

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Pavla Sauerová

**STUDIUM VLASTNOSTÍ GENOVÝCH PRODUKTŮ POLYOMAVIRU
KARCINOMU MERKELOVÝCH BUNĚK: PŘÍPRAVA PROTILÁTEK A
KONSTRUKCE EXPRESNÍCH VEKTORŮ**

STUDIES OF PROPERTIES OF GENE PRODUCTS OF THE MERKEL CELL
CARCINOMA POLYOMAVIRUS: ANTIBODY PREPARATION AND EXPRESSION
VECTOR CONSTRUCTION

Diplomová práce

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

Praha, 2013

Prohlášení:

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

V Praze, dne 6. 5. 2013

Podpis:

Pavla Sauerová

Na tomto místě bych velice ráda poděkovala paní **Doc. RNDr. Jitce Forstové, CSc.** za vedení této diplomové práce, za pomoc, spoustu cenných rad a připomínek a za motivaci ke studiu na Přírodovědecké fakultě.

Dále děkuji **RNDr. Aleně Morávkové, Ph.D.** za rady a pomoc v oblasti přípravy protilátek a za provedení imunizace myšek.

Mé velké díky patří také **Mgr. Lence Horníkové, Ph.D.** za neocenitelné rady pro práci v laboratoři, ochotu vždy poradit a za trpělivost. Za mnohé laboratorní rady, pomoc a zhotovení elektronmikroskopických snímků rovněž děkuji **Mgr. Martinu Fraiberkovi**, který byl často původcem naprosto nepopsatelné atmosféry v laboratoři. Za podporu a pomoc laboratorní i nelaboratorní děkuji **Mgr. Martině Kojzarové**. Děkuji **Mgr. Vojtěchu Žilovi** za elektronmikroskopické snímky a **Mgr. Ondřejovi Šebestovi** za pomoc při konfokální mikroskopii. Děkuji také ostatním kolegům z laboratoře za pomoc a vytvoření výborné pracovní atmosféry a našim ochotným, stále dobře naladěným a šikovným laborantkám **Vlastě Sakařové** a **Ivaně Polívkové**.

Nevím, zda vůbec někdy budu moci dostatečně poděkovat svým milovaným rodičům, sestře a dědečkovi za opravdu dlouhodobou psychickou a finanční podporu. Děkuji jim za splnění mého velkého snu.

Předkládaná diplomová práce vznikla v letech 2011-2013 za finanční podpory grantů:
Grantové agentury České republiky – GAČR P304-10-15-11: Studium nového lidského
polyomaviru objeveného v karcinomech Merkelových buněk a Výzkumného záměru
Ministerstva školství mládeže a tělovýchovy ČR – MSM 0021620858

Abstrakt

Polyomavirus karcinomu Merkelových buněk (MCPyV) je relativně nedávno objevený lidský virus, jehož genom je často klonálně integrován v genomu karcinomových Merkelových buněk. Tento typ karcinomu se sice nevyskytuje zcela běžně, ale je velice agresivní a jeho incidence v posledních letech vzrůstá. Proto je tento virus středem vědeckého zájmu, ostatně tak jako většina patogenů či mechanismů, které působí na zdraví člověka. Virus byl objeven nedávno, proto je jeho výzkum na počátku. Tato diplomová práce se pokusila alespoň částečně přispět ke studiu tohoto patogenu z pohledu molekulární virologie. V této práci byla připravena neutralizační monoklonální protilátka typu IgG2a namířená proti hlavnímu kapsidovému proteinu VP1 MCPyV, která rozeznává konformační epitop VP1. Protilátka byla použita k pilotní studii pohybu VP1 VLPs MCPyV v savčích buňkách. Tato studie ukázala zřetelně, že virus využívá, alespoň částečně, ke svému pohybu buňkou váček nesoucích caveolin-1 (byla pozorována kolokalizace VP1 VLPs s caveolinem-1). Sporadicky byla zaznamenána kolokalizace VP1 VLPs s markerem časného endozómu EEA1, markerem pozdního endozómu Lamp2 a s markerem endoplazmatického retikula BiP. Tyto předběžné výsledky pozorování naznačují, že MCPyV virus by mohl využívat endocytickou dráhu vedoucí přes časný a pozdní endozóm, podobně jako myší polyomavirus (MPyV) či opičí virus SV40. VP1 VLPs MCPyV vstupovaly do buněk s velmi malou účinností a výrazně pomaleji než VLPs MPyV. V této práci byly dále vytvořeny konstrukty pro produkci minoritních proteinů fúzovaných s komerčně dostupným epitopem FLAG a také konstrukt pro produkci nefúzovaného VP3 MCPyV. Konstrukty produkující VP2-FLAG a VP3-FLAG byly užity pro studium lokalizací minoritních proteinů v buňce. Studie ukázala, že se minoritní proteiny MCPyV chovají odlišně od minoritních proteinů myšího polyomaviru (MPyV). VP2 protein byl detekován v malém množství v jádře, většina pak v cytoplazmě poblíž jádra. VP3 byl detekován v cytoplazmě. Nebyla pozorovány kolokalizace s jaderným obalem a kolokalizace s markerem endoplazmatického retikula byla podstatně méně signifikantní než jak je tomu u MPyV. Nebyl také prokázán výrazný cytotoxický efekt obou minoritních proteinů MCPyV. Na rozdíl od buněk produkujících VP2 nebo VP3MPyV, při produkci minoritních proteinů MCPyV nebyl ani 21 hod po transfekci pozorován únik histonu H1 do cytoplazmy a jeho rychlá degradace, což se děje, pokud dojde k poškození jaderné membrány

Klíčová slova: polyomavirus karcinomu Merkelových buněk (MCPyV), protein VP1, VLPs, monoklonální protilátka, minoritní strukturální proteiny VP2 a VP3, FLAG, lokalizace proteinu v buňce, pohyb VLPs buňkou

Abstract

Merkel cell polyomavirus (MCPyV) is a recently discovered human virus, having its genome often integrated in a genome of Merkel carcinoma cells. Although this type of carcinoma is not so usual, it is very aggressive and its incidence has been rising in last few years. It is not surprising that this virus is nowadays in the centre of scientific interest, as well as other pathogens and mechanisms affecting human life. Because the virus was discovered not so long ago, its research has been at the whole beginning. This diploma thesis aims to contribute to the study of this virus from the molecular-virology point of view. A neutralizing monoclonal antibody, type IgG2a, targeted against the main capsid protein of MCPyV, VP1, and recognizing its conformational epitope was prepared. This antibody was then used for a pilot study of VP1 VLPs MCPyV movement in mammalian cells. Results showed that the studied virus, at least particularly, utilizes caveolin-1-carrying vesicles for its movement in cells (colocalisation of VP1 VLPs and caveolin-1 was observed). Colocalisation with EEA1 marker of early endosomes, LamP2 marker of endolysosomal compartments or with BiP marker of endoplasmic reticulum was sporadic but significant. These preliminary results suggest that MCPyV might utilise an endocytic pathway leading through early and late endosomes, similar to that used by the mouse polyomavirus (MpyV) or the Simian virus 40. VP1 VLPs MCPyV entered cells considerably less effectively and slowly in comparison with those of the mouse polyomavirus. Next we created constructs for FLAG-fused minor proteins production and a construct for non-fused VP3 MCPyV production. Constructs producing VP2-FLAG and VP3-FLAG were used to study localization of minor proteins in the cell. The results showed that MCPyV minor proteins behavior is different from that of MpyV minor proteins. VP2 protein was detected in a small amount in the nucleus, most of it is then found in the cytoplasm close to the nucleus, while VP3 was detected only in the cytoplasm. Both, VP2 and VP3 have no striking affinity to intracellular membranes. No colocalizations with nuclear envelope was detected and colocalisation with BiP marker of endoplasmic reticulum was substantially less significant than that of the MpyV minor proteins. None of MCPyV minor proteins have a noticeable cytotoxic effect. While in the case of MpyV, histone H1 was translocated out of the nucleus and degraded (as a consequence of nuclear envelope damage), such effect was not observed in cells producing MCPyV VP2 or VP3.

Key words: Merkel cell carcinoma polyomavirus (MCPyV), VP1 protein, VLPs, monoclonal antibody, structural minor proteins VP2 and VP3, FLAG, localization of protein in cell, movement of VLPs in cell

OBSAH

1	ÚVOD.....	15
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED	17
2.1	Polyomaviridae	18
2.2	Polyomavirus karcinomu Merkelových buněk	20
2.2.1	Karcinom Merkelových buněk a výskyt viru	22
2.2.2	Klonální integrace polyomaviru karcinomu Merkelových buněk.....	23
2.2.3	Organizace genomu.....	24
2.2.4	Velký a malý T antigen – struktura, funkce	25
2.3	Kapsida polyomavirů.....	28
2.4	Kapsidové proteiny polyomavirů	29
2.4.1	Struktura a úloha hlavního kapsidového proteinu polyomavirů	29
2.4.2	Struktura a úloha minoritních kapsidových proteinů polyomavirů.....	34
2.5	Vstup polyomavirů do buňky a pohyb buňkou.....	37
3	CÍLE.....	41
4	MATERIÁL A METODY	43
4.1	Materiál.....	44
4.1.1	Roztoky, kultivační média (složení), antibiotika.....	44
4.1.2	Protilátky	46
4.1.3	Enzymy	47
4.1.4	Primery	47
4.1.5	Buněčné linie, bakteriální kmeny, plazmidy a viry	49
4.2	Metody.....	51
4.2.1	Pasážování hmyzích buněk	51
4.2.2	Pasážování savčích (myších) fibroblastů linie 3T3 a 3T6.....	51
4.2.3	Pasážování lidských plicních epitelálních buněk (HEL 299).....	51
4.2.4	Neutralizační test metodou hemaglutinace	52
4.2.5	Pseudoinfekce savčích buněk VP1 „virus like particules“MCPyV	53
4.2.6	Transfekce buněčné linie 3T6 a 3T3 plazmidovou DNA systémem Amaxa	54
4.2.7	Určení titru inokula rekombinantního bakuloviru VP1 MCPyV plakovou zkouškou ...	54
4.2.8	Infekce hmyzích buněk linie SF9 rekombinantním bakulovirem VP1 MCPyV	55
4.2.9	Značení buněk metodou nepřímé imunofluorescence.....	56
4.2.10	Izolace VP1 VLPs (příprava antigenu na imunizaci myši)	56
4.2.10.1	Ultracentrifugace přes sacharózový polštář	57

4.2.10.2	Ultracentrifugace v rovnovážném gradientu chloridu cesného	57
4.2.10.3	Přečištění gradientových frakcí dvoustupňovou dialýzou	58
4.2.10.4	Ověření přítomnosti proteinu VP1 MCPyV	58
4.2.10.4.1	Stanovení koncentrace proteinu metodou Bradfordové.....	58
4.2.11	Imunizace myši.....	59
4.2.12	Buněčná fúze	59
4.2.12.1	Příprava myelomových buněk pro buněčnou fúzi	60
4.2.12.2	Příprava myších splenocytů pro buněčnou fúzi	60
4.2.12.3	Příprava myších splenocytů a myelomových buněk před buněčnou fúzí.....	60
4.2.12.4	Příprava podpůrných buněk	60
4.2.12.5	Proces buněčné fúze a vysetí hybridomů do média	61
4.2.13	Práce s hybridomovými buňkami	61
4.2.13.1	Ošetření a kontrola hybridomů po fúzi	61
4.2.13.2	Testování hybridomových buněk.....	61
4.2.13.2.1	Příprava hmyzích buněk na testování průtokovou cytometrií	62
4.2.13.2.2	Testování hybridomových médií na přítomnost protilátky testem dot Blotu .	63
4.2.13.3	Klonování hybridomů („rozklonování“).....	63
4.2.13.4	Zamrazování hybridomů.....	64
4.2.14	SDS PAAGE elektroforéza.....	64
4.2.14.1	Barvení a fixace gelů po elektroforéze	65
4.2.15	Western blot.....	65
4.2.16	Dot blot.....	66
4.2.17	Imunologická detekce proteinů na mebránách	66
4.2.18	Práce s bakteriálními buňkami.....	66
4.2.18.1	Kultivace bakteriálních buněk	66
4.2.18.2	Skladování bakteriálních buněk (bakteriální „konzervy“).....	66
4.2.18.3	Elektroporace bakteriálních buněk	67
4.2.19	Práce s DNA	67
4.2.19.1	Maxiizolace plazmidové DNA kitem „Quiagen Endofree“	67
4.2.19.2	Miniizolace plazmidové DNA komerčními kity	67
4.2.19.3	Etanolové srážení DNA	68
4.2.19.4	Fenol-chloroformová metoda pro čištění plazmidů	68
4.2.19.5	Minipreparace rekombinantní plazmidové DNA alkalickou metodou	68
4.2.19.6	Agarózová elektroforéza.....	69
4.2.19.7	Izolace DNA z agarózového gelu Fastback DNA Minispín Kitem.....	69

4.2.19.8	Štěpení DNA restrikčními endonukleázami.....	69
4.2.19.9	Defosoforylace a ligace plazmidové DNA.....	70
4.2.19.10	Polymerázová řetězová reakce (PCR amplifikace DNA).....	70
4.2.19.11	Systém „pENTR Directional TOPO Cloning Kits“ (Invitrogen)	71
5	VÝSLEDKY	73
5.1	Příprava monoklonální protilátky proti hlavnímu kapsidovému proteinu VP1 polyomaviru karcinomu Merkelových buněk	74
5.1.1	Určení titru inokula rekombinantního bakuloviru vp1 MCPyV	74
5.1.2	Izolace VP1 VLPs (antigenů) z hmyzích buněk a jejich ověření.....	75
5.1.3	Imunizace myši antigenem VP1 VLPs MCPyV	78
5.1.4	Fúze buněk	79
5.1.5	Testování a klonování hybridomů.....	80
5.1.6	Charakterizace protilátek	86
5.1.7	Konfokální analýza pohybu VP1 VLPs MCPyV buňkou –	91
5.1.8	Příprava polyklonální protilátky proti denaturovanému proteinu VP1 MCPyV.....	101
5.2	Konstrukce expresních vektorů pro produkci minoritních strukturních proteinů MCPyV fúzovaných s epitopem FLAG pro studium interakcí s buněčnými strukturami	103
5.2.1	Konstrukce expresních vektorů VP2-FLAG a VP3-FLAG	103
5.2.2	Ověření kolonií po elektroporaci – minipreparace, izolace „endofree“, štěpení EcoRI a BglIII a sekvenace	106
5.2.3	Studium lokalizace minoritních proteinů VP2 a VP3 MCPyV v 3T3 myších fibroblastech.....	107
5.3	Konstrukce univerzálního expresního vektoru „phGf-polylinker pro zajištění exprese VP3 MCPyV.....	113
5.3.1	TOPO reakce pomocí „pENTR Directional TOPO Cloning“ Kitu a její ověření.....	116
5.3.2	LR rekombinace a její ověření	118
5.3.3	Vložení sekvence kodující VP3 MCPyV do vytvořeného vektoru „phGf-polylinker“.....	121
6	DISKUZE	127
6.1	Příprava monoklonální protilátky proti hlavnímu kapsidovému proteinu VP1 polyomaviru karcinomu Merkelových buněk	128
6.2	Konstrukce vhodných expresních vektorů pro produkci a studium buněčných lokalizací minoritních strukturních proteinů VP2 a VP3 polyomaviru karcinomu Merkelových buněk.....	131
7	SHRNUTÍ.....	135
8	SEZNAM UŽITÉ LITERATURY	139

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ATG	iniciační kodón, první translatovaný kodón mRNA
BiP	(GRP78, HSP70) molekulární chaperon endoplazmatického retikula (binding immunoglobulin protein)
BK virus	B.K. virus
BSA	bovinní sérový albumin
BSM	bezsérové médium
CAV1	caveolin 1
COPI	specifický plášťový („coat“) proteinový komplex 1
CR1	konzervovaná oblast 1
CsCl	cesium chlorid
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol, fluorescenční barvivo vázající DNA
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	dimethyl sulfoxid
DNA	deoxynukleotidová kyselina
DnaJ	chaperon DnaJ (Hsp40) s J-doménou pro vazbu s Hsp70
dNTP	deoxyribonukleotid trifosfát
Ds	dvouřetězcový
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	kyselina ethylendiaminotetraoctová
EEA1	antigen 1 časného endozómu
EGFP	zesílený zelený fluorescenční protein
ELFO	elektroforéza
ER	endoplazmatické retikulum
ERAD	degradace spojená s endoplazmatickým retikulem
ESC	pentapeptidový (DDDDK) epitop (alternativa FLAG), proteinová značka
FACS	fluorescencí aktivované třídění buněk (typ průtokové cytometrie)
FBS	fetální bovinní sérum
FLAG	oktapeptidový (DYKDDDDK) epitop, proteinová značka
GD1	disialogangliosid 1
GM1	monosialotetrahexosylgangliosid 1
GT1b	trisialogangliosid 1b
HAT medium	hypoxanthine-aminopterin-thymidine medium
HEL 299	lidské fetální plicní fibroblasty 299
HPyV	lidský polyomavirus
HRP	křenová peroxidáza
HRPT	hypoxantin fosforibosyl transferáza
HRPTC	primární lidské ledvinné epiteliální buňky proximálních tubulů
CH₃COONa	octan sodný
IgG2a	imunoglobulin G2a
JC virus	John Cuningham virus
kDa	kiloDalton
KI virus	Karolinska Institute polyomavirus

Lamp2	lyzozomální membránový protein 2, marker pozdního endozómu/lyzozómu
LB médium	Luria-Bertani medium
LT	velký T antigen polyomavirů
MCPyV	polyomavirus karcinomu Merkelových buněk
MCS	vícečetné klonovací místo
MOI	multiplicita infekce
MPyV	myší polyomavirus
mRNA	„messenger“ RNA
MUR	unikátní oblast MCPyV
NaAc	acetát sodný
NK	negativní kontrola
NLS	jaderný lokalizační signál
OBD	doména vázající replikační počátek
pb	pár bazí
PBS	fosfátový izotonický tlumivý pufr (phosphate buffered saline)
PCR	polymerázová řetězová reakce
PEG	polyethylenglykol
pfu	plak formující jednotka
PMSF	fenylmetylsulfonyl fluorid
PK	pozitivní kontrola
rpm	otáčky za minutu
RIPA pufr	lyzační pufr pro radioimmunoprecipitační analýzu
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SDS PAAGE	dodecylsulfát sodný polyakrylamidová gelová elektroforéza
SOC médium	(super optimal broth with catabolite repression), živný bujón s glukózou
ST	malý T antigen polyomavirů
SV40	opičí virus 40, simian vacuolating virus 40
TBE pufr	Tris/kyselina boritá/EDTA pufr
TE pufr	Tris/EDTA pufr
TEMED	N,N,N',N'- tetramethylethylen diamin
Tris	tris(hydroxymetyl)aminometan
ÚHKT	Ústav hematologie a krevní transfuze
Vamp6	membránový protein 6 spojený s váčky (váčková fúze, SNARE protein)
VLPs	viru podobné částice, „virus-like particles“
VP1	hlavní kapsidový protein (VP1) polyomavirů
VP2, VP3	minoritní kapsidové proteiny (VP2 a VP3) polyomavirů
WU virus	Washington University polyomavirus

1 ÚVOD

Polyomaviry jsou stále intenzivně studovanou skupinou tumorogenních virů. Jejich studium přineslo jednak možnost více porozumět jejich replikačním životním cyklům a strategiím, ale díky jejich studiu byly objeveny a popsány tak zásadní děje buněčné biologie, jako jsou například mechanismy DNA replikace. Studium tumorogenního potenciálu polyomavirů byla prokázána existence proteinu p53 či jaderného lokalizačního signálu. V neposlední řadě studium zasahuje i na pole klinické/medicínské, neboť do skupiny polyomavirů patří také lidské patogeny. V poslední letech bylo objeveno 9 nových lidských polyomavirů. Jedním z nich je polyomavirus karcinomu Merkelových buněk (dále označován jako MCPyV). Virus je spojován se vznikem karcinomu kůže, neboť jeho genom byl objeven integrovaný v karcinomových Merkelových buňkách. Tento typ karcinomu se sice nevyskytuje příliš často (oproti jiným kožním karcinomům), ale je velice agresivní a je spojen s vysokou úmrtností pacientů. Vzhledem k tomu, že jeho incidence v posledních letech roste, je tento virus studován pro možný vývoj vakcíny. MCPyV je součástí přirozené kožní mikroflóry. Studium MCPyV je na svém počátku a proto je většina jeho vlastností prozatím předpokládána na základě sekvenční podobnosti a příbuznosti s jinými lépe prostudovanými polyomaviry, nejvíce však s myším polyomavirem (dále označován jako MPyV). Jak se zdá, tak MPyV je paradoxně bližší příbuzný MCPyV než lidské polyomaviry. Celé studium MCPyV významně komplikuje fakt, že se dosud nepodařilo izolovat infekční virus, protože nejsou známy permissivní buňky, ve kterých by se virus replikoval. K dispozici jsou tedy pouze konstrukty odvozené ze sekvencí genomů MCPyV detekovaných v buňkách karcinomů. Směrů, ze kterých lze studium MCPyV uchopit, je několik. Jednou z variant je začít studium na úrovni proteinů a sledovat jejich vlastnosti a chování v buňce. Vstup viru a jeho pohyb v buňce lze mimikovat užitím „viru podobných částic“ (dále označovány jako VLPs). Hypotézy o chování MCPyV lze porovnat s vlastnostmi známých polyomavirů a postupně tak virus charakterizovat. Nutným nástrojem pro studium viru jsou protilátky specifické pro virové proteiny. Aby bylo možné studovat vlastnosti jednotlivých genových produktů, je žádané připravit plazmidy zajišťující jejich produkci v savčích buňkách. Příprava protilátek a konstrukce vektorů pro expresi strukturálních proteinů MCPyV byla předmětem této diplomové práce.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 POLYOMAVIRIDAE

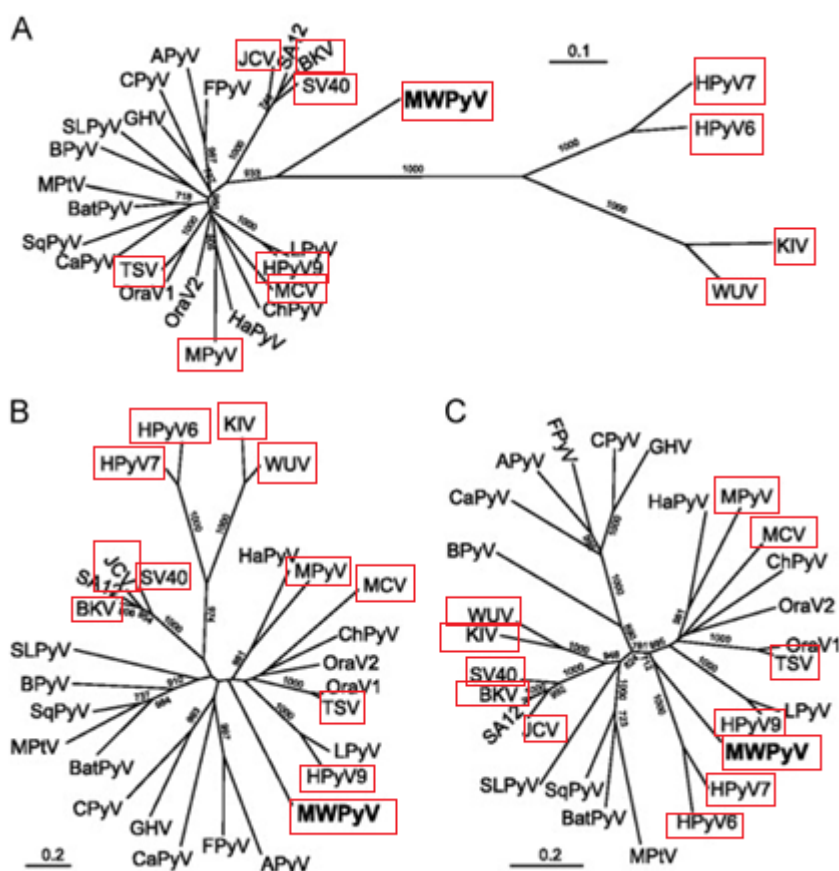
Polyomaviry jsou malé neobalené viry čeledi *Polyomaviridae*, řazené do I. třídy virů Baltimorovy klasifikace. Ve virové kapsidě s ikosahedrální symetrií se nachází kruhová genomová dsDNA v komplexu s hostitelskými histony (kromě H1). Velikost polyomavirových částic se pohybuje v rozmezí 40 -50 nm, proto jsou tyto viry klasifikovány jako „malé“. Genom o velikosti cca 5000 pb kóduje regulační nestrukturní proteiny, tzv. malý a velký T antigen (ST a LT antigen). U polyomavirů hlodavců existuje ještě střední T antigen (MT antigen). Genom dále kóduje strukturní proteiny VP1, VP2 a VP3. V počáteční fázi infekce, tj. před virovou replikací jsou exprimovány tzv. časné geny. Jejich produkty, T antigeny se uplatňují v indukci replikace a regulaci transkripce virové DNA i v deregulaci buněčných procesů. V pozdní fázi infekce jsou exprimovány geny pro strukturní kapsidové proteiny (*Knipe and Howley, Fields Virology, 2007,*). Kapsida je tvořena 60 hexavalentními a 12 pentavalentními pentamery hlavního kapsidového proteinu VP1.

Polyomaviry jsou tumorogenní viry schopné transformovat nepermissivní buňky svými T antigeny. Tuto schopnost většinou tyto viry nevykazují u svých přirozených hostitelů. Například opičí virus SV40, je schopen vyvolat tumor u křečka, kdežto u opice tumorogenně nepůsobí (*Eddy et al., 1961*).

Jako první byl objeven v 50. letech 20. století MPyV (*Gross, 1953*), jakožto původce mnohočetných nádorů u myši (odtud *poly* - mnoho, *oma* - nádor). V roce 1960 byl objeven první primátí polyomavirus SV40. Tento virus byl detekován v kultuře opičích ledvinných buněk (African green monkey kidney cells) užívaných pro produkci poliovirových vakcín. Protože bylo prokázáno onkogenní působení tohoto viru na hlodavce včetně myši, logicky vyvstala obava, že by SV40 obsažený ve vakcíně mohl vyvolat vznik nádorů také u lidí (*Sweet and Hilleman, 1960*). Dodnes ale nebyla prokázána přímá spojitost mezi SV40 a lidskými kancerózami. Od dob objevu polyomavirů jsou stále identifikováni noví zástupci s odlišnými a relativně úzkými hostitelskými a tkáňovými preferencemi či specifitami. Polyomaviry jsou rozšířeny mezi obratlovci, především savci a ptáky a replikují se zejména v ledvinné tkáni. Pro savčí polyomaviry je typická spíše asymptomatická primární infekce s dlouhodobou persistencí v hostiteli a neintegrovanou virovou DNA (*Dubensky and Villarreal, 1984*). Nejvíce studovány jsou MPyV, virus SV40, lidské polyomaviry JC a BK a v nedávné

době objevený polyomavirus MCPyV, jehož genom byl nalezen integrovaný v genomu karcinomových Merkelových buněk.

Dnes je známo 11 lidských polyomavirů – BK a JC virus, KI a WU virus, dále HPyV6, HPyV7, TSPyV (trichodysplasia spinulosa virus, TSV), HPyV9, MWPyV (Malawi polyomavirus), STL PyV a v neposlední řadě výše zmíněný intenzivně studovaný MCPyV. Důležitým bodem při studiu nových polyomavirů je určování jejich příbuznosti na základě srovnávání sekvencí. Z příbuznosti lze dopředu predikovat vlastnosti a ty následně testovat. Fylogenetická příbuznost mezi jednotlivými polyomaviry sestavená na základě srovnání aminokyselinových sekvencí VP1 proteinů, VP2 proteinů a velkých T antigenů je ukázána na obrázku 1. Jak je patrné ve všech třech případech analýzy, převážně jsou nejznámější zástupci polyomavirů (červeně označené polyomaviry) rozprostřeny do tří větších příbuzenských skupin. U všech tří analýz vždy pozorujeme skupinu JCV, BKV a SV40 a skupinu MCPyV a MPyV. Zajímavá a celkem překvapivá je pozice MCPyV vůči ostatním polyomavirům. Jak je na obrázku 2.1 patrné, tak MCPyV v porovnání se známějšími polyomaviry je často nejbližší myšimu polyomaviru a je poměrně výrazně vzdálen ostatním lidským polyomavirům. Zde se tedy nabízí otázka, jaký je skutečný původ MCPyV. Pochybnosti o tom, zda se jedná o původní lidský polyomavirus podporuje jednak fakt, že doposud nejsou známy permissivní buňky, ve kterých by se tento virus replikoval. Pro porovnání výsledku uvedené fylogenetické analýzy je zde stručně uvedeno ještě běžné dělení rodiny *Polyomaviridae* do tří rodů. Prvním je rod Orthopolyomavirus, kam spadá virus SV40, MPyV, MCPyV, BK či JC virus. Rod Wukipolyomavirus nese WU, KI viry, HPyV6 a 7. Rod Avipolyomavirus je rodem ptačích polyomavirů, kam spadá například i HPyV9. Jak bylo v úvodu zmíněno, tak studiem polyomavirů byl například objeven protein p53 (Lane and Crawford 1979), základní mechanismy replikace DNA (Waga and Stillman, 1994) nebo například jaderný lokalizační signál (Spurgeon and Lambert, 2013).



Obr. 2.1. Fylogenetická analýza polyomavirů. Jednotlivé fylogenetické stromy byly vytvořeny na základě aminokyselinových sekvencí VP1 proteinu polyomavirů (A) VP2 proteinu (B) a velkého T antigenu (C). MCPyV (na obrázku jako MCV). Převzato a upraveno z *Dalianis and Hirsch, 2013* (převzato z *Siebrasse et al., 2012*).

2.2 POLYOMAVIRUS KARCINOMU MERKELOVÝCH BUNĚK

Polyomavirus karcinomu Merkelových buněk (MCPyV či MCV) byl objeven relativně nedávno, v roce 2008 skupinou Feng a kolektivem. Jedná se o zatím jediný polyomavirus, o kterém se soudí, že by mohl být přímým původcem karcinomu člověka, nebo přispívat k jeho vzniku, tzv. karcinomu Merkelových buněk. Merkelovy buňky jsou organizovány hojně v bazální vrstvě epidermis, kde zastávají roli mechanoreceptorů kontaktem s nervovými zakončeními. Existuje však rovněž varianta buněk vykazujících znaky Merkelových buněk, které ale nekomunikují s nervovými zakončeními a jsou součástí difúzního neuroendokrinního systému. A právě tento druhý typ se zdá být pravděpodobnějším adeptem na „původní buňky“ karcinomu Merkelových buněk (*Halata et al, 2003*).

MCPyV je běžnou složkou kožní mikroflóry, kde se nachází mj. i ve formě virionů, které právě jak se zdá, za určitých podmínek zapříčiní maligní transformaci buňky.

Studiem tumorových izolátů bylo prokázáno, že v genomu buněk karcinomů je velmi často přítomna DNA příbuzná s genomy polyomavirů, která je tzv. klonálně integrována, tedy nachází se v hostitelského genomu u všech buněk nádoru na stejném místě. Integrovaný genom byl přisouzen novému typu polyomaviru, MCPyV, na základě srovnání a homologie integrované sekvence. Genom MCPyV byl detekován v 8 z 10 případů analyzovaných vzorků karcinomů a z těchto 8 karcinomů pozitivních na MCPyV byl virový genom integrován v 6 z nich. Právě toto zjištění vedlo k závěrům, že MCPyV je jednou z možných příčin vzniku karcinomu (Feng et al., 2008). Není ale jedinou příčinou, protože u cca 20 % případů analyzovaných karcinomů virus detekován vůbec nebyl a má se tudíž za to, že se karcinom Merkelových buněk může rozvinout na různém podkladě a pouze jedním z nich (i když s vyšší pravděpodobností) může být právě MCPyV.

Integraci viru do hostitelského genomu dochází k mutacím v genomu viru, naprosto typická je delece C-konce velkého T antigenu (dále označován jako LT). Deleci je zasažena helikázová doména a je tedy poškozena funkce virové replikace, ovšem onkogenní potenciál LT antigenu je stále zachován. Tyto události vedou k virové integraci a vzniku karcinomu (Duncavage et al., 2009, Shuda et al., 2008). Dále byla pozorována i možná delece v sekvencích hlavního kapsidového proteinu VP1 (Kassem et al. 2008), která brání tvorbě virionů v karcinomu, pak nedochází k tvorbě virových kapsid. V buňkách karcinomu tedy dochází k narušení virové replikace a exprese pozdních genů. Je zřejmě vyvinut selekční tlak na to, aby v tumorech vyvolaných virem nedocházelo k produktivní (lytické) replikaci viru (Arora et al., 2012). Podmínkami pro rozvoj tumoru jsou tedy kombinace mutací a klonování integrace virového genomu do hostitelského chromozomu. Co je spouštěčem integrace viru, ale není známo. Jedna z hypotéz tvrdí, že spouštěčem je UV záření, další sází přímo na defekt ve viru samotném, zdá se být pravděpodobný i oslabený imunitní systém hostitele. Všechny tyto signály mohou aktivovat replikaci viru a jeho následnou integraci do chromozomu hostitele (Spurgeon and Lambert, 2013, Arora et al., 2012). Demetriou a kolektiv v roce 2012 navíc přímo ukázali, že zkrácený LT může změnit normální odpověď buňky na UV záření. V jeho přítomnosti je jednak narušena oprava DNA, ale také dochází k inhibici zástavy buněčného cyklu. Setkáváme se tedy s fenoménem nestability genomu, který je vyvolán samotným MCPyV.

Jak již bylo zmíněno, infekční virus se nepodařilo dodnes připravit – primární produkce virionů z genomové DNA s malým výtěžkem sice byla provedena, ovšem následná

sekundární infekce buněk se doposud nezdařila. Nejsou známy permisivní buňky, ve kterých je virus ochoten se replikovat a proto jsou ke studiu používány infekční molekulární klony MCPyV odvozené od genomů MCPyV nalezených právě v tumorových buňkách (*Neumann et al., 2011*). Pro studium replikace MCPyV byl například rekonstruován replikující se klon genomu MCPyV (tzv. konsensus klon odvozený z více izolovaných MCPyV genomů). Mutací virových míst potřebných pro replikaci či interakci s buněčnými proteiny byla na tomto klonu studována genová exprese viru a účinnost replikace. Nemutovaný genom se replikoval a tak mohla být detekována enkapsidovaná DNA viru. Bylo ukázáno, že po jeho transfekci dochází během replikace nejprve k expresi LT a jeho zkrácené formy 57kT (asi za dva dny po transfekci klonem). Následuje exprese malého T antigenu (dále uvedeno jako ST) a VP1 proteinů. U replikačně-mutovaného klonu nebyl detekován VP1 ani ST antigen a množství 57kT bylo výrazně redukováno. Z toho plyne, že by sestřih časných genů a transkripce pozdních genů měly být závislé na replikaci DNA. Dále bylo ukázáno, že při zvýšení exprese ST antigenu se výrazně navýšila úroveň replikace i enkapsidace. Klon byl také využit pro studium tropismu MCPyV, protože dával vzniku enkapsidovaným „wild type“ virionům. Ani zde se ale nepodařilo zajistit jejich persistentní transmissi do různých buněčných linií. Jak se zdá, tak virus má omezený tropismus (*Feng et al., 2011*).

Zajímavá je problematika detekce MCPyV v organismu a případná malignita. Protože enkapsidované viriony a DNA MCPyV jsou běžně detekovány na normální zdravé kůži, nelze přítomnost DNA MCPyV považovat za dostatečně specifický marker pro virem indukovanou malignitu. Naopak dostatečně specifickým markerem se zdá být přítomnost zkráceného LT antigenu (*Schmitt et al., 2012*). Mezi protilátkami proti MCPyV v séru pacientů a DNA MCPyV detekovanou na kůži byla prokázána korelace. Tím, že se MCPyV běžně vyskytuje u zdravé populace, lze zaznamenat protilátkovou odpověď i u zdravých jedinců, ovšem v případě pacientů s karcinomem Merkelových buněk je hladina protilátek výrazně zvýšena. (*Faust et al., 2011*).

2.2.1 KARCINOM MERKELOVÝCH BUNĚK A VÝSKYT VIRU

Karcinom Merkelových buněk je obecně považován za malignitu kožních neuroendokrinních buněk, která má pravděpodobně původ v transformaci Merkelových buněk. Jedná se sice o nepříliš běžnou, ale velmi agresivní formu kožní malignity s vysokým sklonem metastazovat. Tumorem bývají nejčastěji postiženi starší jedinci (zejména s kůží vystavenou často

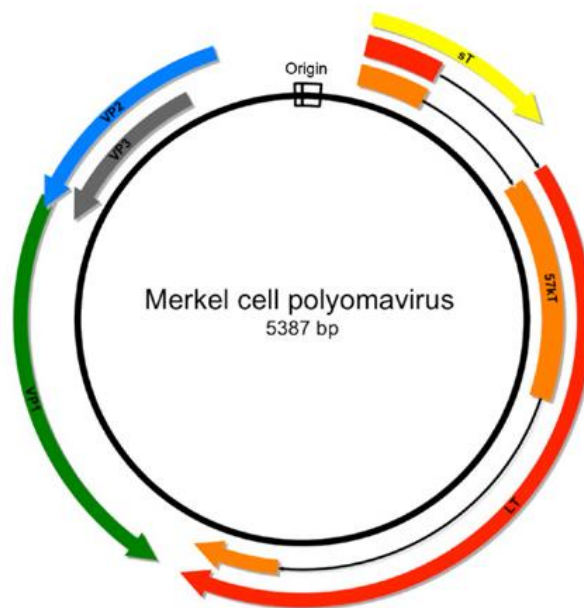
slunečnímu záření) či imunosuprimované osoby. Přestože se karcinom nevyskytuje příliš často, v posledních letech jeho incidence nezanedbatelně vzrostla. Od roku 1986 do 2001 se zvýšila trojnásobně, tedy asi o 8 % za rok (*Hodgson, 2005*).

2.2.2 KLONÁLNÍ INTEGRACE POLYOMAVIRU KARCINOMU MERKELOVÝCH BUNĚK

Jak již bylo v předchozích kapitolách zmíněno, virus je v buňkách karcinomu Merkelových buněk integrován. Na zvířecím modelu bylo dříve ukázáno, že DNA MPyV se integruje do hostitelského genomu často před vznikem nádoru. Sekvence DNA polyomaviru byly nalezeny v oblasti genu *c-myc* a deregulovaly jeho expresi. Podobné mechanismy modifikace exprese *c-myc* se nalézají také u jiných savčích karcinomů (*Holländerova et al.; 2003, Feng et al., 2008*). Podle nedávné studie, která se zabývala podrobněji integrací MCPyV do buňky, neexistují žádná specifická preferenční místa v buňce pro vložení viru a místa, kterými se virus vkládá do buňky, nejsou jasně dána. Celkem 13 z 19 míst, kterými se genom viru integroval, se nacházelo v oblasti genu pro LT antigen. Příčina výběru tohoto místa je patrně ve velikost sekvence genu LT, která tvoří přes 50 % genomu viru. Ve všech 13 případech integrace prostřednictvím oblasti genu pro LT, se jednalo o vložení do oblasti druhého exonu LT, tedy až za pRB vazebnou doménou. Ukázalo se, že integrace vždy způsobí zkrácení LT na jeho 3' konci. Jedním z možných vysvětlení, proč se v karcinomových buňkách nachází integrace jejímž důsledkem je zkrácení genu pro LT je, že zlom v genomu viru vytvořený inzercí blokuje helikázovou funkci LT a tím i virovou replikaci. A to, že je v tumoru často detekována více než jedna kopie genomu MCPyV je patrně důvod, proč jsou při analýze lokusů velkého T antigenu detekovány formy velkého T antigenu jak o plné délce, tak jeho zkrácené formy. Integrace viru do genomu hostitelské buňky byla opakovaně zaznamenána v 5. chromozomu, vždy se ale jednalo o odlišná místa vložení. U dvou případů se přece jen integrace objevila před geny přímo ovlivňujícími karcinogenezi – gen pro XRCC4 (X-ray ray complementing defective repair in Chinese hamster cells 4) a gen pro PLA2G4A (fosfolipáza 2A skupiny IV.A) (*Martel-Jantin et al., 2012; Shuda et al., 2008*).

2.2.3 ORGANIZACE GENOMU

Genomu MCPyV lze rozdělit do třech oblastí – časně, pozdní a regulační. Hlavním produktem polyomavirové časně oblasti je tzv. velký T antigen, který se uplatňuje nejen v replikaci, díky své helikázové aktivitě, ale také v tumorigenezi. U ostatních polyomavirů bylo ukázáno, že velký T antigen působí jako zesilovač pozdního promotoru a tak vlastně podporuje přesmyk časně genové exprese na pozdní expresi. Tento jev se dá předpokládat také u MCPyV. Pozdní oblast kóduje strukturální proteiny VP1, VP2, (VP3?), které jsou schopny samouspořádat se do tzv. VLPs („virus-like particles“) (shrnuto ve *Feng et al., 2011*). Tyto VLPs se dále dají užít k infekci buněk a tedy pro studium vlastností viru. Existence proteinu VP3 u MCPyV není jistá, je pouze odvozena na základě sekvence VP2, která v sobě VP3 obsahuje. VP3 je u polyomavirů kratší forma sekvence pro VP2. Protože v sekvenci VP2 MCPyV jsou dva další ATG kodony, není jasné, zdali a ze kterého ATG VP3 sekvence začíná. Organizace genomu MCPyV je ukázána na prototypu MCPyV350 (viz obr. 2.2). Genom o 5,4 kpb disponuje replikačním počátkem a promotory umožňujícími obousměrnou transkripci. Časná genomová oblast kóduje tři virové T antigeny – LT antigen, 57kT antigen (je identický s LT až do oblasti jaderného lokalizačního signálu, dále je sestřižen) a ST antigen. Pozdní oblast je transkribována v opačném směru od počátku replikace a kóduje strukturální proteiny – hlavní kapsidový protein VP1 a minoritní kapsidové proteiny VP2, případně VP3 (shrnuto ve *Spurgeon and Lambert, 2013*).



