzát hmyzích buněk infikovaných divokým bakulovirem (NK). M=pozice markeru molekulových hmotností.

hybridomy produkující protilátku proti proteinům VP3 BK viru. Nicméně vybrané klony byly nestabilní a při dalším pasážování ztratily schopnost produkce protilátek. Z toho důvodu byly provedeny jen ukázané 2 testy získaných protilátek. Pro selekci nových stabilních hybridomů produkujících protilátky proti proteinům VP2 a VP3 BK viru budou použity konzervy neklonovaných hybridomů uchované v tekutém dusíku, popřípadě bude provedena nová fúze slezinných buněk myši č. 1

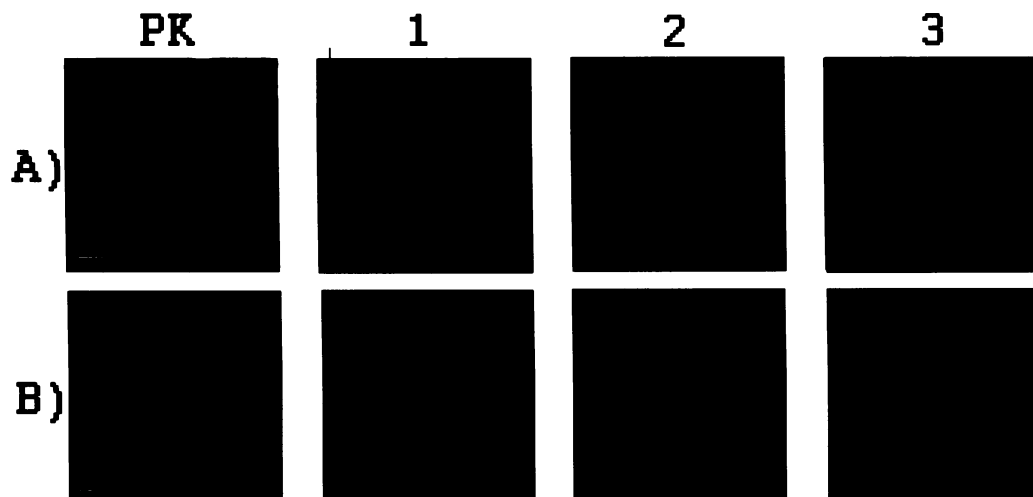
5.1.5.2 Testování myších monoklonálních protilátek proti hlavnímu kapsidovému proteinu VP1 BK viru

Protilátky proti VP1 produkované re-klonovanými hybridomy „1“ až „3“ (obr. 5.1.22) byly dále testovány metodou nepřímé imunofluorescence a metodou western-blot. Na obrázku 5.1.25 je nepřímé imunofluorescenční značení proteinu VP1 v hmyzích buňkách infikovaných rekombinantním bakulovirem produkujícím protein VP1 BK viru (viz 4.2.3.1.2). Buňky byly fixovány vychlazeným metanol/acetonem (1:1) 72 hpi (viz 4.2.4.1.a.). Jako negativní kontrola byly použity hmyzí buňky infikované divokým bakulovirem. Pro pozitivní kontrolu byla použita ověřená králičí polyklonální protilátka proti proteinu VP1 BK viru. Z obrázku je patrné, že protilátky produkované jednotlivými re-klonovanými hybridomy 1, 2 a 3 reagovaly, stejně jako kontrolní protilátka, specificky s proteinem VP1.

Protilátky produkované re-klonovanými hybridomy 1, 2 a 3 byly dále testovány podobně na opičích fibroblastech VERO infikovaných virem BKV (viz 4.2.3.2.3) s M.O.I. =10. (obr. 5.1.26). Negativní kontrolou byly neinfikované opičí fibroblasty VERO. Buňky byly fixovány 5 minut vychlazeným metanol-acetonem (1:1) 60 hpi. Z obrázku je patrné, že protilátky produkované danými re-klonovanými hybridomy interagují specificky s proteinem VP1 BK viru. Nicméně lokalizace VP1 detekovaného monoklonálními protilátkami byla v mnoha případech nejen jaderná, ale i cytoplazmatická.

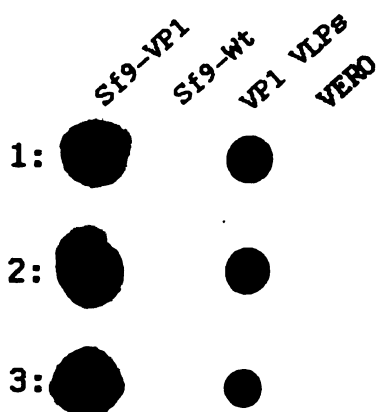


Obr. 5.1.25: Testování protilátek produkovaných hybridovými klony 1, 2, 3 - nepřímá imunofluorescence. A) Hmyzí buňky infikované rekombinantním bakulovirem produkujícím protein VP1 BK viru. B): hmyzí buňky infikované divokým bakulovirem. Jako primární protilátka bylo použito médium odebrané od re-klonovaných hybridomů „1“, „2“ a „3“. Jako sekundární protilátka byly použity oslí protilátky proti myším imunoglobulinům značené AF488. Pro pozitivní kontrolu (PK) byla použita ověřená králičí polyklonální protilátka proti proteinu VP1 BK viru a jako sekundární protilátka byly použity kuřecí protilátky proti králičím imunoglobulinům značené AF488.



Obr. 5.1.26: Testování protilátek produkovaných hybridovými klony 1, 2, 3 - nepřímá imunofluorescence. A) Buňky VERO infikované BK virem (60hpi). B) Neinfikované buňky VERO. Jako primární protilátka bylo použito médium odebrané od re-klonovaných hybridomů „1“, „2“ a „3“. Jako sekundární protilátka byly použity oslí protilátky proti myším imunoglobulinům značené AF488. Pro pozitivní kontrolu (PK) byla použita ověřená králičí polyklonální protilátka proti proteinu VP1 BK viru a jako sekundární protilátka byly použity kuřecí protilátky proti králičím imunoglobulinům značené AF488.

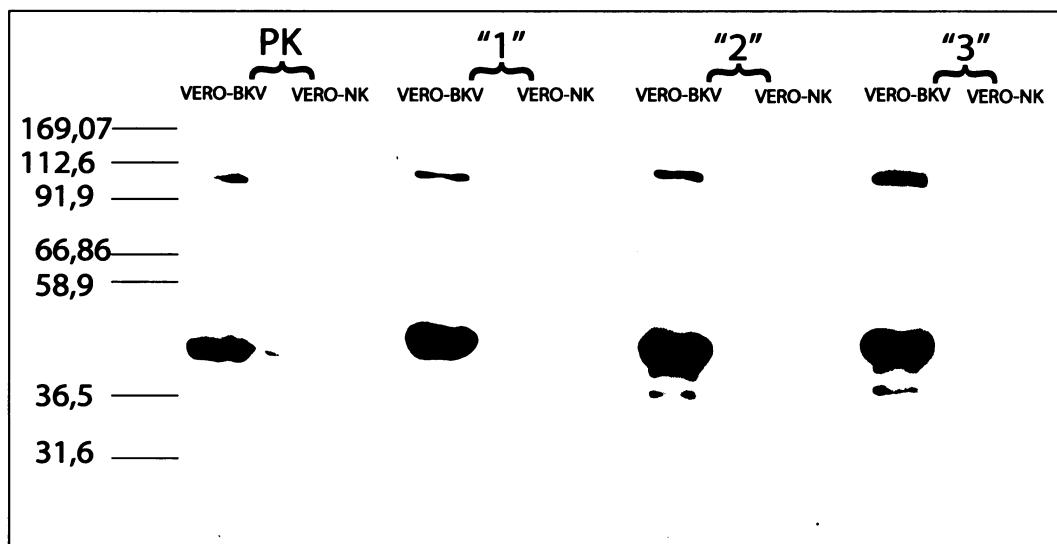
Protilátky byly dále testovány metodou imunodot-blot pro kontrolu produkce protilátek po zmražení hybridomů a jejich uchování v tekutém dusíku po dobu 14 dnů a dále metodou western blot. Antigenem pro imunodot-blot byl lyzát hmyzích buněk infikovaných bakulovirem r-Bac-VP1 BKV produkujícím protein VP1 BK viru a lyzát VP1 BKV VLPs. Negativními kontrolami byl lyzát hmyzích buněk Sf9 infikovaných divokým bakulovirem a lyzát z neinfikovaných opičích fibroblastů VERO. Výsledek imunodot-blotu je na obrázku 5.1.27. Z obrázku je patrné, že všechny testované protilátky interagovaly specificky s antigenem VP1, nikoliv s negativními kontrolami.



Obr. 5.1.27: Výsledek testování protilátek produkovaných hybridomů 1, 2 a 3 metodou imunodot-blot po uchování hybridomů 14 dní v tekutém dusíku. Antigenem byl lyzát hmyzích buněk infikovaných bakulovirem r-Bac-VP1 BKV produkujícím protein VP1 BK viru (Sf9-VP1) a lyzát VP1 BKV VLPs (VP1 VLPs). Negativními kontrolami byl lyzát hmyzích buněk Sf9 infikovaných divokým bakulovirem (Sf9-Wt) a lyzát z neinfikovaných opičích fibroblastů VERO (VERO). Jako primární protilátka bylo vždy použito médium odebrané od re-klonovaných hybridomů 1, 2 a 3 z obr 5.1.20 (uchovaných 14 dní v tekutém dusíku). Jako sekundární protilátka byly použity kozí protilátky proti myším imunoglobulinům konjugované s HRP.

Na obrázku 5.1.28 jsou výsledky testování metodou western blot s použitím lyzátu VERO buněk infikovaných BKV a neinfikovaných. Z obrázku je patrné, že protilátky produkované hybridomů 1, 2 a 3

interagovaly, stejně tak jako protilátka použitá pro pozitivní kontrolu, s proteinem VP1 v buňkách VERO infikovaných BK virem. Na western blotu se u všech použitých protilátek, včetně kontrolní polyklonální protilátky proti VP1 BKV, objevil ještě proužek o velikosti přibližně 105-110 kDa. Je zřejmé, že se jedná o protein virového původu, protože v neinfikovaných buňkách VERO nebyl nalezen.



Obr. 5.1.28: Western blot testování protilátek produkovaných hybridomou 1, 2 a 3 na lyzátu buněk VERO infikovaných BK virem. Antigenem byl lyzát buněk VERO infikovaných BK virem (VERO-BKV). Jako negativní kontrola byly použity neinfikované buňky VERO (VERO-NK). Primární protilátkou bylo médium odebrané z re-klonovaných hybridomů „1“, „2“ a „3“ z obr 5. 1. 20. Jako sekundární protilátka byly použity kozí protilátky proti myším imunoglobulinům konjugované s HRP. Jako ověřená protilátka pro pozitivní kontrolu byla použita králičí polyklonální protilátka proti proteinu VP1 BK viru a jako sekundární protilátka byly použity kozí protilátky proti králičím imunoglobulinům konjugované s HRP.

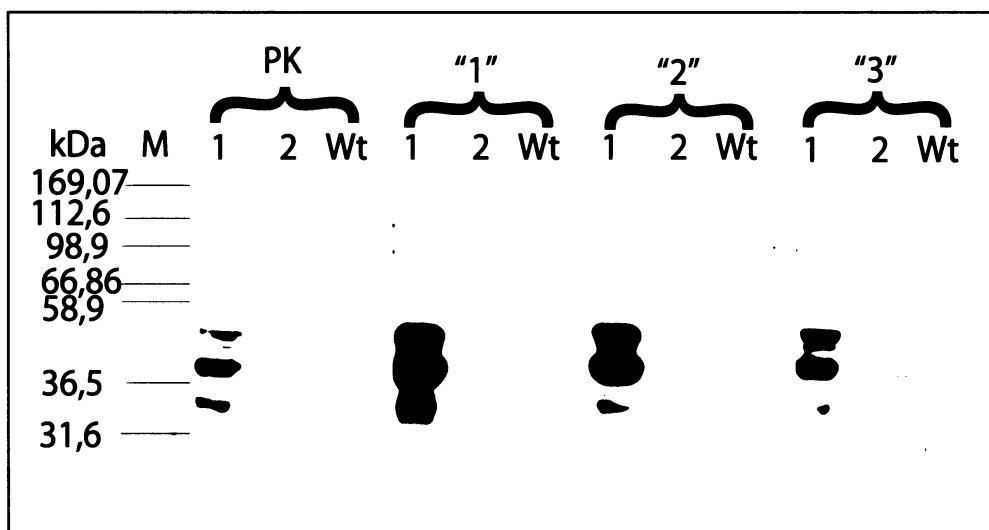
Na obrázku 5.1.29 je western blot, kde antigenem byly VP1 VLPs a VP1/3 VLPs BK viru. Z obrázku je patrné, že protilátky 1, 2 a 3, stejně tak jako protilátka použitá pro pozitivní kontrolu interagovaly s proteinem VP1 (40 kDa) a nikoliv s proteinem VP3 (26 kDa). Mimo to všechny protilátky interagovaly ještě s proteinem o 10-15 kDa větším než samotný protein VP1.

Antigenem pro další western blot (obr. 5.1.30) byl lyzát hmyzích buněk infikovaných bakulovirem r-Bac-VP1 BKV. Negativní kontrolou byl lyzát hmyzích buněk infikovaných divokým typem bakuloviru a lyzát buněk infikovaných bakulovirem r-Bac-VP2 BKV. Protilátky 1, 2 a 3, stejně tak jako protilátka použitá pro pozitivní kontrolu interagovaly s proteinem VP1 (40 kDa) v lyzátu buněk infikovaných bakulovirem r-Bac-VP1 BKV a nikoliv s lyzátem buněk infikovaných bakulovirem r-Bac-VP2 BKV nebo divokým bakulovirem. Mimo to všechny protilátky interagovaly ještě s proteinem o 10-15 kDa větším než protein VP1.

Ze všech těchto testů vyplývá, že byly získány stabilní hybridomy produkující monoklonální protilátku proti proteinu VP1 BKV, která interaguje jak s denaturovaným, tak s nativním VP1, a je použitelná jak pro western blot, tak pro metody nepřímé imunofluorescence buněk.



Obr. 5.1.29: Western blot testování protilátek produkovaných hybridomy 1, 2 a 3 na lyzátu VP1 a VP1/3 BKV VLPs. Antigenem byl lyzát VP1 (1) a VP1/3 (1/3) VLPs. Primární protilátkou bylo médium odebrané od re-klonovaných hybridomů „1“, „2“ a „3“ z obr 5.20. Jako sekundární protilátka byly použity koží protilátky proti myším imunoglobulinům konjugované s HRP. Jako ověřená protilátka pro pozitivní kontrolu byla použita králičí polyklonální protilátka proti proteinu VP1 BK viru a jako sekundární protilátka byly použity koží protilátky proti králičím imunoglobulinům konjugované s HRP.



Obr. 5.1.30: Western blot testování protilátek produkovaných hybridomy 1, 2 a 3 na lyzátu hmyzích buněk infikovaných bakulovirem r-Bac-VP1 BKV. Antigenem byl lyzát hmyzích buněk infikovaných bakulovirem r-Bac-VP1 BKV (1). Negativní kontrolou byl lyzát buněk infikovaných bakulovirem r-Bac-VP2 BKV (2) a lyzát hmyzích buněk infikovaných divokým typem bakuloviru (Wt). Primární protilátkou bylo médium odebrané od re-klonovaných hybridomů „1“, „2“ a „3“ z obr 5.20 Jako sekundární protilátka byly použity koží protilátky proti myším imunoglobulinům konjugované s HRP. Ověřená protilátka, jako pozitivní kontrola, byla králičí polyklonální protilátka proti proteinu VP1 BK viru a jako sekundární protilátka byly použity koží protilátky proti králičím imunoglobulinům konjugované s HRP.

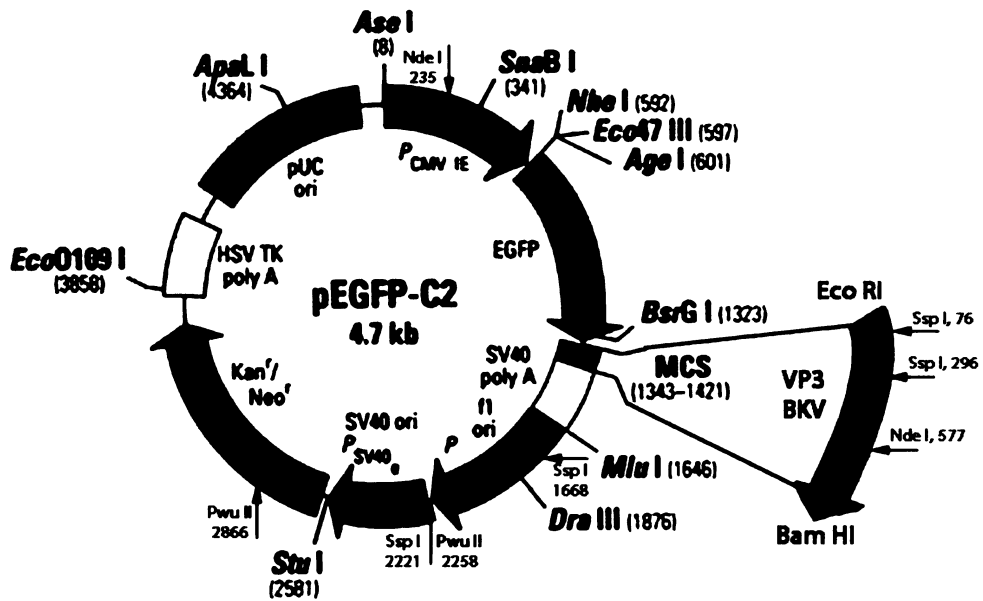
5.2 Příprava expresních vektorů produkujících s EGFP fúzovaný minoritní protein BK viru VP3 v savčích buňkách

V infikovaných buňkách přicházejí, alespoň v počátku infekce, do jader minoritní proteiny polyomavirů v komplexu s pentamery hlavního strukturálního proteinu VP1. Abychom mohli začít studovat vlastnosti a funkce minoritního proteinu VP3, bylo nutné připravit některé konstrukty pro individuální produkci tohoto proteinu v savčích buňkách. Já jsem se ujala přípravy dvou expresních vektorů pro produkci minoritního proteinu VP3 BK viru fúzaného s EGFP. Abychom snížili možnost ovlivnění přirozených vlastností proteinu VP3 fúzí se zeleným fluorescenčním proteinem, byly připraveny dva konstrukty, z nichž první měl EGFP fúzované na N konci VP3 (EGFP-VP3) a druhý na C konci VP3 (VP3-EGFP). Díky fúzi proteinu VP3 s EGFP bude možné pozorovat interakce proteinu VP3 s buněčnými strukturami nejen na fixovaných, ale i na živých buňkách. Další výhodou je možnost imunoprecipitace proteinových komplexů interagujících s VP3 pomocí primární protilátky proti EGFP dříve, než budou připraveny protilátky proti VP3, nebo v případě, že by epitopy protilátky proti VP3 interferovaly s místem interakce.

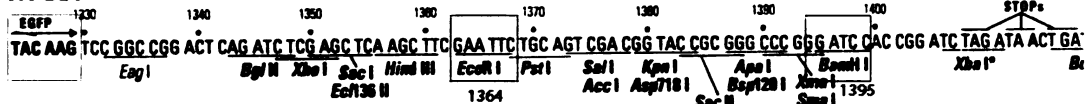
5.2.1 Konstrukce expresního vektoru pro produkci fúzního proteinu EGFP-VP3, kde je EGFP fúzován k N konci VP3

Na obrázku 5.2.1 je navrženo schéma konstrukce expresního vektoru pro produkci fúzního proteinu EGFP-VP3 v savčích buňkách. Konstrukce byla provedena s použitím donorového plazmidu pEGFP-C2, nesoucího gen pro EGFP před polylinkerem s restrikčními místy (MCS-multiple cloning site).

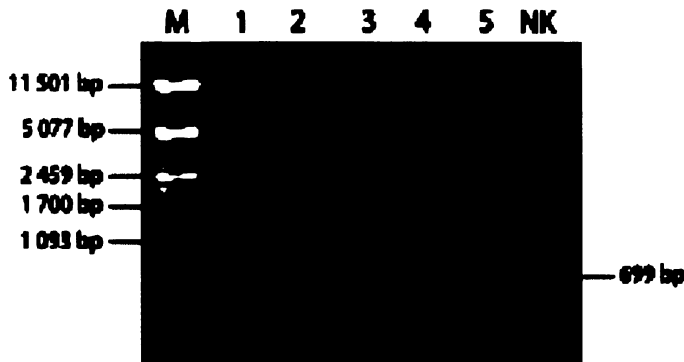
Nejprve jsem PCR amplifikací, pomocí primerů EGFP-C2-VP3-Eco RI a pSVL-VP2-B, zavádějících restrikční místa pro restrikční endonukleázy *Eco RI* a *Bam HI*, připravila gen pro protein VP3. Jako templát byl použit plazmid p734a nesoucí genom BK viru. Teplota hybridizace primerů (60°C) byla stanovena stejně jako při konstrukci pFastBac HT A-VP2. Výsledek PCR amplifikace je znázorněn na obrázku 5.2.2. Amplifikovaný gen (VP3) byl poté přečištěn pomocí soupravy "NucleoSpin Extract II" (*Macherey Nagel*) a štěpen restrikčními endonukleázami *Eco RI* a *Bam HI*, aby byly vytvořeny kohezní konce, umožňující snazší ligaci. Štěpený fragment VP3 byl izolován z agarózového gelu pomocí soupravy „NucleoSpin Extract II“ (*Macherey Nagel*). Restrikční štěpení fragmentu bylo ověřeno ligačním testem (neukázáno). Plazmidový vektor pEGFP-C2 byl nejprve izolován z bakteriální kultury alkalickou maxipreparací a jeho identita ověřena štěpením restrikčními endonukleázami: *Bam HI* a *Eco RI*, které plazmid linearizovaly, dále enzymem *Ssp I*, který DNA štěpil na dvě části o velikosti cca 4185 bp a 553 bp a konečně kombinací enzymů *Pvu II* a *Bam HI*. Výsledkem posledního štěpení byly tři proužky o velikosti cca 608 bp, 894 bp a 3198 bp. Na obrázku 5.2.3A je zobrazen izolovaný nelinearizovaný vektor pEGFP-C2 a na obrázku 5.2.3. B je elektroforéza restrikčního ověření donorového plazmidu pEGFP-C2. Všechny použité restrikční endonukleázy štěpily vektor podle očekávání.