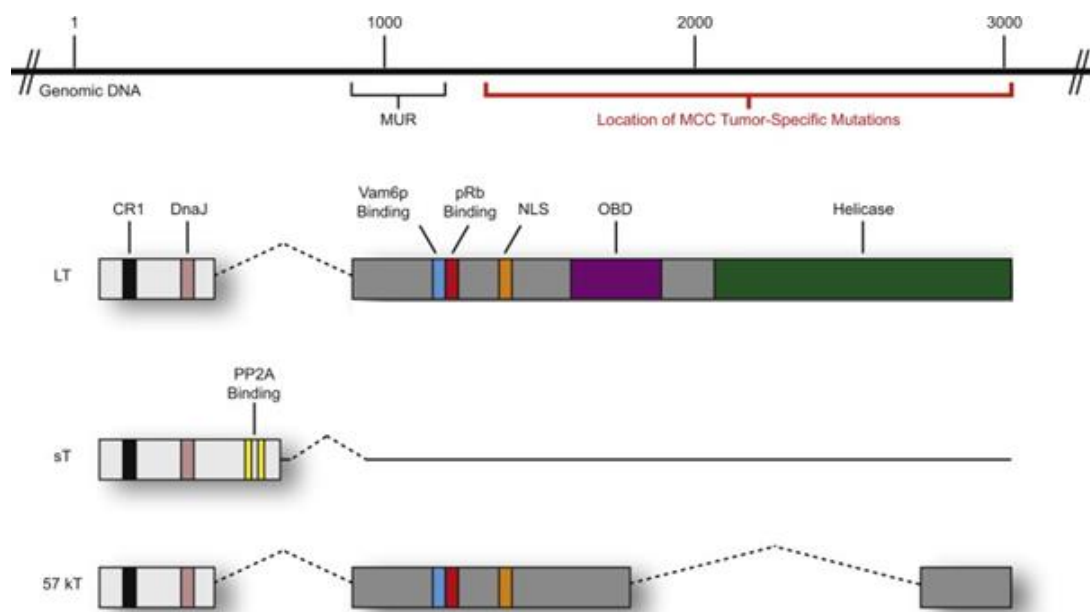
Obr. 2.2. Genom Polyomaviru karcinomu Merkelových buněk (MCPyV). Na obrázku je znázorněn genom prototypu MVPyV350. Velikost je přibližně 5,4 kpb. Bíle je značen replikační počátek a promotory umožňující obousměrnou transkripci. Časná oblast kóduje tři virové T antigeny – velký T antigen (červeně), 57kT antigen (oranžově) a malý T antigen (sT, žlutě). Pozdní oblast je transkribována v opačném směru a kóduje strukturální proteiny – hlavní kapsidový protein VP1 (zeleně) a minoritní kapsidové proteiny VP2 (modře) a putativní VP3 (šedě). Převzato a upraveno z *Spurgeon and Lambert, 2013*.

2.2.4 VELKÝ A MALÝ T ANTIGEN – struktura, funkce

T antigeny jsou známy jako regulátory replikačního cyklu viru, ale i stimulátory buněčného cyklu hostitelské buňky. Oblast T antigenu MCPyV, která je umístěna v časně oblasti genomu MCPyV kóduje tři T antigeny, které vznikají alternativním sestřihem – LT, ST a 57kT antigen. LT nese domény stejné jako LT jiných polyomavirů - CR1 (konzervovaná oblast 1, oblast LXXLL), DnaJ (oblast HPDKGG, chaperonová J doména zprostředkující vazbu Hsp70 a buněčných proteinů a jejich změnu konformace), helikázovou doménu, „origin“-vazebnou doména (OBD), pRb-vazebné místo, jaderný lokalizační signál (NLS), vazebné místo pro Vamp6p, MCPyV unikátní oblast (MUR). LT antigen je tvořen dvěma exony, které společně kódují protein o 816 aminokyselinách. Jak je ukázáno na obrázku 2.3., ST sdílí s LT první exon včetně vazebného místa pro protein fosfatázu 2A (PP2A). 57kT se shoduje s LT až do oblasti NLS, další část 57kT je po alternativním sestřihu ochuzena o OBD a helikázovou doménu (*Nakamura et al., 2010*; shrnuto v *Spurgeon and Lambert, 2013*). Jak již bylo řečeno dříve, integrací viru do hostitelského genomu dochází k mutacím v genomu viru, typická je

delece C-konce LT antigenu, která postihne helikázovou doménu a tak je znemožněna virová replikace. Onkogenní potenciál si LT antigen i přes mutační změnu stále zachovává - i zkrácený LT antigen má rovněž podíl na inaktivaci pRb a reguluje buněčnou transkripci (*Duncavage et al, 2009, Shuda et al., 2008*).

LT antigen viru SV40 se váže na GAGGC motiv virového počátku replikace, kde ve formě hexameru vytváří komplex s buněčnými replikačními proteiny. Vzhledem k tomu, že motiv pro vazbu LT antigenu a virový replikační počátek je u lidských polyomavirů a SV40 podobný, lze předpokládat, že se LT antigen lidských polyomavirů včetně MCPyV bude chovat tak jako u SV40 (*Simmons, 2000; Van Gheule et al., 2012*). Na studii LT antigenu byl ukázán zajímavý fenomén, mutace běžně postihující LT antigen se zpravidla netýkají jaderného lokalizačního signálu ani nebyla ukázána přítomnost stop kodonů v jeho „upstream oblasti“. Jaderný lokalizační signál (umístěný v oblasti mezi pRb vazebnou doménou a helikázovou doménou) je i v karcinomu Merkelových buněk vysoce konzervovanou a stále funkční jednotkou. Mutace v okolí jaderného lokalizačního signálu, mají ale vliv na funkce LT antigenu. Dle autorů této studie nelze vyloučit, že i zkrácená forma velkého T antigenu, která nemá jaderný lokalizační signál, přesto může participovat na vzniku karcinomu (*Nakamura et al., 2010*).



Obr. 2.3.. Lokus genu pro T antigeny polyomaviru MCPyV. Lokus genů T antigenu umístěný v časné oblasti genomu MCPyV kóduje tři isoformy T antigenu, které vznikají alternativním sestřihem – velký T antigen (LT), malý T antigen (sT) a 57kT antigen. Velký T antigen je organizován podobně jako u jiných polyomaviry - nese CR1 (černě), DnaJ (růžově), pRb-vazebné místo (červeně), helikázovou doménu (zeleně), jaderný lokalizační signál (NLS, oranžově), vazebné místo pro Vamp6p (s vezikly asociovaný membránový protein, modře), doména vázající se k replikačnímu počátku (OBD, fialově), MCPyV unikátní oblast (MUR). Červenou čarou je pak znázorněna C-koncová oblast velkého T antigenu podléhající specifickým mutačním změnám spojeným s rozvojem karcinomu Merkelových buněk. Jak je na obrázku patrné sT sdílí s LT první exon včetně vazebného místa pro fosfatázu 2A (PP2A, žlutě). 57kT se shoduje s LT do oblasti NLS, další část je po alternativním sestřihu pozbývá o OBD a helikázové domény. Převzato z *Spurgeon and Lambert, 2013*.

LT antigen, ale i sT antigen je potenciálním onkoproteinem. Houben a kolektiv došli k závěru, že exprese T antigenů je nezbytná pro zachování karcinomu Merkelových buněk pozitivního na přítomnost MCPyV, a že MCPyV je infekční agens stojící za vznikem karcinomu. Tato studie, se ale zabývala T antigeny společně, nikoli chováním každé isoformy zvlášť. Všechny transkripty T antigenů inhibovala pomocí malé RNA zacílené na exon1, který je společný všem isoformám T antigenu (LT, sT i 57kT) (*Houben et al., 2010*).

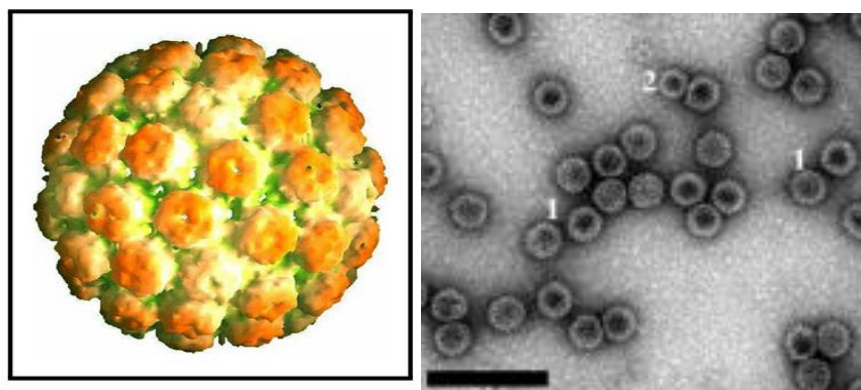
Pozdější studie se již zaměřila na roli jednotlivých izoform v karcinogenezi, přesněji řečeno na roli sT a LT. U sT antigenu byla detekována transformující aktivita. Zároveň bylo pozorováno, že buňky karcinomu Merkelových buněk nepotřebují sT antigen pro přežití ani růst. Angermeyer a kolektiv tedy ze své práce vyvodil, že sT antigen je postradatelný a že pro zachování proliferace karcinomových buněk je stále hlavním faktorem LT antigen. Při umlčení obou T typů antigenů (sT i LT) došlo k růstové retardaci karcinomových buněk pozitivních na MCPyV, následnou „ektopickou expresí“ LT antigenu došlo k zvrácení celé

situace. Z toho výsledku byla odvozena zastupitelnost ST antigenu jako faktoru pro přežití a růst karcinomových buněk (*Shuda et al., 2011*; needitovaný manuskript *Angermeyer et al., 2013*)

2.3 KAPSIDA POLYOMAVIRŮ

Následující kapitoly shrnují to, co je obecně známo o kapsidě a kapsidových proteinech polyomavirů. Tyto oblasti jsou u MCPyV velice málo prostudovány a proto je potřeba pro studium kapsidy a jejich proteinů u MCPyV z těchto znalostí vycházet.

Velikost kapsidy myšího polyomaviru je asi 45 nm, pokud jsou tvořeny VLPs jsou detekovány i menší částice s velikostí okolo 32 a 26 nm, tento jev je podmíněn in vitro podmínkami (*Salunke et al., 1989*). Podobně u MCPyV byly detekovány kapsidy o velikosti 45 nm, ale i menší pohybující ve velikosti 20-35 nm, viz obr. 2.4 (*Touzé et al., 2010*). Virová kapsida (obr. 2.4) je složena ze tří stavebních komponent – z hlavního strukturního proteinu VP1 a minoritních strukturních proteinů VP2 a VP3. Kapsida v sobě uzavírá tzv. virové „nucleocore“, které je definováno jako kondenzovaný minichromozom viru. Minichromozomem je pak myšlen komplex buněčných histonů (H2A, H2B, H3 a H4) s virovou DNA. Histon H1 je při kondenzaci chromozomu vytěsněn. Součástí „nucleocore“ je ale také hlavní kapsidový protein VP1, který se váže nespecificky k . Polyomavirová kapsida je ikosahedrální. Celkem 360 molekul hlavního kapsidového proteinu se skládá do 72 pentamerů. Každý pentamer pak interaguje právě s jedním minoritním proteinem VP2 nebo VP3. Minoritní proteiny jsou kotveny silnými hydrofóbními interakcemi do dutiny, která se nalézá v ose každého pentameru (*Chen et al., 1998*). Jednotlivé pentamery jsou mezi sebou propojeny prostřednictvím C-konců VP1 proteinů (*Liddington et al., 1991*; *Stehle et al., 1996*). K morfogenezi virionů (kapsid) dochází v jádře, kam jsou transportovány komplexy VP1 s minoritními proteiny (*Barouch and Harrison, 1994*).



Obr. 2.4 Model kapsidy myšního polyomaviru (převzato z *Liddington et al., 1991*). **Elektronmikroskopický snímek viru podobných částic (VLPs) MCPyV.** Na obrázku lze rozlišit dvě různé velikosti částic o velikosti 45nm a 30 nm, měřítko je 100 nm (převzato z *Touzé et al., 2010*).

2.4 KAPSIDOVÉ PROTEINY POLYOMAVIRŮ

2.4.1 STRUKTURA A ÚLOHA HLAVNÍHO KAPSIDOVÉHO PROTEINU POLYOMAVIRŮ

MCPyV je obecně málo prostudován a to se týká i jeho u strukturních proteinu a jeho kapsidy. V takovýchto studijních počátcích je třeba vycházet ze znalostí získaných u jiných zástupců polyomavirů či obecných fakt. Tyto informace je možno využít jako odrazový můstek pro další studium MCPyV. Nicméně taková srovnání je třeba experimentálně ověřit, neboť ke stejnému cíli mohou různé viry použít různé mechanismy.

Převažující složkou polyomavirové kapsidy je hlavní kapsidový VP1 protein. Pro srovnání, u MPyV je VP1 velký 45kDa, u MCPyV asi 46,5 kDa. Protein VP1 vytváří pentamery, které skládají do polyomavirové kapsidy. Funkce VP1 není pouze strukturní. VP1 je odpovědný za přichycení viru k buňce, neboť obsahuje doménu vázající se k receptoru (*Stehle et al., 1994; Neu et al., 2009*). VP1 protein podstupuje také četné postranlační modifikace, z nichž významná je fosforylace serinů a threoninů. Tento jev je ovlivňován VP2 proteinem (*Forstová et al., 1993; Li et al., 1995*). Ze znalosti terciální struktury, lze VP1 rozdělit na část N-koncovou, střední a C-koncovou. N-konec VP1 disponuje jednak jaderným lokalizačním signálem, ale také sekvenčně nespecifickou DNA vazebnou doménou. U SV40 viru bylo zjištěno, že součástí jaderného lokalizačního signálu je KRK motiv. Motivy bohaté na K/R se nalézají také u VP1 většiny lidských polyomavirů kromě KI a WU viru, a také HPyV6 a 7, které mají jaderný lokalizační signál slabý či jej zcela postrádají (*Kalderon et al., 1984;*

Chang et al., 1993; Gheule et al., 2012). Prvních 15 aminokyselin VP1 polyomavirů je orientováno do dutiny pentameru, kde dochází k interakci s virovou DNA a pravděpodobně je tak tvořeno „nucleocore“ (viz dále). Střední část VP1 je tvořena hlavně z β -listů s α -helixy, které jsou propojovány flexibilními smyčkami (BC, DE, HI, EF, FG a G2). BC, HI a DE smyčky jsou exponovány na povrchu. U MPyV jsou BC a HI smyčky jsou zahrnuty v interakci s receptorem. C-koncová část VP1 obsahuje α helix a C-smyčku a vytváří interace mezi pentamery v rámci kapsidy (*Liddington et al., 1991; Stehle et al., 1996*). Model proteinu VP1 a jeho smyček různých polyomavirů je pak ukázán na obrázku 2.6.

Z výsledku fylogenetické analýzy VP1 proteinů různých lidských polyomavirů je patrné, že mezi lidskými polyomaviry je poměrně nízká identita - 26-55 %. Při analýze sekvence VP1 polyomavirů na společné fylogenetické větvi pak identita výrazně stoupá, např. shoda v aminokyselinových sekvencích BKV a JCV činí cca 78 %, KI a WU viry sdílí cca 66%. Při pohledu na celkovou strukturu VP1 proteinů jistá shoda existuje napříč lidskými polyomaviry. Lze ji najít na úrovni smyček VP1 proteinu (obr. 2.5). Nejvíce konzervované jsou smyčky EF a GH (G2), u ostatních smyček lze detekovat alespoň menší sekvenční podobnost. BC smyčka u BKV a JCV je vysoce variabilní (*Stehle et al., 1996; Gheule et al., 2012*). Smyčky a porovnání aminokyselinových sekvencí proteinů VP1 různých lidských polyomavirů jsou znázorněny na obrázku 2.5. Zde můžeme porovnat sekvenční shodu či odlišnost mezi jednotlivými zástupci. Lze si všimnout výraznější velikosti VP1 MCPyV. Pokud se zaměříme na MCPyV dále, pak je z tohoto obrázku patrna podobnost MCPyV s HPyV9 a TSPyV (TSV). U obrázku 2.1 (viz kapitola 2.1) je vidět ještě blízká příbuznost MCPyV s myším polyomavirem (MPyV) (*Gheule et al., 2012*).

```

AB-loop
BKV      MAPT-----KRGECPGAA-----PKKPKEPVQVPKLLIKGGVEVLEVVTG-VDAIT 46
SV40     MAPT-----KRGSCPGAA-----PKKPKEPVQVPKLVKGGIEVLGVKGTG-VDSFT 46
JCV      MAPT-----KRGGER-----KDPVQVPKLLIRGGVEVLEVKGTG-VDSIT 38
TSPyV    MAPK-----RKGEFCAR----KCPKT--CPTPKVPKLMKGNIEVLNLVTG-PDSIT 47
MCPyV    MAPK-----RKASSTCKTPKRQCIPKPGCCPNVASVPKLLVKGVEVLSVVTG-EDSIT 53
LPyV     MAPQ-----RKRQD-GAC-----KKTCPAPVPVRLLVKGGVEVLEVRTG-PDAIT 44
HPyV9    MAPQ-----RKRQECGACP-----VKKTCPTPAPVPKLLVKGVEVLEVRTG-PDAIT 47
HPyV6    MPCH-----RKGNP-----IQKLPVIRKGGVEVMEVPLSEDTIY 37
HPyV7    MPCQ-----RKGNP-----IQKLPVIRKGGVEVLDTVPLTEETQY 37
KIPyV    MSCT--PCRPRQKRLTRPRSQ-----VPRVQTLATEVKKGGVEVLAAPVLSSETEF 48
WUPyV    MACTAKPACTAKPGRSPRSQ-----PTRVQSLPKQVRKGGVDVLAAPVLSSETEF 50
* .      :      :      :      :      :      :      :      :      :      :      :
          :      :      :      :      :      :      :      :      :      :      :

<-----BC loop----->
BKV      EVECFLNPEMGGDP-----ENLRGFSLSAENDFS----SDSPEKMLPCYSTAR 93
SV40     EVECFLNPMGNPD-----EHQKGLSKSLAAEKQFT---DDSPDKEQLPCYSVAR 93
JCV      EVECFLTPEMGGDP-----EHLRGSFKSISISDTFE---SDSPNRDMLPCYSVAR 85
TSPyV    TIELYLNTRMGQND-----ESKDNYGYSEKVTVANSSD---QDKPTSGEIPYSTAR 96
MCPyV    QIELYLNPRMGVNSPDLP---TTSNWTYTYDLPQKSS----PDQPIKENLPAYSVAR 105
LPyV     QIEAYLNPRMGNNI-----PSEDLYGYSNSINTAFSKA---SDTPNKDTLPCYSVAV 93
HPyV9    QIEAYLNPRMGNNN-----PTDELYGYSADINVASSKA---SDNP NATTLPTYSVAV 96
HPyV6    KVEAILLNFASGSNT-----AVYQSRGAPYT-----FTDTLDAGSSSLCYTLAV 81
HPyV7    KVEAVLLPNFGKAATT-----GNFQSRGLPYP-----MSDTLPGAALCYSVAV 81
KIPyV    KVELFVKPVI GNTTAAQDGREPTPHYWSISSAIHDKESGSSIKV EETPDADTTVCYSLAE 108
WUPyV    KVELFVKPVI GNAEGT-----TPHYWSISSPLKTAE AAN----VTPDADTTVCYLSLQ 99
* *      : . : .      :      :      :      :      :      :      :      :
          :      :      :      :      :      :      :      :      :      :      :

CD loop          <----DE loop---->
BKV      IPLPMLNLEDITCGNLLMWEAVTVQTEVIGITSMNLNLAGSQVHFEH-GGGPIQGSNFHF 152
SV40     IPLPMLNLEDITCGNLLMWEAVTVKTEVIGVTAMLNLHSGTQKTHEN-GAGKPIQGSNFHF 152
JCV      IPLPMLNLEDITCGNLLMWEAVTLKTEVIGVTSMLNVHNSGQATHDN-GAGKPVQGTSFHF 144
TSPyV    INLPLNLEDITCNTLTMWEAVSVKTEVVGVSLLVNVHMATKRMVDKGI GFVPEGMNFHM 156
MCPyV    VSLPMLNEDITCDTLQMWEAISVKTEVVGISSLINVHYWDMKRVHDYAGIPVSGVNYHM 165
LPyV     IKLPLLNEDMTCDTILMWEAVSVKTEVVGISSLVNLHQGGKYIYGSSSGCVPVQGTTYHM 153
HPyV9    IKLPLLNEDMTCDTLLMWEAVSVKTEVMGISSLVNLHQGGKYIYGSSSGTIPVQGTTLHM 156
HPyV6    VNLPEIPEALCDDTLVWEAFRVE TELIFTPQVG-----SAGYIRAQGT PAGVEGSMYF 136
HPyV7    INLPEIPDAMCEDTMIVWEAYRLETELLFAPQMA----SSGYORANGTLAGTEGSLYF 136
KIPyV    IAPPDIPNQVSECDMKVWELYRMETELLVVPLVN----ALGNT--NGVVHGLAGTQLYF 161
WUPyV    VAPPDIPNQVSECDMLIWELYRMETEVLVLPVLN----AGILT--TGGVGGIAGPQLYF 152
* *      : * : : :      : : ** : : * : : :      :      :      :      :      :
          :      :      :      :      :      :      :      :      :      :      :

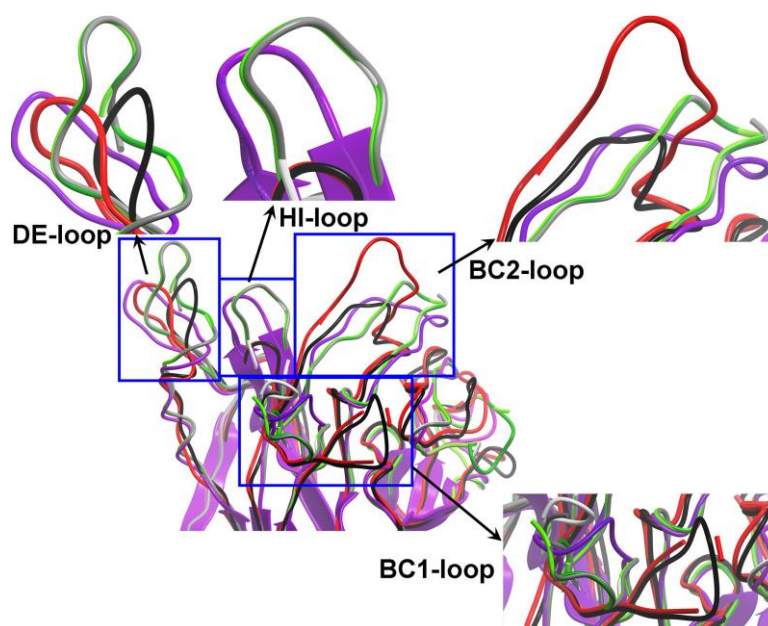
<-----EF loop----->
BKV      FAVGGEPLEMQGLMNYRSYYPDGT-----ITPKNPTAQSQVMNTDHKAYLDENNA 203
SV40     FAVGGEPLELQGLVANYRTKYPQGT-----VTPKNATVDSQQMNTDHKAVLDKDNA 203
JCV      FSVGGEALELQGLVFNRYTKYPDGT-----IFPKNATVQSQQVMNTEHKAYLDKNKA 195
TSPyV    FAVGGEPLELQFLTGNRYTDYSAND-----KLVVPPIKHQSTQGLNPHYKQLTKDGA 209
MCPyV    FAIGGEPDLQGLVLDYQTEYPKTTNGGPTIETVLGRKMTPKNQGLDPQAKAKLDKDG 225
LPyV     FAVGGHPELQGLVASSTATYPDDV-----VAIKNMKPGNQGLDPKAKPLLDKDG 204
HPyV9    FSVGGEPLELQGLVASSTTYPTDM-----VTIKNMKPVNQALDPNAKALLDKDGK 207
HPyV6    WACGGPLDVIGINP-DPERMVAAG-----LEGPSKENQPSVAGIK-ATRKQVTAN 187
HPyV7    WACGGPLDVIGINP-DPERLKVNEA-----LEGGPN--TDVASLQ-ALRKQVNAAN 184
KIPyV    WAVGGQPLDVVGVPTDKYKGPTTYT-----INPPGDPRTLHVYNSN-TPKAKVTSER 213
WUPyV    WAVGGQPLDVLGLAPTEKYKGAQYT-----VNPKTNGTVPHVYSSSETPRARVTNEK 205
: : ** . * : :      :      :      :      :      :      :      :      :
          :      :      :      :      :      :      :      :      :      :      :

<----->          <--GH loop-->
BKV      YPVECWVPDES NENARYFGFTGGENVPPVLHVNTATVLLDEQGVGLCKADSLYVS 263
SV40     YPVECWVPDPK NENARYFGTYTGGENVPPVLHITNTATVLLDEQGVGLCKADSLYVS 263
JCV      YPVECWVPDPTRNENARYFGTLTGGENVPPVLHITNTATVLLDEFGVGLCKGDNLYLS 255

```


polyomavirů (i jiných virů) vytvářet VLPs inspirovala vědce k různým návrhům na jejich využití pro účely diagnostiky nebo terapie. Do VLPs je možno enkapsidovat cizí DNA a využít ji tak pro účely genové terapie. Velkou překážkou tohoto vývoje je silná imunogenicita VLPs. Imunogenicita má na druhou stranu využití ve vývoji vakcín. Dnes jsou užívány VLPs papilomaviru jako preventivní vakcíny proti karcinomu děložního čípku, ale VLPs lze využít pro vývoj vakcín proti dalším virům, od kterých jsou odvozeny (Wang and Roden, 2013). Lze také konstruovat chimerické VLPs, které ponесou uvnitř či na povrchu cizí epitopy jiných patogenů.

VLPs jsou podobně jako viry schopny překonávat vnější membránu různých typů buněk a proto se nabízí možnost je přeměrovat na určité typy tkání manipulací jejich povrchových sekvencí (Forstova et al. 1995, Krauzewicz et al., 2000). VLPs lze pro jejich imunogenicitu také využít jako antigen pro přípravu protilátek nebo pro klinickou detekci protilátek u pacientů (Caparrós-Wanderley et al., 2004; Touzé et al., 2010).



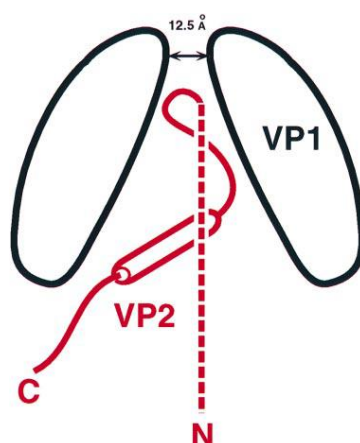
Obr. 2.6. Molekulární model VP1 proteinu různých lidských polyomavirů. Tmavě fialová značí 3D strukturu VP1 SV40, tmavě modrá značí BKV VP1 protein, červenorudá JCV VP1, žlutá KIV VP1, černá WUPyV, tmavě šedá MCPyV VP1, tmavě purpurová HPyV6 VP1, červená HPyV7 VP1, světle šedá TSPyV VP1, tmavě zelená HPyV9 VP1, zelená LPyV. Převzato z Gheule et al., 2012.

2.4.2 STRUKTURA A ÚLOHA MINORITNÍCH KAPSIDOVÝCH PROTEINŮ POLYOMAVIRŮ

Minoritní kapsidové proteiny VP2 a VP3 jsou translatovány ze stejného čtecího rámce, liší se od sebe pouze délkou. VP3 je identický s C-koncovou částí VP2 a je tedy zkrácenou formou VP2, která je translatována z vnitřního methioninu, ATG (součást MAL motivu u většiny lidských polyomavirů, MAF u MCPyV). V sekvenci VP2 MCPyV jsou dva další ATG kodony, není proto jasné, zdali a ze kterého ATG sekvence VP3 začíná, existuje tedy možnost existence zkráceného VP3 proteinu. Velikost VP2 u MPyV je cca 35kDa, VP3 má asi 23 kDa. U MCPyV je VP2 kratší, cca 25kDa, a delší varianta VP3 má cca 21kDa. Zatímco velikost proteinu VP2 u MPyV je 319 aminokyselin, u lidských polyomavirů je průměru cca 350 aminokyselin. Velikost KI a WU je 400 a 415 aminokyselinových zbyků. Na druhé straně VP2 MCPyV má pouze 241 aminokyselin. Smysl velikostní variability VP2 není znám. U lidských polyomavirů se nalézá pouze pět konzervovaných zbytků aminokyselin na N-konci a čtyři na C-konci proteinů VP2. VP2 a VP3 u SV40 nesou na svém C-konci jednak jaderný lokalizační signál a dále ještě vzdálenější element vázající nespecificky DNA. U lidských polyomavirů nalézáme rovněž dva obdobné C-koncové motivy bohaté na přítomnost lysinu a argininu, které se také nachází vždy v podobných oblastech jako u SV40. To, zda druhý bazický motiv funguje také u lidských polyomavirů jako DNA vazebný motiv nebylo doposud ukázáno. U VP2/VP3 MCPyV a TSPyV, podobně jako u MPyV, druhý motiv zcela chybí (*Ghelue et al., 2012*).

Minoritní kapsidové proteiny nejsou vystaveny na povrchu kapsidy, ale vždy jedna molekula (VP2 nebo VP3) je svým C-koncem přichycena v centrální dutině pentameru VP1, N-konec minoritního proteinu pak směřuje dovnitř kapsidy (*Rayment et al., 1982*). Skupina Chen a kolektiv provedla krystalografickou studii, ze které usoudila, jak C-koncová část VP2 či VP3 interaguje s pentametrem VP1. Minoritní proteiny vkládají svůj C-konec poskládaný v podobě vlásenky do dutiny VP1 proteinu. V dutině dochází k pevnému ukotvení minoritního proteinu díky hydrofobním interakcím (Obr. 2.7). Kotevní část obsahuje α -helix. Zbývající část daného minoritního proteinu však zůstává značně flexibilní - dosud se nezdařilo určit, zda tato část disponuje nějakou sekundární strukturou či nikoli. Touto skupinou byla proto vyslovena hypotéza, že by minoritní proteiny (hlavně tedy VP2) mohly, za podmínek změny konformace VP1, svůj flexibilní N-konec exponovat z pentameru a účastnit se vstupu viru do buňky například penetrací membrány. Původně vnitřní forma proteinu VP2 se dostane

z vnitřku na povrch virionu vnitřním přeuspořádáním, kdy C-konec zůstává stále ukotven v dutině VP1, ale N-konec je exponován na povrch virionu a je tak odhalen pro možné interakce s membránami (Chen *et al.*, 1998). Tato hypotéza však nebyla prokázána.



Obr. 2.7. Schéma interakce mezi VP1 a VP2 proteinem. Červeně značený VP2 je vložen do dutiny VP1 pentameru, ve vrcholu dutiny se stáčí a za interakce s VP1 se vrací zpět k místu vstupu, vytváří tak vlásence podobnou strukturu. Převzato z Chen *et al.*, 1998.

Role minoritních strukturních proteinů není stále jasná ani u nejlépe prostudovaných polyomavirů jako jsou myší polyomavirus (MPyV) či virus SV40. Proto se na jejich funkci soudí z různých mutačních studií. Jedním z takových příkladů je studium významu minoritních proteinů v infektivitě viru. Bylo prokázáno, že minoritní proteiny nejsou potřebné pro tvorbu pseudokapsid, ovšem pro infektivitu viru potřebné jsou. Po mutaci ATG kodonu VP2 nebo VP3 je virus velmi slabě infekční, při mutaci obou proteinů virus ztrácí svoji infektivitu kompletně (Mannova *et al.* 2002). Z této studie tedy plyne důležitost obou minoritních proteinů pro infekčnost viru. Proto je celkem přirozenou otázkou, jaký význam má existence VP3 proteinu, tedy zkrácené formy VP2. Jedním z logických vysvětlení by mohla být malá velikost viru, jež vedla k vytvoření menší varianty VP2. Menší VP3 tak může zastoupit strukturní a VP1 vazebné aktivity VP2. Zatímco unikátní část VP2 pak může plnit funkci při vstupu viru do buňky. Část proteinů VP2 je tak zastoupena VP3 a dojde k ušetření místa ve virionu (Barouch and Harrison, 1994).

Dalším z příkladů mutační studie je studium významu myristilace VP2. VP2 protein je totiž na svém N-koncovém glycinu myristylován. Bylo ukázáno, že tato modifikace ovlivňuje

infektivitu viru. (Sahli *et al.*, 1993). Mannová a kolektiv v roce 2002 ukázali mutační analýzou, že jednak myristilace, ale zejména aminokyselina, za jakou je koncový glycin vyměněn má vliv na míru snížení infekivity. Zajímavé je, že se problém mutovaných virů neprojevil v prvním kole infekce, ale nahromadil se při reinfekcích. N-konec VP2 se také ukázal jako pravděpodobný mediátor správné fosforylace VP1 proteinu. Při samostatné expresi VP1 chyběly některé fosforylované formy tohoto proteinu, Při ko-expressi VP2 a VP1 byly fosforylované formy obnoveny. (Forstová *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1995).

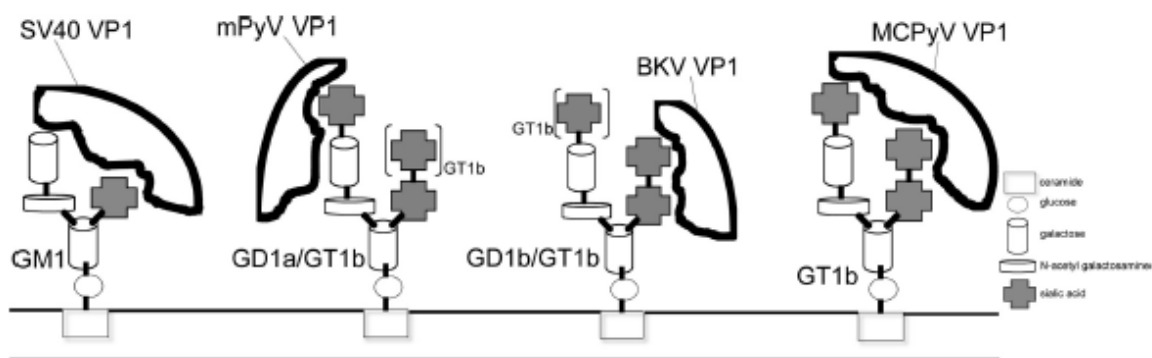
V naší laboratoři bylo pozorováno, že VP2 a VP3 mají cytotoxické vlastnosti a afinitu k vnitrobuněčným membránám. Toto platí pouze při jejich samostatné expresi, tedy za nepřítomnosti ostatních virových složek. Za těchto podmínek se ukázaly minoritní proteiny jako silné induktory apoptózy. Apoptóza by mohla být vyvolána interakcemi minoritních proteinů s poškozenými membránami mitochondrií, jádra a endoplazmatického retikula. Poškození membrán bylo zaznamenáno při imunoelektronové analýze buněk a hovoří pro možnou roli minoritních proteinů jako viroporinů (Huerfano *et al.*, 2010). Buněčná smrt při virové infekce ale pravděpodobně není na minoritních proteinech vysloveně závislá, přispívají k ní také časné antigeny (Huerfano *et al.*, 2010).

V buňkách, ve kterých byly samostatně exprimované minoritní proteiny MPyV, byl pozorován únik histonu H1 z jádra. Degradace histonu H1 patrně souvisí s narušením jaderné membrány (Bouřa, 2004; Vít, 2010; Plevka, 2002).

K zajímavým závěrům došla studie, která sledovala chování minoritních proteinů exprimovaných také v kontextu VP1, ne pouze samostatně. Při infekci savčích buněk MPyV byly pozorovány všechny tři strukturální proteiny v jádře. Pokud ale jsou minoritní proteiny a VP1 exprimovány samostatně v hmyzích buňkách, pak se VP2 nalézá v okolí jádra, VP3 je rozptýlen v cytoplazmě a VP1 je jako jediný pozorován v jádře. Při společné expresi VP1 a VP2 či VP3, jsou potom minoritní proteiny lokalizovány také v jádře. U savčích buněk se lépe dostávají všechny tři strukturální proteiny do jádra, jsou-li v komplexu VP1-VP2 či VP1-VP3. Z toho vyplývá, že ačkoliv u jednoho každého byl identifikován jaderný lokalizační signál, strukturální proteiny polyomavirů se snáze dopravují do buněčného jádra, jsou-li v komplexu (Forstová *et al.*, 1993). Je postulováno, že viroporinové vlastnosti minoritních strukturálních proteinů by mohly být využity při úniku polyomaviru z endozmálního kompartmentu, pravděpodobně z endoplazmatického retikula do cytoplazmy na cestě do buněčného jádra Pro potvrzení těchto a dalších funkcí bude zapotřebí dalších experimentů.

2.5 VSTUP POLYOMAVIRŮ DO BUŇKY A POHYB BUŇKOU

Pro přichycení polyomavirů k buňce se jako primární receptory běžně uplatňují gangliosidy. Gangliosidy jsou glykolipidy s ceramidovou doménou a karbohydrátovou doménou, jejíž součástí je sialová kyselina. Zatímco ceramidová doména je zanořena v membráně, karbohydrátová doména přímo interaguje s virem. Na obrázku 2.8 jsou ukázány struktury gangliosidových receptorů využívaných některými polyomaviry pro vstup do buňky. Virus SV40 interaguje s gangliosidovým receptorem GM1, který má pouze jednu sialovou kyselinu a to je patrně důvod proč tento virus nehemaglutinuje. Ostatní viry na svých receptorech mají více sialových kyselin a aglutinují červené krvinky. MPyV váže gangliosidy GD1a a GT1b, virus BKV váže GD1b a GT1b. MCPyV sice váže gangliosid GT1b, ale v jeho případě je situace složitější (Tsai et al., 2003; Erickson et al., 2009). Dle posledních studií se zdá, že MCPyV pro vstup do buňky využívá dvou typů receptorů. Prvý typ se uplatňuje při vlastním přichycení viru k buňce a jedná se o nesialované karbohydrátové receptory, tzv. glykosaminoglykany, jako např. heparan sulfát. Až pro vlastní internalizaci buňkou využívá MCPyV druhou molekulu - gangliosid (GT1b) jako koreceptor. V případě MCPyV se tedy ukazuje další možná role gangliosidových receptorů a to v procesu probíhajícím po přichycení k buňce (Schowalter et al., 2011; Neu et al., 2012).



Obr. 2.8. Model vytvořený Kim a kolektivem ukazující odlišné interakce VP1 – gangliosid u polyomavirů SV40, MPyV, BKV a MCPyV. U MCPyV vidíme možnou interakci se sialovými kyselinami na obou větvích gangliosidu GT1b, zatímco u MPyV se jedná pouze o interakci s jednou sialovou kyselinou jedné větve GT1b, u BKV jsou to sialové kyseliny na jedné větvi GT1b. Převzato z Erikson et al., 2009.

Vstup a pohyb polyomavirových částic buňkou není dodnes uzavřenou záležitostí. Pro vstup do buňky využívá většina neobalených DNA virů receptorem zprostředkovanou endocytózu, cílem těchto virů je buněčné jádro. Podle dosavadních studií se zdá, že polyomaviry nesdílí jednu společnou endocytickou dráhu. Význačným společným bodem více či méně podobných endocytických drah využívaných polyomaviry je endoplazmatické retikulum (dále jako ER). Velmi zjednodušené schéma vstupu polyomavirů je, že po vazbě na buňku je virus internalizován do monopinocytického váčku a endocytickou drahou doručen do ER. Z ER je pak rozvolněný virion transportován do jádra. Nejlépe jsou prostudovány endocytické dráhy MPyV a viru SV40, částečně lidských polyomavirů - JC a BK viru. JC virus využívá klatrinem zprostředkovanou endocytickou dráhu a jak se ukázalo, tak infekce viru je závislá na kyselém pH endosomů (*Pho et al., 2000; Ashok and Atwood, 2003*). BK virus využívá caveolární endocytózu a také potřebuje pro svoji infektivitu kyselého pH (*Eash et al., 2004; Moriyama et al., 2007*). Pro cestu do ER využívá BK virus COPI váčku, které zprostředkovávají retrogradní transport do ER (*Moriyama and Sorokin, 2008*). O viru SV40 se nejprve soudilo, že využívá ke vstupu do buňky caveol a že nepotřebuje kyselého pH endozómů pro produktivní infekci (*Pelkmans 2001*;). Původní model byl však později přehodnocen a nyní se soudí, že SV40 využívá endosomy klasické endocytické dráhy, tj. časného a pozdního endolyzozomálního kompartmentu na cestě do ER (*Engel et al., 2011*). SV40 tedy prochází časnými a pozdními endozómy a pro vstup do ER využívá podobně jako BK virus COPI váčku (*Moriyama and Sorokin, 2008*). Role caveolinu1 v infekci MPyV nebyla jednoznačná (*Gilbert and Benjamin 2000, Richterová et al. 2001 Gilbert et al., 2005*), ale později bylo ukázáno, že caveolin1 není nutný pro internalizaci MPyV ani pro jeho infektivitu. (*Liebl et al 2006*) Monopinocytické váčky s viriony MPyV dále fúzí s časnými endozomy. Kyselého pH endozómů je nutné pro infekčnost viru (*Liebl et al., 2006; Horníková, 2012*). MPyV je dále nalézán v endolyzozómech, ER, a také v recyklujících endozómech (*Liebl et al. 2006*). Jakým způsobem se MPyV dostává do ER, není známo, ovšem COPI váček nevyužívá (*Mannová and Forstová, 2003*). Předpokládá se, že v ER dochází k rozvolnění virionu, které umožní následný transport do jádra.

Vše nasvědčuje tomu, že u MPyV i SV40 dochází k rozvolnění virionu v ER využitím proteinů z rodiny protein disulfid izomeráz (*Manguson et al., 2005; Schelhaas et al., 2007*).

Pohyb virového genomu z ER do jádra není jasný. Virion se stane hydrofobním díky svému rozvolnění a expozici C-koncového ramena VP1, virová částice se tak má tendenci se vázat

k membráně. Zde by mohl nastat čas pro funkci minoritních proteinů – jako viroporinů. (*Manguson et al., 2005*). Existují tři hypotézy o uvolnění genomu z ER a jeho doručení do jádra. Jedna hypotéza předpokládá, že v ER jsou změnou konformace (také role chaperonů ER) odhaleny na kapsidě minoritní proteiny, jež svými viroporinovými schopnostmi (tvorbou póru v ER membráně) umožní, aby rozvolněná částice a genom přešly do cytoplazmy, poté dojde k transportu genomu jaderným pórem díky NLS VP1 a VP3 proteinu a interakci NLS minoritního proteinu VP3 s jaderným importinem (*Nakanishi et al., 2002*). Druhá hypotéza uvažuje o zapojení ERAD dráhy do tohoto procesu. Po rozvolnění virionu jsou minoritní proteiny rozpoznány složkou ERAD dráhy a virion je z endoplazmatického retikula vypuzen, podobně jako špatně poskládané proteiny, do cytoplazmy. „Knock-down“ ERAD proteinu Derlin 1 snížil efektivitu infekce BK viru (*Jiang et al., 2009*), a proteinu Derlin 2 infektivitu MPyV (*Lilley et al., 2006*). Nelze ani vyloučit třetí variantu, že by virion mohl být translokován viroporinovou aktivitou minoritních strukturních proteinů přímo z ER do jádra. Bylo pozorováno, že při infekci MPyV zůstává většina virových genomů a VP1 proteinů vně buněčného jádra a v cytoplazmě pak dochází k jejich degradaci. Pouze několik málo virionů doručí svůj genom do jádra (*Mannová and Forstová, 2003*). Z tohoto vyplývá, že vstup do jádra není pro virové částice samozřejmostí a že velké množství virových částic je navedeno na neinfekční („neproduktivní“) dráhu, která končí degradací.

O vstupu a pohybu MCPyV buňkou se prozatím neví nic. Veškeré studium je odkázáno na použití umělých VLPs, protože doposud nebyl izolován infekční MCPyV.

3 CÍLE

V naší laboratoři jsou léta studovány mechanismy jednotlivých kroků polyomavirových infekcí na modelu myšního polyomaviru. Nedávno bylo studium rozšířeno a lidský BK virus a v současné době se zájem soustřeďuje také na nově objevený lidský polyomavirus spojovaný s velmi agresivní formou kožního nádoru – polyomavirus karcinomu Merkelových buněk (MCPyV). Zajímá nás, jak se chování tohoto viru shoduje, či odlišuje od chování ostatních polyomavirů. Studium MCPyV je složitější o to, že se dosud nepodařilo virus připravit a ani není známo, které buňky jsou pro něj permisivní.

Podmínkou pro studium vlastností jednotlivých genových produktů MCPyV je dostupnost specifických protilátek. Proto prvním cílem této diplomové práce bylo:

1. PŘIPRAVIT MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKU PROTI KAPSIDOVÉMU PROTEINU VP1 POLYOMAVIRU KARCINOMU MERKELOVÝCH BUNĚK

Protilátka namířená proti minoritním strukturním proteinům MCPyV je sice také připravována v naší laboratoři, ale stále ještě není k dispozici. Abychom mohli sledovat lokalizaci těchto proteinů a studovat jejich interakce v buňce, rozhodli jsme se připravit vektory pro produkci VP2 a VP3 fúzovaných s epitopy, proti nimž jsou komerčně dostupné protilátky a také připravit vektor pro zajištění produkce putativního proteinu VP3 v jeho nefúzované podobě. **Druhým cílem tedy bylo:**

2. ZKONSTRUOVAT VHODNÉ EXPRESNÍ VEKTORY PRO PRODUKCI MINORITNÍCH STRUKTURNÍCH PROTEINŮ VP2 A VP3 MCPyV V SAVČÍCH BUŇKÁCH KE STUDIU JEJICH INTERAKCÍ S BUNĚČNÝMI STRUKTURAMI.

- konkrétně:

- a) **připravit vektory pro produkci proteinů VP2 a VP3 MCPyV fúzovaných s epitopem FLAG**
- b) **vložit polylinker do komerčně dostupného vektoru specificky navrženého pro dostatečnou expresi virových proteinů a použít takto upravený vektor pro zajištění exprese VP3 MCPyV**

4 MATERIÁL A METODY

4.1 MATERIÁL

4.1.1 ROZTOKY, KULTIVAČNÍ MÉDIA (složení), ANTIBIOTIKA

➤ ROZTOKY

- **30% akrylamid/bisakrylamid:** 29% akrylamid, 1% bisakrylamid, dd H₂O
- **B pufr:** 10mM tris-HCl (pH7,4), 150 mM NaCl, 10 μM CaCl₂
- **Blotovací pufr pro Western blot:** 25 mM tris, 192 mM glycin, 20% etanolmetanol, pH 8,3
- **Chloroform** s izoamylalkoholem (poměr 24:1)
- **Barvicí roztok pro polyakrylamidové gely:** 3,5% CH₃COOH, 0,5% Coomassie Brilliant Blue G250
- **Fixační roztok pro polyakrylamidové gely:** 50% etanolmetanol, 5% CH₃COOH
- **Laemmliho pufr 5x koncentrovaný:** 50% glycerol., 25% merkaptotanol, 50 mM tris-HCl (pH 6,8), 5% SDS, 0,005% bromfenolová modř
- **Luminol:** roztok A – 18 ml dH₂O, 2 ml tris-HCl (pH 8,5), 250 mM luminol v DMSO (200 μl), 90 mM kyselina kumarová v DMSO (88μl), roztok B - 18 ml dH₂O, 2 ml tris-HCl (pH 8,5), 30 μl H₂O₂
- **PBS (phosphate buffered saline):** 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM Na₂HPO₄, 6,5 mM KH₂PO₄
- **RIPA pufr:** 50 mM tris-HCl (pH 7,4), 1 mM EDTA-NaOH (pH 8,0), 150 mM NaCl., 1 % NP-40, 1 % deoxycholát sodný, 0,1 % SDS (+ přídavek PMSF – inhibitor proteáz)
- **Roztok I (minipreparace DNA):** 50 mM glukóza, 25 mM tris-HCl, 10 mM EDTA (pH 8)
- **Roztok II (minipreparace DNA):** 1% SDS, 0,2M NaOH
- **Roztok III (minipreparace DNA):** 60 % 5M KAc, 11,5 % kyselina octová, 28,5 % d H₂O
- **RNáza** – roztok: 10 mg/ml v TE pufriu
- **SDS PAGE pufr** 10x koncentrovaný: 25 mM tris, 192 mM glycin, 1% SDS v dd H₂O, pH 8,3
- **TE pufr:** 10 mM tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA (pH 8)
- **Trypsin:** 0,25 % trypsin v PBS
- **Verzén:** 0,02 % verzén v PBS

➤ KULTIVAČNÍ MÉDIA

- **Médium pro savčí buňky 3T3, 3T6 a HEL-299:** DMEM-Dulbecco's modified Eagle's medium s glukózou 4500 mg, pyridoxinem, HCl a NaHCO₃ (Sigma) , 10% FBS, 1% 2mM glutamin, 1% antibiotika
- **Bezsérové médium (BSM) pro savčí buňky (Sigma):** DMEM-Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma) – s glukózou 4500 mg, pyridoxinem, HCl a NaHCO₃, 1% 2mM glutamin,
- **HAT médium pro hybridomy:** RPMI-1640 (Sigma), 10% FBS, 1% 2mM glutamin, 1% pyruvát, 1% antibiotika, 2% HAT suplement, 0,2% merkaptoetanol (filtrovaný)
- **RPMI médium:** RPMI-1640 (Sigma)
- **Médium pro myelomové buňky:** RPMI-1640 (Sigma), přidáno: 10% FBS, 1% 2mM glutamin, 1% pyruvát, 1% antibiotika, 0,2% merkaptoetanol (filtrovaný)
- **Médium pro hmyzí buňky se sérem:** TNM-FH Insect Medium s L-glutaminem (Sigma) filtrované, v redestilované vodě, pH 6,2, 10% FBS a 1% 2mM glutamin
- **Médium pro hmyzí buňky bez séra (BSM):** TNM-FH Insect Medium s L-glutaminem (Sigma) filtrované, v redestilované vodě, 1% 2mM glutamin, pH 6,2
- **LB (Luria-Bertani) médium (11):** 10 g pepton, 5 g kvasničný extrakt, 10 g NaCl doplněné destilovanou vodou a sterilováno, přidáno antibiotikum
- **Pevné médium** – živný agar (Nutrient agar N° 2, BioLife), destilovaná voda, 30 minut klávkováno a po zchladnutí přidána odpovídající antibiotika a směs byla nalita na misky
- **S.O.C médium:** 2% pepton pro bakteriologii, 0,5% kvasničný autolyzát, 20 mM glukóza, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄
- **Zamrazovací médium:** čisté RPMI-1640 (Sigma), 20% FBS a 10% DMSO

➤ ANTIBIOTIKA

- Ampicilin (Biotika) : užívaná konečná koncentrace 100 µg/ml
- Geneticin – G418 (Sigma) 50 mg/ml: používaný v konečné koncentraci 200 µg/ml
- Kanamycin (Sigma): používaný v konečné koncentraci 50 µg/ml
- Směs ATB pro tkáňové kultury (Gibco): 100x koncentrovaný roztok obsahující 10000 jednotek ampicilínu, 10 mg streptomycinu, 25 mg amfotericínu

- Zeocin (Invivogen) 100 mg/ml: používaný v konečné koncentraci 50 µg/ml

4.1.2 PROTILÁTKY

➤ PROTILÁTKY PRIMÁRNÍ

- myší monoklonální protilátka proti FLAG (Santa Cruz Biotechnology), ředěno 1000x (ve studii nahrazena protilátkou proti ESC, viz níže)
- králičí polyklonální protilátka proti ESC (Bethyl), ředěno 1000x pro IF, 5000x pro WB
- kozí polyklonální protilátka proti laminu B (Santa Cruz Biotechnology) ředěno 100x
- králičí protilátka proti BiP/Grp78 (Santa Cruz Biotechnology), ředěno 750x
- krysí protilátka proti proteinu pozdních endozomů/lyzozomů - Lamp2, supernatant (University of Iowa, Developmental Studies Hybridoma Bank), ředěno 10x
- myší polyklonální protilátka proti histonu H1 (Santa Cruz Biotechnology), ředěno 50x
- králičí polyklonální protilátka proti histonu H1 (Santa Cruz Biotechnology), ředěno 250x (ve studii nahrazena myší protilátkou proti histonu H1, viz výše)
- kozí polyklonální protilátka proti markeru časných endozomů EEA1 (Santa Cruz Biotechnology), ředěno 200x
- králičí polyklonální protilátka proti caveolinu-1 (Santa Cruz Biotechnology), ředěno 200x
- myší monoklonální protilátka proti proteinu VP1 MCPyV (příprava popsána v této práci, P. Sauerová, PřF UK), neředěný supernatant
- myší polyklonální protilátka proti proteinu VP1 MCPyV(ÚHKT), sérum, ředěno 500x
- myší polyklonální protilátka proti proteinu VP1 MCPyV (příprava popsána v této práci, P. Sauerová, PřF UK), krevní sérum, ředěno 750x

➤ PROTILÁTKY SEKUNDÁRNÍ

- oslí protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s Alexa Fluor 488 (Molecular Probes), ředěno 1000x
- kozí protilátka proti králičím imunoglobulinům konjugovaná s Alexa Fluor 488 (Molecular Probes), ředěno 1000x
- oslí protilátka proti kozím imunoglobulinům konjugovaná s Alexa Fluor 546 (Molecular Probes), ředěno 1000x

- kozí protilátka proti králičím imunoglobulinům konjugovaná s Alexa Fluor 546 (Molecular Probes), ředěno 1000x
- kozí protilátka proti krysím imunoglobulinům konjugovaná s Alexa Fluor 546 (Molecular Probes), ředěno 1000x
- Cy3 protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s Alexa Fluor 546 (Molecular Probes), ředěno 200x
- kozí protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s křenovu peroxidázou (Pierce), pro WB ředěno 1000x
- kozí protilátka proti králičím imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou (Bio-Rad), pro WB ředěno 1000x
- faloidin konjugovaný s Alexa Fluor 546, značení aktinových vláken (SIGMA), ředěno 1000x

4.1.3 ENZYMY

- T4 DNA ligáza a pufr (Fermentas)
- T4 Polynukleotid kináza a pufr (Fermentas)
- ATP nukleotid (Fermentas)
- Deoxinukleotidy – dATP, dGTP, dCTP a dTTP (Fermentas)
- FastAP termosensitivní alkalická fosfatáza a pufr (Fermentas)
- Restrikční enzymy XhoI, BglII, EcoRV, EcoRI, Eco0109I, AvrII, (Fermentas)
- Pufry restrikčních enzymů – Orange, Tango, Red (Fermentas)
- Vent DNA Polymeráza (BioLabs) a 10x Thermopol pufr

4.1.4 PRIMERY

MerVP2_EcoRI_FW 5'-CAAGTAGAATTCATGGGCGGGATCATTACCCTG-3

- forward primer pro amplifikaci VP2 sekvence z plazmidu ph2m (komplementární část k ph2m je zeleně značená), obsahuje přídavné restrikční místo **EcoRI** pro každou VP2 sekvenci

MerVP3_EcoRI_FW 5'- CAA GTA **GAA TTC** ATGACCATCGAAGGCATCAGC-3'

- forward primer pro amplifikaci VP3 sekvence z plazmidu ph2m (komplementární část k ph2m je značena zeleně), primer obsahuje přídavné restrikční místo **EcoRI** pro každou VP3 sekvenci

MerVP2/3_BGLII_REV

5'-CAAGTAAGATCTATGAGATGAATGATTGACTT CTTCTTTG-3

- reverzní primer společný pro amplifikaci sekvence VP2 i VP3 z plazmidu ph2m (komplementární část k ph2m je značena zeleně), primer nese restrikční místo **BglII** pro každou VP2 i VP3 sekvenci, modře jsou značeny dva vložené nukleotidy pro ideální chování primeru (netvoří se vlásenky)

polylinker FOR 5'- **CACCGGGCGAATTGGGTACCGGGC'-3**

- primer forward pro amplifikaci polylinkerové části z pBLUESCRIPT SK-, zeleně je značena část komplementární k vektoru

polylinker REV 5'-**CACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGC-3**

- primer reverzní pro amplifikaci polylinkerové části z pBluescript SK-, zeleně je značena část primeru komplementární k vektoru

FW sekv pHGF-pol 5'- **TGTTCTGCGCCGTTACAGATCC -3'**

- primer forward pro sekvenaci vektoru „VP3-phGf-polyliker“ v oblasti vloženého polylinkeru, zeleně je značena část komplementární k vektoru

REV sekv pHGF-pol 5'- **GATTAAGAGTGGGGTGGCAG -3'**

- reverzní primer pro sekvenaci „VP3-phGf-polyliker“ v oblasti vloženého polylinkeru, zeleně je značena část komplementární k vektoru

MerVP3_XhoI_FW 5'- GTA GTA **CTC GAG** ATGACCATCGAAGGCATCAGC-3'

- primer forward, pro amplifikaci VP3 z ph2m vektoru, červeně je značeno vkládané restrikční místo **XhoI**, zeleně je značena část komplementární k vektoru ph2m

MerVP2/3_ECoRI_REV 5'- GTT CAA GAA TTC TCAGAGATGAATGATTGACTTCTTC-3'

- reverzní primer, pro amplifikaci VP3 z ph2m vektoru, červeně je značeno vkládané restriční místo **EcoRI**, zeleně je značena část komplementární k vektoru ph2m

4.1.5 BUNĚČNÉ LÍNIE, BAKTERIÁLNÍ KMENY, PLAZMIDY A VIRY

➤ BUNĚČNÉ LÍNIE

- **Myší fibroblasty linie NIH 3T6**
 - stabilní buněčná linie myších fibroblastů odvozených z embryonálních tkání. Získáno ze sbírky American Type Culture Collection.
- **Myší fibroblasty linie NIH 3T3**
 - stabilní buněčná linie myších fibroblastů odvozených z embryonálních tkání. Získáno ze sbírky American Type Culture Collection.
- **HEL 299**
 - lidské fetální plicní fibroblasty, získáno z American Type Culture Collection, Promochem
- **Hmyzí buňky linie SF9**
 - stabilní linie hmyzích buněk odvozená z ovarii motýla *Spodoptera frugiperda*. CRL-1711 ze sbírky American Type Culture Collection, Promochem
- **Myelomové B-lymfocyty linie Sp2/0**
 - linie z *Mus musculus* HB- 9311, Promochem

➤ BAKTERIÁLNÍ KMENY

- **One shot®TOP10 Chemically competent E.Coli (Invitrogen)**, získáno od Mgr. Martina Fraiberka

➤ PLAZMIDY

- **ph2m (Ch.Buck, Addgene)**
 - plazmid nesoucí sekvenci proteinu VP2 polyomaviru karcinomu Merkelových buněk, je určený pro expresi v savčích buňkách a má optimalizované kodóny. Základem vektoru je vektor phGf. Vektor nese T7 a SV40 promotor a kóduje také EGFP protein. Plazmid nese rezistenci na Zeocin. Viz Obr. 5.32.
- **pwM (Ch. Buck, Addgene)**
 - plazmid nesoucí sekvenci proteinu VP1 polyomaviru karcinomu Merkelových buněk, je určený pro expresi v savčích buňkách a má optimalizované kodóny. Základem vektoru je vektor pGwf. Vektor nese T7 a SV40 promotor a kóduje také EGFP protein. Plazmid nese rezistenci na Zeocin.
- **phGf (Ch. Buck, Addgene)**
 - plazmid určený pro expresi v savčích buňkách, nese T7 promotor a promotor SV40. Plazmid také kóduje protein EGFP a rezistenci na Zeocin. Viz Obr. 5.44.
- **pBluescript SK- (Stratagene)**
 - plazmid určený pro bakteriální expresi, nese T3 a T7 promotor a ampicilinovou rezistenci. Viz Obr. 5.44
- **pFLAG-CMV5a (Sigma-Aldrich)**
 - jedná se o tzv. kyvadlový vektor (pro expresi bakteriální i savčí), nese rezistenci na ampicilin. Obsahuje CMV promotor. Viz Obr. 5.31.
- **pENTR/D-TOPO (Invitrogen)**
 - součást systému pENTR Directional TOPO Cloning Kits. Plazmid nese ampicilinovou rezistenci. Viz Obr. 5.46.

➤ VIRY

- **Rekombinantní bakulovirus VP1 polyomaviru karcinomu Merkelových buněk**
 - virus byl vytvořený ve spolupracující laboratoři ÚHKT (Ústav hematologie a krevní transfuze). VP1 sekvence byla získána z plazmidu pwM a vložena do pCR® -Blunt II-TOPO® (Invitrogen). VP1 gen byl poté přenesen do pFactBacTMDual plazmid za

vzniku pBac-VP1-MCPyV. Rekombinantní bakulovirus byl připraven pomocí Bac-to-Bac Baculovirus Expression System (Invitrogen), donórový plazmid pBac-VP1-MCPyV byl transfekován do bacmidu obsaženého v *E.coli* kmenu (DH10Bac™). Rekombinantní bacmidy byly selektovány a užity na infekci SF9 buněk.

4.2 METODY

4.2.1 PASÁŽOVÁNÍ HMYZÍCH BUNĚK

Pěstované buňky byly seškrabány z misek a resuspendovány v médiu pro hmyzí buňky s FBS, glutaminem a antibiotiky (viz.4.1.1). Suspenze byla doplněna médiem dle konfluency buněk na miskách a rozdělena (pasážována) na nové misky a inkubována v prostředí o 27 °C.

4.2.2 PASÁŽOVÁNÍ SAVČÍCH (MYŠÍCH) FIBROBLASTŮ LÍNIE 3T3 A 3T6

Z misek s narostlými buňkami bylo odsáto médium, buňky byly opláchnuty roztokem Versenu a následně vystaveny roztoku trypsinu na dobu cca 2 minut v prostředí o teplotě 37 °C a CO₂. Trypsin byl inaktivován přidáním média pro savčí buňky (DMEM) obsahujícího FBS, glutamin a antibiotika. Směs buněk a média byla resuspendována, pasážována na misky a inkubována při 37 °C s 5% CO₂.

4.2.3 PASÁŽOVÁNÍ LIDSKÝCH PLICNÍCH EPITELIÁLNÍCH BUNĚK (HEL 299)

HEL 299 buňky byly pasážovány stejným způsobem a ve stejném médiu jako savčí fibroblasty (viz 4.2.2.). Buňky byly dvakrát po sobě opláchnuty Versenem, aby se snáze uvolnily od povrchu misky. Buňky bylo lépe pěstovat na menších površích (Ø 6cm misky).

4.2.4 NEUTRALIZAČNÍ TEST METODOU HEMAGLUTINACE

Neutralizační test (této DP) byl využit pro určení, zda testovaná protilátka má schopnost neutralizovat VP1 VLPs („viruse-like particules“). Jelikož VP1 protein polyomavirů vykazuje schopnost vázat sialové kyseliny receptorů na membránách buněk, což se projevuje zesíťováním erytrocytů (vzniká difúzní homogenát), test byl proveden metodou hemaglutinace.

Pokud inkubujeme VP1 VLPs s neutralizační protilátkou, tato protilátka obsadí sialové receptory na VP1 proteinu a brání tak VLPs ve vazbě na buněčné membrány a tedy vstupu do buněk. Vlivem neutralizace tedy nezvznikne difúzní homogenát, který by vznikl interakcí VP1 protein-erytrocyt, ale vznikne ostře ohraničený bod sražených erytrocytů na dně testovací jamky. Hemaglutinace byla provedena na morčecích erytrocytech. Morčecí krev byla centrifugována 20 min při 2600 rpm a 4⁰C a 3x promyta roztokem 0,2% BSA v PBS. Koncentrace erytrocytů byla určena odečtením hematokrytu – erytrocyty byly promíchány a cca 30 µl bylo odebráno do heparinizované kapiláry, kapilára byla zatavena na jednom konci a centrifugována 5 min při 2500 rpm v rotoru pro hematokryt (MPW 300). Hodnota hematokritu pak byla odečtena z kapiláry a určena jako procento z poměru výšky PBS vůči výšce erytrocytů. Na základě výsledku pak byly erytrocyty naředěny roztokem 0,2% BSA v PBS na pracovní koncentraci 0,4%. Po přípravě erytrocytů bylo do všech jamek mikrotitrační testovací destičky s kulatým dnem nanášeno po 50 µl 0,2% BSA v PBS. Do prvního sloupce destičky bylo přidáno 50 µl VP1 VLPs naředěných v protilátce proti VP1 MCPyV (5 µl izolovaných částic a 45 µl protilátky). Směs VLPs a protilátky byla před aplikací do jamek inkubována cca 1,5 hod. za laboratorní teploty. Obsah jamek prvního sloupce testovací destičky byl multikanálovou pipetou promíchán a z každé jamky bylo přeneseno 50 µl do vedlejší jamky v řadě a resuspendováno. Odtud bylo opět odebráno 50 µl a přeneseno stejným způsobem do sousední jamky, takto bylo postupováno až k poslední jamce každé řady (vytvoření ředící řady). Nakonec bylo do všech jamek přidáno po 50 µl 0,4% suspenze morčecích erytrocytů. Mikrotitrační testovací destička byla uložena do 4⁰C a hemaglutinace byla odečtena po přibližně 6 hodinách. Jako kontrola k neutralizaci protilátky byla vytvořena jedna řada jamek obsahující pouze VP1 VLPs bez přítomnosti protilátky.

4.2.5 PSEUDOINFEKCE SAVČÍCH BUNĚK VP1 „VIRUS LIKE PARTICULES“ MCPyV

➤ PŘÍPRAVA SAVČÍCH BUNĚK NA PSEUDOINFEKCI VP1 „VIRUS LIKE PARTICULES“ MCPyV

Buňky pro pseudoinfekci je vhodné nechat narůst do přibližně 80% konfluence, tedy tak aby se nacházely v růstové fázi. Buňky v této fázi růstu byly opláchnuty Versenem, inkubovány s trypsinem a resuspendovány v médiu pro savčí buňky (4.1.1). Po spočítání buněk v suspenzi bylo na každé sklíčko 24-jamkové desky vyseto $6 \cdot 10^6$ buněk. Poté bylo k buňkám na každém sklíčku přidáno médium do konečného objemu 1 ml. Deska s buňkami byla přenesena do termostatu o 37 °C a 5% CO₂.

Myší fibroblasty linie 3T6 byly vysety na desky přibližně 12 hodin nebo méně před samotnou pseudoinfekcí, HEL-299 buňky byly ideálně vysety asi 21 hodin před pseudoinfekcí (tyto buňky hůře přisedají na povrch sklíčka).

➤ PROCES PSEUDOINFEKCE

Buňkám pěstovaným na sklíčkách bylo odebráno médium. Sklíčka byla pokryta chlazeným BSM (bezsérovým médiem pro savčí buňky, 4.1.1) a ponechána na ledu po dobu 5 minut. Poté bylo médium odstraněno a na sklíčka byla aplikována dávka 200 µl VLPs („virus-like particules“) ředěných v BSM pro savčí buňky, tak aby na každou buňku sklíčka připadla požadovaná multiplicita „infekce“ (v tomto případě koncentrace $5 \cdot 10^4$ VLPs). Pro experimenty byly užity izolované částice z frakcí III různých izolací. Sklíčka s VLPs byla 30 minut inkubována na ledu na kývačce. Po ukončení inkubace na ledu byla sklíčka uložena do termostatu (37 °C, 5% CO₂) a od této doby byla sklíčka v různých časech odebírána z termostatu a fixována 3% paraformaldehydem: Časy sběru sklíček po inkubaci byly zvoleny pro kolokalizace s EEA1 20, 60 minut a 3 hodiny, s aktinem 30 minut, s caveolinem1 20 minut a 3 hodiny, s LAMP2 90 minut a 3 hodiny a s BiP 3 hodiny. Fixované buňky byly značeny metodou nepřímé imunofluorescence dle protokolu (4.2.9.). Analýza kolokalizací VLPs s různými buněčnými strukturami byla provedena na konfokálním mikroskopu TCS SP2 Laser Scanning Confocal Microscope (Leica).

4.2.6 TRANSFEKCE BUNĚČNÉ LÍNIE 3T6 A 3T3 PLAZMIDOVOU DNA SYSTÉMEM AMAXA

Den před transfekcí byly 3T3 či 3T6 buňky pasážovány (plná konfluence) v poměru 1:5 (Ø 10 cm misky), tak, aby se v den transfekce konfluence pasážovaných buněk pohybovala v rozmezí cca 50 - 80 %, kdy jsou buňky v optimální růstové fázi.

V den transfekce byla každá miska opláchnuta roztokem Versenu, trypsinizována a resuspendována přibližně ve 3 ml média se sérem pro savčí buňky (DMEM). Suspenze uvolněných buněk byly z každé miskapřeneseny do sterilní zkumavky a buňky spočítány v počítací komůrce. Potřebné množství buněk na jednu transfekci ($4 \cdot 10^6$) bylo přeneseno do nové zkumavky a centrifugováno po dobu 10 minut při 90 g. Od buněčného peletu bylo kompletně odebráno medium a přidáno 6 µg plazmidové DNA a 100 µl transfekčního roztoku (Nucleofector Solution – Amaxa Kit) při pokojové teplotě. Směs byla resuspendována, přenesena do elektroporační kyvety a elektroporována elektroporátorem Nucleofector II (Amaxa Biosystems) dle programu Amaxa - pro NIH 3T3 platí program U-030 a pro 3T6 platí program T-030. Po provedení pulzu bylo do kyvety ihned přidáno 500 µl RPMI media. Suspenze pak byla přenesena do zkumavky a inkubována v termostatu při 37 °C po dobu 15 minut. Po inkubaci byly buňky vysety na misky či sklíčka zalitá předem předehřátým médiem. Po cca 4 hodinách byla provedena výměna media.

4.2.7 URČENÍ TITRU INOKULA REKOMBINANTNÍHO BAKULOVIRU VP1 MCPyV PLAKOVOU ZKOUŠKOU

U virového inokula, které bylo poskytnuto spolupracující laboratoří UHKT byl určen titr viru a to pomocí plakové zkoušky.

➤ PLAKOVÁ ZKOUŠKA A IZOLACE REKOMBINANTNÍCH PLAKŮ

Konfluentně narostlé misky SF9 buňkami byly seškrabány a buňky byly spočítány v počítací komůrce. Na každou novou misku bylo aplikováno množství buněčné suspenze odpovídající $2 \cdot 10^6$ buněk. Misky s vysetými buňkami byly inkubovány 30 – 60 min. při 27 °C pro přichycení buněk k povrchu misky. Výchozí virové inokulum bylo naředěno v BSM (bezsérovém médiu) pro hmyzí buňky na hodnoty 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} . Po přisednutí

buněk bylo z misek odsáto médium a následně aplikována po 0,5 ml různá ředění inokula, na negativní kontrolu bylo aplikováno bezsérové médium. Misky byly ponechány k infekci nejprve 1 hod. na kývačce při laboratorní teplotě. Před koncem inkubace byla do nahřáté lázně (42 °C) přenesena předem roztavená 4,5% Sea Plaque agaróza, která byla použita pro přípravu agarózového média o konečném složení: 1,5% Sea Plaque agaróza, 10% sérum, bezsérové médium pro hmyzí buňky s antibiotiky. Po hodinové inkubaci bylo z buněk odsáno inokulum a na jednotlivé misky bylo aplikováno po 4 ml agarózového média. Misky byly ponechány v pracovním boxu po dobu cca 20 minut pro zatuhnutí zalévací směsi. Misky byly otočeny dnem vzhůru a dále inkubovány v prostředí o 27 °C. Za cca 9 dní byly pozorovatelné vytvořené plaky na miskách. Ideální plaky (velké a dobře izolovatelné z misky) pak byly po lupou (30x zvětšení) označeny zakroužkováním, poté v boxu vypíchnuty sterilní špičkou pipety a resuspendovány v 0,5 ml BSM pro hmyzí buňky (4.1.1). Tyto resuspendované plaky určitých ředění pak byly užity na infekci nových SF9 buněk, aby se rekombinantní bakulovirus pomnožil. Buňky byly infikovány po dobu 6 dní, po této době byl supernatant (inokulum) z misek odebrán. Pomocí světelného mikroskopu a SDS PAAGE elektroforézy (množství proteinu VP1 na gelu) bylo vybráno inokulum (plak), které vykazovalo nejlepší schopnost infekce. Toto inokulum pak bylo užito pro další reinfekci SF9 buněk, tak bylo získáno silné inokulum pro přípravu a izolaci VP1 VLPs. Z tohoto inokula a dalších záložních vybraných byly vytvořeny také konzervy s 5% glycerolem. Z počtu plaků byl vypočítán titr virového inokula.

4.2.8 INFEKCE HMYZÍCH BUNĚK LÍNIE SF9 REKOMBINANTNÍM BAKULOVIREM VP1 MCPyV

Hmyzí buňky SF9 byly zpasážovány na cca 70% konfluenci na každou misku (Ø 10 cm). Po přichycení k misce (1 hod. po pasáži) byly buňky nejprve opláchnuty BSM pro hmyzí buňky, poté na ně bylo aplikováno inokulum o dané multiplicitě (v našem případě 2,5 ml inokula s multiplicitou infekce 0,5 – dále viz 5.1.1). Buňky s inokulem byly ponechány na kývačce po dobu 1 hodiny za laboratorní teploty, po uplynutí této doby bylo do každé misky přidáno medium se sérem a misky byly uloženy do termostatu o teplotě 27 °C na dobu 72 hodin (dokončený replikační cyklus bakuloviru). Po 72 hodinách a mikroskopické kontrole úrovně infekce buněk bylo z misek nejprve odsáto a stočeno medium, které bylo uloženo jako virové

inokulum. Buňky na miskách byly opláchnuty PBS, seškrabány a přeneseny do zkumavek k peletům od stočeného inokula a centrifugovány při 1000 g po dobu 10 minut. Proces izolace VLPs je možno pozastavit zamražením získaných peletů v -20 °C. Pelety byly resuspendovány v PBS a sonikovány na ledu při 10 W po dobu 3x 45 sec. Po mikroskopické kontrole destrukce většiny buněk ze vzorku sonikovaného peletu byla suspenze centrifugována 10 minut při 4150 g. Vzniklý supernatan byl přenesen do ultracentrifugačních zkumavek pro přečištění přes sacharozový polštář (dále viz kapitola 4.2.10).

4.2.9 ZNAČENÍ BUNĚK METODOU NEPŘÍMÉ IMUNOFLUORESCENCE

Buňky (narostlé na sklíčcích) určené pro nepřímé imunofluorescenční barvení byly nejprve fixovány po dobu 30 minut 3% paraformaldehydem (v PBS), dále permeabilizovány 5 minut 0,5% Tritonem X-100 a poté 3x10 minut promývány v PBS. Po vysycení nespecifických vazebných míst v 0,25% želatině s 0,25% BSA v PBS (30 min.) byla na sklíčka aplikována primární protilátka na dobu 1 hodiny. Poté následovalo promývání (3x 10 min.) v PBS a inkubace se sekundární protilátkou konjugovanou s fluorescenční barvou po dobu 30 minut. Po promytí v PBS (3x 10 min.) byla sklíčka s buňkami opláchnuta demineralizovanou vodou a po uschnutí byla montována do kapky glycerolu s DAPI. Buňky byly pozorovány pomocí fluorescenčního mikroskopu BX-60 (Olympus) nebo konfokálního mikroskopu TCS SP2 Laser Scanning Confocal Microscope (Leica).

4.2.10 IZOLACE VP1 VLPS (PŘÍPRAVA ANTIGENU NA IMUNIZACI MYŠI)

První krokem v izolaci VP1 VLPs je infekce hmyzích buněk SF9 rekombinantním VP1 MCPyV bakulovirem a následná destrukce infikovaných buněk pro uvolnění naprodukovaných VLPs. - tato část je popsána v kapitole 4.2.8.

4.2.10.1 ULTRACENTRIFUGACE PŘES SACHARÓZOVÝ POLŠTÁŘ

Supernatant získaný z centrifugace sonikovaných infikovaných hmyzích buněk byl přenesen do ultracentrifugačních zkumavek (viz kapitola 4.2.8.). Konus těchto zkumavek byl vyplněn roztokem 10% sacharózy v pufru B (tzv. podvrstvení supernatantu sacharózou). Supernatanty byly doplněny a vyváženy proti sobě pufrům B a centrifugovány po dobu 3 hodin při 35 000 rpm a 4 °C (ultracentrifuga Optima TM L-90K, rotor SW41, Beckman). Získané sedimenty byly převrstveny vychlazeným pufrům B, resuspendovány a na ledu homogenizovány v Potterově homogenizátoru nebo ručním sonikátorem. Homogenizovaný materiál byl rozdělen do ultracentrifugačních zkumavek pro následující krok izolace.

4.2.10.2 ULTRACENTRIFUGACE V ROVNOVÁŽNÉM GRADIENTU CHLORIDU CESNÉHO

Ultracentrifugační zkumavky s homogenátem (sediment po přečištění přes sacharózový polštář) byly doplněny pufrům B na hmotnost 7,9g a bylo přidáno 3,79g CsCl - odpovídá poměru 2,5 : 1,5 (supernatant : CsCl). U této směsi byl změřen refraktometrický index a upraven do hodnot v rozsahu 1,363-1,364. Směs s ideální hodnotou refraktometrického indexu pak byla doplněna po okraj zkumavky a vyvážena parafinovým olejem (Buyol) a stočena po dobu minimálně 21 hodin při 35 000 rpm a 18 °C. Gradient, jenž vznikl centrifugací, byl rozdělen na frakce (po přibližně 500μl) peristaltickou pumpou. Každé frakci byl naměřen refraktometrický index (refraktometr ABBE – Carl Zeiss Jena). Každá frakce byla nakapána na nitrocelulóзовou membránu pro zjištění přítomnosti proteinu a jeho orientačnímu množství Dot blotem (síla signálu vzhledem k ostatním frakcím). Na základě hodnot refraktometrických indexů jednotlivých frakcí v kombinaci s výsledkem Dot blotu byly jednotlivé frakce pospojovány do třech konečných frakcí: frakce I, frakce II a frakce III. Zatímco frakce II sdružuje gradientové frakce o refraktometrických indexech 1,366 – 1,363 a běžně obsahuje „plné“partikule (vyplněny hostitelskou DNA), tak III. frakce (o refraktometrických indexech 1,362 – 1,361) obsahuje zejména „prázdné“ partikule, frakce I. je složená ze zbytkových frakcí o jiných refraktometrických indexech.

4.2.10.3 PŘEČIŠTĚNÍ GRADIENTOVÝCH FRAKČÍ DVOUSTUPŇOVOU DIALÝZOU

Pro odstranění CsCl z frakcí I, II a III bylo užito dialyzační metody. Každá frakce byla přenesena do dialyzačního střeva (SERVA - polopropustná membrána o Ø 21mm a pórech o Ø 2,5mm, povařeno 10 minut). Střevo byla přenesena do velkého objemu (2 litry) nesterilního pufru B. CsCl přechází díky koncentračním spádu z frakcí přes membrány do nesterilního pufru B (do místa o nízké koncentraci solí). Proces je dvoustupňový, střevo byla po přibližně 2 hodinách přenesena do nového pufru B (2 litry), ve kterém byla ponechána přes noc. Dialýza probíhala za stálého míchání a při 4 °C. Frakce po dialýze byly znovu centrifugovány přes sacharózový polštář (viz 4.2.8), tentokrát byl ale vzniklý sediment každé frakce „rozplaven“ v malém množství pufru B (přes noc při 4 °C) a poté resuspendován. U jednotlivých frakcí byla zjištěna přítomnost VP1 VLPs a koncentrace proteinu (kapitola 4.2.10.4.).

4.2.10.4 OVĚŘENÍ PŘÍTOMNOSTI PROTEINU VP1 POLYOMAVIRU KARCINOMU MERKELOVÝCH BUNĚK

Testování frakcí na přítomnost proteinu zahrnovalo: metodu SDS/PAAGE elektroforézy (kapitola 4.2.14), elektronové mikroskopie a metodu podle Bradfordové (4.2.10.4.), která stanovuje koncentraci proteinu ve vzorku. Metoda Western blotu nemohla být užita pro nedostupnost protilátky namířené proti sekvenčnímu epitopu VP1 MCPyV.

4.2.10.4.1 STANOVENÍ KONCENTRACE PROTEINU METODOU BRADFORDOVÉ

Pro stanovení koncentrace proteinu v roztoku (koncentrace izolovaného VP1 proteinu v dialyzovaných frakcích) byla užita metoda dle Bradfordové. Nejprve byla vytvořena ředící řada BSA (bovinní sérový albumin) v pufru B, byly tak vytvořeny standardy o koncentracích 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 a 1 mg/ml BSA v pufru B. Pro tyto standardy byly naměřeny absorbance, které společně s hodnotami známých koncentrací standardů byly použity pro vytvoření kalibrační křivky. Do rovnice odvozené z křivky byla dosazena hodnota absorbance našeho vzorku frakce I, II a III a koncentrace proteinu ve frakcích pak byla dopočítána. Měření

absorbancí probíhalo na spektrofotometru, kdy ke standardu nebo vzorku bylo přidáno tzv. Bradfordové reagens.

4.2.11 IMUNIZACE MYŠI

Myši Balb/c byly imunizovány izolovaným a ověřeným antigenem VP1 VLPs MCPyV (kapitola 4.2.10). Imunizace byla tří kroková, každá dávka (50 μ g antigenu ve 100 μ l PBS) byla injikována do peritoneální dutiny imunizované myši. Druhá dávka antigenu byla aplikována 14. den od aplikace dávky první. 10 dnů po podání druhé dávky byla provedena metoda Dot blotu pro detekci tvorby protilátek v séru imunizované myši. V případě imunizace denaturovaným antigenem (dále viz 5.1.8) byl k odpovídajícímu množství VP1 VLPs přidán Laemliho pufr, směs byla ponechána ve 100 °C po dobu 10 minut. Imunizace byly provedeny RNDr. Alenou Morávkovou, PhD.

4.2.12 BUNĚČNÁ FÚZE

Proces buněčné fúze je založen na splynutí buněk, které produkují protilátky proti danému antigenu (splenocyty – B-lymfocyty imunizovaného zvířete) s buňkami, které propůjčí fúzované buňce „nesmrtelnost“ a rychlou dělivost (myelomová buňka). Výsledná hybridní buňka si pak ponechává vlastnosti obou typů buněk, ze kterých pochází, má tedy ideální vlastnosti pro produkci monoklonálních protilátek. Hybridní buňky jsou selektovány HAT médiem (hypoxantin, aminopterin a thymidin), které je založeno na blokování *de novo* syntézy nukleotidů aminopterinem. Díky hypoxantinu a thymidinu může buňka provést syntézu nukleotidů vedlejší drahou, disponuje-li ale hypoxantin fosforibosyl transferázou (HPRT) i thymidin kinázou. Myelomová buňka HPRT nemá a proto v médiu nepřežije, B-buňka sice má HPRT, ale má krátkou životnost a proto v médiu také nepřežije. Pouze hybridní buňka má oba tyto enzymy (HPRT získá od B-lymfocyty) a v médiu přežije.

4.2.12.1 PŘÍPRAVA MYELOMOVÝCH BUNĚK PRO BUNĚČNOU FÚZI

Přibližně 10 dnů před plánovanou buněčnou fúzí byla přenesena konzerva myelomových buněk (linie Sp2/0) z tekutého dusíku do 37 °C lázně pro rozmrazení. Buňky byly vysety na misku s předehřátým médiem pro myelomové buňky (viz 4.1.1). Druhý den bylo buňkám vyměněno médium za čerstvé. Buňky před fúzí podstoupily celkem dvě pasáže. Druhá pasáž byla provedena 2 dny před plánovanou fúzí, aby se myelomy v den fúze nacházely v růstové fázi. V den fúze byly myelomové buňky o přibližně 80% konfluenci centrifugovány při 1000 rpm 10 minut v 50 ml média. Další práce s buňkami je popsána v kapitole 4.2.12.3.

4.2.12.2 PŘÍPRAVA MYŠÍCH SPLENOCYTŮ PRO BUNĚČNOU FÚZI

Slezina imunizované myši (zdroj aktivovaných B-lymfocytů) byla v den buněčné fúze operativně vyjmuta, homogenizována v čistém médiu RPMI. „Slezinná“ suspenze (bez kusů tkáně) byla centrifugována při 1000 rpm 10 minut v 50 ml média. Další práce s buňkami je popsána v kapitole 4.2.12.3.

4.2.12.3 PŘÍPRAVA MYŠÍCH SPLENOCYTŮ A MYELOMOVÝCH BUNĚK PŘED BUNĚČNOU FÚZÍ

Pelety obou typů buněk (myelomů i splenocytů) byly poklepem resuspendovány ve 25 ml média pro myelomy a v jednotlivých suspenzích bylo stanoveno množství buněk. Stále ještě jednotlivé suspenze byly znovu centrifugovány a opět doplněny na do stejného objemu média jako před počítáním buněk (25 ml). Buňky byly smíchány v poměru 5:1 (slezinné vs myelomové buňky) a společně centrifugovány při 1000 rpm 10 minut. Takto promytý pelet směsi buněk byl připravený pro buněčnou fúzi.

4.2.12.4 PŘÍPRAVA PODPŮRNÝCH BUNĚK

Den před buněčnou fúzí byla do 96-jamkových desek rozplněna suspenze podpurných buněk v HAT médiu. Podpurné buňky byly získány výplachem myši peritoneální dutiny. Smysl užití

podpůrných buněk pro fúzované buňky je v jejich schopnosti vytvořit jakýsi dočasný (mají cca 10 dní života) „vyživující podklad“ optimalizující prostředí pro úspěšně zfúzované buňky.