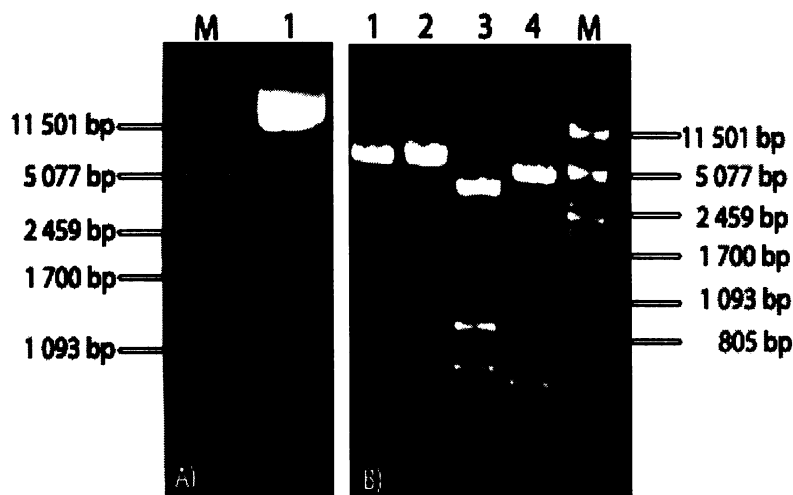
MCS:



Obr. 5.2.1: Schéma konstrukce expresního vektoru pEGFP-C2-VP3. Popis expresního vektoru pEGFP-C2: P_{CMV IE} = bezprostředně časný promotor HCMV, EGFP = gen pro EGFP, MCS = polylinker-„multiple cloning site“, SV40 polyA = polyadenylační signál časné mRNA SV40, f1 ori = f1 počátek replikace „single strand“ DNA, P = bakteriální promotor genu pro rezistenci na Kanamycin (Kan^r), SV40 ori = počátek replikace SV40, P_{SV40} = časný promotor SV40, Kan^r/Neo^r = gen pro rezistenci ke kanamycinu a neomycinu, HSV TK poly A = polyadenylační signál genu pro thymidin kinázu (TK) viru Herpes simplex (HSV), pUC ori = počátek replikace plazmidu. Gen pro protein VP3 byl do vektoru pEGFP-C2 vnášen za restrikční místa pro *Eco RI* (1364 bp) a *Bam HI* (1395 bp), které jsou součástí MCS. Při ověřování expresního vektoru pEGFP-C2 a vytvořeného expresního vektoru pEGFP-C2-VP3 byly použity ještě tyto restrikční endonukleázy: *Ssp I* (štěpící DNA donorového plazmidu v místech 1668 bp a 2221 bp a gen pro protein VP3 v místech 76 bp a 296 bp), *Pvu II* (štěpící DNA donorového plazmidu v místech 2258 bp a 2866 bp) a enzym *Nde I* (štěpící DNA donorového plazmidu v místě 235 bp a gen pro protein VP3 v místě 577 bp).

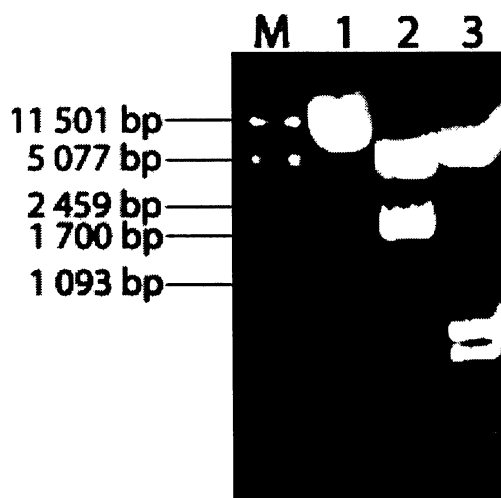


Obr. 5.2.2: Výsledek PCR amplifikace genu pro protein VP3 BK viru. V drahách „1“ až „5“ je amplifikovaný fragment o velikosti genu pro protein VP3 (699 bp). Templátem byla DNA plazmidu p734a nesoucí genom BKV. Negativní kontrolou byla reakční směs bez templátové DNA. Pro reakci byly použity primery EGFP-C2-VP3-Eco RI a pSVL-VP2-B zavádějící restrikční místa pro restrikční endonukleázy *Eco RI* a *Bam HI*.



Obr. 5.2.3: Elektroforéza restrikčního ověření donorového plazmidu pEGFP-C2. A) V dráze „1“ je nelinearizovaný plazmid B) V dráze „1“ je plazmid linearizovaný pomocí *Bam HI*, v dráze „2“ je plazmid linearizovaný pomocí *Eco RI*, v dráze „3“ je štěpení enzymy *Pvu II* a *Bam HI* a v dráze „4“ je štěpení enzymem *Ssp I*.

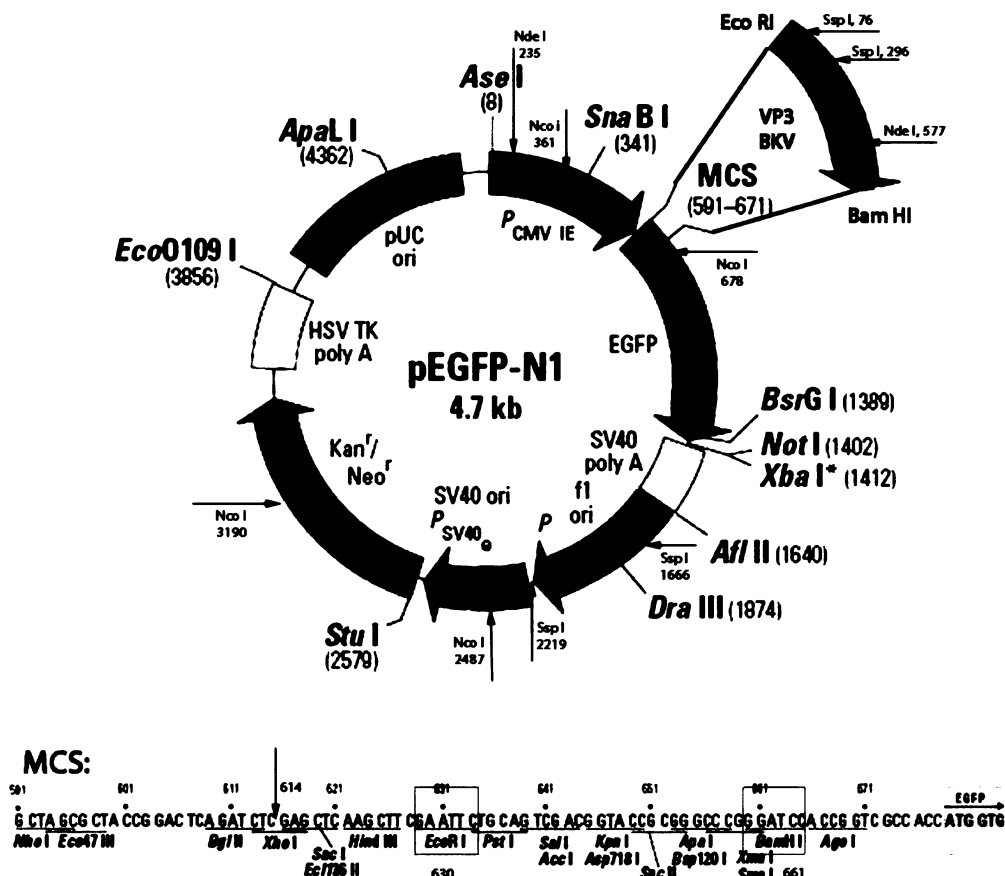
Ověřený vektor byl štěpen pomocí restrikčních endonukleáz *Eco RI* a *Bam HI* a byla připravena ligační směs obsahující plazmidovou DNA a fragment VP3 v poměru 1:6. Ligace probíhala při laboratorní teplotě přes noc s použitím T4 ligázy. Ligační směs byla použita pro transformaci kompetentních buněk *E. coli* DH5 α metodou elektroporace. Po elektroporaci byly bakterie třepány 1 hodinu při 37°C a poté vysety v různých ředěních na pevné médium s kanamycinem a inkubovány 12-16 hodin staticky při 37°C. Z narostlé kolonie byly minipreparací izolovány plazmidové DNA. Správný konstrukt byl vyhledáván restrikčním štěpením pomocí restrikčních endonukleáz *Bam HI*, *Nde I* a *Ssp I*. Restrikční endonukleázou *Bam HI* byl plazmid linearizován, enzym *Nde I* štěpil DNA na dvě části o velikosti cca 3790 bp a 1705 bp a enzym *Ssp I* štěpil DNA konstrukt na čtyři části o velikosti cca 3989 bp, 662 bp, 553 bp a 220 bp. Elektroforéza tohoto restrikčního ověření minipreparované plazmidové DNA je zobrazena na obr. 5.2.4.



Obr. 5.2.4: Elektroforéza restrikčního ověření minipreparované plazmidové DNA. V dráze „1“ je plazmid pEGFP-C2-VP3 linearizovaný pomocí *Bam HI*, Ověření přítomnosti inzertu VP3 bylo provedeno restrikcí endonukleázami *Nde I* (dráha „2“) a *Ssp I* (dráha „3“).

5.2.2 Konstrukce expresního vektoru pro produkci fúzního proteinu VP3-EGFP, kde je EGFP fúzováno k C konci VP3

Na obrázku 5.2.5 je naznačeno schéma konstrukce expresního vektoru pro produkci fúzního proteinu VP3-EGFP. Konstrukce byla provedena s použitím donorového plazmidu pEGFP-N1 nesoucího gen pro EGFP za MCS.

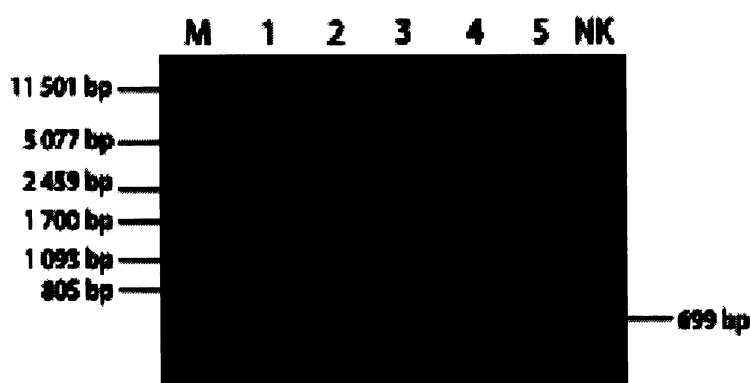


Obr. 5.2.5: Schéma konstrukce expresního vektoru pEGFP-N1-VP3. Popis expresního vektoru pEGFP-N1: pCMV IE=bezprostředně časný promotor lidského cytomegaloviru, EGFP= gen pro EGFP, MCS=polylinker-„multiple cloning site“, SV40 polyA=polyadenylační signál časné mRNA SV40, f1 ori=f1 počátek replikace „single strand“ DNA, P=bakteriální promotor genu pro rezistenci na Kanamycin (Kan^r), SV40 ori=počátek replikace SV40, P_{SV40e} =časný promotor SV40, $Kan^r/Neor^r$ =gen pro rezistenci ke kanamycinu a neomycinu, HSV TK poly A= polyadenylační signál genu pro thymidin kinázu (TK) viru Herpes simplex (HSV), pUC ori=počátek replikace plazmidu. Gen pro protein VP3 byl do vektoru pEGFP-N1 vnášen za restrikční místa pro *EcoRI* (630 bp) a *BamHI* (661 bp), které jsou součástí MCS. Při ověřování expresního vektoru pEGFP-N1 a vytvořeného expresního vektoru pEGFP-N1-VP3 byly použity ještě tyto restrikční endonukleázy: *SspI* (štěpící DNA donorového plazmidu v místech 1666 bp a 2219 bp a gen pro protein VP3 v místech 76 bp a 296 bp), *XhoI* (štěpící DNA donorového plazmidu v místě 614, které je součástí MCS), *NcoI* (štěpící DNA donorového plazmidu v místech 361 bp, 678 bp, 2487 bp, 3190 bp) a enzym *NdeI* (štěpící DNA donorového plazmidu v místě 235 bp a gen pro protein VP3 v místě 577 bp).

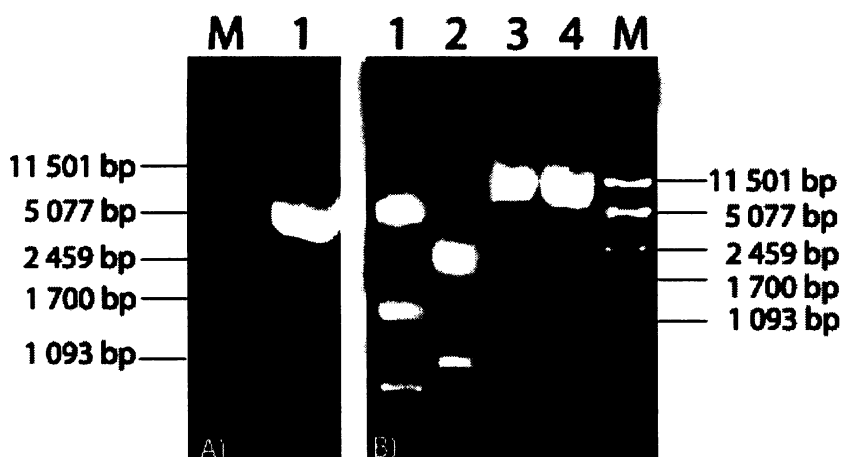
KAPITOLA 5: VÝSLEDKY

Nejprve jsem pomocí PCR amplifikace pomocí primerů EGFP-C2-VP3-Eco RI a EGFP-N1-VP3-Bam HI zavádějících restrikční místa pro restrikční endonukleázy *Eco RI* a *Bam HI*, připravila gen pro protein VP3. Jako templát byl použit opět plazmid p734a nesoucí genom BK viru. Teplota hybridizace obou primerů (60 °C) byla stanovena stejně jako u předchozích konstrukcí. Výsledek PCR amplifikace je znázorněn na obrázku 5.2.6. Amplifikovaný gen (VP3) byl poté štěpen stejně jako v předchozí konstrukci. Plazmidový vektor pEGFP-N1 byl izolován alkalickou maxipreparací a jeho identita ověřena štěpením restrikčními endonukleázami: *Eco RI* a *Bam HI*, které plazmid linearizovaly, dále kombinací enzymů *Xho I* a *Ssp I*, které DNA štěpily na tři části o velikosti cca 2219 bp, 1660 bp a 614 bp a dále enzymem *Nco I*, který plazmid štěpil na čtyři části o velikosti (cca) 1909 bp, 1804 bp, 703 bp a 317 bp. Na obrázku 5.2.7A je zobrazen izolovaný nelinearizovaný vektor pEGFP-N1 a na obrázku 5.2.7. B je elektroforéza restrikčního ověření donorového plazmidu pEGFP-N1. Při štěpení enzymem *Nco I*, (dráha 2), proužky o velikosti 1909 bp a 1804 bp splývají v jeden.

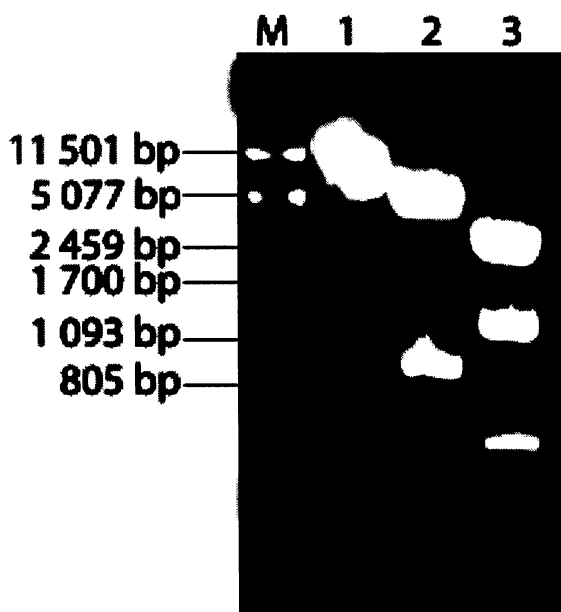
Ověřený vektor byl štěpen pomocí restrikčních endonukleáz *Eco RI* a *Bam HI* a ligován se štěpeným izolovaným genem pro VP3. Byla připravena ligační směs obsahující plazmidovou DNA a fragment VP3 v poměru 1:6. Ligace probíhala při laboratorní teplotě přes noc s použitím T4 ligázy. Ligovaný genový konstrukt byl následně vnesen metodou elektroporace do kompetentních buněk *E. coli* DH5 α . Selektce a vyhledávání správného konstrukt probíhalo obdobně jako při předchozí konstrukci. Správný konstrukt byl vyhledáván restrikčním štěpením pomocí restrikčních endonukleáz *Bam HI*, *Nde I* a *Ssp I*. Enzymem *Bam HI* byl konstrukt linearizován, enzym *Nde I* štěpil DNA na dvě části o velikosti (cca) 4451 bp a 971 bp a enzym *Ssp I* štěpil DNA konstrukt na čtyři části o velikosti (cca) 3779bp bp, 1730bp, 503 bp a 220 bp. Elektroforéza restrikčního ověření jednoho z pozitivních klonů je zobrazena na obr. 5.2.8.



Obr. 5.2.6: Výsledek PCR amplifikace genu pro protein VP3 BK viru. V drahách „1“ až „5“ je amplifikovaný fragment o velikosti genu pro protein VP3 (699 bp). Templátem byla DNA plazmidu p734a nesoucí genom BKV. Negativní kontrolou byla reakční směs bez templátové DNA. Pro reakci byly použity primery EGFP-C2-VP3-Eco RI a EGFP-N1-VP3-Bam HI zavádějící restrikční místa pro restrikční endonukleázy *Eco RI* a *Bam HI*.



Obr. 5.2.7: Elektroforéza restrikčního ověření donorového plazmidu pEGFP-N1. A) V dráze 1 je nelinearizovaný plazmid B) V dráze 1 je štěpení enzymy *Ssp I* a *Xho I*, v dráze 2 je štěpení enzymem *Nco I*, v dráze 3 je plazmid linearizovaný pomocí *Bam HI* a v dráze 4 je plazmid linearizovaný pomocí *Eco RI*.



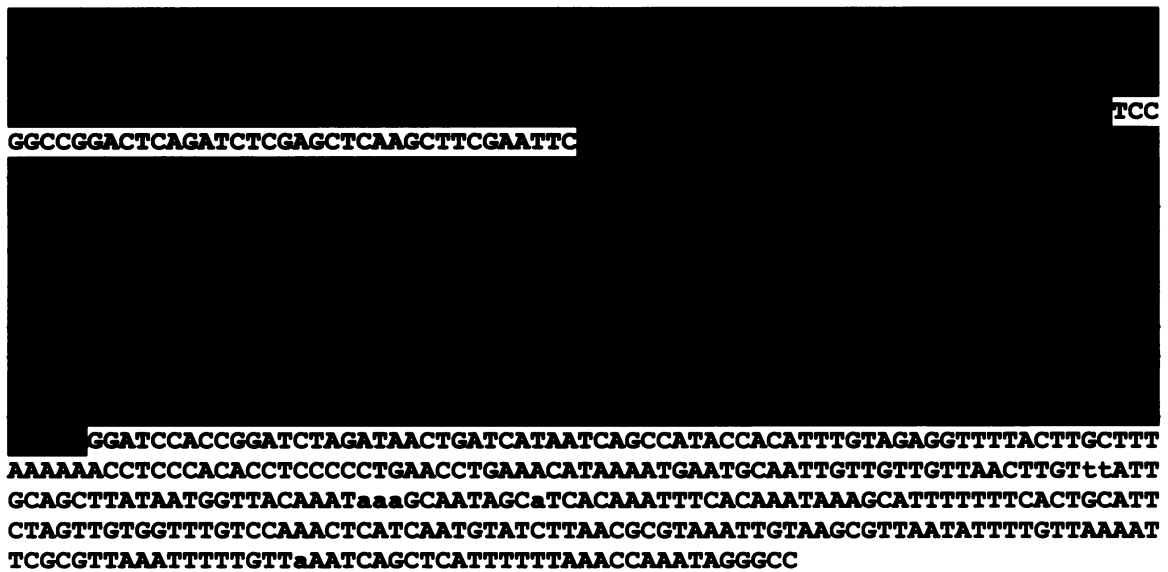
Obr. 5.2.8: Elektroforéza restrikčního ověření konstruktů pEGFP-N1-VP3. V dráze 1 je plazmid linearizovaný pomocí *Bam HI*. Restrikční ověření přítomnosti inzertu VP3 bylo provedeno restrikčními endonukleázami *Nde I* (dráha 2) a enzymem *Ssp I* (dráha 3).

5.2.3 Ověření konstrukce plazmidů pEGFP-C2-VP3 a pEGFP-N1 VP3 sekvenací.

Aby byla zkontrolována bezchybná konstrukce a vyloučeny možné mutace v připravených expresních plazmidech, byly tyto konstrukty sekvenovány. Na obrázku 5.2.9.A je sekvence konstruktů pEGFP-C2-VP3 pro expresi fúzního proteinu EGFP-VP3 v savčích buňkách. Na obrázku 5.2.9.B je sekvence konstruktů pEGFP-N1-VP3 pro expresi fúzního proteinu VP3-EGFP v savčích buňkách. Ani v jednom z vytvořených konstruktů nebyly nalezeny žádné mutace ani posuny čtecího rámce.

KAPITOLA 5: VÝSLEDKY

A)



GGCCGGACTCAGATCTCGAGCTCAAGCTTCGAATC

GGATCCACCGGATCTAGATAACTGATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGCTTT

AAAAAACCTCCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTttATT

GCAGCTTATAATGGTTACAAATaaaGCAATAGCaTCACAAATTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATT

CTAGTTGTGGTTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTAACGCGTAAATGTAAGCGTTAATATTTTGTAAAT

TCGCGTTAAATTTTTGTTaAATCAGCTCATTTTTTAAACCAAATAGGGCC

TCC

B)



CCATGGGTGAAGGCGGTTTTGGCAGTACATCCAAATGGGGCGTGGGATAGCGGGTTTGACTCACGGGGATTTC

CAAGTCTCCACCCCAATTGACGTCAATGGGAGGTTTTGTTTTGGGCACCAAATCAACGGGACTTTCCAAATGT

CGTAACAACCTCCGCCCCATGACGCAATGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGT

TTAGTGAACCGTCAGATCCGCTAGCGCTACCGGACTCAGATCTCGAGCTCAAGCTTCGAATTC

CTGGATCCACCGGTCGCCACC

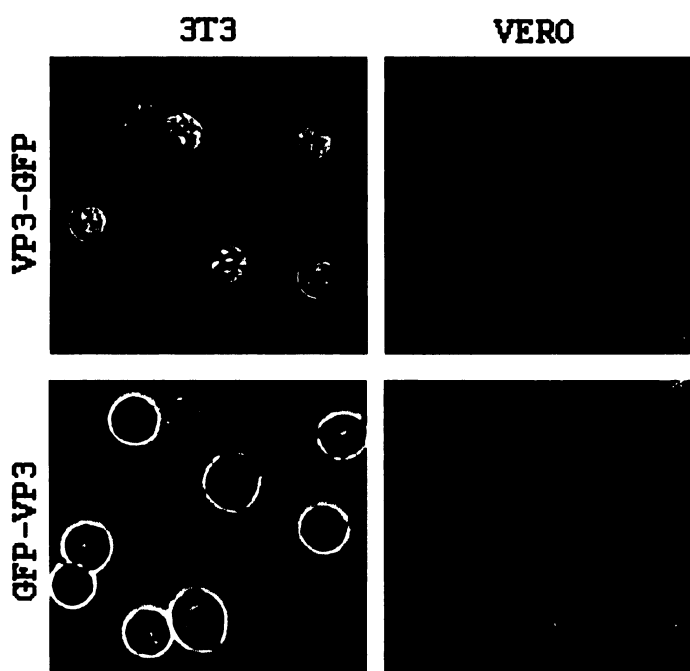
TCCAAG

Obr. 5.2.9: Sekvence konstruktů pEGFP-C2-VP3 (A) a pEGFP-N1-VP3 (B). Zeleně je vyznačena sekvence EGFP, červeně je vyznačena sekvence proteinu VP3.