4.2.12.5 PROCES BUNĚČNÉ FÚZE A VYSETÍ HYBRIDOMŮ DO MÉDIA

K dostatečně resuspendovanému (pouze poklepem) peletu směsi buněk určených pro fúzi byl nejprve během první minuty přikapán 1 ml 50% sterilního roztoku PEG 3350 Da. V druhé minutě byl přikapán 1 ml média pro myelomy a během třetí minuty bylo přikapáno 8 ml stejného média. Směs byla centrifugována při 1000 rpm 10 min., zbavena supernatantu a doplněna do 50 ml HAT mediem a resuspendována. Suspenze pak byla rozplněna po 100 µl/jamka do 96-jamkových desek s předem připravenými podpůrnými buňkami. Desky byly uloženy do termostatu při 37 °C a 5% CO₂.

4.2.13 PRÁCE S HYBRIDOMOVÝMI BUŇKAMI

4.2.13.1 OŠETŘENÍ A KONTROLA HYBRIDOMŮ PO FÚZI

Třetí den po provedení buněčné fúze bylo přidáno k buňkám HAT medium obohacené o geneticin (cílová koncentrace 200 µg/ml), jako prevence před infekcí mykoplazmou. Geneticin je neškodný pro myelomy a pro hybridomy. Po třech dnech bylo toto medium vyměněno za čestvé HAT medium bez obsahu geneticinu. Výměna média byla provedena ještě druhý den po první výměně.

4.2.13.2 TESTOVÁNÍ HYBRIDOMOVÝCH BUNĚK

Média jamek s dostatečně narostlými hybridomy (kontrola světelným mikroskopem) byla otestována na přítomnost protilátky proti VP1 MCPyV. Nejprve byla užitá metoda Dot blotu (kapitola 4.2.16), poté metoda průtokové cytometrie (kapitola 4.2.13.2.1). Metoda Western blot (kapitola 4.2.15) byla provedena až v poslední fázi testování protilátky, při charakterizaci vybraných stabilních klonů hybridomů.

4.2.13.2.1 PŘÍPRAVA HMYZÍCH BUNĚK NA TESTOVÁNÍ PRŮTOKOVOU CYTOMETRIÍ

➤ PŘÍPRAVA INFIKOVANÝCH BUNĚK

Hmyzí buňky linie SF9 byly infikovány rekombinantním bakulovirem nesoucím sekvenci VP1 MCPyV (infikovaných buňkách je produkován VP1 protein – antigen, proti kterému je testováno medium hybridomů). Tato část přípravy je uvedena v kapitole 4.2.8. Po 72 hodinách infekce byly tyto buňky seškrabány z misek a centrifugovány při 150 g po dobu 5-10 minut. Pelet byl resuspendován v PBS a opět centrifugován. Nově získaný pelet byl resuspendován v 300 μl PBS a za jemného protřepávání suspenze (zabránění shlukování buněk) bylo přikapáno 800 μl 96% ledově chlazeného etanolu (konečná koncentrace je 70% etanol). Buňky v této fázi byly buď přímo zpracovány pro testování průtokovou cytometrií, tzn. s etanolem inkubovány 30 minut na ledu a dále upraveny dle protokolu uvedeného níže, nebo byly uloženy do -20 °C (takové to podobě je lze skladovat i několik dnů).

➤ FLUORESCENČNÍ ZNAČENÍ INFIKOVANÝCH BUNĚK

Z infikovaných fixovaných buněk byl centrifugací (150 g, 7 minut) odstraněn etanol, pelet byl promyt v PBS a opět centrifugován. Pelet buněk byl dále resuspendován v roztoku 0,2% želatiny obsahující 5 % FBS. Resuspendované buňky byly nejprve spočítány v počítací komůrce a pak rozděleny do 96-jamkových desek s kulatým dnem (na jednu jamku bylo aplikováno cca 20 tisíc buněk – minimum je 5 tisíc buněk). Rozplněné buňky byly v želatině vysyceny při 4 °C na 30 minut. Po vysycení byly desky s buňkami centrifugovány 6 minut při 150 g a 4 °C a byly zbaveny supernatantu. Na buňky bylo aplikováno na dobu 30 minut při 4 °C 150 μl primární protilátky, tedy média odebraného testovaným hybridomům. Na buňky určené pro pozitivní kontrolu (dále PK) byla aplikovány myší polyklonální protilátky proti VP1 MCPyV (ÚHKT). Na buňky určené pro negativní kontrolu (dále NK) bylo aplikováno místo primární protilátky pouze čisté HAT medium. Po inkubaci byly buňky centrifugovány pro odstranění protilátky a dvakrát promyty v PBS. Na dobu 30 minut při 4 °C bylo k buňkám (vzorky, NK i PK) přidáno 100 μl sekundární fluorescenční protilátky – v našem případě oslí sekundární protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s Alexa Fluor 488. Po odstranění protilátky centrifugací, byly buňky dvakrát promyty v PBS a

nakonec resuspendovány ve 100 µl PBS. V této fázi byly buňky připraveny na testování průtokovou cytometrií.

➤ **TESTOVÁNÍ HYBRIDOMOVÝCH MÉDIÍ PRŮTOKOVÝM CYTOMETREM**

Hybridomová média byla testována průtokovým cytometrem LSR II (BD Biosciences). Základem pro testování byla příprava hmyzích buněk linie SF9 infikovaných VP1 MCPyV rekombinantním bakulovirem. Na buňky s naprodukováným VP1 proteinem MCPyV a upravené pro testování, pak byla aplikována jednotlivá hybridomová média v roli primární protilátky proti VP1 MCPyV. Po označení sekundární protilátkou bylo možno na cytometru analyzovat pozitivitu jednotlivých hybridomových médií, dle signálu tvořeného vazbou protilátek na VP1 protein obsažený v jednotlivých buňkách. Celý postup přípravy testování hybridomových médií metodou průtokové cytometrie je popsán v kapitole 4.2.5.2.1.1.

4.2.13.2.2 TESTOVÁNÍ HYBRIDOMOVÝCH MÉDIÍ NA PŘÍTOMNOST PROTÍLÁTKY TESTEM DOT BLOTU

Postup testování Dot blotem byl proveden dle protokolu uvedeného v kapitole 4.2.16. Antigen VP1 VLPs byl nanesen na membránu a testované hybridomové médium bylo užito v procesu Dot blotu jako primární protilátka. Sekundární protilátkou pak byla kozí protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s HRP (horse radish peroxidase).

4.2.13.3 KLONOVÁNÍ HYBRIDOMŮ („ROZKLONOVÁNÍ“)

Každá jamka, která vykazovala pozitivní signál na průtokové cytometrii případně Dot blotu byla dále rozklonována na jednu celou 96-jamkovou desku s předpěstovanými podpůrnými buňkami. Na rozklonování byly užity ty jamky, ve kterých byly průběžně detekovány monokolonie. Buňky byly „rozklonovány“ do desek tak, aby nejlépe na každou jamku desky připadla jedna buňka resuspendované monokolonie.

4.2.13.4 ZAMRAŽOVÁNÍ HYBRIDOMŮ

Hybridomy jednotlivých jamek byly zamražovány buď do 200 μ l nebo 500 μ l zamrazovacího média. Buňky byly v jamce resuspendovány a centrifugovány 8 minut při 1000 rpm. Supernatant byl odstraněn a uložen jako primární protilátka, pelet byl resuspendován v zamrazovacím médiu (viz 4.1.1). Konzervy byly uloženy na cca 12 hodin do -80 °C, poté byly uloženy do tekutého dusíku.

4.2.14 SDS PAAGE ELEKTROFORÉZA

Prvním krokem v provedení tohoto typu proteinové elektroforézy byla příprava zaostřujícího a separačního gelu. Po složení aparatury, kontrole její těsnosti (nepropustnosti pro vodu) byl do aparatury nalit tzv. 10% spodní (separační) gel do úrovně cca 1 cm pod zuby hřebenu. Gel byl převrstven demi H_2O a za laboratorní teploty ponechán k polymeraci na cca 20 minut. Složení separačního gelu (12 ml) bylo následující 4 ml 30% akrylamidu, 4,5 ml 1M tris-HCl pH 8,8, 120 μ l 10% SDS, 3,25 ml ddH $_2O$, 40 μ l 10% amónium persulfát, 17 μ l TEMED. Po zatuhnutí byl gel doplněn tzv. vrchním (zaostřovacím) gelem, do kterého byl zasazen hřeben. Gel byl ponechán k polymeraci na cca 20 minut. Vrchní gel (3 ml) byl složen z 0,5 ml 30% akrylamid, 0,375 ml 1M tris-HCl pH 6,8, 30 μ l 10% SDS, 2,11 ml ddH $_2O$, 20 μ l 10% amónium persulfát, 5 μ l TEMED. Po zatuhnutí vrchního gelu byl z aparatury odstraněn hřeben a skla s gely byla přenesena do speciální vany, kde byla zalita tzv. SDS PAAGE pufrem (kapitola 4.1.1).

Během polymerace gelů byly připraveny vzorky pro elektroforézu včetně markerumolekulových vah. Vzorky byly smíchány s 1x koncentrovaným Laemliho pufrem (obsahujícím bromfenolovou modř) a ponechány 5 minut ve 100 °C. Jako marker byl užit buď Spectra TM Multicolor Broad Range Protein Ladder:10-260 kDa (Fermentas) nebo Prestrained Molecular Weight Marker: 26-180 kDa (Sigma-Aldrich), který byl i 2 minuty inkubován při 100 °C). Takto upravené vzorky a marker byly naneseny do propláchnutých jamek gelu. Elektroforéza byla spuštěna nejprve při napětí o hodnotě 80V. Jakmile vzorky dosáhly úrovně přechodu dvou gelů, bylo napětí zvýšeno na 140V. Když čelo separovaných vzorků dosáhlo konce spodního gelu, byla elektroforéza ukončena. Gely byly vyjmuty ze

skel, a buď fixovány a obarveny pro vizualizaci separace nebo užity pro metodu Western blotu (převod separovaných proteinů z gelu na nitrocelulózovou membránu).

4.2.14.1 BARVENÍ A FIXACE GELŮ PO ELEKTROFORÉZE

Gely byly po ukončení elektroforézy přeneseny na 1 hodinu do fixačního roztoku (50% metanol a 5% HClO₄). Poté byly přes noc ponechány v barvicím roztoku (0,5% Coomassie Brilliant Blue G 250 a 3,5% HClO₄). Obarvené gely byly pak proplachovány v destilované vodě do odmytí přebytečné barvy.

4.2.15 WESTERN BLOT

V případě potřeby specificky detekovat proteinu zájmu v separované směsi vzorku na SDS PAAGE gelu byly proteiny z gelu převedeny na nitrocelulózovou membránu NC45 a následně detekovány specifickou protilátkou. Po ukončení elektroforézy byl gel opláchnut destilovanou vodou a inkubován 10 minut v blotovacím pufru. Poté byl vytvořen tzv. sendvič, do něhož byl vložen gel i nitrocelulózová membrána. Složení sendviče záviselo na typu blotování („mokrý“ či „polosuchý“ blotování).

V případě „polosuchého“ blotování (detekce VP1 proteinu) byla na desku blotovacího přístroje položena blána s otvorem, na který byly postupně vrstvené v blotovacím pufru namočené následující komponenty sendviče: papír Watman, filtrační papíry, nitrocelulózová membrána, gel, filtrační papíry a papír Whatman. Sendvič byl přiklopen víkem aparatury. Blotování probíhalo 75 minut, v případě jednoho gelu při 54mA, u blotování dvou gelů při 108 mA.

Pro „mokrý“ blotování (detekce minoritních proteinů) byl sendvič vyskládán mezi dvě speciální mřížky. Na černou mřížku byly vrstveny v blotovacím pufru namočené části sendviče: černá houbička, filtrační papír, papír Whatman, gel, nitrocelulózová membrána, papír Whatman, filtrační papíry, bílá houbička a bílá mřížka. Blotování v tomto případě probíhalo ve speciální aparatuře 3 hodiny při 250mA, 100V a 50W.

Po ukončení blotování byla membrána s proteiny zpracována metodou imunologické detekce proteinů na membráně (kapitola 4.2.17).

4.2.16 DOT BLOT

Testované vzorky byly nakapány po 1,5 μ l na nitrocelulózovou membránu NC45. Takto připravená membrána byla zpracována metodou imunodetekce proteinů na nitrocelulózové membráně (kapitola 4.2.17).

4.2.17 IMUNOLOGICKÁ DETEKCE PROTEINŮ NA MEBRÁNÁCH

Nitrocelulózová membrána s nakapanými vzorky (Dot blot) či přeblovanými proteiny byla nejprve minimálně 1 hodinu sycena v 5% netučném mléce ředěném v PBS, poté byla inkubována 1 hodinu se specifickou primární protilátkou a následně promyta 3x 10 minut v PBS. Dále byla membrána inkubována 30 minut v sekundární protilátce konjugované s křenovou peroxidázou a opět promyta 3x 10 minut v PBS.

V temné komoře byl na takto upravenou membránu aplikován po dobu cca 30 sekund „vyvolávací“ roztok Luminolu (složení viz kapitola 4.1.1). Membrána vložená do fólie byla přenesena do fotodesek, kde byla překryta filmem RTG. Doba, po kterou byl na membráně film ponechán, byla závislá na tom, z jaké metody membrána pocházela - ro Dot blot byla dostatečná doba většinou 1-2 minuty, u membrány Western blotu byly užity časy 6 a 25 minut.

4.2.18 PRÁCE S BAKTERIÁLNÍMI BUŇKAMI

4.2.18.1 KULTIVACE BAKTERIÁLNÍCH BUNĚK

Bakterie byly zaočkovány do 5 ml LB média s přidavkem příslušného antibiotika. Celá směs byla třepána při 37 °C přes noc (maximálně však 16 hodin).

4.2.18.2 SKLADOVÁNÍ BAKTERIÁLNÍCH BUNĚK (BAKTERIÁLNÍ „KONZERVY“)

Z ověřené bakteriální kolonie byla vytvořena konzerva pro uložení do -80 °C: bakterie určité kolonie byly resuspendovány a kultivovány přes noc v 5 ml LB média s antibiotiky. Po kultivaci byla část suspenze smíchána s 40% glycerolem v poměru 1:1 a zamražena.

4.2.18.3 ELEKTROPORACE BAKTERIÁLNÍCH BUNĚK

Kompetentní buňky (v našem případě TOP10) byly přeneseny na led k postupnému rozmražení. Poté byly buňky přidány ke 3 μ l ligační směsi DNA a daného insertu. Po cca 2 minutové inkubaci na ledu byla celá směs přenesena do elektroporační kyvety a byla elektroporována (Gene Pulser Apparatus – Bio-Rad). Hodnoty aplikovaného pulzu byly 25 μ F; 2,5kV a 200 Ω . Ihned po pulzu byl ke směsi přidán 1ml S.O.C média (kapitola 4.1.1) a vše bylo třepáno 1 hodinu při 37 °C. Bakterie byly poté vysety na misky s pevným médiem (živný agar, viz kapitola 4.1.1) obsahujícím příslušné antibiotikum a byly inkubovány přes noc při 37 °C.

4.2.19 PRÁCE S DNA

4.2.19.1 MAXIIZOLACE PLAZMIDOVÉ DNA KITEM „QUIAGEN ENDOFREE“

Bakteriální kolonie vypěstovaná na misce se selekčním médiem a antibiotiky nebo vzorek odebraný z bakteriální konzervy nesoucí cílený plazmid byl zaočkován do 5 ml LB média s odpovídajícím antibiotikem. Tato směs byla inkubována při 37 °C po dobu 8 hodin za kontinuálního třepání rostoucí kultury. Z narostlé bakteriální kultury bylo odebráno 100 μ l přeneseno do 100 ml LB média s přidáním antibiotikem, tato směs pak byla ponechána při 37 °C po dobu 16 hodin za neustálého třepání. Bakteriální kultura byla dále zpracována dle protokolu, který je součástí kitu.

4.2.19.2 MINIIZOLACE PLAZMIDOVÉ DNA KOMERČNÍMI KITY

Plazmidová DNA byla izolována komerčními kity různých typů dle plánovaného využití plazmidu. V případě použití plazmidu pro transfekci bylo užito „endofree“ systému, Plasmid Endofree Flexspin Kit (RenogenBiolab). Pokud byl plazmid využit například pro amplifikační metodu a tedy jako templát pro PCR, byl použit kit bez „endofree“ systému – Genelute HP Plasmid Miniprep Kit (Sigma).

4.2.19.3 ETANOLOVÉ SRÁŽENÍ DNA

Ke směsi DNA byla přidána 1/10 objemu CH₃COONa a 2,5 násobek množství DNA 96% etanolu. Směs byla resuspendována a uložena do -20 °C na minimálně 30 minut, ideálně přes noc. Poté byla směs centrifugována 35 minut při 20 000 g a 4 °C. K peletu vzniklému centrifugací byl přidán 1ml 70% etanolu a směs byla opět centrifugována při 20000 g a 18 °C. Po centrifugaci byl pelet po vyschnutí resuspendován v H₂O.

4.2.19.4 FENOL-CHLOROFORMOVÁ METODA PRO ČIŠTĚNÍ PLAZMIDŮ

Směs DNA s přidáním 1 objemem fenolu byla promíchána a centrifugována při 12 000 g po dobu 5 minut. Ihned byla odebrána horní fáze, bylo přidáno 0,5 objemu fenolu a 0,5 objemu chloroformu, směs byla promíchána a centrifugována při 12 000 g po dobu 5 minut. Z centrifugované směsi byla odebrána horní fáze, přidán 1 objem chloroformu a směs byla promíchána a centrifugována opět za stejných podmínek. Po centrifugaci byla odebrána opět horní fáze. Dále bylo přidáno 0,1 objemu NaAc a 3 objemy 96% etanolu, vše bylo promícháno a uloženo do -20 °C na minimálně 30 minut. Po této inkubaci byla směs centrifugována při 20 000 g a 4 °C po dobu 20 minut. Vytvořený pelet byl resuspendován v 1 ml 70% etanolu a centrifugován při 15 300 rpm, 18 °C na 20 minut (centrifuga Microfuge Lite, rotor F1802, Beckman). Nově vzniklý pelet byl vysušen a resuspendován v TE pufru či H₂O.

4.2.19.5 MINIPREPARACE REKOMBINANTNÍ PLAZMIDOVÉ DNA ALKALICKOU METODOU

Vybrané bakteriální monokolonie (narostlé na miskách po elektroporaci, viz kapitola 4.2.18.3) byly přeočkovány do 700 µl LB media s vhodným antibiotikem, a poté byly třepány při 150 rpm a 37 °C 12-16 hodin (kultivační třepačka Orbital Shaker, Forma Scientific). Narostlé bakterie byly dále centrifugovány 2 minuty při 6 000 g. K pelet byl resuspendován v 250 µl roztoku I. Dále bylo přidáno 250 µl roztoku II, se kterým byla směs opatrným přetáčením promíchána, co nejdříve byla přidána dávka 200 µl roztoku III a opět byla směs převrácením zkumavek promíchána (roztoky I-III viz 4.1.1). Zkumavky s promíchanou směsí byly centrifugovány 10 minut při 16 000 g při pokojové teplotě. K získanému supernatantu

bylo přidáno 500 μ l 100% izopropanolu a vše bylo opět pozvolným převrácením zkumavek promícháno. Následovala centrifugace směsi s izopropanolem 15 minut při 4 °C a 20 000 g. Pelet byl opatrně opláchnut 80% etanolem, vysušen a resuspendován v 20 μ l TE pufru s RNazou A (konečná koncentrace 10 μ g/ ml). K cca 5 μ l vzorku bylo přidáno 5 μ l dané štěpící směsi restriční endonukleázy a štěpícího pufru. Směs pak byla štěpena 1,5 hodiny při 37 °C. Výsledek štěpení a úspěšnost celé izolace pak byla ověřena na agarozové elektroforéze.

4.2.19.6 AGARÓZOVÁ ELEKTROFORÉZA

Pro přípravu 1% agarózového gelu bylo k agaróze přidáno odpovídající množství 0,5x TBE pufru (4.1.1). Agaróza pak byla varem rozpuštěna, mírně ochlazená a obohacena interkalačním barvivem Red Gel a nalita do aparatury s hřebenem. Po zatuhnutí směsi (po cca 20 minutách) byl z gelu hřeben odstraněn a aparatura byla přenesena do vany s 0,5x pufrům TBE. Do jednotlivých jamek byly naneseny vzorky s přídatkem 6x Orange DNA Loading Buffer (Fermentas) a marker molekulových vah (O'GenneRuler TM 1kb Plus DNA Ladder: 75-20 000 pb, Fermentas). DNA byla separována při 70 V do dosažení čela nanesených vzorků konce gelu.

4.2.19.7 IZOLACE DNA Z AGARÓZOVÉHO GELU FASTBACK DNA MINISPIN KITEM

DNA vzorek byl nanesen na 1,2% agarózový gel a byl podroben elektroforéze. Po ukončení separačního procesu byly fragmenty zájmu vyříznuty z gelu pod UV zářením a dále zpracovány dle protokolu přiloženého k FastBack DNA Minispin Kitu (Renogen Biolab Inc.).

4.2.19.8 ŠTĚPENÍ DNA RESTRIČNÍMI ENDONUKLEÁZAMI

Štěpení DNA probíhalo 12-16 hodin při 37 °C ve 100 μ l směsi o složení: 5 μ g DNA, 2 μ l restriční endonukleázy (1-10 jednotek), 1/10 objemu 10 x koncentrovaného pufru pro restriční endonukleázu a sterilní demineralizované H₂O (pro doplnění objemu směsi do 100 μ l).

4.2.19.9 DEFOSOFORYLACE A LIGACE PLAZMIDOVÉ DNA

Defosforylace byla provedena dle protokolu Fermentas pomocí FastAP Termosensitivní Alkalické fosfatázy (Fermentas).

Do ligační směsi bylo užito 200 či 400 ng plazmidové DNA (štěpená a defosforylovaná), trojnásobný nadbytek insertu (částicový nikoli hmotnostní nadbytek), dále 0,5 μ l T4 DNA ligázy, 2 μ l 10x koncentrovaného pufru pro T4 DNA ligázu a vše bylo doplněno sterilní demineralizovanou H₂O na objem 20 μ l. V případě negativní kontroly byla nahrazena složka insertu za H₂O. Směs byla ligována při 22 °C po dobu 12-16 hodin.

4.2.19.10 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR AMPLIFIKACE DNA)

DNA byla amplifikována metodou PCR. Prováděny byly zejména reakce v 20 μ l objemu. Nejprve byl připraven tzv. „master mix“ a z něho pak byly rozpipetovány jednotlivé reakce po 20 μ l. V „master mixu“ byl zahrnut i objem pro negativní kontrolu, která se lišila složením od reakčních směsí pouze náhradou templátu za H₂O. Pro jednu 20 μ l reakci bylo připraveno 15,8 μ l sterilní demineralizované H₂O; 2 μ l 10x koncentrovaného pufru pro Vent polymerázu; 0,4 μ l 10 μ M dNTP mix; 0,6 μ l 10 μ M forward primeru; 0,6 μ l 10 μ M reverse primeru a 0,2 μ l Vent polymerázy (polymeráza byla přidána až do směsi chlazené v bločku), nakonec byla odebrána negativní kontrola, do které byla přidána H₂O místo templátu a do zbytku směsi byl přidán templát (0,4 μ l). Jednotlivé reakce byly přeneseny do PCR „cyklu“ (Mastercycler EPgradient S, Eppendorf) a byla zahájena PCR reakce. Program reakce byl následující:

1. denaturace při 94 °C 3 minuty, 2. denaturace cyklu 94 °C 40 sekund, 3. nasedání primerů 50 sec. (teplota závisela na parametrech primeru), 4. elongační fáze cyklu 72 °C 1 minuta a 5. elongace 72 °C 7 minut. Reakce se skládala z 30 cyklů, tedy 30x opakujících se bodů 2.-4. Bod 1 proběhl na počátku celého procesu a bod 5 v konečné fázi procesu. Po ukončení reakce byly dílčí reakce ověřeny na agarózové elektroforéze (kapitola 4.2.19.6). PCR produkty byly přečištěny pomocí komerčního kitu High Pure PCR Product Purification Kit nebo byly (Roche) nebo přesráženy etanolem (4.2.19.3).

4.2.19.11 SYSTÉM „pENTR DIRECTIONAL TOPO CLONING KITS“ (INVITROGEN)

Systém pENTR Directional TOPO Cloning Kits od Invitrogen byl využit při konstrukci univerzálního expresního vektoru „phGf-polylinker“ (viz kapitola 5.3). Prostřednictvím kitu byla provedena v prvním kroku TOPO reakce pro přenos fragmentu DNA zájmu do komerčního pENTR/D-TOPO plazmidu, v druhém kroku byl z tohoto plazmidu LR rekombinací přenesen fragment do cílového expresního vektoru (v tomto případě phGf vektoru). Postup byl proveden dle protokolu kitu.

5 VÝSLEDKY

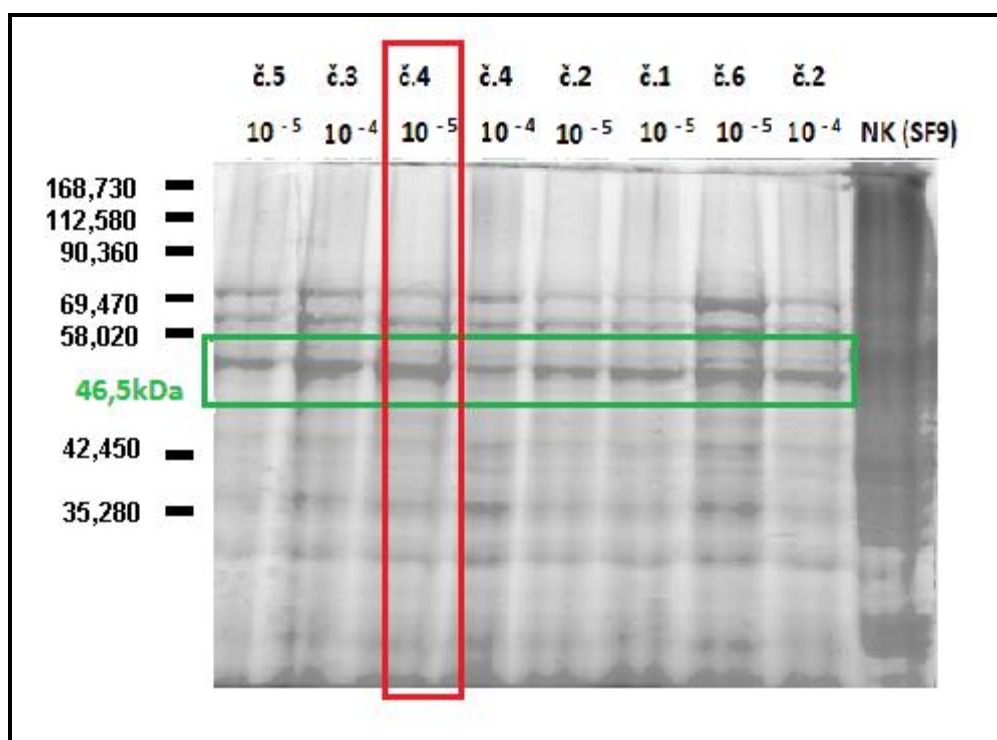
5.1 PŘÍPRAVA MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY PROTI HLAVNÍMU KAPSIDOVÉMU PROTEINU VP1 POLYOMAVIRU KARCINOMU MERKELOVÝCH BUNĚK

Jako antigen pro přípravu protilátky byl zvolen rekombinantní protein VP1 MCPyV izolovaný ve formě VLPs z buněk infikovaných rekombinantním bakulovirem nesoucím gen pro VP1 MCPyV. Rekombinantní bakulovirus byl konstruován ve spolupracující laboratoři ÚHKT (popis kapitola 4.1.5). Izolovaným antigenem byla imunizována myš, jejíž splenocyty byly užity k buněčné fúzi. Byly vytvořeny a selektovány hybridní buňky pocházející z jednoho klonu, a které stabilně produkují protilátku namířenou proti VP1 MCPyV. Tato protilátka byla dále charakterizována. Nakonec byla protilátka využita ke konfokální analýze pohybu VP1 VLPs buňkou.

5.1.1 URČENÍ TITRU INOKULA REKOMBINANTNÍHO BAKULOVIRU VP1 MCPyV

Titř bakulovirového inokula byl určen na základě plakové zkoušky, která byla provedena dle protokolu uvedeného v kapitole 4.2.7. Z plakové zkoušky byly po 9 dnech vybrány misky infikované inokulem ředěným 10^{-4} a 10^{-5} . Z výsledku zkoušky byl určen orientační titř viru. Pro určení titru byly vybrány dvě misky infikované inokulem o ředění 10^{-5} . Průměrný počet plaků na miskách byl 21. Z toho byl stanoven orientační titř viru o hodnotě 4,2. 10^6 PFU/ml. Plaky z misek 10^{-4} a 10^{-5} byly izolovány špičkou pipety a resuspendovány v BSM. Resuspendovanými plaky pak byly infikovány nové buňky SF9 po dobu 6 dní. Medium (inokulum) z těchto infikovaných buněk bylo sebráno a uloženo pro další práci, z buněk infikovaných jednotlivými plakovými inokuly byly vytvořeny lyzáty a jejich supernatanty byly separovány SDS PAGE pro ověření produkce VP1 proteinu (Obr. 5.1). Pro další práci bylo zvoleno inokulum z plaku č. 4. 10^{-5} To bylo pomnoženo pro infekci rekombinantním VP1 MCPyV bakulovirem a uloženo v podobě konzervy.

Byl stanoven titř. Pro infekci za účelem produkce VP1 VLPs pro přípravu antigenu bylo na cca $2,1 \cdot 10^7$ buněk SF9 (odpovídá 80% konfluenci misky o $\varnothing 10$ cm) aplikováno 2,5 ml inokula, což odpovídalo multiplicitě infekce 0,5). Rezignovali jsme na optimální multiplicitu infekce i za cenu poněkud nižší produkce VLPs. Rekombinantním bakulovirem byly infikovány hmyzí buňky linie SF9, celkem 13 misek ($\varnothing 10$ cm).

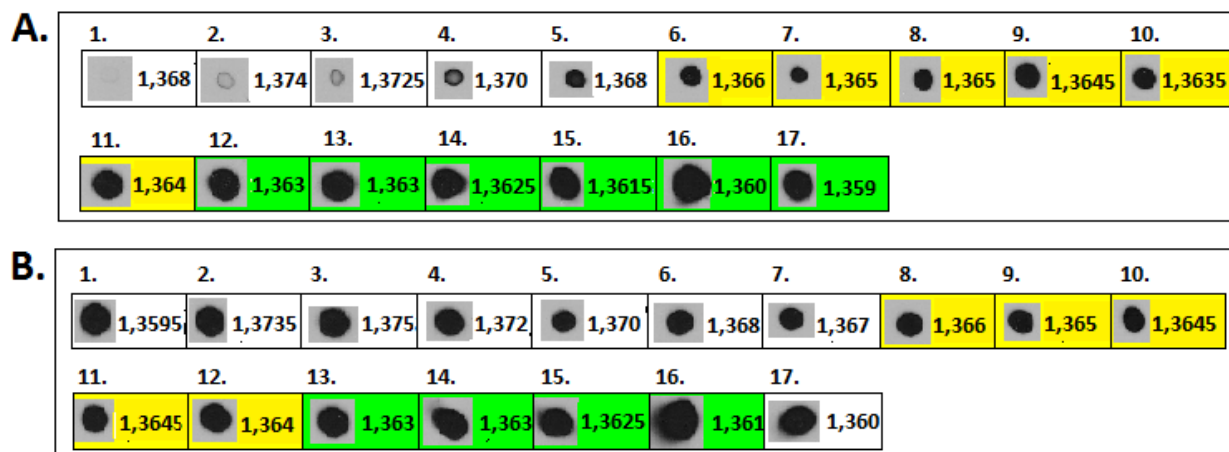


Obr. 5.1. Ověření inokul z vybraných plaků rekombinantního bakuloviru VP1 MCPyV. Na SDS PAAGE byly naneseny supernatanty pocházející z lyzátů hmyzích buněk SF9 infikovaných jednotlivými plakovými inokuly - zleva č.5/ 10^{-5} až č.2/ 10^{-4} , NK supernatant z lyzátu neinfikovaných buněk SF9. Inokulum č. 4 z plaku č.4/ 10^{-5} bylo vybráno pro pomnožení a další práci (viz červený rámeček). V zeleném rámečku je proužek odpovídající elektroforetickou mobilitou proteinu VP1 MCPyV (46,5 kDa).

5.1.2 IZOLACE VP1 VLPs (ANTIGENU) Z HMYZÍCH BUNĚK A JEJICH OVĚŘENÍ

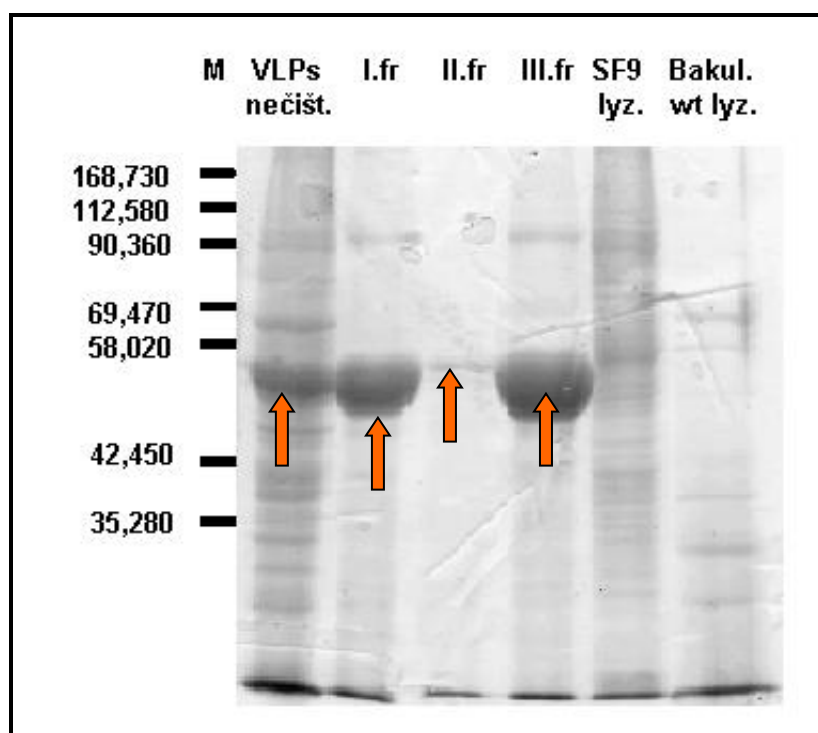
Proces izolace proběhl dle protokolů v kapitole 4.2.10. Infikované buňky byly po 72 hodinách infekce sklizeny, sonikovány 3x 40 sekund a po kontrole rozbití buněk znovu sonikovány 3x 30 sekund. VLPs byly z buněčného lyzátu centrifugací v hustotním gradientu CsCl. Po kroku centrifugace v CsCl gradientu byly dva nezávislé gradienty rozebrány do jednotlivých frakcí. Byl změřen refraktometrický index jednotlivých frakcí (obr.5.2.). Zastoupení proteinu VP1 v jednotlivých frakcích bylo detekováno Dot blot testem (Obr. 5.2.). Pro imunologickou detekci VP1 byla užita jako primární protilátka myší polyklonální protilátka namířená proti VP1 MCPyV poskytnutá spolupracující laboratoří ÚHKY, jako sekundární protilátka byla použita kozí protilátka namířená proti myším imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou. Dle výsledku Dot blotu a hodnot refraktometrických indexů (Obr. 5.2.) byly jednotlivé frakce pospojovány do třech konečných frakcí: I, II a III.

Do frakce II. byly zahrnuty gradientové frakce o refraktometrickém indexu 1,366 – 1,364 [„plné“VLPs (enkapsidovaly hostitelskou DNA)], III. frakce (tvořena zejména „prázdnými“ částicemi) byla spojena z frakcí o indexech 1,363 – 1,360 respektive 1,359). Frakce I. byla zastoupena zbytkovými frakcemi o různých refraktometrických indexech. Frakce byly dále dialyzovány (kapitola 4.2.10.3).

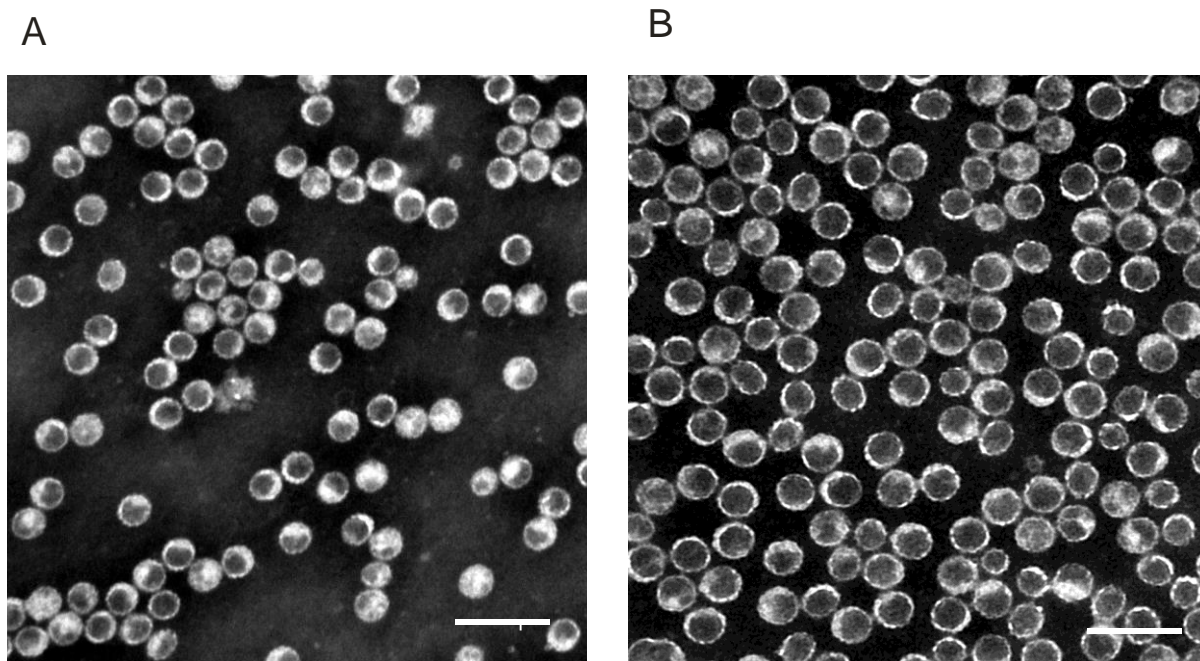


Obr. 5.2. Detekce přítomnosti VP1 MCPyV proteinu Dot blotem. A. a B. jsou dvě gradientové preparace rozdělené do frakcí 1. - 17. Žlutá pole obou preparací byla spojena do společné II. frakce (plné VLPs) ,zelená pole pak byla spojena do společné III. frakce (prázdné VLPs). Bílá pole byla spojena do frakce I (zbytkové frakce). Číselné hodnoty vyjadřují refraktometrický index naměřený u jednotlivých frakcí.

Přítomnost VP1 VLPs ve finálních frakcích I, II a III. byla ověřena jednak na SDS/PAAGE elektroforóze (Obr. 5.3) a také elektronovou mikroskopií (Obr. 5.4). Preparáty pro elektronovou mikroskopií a snímky byly připraveny a vyhotoveny Mgr.Vojtěchem Žílou a Mgr.Martinem Fraiberkem.



Obr. 5.3. Ověření přítomnosti VP1 VLPs SDSPAAGE elektroforézou. Oranžové šipky znázorňují pruh odpovídající VP1 proteinu MCPyV (46,5kDa). Do první dráhy byl nanesen lyzát infikovaných buněk, dále byla nanesena frakce I, II, III a jako kontroly byly použity lyzát z neinfikovaných SF9 buněk (SF9 lyz.) a lyzát SF9 buněk infikovaných divokým typem bakuloviru (Bakul.wt lyz.).



Obr. 5.4. Izolované VP1 VLPs na snímcích elektronového mikroskopu . Jedná se o negativní barvení (A.) VLPs II. frakce. (B.) VLPs z III.frakce – je zde převaha prázdných partikulí (tmavé). Velikost úsečky je 100 nm Vyhотовeno Mgr.Vojtěchem Žílou.

Koncentrace proteinu v konečných spojených frakcích byla určena metodou dle Bradfordové (viz tab.5.2.) dle protokolu v kapitole 4.2.10.4.1 na základě naměřených hodnot absorbancí standardů o známých proteinových koncentracích (tab.5.1.).

Číslo standardu	Koncentrace proteinu ve standardu (mg/ml)	Absorbance standardu
1	0,0	0,0
2	0,2	0,142
3	0,4	0,3
4	0,6	0,430
5	0,8	0,540
6	1,0	0,610

Tab.5.1. Hodnoty absorbancí standardů užitých pro stanovení koncentrace VP1 VLPs v jednotlivých frakcích.

Číslo frakce	Absorbance	Koncentrace proteinu ve frakci (mg/ml)
I	0,115	1,74
II	0,020	0,303
III	0,190	2,89

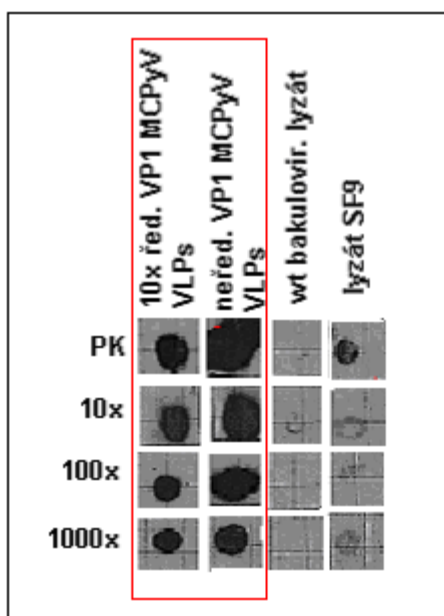
Tab.5.2. Koncentrace VP1 VLPs v jednotlivých frakcích získaných po izolaci. Z naměřených absorbancí jednotlivých frakcí byla vypočítána koncentrace proteinu ve frakcích.

5.1.3 IMUNIZACE MYŠI ANTIGENEM VP1 VLPs MCPyV

Myš byla imunizována (kapitola 4.2.11) intraperitoneálně 50 µg proteinu III. frakce, tedy prázdnými partikulami, ve třech dávkách. Aplikace druhé dávky byla provedena 13. den po aplikaci dávky první. Týden po injekci druhé dávky byla odebrána krev z ocasu myši pro otestování séra na přítomnost protilátek proti injikovanému antigenu. Sérum bylo otestováno metodou Dot blot při ředěních 10x, 100x a 1000x (jako primární protilátka). Jako pozitivní kontrola byla použita myši polyklonální protilátka proti VP1 MCPyV

vytvořená laboratoří ÚHKT. Jako sekundární protilátka byla užita kozí protilátka namířená proti myším imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou. Jak je patrné na obrázku 5.5, výsledek testu byl pozitivní - silný signál reakce protilátky ze séra vůči antigenu naneseného na membránu byl přítomen u všech třech ředění séra. Slabý signál byl také pozorován u lyzátu neinfikovaných SF9 při použití kontrolní polyklonální protilátky. Zde jde patrně o reakci na protein nacházející se v SF9, který může mít část svého povrchu shodnou s antigenem VP1 MCPyV.

Na základě tohoto pozitivního výsledku byla po čtrnácti dnech aplikována třetí dávka antigenu a třetího dne po aplikaci byla provedena buněčná fúze.



Obr. 5.5. Testování přítomnosti specifických protilátek v séru myši imunizované VP1 VLPs. Dot blot. PK – pozitivní kontrola (polyklonální protilátka proti VP1 VLPs MCPyV vytvořena ÚHKT) a 10x, 100x a 1000x ředěné myší sérum bylo aplikováno jako primární protilátka na membránu s navázanými antigeny VP1 VLPs MCPyV 10x ředěné a neředěné. Jako negativní kontroly byly použity lyzáty SF9 buněk a divokého typu bakuloviru. Signál PK je srovnatelný se signály séra imunizované myši.

5.1.4 FÚZE BUNĚK

Buněčná fúze byla provedena podle protokolu uvedeného v kapitole 4.2.12. Třetí den po fúzi byla na dobu tří dnů přidána k fúzovaným buňkám dávka geneticinu (G418 Sigma) o konečné koncentraci 200 µg/ml.

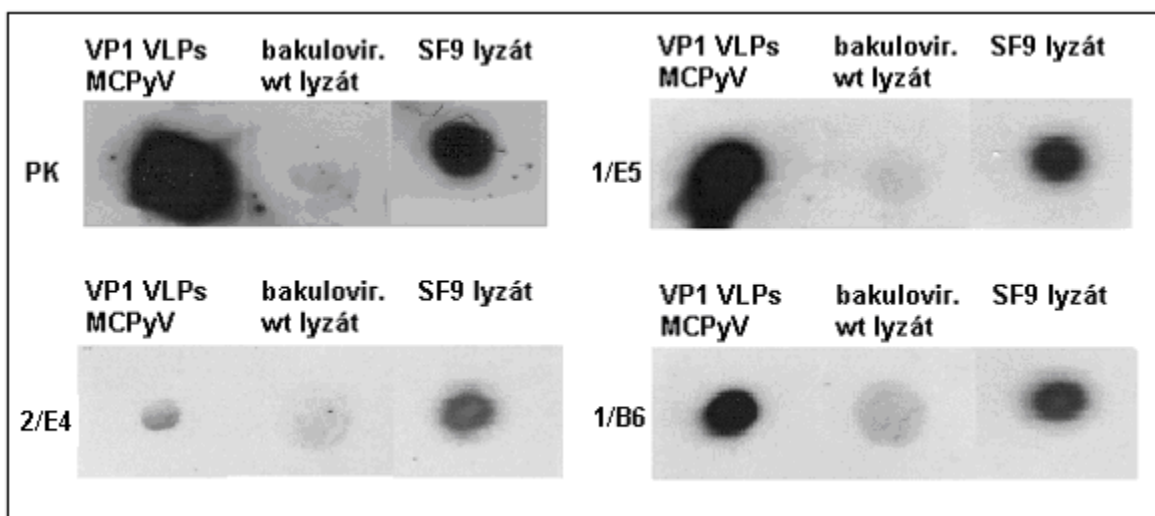
5.1.5 TESTOVÁNÍ A KLONOVÁNÍ HYBRIDOMŮ

Jakmile hybridomy dostatečně porostly dna jamek, byla testována jejich růstová média na přítomnost protilátky. V počátku testování byla využita metoda Dot blot dle kapitoly 4.2.16 a 4.2.13.2.2. (Obr. 5.6.), protože přibližně 20. den po fúzi bylo detekováno pouze 8 jamek pozitivních na hybridomy:

- 1.deska: B6, E5 a F9
- 2.deska: E4, D10
- 3.deska: D3
- 5.deska: F7 a G10

Testovaná média těchto jamek sloužila jako primární protilátka pro detekci VP1, který byl aplikován na nitrocelulózu membránu v podobě 1,5 μ l kapky VP1 VLPs. Jako pozitivní kontrola k testovanému hybridomovému médiu byla užita opět myší polyklonální protilátka proti VP1 MCPyV vyrobená ÚHKT. Sekundární protilátkou pro imunologickou detekci tohoto Dot blotu byla kozí protilátka proti myším imunoglobulínům konjugovaná s křenovou peroxidázou. Výsledek Dot blotu (Obr. 5.6.) ukázal jasně pozitivní kolonie 1/B6 a 1/E5, slabý signál byl patrný také u kolonie 2/E4. Media ostatních hybridomů byla negativní na přítomnost protilátek specifických pro VP1.

Signál u lyzátu SF9 je patrně způsoben podobností některého epitopu proteinů SF9 buněk s epitopem VP1 anebo kontaminující příměsí protilátky proti proteinu buněk SF9.



Obr. 5.6. První testování medií hybridomů na přítomnost protilátek namířených proti VP1 VLPs MCPyV.. Dot blot. Nitrocelulozová membrána s nakapanými vzorky jak je uvedeno v obrázku. Na obrázku vidíme pouze pozitivní hybridomy 1/B6; 1/E5; 2/E4 a pozitivní kontrolu (PK; polyklonální protilátka proti VP1 z ÚHKT).

Ostatní negativní kolonie byly rozklonovány na nové desky, ale dalším testováním se jen potvrdila jejich negativita.

Každý pozitivní klon 1/B6, 1/E5 a 2/E4 byl tzv. **prvně klonován**. Každý byl tedy klonován na jednu 96-ti jamkovou desku s předem připravenými podpurnými buňkami. Jednotlivé kolonie byly resuspendovány a po spočítání buněk byla každá kolonie naředěna v odpovídajícím množství HAT media a „pipetována“ do jamek desky, tak aby na jednu jamku desky připadla ideálně právě jedna buňka z výchozí kolonie (protokol v kapitole 4.2.13.3). V původních deskách našich pozitivních kolonií byly hybridomy dopěstovány a zálohovány do zamražených konzerv (kapitola 4.2.13.4).

Po tomto prvním klonování jednotlivých pozitivních klonů byly nově vzniklé monoklonie již testovány na průtokovém cytometru (FACS). Antigen pro otestování hybridomových medií průtokovým cytometrem byl připraven dle protokolu v kapitole 4.2.13.2.1. Příprava materiálu na testování spočívala v 72 hodinové infekci hmyzích buněk SF9 rekombinantním VP1 MCPyV bakulovirem a následné aplikaci testovaných hybridomových medií na takto infikované buňky (nesoucí antigen VP1) ve funkci primární protilátky Pro PK (pozitivní kontrolu) byla užita primární polyklonální protilátka proti VP1 MCPyV (vytvořena ÚHKT), pro NK bylo užito místo primární protilátky čistého HAT média Jako sekundární protilátka

byla užita oslí protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s Alexa Fluor 488. Průtokovým cytometrem byly detekovány:

- z rozklonovaného 1/E5 čtyři velmi pozitivní klony: 1/E5G2, B4, E4 a B9.
- z rozklonovaného 1/B6 čtyři slabě pozitivní klony: 1/B6F1, A6, B6 a C9 a dva silněji pozitivní klony: 1/B6D8 a B9, u kterých se ale intenzita signálu nerovněla signálům 1E5 řady
- z rozklonovaného 2/E4 žádné pozitivní klony.

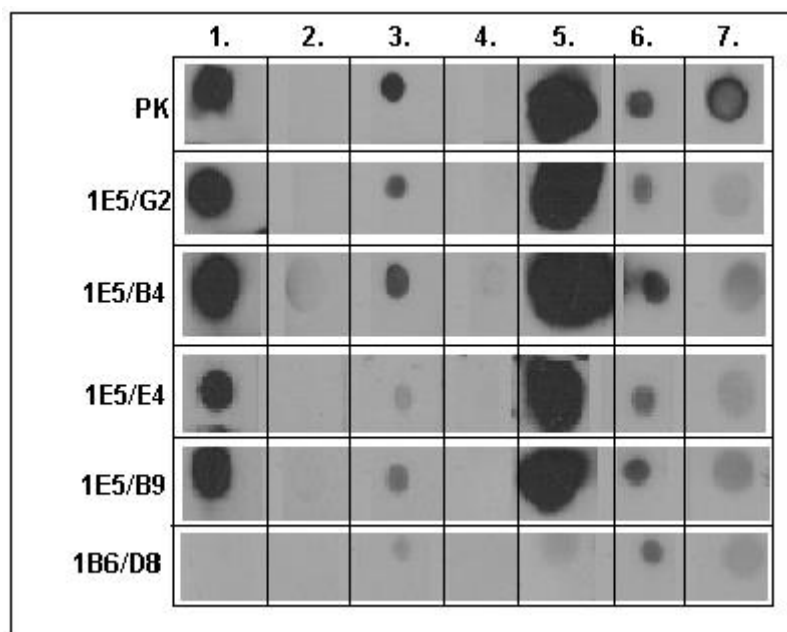
Dále bylo tedy provedeno tzv. **druhé klonování** pozitivních kolonií 1/E5G2, B4, E4 a B9 a 1B6D8. Pozitivní kolonie byly opět aplikovány do jamek desek s podpůrnými buňkami stejným způsobem jako u prvního klonování.

Ve všech původních pozitivních jamkách (ze kterých byly buňky dále klonovány) byly zbytkové buňky ponechány dalšímu růstu a ty pak zase zamražovány či pěstovány v 25 cm³ lahvičkách pro kolekci protilátky, která v tomto stádiu již vykazovala využitelnost na úrovni polyklonální protilátky.

Protilátky produkované klony 1/E5G2, B4, E4 a B9 a 1B6D8 byly kromě průtokové cytometrie (viz dále) také otestovány metodou Dot blotu (Obr. 5.7). Na 1. sloupec každé membrány byly nanášeny 10x řaděné izolované VP1 VLPs MCPyV, antigenem sloupce 2 byl denaturovaný VP1 VLPs MCPyV (denaturace v Laemliho pufru a varem), antigen 3. sloupce byl VP1 VLPs MPyV (myšího polyomaviru), na 4. sloupec byl navázán lyzát hmyzích buněk infikovaných divokým typem bakuloviru (NK, negativní kontrola), na 5. sloupec byl aplikován lyzát SF9 infikovaných rekombinantním bakulovirem VP1 MCPyV (tedy lyzát SF9 s VP1 VLPs MCPyV). Na 6. sloupec byl vázán lyzát neinfikovaných SF9 buněk (NK) a na 7. sloupec lyzát SF9 s obsahem VP1 VLPs MPyV.

Z Dot blot testu (Obr. 5.7) byla patrná pozitivita klonů pocházejících z 1E5. Zajímavá byla reakce (křížová reakce) na VP1 protein MPyV. Nejsilnější interakci s VP1 MPyV měla kontrolní polyklonální protilátka (Obr. 5.7., - PK: sloupec 3 a 7). I klony vycházející z 1/E5 reagovaly slabě s VP1 MPyV. Kromě křížové reakce s VP1 MPyV, nemůžeme ve výsledném Dot blotu zanedbat reakci protilátek na lyzát neinfikovaných SF9 buněk (sloupec 6.) V případě 1/B6D8 nebyl zaznamenán žádný významný signál a pokud porovnáme výsledek předchozího Dot blotu (Obr. 5.6.), je patrné, že klon 1/B6D8 během klonování postupně ztrácel protilátku specifickou pro VP1 MCPy (nebyl stabilní).

Z 2. sloupce, ve kterém byly na membrány vázány VP1 VLPs MCPyV ovšem denaturované, je jasné, že protilátka nerozpoznává sekvenční epitop, ale pouze epitop konformační.



Obr. 5.7. Testování protilátky produkované klony 1/E5G2, B4, E4 a B9 a 1B6D8 testem Dot blot . PK je pozitivní kontrola s použitím polyklonální protilátky proti VP1 MCPyV z ÚHK. 1. Sloupec: ředěné izolované VP1 VLPs MCPyV, 2. sloupec: VP1 VLPs MCPyV denaturované v Laemliho pufru, 3. sloupec: VP1 VLPs MPyV (myšího polyomaviru), 4. sloupec: lyzát SF9 infikovaných divokým bakulovirem, 5. sloupec: lyzát SF9 infikovaných rekombinantním bakulovirem VP1 MCPyV, 6. sloupec: lyzát neinfikovaných SF9 buněk, 7. sloupec: lyzát SF9 s VP1 MPyV.

Výsledné klony z druhého klonování byly otestovány také průtokovou cytometrií. Silně pozitivní klony byly detekovány:

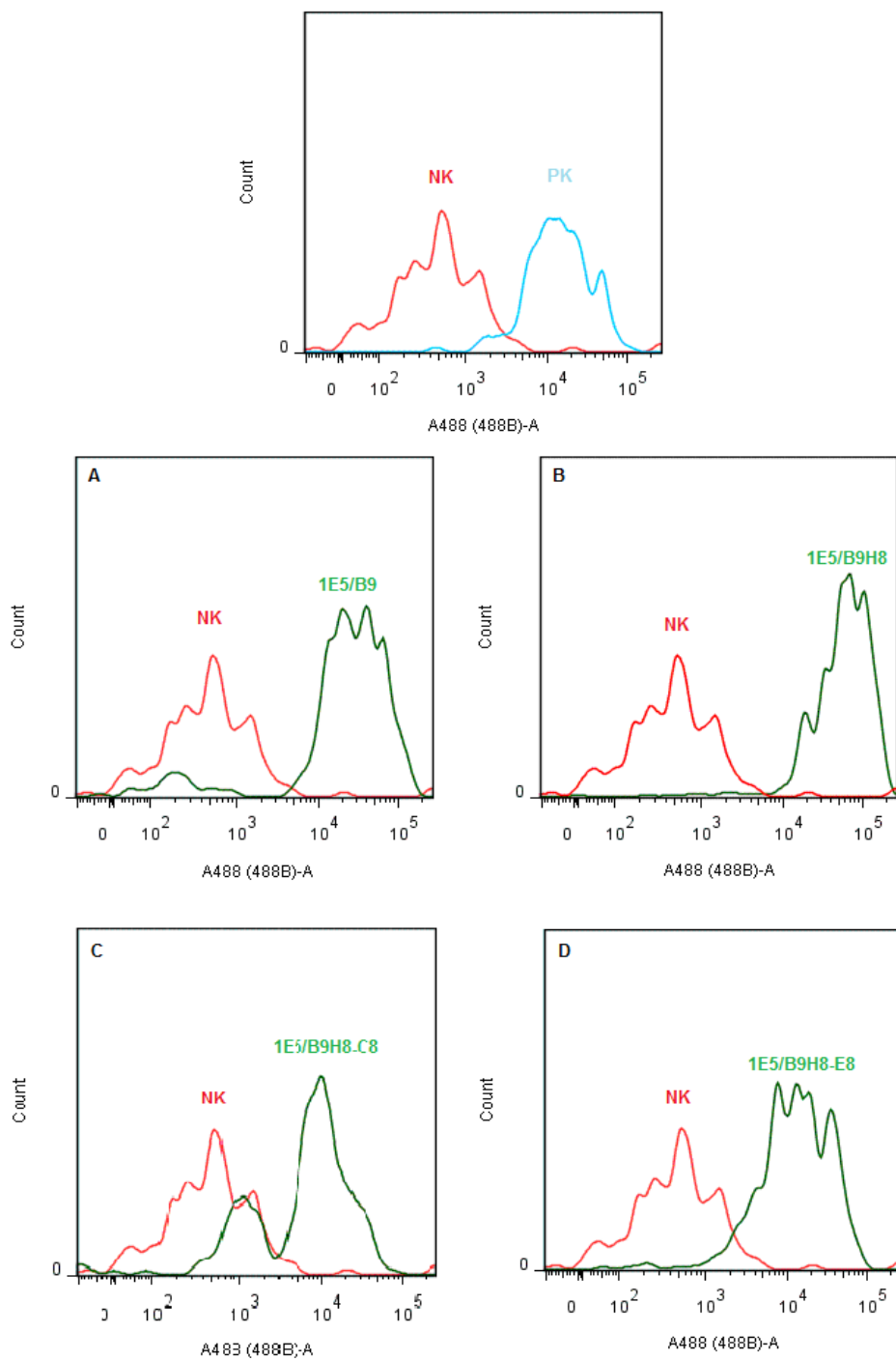
- deska 1/E5G2: D2, G2, G3, B4, C4, F6, F8, H9, B12 a D12
- deska 1/E5B4: F3 a E10
- deska 1/E5E4: D1, E2, F3, A4, B4, D4, G4, D4, B9, B8, C8, F6, B6, D5, C5, B10, D11 a C12
- deska 1/E5B9: D1, E10, H8, G8, F5, F2 a C2

Na desce 1/B6D8 nebyl zaznamenán žádný významně pozitivní signál, proto nebylo s tímto klonem dále pokračováno.

Pro **třetí klonování** byly vybrány klony 1E5/G2F6, 1E5/B9H8 a 1E5/E4B6. Desky s buňkami třetího klonování byly opět testovány průtokovou cytometrií s následujícím výsledkem:

- deska klonu 1E5/E4B6: H3 - relativně slabý signál
- deska klonu 1E5/G2F6: A2 v - relativně slabý signál
- **deska klonu 1E5/B9H8: D5, D11, E8, C8, G6, E6, H6, G3, G2, G7 a B6** velmi pozitivní signály silnější či srovnatelné s PK (kontrolní polyklonální protilátkou proti VP1 MCPyV ÚHKT)

Pozitivní klony desky 1E5/B9H8, byly dále pěstovány v 25 cm³ lahvičkách pro kolekci protilátek a buňky byly průběžně zamražovány. Ukázky výsledků z průtokového cytometru jsou uvedeny na obrázku 5.8. Je zde ukázána cesta klonu 1/E5B9 (A), který po trojím „rozklonování“ dal vzniku stabilním hybridomům produkujícím finální protilátky typu 1/E5B9H8–X. Horní obrázek ukazuje rozdíl mezi PK (kontrolní polyklonální protilátkou proti VP1 MCPyV, ÚHKT) a NK (negativní kontrolou, místo primární protilátky aplikováno čisté HAT médium). Vzhledem k tomu, že všechny klony pocházely ze stejného předka, bylo předpokládáno, že všechny budou vykazovat stejné vlastnosti, které ale stejně bylo třeba ověřit.

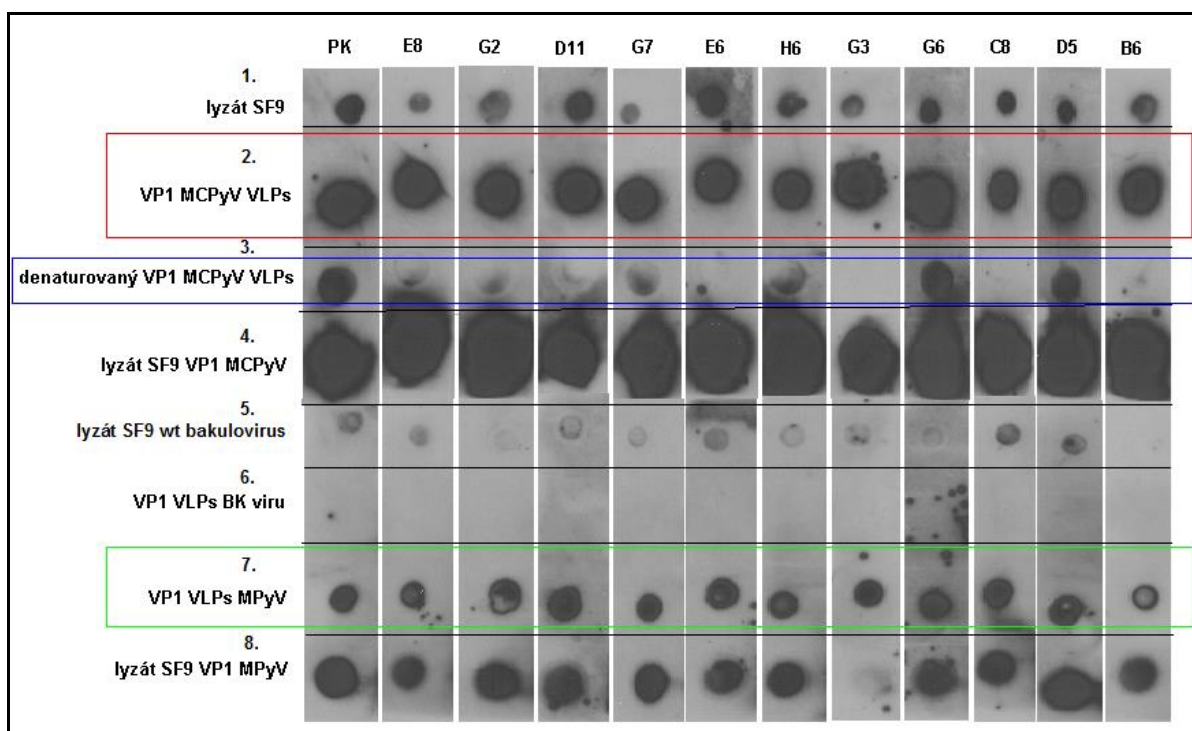


Obr. 5.8. Ukázka výsledků z průtokového cytometru – testování protilátek jejich aplikací na SF9 buňky infikované bakulovirem nesoucím gen pro VP1 MCPyV. Znázornění cesty klonu 1/E5B9 (A), který po trojím „rozklonování“ dal vzniku stabilním hybridomům produkujícím finální protilátky typu 1/E5B9H8–X. Horní obrázek ukazuje rozdíl mezi pozitivní (PK, primární polyoklonální protilátka proti VP1 MCPyV, ÚHKT) a negativní kontrolou (NK, místo primární protilátky aplikace HAT média). A-D testování primárních protilátek produkovaných klonu hybridomových buněk. Jako sekundární protilátka byla užita oslí protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s Alexa Fluor 488. Část **A** ukazuje pozitivní výsledek klonu 1/E5B9 v porovnání s částí **B** ukazující pozitivní výsledek klonu 1/E5B9H8 a částí **C** a **D** ukazující dvě vybrané finální protilátky klonů 1/E5B9H8-C8 a-E8

5.1.6 CHARAKTERIZACE PROTILÁTEK

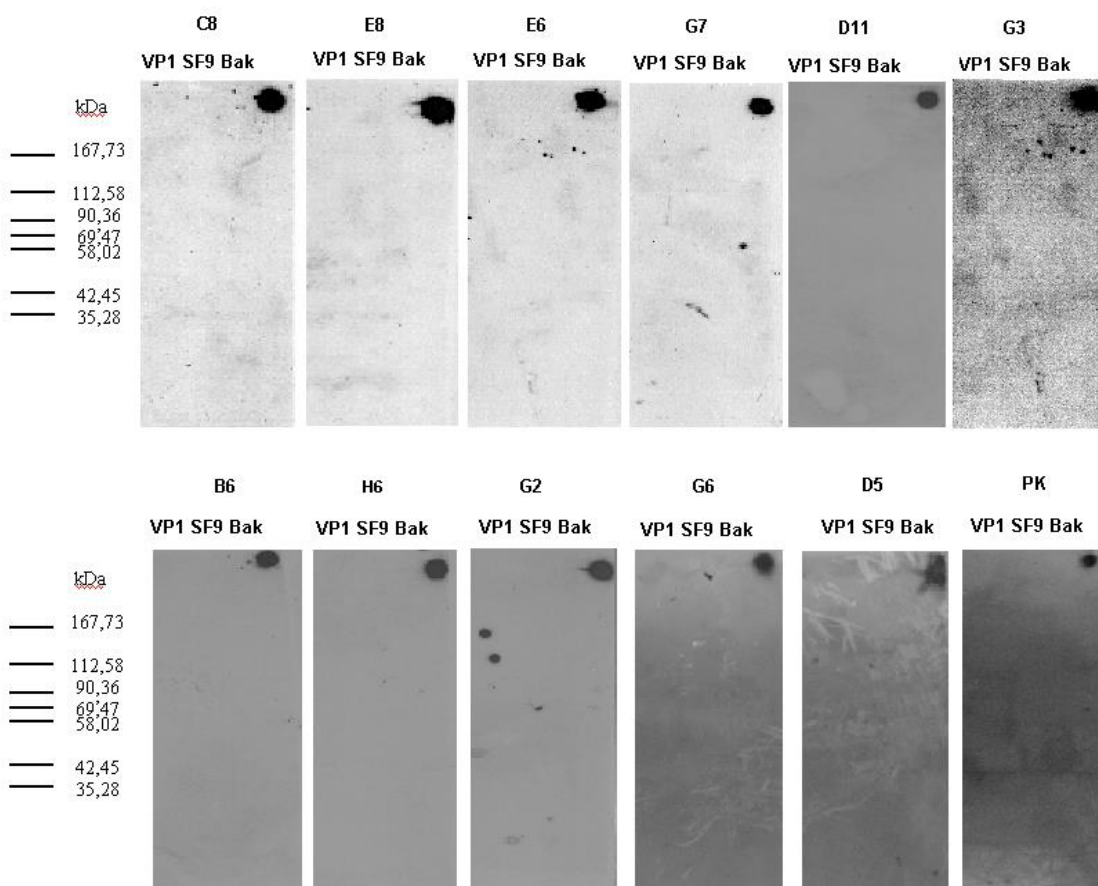
Získané protilátky 1E5/B9H8 - E8, G2, D11, G7, E6, H6, G3, G6, C8, D5 a B6 byly na závěr testovány metodou Dot blot (Obr. 5.9.) a Western blot (Obr. 5.10), neutralizačním testem (Obr. 5.11.) a metodou nepřímé imunofluorescence (Obr. 5.12.). Zajímalo nás, zda všechny protilátky opravdu vykazují stejné vlastnosti (vzhledem ke společnému prvnímu izolátu).

Pro charakterizaci metodou Dot blot (Obr. 5.9.) byly na membrány aplikovány různé antigeny: lyzát SF9 buněk (sloužící jako NK), nativní a denaturovaný VP1 VLPs MCPyV, lyzát SF9 infikovaných rekombinantním bakulovirem VP1 MCPyV (tedy SF9 s VP1 VLPs MCPyV), lyzát SF9 s divokým typem bakuloviru (NK), VP1 VLPs BK viru, VP1 VLPs MPyV (myší polyomavirus) a jeho lyzát v SF9 buňkách. V červeně ohraničeném poli na obrázku je možno vidět signál v reakci na nativní antigen VP1 VLPs MCPyV. V zeleném poli byla zaznamenána křížová reakce s VP1 VLPs MPyV (tedy opět byla potvrzena možnost reakce protilátky s VP1 MPyV. Jak je patrné (řádek 6) připravené protilátky neinteragují s VP1 BK viru. Potvrdila se také slabá reakce protilátek s lyzátem neinfikovaných SF9 buněk. Modře označený řádek značí reakci protilátek na denaturovaný antigen VP1 MCPyV – zde byl zaznamenán slabý signál u protilátek G7, H6, G6 a D5 a u PK (pozitivní kontroly), který by značil, že protilátky rozeznávají, byť méně efektivně i sekvenční epitop VP1. Ale vzhledem k tomu, že všechny testované hybridomy vycházely ze společného klonu a na všech předchozích Dot blot(ech) byla reakce protilátek s denaturovaným VP1 MCPyV negativní, reakce byla způsobena patrně nedostatečnou denaturací antigenu (pro pět membrán tohoto testu byl totiž připraven nově denaturovaný antigen). Tento závěr je podpořen faktem, že i polyklonální protilátka používaná jako PK, která s denaturovaným VP1 dříve nereagovala, dávala v tomto testu pozitivní signál. Přesto byly protilátky testovány na reakci s denaturovaným antigenem citlivější metodou Western blot.



Obr. 5.9. Charakterizace klonů profilátky 1E5/B9H8-E8, G2, D11, G7, E6, H6, G3, G6, C8, D5 a B6 metodou Dot blot. Pro charakterizaci byly na membrány aplikovány různé antigeny – 1. lyzát SF9 buněk (NK), 2. nativní a 3. denaturovaný VP1 VLPs MCPyV, 4. lyzát SF9 infikovaných rekombinantním bakulovirem VP1 MCPyV (tedy SF9 s VP1 VLPs MCPyV), 5. lyzát SF9 infikovaný divokým typem bakuloviru (NK), 6. VP1 VLPs lidského BK viru, 7. VP1 VLPs MPyV (myší polyomavirus) a 8. jeho lyzát SF9 buněk produkujících VP1 MPyV. V červeně ohraničeném poli je možno vidět signál na nativní VP1 VLPs MCPyV. Modře ohraničené pole značí reakci na denaturovaný antigen. V zeleném poli byla zaznamenána křížová reakce s VP1 VLPs MPyV.

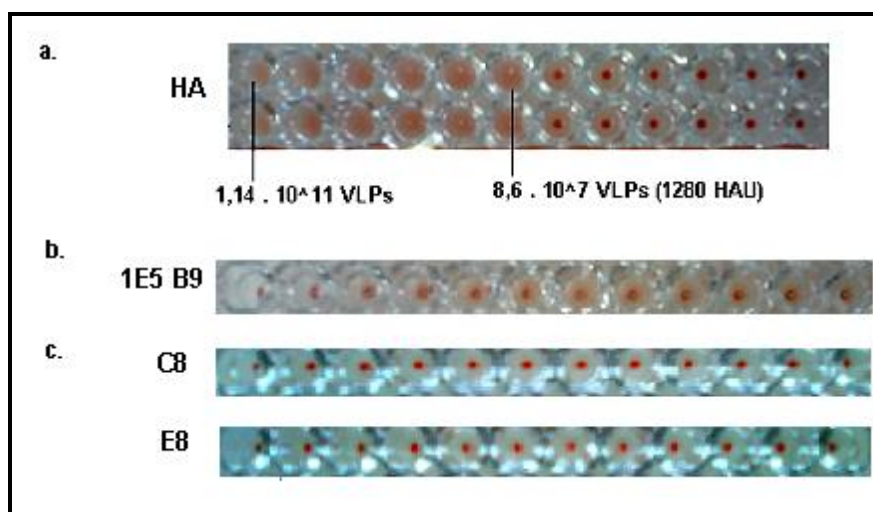
Na obrázku 5.10 jsou Western blot analýzy, které potvrdily, že získané protilátky interagují pouze s nativním VP1 a tedy rozpoznávají konformační epitop VP1 proteinu. Na obrázku je možno vidět pouze signál v podobě tečky v pravém horním rohu každé membrány, kam byl aplikován nativní antigen před blotováním proteinu z gelu na membránu. Není patrný žádný signál u denaturovaného VP1 VLPs antigenu (vždy první sloupec každé membrány – VP1) ani u negativních kontrol lyzátu neinfikovaných SF9 buněk (vždy druhý sloupec každé membrány – SF9) nebo lyzátu buněk infikovaných divokým typem bakuloviru (vždy třetí sloupec každé membrány – Bak).



Obr. 5.10. Charakterizace klonů protilátky 1E5/B9H8-E8, G2, D11, G7, E6, H6, G3, G6, C8, D5 a B6 metodou Western blot. PK je pozitivní kontrola. Na každou membránu byly blotovány proteiny z SDS gelu, na který byly naneseny denaturované VP1 VLPs MCPyV v Laemliho pufru (VP1), dále denaturovaný lyzát neinfikovaných SF9 buněk (SF9) a lyzát SF9 buněk infikovaných divokým bakulovirem (Bak). V pravém rohu každé membrány byl kápnut antigen (VLPs MCPyV) v nativní podobě pro kontrolu. Membrány byly vyvolané s protilátkami uvedených klonů

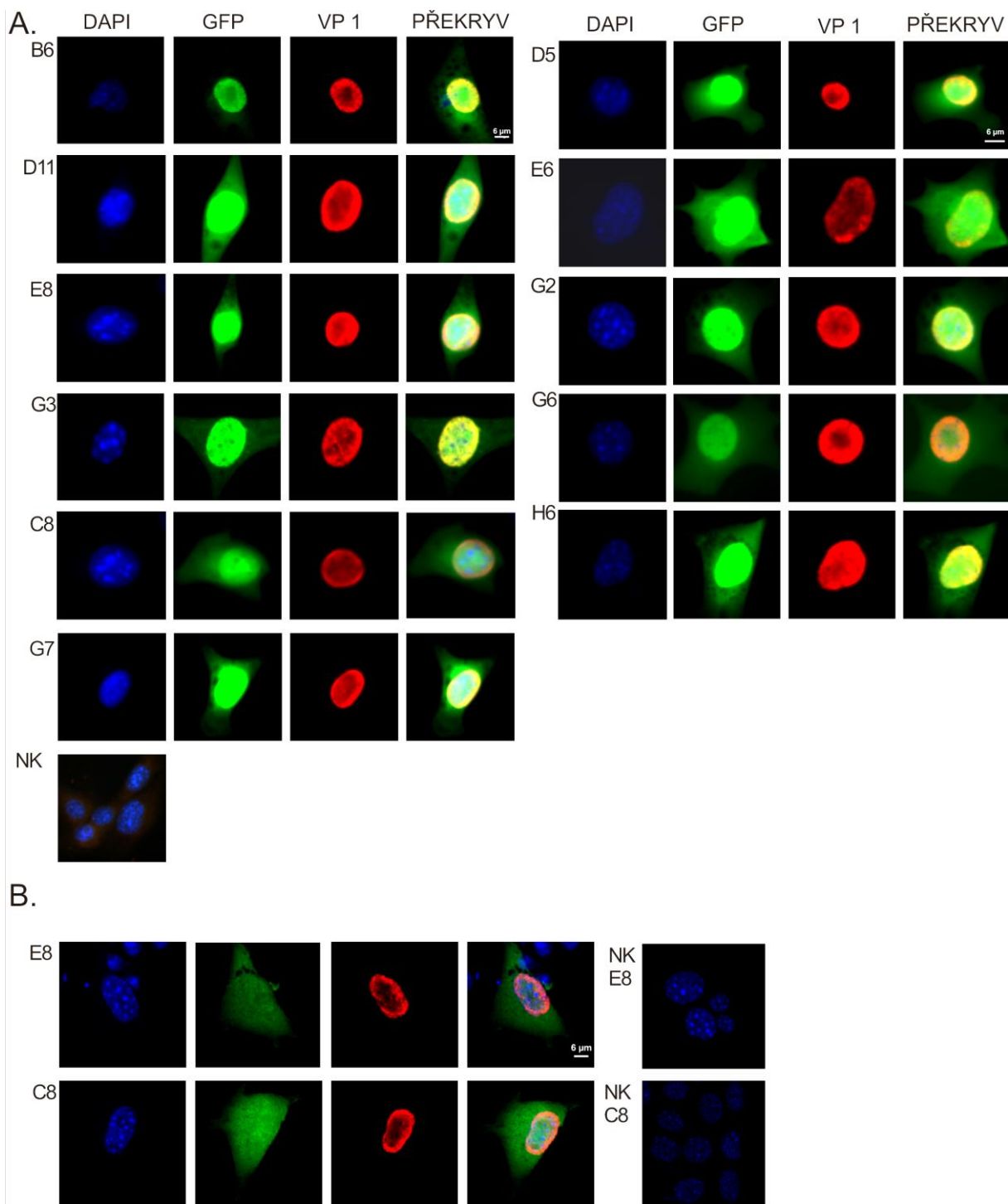
Dále nás zajímalo, zdali získané protilátky brání interakci VLPs s kyselinou sialovou buněčných membránových receptorů. Proto byl proveden neutralizační test metodou hemaglutinace (dle protokolu v kapitole 4.2.4). Jak je již v této kapitole uvedeno, test na principu hemaglutinace byl realizován díky vlastnosti VP1 proteinu MCPyV vázat se na sialové receptory membrán erytrocytů. Ty se navázaným virem zesítují a to se projeví difúzním rozprostřením erytrocytů namísto sraženiny v podobě tečky bez přítomnosti viru. Na obrázku 5.11 v části a. byla provedena kontrolní hemaglutinace, kdy VLPs zesítovaly erytrocyty, schopnost VP1 zesítovat erytrocyty klesá s koncentrací VLPs. Části b. a c. tohoto obrázku ukazují provedení neutralizačního testu. Směs VP1 VLPs MCPyV byla inkubována 1,5 hodiny při laboratorní teplotě s protilátkou proti VP1 MCPyV. Tato směs byla ředěna

ředící řadou a nakonec k ní byla přidána suspenze erytrocytů. Část b. ukazuje neutralizační test u původního klonu 1E5B9. Je vidět, že již protilátka prvotního hybridomového izolátu neutralizovala vazbu na kyselinu sialovou. Část c. ukazuje neutralizační vlastnosti protilátek dvou finálních klonů 1E5/B9H8 - E8 a 1E5/B9H8 - C8.



Obr. 5.11. Obrázek neutralizačního testu metodou hemaglutinace. Část a. - hemaglutinace VP1VLPs MCPyV a jejich schopnost zesítovat erytrocyty, která klesá s koncentrací VLPs. Část b. - neutralizační test provedený protilátkou primárního 1E5B9 klonu. Část c. - neutralizační test protilátek dvou finálních klonů C8 a E8 (tedy 1E5/B9H8-C8 a 1E5/B9H8-E8).

Na závěr byly protilátky testovány pro využití v metodě nepřímé imunofluorescence. Buňky 3T6 byly transfekovány (dle protokolu v kapitole 4.2.6) plazmidem pwM (Addgen, Ch.Buck) a byly fixovány 24 hodin po transfekci (p.t.). Tento expresní plazmid nese kodonově optimalizovanou sekvencí VP1 MCPyV a sekvencí EGPF v jiném čtecím rámci pro kontrolu transfekce. Metoda nepřímé imunofluorescence byla provedena dle kapitoly 4.2.9. Hybridomová růstová media nebyla pro testování protilátek imunofluorescencí ředěna. Jako sekundární protilátka byla užita Cy3 protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s Alexa Fluor 546. Z obrázku 5.12. A, vyplývá, že všechny testované protilátky zobrazovaly protein VP1 podobně, v jádře transfekovaných buněk a nevytvářely žádné výrazné pozadí. Jedná se zřejmě o tutéž protilátku u všech testovaných klonů. Buňky obarvené vybranými proti látkami klonů 1E5/B9H8-E8 a 1E5/B9H8-C8 byly zobrazeny též konfokální mikroskopií. Konfokální snímky řezů buněk (Obr. 5.12. B) ukázaly, že protein VP1 dává nejsilnější signál pod jadernou membránou jak je tomu u jiných polyomavirových VP1 proteinů. Testy prokázaly využitelnost připravené protilátky.



Obr. 5.12. Testování protilátky pro nepřímou imunofluorescenci. Jádro myších 3T6 fibroblastů je barveno modře (DAPI), zelený signál je GFP (EGFP) - z expresního plazmidu pWM obsahujícího VP1 sekvenci a v jiném čtecím rámci také EGFP, červeně - VP1 protein MCPyV (z expresního plazmidu pWM) detekovaný protilátkami z růstového media jednotlivých hybridomových klonů. Poslední snímek v každé řadě zobrazuje překryv signálů. **A.** Testy protilátkami uvedených finálních klonů, NK - buňky neexprimující VP1. Zobrazeno fluorescenčním mikroskopem Olympus BX60, **B.** Konfokální řez vybraných buněk. VP1 protein MCPyV barvený protilátkami klonů 1E5/B9H8 - E8 a 1E5/B9H8 - C8. NK – buňky neexprimující VP1. Zobrazeno na konfokálním mikroskopu Leica SP2 AOBS

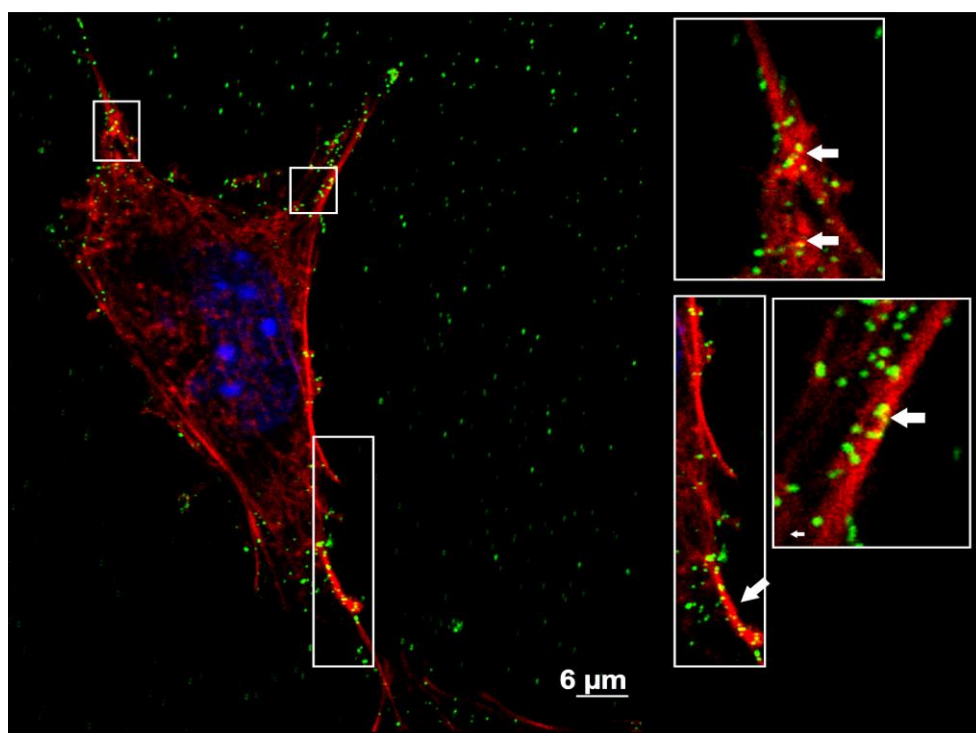
U protilátek klonů 1E5/B9H8-E8 a 1E5/B9H8-C8 byl také určen protilátkový izotyp. Jedná se o IgG2a. Stanovení bylo provedeno firmou Exbio.