Sekvenace byla provedena v laboratoři sekvenace DNA (PřF UK Praha) Mgr. Miroslavou Šedinovou

5.2.4 Ověření produkce fúzních proteinů EGFP-VP3 a VP3-EGFP v savčích buňkách

Pro ověření produkce fúzních proteinů EGFP-VP3 a VP3-EGFP v savčích buňkách, byly plazmidy pEGFP-C2-VP3 a pEGFP-N1-VP3 izolovány soupravou „Endotoxin Maxi Free Kit“, která zaručuje izolaci DNA bez endotoxinů (4.2.5.1.4). Připravenými plazmidy byly transfekovány buňky Swiss 3T3 a buňky VERO (viz 4.2.3.2.5). Na obrázku 5.2.10 jsou myši buňky Swiss 3T3 a opičí buňky VERO produkující fúzní protein EGFP-VP3, nebo VP3-EGFP. Buňky byly fotografovány 20 hodin po transfekci. Z obrázku je patrné, že je v obou případech fúzní protein produkován. Buněčná lokalizace fúzního proteinu je díky NLS proteinu VP3 převážně jaderná. Zatímco buňky VERO mají po transfekci tvar fibroblastu, buňky Swiss 3T3 mají i 20 hodin po transfekci změněnou morfologii a zachovávají si kulatý tvar.

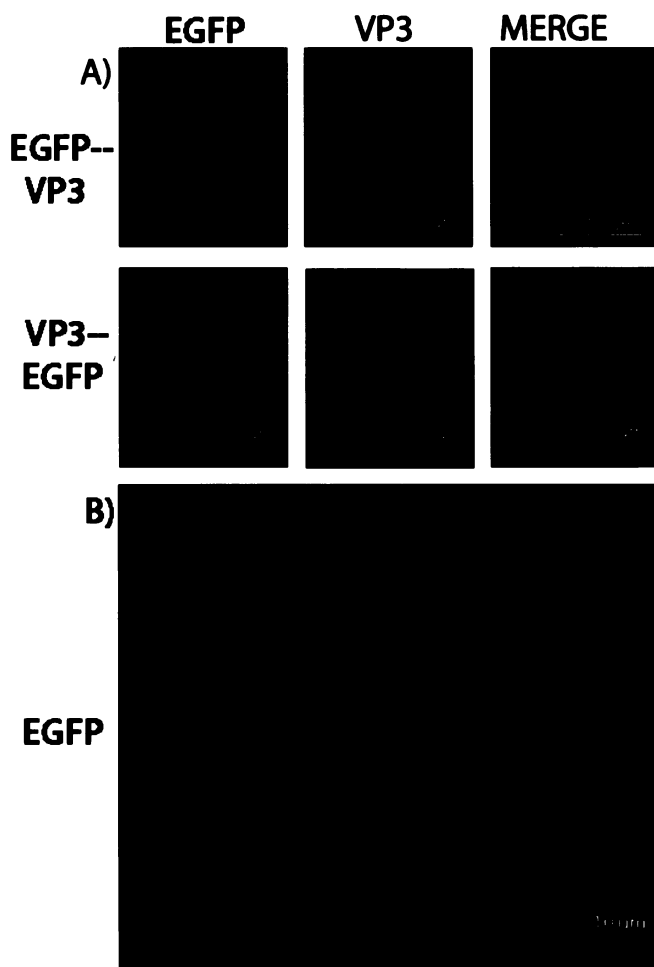


Obr. 5.2.10: Ověření produkce fúzních proteinů VP3-EGFP a EGFP-VP3 v živých buňkách Swiss 3T3 a VERO. Obrázky byly pořízeny invertovaným fluorescenčním mikroskopem CK40 (Olympus) 20 hpt kombinací transmise a zelené fluorescence. Zeleně-VP3-EGFP, EGFP-VP3.

Produkce fúzních proteinů byla ověřena metodou nepřímé imunofluorescence. Buňky VERO byly fixovány 8 hpt. Fúzní protein VP3-EGFP, nebo EGFP-VP3 byl detekován primární králičí protilátkou proti proteinu VP3 SV40 a primární kuřecí protilátkou proti EGFP. Pomocí konfokální mikroskopie byl sledován překryv zeleného signálu EGFP a červeného signálu VP3. Buňky produkující fúzní proteiny VP3-EGFP nebo EGFP-VP3 byly porovnávány s buňkami produkujícími samotný EGFP. Negativní kontrolou byly netransfekované buňky (neukázáno). Výsledek je na obrázku „5.2.11.A“ a „5.2.11.B“. Z obrázku 5.2.11. A a B je patrné, že se v buňkách transfekovaných připravenými konstrukty produkovaly fúzní proteiny, což plyne z kolokalizace červeného signálu VP3 a zeleného signálu EGFP a z převážně jaderné lokalizace fúzních

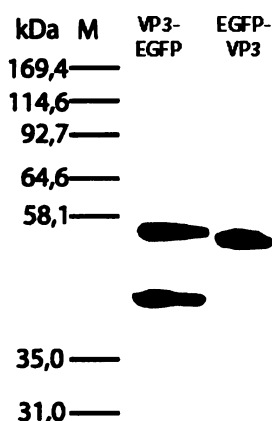
KAPITOLA 5: VÝSLEDKY

proteinů v čase 8 hodin po transfekci, ve srovnání s produkcí samotného EGFP, který je lokalizován rovnoměrně v celé buňce.

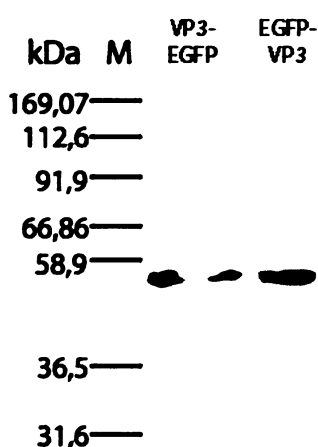


Obr. 5.2.11: Ověření správné produkce fúzních proteinů EGFP-VP3 a VP3-EGFP v savčích buňkách VERO 8 hpt pomocí nepřímé imunofluorescence. A) Buňky VERO byly fixovány 3% paraformaldehydem a permeabilizovány 0,5% tritonem-x-100 8 hpt plazmidy pEGFP-C2-VP3 (EGFP-VP3) a pEGFP-N1-VP3 (VP3-EGFP). Fúzní proteiny byly detekovány primární králičí protilátkou proti proteinu VP3 SV40, jako sekundární protilátka byly použity kozí protilátky proti králičím imunoglobulinům značené AF546 a primární kuřecí protilátkou proti EGFP, jako sekundární protilátka byly použity kozí protilátky proti kuřecím imunoglobulinům značené AF488. B) Buňky VERO fixované stejným způsobem 8 hpt pEGFP-C2 produkovaly samotný EGFP. EGFP byl detekován primární kuřecí protilátkou proti EGFP, jako sekundární protilátka byly použity kozí protilátky proti kuřecím imunoglobulinům značené AF488.

Produkce fúzních proteinů EGFP-VP3 a VP3-EGFP byla ověřena i metodou western blot. Fúzní proteiny byly detekovány v buňkách Swiss 3T3 transfekovaných plazmidy pEGFP-C2-VP3 a pEGFP-N1-VP3 lyzovaných 12 hpt. K detekci fúzních proteinů v těchto buněčných lyzátech byla použita primární králičí protilátka proti proteinu VP3 SV40 (obr. 5.2.12), nebo králičí polyklonální protilátka proti EGFP (obr. 5.2.13). Z obrázků je patrné, že jsou v lyzátech přítomny fúzní proteiny o správných velikostech (55 kDa). Při detekci proteinu VP3 v lyzátu buněk Swiss 3T3 transfekovaných pEGFP-N1-VP3 (obr. 5.2.12) byl kromě proužku o velikosti fúzního proteinu zaznamenán ještě proužek o velikosti cca 40 kDa. Tato velikost ovšem neodpovídá velikosti proteinu VP3 bez EGFP.



Obr.5.2.12: Ověření správné produkce fúzních proteinu EGFP-VP3 a VP3-EGFP v myších buňkách Swiss 3T3 12 hpt metodou western blot. K detekci byla použita primární králičí protilátka proti proteinu VP3 SV40, jako sekundární protilátka byly použity kozí protilátky proti králičím imunoglobulinům konjugované s HRP.



Obr.5.2.13: Ověření produkce fúzních proteinu EGFP-VP3 a VP3-EGFP v myších buňkách Swiss 3T3 12 hpt metodou western blot. K detekci byla použita primární králičí protilátka proti proteinu EGFP, jako sekundární protilátka byly použity kozí protilátky proti králičím imunoglobulinům konjugované s HRP.

5.3 Cílení proteinu VP3 BK viru k buněčným strukturám

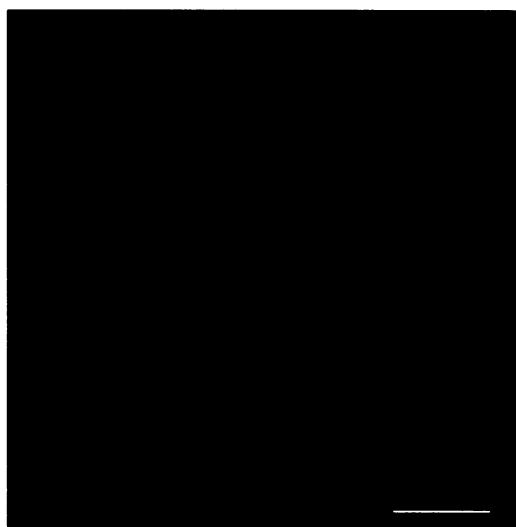
Abychom přispěli k objasnění funkce minoritního proteinu VP3 v životním cyklu BK viru, bylo provedeno několik experimentů pátrajících po možné interakci tohoto virového proteinu s buněčnými strukturami. Zatímco komplexy minoritních proteinů s pentamery VP1 jsou při infekci polyomaviry cíleny do buněčného jádra, první pozorování samostatné exprese minoritních proteinů myšího polyomaviru, současně probíhající v naší laboratoři, přineslo překvapení. Kromě vysoké cytotoxicity spojené s jejich expresí, byla pozorována výrazná lokalizace VP2, a zvláště VP3, na vnitrobuněčných membránách. Zajímalo nás, zdali se protein VP3 BKV, který má ve srovnání s VP3 myšího polyomaviru delší 3'konec, ve kterém je obsažena doména schopná vazby DNA, bude chovat podobně. Protein VP3 BKV byl fúzován s EGFP a jeho buněčná lokalizace byla analyzována pomocí nepřímé imunofluorescence s využitím konfokální mikroskopie (konfokální mikroskop LCS SP2 (Leica)). Zaměřili jsme se na dvě cytoplazmatické orgány: mitochondrie a endoplazmatické retikulum a na tři jaderné struktury: jadernou lamínu, jadernou DNA a PML tělíska. Abychom minimalizovali možnost ovlivnění přirozených vlastností proteinu VP3 fúzí se zeleným fluorescenčním

proteinem, prováděli jsme pokusy paralelně s fúzními proteiny, kde je i) protein EGFP připojen k N konci VP3 (EGFP-VP3) a ii) protein EGFP připojen k C konci VP3 (VP3-EGFP).

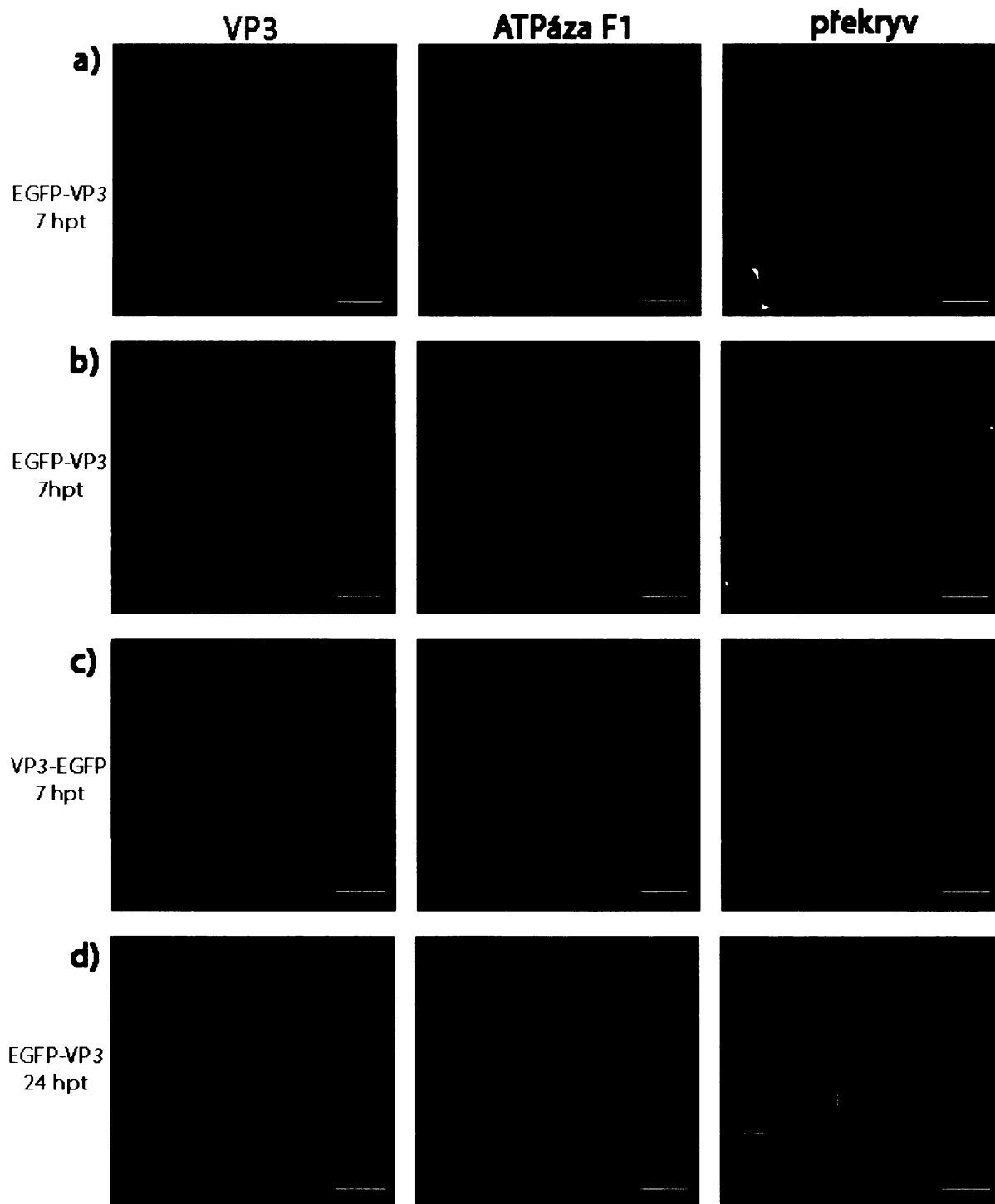
5.3.1 Sledování vzájemné lokalizace proteinu VP3 fúzovaného s EGFP a cytoplazmatických membránových struktur.

Permeabilizace mitochondriálních membrán je klíčovou událostí apoptotické i nekrotické buněčné smrti. Některé viry kódují produkty schopné interakce s mitochondriálními proteiny, zejména s proteiny vnitřní mitochondriální membrány, čímž předchází nebo navozují apoptózu. Některé virové proteiny fungují jako viroporiny, a tvoří póry do vnitřní mitochondriální membrány, což způsobí uvolnění „cytochromu c“ do cytosolu a iniciaci apoptózy. Vzhledem k tomu, že protein VP3 myšího polyomaviru indukuje apoptózu v buňkách, ve kterých se produkuje (nepublikované výsledky naší laboratoře), zajímalo nás, zda protein VP3 BK viru neinteraguje s mitochondriální membránou. Proto jsme porovnávali lokalizaci VP3 vzhledem k mitochondriálním membránám (označených markerem vnitřní membrány mitochondrií - ATPázou F1).

Opičí fibroblasty „VERO“ byly transfekovány metodou „Amaxa“ (viz 4.2.3.2.5) konstruktem pEGFP-C2-VP3 pro produkci fúzního proteinu EGFP-VP3, nebo konstruktem pEGFP-N1-VP3 pro produkci fúzního proteinu VP3-EGFP. Transfekované buňky byly fixovány v čase 7 a 24 hodin po transfekci. Poté byly buňky inkubovány s protilátkami pro nepřímou imunofluorescenci. Ani v jednom čase po transfekci nebyla pozorována přesvědčivá kolokalizace proteinu VP3 s mitochondriemi (viz zvětšené výřezy z obrázku se zesíleným signálem; obr 5.3.2.). Mezi buňkami, ve kterých byl produkován fúzní protein VP3-EGFP a EGFP-VP3 nebyly shledány výrazné rozdíly. Z obr. 5.3.1 a 5.3.2. je patrné, že zatímco v čase 7 hpt byla zachována mitochondriální síť podobná té u netransfekovaných buněk, v čase 24 hpt mělo asi 70% transfekovaných buněk odlišné rozmístění mitochondrií s posunem lokalizace do perinukleární oblasti.

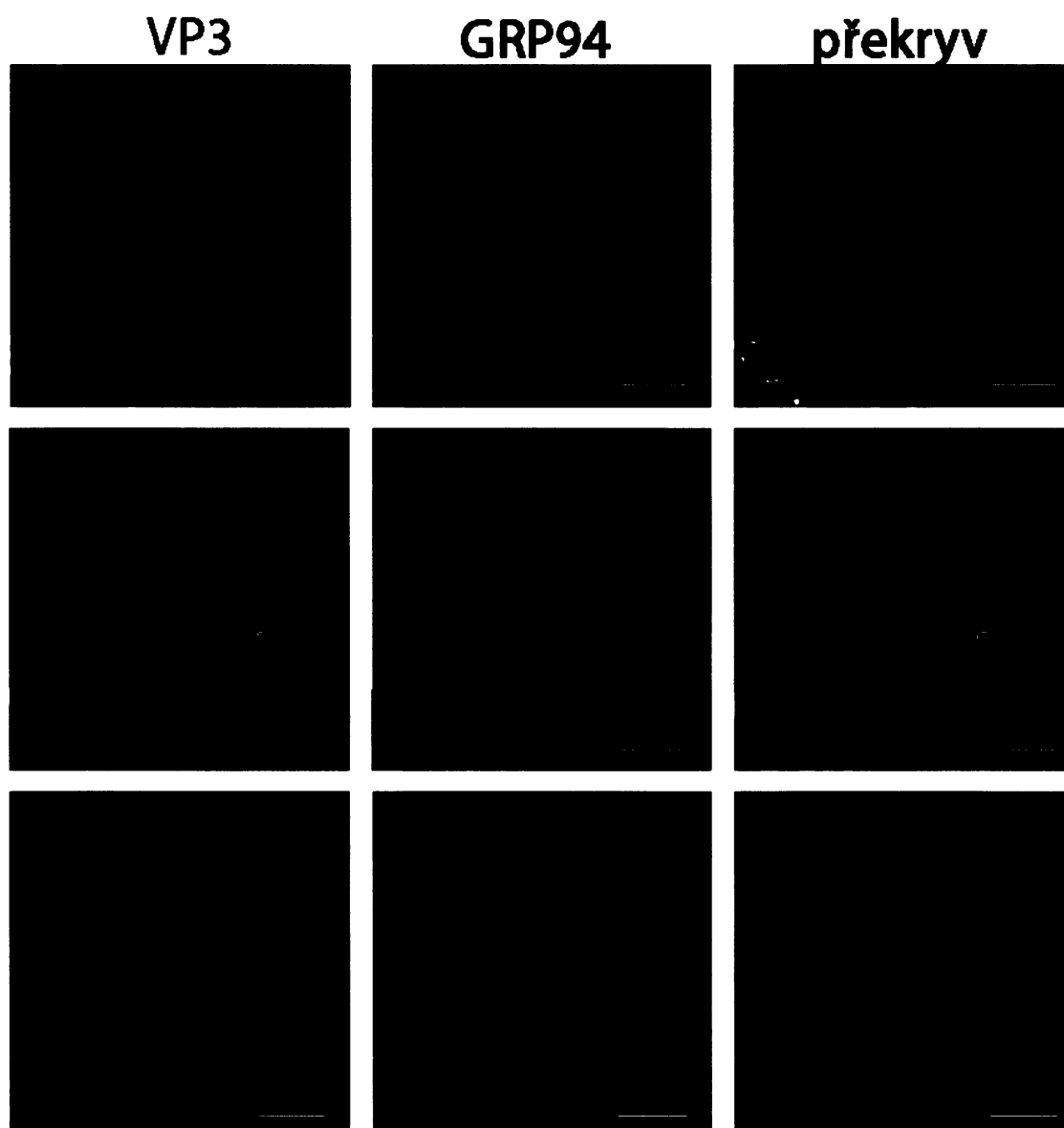


Obr. 5.3.1: Detekce mitochondrií v netransferovaných buňkách VERO. Řez netransfekovanou buňkou VERO. Buňky VERO byly fixovány metanol/acetone a po vybarvení protilátkami pozorovány pod konfokálním mikroskopem. Použité protilátky: Kozí protilátka proti C-konci F1 ATPázy (marker mitochondrií) v kombinaci s oslí protilátkou proti kozím imunoglobulinům konjugovanou s AF546. (překryv s DAPI). Měřítka=5 μ m.

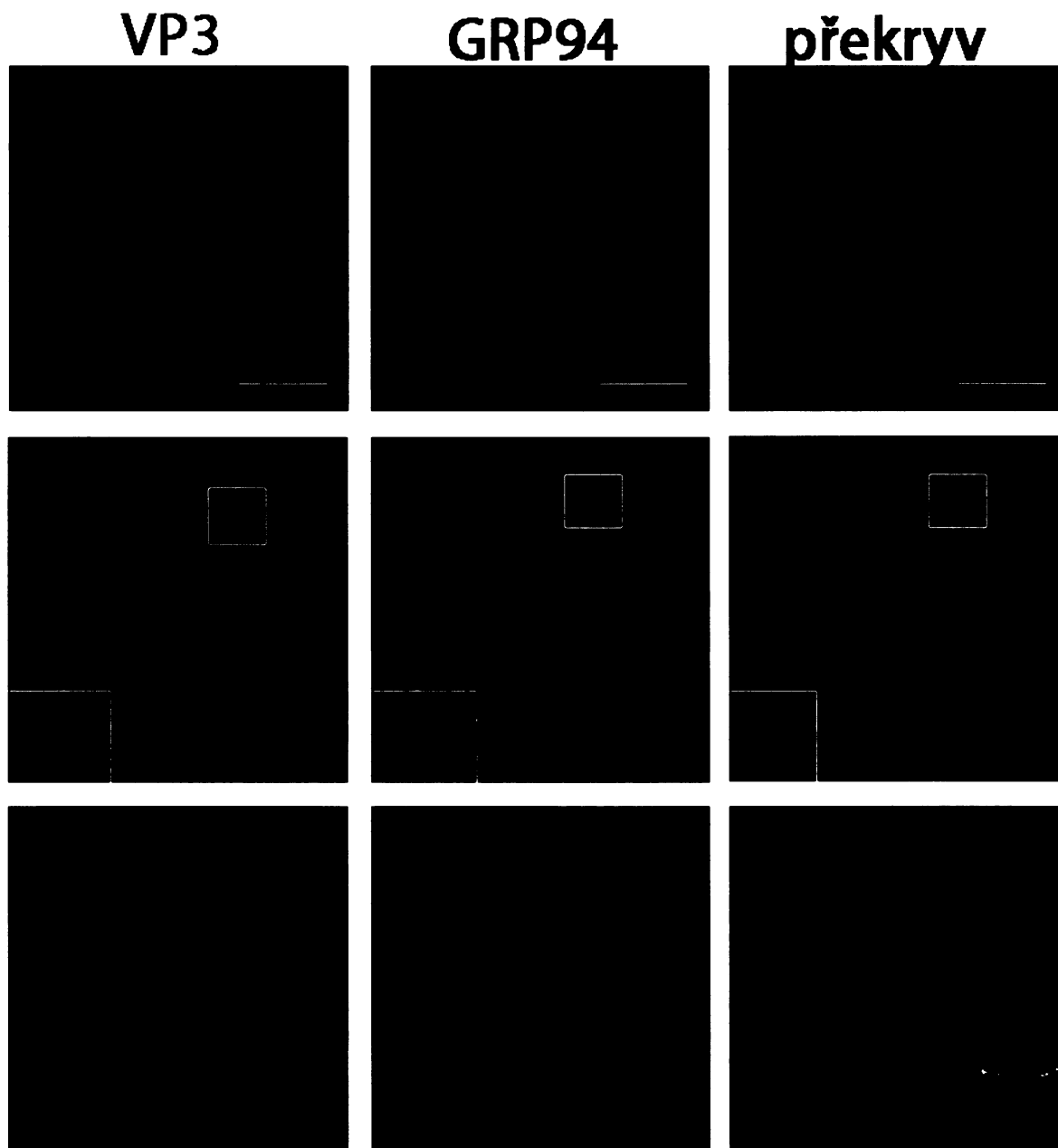


Obr. 5.3.2: Lokalizace proteinu VP3 BKV a F1 ATPázy (marker vnitřní membrány mitochondrií) po transfekci buněk VERO. Buňky byly transfekovány plazmidy pEGFP-C2-VP3 a pEGFP-N1-VP3 a fixovány metanol/acetone 7, nebo 24 hpt. a), b) 2 fezy buňkou transfekovanou pEGFP-C2-VP3, c) fez buňkou transfekovanou pEGFP-N1-VP3, d) fez buňkou transfekovanou pEGFP-C2-VP3. Použité protilátky: králičí polyklonální protilátka proti proteinu EGFP v kombinaci s kuřecí sekundární protilátkou proti králičím imunoglobulinům konjugovanou s AF488. Kozí protilátka proti C-konci F1 ATPázy v kombinaci s oslí protilátkou proti kozím imunoglobulinům konjugovanou s AF546. (překryv je s DAPI). V bílých rámečkách jsou zvětšené výřezy se zesíleným signálem. Měřitko=5 μ m.

Podobně jsme testovali lokalizaci VP3 fúzovaných s EGFP vzhledem k membránám endoplazmatického retikula. Jako marker ER jsme použili protein GRP94 („Glucosa regulating protein 94“). V souladu s předchozím obrázkem, ani na obrázcích 5.3.3. a 5.3.4., na kterých je červeně signál ER, nebyla pozorována výraznější lokalizace na membránách v cytoplasmě. Naprostá většina obou produkovaných fúzních proteinů byla cílena do jádra. To je výrazný rozdíl oproti lokalizaci VP3 myšího polyomaviru. Při zesílení signálu (viz zvětšené výřezy v bílém rámečku) je patrná přítomnost malé části produkovaných fúzních proteinů v cytoplasmě, ale ani zde není kolokalizace s ER přesvědčivá. Mezi fúzními proteiny EGFP-VP3 a VP3-EGFP, ani mezi sledovanými časy, nebyly shledány rozdíly.



Obr. 5.3.3: Lokalizace fúzního proteinu VP3-EGFP vzhledem k endoplazmatickému retikulu po transfekci buněk VERO: Buňky byly transfekovány plazmidem pEGFP-N1-VP3 a fixovány metanol/acetone 24 hpt. Na obrázku jsou pod sebou vyobrazeny jednotlivé řezy buňkou získané konfokální mikroskopií. Použité protilátky: kuřecí protilátka proti proteinu EGFP v kombinaci se kozí sekundární protilátkou proti kuřecím imunoglobulinům konjugovanou s AF488 a krysí protilátka proti GRP94 v kombinaci s kozí protilátkou proti krysím imunoglobulinům konjugovanou s AF546. (Překryv je s DAPI) V bílých rámečkách jsou zvětšené výřezy se zesíleným signálem. Měřítko=5 μ m.

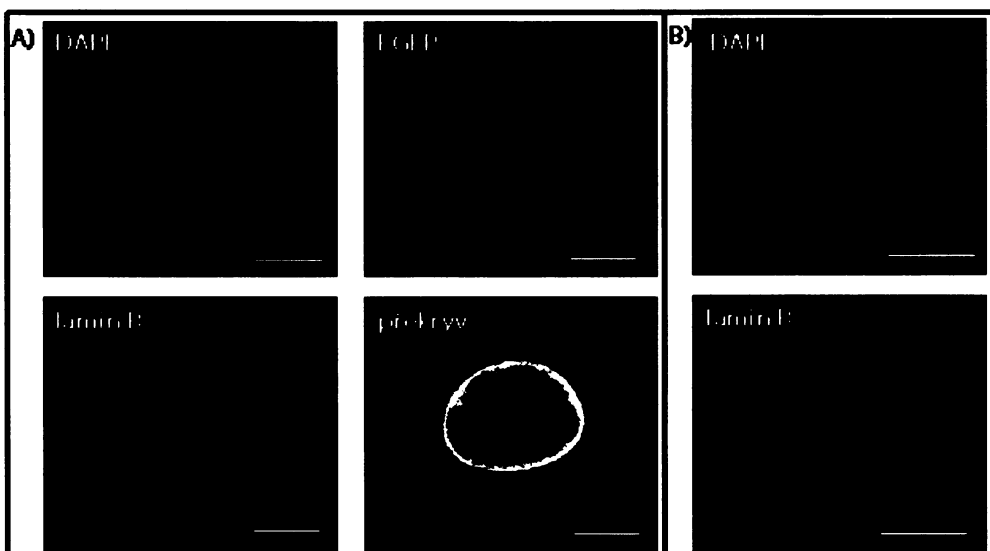


Obr. 5.3.4: Lokalizace fúzního proteinu EGFP-VP3 vzhledem k endoplazmatickému retikulu po transfekci buněk VERO: Buňky byly transfekovány plazmidem pEGFP-C2-VP3 a fixovány metanolem/acetonelem 24 hpt. Na obrázku jsou pod sebou vyobrazeny jednotlivé fezy buňkou získané konfokální mikroskopií. Použité protilátky: kuřecí protilátka proti EGFP v kombinaci s kozí sekundární protilátkou proti kuřecím imunoglobulinům konjugovanou s AF488 a krysí protilátka proti GRP94 v kombinaci s kozí protilátkou proti krysím imunoglobulinům konjugovanou s AF546. (Překryv je s DAPI). V bílých rámečkách jsou zvětšené výřezy se zesíleným signálem. Měřítko=5 μ m.

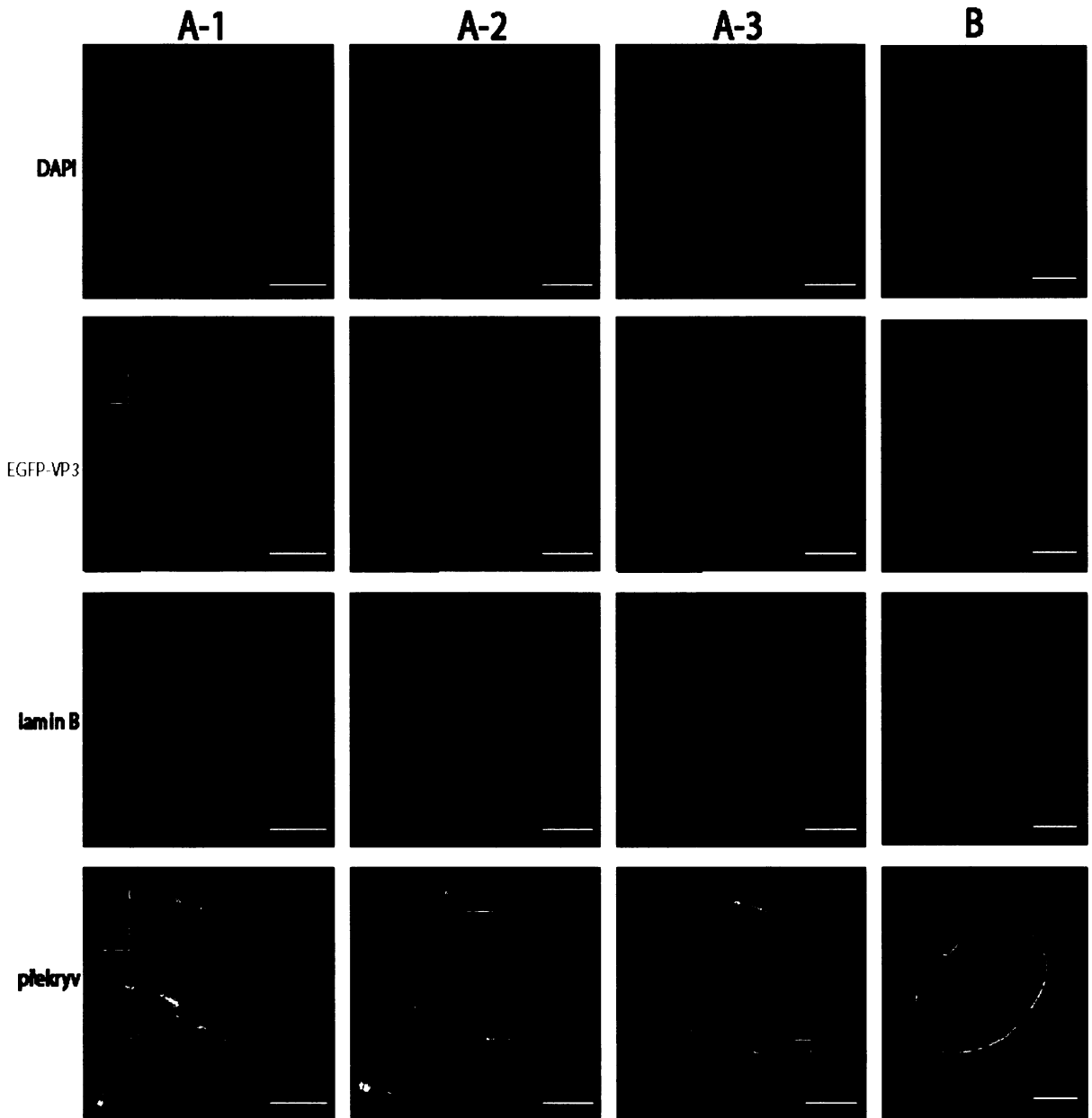
5.3.2 Lokalizace proteinu VP3 fúzovaného s EGFP v buněčném jádře vzhledem k jaderné lamině buněčné DNA.

Na rozdíl od minoritních proteinů myšího polyomaviru, minoritní proteiny BKV interagují svou C-koncovou doménou (která u minoritních proteinů hlodavčích polyomavirů chybí) nespecificky s DNA. Zajímalo nás, zdali se tato skutečnost odrazí v rozdílné lokalizaci VP3 BKV a VP3 myšího polyomaviru. Zároveň nás zajímalo, zdali je VP3 BKV výrazněji umístěn také v jaderné membráně.

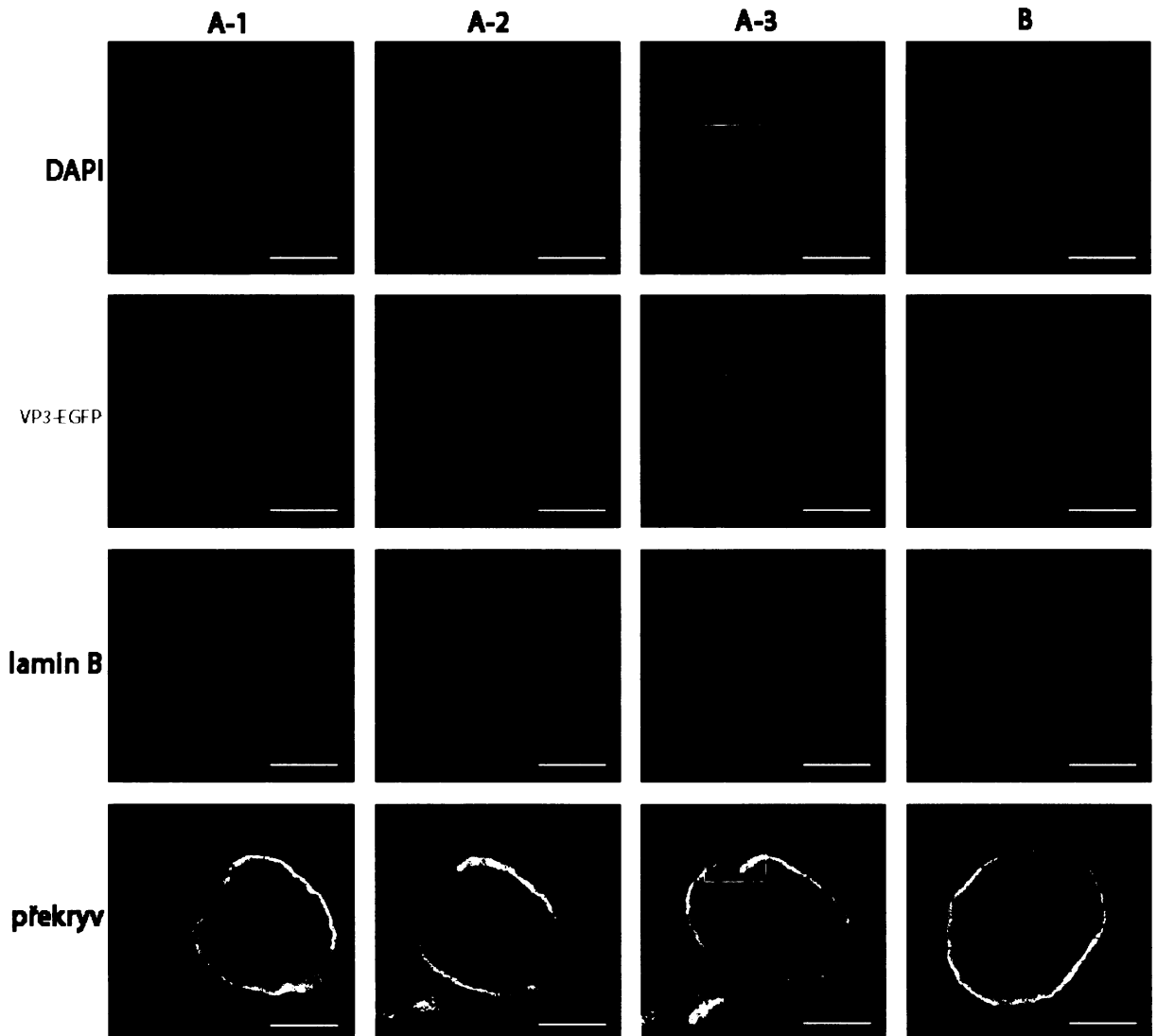
Proto jsme v dalším pokuse sledovali lokalizaci DNA, VP3 a laminu B. Imunofluorescence transfekovaných buněk obarvených protilátkou proti laminu B ukázala (Obr. 5.3.6, 5.3.7), že se protein VP3 nachází v jádře nejen pod jadernou membránou, ale i pod vrstvou laminy. Na obrázcích buněk 3T6 transfekovaných VP3 fuzními proteiny a fixovaných 24 hpt (Obr. 5.3.6 a obr 5.3.7., A1 – A3) je vidět, že je červený signál laminy přerušovaný a méně pravidelný. Takováto porušení laminové vrstvy nejsou pozorovatelná ani u netransfekovaných buněk (Obr. 5.3.5. B), ani u buněk produkujících samotný EGFP (24 hpt) (obr.5.3.5.A) a většinou ani u buněk, které produkovaly fuzní proteiny, ale byly fixovány mnohem dříve (7 hpt) (Obr. 5.3.6 a 5.3.7-B). Toto pozorování naznačuje, že by VP3 BKV mohl narušovat laminu buněk. U některých buněk bylo možno pozorovat (obr. 5.3.8.) tvorbu útvarů, možná váčků vyčnívajících z jádra a obsahujících DNA a protein VP3. V těchto výčnících však signál laminy B nebyl. Barvením DNA se odhalila částečná, avšak přesvědčivá kolokalizace proteinu VP3 s buněčnou DNA a ukázalo se, že především v čase 24 hodin po transfekci má většina buněk kondenzovaný chromatin tak, jak bývá pozorován u apoptotických buněk. DNA se často kumulovala na periferii jaderné membrány, kde interagovala s proteinem VP3 (obr. 5.3.9).



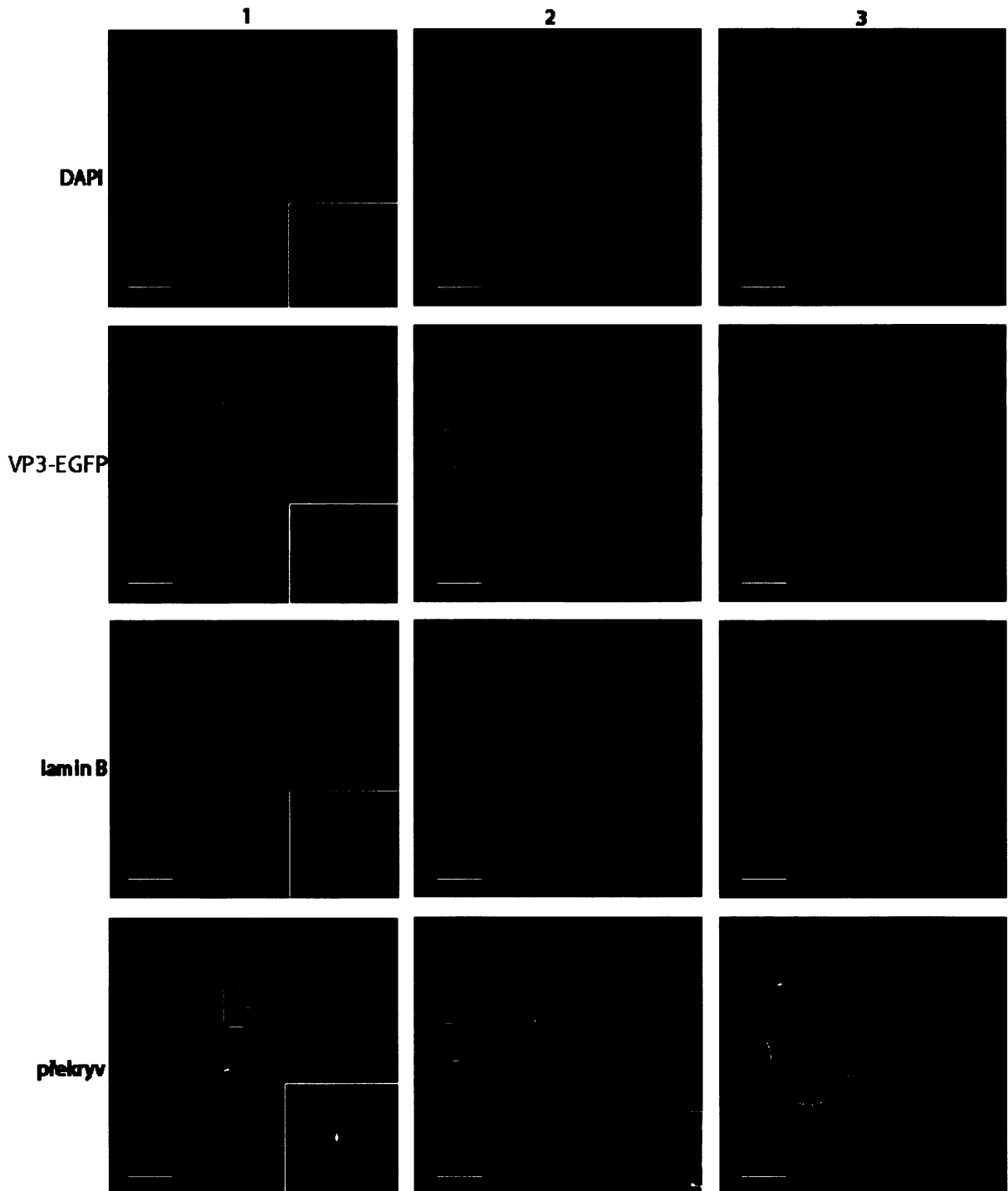
Obr. 5.3.5: Kontrolní snímek buněk 3T6 produkujících protein EGFP (A) a netransfekovaných 3T6 (B). Buňky byly fixovány 3% paraformaldehydem a permeabilizovány 0,5% tritonem-x-100. Použité protilátky: králičí polyklonální protilátka proti proteinu EGFP v kombinaci s kuřecí sekundární protilátkou proti králičím imunoglobulinům konjugovanou s AF488 a kozí protilátka proti laminu B v kombinaci s oslí protilátkou proti kozím imunoglobulinům konjugovanou s AF546. DNA byla barvena DAPI. Měřítka=5 μ m.



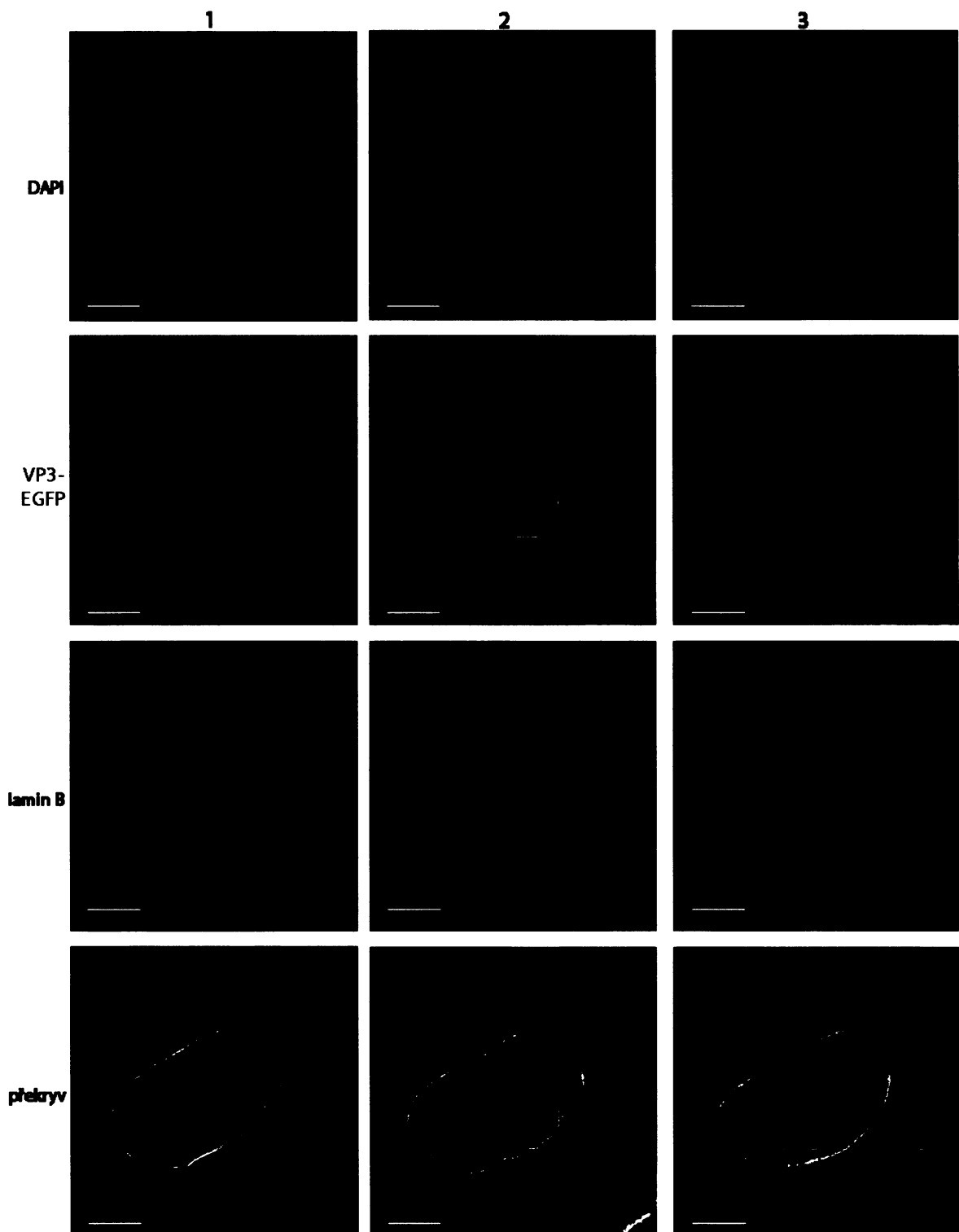
Obr. 5.3.6: Lokalizace EGFP-VP3, DNA a jaderné laminy po transfekci buněk 3T6 plazmidem pEGFP-C2-VP3. Snímky z konfokálního mikroskopu. Buňky byly fixovány 3% paraformaldehydem a permeabilizovány 0,5% tritonem-x-100. **A1-3**= jednotlivé řezy buňkou fixovanou 24 hpt. **B**=řez buňkou fixovanou 7hpt. Použité protilátky: králičí polyklonální protilátka proti proteinu EGFP v kombinaci s kuřecí sekundární protilátkou proti králičím imunoglobulinům konjugovanou s AF488 a kozí protilátka proti laminu B v kombinaci s oslí protilátkou proti kozím imunoglobulinům konjugovanou s AF546. DNA byla barvena DAPI. V bílých rámečkách jsou zvětšené výřezy se zesíleným signálem. Měřítko=5 μ m.