5.1.7 KONFOKÁLNÍ ANALÝZA POHYBU VP1 VLPs MCPyV BUŇKOU –

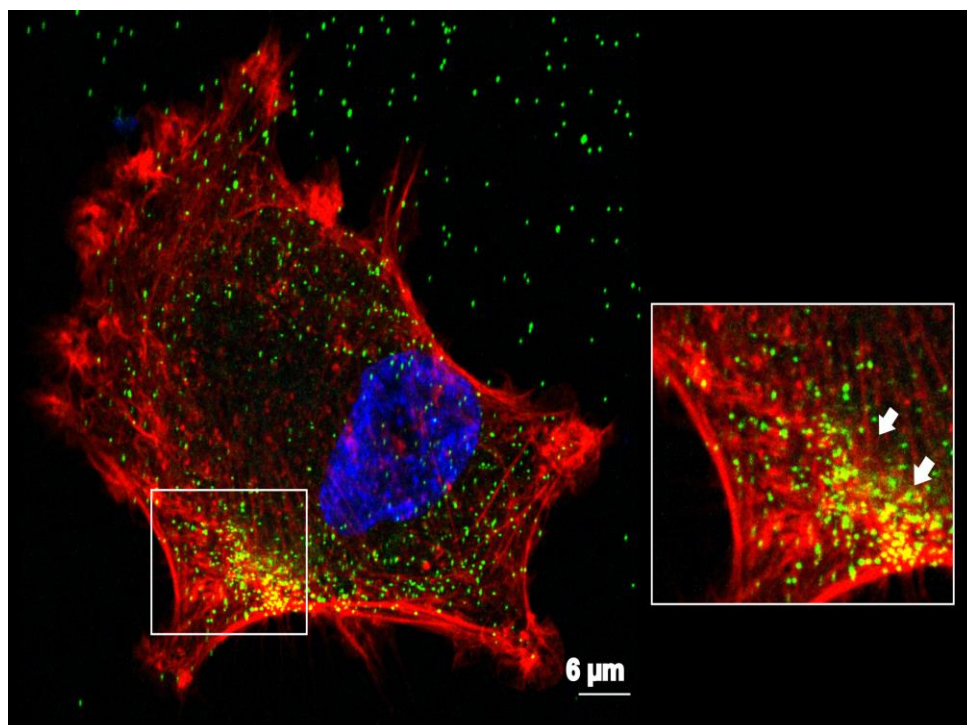
Jedním z důvodů přípravy protilátek namířených proti proteinu VP1 MCPyV bylo její využití pro budoucí studium pohybu tohoto viru buňkou. Cesta polyomavirů od buněčné membrány k buněčnému jádru není zcela dořešena ani u řady let studovaných polyomavirů (SV40, MPyV, BK viru a JC viru). I když dosud není k dispozici infekční MCPyV, dají se pro tento účel využít MCPyV VLPs. V této práci byly provedeny předběžné pokusy sledování přítomnosti virových částic ve vybraných buněčných endocytických strukturách po pseudoinfekci buněk VLPs.

Proces pseudoinfekce včetně přípravy buněk byl proveden podle protokolu uvedeného v kapitole 4.2.5. Na každé sklíčko 24-jamkové desky bylo vyseto $6 \cdot 10^6$ lidských plicních fibroblastů HEL 299 nebo myších fibroblastů 3T6. Buňky byly pseudoinfikovány VP1 VLPs ředěných v BSM tak, aby byla koncentrace $5 \cdot 10^4$ VLPs na každou buňku sklíčka. Taková vysoká koncentrace VLPs na buňku byla použita v tomto prvním pokusu, ve snaze detekovat signál VLPs i v případě, že by internalizace buňkou neprobíhala účinně. Značení pro nepřímou imunofluorescenci bylo provedeno dle protokolu v kapitole 4.2.9. VLPs byly značeny nově připravenou myší protilátkou 1E5/B9H8-E8 namířenou proti VP1 MCPyV a sekundární oslí protilátkou proti myším imunoglobulinům konjugovanou s Alexa Fluor 488. Buněčné struktury byly vždy barveny červeně – použité primární protilátky a sekundární protilátky jsou uvedeny v kapitole 4.1.2. Pro první pozorování byla v buňce označena vždy některá z následujících struktur: časné endozómy (protilátkou proti EEA1), pozdní endozómy/lyzozómy (protilátkou proti proteinu LamP2), struktury obsahující caveolin 1 (protilátkou proti caveolinu; CAV-1), endoplazmatické retikulum (ER) (protilátkou proti proteinu BiP) a aktinová vlákna (barvena phalloidinem). Sklíčka byla po adsorpci VLPs, inkubaci na ledu a po různě dlouhé inkubaci při 37°C v CO₂ inkubátoru fixována 3% paraformaldehydem. Časy po inkubaci byly zvoleny pro kolokalizace s EEA1 20, 60 minut a 3 hodiny, s aktinem 30 minut, s caveolinem1 20 minut a 3 hodiny, s LamP2 90 minut a 3 hodiny a s BiP 3 hodiny. Analýza kolokalizací VLPs s různými buněčnými strukturami byla provedena na konfokálním mikroskopu TCS SP2 Laser Scanning Confocal Microscope (Leica) za asistence Mgr. Ondřeje Šebesty.

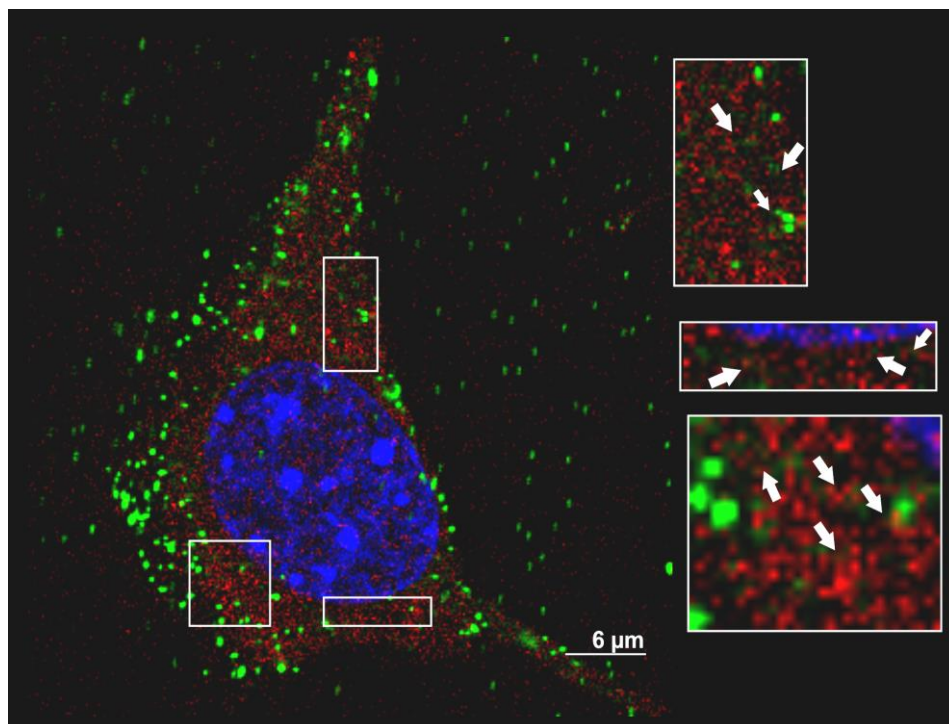
Jak je patrné ze všech přiložených obrázků 5.13 – 5.28., VLPs se adsorbovaly na buněčný povrch ne příliš efektivně a do buněk vstupovaly pomaleji, než jak bylo pozorováno např. u VP1 VLPs MPyV. Zároveň nebyl patrný zásadní rozdíl ve vstupu či interakcích VLPs u 3T6 myších fibroblastů a lidských plicních epitelálních buněk HEL 299. I přes neochotu VLPs vstupovat do buněk, lze na obrázcích pozorovat kolokalizace s použitými buněčnými markery. Obrázek 5.13 ukazuje, že VLPs MCPyV se často adsorbují na filopodia a jiná místa bohatá na aktin. Z obrázku 5.14. je patrné, že podobně jak bylo pozorováno v případě MPyV a jeho VLPs, adsorpci částic a jejich internalizaci provází dezorganizace aktinových vláken. Kolokalizace VLPs s aktinem byla pozorována 30 minut po infekci podobně jako u MPyV. Kolokalizace VLPs s caveolinem1 byla zřetelná u Hel-299 buněk a to v obou časech, 20minut (Obr. 5.16) i 3 hodiny (Obr. 5.22) po adsorpci. Mnohem méně byla pozorována v myších 3T6 fibroblastech (Obr. 5.15, 5.21). Výskyt VLPs v časných endozómech byl sporadický, ale zřetelný v obou buněčných liniích (5.17, 5.18, 5.27 a 5.28). Totéž platí o kolokalizaci s markerem pozdních endozómů Lamp2 (5.19, 5.20., 5.25, 5.26)) a ER (Obr. 5.23, 5.24). V dalších pokusech bude nutno optimalizovat množství částic na buňku a také časy po pseudoinfekci, ve kterých budou kolokalizace jednotlivých markerů s VLPs sledovány.



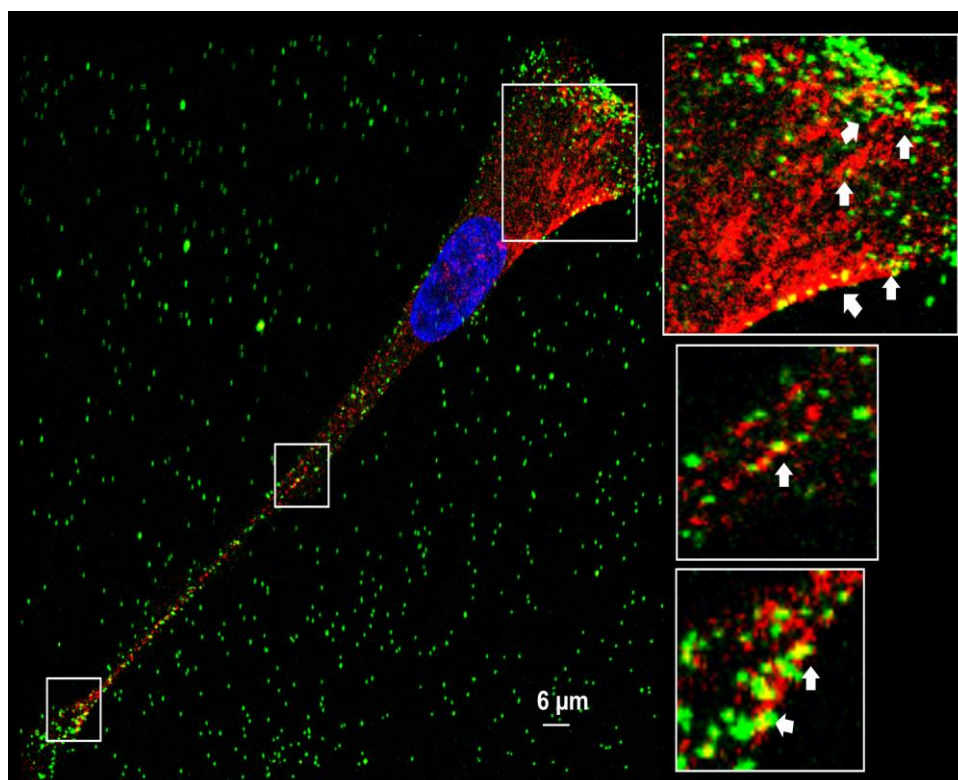
Obr. 5.13. Konfokální řez 3T6 buňkou 30 minut po adsorpci VLPs. DNA jádra modře (DAPI), VP1 VLPs MCPyV zeleně, aktin červeně. Místa kolokalizace(žlutá) jsou zvýrazněna ve výřezech šipkami.



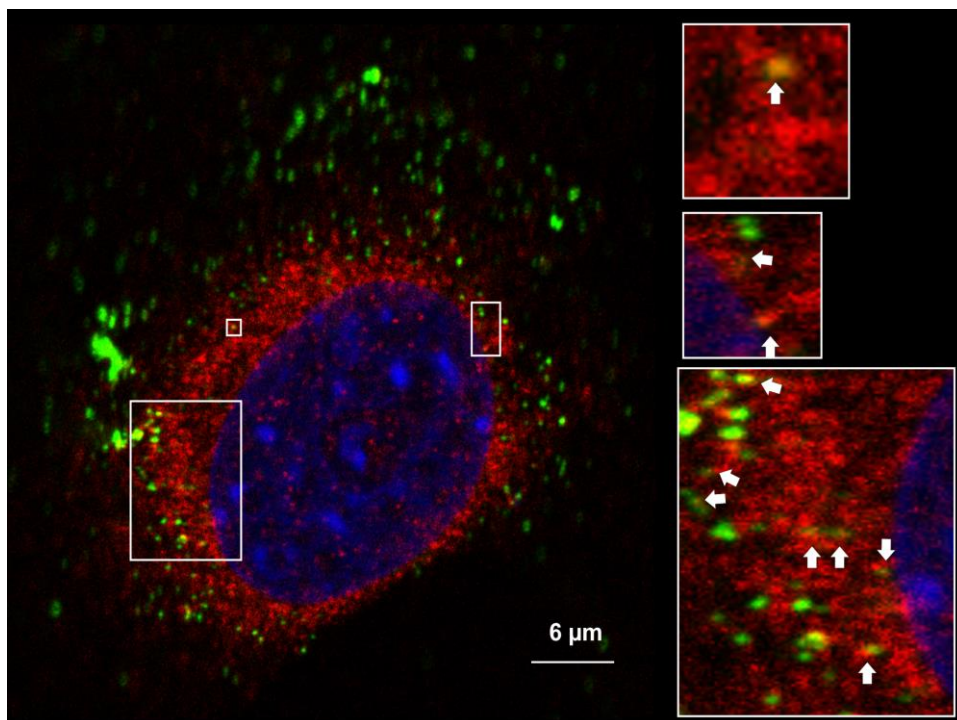
Obr. 5.14. Konfokální řez HEL299 buňkou 30 minut po adsorpci VLPs. DNA jádra modře (DAPI), VP1 VLPs MCPyV zeleně, aktin červeně. Místa kolokalizace(žlutá) jsou zvýrazněna ve výřezech šipkami.



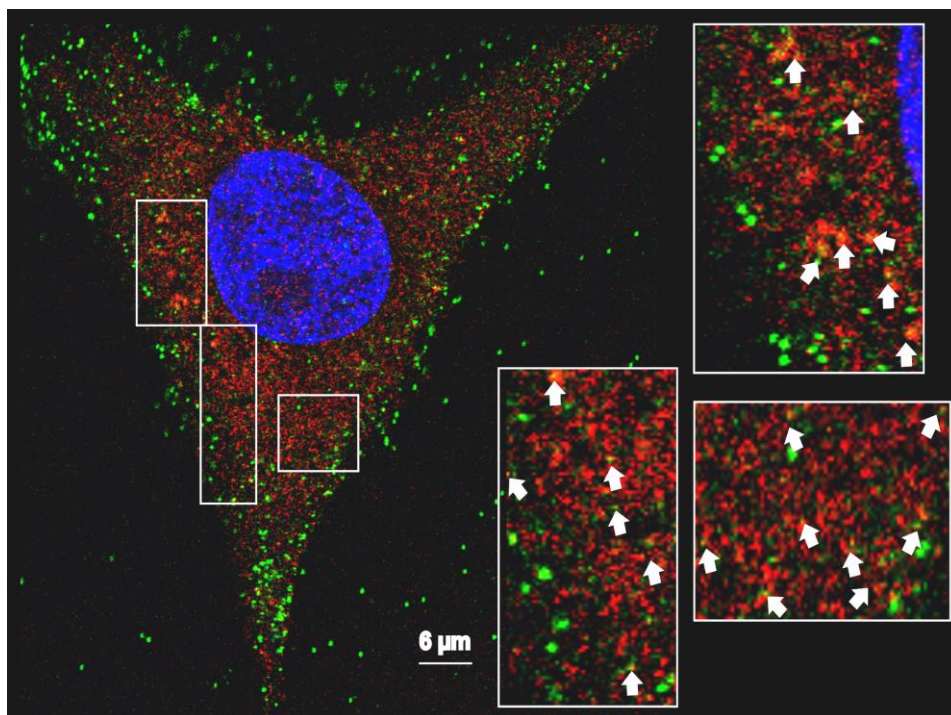
Obr. 5.15. Konfokální řez 3T6 buňkou 20 minut po adsorpci VLPs. DNA jádra modře (DAPI), VP1 VLPs MCPyV zeleně, *caveolin-1* červeně. Místa kolokalizace(žlutá) jsou zvýrazněna ve výřezech šipkami



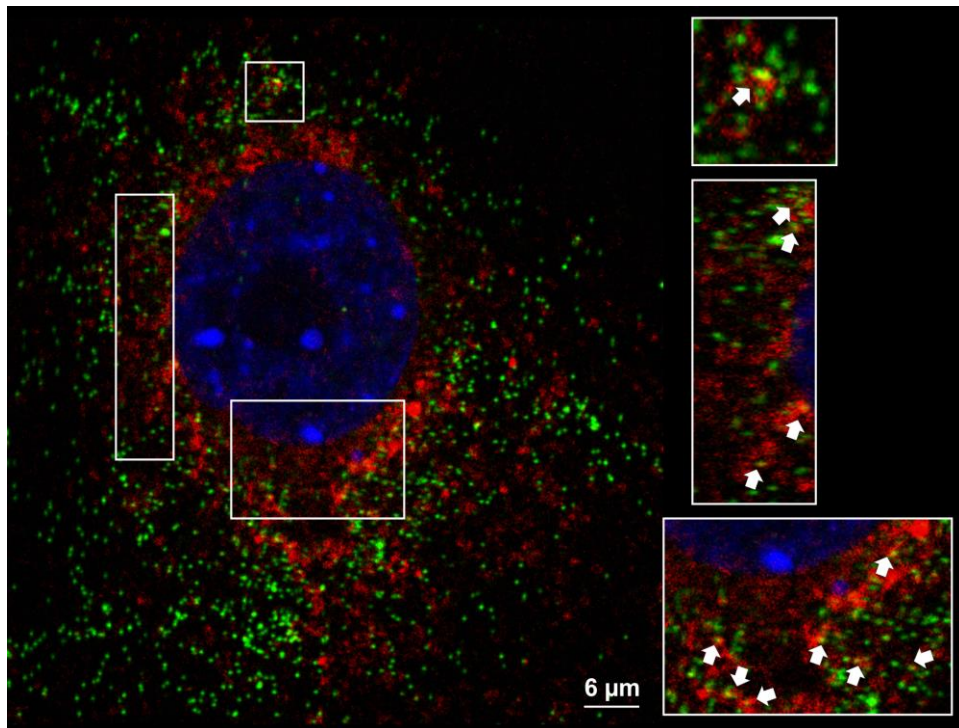
Obr. 5.16. Konfokální řez HEL299 buňkou 20 minut po adsorpci VLPs. DNA jádra modře (DAPI), VP1 VLPs MCPyV zeleně, *caveolin-1* červeně. Místa kolokalizace(žlutá) jsou zvýrazněna ve výřezech šipkami



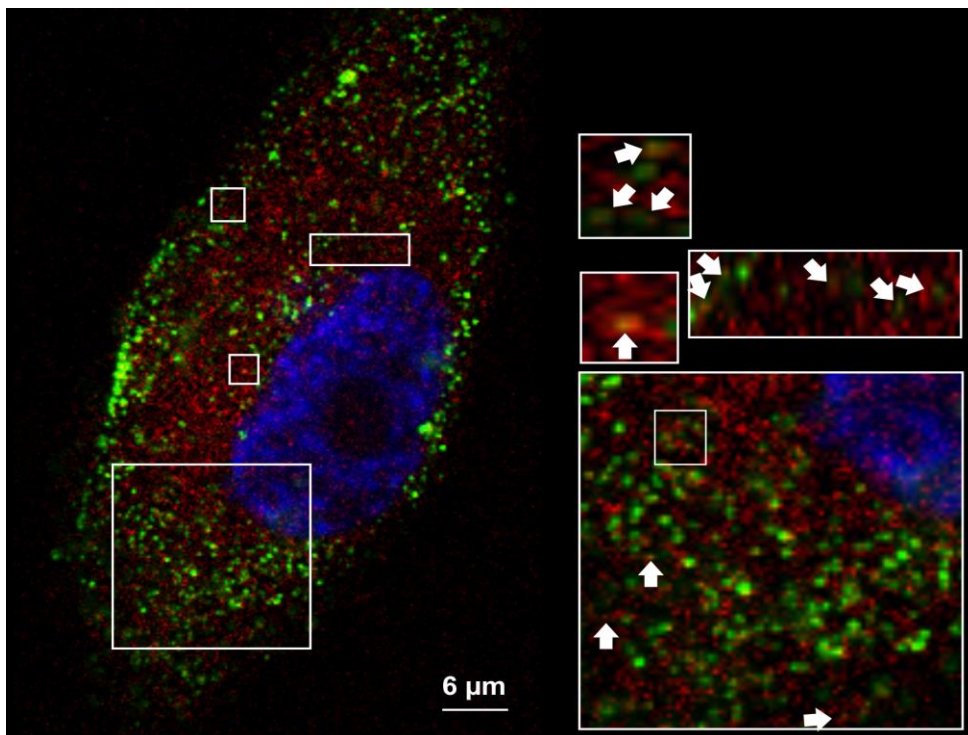
Obr. 5.17. Konfokální řez 3T6 buňkou 20 minut po adsorpci VLPs. DNA jádra modře (DAPI), VP1 VLPs MCPyV zeleně, EEA1 (marker časného endozómu) červeně. Místa kolokalizace(žlutá) jsou zvýrazněna ve výřezech šipkami



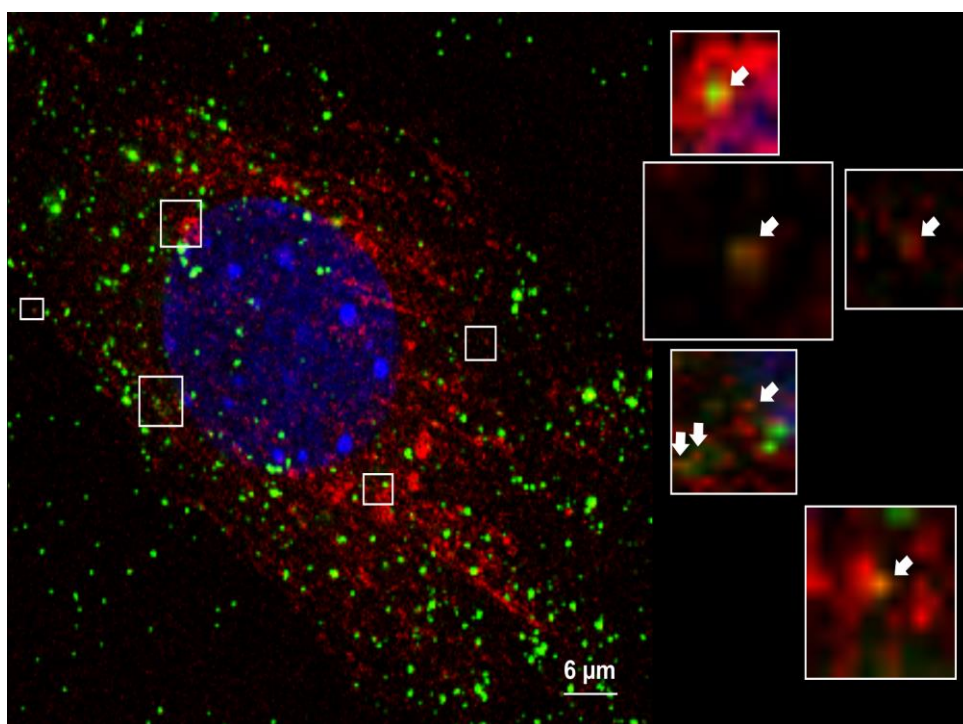
Obr. 5.18. Konfokální řez HEL299 buňkou 20 minut po adsorpci VLPs. DNA jádra modře (DAPI), VP1 VLPs MCPyV zeleně, EEA1 (marker časného endozómu) červeně. Místa kolokalizace(žlutá) jsou zvýrazněna ve výřezech šipkami



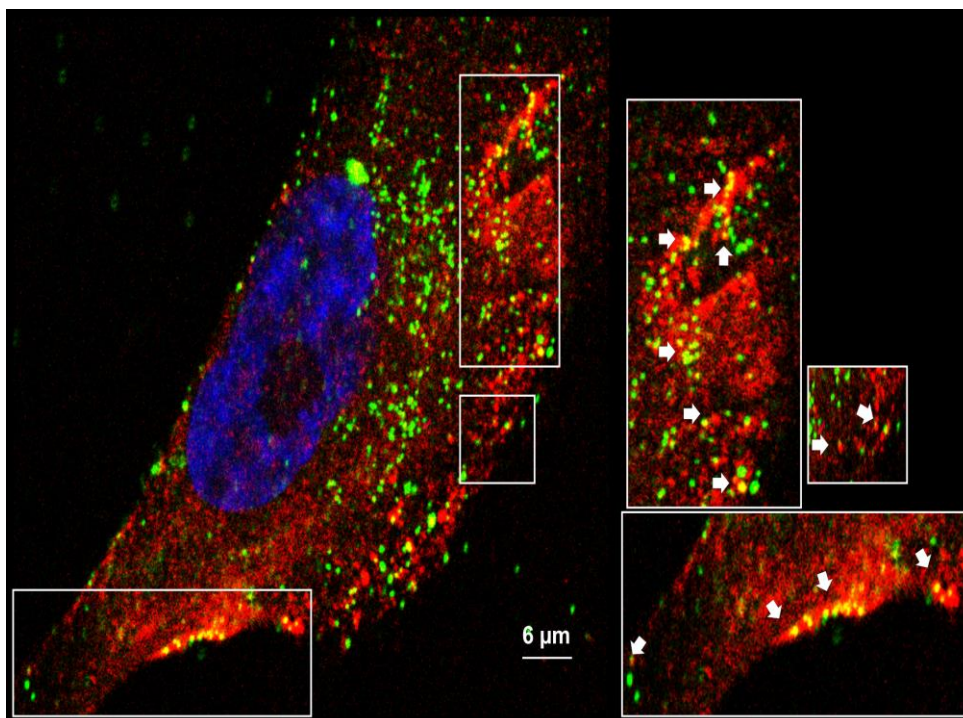
Obr. 5.19. Konfokální řez buňkou 3T6 90 minut po adsorpci VLPs. DNA jádra modře (DAPI), VP1 VLPs MCPyV zeleně, LAMP2 (marker pozdního endozómu/lyzozómu) červeně. Místa kolokalizace (žlutá) jsou zvýrazněna ve výřezech šípkami.



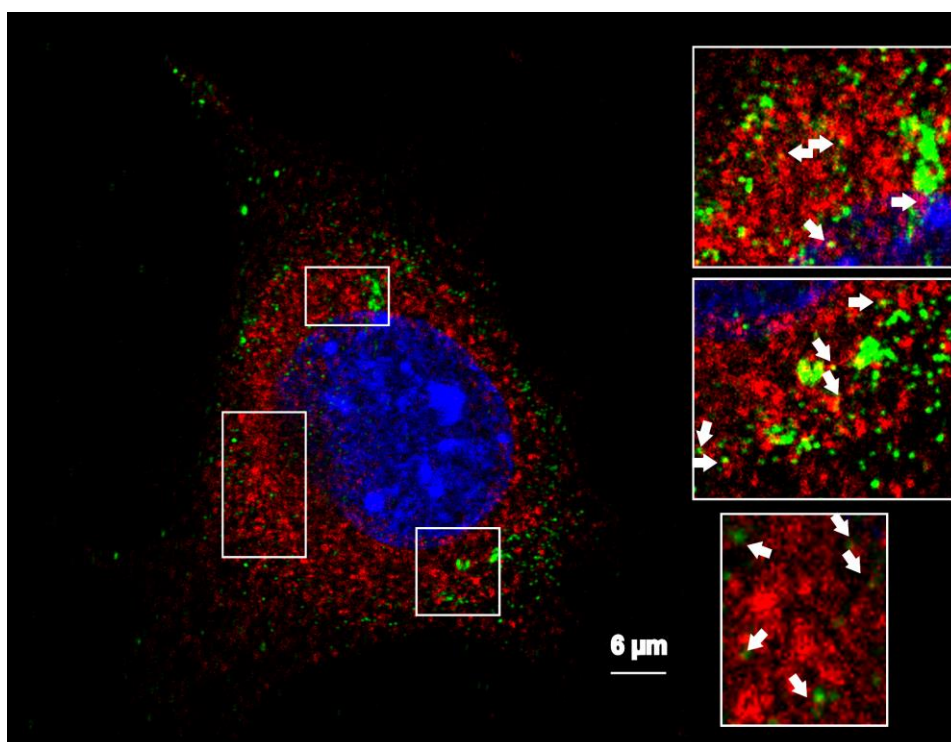
Obr. 5.20. Konfokální řez buňkou HEL 299 90 minut po adsorpci VLPs. DNA jádra modře (DAPI), VP1 VLPs MCPyV zeleně, LAMP2 (marker pozdního endozómu/lyzozómu) červeně. Místa kolokalizace (žlutá) jsou zvýrazněna ve výřezech šípkami.



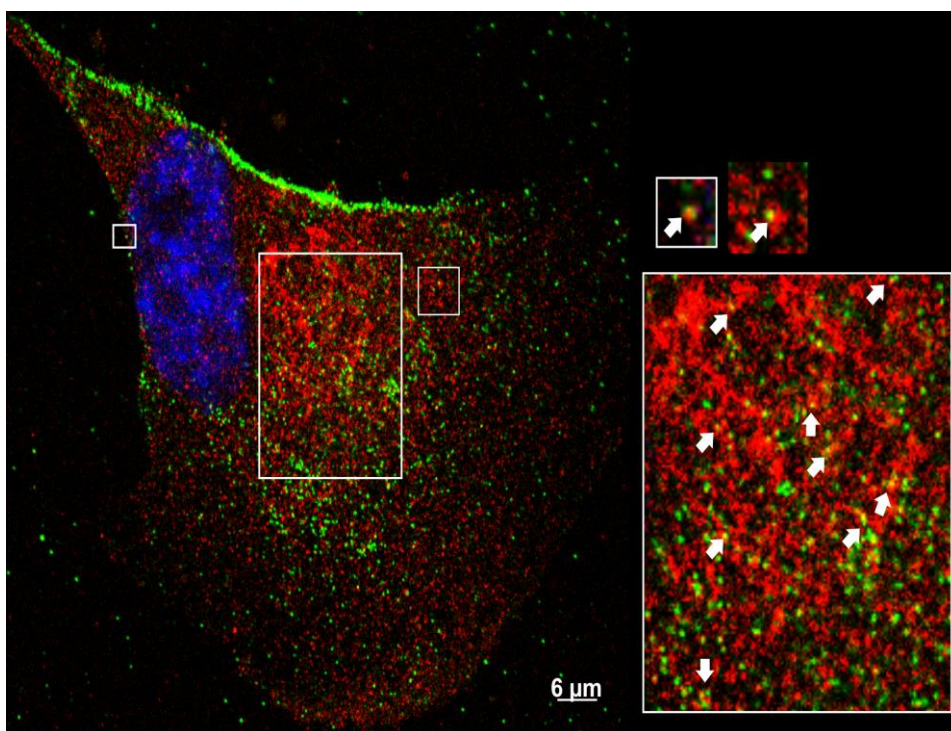
Obr. 5.21. Konfokální řez buňkou 3T6 3 hodiny po adsorpci VLPs. DNA jádra modře (DAPI), VP1 VLPs MCPyV zeleně, *caveolin-1* červeně. Místa kolokalizace (žlutá) jsou zvýrazněna ve výřezech šipkami.



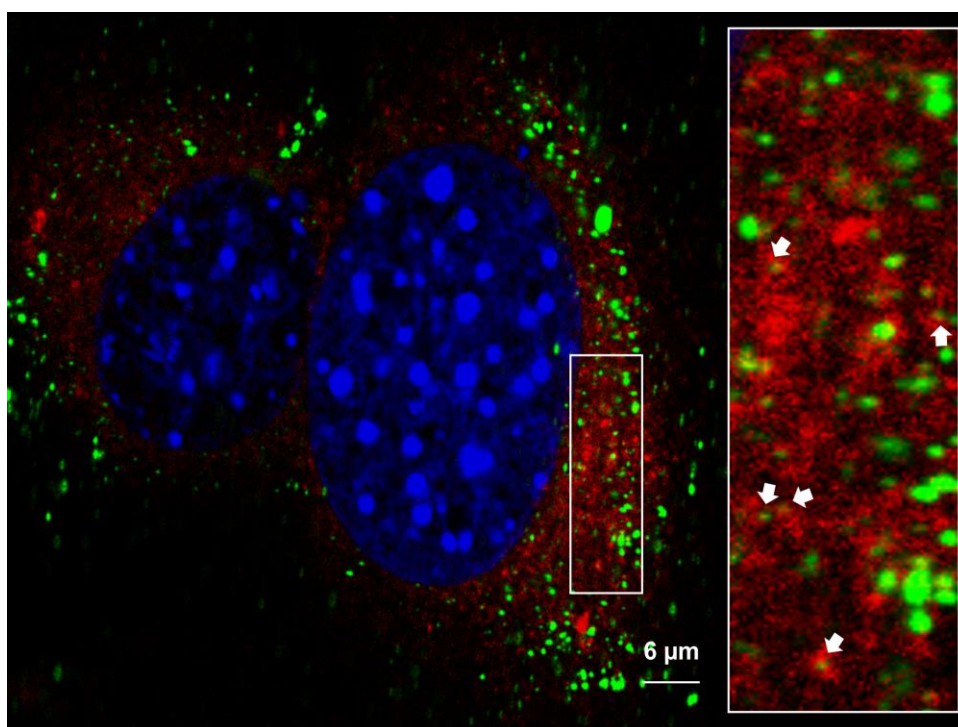
Obr. 5.22. Konfokální řez buňkou HEL 299 3 hodiny po adsorpci VLPs. DNA jádra modře (DAPI), VP1 VLPs MCPyV zeleně, *caveolin-1* červeně. Místa kolokalizace (žlutá) jsou zvýrazněna ve výřezech šipkami.



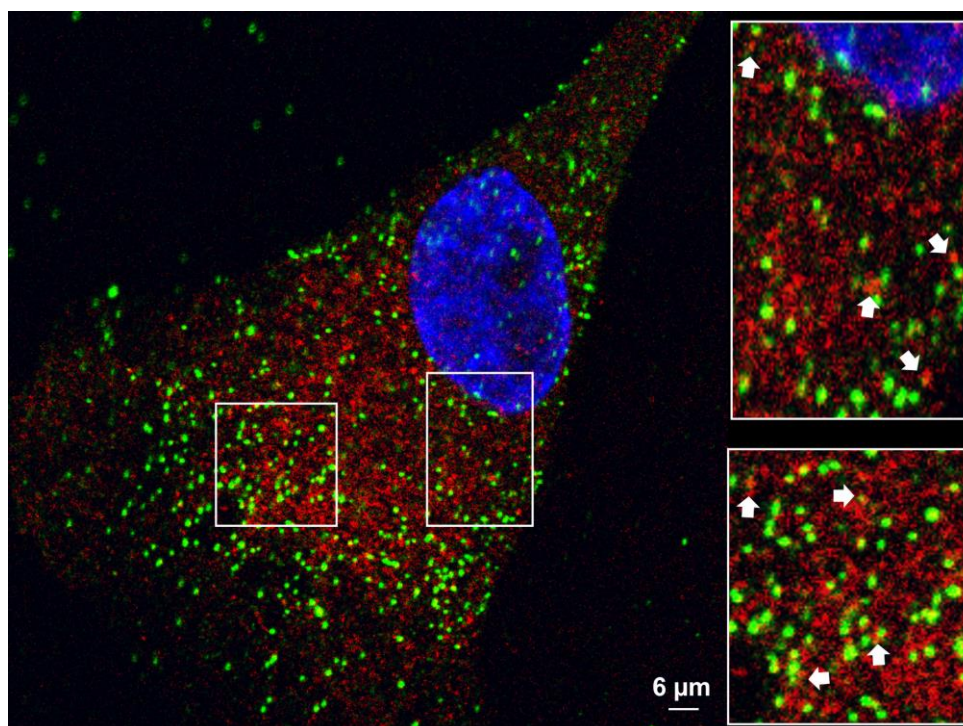
Obr. 5.23. Konfokální řez buňkou 3T6 3 hodiny po adsorpci VLPs. DNA jádra modře (DAPI), VP1 VLPs MCPyV zeleně, BiP (marker endoplazmatického retikula) červeně. Místa kolokalizace (žlutá) jsou zvýrazněna ve výřezech šipkami.



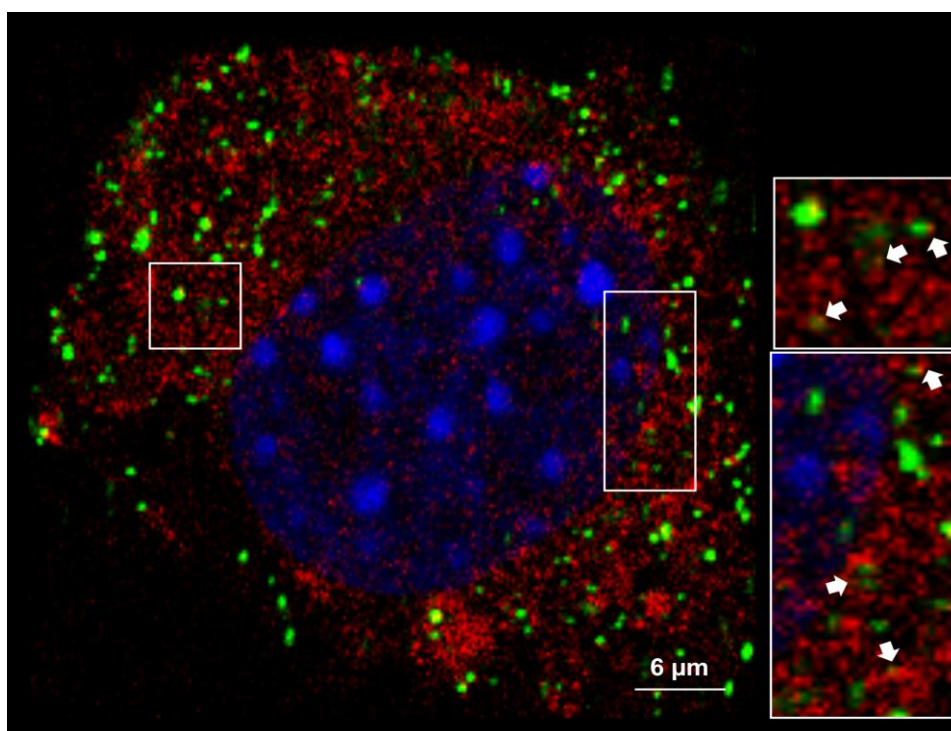
Obr. 5.24. Konfokální řez buňkou HEL 299 3 hodiny po adsorpci VLPs DNA jádra modře (DAPI), VP1 VLPs MCPyV zeleně, BiP (marker endoplazmatického retikula) červeně. Místa kolokalizace (žlutá) jsou zvýrazněna ve výřezech šipkami.



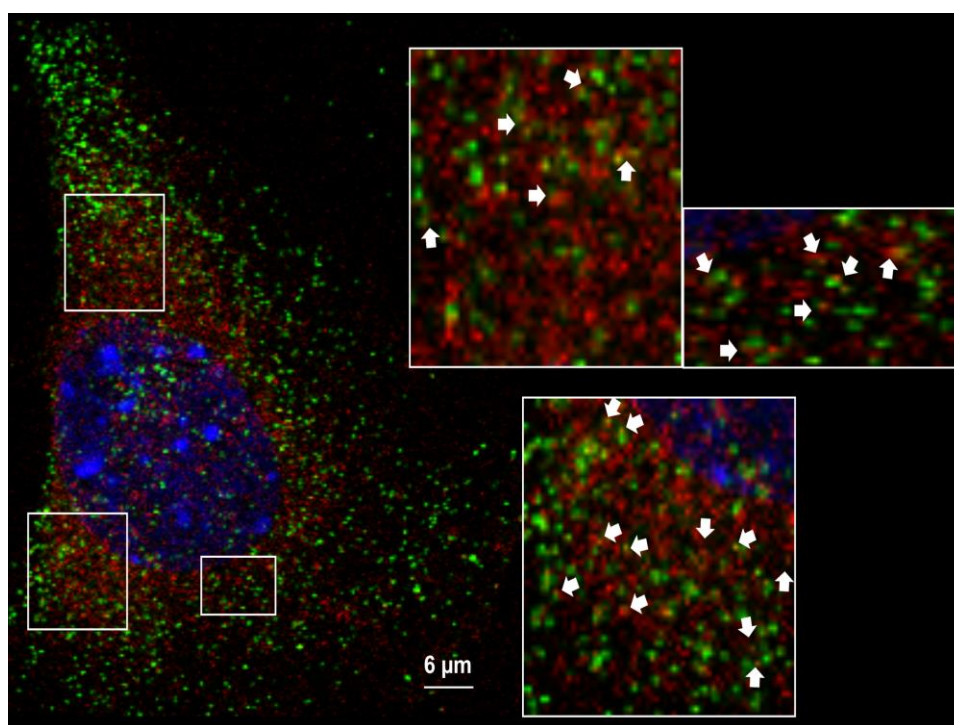
Obr. 5.25. Konfokální řez buňkou 3T6 3 hodiny po adsorpci VLPs. DNA jádra modře (DAPI), VP1 VLPs MCPyV zeleně, LAMP2 (marker pozdního endozómu/lyzozómu) červeně. Místa kolokalizace (žlutá) jsou zvýrazněna ve výřezech šipkami.



Obr. 5.26. Konfokální řez buňkou HEL 299 3 hodiny po adsorpci VLPs. DNA jádra modře (DAPI), VP1 VLPs MCPyV zeleně, LAMP2 (marker pozdního endozómu/lyzozómu) červeně. Místa kolokalizace (žlutá) jsou zvýrazněna ve výřezech šipkami.



Obr. 5.27. Konfokální řez buňkou 3T6 60 minut po adsorpci VLPs. DNA jádra modře (DAPI), VP1 VLPs MCPyV zeleně, EEA1 (marker časného endozómu) červeně. Místa kolokalizace (žlutá) jsou zvýrazněna ve výřezech šipkami.



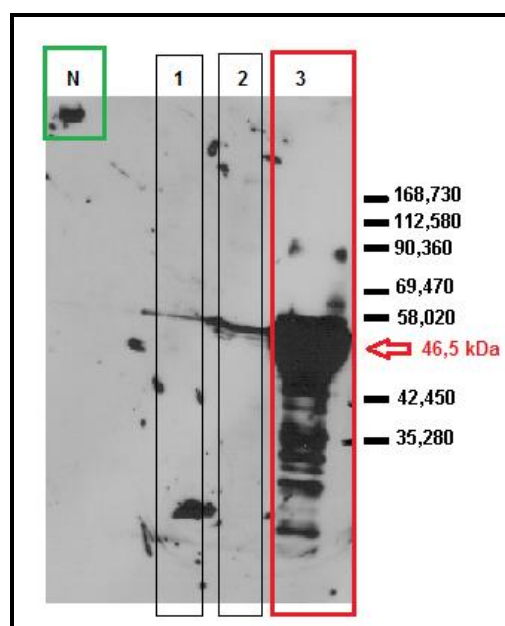
Obr. 5.28. Konfokální řez buňkou 3T6 3 hodiny po adsorpci VLPs. DNA jádra modře (DAPI), VP1 VLPs MCPyV zeleně, EEA1 (marker časného endozómu) červeně. Místa kolokalizace (žlutá) jsou zvýrazněna ve výřezech šipkami.