Obr. 5.3.7: Lokalizace VP3-EGFP, DNA a jaderné laminy po transfekci buněk 3T6 plazmidem pEGFP-N1-VP3. Snímky z konfokálního mikroskopu. Buňky byly fixovány 3% paraformaldehydem a permeabilizovány 0,5% tritonem-x-100. A1-3= jednotlivé řezy buňkou fixovanou 24 hpt. B=řez buňkou fixovanou 7 hpt. Použité protilátky: králičí polyklonální protilátka proti proteinu EGFP v kombinaci s kuřecí sekundární protilátkou proti králičím imunoglobulinům konjugovanou s AF488 a kozí protilátka proti laminu B v kombinaci s oslí protilátkou proti kozím imunoglobulinům konjugovanou s AF546. DNA byla barvena DAPI. V bílých rámečkách jsou zvětšené výřezy se zesíleným signálem. Měřítko=5 μ m.



Obr. 5.3.8: Lokalizace fúzního proteinu VP3-EGFP, jaderné laminy a DNA (DAPI) 24 hpt buněk 3T6 plazmidem pEGFP-N1-VP3. Snímky z konfokálního mikroskopu. Buňky byly fixovány 3% paraformaldehydem a permeabilizovány 0,5% tritonem-x-100. 1-3=jednotlivé řezy buňkou. Použité protilátky: králičí polyklonální protilátka proti proteinu EGFP v kombinaci s kuřecí sekundární protilátkou proti králičím imunoglobulinům konjugovanou s AF488 a kozí protilátka proti laminu B v kombinaci s oslí protilátkou proti kozím imunoglobulinům konjugovanou s AF546. V bílých rámečkách jsou zvětšené výřezy se zesíleným signálem. Měřítka=5 μ m.



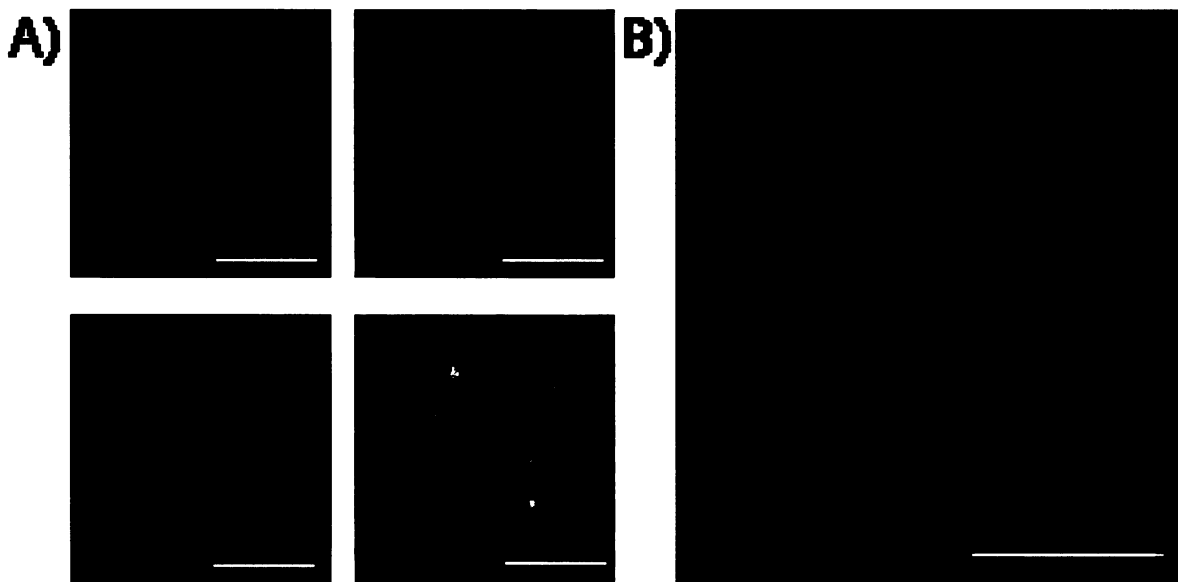
Obr. 5.3.9: Interakce fúzního proteinu VP3-EGFP s buněčnou DNA (DAPI), (červeně-jaderná lamina) 24 hpt buněk 3T6 plazmidem pEGFP-N1-VP3. Snímky z konfokálního mikroskopu. Buňky byly fixovány 3% paraformaldehydem a permeabilizovány 0,5% tritonem-x-100. 1-3=jednotlivé řezy buňkou. Použité protilátky: králičí polyklonální protilátka proti proteinu EGFP v kombinaci s kuřecí sekundární protilátkou proti králičím imunoglobulinům konjugovanou s AF488 a kozí protilátka proti laminu B v kombinaci s oslí protilátkou proti kozím imunoglobulinům konjugovanou s AF546. V bílých rámečkách jsou zvětšené výřezy se zesíleným signálem. Měřítka=5 μ m.

5.3.3 Lokalizace proteinu VP3 fúzovaného s EGFP a PML tělísek.

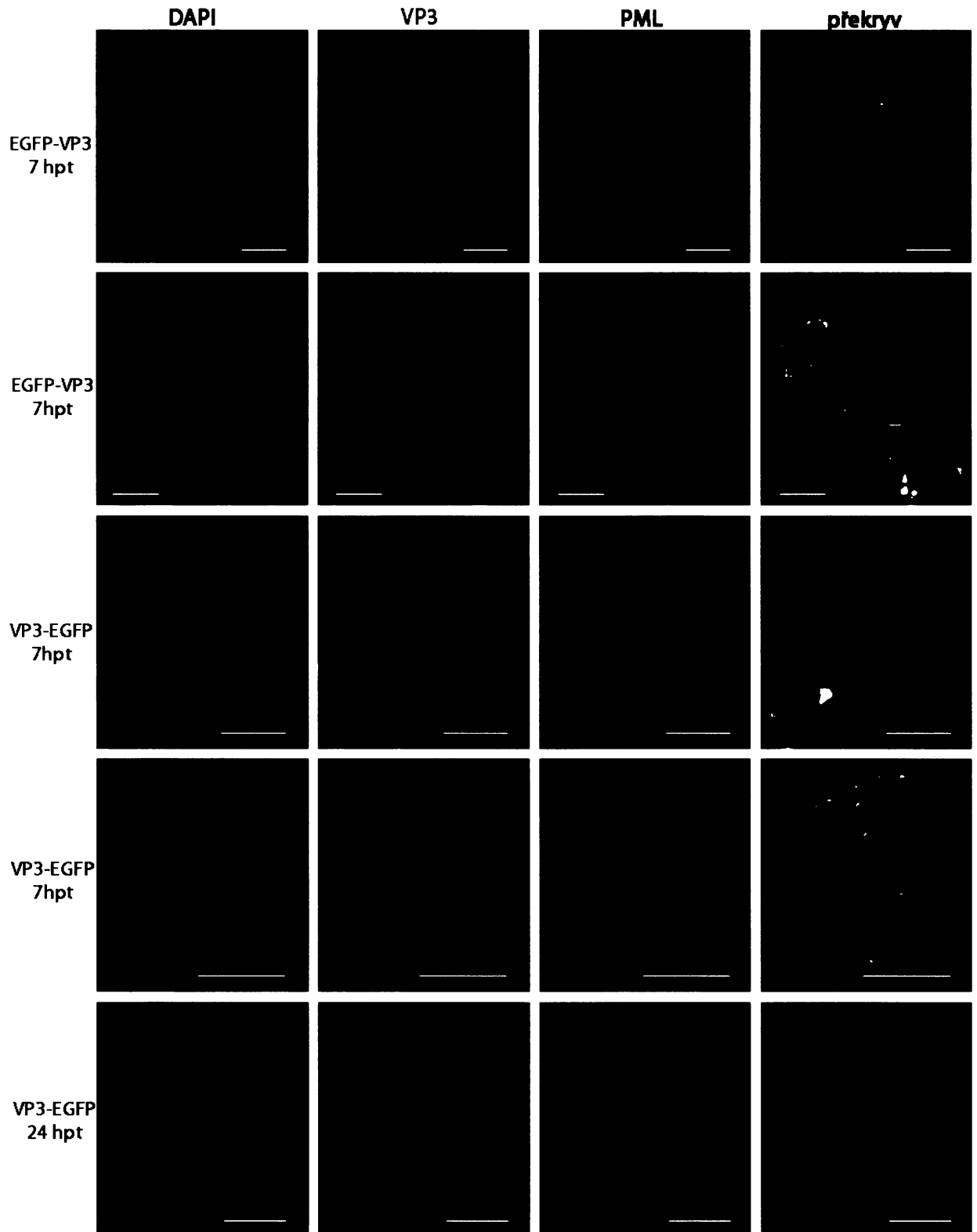
PML tělíška jsou malé jaderné struktury, definované přítomností proteinu PML (promyelocytic leukaemia protein). Jejich velikost se pohybuje okolo 0,2 až 1 μm a jejich frekvence závisí na typu buňky a kolísá mezi 2 až více než 30 PML tělísek na buňku. Funkce těchto tělísek se stále zkoumá, nicméně bývají spojovány s rozličnými buněčnými procesy, jako je onkogeneze, odpověď na poškození DNA a na stres, s apoptózou, s ubiquitinovou dráhou a dalšími. Hromadí se také důkazy o tom, že by tato tělíška mohla mít i roli obrany proti virům.

Vzhledem k tomu, že mnohé viry replikující se v buněčném jádře buď ničí PML tělíška, nebo je naopak využívají ke genové expresi či k morfogenezi virionů, zjišťovali jsme vliv exprese fúzovaného proteinu VP3 na množství a lokalizaci těchto jaderných domén.

Ačkoli jsme nezaznamenali významnou kolokalizaci proteinu VP3 s PML tělísky, všimli jsme si, že je těchto tělísek v mnoha případech, ve srovnání s tělísky v netransfekovaných kontrolních buňkách (obr. 5.3.10-B) výrazně méně. Tato redukce v počtu PML tělísek v jádře však byla pozorována i u buněk produkujících samotný EGFP (obr. 5.3.10-A). Navíc se tělíška často akumulovala společně s buněčnou DNA a VP3 v kroužcích, pravděpodobně kolem jadérek (obr. 5.3.11). Tato akumulace nebyla pozorována u kontrolních buněk exprimujících protein EGFP (obr. 5.3.10-A).



Obr. 5.3.10: Kontrolní snímek buněk 3T6 produkujících protein EGFP (A) a netransfekovaných 3T6 (B). Snímek z konfokálního mikroskopu. Buňky byly fixovány 3% paraformaldehydem a permeabilizovány 0,5% tritonem-x-100. **Modře-DNA (DAPI), červeně-PML tělíška, zeleně-EGFP** Použité protilátky: (A) králičí polyklonální protilátka proti proteinu EGFP v kombinaci s kuřecí sekundární protilátkou proti králičím imunoglobulinům konjugovanou s AF488 a (A i B) myší monoklonální protilátka proti PML tělíškům v kombinaci s kozí protilátkou proti myším imunoglobulinům konjugovanou s AF 594. Měřítka=5 μm .



5.3.11: Lokalizace PML tělísek v buňkách exprimujících fúzní proteiny EGFP-VP3 a VP3-EGFP fixovaných 7 nebo 24 hpt (DNA barvena DAPI). Buňky byly fixovány 3% paraformaldehydem a permeabilizovány 0,5% tritonem-x-100. Použité protilátky: myší monoklonální protilátka proti PML tělískům v kombinaci s kozí protilátkou proti myším imunoglobulinům konjugovanou s AF594 a králičí polyklonální protilátka proti EGFP v kombinaci s kuřecí protilátkou proti králičím imunoglobulinům konjugovaná a AF488. V bílých rámečkách jsou zvětšené výřezy se zesíleným signálem. Měřítko=5 μ m.

6. DISKUZE

6.1 Příprava protilátek proti strukturním antigenům BK viru.

Lidským BK virem je perzistentně a bezpříznakově infikováno až 85% celosvětové populace. V případě snížení imunity, především u jedinců po transplantaci ledvin nebo kostní dřeni, vzrůstá jeho virová aktivita a objevuje se progresivní infekce. Ta je častou příčinou odhojení transplantátu, což bývá pro pacienta fatální. Navíc je v poslední době na BKV poukazováno, jako na možnou příčinu vzniku některých nádorů, protože v nich byly v mnoha případech nalezeny BKV sekvence (shrnutí v FIORITY *et al.*, 2005). Nedávno byl BK virus popsán jako kofaktor etiologie nádorového onemocnění prostaty (DAS *et al.*, 2008). Z tohoto důvodu jsme se v naší laboratoři začali zabývat, kromě dlouhodobě studovaného myšího polyomaviru, i tímto lidským patogenem.

Abychom se mohli účinně chránit proti BK viru, musíme nejdříve pochopit mechanismus jeho patogenezise, mimo jiné i funkce virem kódovaných strukturních proteinů VP1, VP2 a VP3. Pro studium strukturních proteinů bylo nutné připravit monoklonální protilátky. Minoritní protein VP3 je zkrácenou formou minoritního proteinu VP2 a imunogenní oblasti se nachází v jejich společné části. Předpokládali jsme, že použijeme-li jako antigen VP2, bude výsledná protilátka pravděpodobně specifická proti oběma minoritním proteinům. Nicméně zde byla naděje, že by se podařilo připravit i protilátku proti unikátní N koncové části VP2. Na základě zkušeností s izolací minoritních proteinů MPyV jsme předpokládali, že bude izolace proteinu VP2 obtížná. Z toho důvodu byla příprava antigenu VP2 zahájena před izolací hlavního strukturního proteinu VP1. Izolace VP1 je usnadněna skutečností, že se VP1 skládá spontánně do pseudokapsid (VLPs), které je možno snadno purifikovat v hustotních gradientech.

6.1.1 Příprava rekombinantního bakuloviru pro expresi VP2 BKV

Pro produkci proteinu VP2 jsme se rozhodli použít hmyzí buňky a „Bac -to Bac“ bakulovirový expresní systém. Nejprve byl zkonstruován transferový vektor „pFast Bac HT A-VP2, nesoucí za sekvencí pro histidinovou kotvu gen pro protein VP2 BKV. Ten byl poté transformací vnesen do bakterií „*E. coli* DH10 Bac“. Rekombinantní bakteriální kolonie byly selektovány „LacZα“ selekčním systémem. Ze tří vybraných kolonií, u nichž byla PCR amplifikací ověřena přítomnost genu pro protein VP2, byla izolována celková bakteriální DNA obsahující rekombinantní bakulovirovou DNA (bacmid). Získanými bacmidy byly transfekovány hmyzí buňky Sf9. Přítomnost proteinu VP2 v lyzátech hmyzích buněk infikovaných rekombinantním bakulovirem r-Bac-VP2 BKV byla nejprve ověřena metodou western blot. Na detekci proteinu VP2 BKV byla v tomto i v dalších pokusech použita králičí polyklonální protilátka proti minoritním strukturním proteinům VP2 a VP3 SV40 získaná v malém množství z laboratoře. A. Oppenheim. Tato protilátka, díky homologii aminokyselinové sekvence BKV a viru SV40, která činí 69%, reagovala specificky i proti proteinům VP2 a VP3 BK viru (FRISQUE *et al.*, 1984). Ačkoli PCR amplifikace odhalila ve všech třech testovaných bacmidech přítomnost genu pro protein VP2, imunologická detekce prokázala expresi proteinu VP2 jen v hmyzích buňkách infikovaných rBac-VP2 BKV konstrukty 1 a 3 (Obr. 5.1.7, dráhy 1, 3). V lyzátech hmyzích buněk infikovaných rBac-VP2 BKV konstruktem 2 nebyl protein VP2 detekován (Obr. 5.1.7, dráha 2). To by mohlo být způsobeno mutací zavedenou polymerázou během PCR nebo chybnou rekombinací při tvorbě rekombinantního bacmidu.

Zatímco imunodetekce lyzátu buněk infikovaných rekombinantním bakulovirem „3“ prokázala metodou western blot jediný proužek odpovídající svou elektroforetickou mobilitou proteinu VP2, v buňkách infikovaných rekombinantním bakulovirem „1“ byl detekován i výrazný proužek menší velikosti. Mohlo by se jednat buď o produkt degradace způsobený činností buněčných proteáz, nebo o protein VP3, který má stejnou elektromobilitu jako tento menší produkt. Minoritní proteiny VP2 a VP3 totiž vznikají v buňkách infikovaných BKV translací jediné mRNA ze dvou různých AUG. Proužek o mobilitě odpovídající proteinu VP3 se vyskytoval i v hmyzích buňkách infikovaných inokuly dalších čtyř z pěti nezávislých plakových izolátů.

6.1.2 Izolace proteinu VP2 BK viru z hmyzích buněk

Pro izolaci proteinu VP2 byla zvolena afinitní chromatografie využívající histidinovou kotvu na N konci fúzního proteinu. Imunologická detekce proteinu VP2 BKV v jednotlivých frakcích odhalila, že se část fúzního proteinu přítomného v lyzátu hmyzích buněk infikovaných rBac-VP2 BKV, zřejmě z kapacitních možností kolony, na kolonu nenavázala. Navázaný protein VP2 se poté nepodařilo z kolony vymýt (Obr. 5.1.11). To bylo patrně způsobeno nerozpustností proteinu VP2, který v koloně precipitoval. Minoritní proteiny obsahují totiž ve svém C konci vysoce konzervativní oblast nalezenou u všech příbuzných polyomavirů. Tato oblast obsahuje velmi hydrofóbní α -helix, který spolu s úsekem bazických aminokyselin připomíná protein transdukcí domény, které jsou schopné vázat se na membrány. Jsou-li minoritní proteiny v komplexu s VP1 pentamery, zajišťují tyto hydrofobní sekvence interakci mezi pentamerem a minoritními proteiny. Nicméně jsou-li minoritní proteiny exprimovány samostatně, mohl by být tento hydrofobní úsek spoluodpovědný za nerozpustnost minoritních proteinů. V unikátní oblasti VP2 počítačová analýza odhalila další transmembránovou oblast. Rozpustnost VP2 byla testována za různých podmínek (Obr. 5.1.12). Při extrakci s použitím lyzačního pufru „RIPA“ obsahujícího detergenty (0,1 % SDS, NP40, triton-X-100) se naprostá většina proteinu VP2 nacházela v peletu. Také různé koncentrace močoviny (včetně 8M močoviny) měly na rozpustnost minimální vliv (obr. 5.1.12). Afinitní chromatografie byla zopakována a byl použit vazebný a eluční pufr obsahující 4M močovinu. I v tomto případě byl výsledek neuspokojivý.

Přestože jsou minoritní proteiny VP2 i VP3 v buňkách infikovaných BKV cíleny do buněčného jádra, pokud je VP2 myšího polyomaviru produkován v hmyzích buňkách bez VP1, nachází se na vnitrobuněčných membránách. Přítomnost proteinu VP2 viru BK ve frakci buněčných membrán byla prokázána také jeho imunologickou detekcí v membránách izolovaných z hmyzích buněk infikovaných rBac-VP2 BKV (Obr. 5.1.13. b). Z membrán jsme se snažili protein VP2 extrahovat metodou používanou pro membránové proteiny-fázovou separaci membránových proteinů tritonem-x-114. Ta je založená na skutečnosti, že vodný roztok neiontového detergentu tritonu-x-114 je při 0°C homogenní, ale při 20°C se rozdělí na vodnou a detergentovou fázi. Hydrofilní proteiny se poté nacházejí výhradně ve vodné fázi, zatímco integrální membránové proteiny v detergentové fázi (BORDIER, 1980). Tato metoda se již v minulosti osvědčila při izolaci proteinu VP2 myšího polyomaviru. Ačkoli se tehdy podařilo velké množství proteinu VP2 extrahovat do fáze detergentu, už nikdy se ho nepodařilo rozpustit (FORSTOVÁ-ústní sdělení). To by ale pro účel imunizace nevedlo. Nicméně v případě BKV ani fázová separace membránových proteinů nevedla k získání

dostatečného množství proteinu VP2. Z obrázku 5.1.13 A, B je patrné, že množství proteinů v membránách před extrakcí (dráha 1) je srovnatelné s množstvím proteinů detekovaných ve frakci membrán, vzniklé po opakované extrakci membránových proteinů do tritonu-x-114 (dráha 2). Při optimálním fungování této metody by frakce membrán po extrakci měla obsahovat pouze fosfolipidy. Extrakce proteinu VP2 z buněčných membrán do tritonu-x-114 byla tak slabá, že se jeho přítomnost v detergentové fázi podařilo prokázat až citlivou imunologickou detekcí. Vzhledem k tomu, že barvení gelu barvicím roztokem obsahujícím coomassie brilliant blue G250 je schopno detekovat protein v minimálním množství cca 30 ng, bylo do fáze tritonu-x-114 extrahováno méně než 1% proteinu VP2. Protože protein VP2 nebyl detekován ani ve vodné fázi, zůstal pravděpodobně téměř všechen navázán na membránách. Protože se do fáze tritonu-x-114 nepodařilo dostat ani větší množství dalších membránových proteinů, je zřejmé, že by bylo nutné metodu optimalizovat. Z časových důvodů jsme prozatím od této metody upustili.

6.1.3 Příprava monoklonálních protilátek proti strukturním proteinům

Protože se nám nezdařila izolace VP2, rozhodli jsme se pro přípravu myší monoklonální protilátky proti minoritním proteinům BKV využít rekombinantní bakulovirus, ze kterého byly v hmyzích buňkách syntetizovány proteiny VP1 a VP3 BKV (r-Bac-VP1/3 BKV). Oba strukturní proteiny se skládaly v jádrech buněk do pseudokapsid (VLPs), jejichž izolace z hmyzích buněk gradientovými centrifugacemi je snadná. Protein VP3 byl poté izolován z vyčištěných VP1/VP3 pseudokapsid rozdělením proteinů na SDS-proteinové elektroforéze a elektroelucí vyříznutého proteinu VP3 z polyakrylamidového gelu. Důvodem volby VP1/VP3 VLPs a ne VP1/VP2 pseudokapsid, i za cenu toho, že výsledná protilátka nebude rozlišovat mezi oběma minoritními proteiny, byl právě způsob izolace. Protein VP2 má totiž molekulovou hmotnost (38 kDa) téměř stejnou jako protein VP1 (40 kDa), a tak by se na gelu od sebe nedaly snadno oddělit.

Po imunizaci dvou myší 4 dávkami denaturovaného proteinu VP3 byla provedena fúze slezinných buněk myši č. 2, (která v průběhu imunizací lépe odpovídala na antigen) s myeloidními buňkami. Po uskutečnění fúze a prvním orientačním testování s použitím denaturovaných VP1/VP3 VLPs jako antigenu, byla vybraná media nad buňkami po fúzi blíže zkoumána metodu imunodot-blot s použitím několika negativních kontrol, mimo jiné i denaturovaných VP1 VLPs. Překvapivě většina směsných kultur hybridomů reagovala pozitivně nejen s VP3, ale i s VP1 (obr. 5.1.20.a). Přítomnost hybridomů produkujících monoklonální protilátku proti hlavnímu strukturnímu proteinu VP1 BKV si vysvětlujeme způsobem, jakým byl získán antigen. Při izolaci proteinu VP3 z VP1/VP3 VLPs mohl být z gelu společně s proteinem VP3 vyříznut i degradační produkt proteinu VP1, putující v gelu podobnou rychlostí jako VP3. Protože je protein VP1, na rozdíl od minoritních proteinů, vysoce imunogenní, i malá kontaminace vzorku částí tohoto proteinu mohla způsobit účinnou tvorbu protilátek specifických proti VP1. Hybridomy z fúze označené jako IIC7 (obr.5.1.20a) byly několikrát klonovány a byly získány jak klony produkující protilátku pouze proti proteinu VP3, tak klony produkující protilátku jenom proti proteinu VP1 (obr.5.1.20.b). Re-klonované hybridomy byly testovány metodami imunodot-blot, western-blot a nepřímou imunofluorescencí na produkci specifických protilátek. Re-klonované hybridomy 12, 13 a 14 z obr. 5.1.21 reagovaly na imunodot-blotu jak s proteinem VP3 z VP1/3

VLPs, tak i velmi slabě s lyzátem hmyzích buněk infikovaných divokým bakulovirem. Vzhledem k tomu, že tato velmi slabá nespecifická reakce přetrvávala během klonování, domníváme se, že mohla být způsobena podobností epitopu VP3 s epitopem vyskytujícím se na některém z bakulovirových nebo buněčných proteinů spíše, než kontaminací klonů. Podobně si vysvětlujeme i reakci klonů 11 a 12 namířených proti VP1 z obr. 5.1.22 s lyzátem neinfikovaných buněk VERO.

Na obrázku z imunofluorescenční mikroskopie hmyzích buněk infikovaných r-Bac-VP2 BKV po 72 hodinách (obr. 5.1.23) můžeme vidět signály proteinu VP2, z jehož lokalizace můžeme soudit na jeho afinitu k ER a jaderným membránám, podobně jako u VP2 myšího polyomaviru. Tento signál byl pozorován jak po obarvení protilátkami produkovanými re-klonovanými hybridomy 1, 2 a 3 z obr. 5.1.21, tak i ověřenou protilátkou specifickou proti proteinu VP2 a VP3 viru SV40. Protože se nejedná o snímky z konfokálního mikroskopu a buňky nebyly barveny na ER, nemůžeme s jistotou tvrdit, že je protein VP2 přítomen právě v ER. Specifičnost těchto protilátek byla testována i metodou western-blot. Zde protilátky produkované re-klonovanými hybridomy 1 a 2 reagovaly specificky s proteinem VP3 z VP1/3 VLPs. Podařilo se tedy připravit protilátky reagující specificky s proteinem VP2 a VP3 BK viru. Nicméně po měsíci pasážování v buněčné kultuře hybridomy přestaly protilátky produkovat. Příčinou byla pravděpodobně nestabilita tetraploidních hybridomových buněk. Ta spočívá v nepravděpodobném rozřídění chromozomů do jednotlivých buněk při buněčném dělení. Tím mohou některé hybridomy ztratit chromozóm s lokusem genu pro daný imunoglobulin, a tak i schopnost produkovat protilátky (HARLOW & LANE, 1988). V současné době jsou pro selekci nových stabilních hybridomů produkujících protilátku proti minoritním proteinům BKV používány neklonované hybridomy, které byly hned po fúzi a prvním testování produkce specifických protilátek uchovány v tekutém dusíku. Kdyby se ani v tomto druhém pokusu nepodařilo vyhledat stabilní klon produkující specifickou protilátku, je možné, aby byla provedena nová fúze uchovaných slezinných buněk z myši č. 1 s myeloidními buňkami a zopakována celá procedura přípravy protilátek.

Re-klonované hybridomy 1, 2 a 3 (z obr. 5.1.22) produkující protilátku proti hlavnímu kapsidovému proteinu VP1 BKV byly testovány nepřímou imunofluorescencí na hmyzích buňkách infikovaných r-Bac-VP1 BKV (72 hpi) a na opičích fibroblastech VERO infikovaných BK virem (60 hpi). V obou případech byl zaznamenán jaderný signál proteinu VP1 obdobně jako při značení ověřenou králičí polyklonální protilátkou proti proteinu VP1 BKV. Značení monoklonálními protilátkami však prokázalo u mnohých buněk i cytoplazmatickou lokalizaci proteinu VP1. Vzhledem k tomu, že u kontrolních neinfikovaných buněk nebyl po inkubaci s monoklonálními protilátkami zaznamenán žádný signál, vysvětlujeme si cytoplazmatickou lokalizaci proteinu VP1 následovně: Králičí polyklonální protilátka byla získána po imunizaci nativními VP1 pseudokapsidami a je tedy pravděpodobně specifická především proti konformačním epitopům přítomným na povrchu VP1 pseudokapsidy. Monoklonální protilátky vzniklé po imunizaci denaturovaným antigenem jsou naopak specifické spíše proti některému ze sekvenčních epitopů VP1. Ten by v nativních virionech mohl být skryt a odhalen v pentamerách VP1. Bylo prokázáno, že ačkoli je protein VP1 polyomavirů převážně proteinem jaderným, může mít v některých případech i cytoplazmatickou lokalizaci. MANINOVÁ (2007) pozorovala v pozdní fázi infekce buněk myším polyomavirem kromě jaderné lokalizace proteinu VP1 také

tvorbu cytoplazmatických vláken, která byla specificky značena proti proteinu VP1. Tato vlákna byla pozorována i po transfekci buněk plazmidem pro produkci proteinu VP1 MPyV.

Specifičnost monoklonálních protilátek proti VP1 byla ověřena i metodou western-blot. Imunologická detekce prokázala v lyzátech buněk „VERO“ infikovaných BKV (obr. 5.1.28) kromě proužku o elektromobilitě proteinu VP1 (40 kDa) i proužek o elektromobilitě přibližně cca 105 až 110 kDa (odhad z gelu). Protože byl tento proužek potvrzen i slabě reagující polyklonální protilátkou proti VP1 BKV, nejedná se zřejmě o „cross-reakci“, získaných protilátek s některým z buněčných proteinů. U myšího polyomaviru existuje hypotéza, že v závěru morfogeneze virionů, kdy dochází k uzavření virové částice, může docházet jednak ke „kovaletnímu“ spojení mezi některými molekulami VP1, jednak i k částečnému proteolytickému štěpení některých molekul strukturálních proteinů (FORSTOVÁ-ústní sdělení). Je pravděpodobné, že by k této reakci mohlo docházet i u BK viru a oligomery proteinu VP1 by pak mohly být detekovatelné i SDS-PAAGE. Protein VP1 produkovaný v hmyzích buňkách tvořil vedle proužku o mobilitě 40 kDa navíc proužek odpovídající cca 50 (odhad z gelu). Bylo prokázáno, že protein VP1 myšího polyomaviru podléhá mnoha posttranslačním úpravám, mezi které patří fosforylace, sulfonylace, acetylace, hydroxylace či metylace. U VP1 myšího polyomaviru bylo detekováno 11 posttranslačních forem (FORSTOVÁ *et al.*, 1993). Bylo zjištěno, že fosforylace VP1 je důležitá pro účinnou morfogenezi virionů myšího polyomaviru (LI & GARCEA, 1994). Nelze vyloučit, že by i část proteinů VP1 BK viru mohla podstupovat některou z posttranslačních modifikací, která by se projevila zpomalením putování proteinu VP1 v elektrickém poli. Počítačové analýzy (programy CSS palm, myristoylator, Prosite, PSORT a další) predikující možné posttranslační modifikace ukázaly, mimo jiné, na cystein 10 VP1 BKV, který by mohl být palmitoylován. Velmi cenné výsledky by mohla poskytnout analýza „50 kDa“ proužku pomocí hmotnostní spektroskopie, která by ověřila jeho sekvenci i případné kovaletní modifikace. Získané hybridomy produkující monoklonální protilátky specifické proti hlavnímu strukturálnímu proteinu VP1 byly stabilní. Produkce protilátek byla zachována i po dvojnásobném zmrazení a rozmrazení hybridomových linií. Protilátky budou použity k identifikaci interakcí proteinu VP1 s virovými strukturami a se strukturami hostitelských buněk v průběhu replikačního cyklu viru.

6.2 Příprava expresních vektorů produkujících VP3 BKV jako fúzní proteiny s EGFP.

Pro studium vlastností a funkcí minoritního proteinu VP3 BK viru v savčích buňkách byly připraveny dva expresní vektory: i) pEGFP-C2-VP3, produkující protein VP3 připojený k C konci EGFP (EGFP-VP3) a ii) pEGFP-N1-VP3 produkující protein VP3 BKV připojený k N konci EGFP (VP3-EGFP). Díky fúzi s EGFP mohla být exprese fúzních proteinů ověřena již pouhým pozorováním lokalizace zeleného signálu EGFP v živých buňkách. Zatímco signál samostatně produkovaného proteinu EGFP byl rozptýlen rovnoměrně po celé buňce a bez známek membránové lokalizace (obr. 5.2.11.B), fúzní proteiny byly díky NLS proteinu VP3 cíleny především do jádra (obr. 5.2.10 a 5.2.11.A). To je v souladu s pozorováním CLEVER & KASAMATZU (1991) a GHARAKHANIAN *et al.*, (1987), kteří ukázali, že NLS minoritních proteinů SV40 postačuje pro jejich cílení do buněčného jádra a je tedy schopen tyto proteiny transportovat do jádra nezávisle na proteinu VP1 v

buňkách přirozených hostitelů. U myšního proteinu bylo naopak pozorováno v hmyzích buňkách, že aby byly minoritní proteiny cíleny do jader, je nutná ko-exprese genu pro VP1 (FORSTOVÁ *et al.*, 1993).

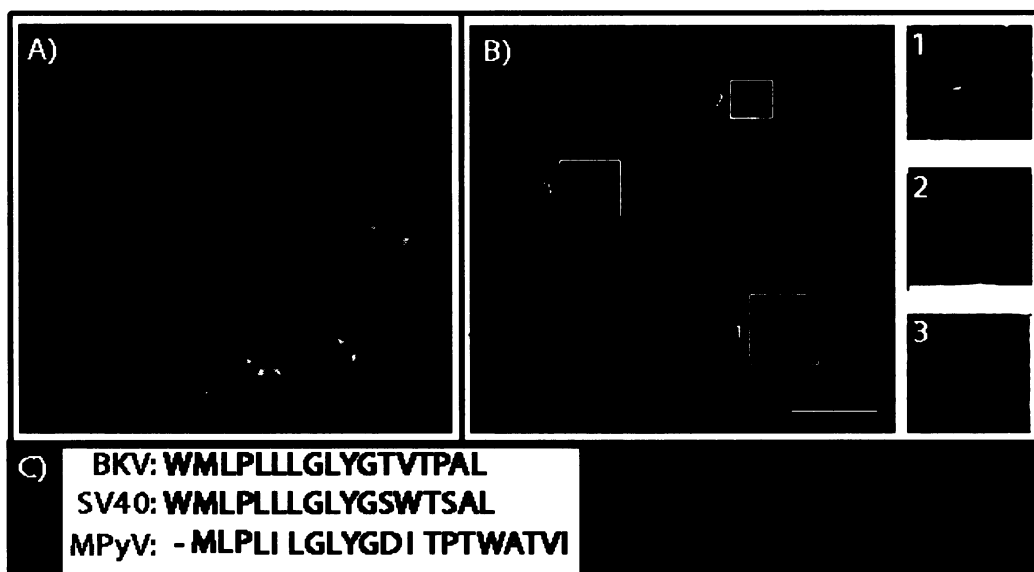
Produkce fúzních proteinů byla prokázána i nepřímou imunofluorescencí a metodou western-blot. Specifickým značením VP3 a EGFP bylo prokázáno, že jde skutečně o fúzní protein. Western-blot lyzátů buněk transfekovaných jednotlivými konstrukty prokázal přítomnost proužku o velikosti fúzního proteinu (55 kDa) s použitím jak protilátky proti EGFP, tak protilátky proti VP3. Na elektroforegramu „5.2.12“ byl v buňkách transfekovaných pEGFP-N1-VP3, kromě proužku o velikosti fúzního proteinu detekován protilátkou proti VP3 (viru SV40) ještě i proužek o velikosti cca 40 kDa. Protože se však nejedná o velikost proteinu VP3 bez EGFP, jde pravděpodobně o produkt degradace způsobený činností buněčných proteáz. Dalším důkazem proto, že v buňkách vzniká pouze fúzní produkt a ne samotné EGFP by byl úplný překryv signálů získaných metodou nepřímé imunofluorescence transfekovaných buněk s použitím protilátek proti VP3 a proti EGFP. Na obr. 5.2.11.B je vidět, že samotný EGFP je rozptýlen jak v jádře, tak i v cytoplasmě buněk. Oba produkty fúze VP3 a EGFP (obr. 5.2.11.A) byly cíleny téměř 100% do buněčného jádra. Nicméně signály získané protilátkami proti EGFP (zelená) a VP3 (červená) se v jádře zcela nepřekrývají. To by mohlo být způsobeno např. tím, že právě epitop rozpoznávaný protilátkou proti VP3 (jedná se sice o polyklonální protilátku, avšak získanou proti antigenu viru SV40, a nikoliv BKV) je v určitých lokalitách jádra nepřístupný pro interakci s protilátkou protože je angažován v jiných interakcích.

6.3 Cílení proteinu VP3 BK viru k buněčným strukturám.

Konstrukty pEGFP-C2-VP3 a pEGFP-N1-VP3 byly využity pro transfekce savčích buněk a sledování lokalizace fúzních proteinů v transfekovaných buňkách. Překvapivě, ani v jednom z provedených experimentů nebyly mezi buňkami transfekovanými jednotlivými konstrukty zaznamenány významné rozdíly. Nedávno získané výsledky naší laboratoře ukázaly, že protein VP3 myšního polyomaviru a také fúzní VP3-EGFP protein (ale nikoliv obrácená forma, EGFP-VP3) indukuje v buňkách apoptózu (HUERFANO *et al.*, nepublikované výsledky). Protože mnoho virů ovlivňuje programovanou buněčnou smrt přímou interakcí virových proteinů s mitochondriálními proteiny, popřípadě tvorbou pórů do mitochondriálních membrán, zajímalo nás, zda signál proteinu VP3 BK viru v buňkách nebude alespoň částečně kolocalizovat s membránami mitochondrií. Ačkoli jsme detekovali v buňkách fixovaných 24 hpt slabý signál VP3 v cytoplasmě, kolocalizace fúzního proteinu s markerem vnitřní mitochondriální membrány F1 ATPázou nebyla průkazná. V buňkách produkujících fúzní proteiny jsme pozorovali zvýšenou koncentraci mitochondrií v perinukleární oblasti. V předběžných měřeních cytotoxicity obou fúzních produktů (data neukázána), překvapivě nebylo detekováno více mrtvých buněk (3T3 fibroblasty) než v kontrolních buňkách produkujících pouze EGFP. To je v rozporu s výsledky získanými při studiu cytotoxicity proteinu VP3 myšního polyomaviru (HUERFANO *et al.*, nepublikované výsledky), kdy 24 hodin po transfekci expresním plazmidem nesoucím gen pro VP3-EGFP bylo 90% buněk mrtvých, na rozdíl od buněk produkujících obrácenou formu fúzního proteinu nebo samotné EGFP. Měření cytotoxicity proteinu VP3 BKV (a jeho fúzních forem), bude třeba zopakovat. Např. u myších 3T6 fibroblastů byla 24 hpt pozorována kondenzace buněčné DNA na jaderné periferii (obr. 5.3.9.). Cenná data by mohly přinést také

ultrastrukturální analýzy transfekovaných buněk, které by odhalily případné morfologické změny buněčných struktur a analýzy dalších markerů apoptózy či nekrózy.

V dalším pokusu jsme se zaměřili na sledování lokalizace fúzních proteinů vzhledem k endoplazmatickému retikulu. Nedávno získané výsledky naší laboratoře na paralelně zkoumaném myším polyomaviru prokázaly výraznou kolokalizaci proteinu VP3 MPyV s jadernou membránou a s membránami ER (obr. 6.3.1-A.). Protože minoritní proteiny MPyV obsahují ve svém C konci již zmíněný hydrofóbní α -helix schopný integrovat se do membrán a spolu s následujícím úsekem bazických aminokyselin fungovat jako viroporin, tzn. narušovat membrány, zajímalo nás, zdali, a jak moc, se tato oblast liší u VP3 BKV. Ukázalo se, že se analogické hydrofóbní sekvence téměř shodují u minoritních proteinů BKV a v SV40. Méně se však podobají té nalezené u MPyV (obr. 6.3.1-C). To by mohlo souviset se sníženou afinitou převážně jaderného proteinu VP3 BKV k cytoplazmatickým membránám ve srovnání s VP3 MPyV (6.3.1-B). Ačkoli sledování vzájemné lokalizace fúzních proteinů a markeru ER GRP94 neprokázalo, na rozdíl od myšního polyomaviru, přesvědčivou kolokalizaci, nekolokalizující, avšak zároveň těsně sousedící signály fúzních proteinů a GRP94 by mohly svědčit o časté komplementární distribuci obou proteinů v membráně ER.



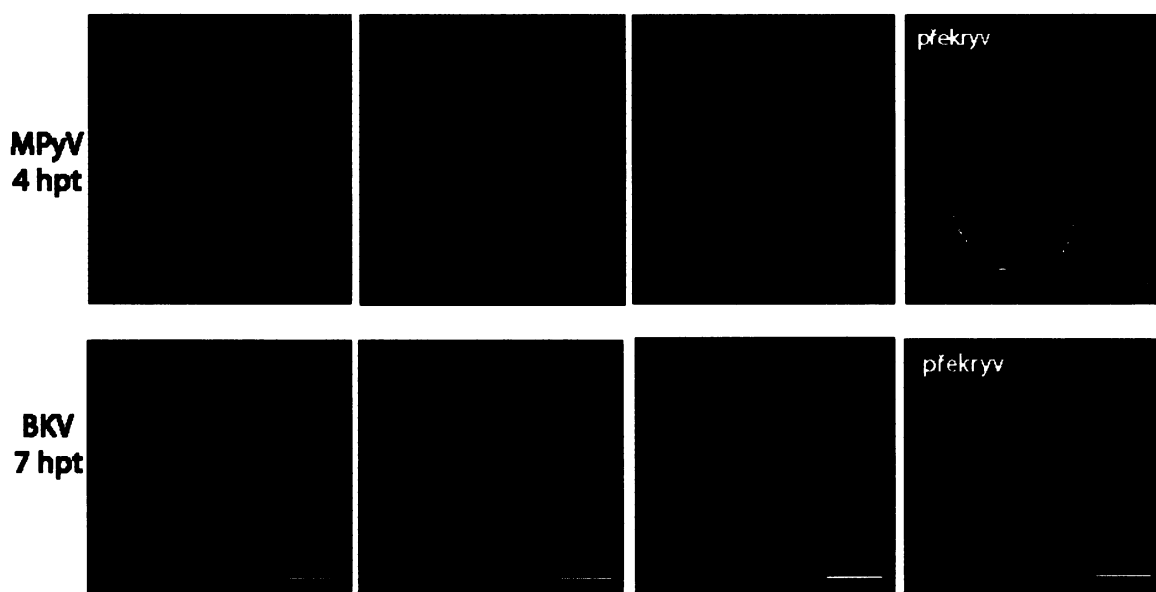
Obr. 6.3.1: Lokalizace fúzních proteinů VP3-EGFP a GRP94 (marker ER) po transfekci savčích buněk: (A) MPyV, buňky 3T3 byly fixovány 4 hpt, (HUERFANO, nepublikované výsledky). (B) BKV, buňky VERO byly fixovány 24 hpt. Použité protilátky: kuřecí protilátka proti proteinu EGFP v kombinaci se kozí sekundární protilátkou proti kuřecím imunoglobulinům konjugovanou s AF488 a krysí protilátka proti GRP94 v kombinaci s kozí protilátkou proti krysím imunoglobulinům konjugovanou s AF546. V bílých rámečkách jsou zvětšené výřezy (1-3) se zesíleným signálem. Překryv je s DAPI. Měřítka=5 μ m. C) Srovnání aminokyselinové sekvence transmembránových helixů BK viru, viru SV40 a myšního polyomaviru (MPyV), červeně jsou vyznačeny aminokyselinové záměny.

Interakce proteinu VP3 s membránami ER byla nedávno detekována u příbuzného viru SV40 (DANIELS *et al*, 2006). V této práci autoři prokázali, že jsou-li minoritní proteiny SV40 exprimovány samostatně bez proteinu VP1, integrují se posttranslačně do membrán ER. To podporuje jejich hypotézu, že minoritní proteiny SV40 oligomerizují v membránách ER a tvoří v nich póry, které by mohly sloužit k dopravě virového genomu z lumen ER do cytoplazmy a následně, přes jaderné póry do jádra. Protože lokalizace VP3

BKV v ER námi nebyla potvrzena ani vyvrácena, navrhuji analýzy na živých buňkách s použitím sondy ER-tracker, popřípadě nepřímou imunofluorescencí s použitím jiného markeru ER (např. Bip chaperon).

Protože na rozdíl od minoritních proteinů myšího polyomaviru, minoritní proteiny BKV interagují svou C-koncovou doménou (která u minoritních proteinů polyomaviru chybí) nespecificky s DNA, zajímalo nás, zdali se tato skutečnost odrazí v rozdílné lokalizaci VP3 BKV a VP3 myšího polyomaviru v jádře. Chtěli jsme zjistit, zda je VP3 BKV cílen také do jaderné membrány a laminy jako VP3 MPyV. Proto jsme se v dalších pokusech zaměřili na sledování vzájemné lokalizace jaderných struktur a fúzních proteinů VP3-EGFP a EGFP-VP3.

Barvení transfekovaných buněk protilátkou proti laminu B odhalilo, že jsou fúzní proteiny VP3 BKV lokalizovány nejen pod jadernou membránou, ale i pod vrstvou laminy, s kterou prakticky nekolokalizovaly. To je rozdíl od buněk transientně produkujících VP3-EGFP myšího polyomaviru, který s vrstvou laminy výrazně kolokalizoval (obr. 6.3.2).