5.1.8 PŘÍPRAVA POLYKLONÁLNÍ PROTILÁTKY PROTI DENATUROVANÉMU PROTEINU VP1 MCPyV

Monoklonální protilátka proti VP1 proteinu polyomaviru karcinomu Merkelových buněk, jejíž příprava je popsána v této DP, není použitelná pro detekci proteinů metodou Western blot. Tato protilátka nerozeznává sekvenční, ale pouze konformační epitop VP1, Proto VP1 vystavený denaturačním podmínkám (metoda Western Blot, SDS PAAGE) není touto protilátkou detekovatelný. Z tohoto důvodu započala také příprava protilátky, ve které byl jako antigen pro imunizaci použitý denaturovaný VP1. Příprava této protilátky momentálně probíhá. Protože získání monoklonální protilátky bývá časově náročné, tak byla v rámci této DP během její přípravy připravena také její polyklonální varianta.

Antigen VP1 VLPs MCPyV, jehož příprava je popsána v kapitole 4.2.10 byl denaturován, tzn., že na každou imunizační dávku bylo 50 µg VP1 VLPs doplněno Laemliho pufrem a vystaveno po dobu 10 minut 100 °C. Imunizace myši proběhla dle protokolu v kapitole 4.2.11., jen s tím rozdílem, že testování séra metodou Dot blot po druhé dávce antigenu bylo nahrazeno metodou Western blot. SDS PAAGE i Western blot byly provedeny dle protokolů kapitol 4.2.14 a 4.2.15. Na gel byly nanесeny denaturované VP1 VLPs, lyzát SF9 neinfikovaných buněk a lyzát divokého typu bakuloviru. Do rohu nitrocelulózové membrány byl před přenosem separovaných proteinů nakapán vzorek nativních VP1 VLPs. Membrána byla vysycena a inkubována se 100x ředěným sérem (jako primární protilátka při imunodetekci na membráně) odebraným imunizované myši Jako sekundární protilátka byla užitá kozí protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou.

Jak je vidět na obrázku 5.30, tak protilátka v séru myši rozpoznává denaturovaný i nativní VP1 protein. V oblasti odpovídající cca 46,5 kDa je detekován VP1 protein. Proužky s vyšší elektroforetickou mobilitou odpovídají patrně degradátům VP1. Slabý proužek velikostí odpovídající proteinu VP1 v negativních kontrolách (Obr. 5.30, dráha 1 a 2) je zjevně materiál přeteklý z dráhy 3. Na základě pozitivního výsledku imunizace, byla myši podána poslední dávka denaturovaného antigenu, třetí den po aplikaci byla myš usmrcena a byla jí odebrána veškerá krev. „Plná“ krev byla ponechána po dobu cca 2 hodin při 4 °C, aby tak došlo k sedimentaci krevních elementů. Poté byla krev centrifugována při 4 °C. Sérum nad sedimentem bylo odebráno a uloženo do -20 °C. Alikvot byl uložen při 4 °C.



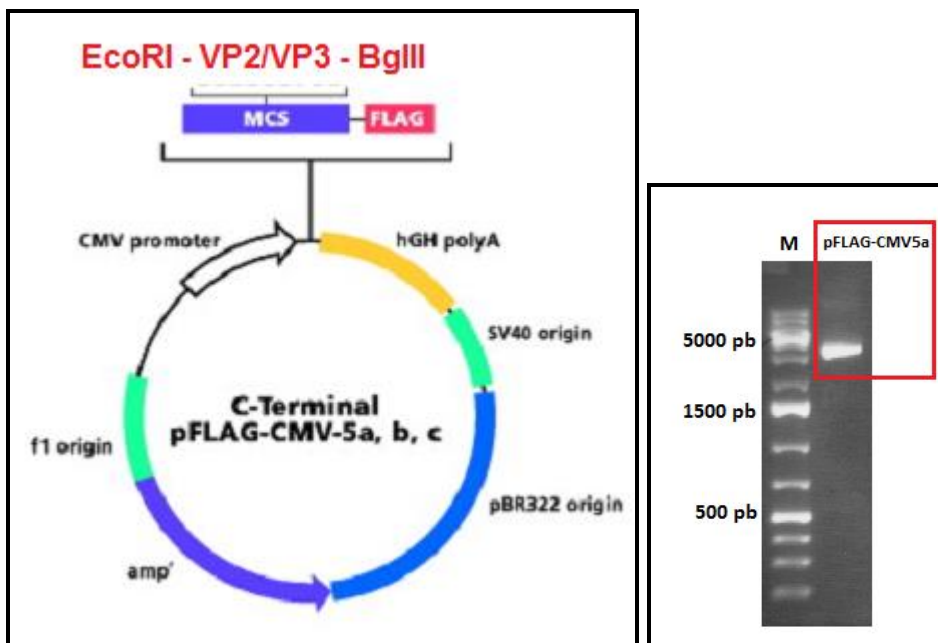
Obr. 5.30. Testování séra imunizované myši denaturovaným antigenem VP1 MCPyV. Odebrané sérum bylo 100x ředěno a aplikováno jako primární protilátka pro imunologickou detekci metodou Western blot. Lyzát neinfikovaných SF9 buněk (dráha 1), lyzát buněk infikovaných divokým typem bakuloviru (dráha 2), VP1 MCPyV (dráha 3, červené ohraničení). Do rohu membrány byl nanesen nativní antigen v podobě VP1 VLPs (N, ohraničení zeleně).

5.2 KONSTRUKCE EXPRESNÍCH VEKTORŮ PRO PRODUKCI MINORITNÍCH STRUKTURNÍCH PROTEINŮ MCPyV FŮZOVANÝCH S EPITOPEM FLAG PRO STUDIUM INTERAKCÍ S BUNĚČNÝMI STRUKTURAMI

Protilátka namířená proti minoritním strukturním proteinům VP2 a VP3 MCPyV je stále v procesu přípravy. Proto dalším cílem této diplomové práce bylo vytvořit expresní vektory pro produkci minoritních proteinů fúzovaných s epitopem FLAG (VP2-FLAG a VP3-FLAG) v savčích buňkách. FLAG je 8 aminokyselinová sekvence, proti níž je dostupná komerční protilátka. Bude tak možno sledovat vlastnosti těchto proteinů při jejich produkci v buňkách.

5.2.1 KONSTRUKCE EXPRESNÍCH VEKTORŮ VP2-FLAG A VP3-FLAG

Pro práci byl zvolen expresní vektor pFLAG-CMV5a (obr. 5.31.), který má za klonovacím místem vloženou sekvenci FLAG. Exprese vkládaného genu je řízena CMV promotorem. Restriční místa EcoRI a BglII v polylinkeru byla vybrána jako vhodná pro vložení sekvencí VP2 nebo VP3 genu.



Obr. 5.31. Schéma expresního plazmidu pFLAG-CMV5a a ověření jeho izolace. MCS značí polylinker, CMV - cytomegalovirový promotor. Červeně je naznačeno vložení sekvence VP2 a VP3 MCPyV prostřednictvím štěpných míst EcoRI a BglII. Upraveno a převzato z Sigma Aldrich. Na pravé straně je zobrazeno ověření izolovaného neštěpeného pFLAG-CMV5a na agarózové elektroforéze.

➤ NÁVRH PRIMERŮ PRO AMPLIFIKACI VP2 A VP3 Z VEKTORU ph2m

Prvním krokem konstrukce bylo navržení primerů pro amplifikaci. Primery bylo nutno obohatit o EcoRI a BglII restrikční místa, pro vložení do polylinkeru plazmidu pFLAG-CMV5a (Obr. 5.31). Jako templát pro PCR amplifikaci byl užit vektor ph2m (Obr. 5.32) získaný z Addgene (Ch. Buck). Tento vektor nese sekvenci VP2 MCPyV. Z této sekvence pak byla odvozena také sekvence VP3 proteinu (590 nukleotidů), protože VP3 je zkrácenou formou VP2 (725 nukleotidů). Navržené primery byly následující:

MerVP2_EcoRI_FW 5'- CAA GTA **GAA TTC** **ATGGGCGGGATCATTACCCTG**-3'

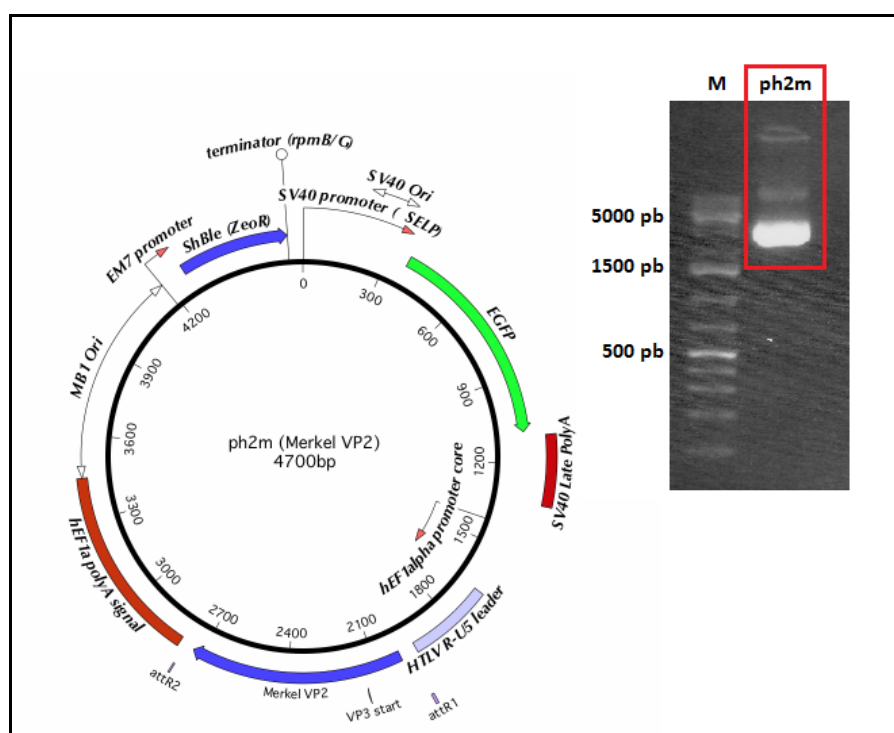
- „forward“ primer pro amplifikaci VP2 sekvence z plazmidu ph2m (komplementární část k ph2m je zeleně značená), obsahuje přídavné restrikční místo **EcoRI**

MerVP3_EcoRI_FW 5'- CAA GTA **GAA TTC** **ATGACCATCGAAGGCATCAGC**-3'

- forward primer pro amplifikaci VP3 sekvence z plazmidu ph2m (komplementární část k ph2m je značena zeleně), primer obsahuje restrikční místo **EcoRI**

MerVP2/3_BGLII_REV 5'- CAA GTA **AGA TCT AT** **GAGATGAATGATTGACTTCTTCTTTG**-3'

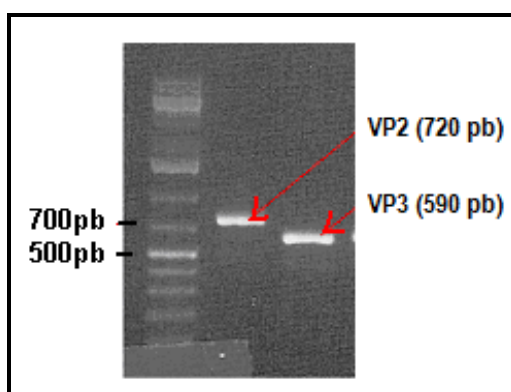
- reverzní primer společný pro amplifikaci sekvence VP2 i VP3 z plazmidu ph2m (komplementární část k ph2m je značena zeleně), primer nese restrikční místo **BglII**, modře jsou značeny dva vložené nukleotidy pro optimalizaci primeru.



Obr. 5.32. Schéma expresního plazmidu ph2m (Addgene, Ch. Buck) a ověření jeho izolace na elektroforéze. Schema převzato a upraveno z Addgene.

➤ AMPLIFIKACE A ŠTĚPENÍ SEKVENCÍ VP2 A VP3

PCR amplifikace proběhla podle protokolu uvedeného v kapitole (4.2.19.10). Templátem byl ph2m vektor, jako negativní kontrola byla užitá reakční směs, do které byla přidána sterilní H₂O místo templátu. Po PCR byly získané fragmenty ještě štěpeny EcoRI a BglII enzymy, přesráženy etanolem a před vlastní ligací znovu ověřeny na agarózové elektroforéze (Obr. 5.33.).



Obr. 5.33. PCR amplifikované a štěpené sekvence VP2 a VP3 odvozené z ph2m plazmidu. Ověření amplifikovaných a EcoRI a BglII štěpených VP2 (725 pb) a VP3 590 pb sekvencí z vektoru ph2m.

➤ **LIGACE VP2 A VP3 SEKVENCÍ DO pFLAG-CMV5a VEKTORU A ELEKTROPORACE**

Ligace VP2 a VP3 sekvencí do pFLAG-CMV5a byla provedena podle protokolu v kapitole

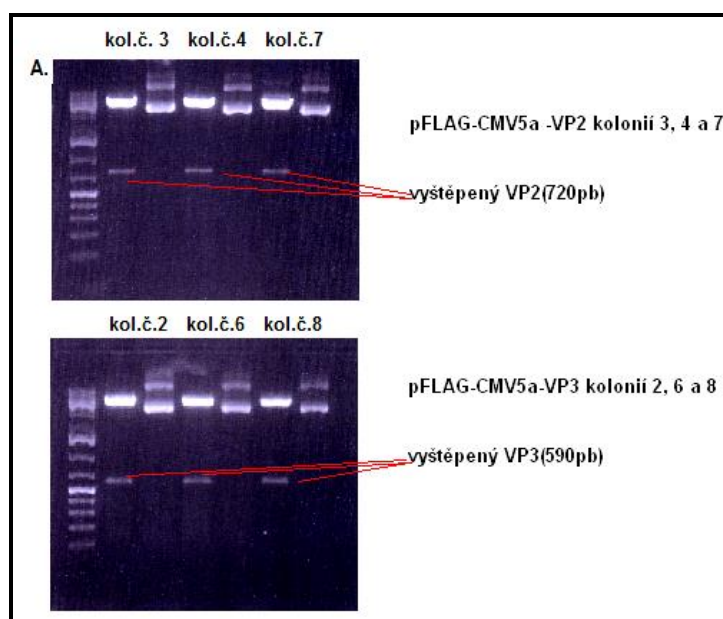
4.2.19.9. Ligační směsi byly složeny z

- 200 ng štěpeného, přečištěného a defosforylovaného pFLAG-CMV5a
- 75 ng štěpeného a přečištěného VP2 či VP3
- ligačního pufru
- sterilní H₂O

Elektroporace byla provedena na buňkách linie 3T3 dle protokolu uvedeného v kapitole 4.2.18.3. Transformované bakterie byly vysety na misky s živným agarem obsahujícím ampicilin (pFLAG-CMV5a nese rezistenci na ampicilin) a inkubovány přes noc při 37 °C.

5.2.2 OVĚŘENÍ KOLONIÍ PO ELEKTROPORACI – MINIPREPARACE, IZOLACE „ENDOFREE“, ŠTĚPENÍ EcoRI A BglII A SEKVENACE

Po elektroporaci bylo vybráno několik monoklonií, ze kterých byly ověřeny plazmidy specifickým štěpením EcoRI a BglII enzymy (zpětně měla být vyštěpena vkládaná sekvence kódující minoritní protein). Štěpením plazmidů oběma enzymy vznikly fragmenty o velikostech VP2 (725pb) či VP3 (590pb). Ověření nejprve proběhlo po minipreparaci DNA (kapitola 4.2.19.5). Na základě výsledku minipreparace pak byly vybrány od každého konstruktu tři pozitivní kolonie, které pak byly přeočkovány a izolovány „miniizolačním“ kitem „endotoxin-free“ (kapitola 4.2.19.2). Izolované plazmidy z kolonií byly poté znovu ověřeny stejným štěpením jako po minipreparaci (Obr. 5.34) a osekvenovány. Z bakteriálních kolonií, které měly sekvenováním ověřené plazmidy, byly vytvořeny konzervy a uloženy do -80 °C. Pro další práci byla použita kolonie č. 7 nesoucí VP2-pFLAG-CMV5a, kolonie č. 2 nesoucí VP3-pFLAG-CMV5a.



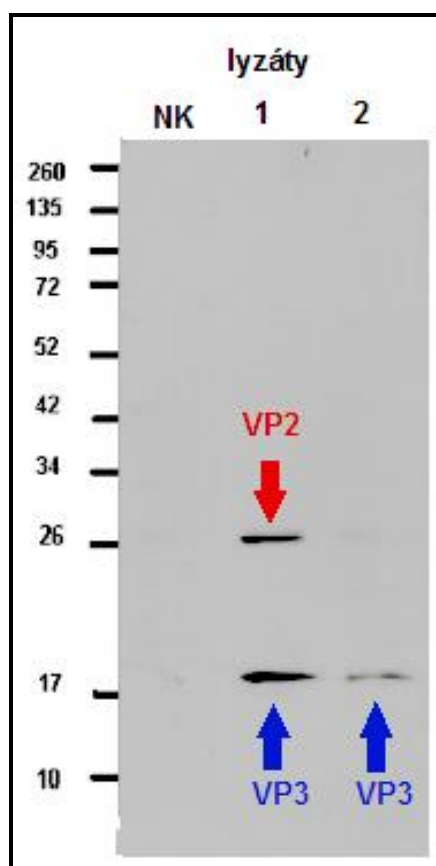
Obr. 5.34. Ověření vybraných monoklonií (po elektroporaci) štěpením na přítomnost VP2-pFLAG-CMV5a a VP3-pFLAG-CMV5a. Obrázek A. Horní část gelu: VP2-pFLAG-CMV5a izolované z vybraných kolonií 3, 4 a 7 buď štěpené BglII a EcoRI (vždy první sloupec na gelu z dané dvojice) nebo neštěpené (vždy druhý sloupec na gelu z dané dvojice). Vyštěpený fragment z vektoru VP2-pFLAG-CMV5a každé štěpené kolonie odpovídá velikosti VP2 fragmentu (720pb). Dolní část gelu: VP3-pFLAG-CMV5a izolované z vybraných kolonií 2, 6 a 8 štěpené BglII a EcoRI (vždy první sloupec) a neštěpené (druhý sloupec). Vyštěpený fragment z vektoru VP3-pFLAG-CMV5a každé kolonie odpovídá velikosti VP3 fragmentu (590pb).

5.2.3 STUDIUM LOKALIZACE MINORITNÍCH PROTEINŮ VP2 A VP3 MCPyV V 3T3 MYŠÍCH FIBROBLASTECH

Proces transfekce proběhl dle protokolu uvedeného v kapitole 4.2.6. Byly provedeny celkem tři transfekce: transfekce konstruktem VP2-pFLAG-CMV5a, VP3-pFLAG-CMV5a a pFLAG-CMV5a (plazmid bez insertu jako negativní kontrola). Na každou transfekci bylo užito $4 \cdot 10^6$ 3T3 myších fibroblastů. K buňkám bylo přidáno po 6 μg plazmidové DNA a 100 μl transfekčního roztoku. Po transfekci (systém Amaxa) byly buňky vysety po cca 30 μl na sklíčko a v termostatu ponechány po dobu 4,5 hodiny a 21 hodin, pak byly fixovány a zpracovány metodou nepřímé imunofluorescence (kapitola 4.2.9), dále viz podkapitola: Studium lokalizací konfokální mikroskopií. Zbytek suspenze byl vyset na jednu jamku z 6-jamkové desky a tyto buňky byly sklizeny po 21 hodinách, lyzovány a lyzát elektroforezován na SDS PAGE (protokol v kapitole 4.2.14). Separované proteiny byly analyzovány metodou Western blot (protokol v kapitole 4.2.15).

➤ KONTROLA PRODUKCE PROTEINŮ V BUŇCE METODOU WESTERN BLOTU

Pro kontrolu produkce proteinu v transfekovaných buňkách byly vytvořeny z části transfekovaných buněk lyzáty. K buněčnému peletu bylo přidáno 100 μ l RIPA pufru s 3 μ l PMSF, resuspendováno a ponecháno inkubovat 20 minut na ledu. Buněčná směs byla sonikována ručním sonikátorem. Po inkubaci byl lyzát centrifugován 20min při 4 °C a 20 000 g. Získaný supernatant byl uložen do -20 °C. SDS PAAGE elektroforéza a Western blot (Obr. 5.35.) byly provedeny dle protokolů uvedených v kapitole 4.2.14 a 4.2.15. Lyzáty byly naneseny na 15% SDS PAAGE gel (v kapitole metody je uveden jinak používaný 10% gel) po cca 30 μ l. Pro imunoanalýzu byla užita králičí polyklonální protilátka namířenou proti ESC (FLAG) v ředění 1:5000 (Rb α ESC), jako sekundární protilátka byla užita kozí protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s HRP (GaRbPx.). U lyzátu VP2-pFLAG-CMV5a byl detekován proužek odpovídající mobilitou velikosti proteinu cca 26 kDa, což odpovídá velikosti VP2-FLAG [VP2 (25kDa) + epitop FLAG (1kDa)]. U tohoto lyzátu byl také detekován proužek odpovídající cca 22 kDa - pravděpodobně se jedná o protein VP3, který je syntetizován z vnitřního ATG sekvence VP2 proteinu. U lyzátu VP3-pFLAG-CMV5a byl detekován proužek na úrovni 22 kDa, který odpovídá proteinu VP3-FLAG [VP3 (21 kDa), epitop FLAG (1kDa)]. Vše je zobrazeno na obr. 5.35.



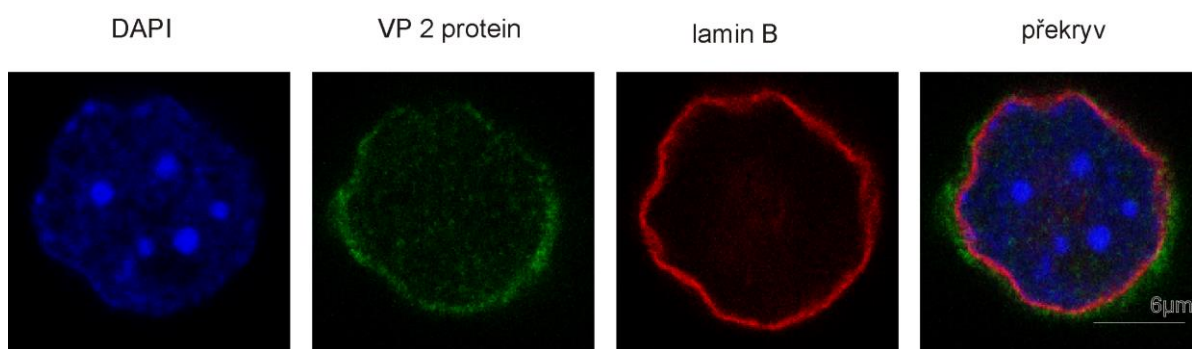
Obr. 5.35. Ověření produkce fúzaných minoritních proteinů metodou Western blot. Lyzáty 3T3 fibroblastů 21hodin po transfekci, použité protilátky: Rb α ESC (1:5000) proti epitopu FLAG a G α RbPx (1:1000). NK (pFLAG-CMV5a), 1. lyzát VP2-pFLAG-CMV5a , 2. lyzát VP3-pFLAG-CMV5a. U lyzátu 1. a 2. detekován signál odpovídající cca 22kDa (VP3-FLAG), u lyzátu 1.1 také detekován signál odpovídající 26 kDa (VP2-FLAG).

➤ VLASTNÍ STUDIUM LOKALIZACÍ KONFOKÁLNÍ MIKROSKOPIÍ

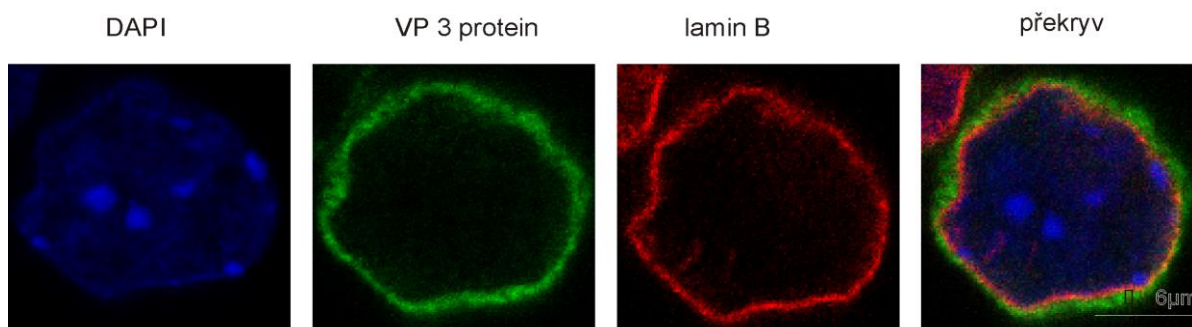
Pro studium lokalizací minoritních proteinů bylo využito konstruovaných expresních vektorů VP2/VP3-pFLAG-CMV5a, kterými byly transfekovány buňky myších fibroblastů linie 3T3 . Transfekce a následná metoda nepřímé imunofluorescence byly provedeny dle protokolů v kapitolách 4.2.6 a 4.2.9. Při imunofluorescenci bylo užito králičí polyklonální protilátky namířené proti sekvenci ECS (FLAG) - protilátka byla po naředění vysycena 1 hodinu na fixovaných 3T3 buňkách pro snížení jejich nespecifických vazeb na buňky. Jako sekundární protilátka byla užita kozí protilátka proti králičím imunoglobulinům konjugovaná s Alexa Fluor 488 (proteiny VP2-FLAG a VP3-FLAG tedy značeny zeleně). Buněčné struktury byly vždy značeny červeně: jaderný lamin B (kozí protilátka proti laminu B, oslí protilátka proti kozím imunoglobulinům konjugovaná s Alexa Fluor 546), dále BiP jako marker

endoplazmatického retikula (králičí protilátka proti BiP/Grp78, kozí protilátka proti králičím imunoglobulinům konjugovaná s Alexa Fluor 546) a histon H1 (myší polyklonální protilátka proti histonu H1, Cy3 protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s Alexa Fluor 546)

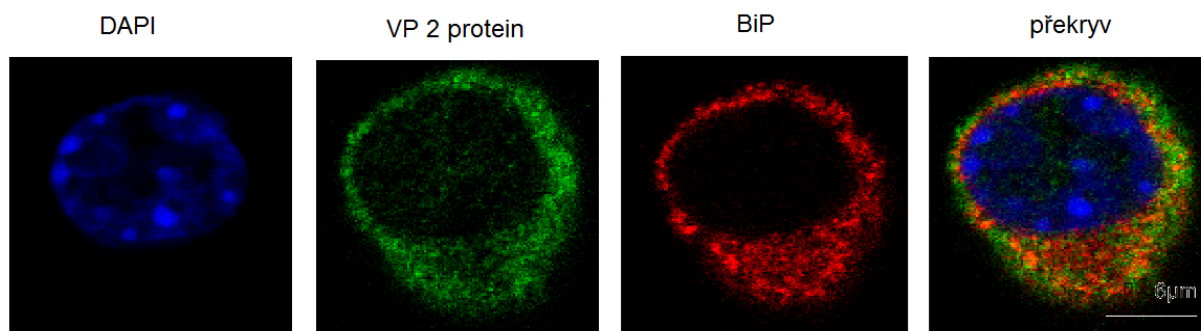
Konfokální analýza lokalizace minoritních proteinů v buňce ukázala, že VP2 se nachází převážně v cytoplasmě, i když malou část je možno detekovat v jádře (lépe patrné na obr. 5.38). VP3 zůstává v cytoplasmě (obr. 5.39). Ani u jednoho z proteinů nebyla pozorována kolokalizace s jaderným obalem (laminem B) (Obr. 5.36 a 5.37). Byla pozorována částečná kolokalizace obou virových proteinů s proteinem BiP - markerem endoplazmatického retikula (obr. 5.38 a 5.39). Vazba obou proteinů na vnitrobuněčné membrány však nebyla zdaleka tak přesvědčivá jak tomu je u VP2 a VP3 myšího polyomaviru (*Huerfano et al. 2010*). Nebyl rovněž pozorován výrazný cytotoxický efekt přítomnosti obou minoritních proteinů MCPyV v buňce. Histon H1, který při poškození jaderné membrány translokuje do cytoplazmy, kde je rychle degradován, si v buňkách produkujících VP2 nebo VP3 MCPyV zachovával jadernou lokalizaci 4 hod ale i 21 hodin po transfekci (obr. 5.40 – 5.43) Je tedy patrné, že minoritní strukturní proteiny MCPyV jsou výrazně méně cytotoxické než jak je tomu v případě MPyV.



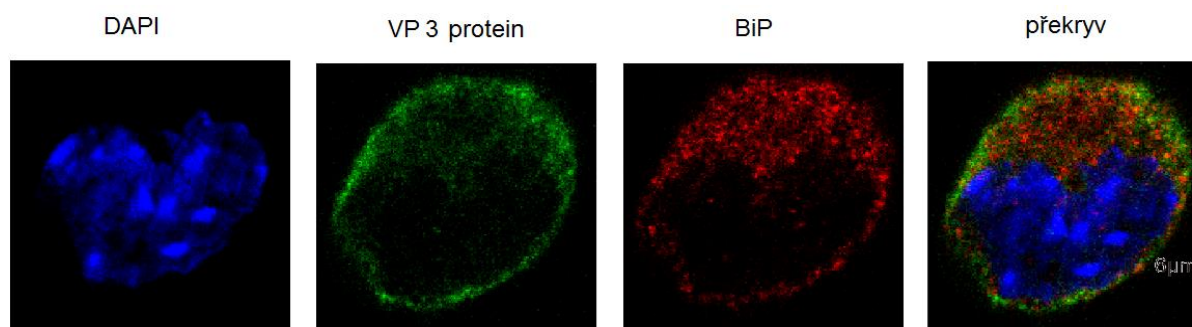
Obr. 5.36. Studium kolokalizace VP2 proteinu s laminem B v buňkách 3T3 (transfekce VP2-pFLAG-CMV5a,) 4,5 hod. po transfekci. DNA jádra modře (DAPI), VP2 protein zeleně, laminB červeně.



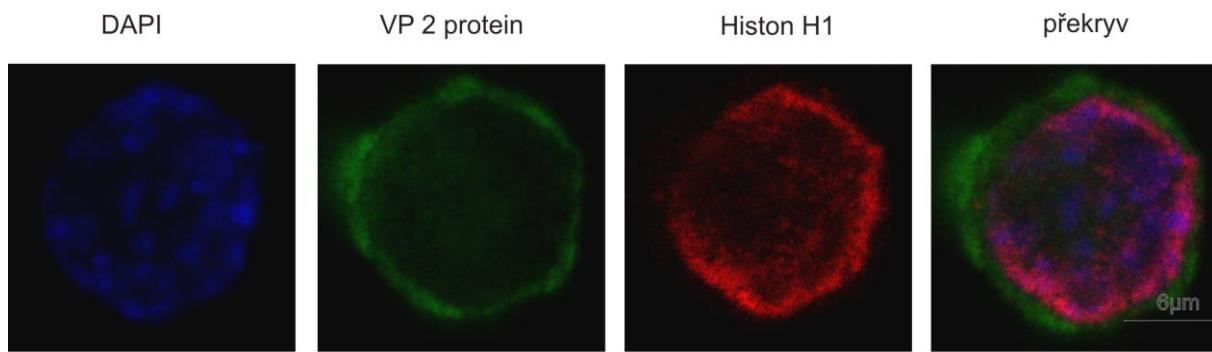
Obr. 5.37. Studium kolokalizace VP3 proteinu s laminem B v buňkách 3T3 (transfekce VP3-pFLAG-CMV5a) 4,5 hod. po transfekci. DNA jádra modře (DAPI), VP3 protein zeleně, laminB červeně



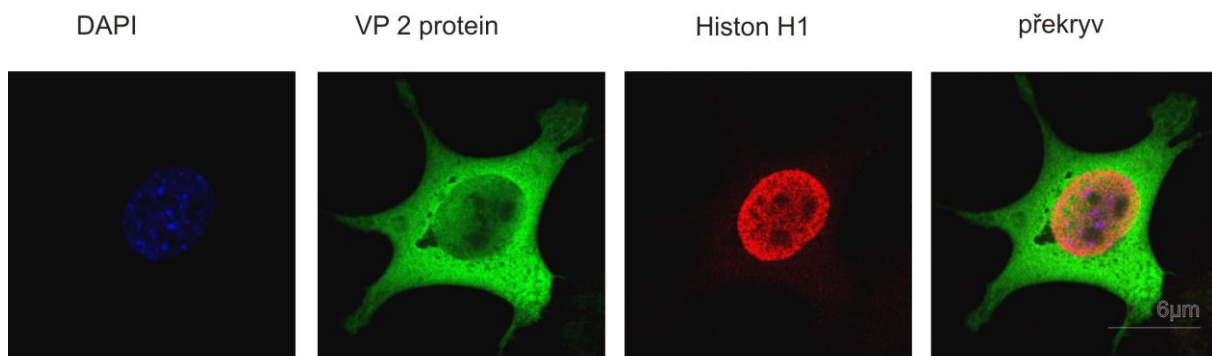
Obr. 5.38. Studium kolokalizace VP2 proteinu s BiP v buňkách 3T3 (transfekce VP2-pFLAG-CMV5a,) 4,5 hod. po transfekci. DNA jádra modře (DAPI), VP2 protein zeleně, BiP červeně Místa kolokalizace žlutá



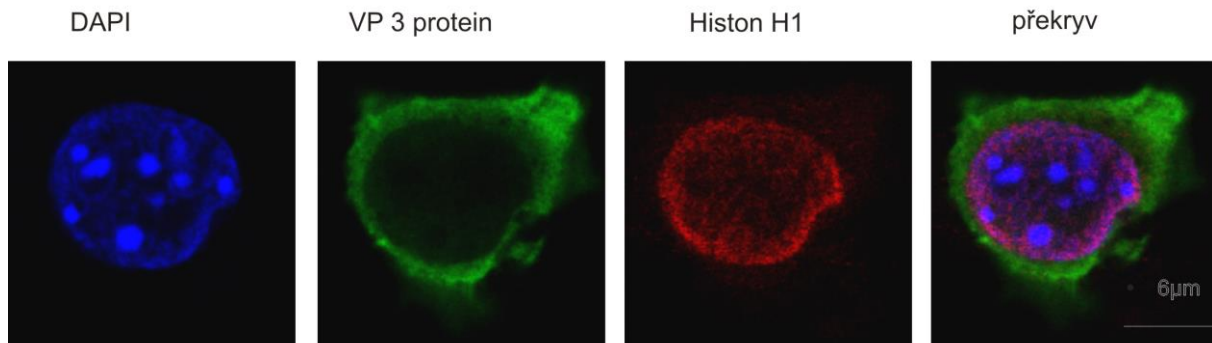
Obr. 5.39. Studium kolokalizace VP3 proteinu s BiP v buňkách 3T3 (transfekce VP3-pFLAG-CMV5a,) 4,5 hod. po transfekci. DNA jádra modře (DAPI), VP2 protein zeleně, BiP červeně Místa kolokalizace žlutá



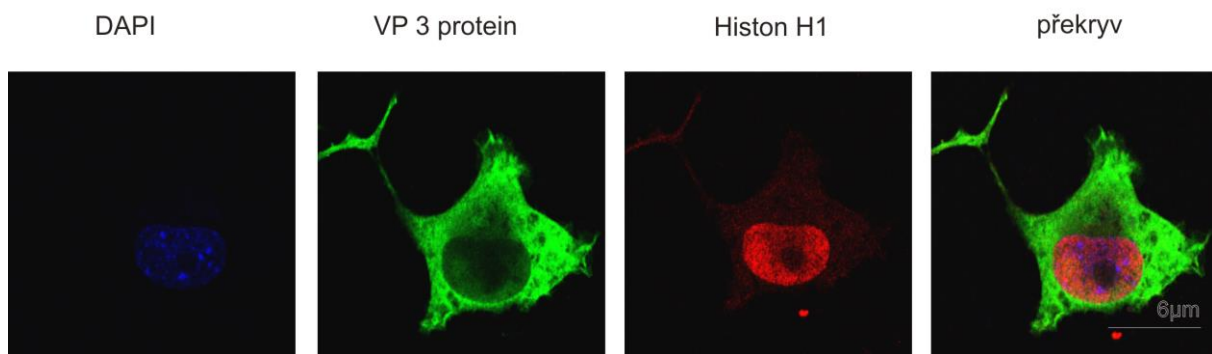
Obr. 5.40. Studium cytotoxického efektu VP2 proteinu na histon H1 v buňkách 3T3 (transfekce VP2-pFLAG-CMV5a,) 4,5 hod. po transfekci. DNA jádra modře (DAPI), VP2 protein zeleně, histon H1 červeně



Obr. 5.41. Studium cytotoxického efektu VP2 proteinu na histon H1 v buňkách 3T3 (transfekce VP2-pFLAG-CMV5a,) 21 hod. po transfekci. DNA jádra modře (DAPI), VP2 protein zeleně, histon H1 červeně



Obr. 5.42. Studium cytotoxického efektu VP3 proteinu na histon H1 v buňkách 3T3 (transfekce VP3-pFLAG-CMV5a,) 4,5 hod. po transfekci. DNA jádra modře (DAPI), VP3 protein zeleně, histon H1 červeně



Obr. 5.43. Studium cytotoxického efektu VP3 proteinu na histon H1 v buňkách 3T3 (transfekce VP3-pFLAG-CMV5a,) 21 hod. po transfekci. DNA jádra modře (DAPI), VP3 protein zeleně, histon H1 červeně

5.3 KONSTRUKCE UNIVERZÁLNÍHO EXPRESNÍHO VEKTORU „phGf-POLYLINKER PRO ZAJIŠTĚNÍ EXPRESE VP3 MCPyV

Pozdní oblasti polyomavirových genomů (tedy i geny pro minoritní strukturní proteiny) se nedaří účinně exprimovat pod běžnými promotory (např. CMV promotor). Proto jsou v naší laboratoři využívány nedavno optimalizované vektory pro expresi pozdních polyomavirových genů v savčích buňkách vytvořené Ch. Buckem a dostupné u firmy Addgene. Vektory obsahují sekvence pro stabilizaci RNA a optimálně překódované geny. V této diplomové práci zaměřené na studium MCPyV byly z těchto vektorů užity např. ph2m a pwM, které nesou sekvenci proteinů VP2 a VP1 MCPyV. Vzhledem k tomu, že není dostupný takovýto typ komerčního vektoru, který by nesl sekvenci VP3 MCPyV, rozhodli jsme se ho připravit. Vzhledem k tomu, že fúze genu s jakoukoliv sekvencí (EGFP, FLAG) může ovlivnit vlastnosti proteinu, potvrzení výsledků s použitím nefúzovaného, nativního proteinu ve chvíli kdy bude připravena specifická protilátka, je žádoucí.

Základ, který je společný výše zmíněným komerčním vektorům, poskytuje vektor phGf (Ch. Buck, Addgene). Výhodou vektoru phGf (Obr. 5.44 B.) je, že obsahuje gen pro EGFP (samostatně se exprimující) a proto umožňuje dobrou kontrolu přítomnosti vektoru v buňce. Pro možné budoucí širší použití vektoru phGf jsme se rozhodli vnést do tohoto vektoru nejprve polylinker s restrikčními místy. Polylinker pro vložení do phGf byl odvozen z vektoru pBlueScript SK- (Obr. 5.44 A). Takto upravený phGf s novým klonovacím místem byl pak využit pro vložení sekvence VP3 MCPyV. Sekvence VP3 byla odvozena z optimalizované sekvence proteinu VP2 vektoru ph2m (Obr. 5.32).

Pro vnesení polylinkeru do phGf vektoru byla využita první částí TOPO reakce a v druhé části LR rekombinace (vše prostřednictvím kitu pENTR Directional TOPO Cloning od Invitrogen – viz kapitola 4.2.19.11). Amplifikovaný polylinker (z pBluescript SK-) byl TOPO reakcí vložen do vektoru pENTR/D-TOPO (obr. 5.46), ze kterého byl polylinker LR rekombinací vnesen do phGf vektoru. Rekombinace se odehrála mezi aattR1 a aattR2 phGf vektoru a aattL1 a aattL2 pENTR/D-TOPO vektoru.

➤ **NAVRŽENÍ PRIMERŮ PRO AMPLIFIKACI POLYLINKERU Z pBLUESCRIPT SK-**

Prvním krokem konstrukce bylo navržení primerů pro amplifikaci. Primery nebylo nutno obohatit o jakákoliv restrikční místa, protože pro TOPO reakci je zapotřebí, aby vkládané úseky do vektoru pENTR/D-TOPO měly tupé konce. Primery byly navrženy takto

polylinker FOR 5'-CACCGGGCGAATTGGGTACCGGGC-3

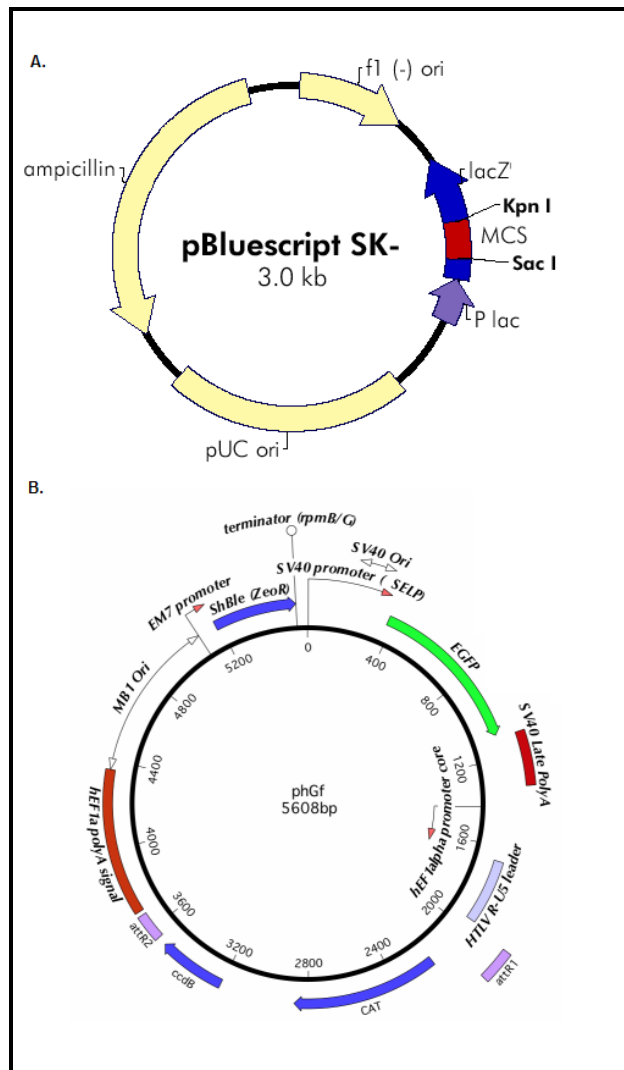
- primer forward pro amplifikaci polylinkerové části z pBLUESCRIPT SK-, zeleně je značena část komplementární k vektoru

polylinker REV 5'-CACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGC-3

- primer reverzní pro amplifikaci polylinkerové části z pBLUESCRIPT SK-, zeleně je značena část primeru komplementární k vektoru

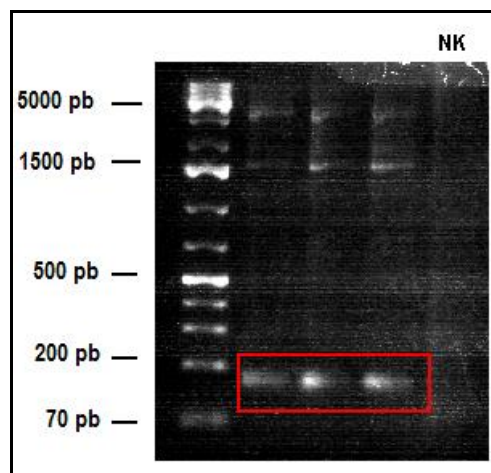
➤ **AMPLIFIKACE POLYLINKERU Z pBLUESCRIPT SK- A IZOLACE AMPLIFIKOVANÝCH POLYLINKERŮ Z GELU**

Amplifikace proběhla dle protokolu uvedeného v kapitole 4.2.19.10. Jako templát pro PCR amplifikaci byl užit pBLUESCRIPT SK-. Tento vektor nese sekvenci polylinkeru (obr. 5.44 A - polyliner popsán jako MCS) o velikosti 132 pb. Negativní kontrola obsahovala místo templátu H₂O.