Obr. 6.3.2: Lokalizace proteinu VP3-EGFP a laminu B po transfekci savčích buněk. (A) MPyV, buňky 3T3 byly fixovány 4 hpt, (HUERFANO, nepublikované výsledky) (B) buňky 3T6 byly fixovány 7 hpt. Použité protilátky: králičí polyklonální protilátka proti proteinu EGFP v kombinaci s kuřecí sekundární protilátkou proti králičím imunoglobulinům konjugovanou s AF488 a kozí protilátka proti laminu B v kombinaci s oslí protilátkou proti kozím imunoglobulinům konjugovanou s AF546. DNA byla barvena DAPI. Měřítko=5 μ m.

Na rozdíl od myšího polyomaviru, byl u buněk exprimujících fúzní minoritní proteiny BKV pozorován přerušovaný a nepravidelný signál laminy, který by mohl svědčit o jejím narušení. Tento jev nebyl pozorován u buněk kontrolních (netransfekovaných nebo exprimujících samotné EGFP). Narušení laminy je typické například pro infekci herpesviry a parvoviry. Herpesviry se z jádra dostávají vypučením skrz vnitřní jadernou membránu v procesu, který je označován jako „primární zabalení“ (DARLINGTON & MOSS, 1968). Odchod nukleokapsid z jádra v pozdní fázi infekce je doprovázen rozpadem jaderného laminy na periferii jádra (OSTERRIEDER *et al.*, 1998, SCOTT & O’HARE, 2001). Mnoho experimentů prokázalo, že pro rozpad jaderné laminy a pro průchod virionů z jádra do cytoplazmy je nezbytná interakce herpesvirových proteinů

s laminem. U buněk infikovaných herpesvirem „HSV-1“ ukázaly imunofluorescenční studie trhliny v lamině. Rozmístění laminu na periferii jádra bylo v těchto buňkách nepravidelné, nespojitě a různé hustoty (SCOTT & O'HARE, 2001). Protože jsme u některých buněk produkujících VP3-EGFP BKV pozorovali tvorbu útvarů, možná membránových váčků, vyčnívajících z jádra a obsahujících DNA, protein VP3, ale nikoli lamin B, mohli bychom spekulovat o tom, že protein VP3 BKV porušuje jaderný obal, aby pomohl novým virionům dostat se z jádra směrem k buněčnému povrchu. U myšího polyomaviru se v pozdních fázích infekce hromadí nově poskládané viriony v jádrech infikovaných buněk. Protože replikační cyklus MPyV končí smrtí infikované buňky, existovala hypotéza, že po nahromadění nových virionů v jádře jádro praskne a viriony se uvolní. V naší laboratoři však byla učiněna pozorování, svědčící o tom, že destrukce buněčného jádra v pozdní fázi infekce není procesem pasivním. Například na ultratenkých řezech buněk v pozdních stádiích infekce byly elektronovým mikroskopem pozorovány váčky, zvenku dekorované viriony. Ty mohly být patrně odvozeny a uvolňovány z jaderné membrány. MANINOVÁ (2007) pozorovala, že hlavní strukturální protein VP1 myšího polyomaviru se kromě jádra vyskytuje také v cytoplasmě, kde tvoří v pozdní fázi infekce (nebo v pozdějších hodinách samostatné produkce) vláknité struktury. Konfokální mikroskopie a subfrakcionace buněk *in situ* prokázala, že v těchto vláknech kolokalizují protein VP1, lamin A/C a také pleiotropní buněčný regulátor a protein vázající se k jaderné matrix, YY1. Zároveň bylo pozorováno v těchto buňkách narušení jaderné membrány, zmizení histonu H1 a detekce některých rozpustných jaderných proteinů v cytoplasmě (BOUŘA, 2004). Protože se tento jev vyskytuje i v buňkách produkujících pouze VP1, MANINOVÁ (2007) usoudila, že hlavní strukturální protein VP1 MPyV je zodpovědný za narušení jaderného obalu v pozdní fázi infekce. Bude zajímavé zjistit, zda jsou za rozrušení jaderných membrán u BKV odpovědné minoritní proteiny, a zda se na tom nepodílí také hlavní strukturální protein VP1.

V buňkách transfekovaných fúzními proteiny VP3-EGFP a EGFP-VP3 BKV jsme pozorovali přesvědčivou kolokalizaci proteinu VP3 s buněčnou DNA (barvenou DAPI). Ta se ukázala především v čase 24 hodin po transfekci, kdy měla většina buněk kondenzovaný chromatin podobný tomu, jaký bývá pozorován u apoptotických buněk. Nicméně skutečnost, že se DNA často kumulovala na periferii jaderné membrány, kde interagovala s proteinem VP3 by mohla nasvědčovat tomu, že by se nemuselo nutně jednat o projev začínající apoptózy. Když CLEVER *et al*, 1993 identifikovali DNA vazebnou doménu v C konci minoritních proteinů VP2 a VP3 SV40, všimli si, že 40 C-koncových aminokyselin má kromě schopnosti vázat DNA i schopnost DNA kondenzovat. Toto pozorování diskutují v souvislosti s morfogenezí virionů a procesem enkapsidace virové DNA. Kondenzací a akumulací buněčné DNA by se protein VP3 mohl také snažit zajistit v buněčném jádře prostor pro replikaci a transkripci virové DNA, popřípadě pro morfogenezi nových virových částic. Některé γ -herpesviry mají schopnost indukovat kondenzaci chromozomu činností virem kódovaných kináz. To, podle autorů (LEE *et al*, 2007), svědčí o novém mechanismu, kterým tyto viry navozují předčasné mitotické události, aby zajistily více extrachromozomálního prostoru pro replikaci virové DNA a úspěšný odchod nukleokapsid z jádra. Pozorované změny v kondenzaci chromatinu a v jaderné lamině spolu s dalšími jevy pozorovanými konfokální mikroskopií budou dále ověřovány pomocí ultrastrukturálních analýz transfekovaných buněk elektronovou mikroskopií a studiem protein-proteinových interakcí.

Poslední zahájený pokus byl zaměřen na sledování vzájemné lokalizace proteinů VP3 fúzovaných s EGFP a jaderných sub-domén, PML tělísek. K tomu nás vedla skutečnost, že mnoho virů replikujících se v buněčném jádře má schopnost buď ničit PML tělíska, nebo je naopak využívat ke genové expresi či k morfogenezi virionů. U příbuzného lidského polyomaviru JC (viz 2.2.9) bylo zjištěno, že se strukturální proteiny tohoto viru kumulují v PML tělískách, kde probíhá morfogeneze virionů (SHISHIDO-HARA *et al.*, 2004). U MPyV a viru SV40 bylo naopak pozorováno, že se v bezprostředním sousedství PML tělísek nacházejí replikující se a možná i transkribované virové genomy, spolu s časným virovým proteinem LT antigenem (ISHOV & MAUL, 1996). Ačkoli jsme nepozorovali přesvědčivou kolokalizaci fúzních proteinů VP3 viru BK s PML tělísky, všimli jsme si redukce počtu těchto tělísek vzhledem k netransfekovaným buňkám. Protože tato redukce byla pozorována i u buněk produkujících samotný EGFP, mohla by souviset spíše s procesem transfekce, nebo nadměrnou heterologní expresí, než s funkcí proteinu VP3. Zajímavé bylo, že se PML tělíska často akumulovala společně s buněčnou DNA a VP3 v kroužcích, pravděpodobně kolem jadérek. Tato akumulace nebyla pozorována u kontrolních buněk exprimujících protein EGFP. Asociace PML-tělísek s jádřky byla popsána u buněk hMSC (human mesenchymal stem cells) (ROSSMEISLOVÁ, 2007). V této práci byla detekována PML tělíska v těsné blízkosti aktivních jadérek. PML tělíska jsou často spojována s deregulací nádorových buněk *in vivo*. Pozorované spojení PML tělísek s aktivními jádřky by podle autorky mohlo svědčit o jednom z běžných mechanismů, důležitých pro aktivity jadérek. Tato asociace nebývá u nádorových buněk nacházena nebo bývá redukována (ROSSMEISLOVÁ, 2007). Význam námi pozorované akumulace PML tělísek, proteinu VP3 a buněčné DNA bude dále zkoumán. Ačkoli je tato diplomová práce spíše přípravného charakteru, doufám, že bude plně zúročena během dalšího plánovaného pokračování studia BK viru.

7. SOUHRN

A. Příprava monoklonálních protilátek proti strukturním proteinům polyomaviru BK.

- ❖ Byl zkonstruován rekombinantní bakulovirus (rBac-VP2 BKV) pro produkci minoritního strukturního proteinu VP2 BK viru fúzovaného s histidinovou kotvou v hmyzích buňkách.
- ❖ Produkce fúzního proteinu His-VP2 BKV po transfekci hmyzích buněk rekombinantním bacmidem byla ověřena imunologickou detekcí proteinu VP2 BKV metodou western blot a nepřímou imunofluorescencí
- ❖ Byly učiněny pokusy izolovat fúzní protein His-VP2 z hmyzích buněk afinitní chromatografií a fázovou separací membránových proteinů tritonem-x-114. Vzhledem k velké nerozpustnosti VP2, nebyly výtěžky izolace dostatečné pro imunizaci myší.
- ❖ K izolaci VP3 byly použity pseudokapsidy (VLPs) složené z hlavního strukturního proteinu VP1 a minoritního proteinu VP3:
 - a) VP1/3 VLPs byly z hmyzích buněk izolovány centrifugací v hustotním gradientu.
 - b) Protein VP3 byl z VP1/3 VLPs izolován v denaturovaném stavu, po rozdělení obou proteinů na SDS-PAAGE, elektroelucí.
- ❖ Izolovaný protein VP3 BKV byl použit jako antigen pro imunizaci 2 myší kmene Balb/c.
- ❖ Byly selektovány myší monoklonální protilátky z myši. č. 2 proti antigenu VP3 BKV a ukázalo se, že:
 - a) Myš tvořila protilátky nejen proti proteinu VP3, ale také proti proteinu VP1 BK viru.
 - b) Získané hybridomové klony produkující imunoglobuliny proti proteinu VP3 BKV byly nestabilní a po měsíci pasážování v tkáňové kultuře schopnost produkce protilátek ztratily.
 - c) Byl získán stabilní klon produkující protilátku proti hlavnímu strukturnímu proteinu VP1. Tato protilátka je použitelná pro imunodetekci VP1 metodou western blot i pro detekci VP1 v buňkách metodou nepřímé imunofluorescence.

B. Konstrukce plazmidů pro expresi VP3 BKV fúzovaných s EGFP.

- ❖ Byly zkonstruovány 2 rekombinantní plazmidy pro produkci proteinu VP3 fúzovaného s EGFP v savčích buňkách:
 - a) Plazmid EGFP-C2-VP3 pro produkci EGFP-VP3
 - b) Plazmid EGFP-N1-VP3 pro produkci VP3-EGFP

- ❖ **Konstrukty byly charakterizovány sekvenční analýzou a produkce fúzních proteinů po transfekci savčích buněk byla ověřena:**
 - a) v lyzátech transfekovaných savčích buněk metodou western blot jak protilátkou proti VP3, tak i proti EGFP
 - b) v savčích buňkách fluorescenční mikroskopii.

- ❖ **Konstrukty byly použity pro sledování lokalizace fúzních proteinů EGFP-VP3 a VP3-EGFP v opičích a myších buňkách metodou konfokální mikroskopie. Přitom se ukázalo, že**
 - a) Oba fúzní produkty byly cíleny převážně do buněčného jádra pod vrstvu jaderné laminy (na rozdíl od samotného EGFP, který byl rovnoměrně rozptýlen v celé buňce
 - b) V buňkách transfekovaných fúzními proteiny (ale nikoli v netransfekovaných buňkách nebo v buňkách transfekovaných samotným EGFP) bylo prokázáno výrazné narušení jaderné laminy.
 - c) Minoritní část proteinů, kterou bylo možno detekovat v cytoplasmě přesvědčivě nekolocalizovala ani s membránami ER ani s membránami mitochondrií.
 - d) Oba fúzní proteiny kolocalizovaly v jádře s buněčnou DNA. DNA byla v přítomnosti fúzních proteinů často kondenzována na periferii jádra pod vrstvou jaderné laminy.
 - e) V některých buňkách produkujících fúzní proteiny byl pozorována lokalizace (fúzovaného) VP3, DNA a PML tělísek v kroužcích patrně kolem jadérek.

8. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

KAPITOLA 8: SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

- An, K., Gillock, E. T., Sweat, J. A., Reeves, W. M., Consigli, R. A. (1999):** Use of the baculovirus system to assemble polyomavirus capsidlike particles with diáerent polyomavirus structural proteins : analysis of the recombinant assembled capsid-like particles. *J Gen Virol*, 80:1009-1016.
- Ashok, A., Atwood, W. J. (2003):** Contrasting roles of endosomal pH and the cytoskeleton in infection of human glial cells by JC virus and Simian virus 40. *J Virol*, 77:1347-1356.
- Atwood, W. J., Norkin, L. C. (1989):** Class I major histocompatibility proteins as cell surface receptors for simian virus 40. *J Virol*, 63:4474-4477.
- Baker, T. S., Drak, J., Bina, M. (1989):** The capsid of small papova viruses contains 72 pentameric capsomeres: direct evidence from cryo-electron-microscopy of simian virus 40. *Biophys J*, 55:243–253.
- Barouch, D. H., Harrison, S. C. (1994):** Interactions among the major and minor coat proteins of polyomavirus. *J Virol*, 68:3982–3989.
- Birnboim, H. C., Doly, J. (1979):** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7:1513.
- Bordier, C. (1980):** Phase separation of integral membrane proteins in triton x-114 solution. *J Biol Chem*, 256:1604-1607)
- Bouřa, E. (2004):** Studium minoritních strukturních proteinů myšního polyomaviru. *diplomová práce PřF UK Praha, katedra genetiky a mikrobiologie, laboratoř molekulární virologie.*
- Bradford, M. M. (1976):** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248-254.
- Cai, X., Chang, D., Rottinghaus, S., Consigli, R. A. (1994):** Expression and purification of recombinant polyomavirus VP2 protein and its interactions with polyomavirus proteins. *J Virol*, 68:7609–7613.
- Carr, M. J., McCormack, G. P., Mutton, K. J., Crowley, B. (2006):** Unique BK virus non-coding control region (NCCR) variants in hematopoietic stem cell transplant recipients with and without hemorrhagic cystitis. *J Med Virol.*, 78:485-93
- Caruso, M., Belloni, L., Sthandier, O., Amati, P., Garcia, M. I. (2003a):** Alpha4beta1 integrin acts as a cell receptor for murine polyomavirus at the postattachment level. *J Virol*, 77:3913-3921.
- Caruso, M., Cavaldesi, M., Gentile, M., Sthandier, O., Amati, P., Garcia, M. I. (2003b):** Role of sialic acid-containing molecules and the alpha4beta1 integrin receptor in the early steps of polyomavirus infection. *J Gen Virol.*, 84:2927-36.
- Cassil J., Deyerle K., Subramani S. (1989):** Unidirectional deletion and linker scan analysis of the late promoter of the human polyomavirus BK. *Virol*, 169: 172–181.
- Cavaldesi, M., Caruso, M., Sthandier, O., Amati, P., Garcia, M. I. (2004):** Conformational changes of murine polyomavirus capsid proteins induced by sialic acid binding. *J Biol Chem.*, 279:41573-41579
- Chang, D., Haynes II, J. I., Brady, J. N., Consigli, R. A. (1992a):** The use of additive and subtractive approaches to examine the nuclear localisation sequence of the polyomavirus major capsid protein VP1. *Virol*, 189:821-827.
- Chang, D., Haynes II, J. I., Brady, J. N., Consigli, R. A. (1992b):** Identification of nuclear localization sequence in the polyomavirus capsid protein VP2. *Virol*, 191:978-983.

KAPITOLA 8: SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

- Chang, D., Cai, X., Consigli, R. A. (1993):** Characterisation of the DNA binding properties of polyomavirus capsid protein. *J Virol.* 67:6327-6331.
- Chen, X. S., Stehle, T., Harrison, S. C. (1998):** Interaction of polyomavirus internal protein VP2 with major capsid protein VP1 and implications for participation of VP2 in viral entry. *EMBO J*, 17:3233-3240.
- Chen Y, Sharp, P. M., Fowkes, M., Kocher, O., Joseph, J. T., Koralnik, I. J. (2004):** Analysis of 15 novel full-length BK virus sequences from three individuals: evidence of a high intra-strain genetic diversity. *J Gen. Virol.* 85:2651–2663.
- Chromy, R. L., Pipas, J. M., Garcea, R. L. (2003):** Chaperone-mediated in vitro assembly of polyomavirus capsids. *PNAS*, 100:10477-10482.
- Clarke, R., Dickson, R. B. Lippman, M. E. (1991):** The role of steroid hormones and growth factors in the control of normal and malignant breast. *Nuclear Hormone Receptors*, pp.297±319. Edited by M. G Parker. London: *Academic Press*.
- Clever, J., Kasamatsu, H., (1991):** Simian virus 40 Vp3 structural proteins harbor their own nuclear localization signal. *Virol.*, 181:78–90.
- Clever, J., Dean, D., Kasamatsu, H. (1993):** Identification of a DNA binding domain in simian virus 40 capsid proteins Vp2 and Vp3. *J Biol Chem*, 268:20877–20883.
- Cole, C. N. (1996):** Polyomavirinae: The viruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. *Fundamental virology*, 3rd edn. Philadelphia: *Lippincott, Williams & Wilkins*. pp 917–946.
- 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. *J Virol.*, 69:7807-13.
- Dalyot-Herman, N., Ben-nun-Shaul, O., Gordon-Shaag, A., Oppenheim, A. (1996)** The simian virus 40 packaging signal ses is composed of redundant DNA elements which are partly interchangeable. *J Mol Biol*, 259:69-80.
- Daniel, A. M., Swenson, J. J., Mayreddy, R. P., Khalili, K., Frisque, R. J. (1996):** Sequences within the early and late promoters of archetype JC virus restrict viral DNA replication and infectivity. *Virol* 216(1):90–101.
- Daniels, R., Rusan, N. M., Wadsworth, P., Hebert, D. N. (2006b):** SV40 VP2 and VP3 Insertion into ER Membranes Is Controlled by the Capsid Protein VP1: *Mol. Cell*, 24:955–966.
- Daniels, R., Rusan, N. M., Wilbuer, A. K., Norkin, L. C., Wadsworth, P., Hebert, D. N. (2006a).** Simian virus 40 late proteins possess lytic properties that render them capable of permeabilizing cellular membranes. *J. Virol.*, 80:6575–6587.
- Daniels, R., Sadowicz, D., Hebert, D. N. (2007):** A very late viral protein triggers the lytic release of SV40. *PLoS Pathog*, 3:e98.
- Darlington, R. W., Moss, L. H. (1968):** Herpesvirus envelopment. *J Virol*, 2:48-55.
- Das, D., Wojno, K., Imperiale, M. J. (2008):** BK virus as cofactor in the etiology of prostate cancer in its early stages. *J Virol*, 82: 2705-2714.
- Dean, D. A., Li, P. P., Lee, L. M., Kasamatsu, H. (1995):** Essential role of the Vp2 and Vp3 DNA-binding domain in simian virus 40 morphogenesis. *J Virol.*, 69:1115-21

KAPITOLA 8: SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

- Delos, S. E., Cripe, T. P., Leavitt, A. D., Greisman, H., Garcea, R. L. (1995):** Expression of the polyomavirus minor capsid proteins VP2 and VP3 in *Escherichia coli*: in vitro interactions with recombinant VP1 capsomeres. *J Virol*, 69:7734–7742.
- Demeter, L. M. (2000):** Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. JC, BK, and other polyomaviruses; progressive multifocal leukoencephalopathy. *Philadelphia: Churchill Livingstone*. p 1645.
- Dhar, R, Subramanian, K. N., Pan, J., Weissman, S. M. (1977):** Structure of a large segment of the genome of simian virus 40 that does not encode known proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74:827–831.
- Dower, W. J., Miller, J. F., Ragsdale, Ch. W.(1988):** High efficiency transformation of E coli by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res*, 16:6127-6145.
- Drachenberg, C. B., Papadimitriou, J. C., Wali, R., Cibitt, C. L., Ramos, E. (2003):** BK polyoma virus allograft nephropathy: ultrastructural features from viral cell entry to lysis. *AmJ Transplant*, 3:1383-1392.
- Dugan, A., Eash, S., Atwood, W. J. (2005):** A N-linked glycoprotein with alpha(2,3)-linked sialic acid is a receptor of BK virus. *J Virol*, 79: 14442–14445.
- Eash, S., Querbes, W., Atwood, W. J. (2004):** Infection of Vero cells by BK virus is dependent on caveolae. *J Virol*, 78: 11583–11590
- Eash, S., Atwood, W. J. (2005):** Involvement of cytoskeletal components in BK virus infectious entry. *J Virol*, 79: 11734–11741.
- Eash, S., Manleyb, K., Gasparovicb, M., Querbesa, W., Atwood, W. J.(2006):** The human polyomaviruses. *Cell Mol Life Sci*, 63:865–876.
- Everett , R. D.(2001):** DNA viruses and viral proteins that interact with PML nuclear bodies. *Oncogene* 20: 7266-7273.
- Fields (2007) Virology. The fifth edition, volume two, kapitola:Polyomaviridae, Imperiale, M. J., Major, E. O., Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer Business, Philadelphia PA 19106 USA**
- Fioriti, D, Degener, A. M., Mischitelli, M., Videtta, M., Arancio, A., Sica, S., Sora, F., Pietropaolo, V. (2005):** BKV infection and hemorrhagic cystitis after allogeneic bone marrow transplant. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 18:309–316.
- Fiority, D., Videtta, M., Mischitelli, M., Degener, A. M., Russo, G., Giordano, A., Pietropaolo, V.(2005):**Human Polyomavirus BK: Potential Role in Cancer. *J Cell Physiol*, 204:402-406.
- Forstová, J., Krauzewicz, N., Wallace, S., Street, A. J., Dilworth, S. M., Beard, S., Griffin, B. E. (1993):** Cooperation of structural protein during late events in the life cycle of polyomavirus. *J Virol*,54:311-316.
- 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*, 6:297±306
- Frisque, R. L., Brea, G. L., Cannella, M. T. (1984):** Human polyomavirus JC virus genom. *J Virol*, 51:458-469.
- Garcea, R. L., Benjamin, T. L. (1983):** Isolation and characterization of polyoma nucleoprotein complexes. *Virology*, 130:65-75.
- Garcea, R. L., Salunke, D. M., Caspaar, D. L. (1987):** Site-directed mutation affecting polyomavirus capsid self-assembly in vitro. *Nature*, 329:86-87.

KAPITOLA 8: SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

- Gardner, S. D., Field, A. M., Coleman, D. V., Hulme, B. (1971):** New human papovavirus (BK) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet*, 1:1253–1257
- Garnier, J, Osguthorpe, D. J, Robson, B. (1978):** Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. *J Mol Biol* 120:97–120.
- Genevaux, P., Lang, F., Schwager, F., Vartikar, J. V., Rundell, K., Pipas, J. M., Georgopoulos, C., Kelley, W. L. (2003):** Simian virus 40 T antigens and J domains: analysis of Hsp40 cochaperone functions in *Escherichia coli*. *J Virol.*, 77:10706-13.
- Gharakhanian, E., Takahashi, J., Kasamatsu, H. (1987):** The carboxy 35 amino acids of SV40 VP3 are essential for its nuclear accumulation. *Virology*, 157:440-448.
- Gharakhanian, E., Takahashi, J., Clever, J., Kasamatsu, H. (1988):** In vitro assay for protein-protein interaction: carboxyl-terminal 40 residues of simian virus 40 structural protein VP3 contain a determinant for interaction with VP1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85:6607–6611.
- Gharakhanian, E., Kasamatsu, H. (1990):** Two independent signals, a nuclear localization signal and a Vp1-interactive signal, reside within the carboxy-35 amino acids of SV40 Vp3. *Virology*, 178:62–71.
- Gilbert, J. M., Benjamin, T. L. (2000):** Early steps of polyomavirus entry into cells. *J Virol*, 74:8582-8588.
- Gilbert, J. M., Goldberg, I. G., Benjamin, T. L. (2003):** Cell penetration and trafficking of polyomavirus. *J Virol*, 77:2615-2622.
- Gordon-Shaag, A., Ben-nun-Shaul, O., Kasamatsu, H., Oppenheim, A. (1998):** The SV40 capsid protein VP3 cooperates with the cellular transcription factor Sp1 in DNA-binding and in regulating viral promoter activity. *J. Mol. Biol.*, 275:187-195.
- Gordon-Shaag, A., Ben-nun-Shaul, O., Roitman, V., Yosef, Y., Oppenheim, A. (2002):** Cellular transcription factor Sp-1 recruits the SV40 capsid proteins to the viral packaging signal sites. *J Virol*, 76:5915-5924.
- Gordon-Shaag, A., Yosef, Y., El-Latif, M. A., 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. *J Virol*, 77:4273-4282.
- Goudsmit, J., Wertheim-van Dillen, P., van Strien, A., van der Noorde, J. (1982):** The role of BK virus in acute respiratory tract disease and the presence of BKV DNA in tonsils. *J Med Virol*, 10:91-99.
- Griffith, J. P., Griffith, D. L., Rayment, I., Murakami, T., Caspar, D.L.D (1992):** Inside polyomavirus at 25-Å resolution. *Nature*, 355:652–654.
- Harlow, E., Lane, D. (1988):** Antibodies a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory*
- Harris, K. F, Christensen, J. B, Imperiale, M. J. (1996):** BK virus large T antigen: Interactions with the retinoblastoma family of tumor suppressor proteins and effects on cellular growth control. *J Virol* ,70:2378–2386.
- Harris, K. F., Chang, E., Christensen, J. B., Imperiale, M. J. (1998a):** BK virus as a potential co-factor in human cancer. *Dev Biol Stand*, 94: 81–91.
- Harris, K. F, Christensen, J. B, Radany, E. H, Imperiale, M. J. (1998b):** Novel mechanisms of E2F induction by BK virus large-T antigen: Requirement of both the pRb-binding and the J domains. *Mol Cell Biol* 18:1746–1756.

KAPITOLA 8: SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

- Hirsch, H. H.:** Polyomavirus BK nephropathy (2002): A (re-)emerging complication in renal transplantation. *Am J Transplant*, 2:25–30.
- Hirsch, H. H., Steiger, J. (2003):** Polyomavirus BK. *Lancet Infect Dis*, 3: 611–23.
- Imperiale, M. J. (2000):** The human polyomaviruses, BKV and JCV: Molecular pathogenesis of acute disease and potential role in cancer. *Virology*, 267(1):1–7.
- Ishizu, K.I., Watanabe, H., Han, S. I., Kanesashi, S. N., Hoque, M., Yajima, H., Kataoka, K., Handa, H. (2001):** Roles of disulfide linkage and calcium ion-mediated interactions in assembly and disassembly of virus-like particles composed of simian virus 40 VP1 capsid protein. *J Virol.*, 75:61-72.
- Ishov, A. M., Maul, G. G.(1996):** The periphery of nuclear domain 10 (ND10) as site of DNA virus deposition. *J Cell Biol*, 134:815-826.
- Jackson, V, Chalkley, R. (1981):** Use of whole-cell fixation to visualize replicating and maturing simian virus 40: Identification of new viral gene product. *Proc Natl Acad Sci USA*, 78:6081–6085.
- Jay, G., Nomura, S., Anderson, C. W., Khoury, G. (1981):** Identification of the SV40 agnogene product: A DNA binding protein. *Nature* 291:346–349.
- Jul-Larsen, A, Visted, V, Karlsen, B. O., Rinaldo, Ch. H., Bjerkvig, R., Lonning, P. E., Boe, S. O. (2004):** PML-nuclear bodies accumulate DNA in response to polyomavirus BK and simian virus 40 replication. *Exp Cell Res*, 298:58-73.
- Kanesashi, S. N., Ishizu, K. I., Kawano, M. A., Han, S.I., Tomita, S., Watanabe, H., Kataoka, K., Hanada, H.(2003)** Simian virus 40VP1 capsidprotein formspolymorphic assemblies in vitro. *J Gen Virol*,84:1899-1905.
- Kasamatsu, H., Nehorayan, A. (1979):** VP1 affects intracellular localization of VP3 polypeptide during simian virus 40 infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76:2808–2812.
- Kasamatsu, H., Nakanishi A. (1998):** How do animal DNA viruses get to the nucleus? *Annu Rev Microbiol*, 52: 627–686
- Kawano, M., Inoue, T., Tsukamoto, H., Takaya, T., Enomoto, T., Takahashi, R., 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. *J Biol Chem*. 281:10164–10173
- Khalili, K., White, M. K., Sawa, H., Nagashima, K., Safak, M.(2005):** The Agnoprotein of Polyomaviruses A Multifunctional Auxiliary Protein. *J Cell Physiol*, 204:1–7.
- Knowles, W. A. (2001):** The epidemiology of BKvirus and the occurrence of antigenic and genomic subtypes. In: Khalili K, Stoner GL, editors. Human polyomaviruses: Molecular and clinical perspectives. New York: Wiley, pp 527–559.
- Knowles, W. A., Pipkin, P., Andrews, N., Vyse, A., Minor, P., Brown, D. W., Miller, E. (2003):** Population-based study of antibody to the human polyomaviruses BKV and JCV and the simian polyomavirus SV40 *J Med Virol.*, 71:115-23.
- Köllner, G., Milstein, C. (1975):** Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256 :495-497.
- Krauzewicz, N., Streuli, C. H., Stuart-Smith, N., Jones, M. D., Wallace, S., Griffin, B. E. (1990):** Myristylated polyomavirus VP2: role in the life cycle of the virus. *J Virol*, 64:4414-4420.

KAPITOLA 8: SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

- Le Gall, S., Neuhof, A., Rapoport, T. (2004):** The endoplasmic reticulum membrane is permeable to small molecules. *Mol Biol Cell*, 15: 447–455.
- Lee, W., Langhoff, E. (2002):** Polyomavirus and human cancer. *Graft*, 5: 73-81.
- Lee, Ch. P., Chen, J. Y., Wang, J. T., Kimura, K, Takemoto, A., Lu, Ch. Ch., Chen, M. R. (2007):** Epstein-Barr virus BGLF4 kinase induces premature chromosome condensation through activation of condensin and topoisomerase II. *J Virol*, 81:5166-5180.
- Leuenberger, D., Andresen, P. A., Gosert, R., Binggeli, S., Ström, E. H., Bodaghi, S., Rinaldo, C.H., Hirsch, H. H. (2007):** Human polyomavirus type 1 (BK virus) agnoprotein is abundantly expressed but immunologically ignored. *Clin Vaccine Immunol.*, 14:959-68.
- Li, M., Garcea, R. L. (1994):** Identification of the threonine phosphorylation sites on the polyomavirus major capsid protein VP1: relationship to the activity of middle T antigen. *J Virol*, 68:320-327.
- Li, M., Delos, S. E., Montross, L., Garcea, R. L. (1995):** Polyomavirus VP1 phosphorylation: coexpression with the VP2 capsid protein modulates VP1 phosphorylation in Sf9 insect cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 92:5992-5996.
- Li, P.P., Nakanishi, A., Shum, D., Sun, P. C., Salazar, A. M., Fernandez, S. W., Chan, S. W., Kasamatsu, H. (2001):** Simian virus 40 VP1 DNA binding domain is functionally separable from the overlapping nuclear localization signal and is required for effective virion formation and full viability. *J Virol*, 75:7321-7329.
- Li, P. P., Nakanishi, A., Tran, M. A., Ishizu, K., Kawano, M., Phillips, M., Handa, H., Liddington, R. C., Kasamatsu, H. (2003):** Importance of Vp1 calcium-binding residues in assembly, cell entry, and nuclear entry of simian virus 40. *J Virol*, 77:7527–7538.
- Li, T. C., Takeda, N., Kato, K., Nilsson, J. Xing, L, Haag, L., Cheng, R. H., Miyamura, T. (2003a):** Charakterization of self-assembled virus-like particles of human polyomavirus BK generated by recombinant baculoviruses. *Virology*, 311:115-124.
- Li, P. P., Nakanishi, A., Fontanes, V., Kasamatsu, H. (2005):** Pairs of Vp1 cysteine residues essential for simian virus 40 infection. *J Virol*, 79:3859–3864.
- Liddington, R C., Yan, Y., Moulai, J, Sahli, R., Benjamin, T. L., Harrison, S. C.(1991):** Structure of simian virus 40 at 3,8-Å resolution. *Nature*, 354: 278-284.
- Lin, W., Hata, T., Kasamatsu, H. (1984):** Subcellular distribution of viral structural proteins during simian virus 40 infection. *J Virol*, 50:363–371.
- Lin, W., J. Shurgot, and H. Kasamatsu. (1986):** The synthesis and transport of SV40 structural proteins. *Virology*, 154:108–120.
- Lin, P. L, Vats, A. N., Green, M. (2001):** BK virus infection in renal transplant recipients. *Pediatr Transplant*, 5:398–405.
- Littlefield, J. W. (1966):** The use of drug-resistant markers to study the hybridization of mouse fibroblasts. *Exp Cell Res*, 41:190-196.
- Low, J. A., Magnuson, B., Tsai, B., Imperiale, M. J. (2006):** Identification of gangliosides GD1b and GT1b as receptors for BK virus. *J Virol*, 80:1361-1366.
- Magnuson, B., Rainey, E. K., Benjamin, T., Baryshev, M., Mkrtychian, S., Tsai, B. (2005):** ERp29 triggers a conformational change in polyomavirus to stimulate membrane binding. *Mol Cell*, 28:289–300.

KAPITOLA 8: SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

Maninová, M (2007): Pozdní fáze replikačního cyklu myšního polyomaviru: Příprava metod k analýze interakcí kapsidového proteinu VP1^{se} strukturami jaderného cytoskeletu. *diplomová práce PřF UK Praha, katedra genetiky a mikrobiologie, laboratoř molekulární virologie*.

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

Moens, U., Subramanian, N., Johansen, J. I., Seternes, O. M., and Traavik, T. (1994) A steroid hormone response unit in the late reader of the noncoding control region of the human polyomavirus BK confers enhanced host cell permissivity. *J Virol*, 68, 2398-2408.

Moens, U, Johansen, T, Johnsen, J. I., Seternes, O. M., Traavik, T. (1995). Noncoding control region of naturally occurring BK virus variants: Sequence comparison and functional analysis. *Virus Genes* 10:261–275.

Moens, U., Van Ghelue, M., Johansen, B., Seternes, O. M. (1999) Concerted expression of BK virus large T- and small t-antigens strongly enhances oestrogen receptor-mediated transcription. *J Gen Virol.*, 80: 585–594.

Moens, U., Rekvig, P. (2001): Molecular biology of BK virus and clinical and basic aspects of BK virus renal infection. In: *Human Polyomaviruses: Molecular And Clinical perspectives*, vol. 1, pp. 359–408, Khalili K. and Stoner G. L. (eds.), Wiley-Liss, New York

Moriyama, T., Marquez, J. P., Wakatsuki, T., Sorokin, A. (2007) Caveolar endocytosis is critical for BK virus infection of human renal proximal tubular epithelial cells. *J Virol*, 81: 8552-8562.

Nabi, I. R., Le, P. U. (2003): Caveolae/raft-dependent endocytosis. *J Cell Biol*, 161:673–677.

Nakanishi, A., Nakamura, A., Liddington, R., Kasamatsu, H. (2006): Identification of amino acid residues within simian virus 40 capsid proteins Vp1, Vp2, and Vp3 that are required for their interaction and for viral infection. *J Virol.*, 80:8891-8898

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 endoplasmic reticulum, where the virus disassembles. *J Virol*, 76: 2:38.

Norkin, L. C., Kuksin, D. (2005) The caveolae-mediated SV40 entry pathway bypasses the golgi complex en route to the endoplasmic reticulum. *Virology*, 337: 2:38.

Oppenheim, A., Sandalon, Z., Peleg, A., Shaul, O., Nicolis, S., Ottolenghi, S. (1992): A cis-acting DNA signal for encapsidation of simian virus 40. *J Virol*, 66:5320-5328.

Osterrieder, N., Neubauer, A., Brandmuller, C., Kaaden, O. R., O'Callaghan, D. J. (1998): The equine herpesvirus 1 IR6 protein that colocalizes with nuclear lamins is involved in nucleocapsids egress and migrates from cell to cell independently of virus infection. *J Virol*, 72:9806-9817.

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

Pelkmans, L., Kartenbeck, J., Helenius, A. (2001): Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat Cell Biol*, 3: 473-483.

Pelkmans, L., Puntener, D., Helenius, A. (2002) Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveole. *Science*, 296:535-539.

KAPITOLA 8: SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

- Petrogiannis-Haliotis, T., Sakoulas, G., Kirby, J., Koralnik, I. J., Dvorak, A. M., Monahan-Earley, R., DE Girolami, P. C., DE Girolami, U., Upton, M., Major, E. O., Pfister, L. A., Joseph, J. T. (2001):** BK-related polyomavirus vasculopathy in a renal-transplant recipient. *N Engl J Med.*, 345:1250-1255.
- Pho, M. T., Ashok, A., Atwood, W. J. (2000):** JC virus enters human glial cells by clathrin dependent receptor mediated endocytosis. *J Virol*, 74:2288–2292.
- Plevka, P (2002):** Vliv polyomaviru a jeho strukturního proteinu VP1 na cytoskelet a organizaci vybraných jaderných proteinů. *diplomová práce PřF UK Praha, katedra genetiky a mikrobiologie, laboratoř molekulární virologie.*
- Portolani, M, Borgatti, M. (1978):** Stable transformation of mouse, rabbit, and monkey cells and abortive transformation of human cells by BK virus, a human papovavirus. *J Gen Virol*, 38(2):369–374.
- Portolani, M., Piani, M., Gazzanelli, G., Borgatti, M., Bortoletti, A., Grossi, m. P., Corallini, A., Barbanti-Brodano, G. (1985):** Restricted replication of BK virus in human lymphocytes. *Microbiologica*, 8:59-66.
- Pride, J. G., Phillips, J. H. (1986):** Fractionation of membrane proteins by temperature-induced phase separation in triton x-114. *J Biochem*, 233:525-533.
- Rainey-Barger, E. K., Magnuson, B., Tsai, B. (2007):** A chaperone-activated nonenveloped virus perforates the physiologically relevant endoplasmic reticulum membrane. *J Virol.*, 81:12996-3004.
- Rainey-Barger, E. K., Mkrтчian, S., Tsai, B.(2007):** Dimerization of ERp29, a PDI-like protein, is essential for its diverse functions. *Mol Biol Cell*, 18:1253—1260.
- Randhawa, P., Zygmunt, D., Shapiro, R., Vats, A., Weck, K., Swalsky, P., Finkelstein, S. (2003):** Viral regulatory region sequence variations in kidney tissue obtained from patients with BK virus nephropathy. *Kidney Int* 64:743–747.
- Richterová, Z., Liebl, D., Horák, M., Palková, Z., Stokrová, J., Hozák, P., Korb, J., Forstová, J. (2001):** Caveolae are involved in the trafficking of mouse polyomavirus virions and artificial VP1 pseudocapsids toward cell nuclei. *J Virol.*, 75:10880-10891.
- Rinaldo, C. H., Traavik, T., Hey, A. (1998):** The agnogene of the human polyomavirus BK is expressed. *J Virol*, 72:6233–6236.
- Roitman-Shemer, V., Štokrová, J., Forstová, J., Oppenheim, A. (2007):** Assemblages of simian virus 40 capsid proteins and viral DNA visualized by electron microscopy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 353:424-430.
- Rossmeslová, L. (2007):** Promyelocytic leukemia protein function in normal, tumor and senescent human cells. PhD Thesis, *3th Faculty of Medicine, UK, Praha.*
- Rundell, K., Parakati, R. (2001):** The role of the SV40 ST antigen in cell growth promotion and transformation. *Semin Cancer Biol* 11:5–13.
- Sahli, R., Freund, R., Dubensky, T., Garcea, R., Bronson, R., 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.*, 46:895-904.
- Salunke, D. M, Caspar, D. L., Garcea, R. L. (1989):** Polymorphism in the assembly of polyomavirus capsid protein VP1. *Biophys J*, 56:887-900.

KAPITOLA 8: SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

- Salzet, E., Verger-Bocquet M.** (2001): Elements of angiotensin system are involved in leeches and mollusks immune response modulation. *Molecular Brain Research*, 94:137-147.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T.** (1989): A molecular cloning. A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Santarelli, R., Tzeng, Y. J., Zimmermann, C., Guhl, E. & Graessmann, A.** (1996): SV40 T-antigen induces breast cancer formation with a high efficiency in lactating and virgin WAP-SV-T transgenic animals but with a low efficiency in ovariectomized animals. *Oncogene*, 12: 495-505.
- Scott, E. S., O'Hare, P.** (2001): Fate of the inner nuclear membrane protein lamin B receptor and nuclear lamins in herpes simplex virus type 1 infection. *J Virol*, 75:8818-8830.
- Seganti, L., Mastromarino, P., Superti, F., Sinibaldi, L., Orsi, N.** (1981): Receptors for BK virus on human erythrocytes. *Acta Virol*. 25:177-181.
- Seif, I., Khoury, G., Dhar, R.** (1979): The genome of human papovavirus BKV. *Cell*, 18:963-977.
- Shah, K. V.** (1996) Polyomaviruses. In: Fields Virology, vol. 2, pp. 2027-2043, Fields B. N., Knipe D. M. and Howley P. M. (eds.), *Lippincott-Raven, Philadelphia*
- Shenk, T. E., Carbon, J., Berg, P.** (1976). Construction and analysis of viable deletion mutants of simian virus 40. *J Virol*, 18:664-671.
- Shishido-Hara, Y., Ichinose, S., Higuchi, K., Hara, Y., Yasui, K.** (2004): Major and minor capsid proteins of human polyomavirus JC cooperatively accumulate to nuclear domain 10 for assembly into virions *J Virol.*, 78:9890-9903.
- Simbulan-Rosenthal, C. M., Rosenthal, D. S., Iyer, S., Boulares, A. H., Smulson, M. E.** (1998): Transient poly(ADP-ribose)ation of nuclear proteins and role of poly(ADP-ribose) polymerase in the early stages of apoptosis. *J Biol Chem*, 273:13703-13712.
- Sinibaldi, L., Viti, D., Goldoni, P., Cavallo, G., Caroni, C., Orsi, N.** (1987): Inhibition of BK virus haemagglutination by gangliosides. *J Gen Virol*: 68:879-883.
- Sinibaldi, L., Goldoni, P., Pietropaolo, V., Longhi, C., Orsi, N.** (1990): Involvement of gangliosides in the interaction between BK virus and Vero cells. *Arch Virol*, 113:291-296.
- Sleigh, M. J., Topp, W. C., Hanich, R, Sambrook, J. F.** (1978): Mutants of SV40 with an altered small t protein are reduced in their ability to transform cells. *Cell*, 14:79-88.
- Stamatos, N. M., Chakrabarti, S., Moss, B., Hare, J. D.** (1987): Expression of polyomavirus virion proteins by a vaccinia virus vector: association of VP1 and VP2 with the nuclear framework. *J Virol*, 61:516-525.
- Stehle, T., Yan, Y., Benjamin, T. L., Harrison, S. C.** (1994): Structure of murine polyomavirus complexed with an oligosaccharide receptor fragment. *Nature*, 369: 160-163.
- Stehle, T., Gamblin, S. J., Yan, Y., Harrison, S. C.** (1996): The structure of simian virus 40 refined at 3,1 Å resolution, *Structure*, 4:165-182.
- Streuli, C. H., Griffin, B.** (1987): Myristic acid is coupled to a structural protein of polyoma virus and SV40. *Nature*, 326, 619-622.

KAPITOLA 8: SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

- Stubdal, H., Zalvide, J., Campbell, K. S., Schweitzer, C., Roberts, T. M., DeCaprio, J. A. (1997):** Inactivation of pRB-related proteins p130 and p107 mediated by the J domain of simian virus 40 large T antigen. *Mol Cell Biol*, 17: 4979–4990
- Sullivan, C. S., Gilbert, S. P., Pipas, J. M. (2001):** ATP-dependent simian virus 40 T-antigen-Hsc70 complex formation. *J Virol*, 75:1601-1610.
- Sullivan, C. S., Grundhoff, A. T., Tevethia, S., Pipas, J. M., Ganem, D. (2005):** SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells. *Nature*, 435:682-686.
- Summers, M. D., Smith, G. E. (1987):** A manual of methods for baculovirus vectors and insect culture procedures. *Texas Agricultural Experiment Station, Bulletin no. 1555*
- Tang, Q, Bell, P, Tegtmeyerm P, Maul, G. G. (2000):** Replication but not transcription of simian virus 40 DNA is dependent on nuclear domain 10. *J Virol*, 74:9694-9700.
- Trabanelli, C., Corallini, A., Gruppioni, R., Sensi, A., Bonfatti, A., Campioni, D., Merlin, M., Calza, N., Possati, L., Barbanti-Brodano, G. (1998):** Chromosomal aberrations induced by BK virus T antigen in human fibroblasts. *Virology*, 243:492–496.
- Tsai, B., Ye, Y., Rapoport, T.A. (2002):** Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3: 246–255.
- Tsai, B., Gilbert, J. M., Stehle, T., Lencer, W., Benjamin, T. L., Rapoport, T. A. (2003):** Gangliosides are receptors for murine polyoma virus and SV40. *J EMBO*. 22:4346–4355.
- Tüler, H., Bard, P. (1985):** Simian virus 40 and polyoma virus: growth titration, transformation, and purification of viral components, p. 169-192. In B. W. J. Mahy (ed.), *Virology: a practical approaches*. IRL Press, Oxford.
- Van Ghelue, M., Moens, U., Bendiksen, S., Rekvig, O. P. (2003):** Autoimmunity to nucleosomes related to viral infection: a focus on hapten-carrier complex formation. *J Autoimmun*, 20:171–82.
- Von Heijne, G. (1981):** On the hydrophobic nature of signal sequences. *Eur J Biochem*, 116:419–422.
- Wyckowski, C., Benichou, D., Girard, M. (1987):** The intranuclear location of simian virus 40 polypeptides VP2 and VP3 depends on a specific amino acid sequence *J Virol*, 61:3862-3869.
- Yang, R. C., Wu, R. (1979):** BK virus DNA: Complete nucleotide sequence of a human tumor virus. *Science* 206:456–462.
- Yoshiike, K., Takemoto, K. K. (1986):** Salzman NP, editor. Studies with BK virus and monkey lymphotropic papovavirus. *New York: Plenum Press*. pp 295–326.
- Yuen, L, K., Consigli, R. (1983):** Generation of capsods from unstable polyoma virions. *J Virol*, 75:7848-7853.