Obr. 5.44. Schéma vektorů pBluescript SK- a phGf. **A:** Schéma vektoru pBluescript SK- s červeně vyznačeným polylinkerem (MCS) Schema vektoru upraveno a převzato z Xenabase. **B:** Schéma phGf vektoru. Oblast mezi fialově značenými místy (attR1 a attR2) je možno LR rekombinací nahradit – v našem případě za polylinker z pBluescript SK-.. Schema phGf vektoru upraveno a převzato z Addgene.

Amplifikace byla několikrát zopakována a pokaždé ověřena agarózovou elektroforézou. Všechny amplifikovaný materiál byl spojen, nanesen na agarózový gel, ze kterého byly příslušné fragmenty izolovány (Obr. 5.45, protokol viz kapitola 4.2.19.7) a následně přečištěny. Koncentrace izolovaného polylinkeru byla pouhých 6,8 ng/μl, přesto byla použita pro TOPO reakci.



Obr. 5.45. Ověření PCR amplifikace polylinkeru z pBluescript SK- Červeně ohraničené fragmenty odpovídají 132 pb, tedy polylinkeru.

5.3.1 TOPO REAKCE POMOCÍ „pENTR DIRECTIONAL TOPO CLONING“ KITU A JEJÍ OVĚŘENÍ

Reakční směs pro TOPO reakci byla vytvořena dle manuálu kitu pENTR Directional TOPO Cloning Kits. Molární poměr PCR produktu (v tomto případě polylinkeru pBluescript) a TOPO vektoru (pENTR/D-TOPO) se měla ideálně pohybovat v rozmezí (0,5:1) – (2:1). Při molárním poměru 1:1, z výpočtu velikostí (pb) reaktantů vyplynulo, že by bylo třeba dát 19x více polylinkeru než TOPO vektoru. A protože se do reakce doporučuje aplikovat 1 μl TOPO vektoru (asi 15 ng), polylinker by musel být přidán v množství 285 ng. Vzhledem k nízkému výtěžku polylinkeru po izolaci z gelu (pouze 6,8 ng/μl), by se ho muselo do reakce přidat asi 40 μl. Do reakce se ovšem nedoporučuje aplikovat více než 4 μl PCR produktu (polylinkeru), proto bylo aplikováno maximum PCR produktu, tedy 4 μl polylinkeru (pouze asi 27 ng), s tím, že proběhne pouze 25 % TOPO reakce.

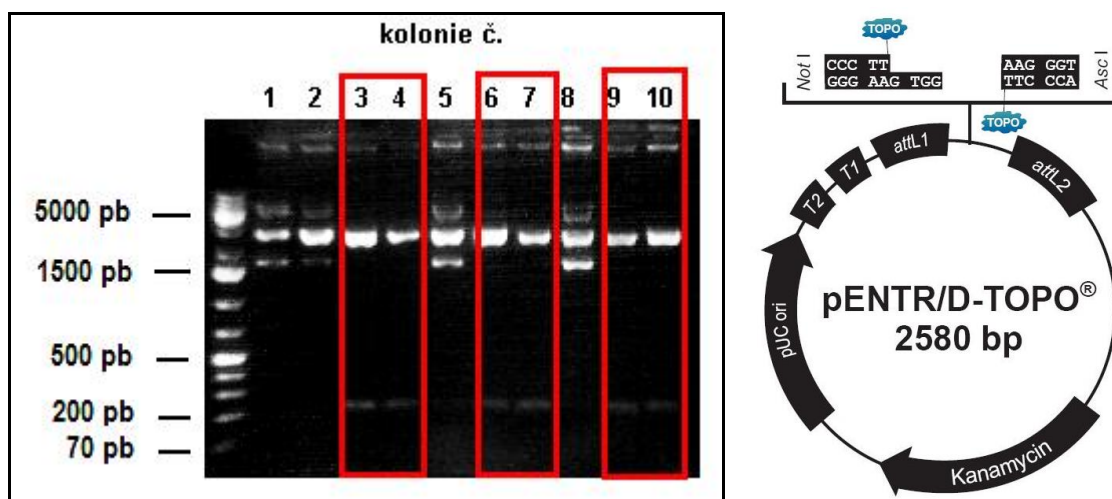
Reakční směs byla složena z:

- 4 μl polylinkeru pBluescript
- 1 μl „salt solution“
- 1 μl TOPO vektoru (pENTR/D-TOPO)

Směs pak byla přidána ke kompetentním *E.coli* TOP10 a vyseta na plotny. Vzniklé kolonie byly testovány a ověřovány na přítomnost polylinkeru v pENTR/D-TOPO. Celý proces proběhl dle postupu v protokolu Invitrogen (kapitola 4.2.19.11).

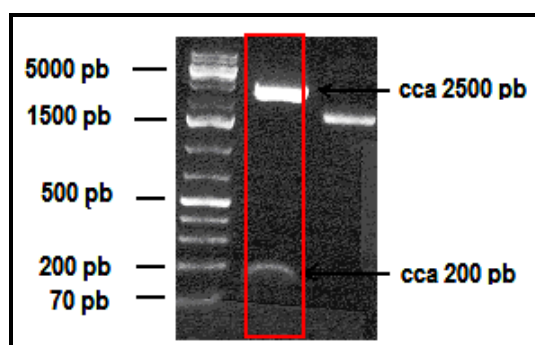
➤ OVĚŘENÍ A VÝBĚR POZITIVNÍCH KOLONIÍ PO TOPO REAKCI

Úspěšnost reakce byla ověřena jednak štěpením jednoho zvoleného štěpného místa v polylinkeru a jednoho místa ve vektoru tak, aby zároveň bylo možno ověřit orientaci vloženého polylinkeru. Nejprve byl naštěpen vektor izolovaný minipreparační metodou DNA (4.2.19.5). Na základě výsledku štěpení byly vybrány kolonie 3, 4, 6 a 7 (Obr. 5.46.), které pak byly zaočkovány do LB media se Zeocinem a izolovány pomocí kitu (4.2.19.2.). V obou případech štěpení (po izolacích minipreparační a kitem) bylo zvoleno EcoRV štěpné místo, které se nacházelo ve vektoru i v polylinkeru. Na elektroforéze je vidět vyštěpený fragment o velikosti nad 200 pb, což by značilo opačnou orientaci vloženého polylinkeru (opačná orientace polylinkeru by stejně v expresním vektoru neměla znamenat problém). Protože rozdíl mezi vyštěpeným fragmentem v pozitivní orientaci a negativní orientaci činil jen cca 30pb, byl úsek z vektoru s polylinkerem osekvenován. Osekvenován byl plazmid kolonie č.3.



Obr. 5.46. Ověření vložení polylinkeru do pENTR/D-TOPO (po minipreparaci DNA) štěpením. Ke štěpení byl užit restriční enzym EcoRV (štěpné místo bylo ve vektoru i v polylinkeru). Správným štěpením vznikly dva fragmenty – menší část s polylinkerem a zbytková část vektoru. Při kladné orientaci vloženého polylinkeru měl vzniknout cca 185pb fragment, v případě negativní orientace 222pb fragment. V červených rámečcích jsou kolonie, které odpovídaly správnému štěpení. Velikost menšího fragmentu nasvědčovala spíše opačné orientaci polylinkeru. **Vpravo je mapa plazmidu pENTR/D-TOPO.**

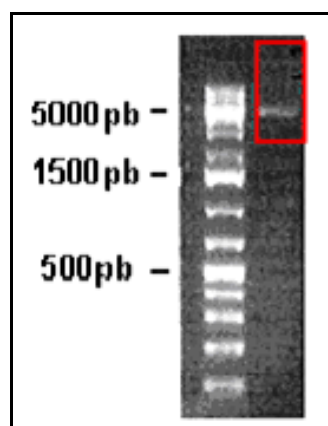
Výsledek sekvenace nakonec ukázal vložení ve správné orientaci. V místě polylinkeru sekvenace ale ukázala, že bylo narušeno restriční místo pro EcoRI. Proto byl polylinker znovu štěpen v místě pro EcoRI - pro ověření, zda nese vskutku nefunkční EcoRI místo, nebo došlo pouze k chybě polymerázy při sekvenaci. Polylinker byl tedy štěpen EcoRI, zatímco pENTR/D-TOPO vektorová část byla naštěpena enzymem Eco0109I. Štěpení ověřilo přítomnost funkčního EcoRI místa v polylinkeru, neboť vyštěpený fragment odpovídal předpovězené velikosti (cca 200 pb), jak tomu mělo být v případě funkčního EcoRI místa (Obr. 5.47.). Takto ověřený vektor mohl být užít pro další krok, tedy LR rekombinaci.



Obr. 5.47. Ověření přítomnosti EcoRI místa v polylinkeru. V červeném rámečku je vidět fragment o cca 200 pb vzniklý štěpením vektoru enzymem EcoRI v kombinaci s enzymem Eco0109I, který potvrdil přítomnost funkčního EcoRI místa. Fragment o cca 2500 pb je zbytková část po štěpení vektoru. V sousedním nezarámovaném sloupci vidíme neštěpený plasmid pENTR/D-TOPO-polylinker pro kontrolu.

5.3.2 LR REKOMBINACE A JEJÍ OVĚŘENÍ

Posledním krokem přípravy plazmidu pHGf-polylinker byla LR rekombinace mezi pENTR/D-TOPO nesoucím polylinker a pHGf vektorem. Bakterie nesoucí plasmid pHGf byly zaočkovány do LB media se Zeocinem. Z pomnožených bakterií byl plasmid izolován kitem a oveřen na agarózové elektroforéze (Obr. 5.48).

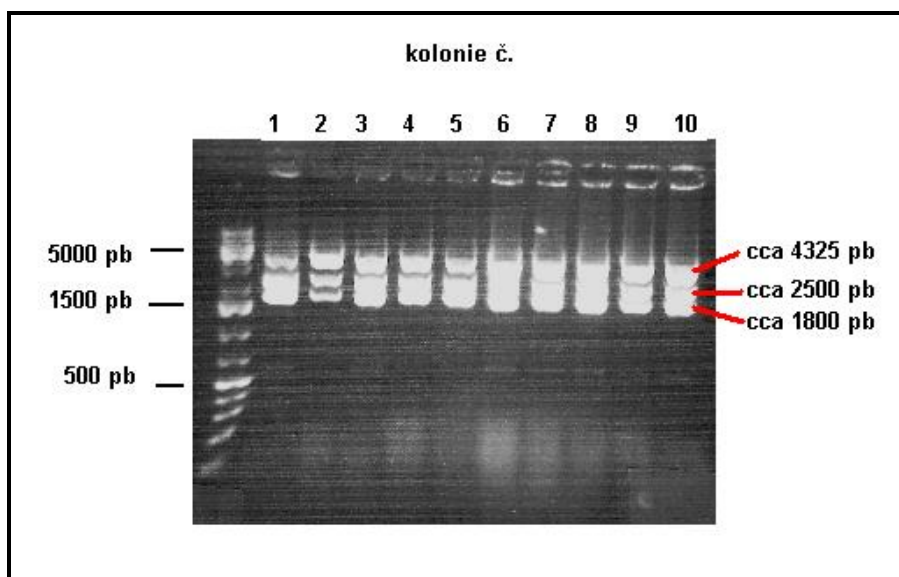


Obr. 5.48. Ověření phGf po izolaci V červeném rámečku jsou patrné tři konformace izolovaného vektoru.

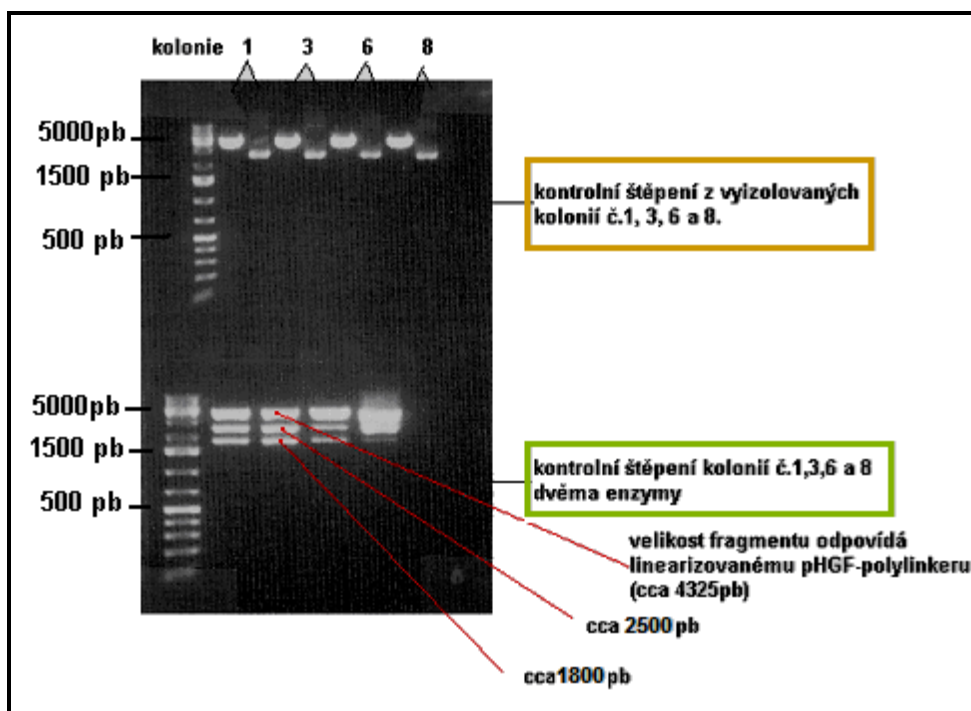
LR rekombinace proběhla dle doporučeného protokolu Invitrogen (4.2.19.11). Do reakce byl přidán pENTR/D-TOPO (2712 pb) a phGf (5680 pb) v molárním poměru 1:1 (tedy 2x více pENTR/D-TOPO než vektoru phGf). Reakční směs tedy byla složena z doporučených 150 ng pENTR/D-TOPO (z kolonie č.3), tomu odpovídajících 72,5 ng phGf a byla doplněna do 8 μ l TE pufru. Další kroky proběhly dle protokolu Invitrogen. Po elektroporaci (4.2.18.3.) do kompetentních bakterií TOP10 byla směs vyseta na misky a inkubována při 37 °C přes noc.

➤ OVĚŘENÍ VEKTORU PO LR REKOMBINACI

Náhodně vybrané monokolonie byly z narostlých misek přeočkovány do LB media se Zeocinem a zpracovány dle protokolu minipreparace DNA (kap. 4.2.19.5). Izolovaný plazmid byl štěpen v místech AvrII (ve vektorové části) a EcoRV (v polylinkerové části). Při přítomnosti polylinkeru a jeho správné orientaci vznikly v izolovaných vektorech kolonií předpokládané úseky o cca 1800 pb a 2500 pb (dva spodní pruhy na Obr. 5.49). Třetí nejvýše položený proužek je linearizovaný plazmid phGf-polylinker (4325 pb).. Zde je nutno doplnit, že phGf vektor se rekombinací zmenšil z 5000pb na cca 4325 pb. Na základě výsledku byly vybrány pozitivní kolonie č. 1, 3, 6 a 8, ze kterých byly plazmidy izolovány kitem (viz 4.2.19.2). Takto izolované plazmidy pak byly znovu zkontrolovány štěpením (Obr. 5.50.) – jednak byly štěpeny stejnými enzymy jako v případě minipreparace (obr. 5.50. - dolní část) a pak pouze enzymem EcoRV, aby bylo možno porovnat linearizovaný a nelinearizovaný phGf-polylinker (obr.5 50 - horní část). V tomto případě již vektor nebyl dále ověřován sekvenací. Pro další práci byl použit klon č.1.



Obr. 5.49. Výsledek minipreparace pro ověření přítomnosti MCS v phGf. Štěpena byla místa AvrII a EcoRV. Při přítomnosti polylinkeru a jeho a správné orientaci vznikly předpokládané úseky o cca 1800 pb a 2500 pb. Třetí horní proužek je linearizovaný phGF-polylinker (4325 pb).



Obr. 5.50. Kontrolní štěpení plazmidu „phGf-polylinker“ z vybraných kolonií.. V horním gelu (oranžový popis) je kontrolní štěpení plazmidu phGf-polylinker z izolovaných kolonií č.1, 3, 6 a 8. V prvním sloupci je štěpení plazmidu v jednom polylinkerovém místě (EcoRV), ve druhém sloupci je neštěpený plazmid. Na dolním obrázku (zelený popis) je štěpení plazmidu phGf-polylinker z kolonií 1, 3, 6 a 8 EcoRV enzymem v oblasti polylinkeru a enzymem AvrII v oblasti vektoru. Štěpením vznikly tři fragmenty 1800 pb a 2500 pb (svědčí o přítomnosti a pozitivní orientaci polylinkeru), nejvýše položený pruh odpovídá linearizovanému vektoru phGf-polylinker (4325pb).

5.3.3 VLOŽENÍ SEKVENCE KODUJÍCÍ VP3 MCPyV DO VYTVOŘENÉHO VEKTORU „phGf-polylinker“

Do vytvořeného vektoru phGf-polylinker byla v posledním kroku vložena sekvence kodující protein VP3 MCPyV.

➤ NAVRŽENÍ PRIMERŮ PRO AMPLIFIKACI SEKVENCE VP3 Z ph2m VEKTORU PRO VLOŽENÍ DO „phGf-polylinker“

Do primerů pro amplifikaci sekvence kódující VP3 (z optimalizované sekvence proteinu VP2 MCPyV přítomnou ve vektoru ph2m) bylo nutno zahrnout XhoI a EcoRI restrikční místa. Tato místa byla vybrána pro vložení sekvence VP3 do polylinkerové části plazmidu phGf-polylinker. Templátem pro PCR amplifikaci VP3 sekvence byl tedy vektor ph2m (Obr. 5.32) získaný z Addgene (Ch. Buck). Vektor ph2m nese optimalizovanou sekvenci VP2 MCPyV. Protože protein VP3 (sekvence nukleotidů 590 pb) je zkrácenou formou VP2 (nukleotidová sekvence 720 pb), lze vhodnými primery amplifikovat sekvenci VP3. Pro tuto konstrukci jsme zvolili delší ze dvou možných variant putativního VP3. Primery byly navrženy takto:

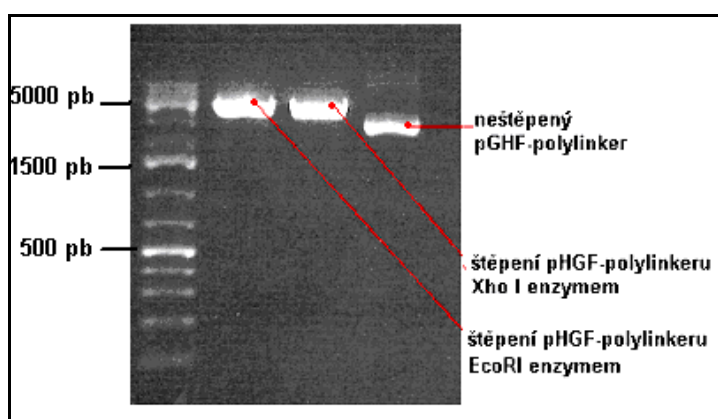
MerVP3_XHOI_FW 5'-GTA GTA CTC GAG ATGACCATCGAAGGCATCAGC

- primer forward, pro amplifikaci VP3 z ph2m vektoru, červeně je značeno restrikční místo XhoI, zeleně je značena část komplementární k vektoru ph2m

MerVP2/3_ECoRI_REV 5'-GTT CAA GAA TTC TCAGAGATGAATGATTGACTTCTTC

- reverzní primer, pro amplifikaci VP3 z ph2m vektoru, červeně je značeno restrikční místo EcoRI, zeleně je značena část komplementární k vektoru ph2m

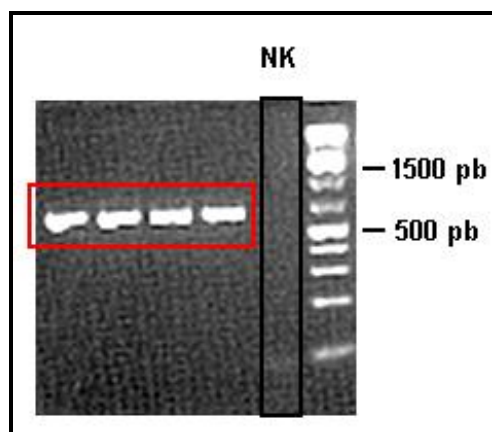
Přítomnost štěpných míst XhoI a EcoRI (pro vložení VP3 do pHGF-polylinkeru) v pHGF-polylinkeru byla před objednáním primerů ještě ověřena (Obr. 5.51.).



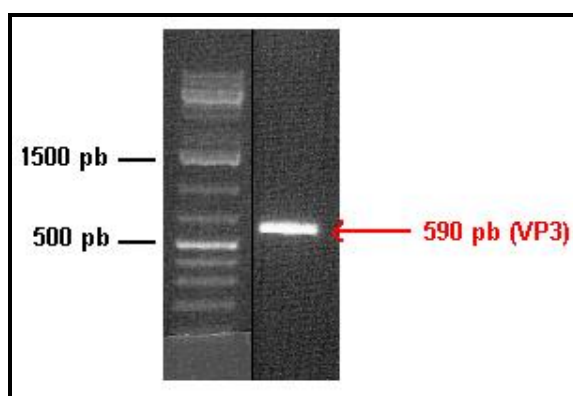
Obr. 5.51. Ověření přítomnosti štěpných míst XhoI a EcoRI v pHGF-polylinkeru (pro specifické vložení VP3 do pHGF-polylinkeru.). Ověření přítomnosti štěpných míst pro XhoI a EcoRI enzymy (plazmid byl linearizován).

➤ AMPLIFIKACE VP3 SEKVENCE Z ph2m VEKTORU

Výsledek PCR reakce (protokol kapitola 4.2.19.10) je ukázán na elektroforéze (Obr. 5.52). Fragменты obsahující gen pro VP3 byly přečištěny, štěpeny XhoI a EcoRI enzymy, kolonkou znovu přečištěny a opět ověřeny na elektroforéze (Obr. 5.53).



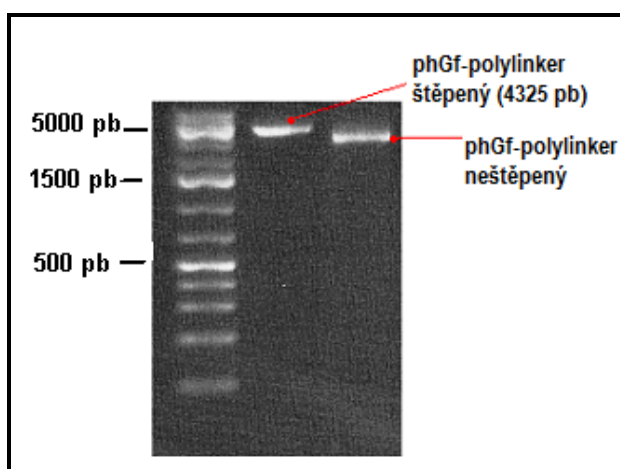
Obr. 5.52. Ověření PCR amplifikovaných sekvencí kodujících VP3 pro vložení do pHGF-polylinker. Amplifikovaný fragment je cca 590 pb dlouhý (červený rámeček). NK je negativní kontrola (templát byl nahrazen H₂O).



Obr. 5.53. Ověření amifikované, štěpené a přesrážené frakce sekvencí kodujících VP3 připravených pro ligaci do pHGf-polylinker..

➤ LIGACE VP3 SEKVENCE DO VEKTORU „pHGf-polylinker“

Vektor pHGf-polylinker byl připraven na ligaci, tzn. naštěpen a přečištěn fenol-chloroformovou metodou (protokol kapitola 4.2.19.4). Před vlastní ligací byl znovu ověřen na elektroforéze (Obr. 5.54.) a defosforylován dle protokolu Fermentas (kapitola 4.2.19.9.).

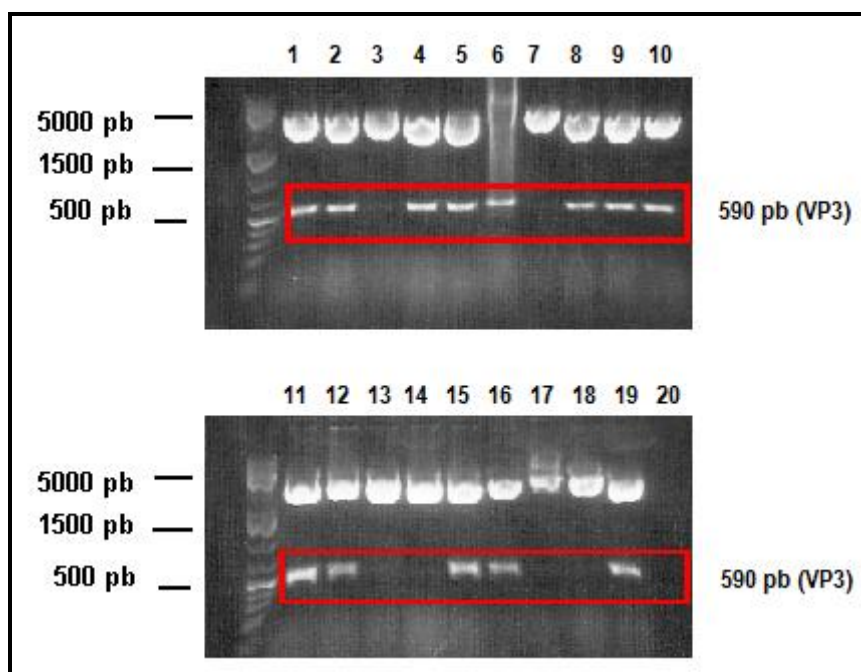


Obr. 5.54. Ověření „pHGf-polylinker“ po naštěpení EcoRI a XhoI a po přečištění. Na obrázku je pHGf polylinker štěpený EcoRI a XhoI (první sloupec) a neštěpený (druhý sloupec).

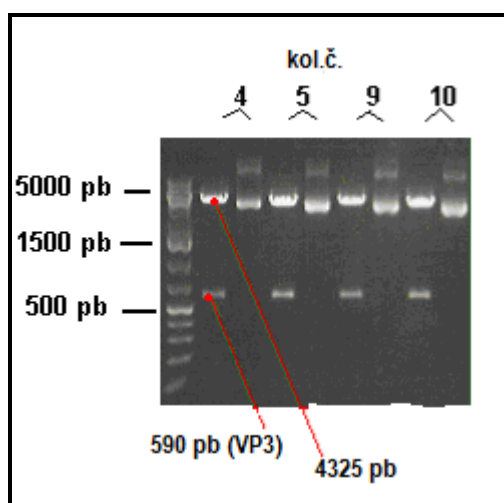
Ligace proběhla dle protokolu uvedeného v kapitole 4.2.19.9. Do ligační směsi bylo přidáno 400 ng vektoru pHGf-polylinker a 166,7 ng VP3 fragmentu. V negativní kontrole byl inzert nahrazen H₂O. Ligační směs byla elektroporací (4.2.18.3) vnesena do kompetentních bakterií TOP 10.

➤ OVĚŘENÍ VÝSLEDKU LIGACE

Po transformaci bylo 20 monoklonií zaočkováno do LB media se Zeocinem., aby byla otestována přítomnost plazmidu „VP3-phGf-polylinker“. Izolace vektorů byla provedena metodou minipreparace DNA (kapitola 4.2.19.5). Izolované vektory byly štěpeny restrikcí enzymy EcoRI a XhoI, toto štěpení mělo zajistit vyštěpení VP3 sekvence pokud byla přítomna. VP3 bylo vyštěpeno, takže na gelu vznikly předpokládané fragmenty o cca 590 pb a 3735 pb (Obr. 5.55). Na základě výsledku byly vybrány pozitivní kolonie č. 4, 5, 9 a 10, ze kterých byly plazmidy izolovány tentokrát komerčním kitem „endofree“. Takto izolované plazmidy pak byly znovu stejným způsobem štěpeny XhoI a EcoRV enzymy, pro ověření přítomnosti sekvence VP3 MCPyV (Obr. 5.56).



Obr. 5.55. Kontrolní štěpení plazmidu „VP3-phGf-polylinker“ izolovaného z monoklonií po minipreparaci DNA. V případě, že vektor obsahoval VP3 sekvenci, byl z něho vyštěpen fragment o velikosti cca 590 pb (červené rámečky).



Obr. 5.56. Kontrolní štěpení plazmidu „VP3-phGf-polylinker“ izolovaného komerčním kitem z kolonií č.4, 5, 9 a 10. Z vektoru každé kolonie byl vyštěpen fragment obsahující sekvenci pro VP3 (vždy první sloupec každé kolonie), druhý sloupec každé kolonie je neštěpený plazmid.

Přestože opakovaná štěpení ukázala úspěšné vložení VP3 sekvence do vektoru pHGF-polylinker, byl vektor jedné kolonie (kolonie č.5) osekvenován. Pro vektory typu phGf nebyly dostupné sekvenční primery, proto bylo nutné je navrhnout.

➤ **NAVRŽENÍ PRIMERŮ PRO SEKVENACI VEKTORŮ TYPU phGf A
VÝSLEDEK SEKVENACE**

Primery byly navrženy tak, aby nasedaly co nejbližší vloženému polylinkeru, takže je lze užít i pro jiné vektory typu phGf, které polylinker neobsahují:

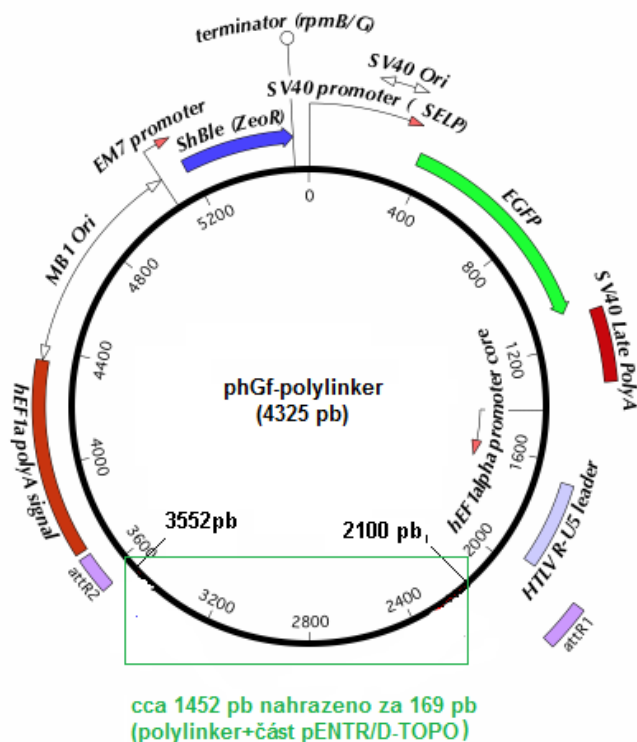
FW sekv pHGF-pol 5'- TGTTCTGCGCCGTTACAGATCC -3'

- primer forward pro sekvenaci vektoru „VP3-phGf-polylinker“ v oblasti vloženého polylinkeru, zeleně je značena část komplementární k vektoru

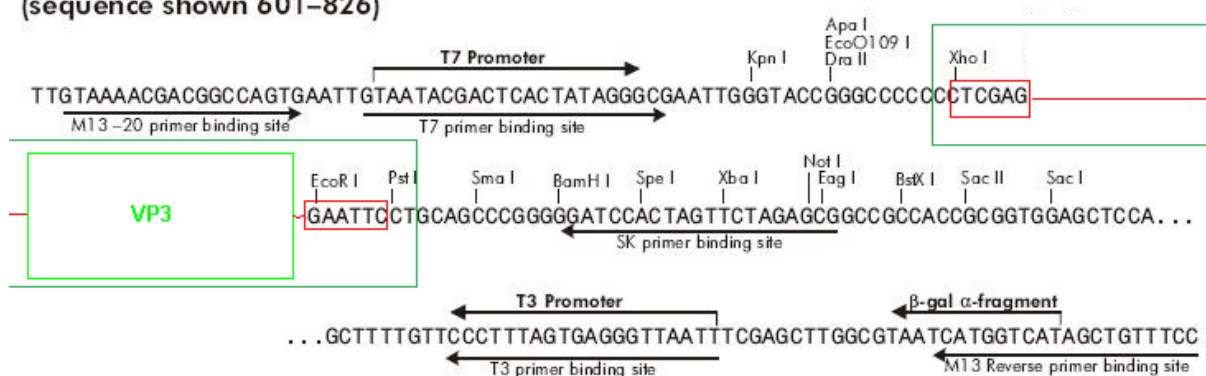
REV sekv pHGF-pol 5'- GATTAAGAGTGGGGTGGCAG -3'

- reverzní primer pro sekvenaci „VP3-phGf-polylinker“ v oblasti vloženého polylinkeru, zeleně je značena část komplementární k vektoru

Sekvence potvrdila vložení sekvencí kodujících VP3 ve správné orientaci. „VP3-phGf-polylinker“ nebyl prozatím využit k žádným experimentům. Bude použit po získání specifické protilátky proti minoritním proteinům MCPyV.



pBluescript SK (+/-) Multiple Cloning Site Region (sequence shown 601–826)



Obr. 5.57. Schéma konstruktů „VP3-phGf-polylinker“. Na vektoru je tmavě zelenou barvou orámováno místo, kde došlo k výměně původní části phGf za část polylinkeru z pBluescript SK-. O jakou část polylinkeru se jedná je znázorněno tmavě zeleným ohraničením v sekvenci polylinkeru pBluescript SK-. Červeně jsou ohraničena restrikční místa XhoI a EcoRI, přes která byla do polylinkeru vložena sekvence VP3, světle zeleně je znázorněno místo, kam byla v polylinkeru vložena sekvence kodující VP3.

6 DISKUZE

6.1 PŘÍPRAVA MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY PROTI HLAVNÍMU KAPSIDOVÉMU PROTEINU VP1 POLYOMAVIRU KARCINOMU MERKELOVÝCH BUNĚK

Monoklonální protilátky jsou jedinečným nástrojem pro studium mnoha s buňkou spojených dějů - jako jsou například protein-proteinové interakce či sledování proteinu v buněčných strukturách. Protilátky jsou rovněž využitelné v různých analytických či izolačních metodách, ale také nachází své uplatnění na poli klinickém, zejména na úrovni diagnostické. V rámci této diplomové práce se podařilo připravit monoklonální protilátku izotypu IgG2a namířenou proti nativnímu hlavnímu kapsidovému proteinu VP1 polyomaviru karcinomu Merkelových buněk. Taková protilátka zatím není komerčně dostupná. První práce, ve které je popsána příprava monoklonálních protilátek namířených proti VP1 kapsidovému proteinu MCPyV vznikla až v roce 2010. I tato recentní práce měla jako primární cíl získat přípravou protilátek nástroj pro studium kapsidových proteinů včetně jejich skládání, nástroj pro studium vstupu viru, respektive VLPs do buňky. (*Pastrana et al., 2010*). Díky schopnosti VP1 proteinu tvořit VLPs i bez přítomnosti jiných složek viru (*Salunke et al., 1986*), a vzhledem k jejich velké imunogenitě (*Caparrós-Wanderley et al., 2004*) byly jako imunizační antigen použity VP1 VLPs. Ty byly získané izolací z hmyzích buněk infikovaných rekombinantním bakulovirem nesoucím VP1 MCPyV (poskytnut Dr. Šrollerem z ÚHK). Po imunizaci myši kmene Balb/c a fúzi slezinných buněk imunizovaného zvířete s myelomovými buňkami probíhala selekce hybridomových buněk na základě testování hybridomových médií metodou „Dot blot“ ale zejména za využití průtokového cytometru, který umožnil testovat velké množství hybridomových médií a následně vybrat nejlépe produkující klony. Bylo generováno celkem jedenáct hybridomů, které ale pocházely ze společného prvního klonu. Při charakterizaci získaných protilátek, nebyla pozorována žádná odlišnost v jejich vlastnostech, takže se velmi pravděpodobně jedná o identickou protilátku. Základními vlastnostmi, které jsou zjišťovány u připravených protilátek, jsou právě schopnost neutralizace virové infekčnosti (nebo v případě VLPs zabránění vázat se na buňky nebo do nich vstoupit), použitelnost pro metodu nepřímé imunofluorescence, imunoprecipitace nebo metody Western blot (*Pastrana et al., 2010*). Námí získaná protilátka se ukázala jako nepoužitelná pro detekci denaturovaného proteinu, ale vhodná pro metodu nepřímé imunofluorescence. Také bylo ukázáno, že protilátka zabráňuje VLPs aglutinovat červené krvinky, což znamená, že brání vazbě VLPs na sialovou kyselinu. Bylo ovšem zjištěno, že primárním receptorem pro MCPyV není, na rozdíl od řady

známých polyomavirů, gangliosid, který je zakončen jednou nebo více sialovými kyselinami ((*Tsai et al., 2003; Erickson et al., 2009*), ale nesialovaný karbohydrátový receptor - glykosaminoglykan (*Schowalter et al., 2011; Neu et al., 2012*). To znamená, že by protilátka nemusela bránit adsorpci virových částic na povrch buňky. Gangliosid GT1b se podle nedávné práce (*Neu et al., 2012*) uplatňuje jako sekundární receptor, v post-adsorpčních procesech vstupu MCPyV do buňky. Bude tedy zajímavé zjistit, zdali protilátka bude bránit internalizaci virových částic buňkou. VP1 VLPs MCPyV mají schopnost hemaglutinovat morčecí erytrocyty, které jsou v naší laboratoři běžně užívané pro studium myšího polyomaviru. Toto zjištění bylo překvapivé, neboť jsme očekávali na základě předchozích studií, že najít vhodné zvířecí erytrocyty nebude snadné. Předchozí práce totiž shodně zjistily, že VP1 VLPs MCPyV neinteragují s lidskými erytrocyty, ale že aglutinují ovčí erytrocyty (*Erickson et al., 2009; Schowalter et al., 2011*). Zajímavý příklad praktického využití a významu modifikovaného neutralizačního testu spojeného s VLPs je ukázán například ve studii, která potvrdila korelaci mezi výskytem protilátek proti MCPyV v lidských sérech a izolovanou DNA MCPyV z lidské kůže (*Faust et al., 2011*).

Metodou Dot blot bylo dále ukázáno, že nedochází ke křížové reakci protilátky s proteinem VP1 lidského BK viru. Naopak, byla detekována slabá interakce protilátky s VP1 MPyV. Výsledek křížových reakcí je v souladu s výsledkem studie *Gheule et al., 2012*, která určovala příbuznost mezi jednotlivými lidskými polyomaviry na základě aminokyselinových sekvencí VP1 proteinů různých lidských polyomavirů. Potvrdila, že MCPyV je více příbuzný s MPyV, než s mnohými lidskými polyomaviry a při porovnání MCPyV s BK virem byla vzájemná podobnost nízká. Přesto ale jsou práce, ve kterých byly generovány protilátky proti VP1 MCPyV, které naopak křížově reagovaly s VP1 BKV a s VP1 MPyV nikoli (*Touzé et al., 2010*).

U reprezentativního klonu protilátky 1E5/B9H8-E8 byl určen izotyp IgG2a (firmou EXBIO). Protilátka bude nabídnuta ke komerčním účelům, pro možné užití v diagnostice či výzkumu. Pro diagnostiku počátku rozvoje karcinomu způsobeného MCPyV se ale uplatní spíše protilátky namířené proti velkému T antigenu nebo jeho deletované formě. Složky kapsidy nebo DNA MCPyV, je možno nalézt i na zdravé lidské kůži a velká část populace má protilátky proti VP1 MCPyV. Přítomnost T antigenu v buňkách, případně protilátky proti T antigenu v lidském séru jsou známkou integrace MCPyV do genomu buněk (*Schmitt et al., 2012*).

Získaná protilátka byla dále využita ke konfokální analýze pohybu VP1 VLPs MCPyV v buňce. Je třeba zdůraznit, že se jednalo o předběžné pokusy. K analýze byly užity dva typy buněk, jednak myší fibroblasty linie 3T6 a dále lidské primární plicní epitelální buňky HEL-299. Z výsledků nebyl patrný velký rozdíl v účinnosti vstupu VP1 VLPs do buněk lidských a myších. Do obou typů buněk vstupovaly VLPs ve srovnání s VLPs myšího polyomaviru málo účinně a pomaleji. Bude tedy v budoucnu zapotřebí kromě otestování částic s dalšími buněčnými typy (nabízejí se například HRPTC - primární lidské ledvinné epitelální buňky proximálních tubulů, buňky 293TT, HeLa buňky), také najít optimální časy pro pozorování interakcí VLPs s jednotlivými buněčnými strukturami. Možná by příčina problému s internalizací viru mohla být na úrovni receptorů. Jak už bylo řečeno, pro vstup VLPs MCPyV (a patrně také viru) do buňky je zapotřebí dvou typů receptorů. Pro přichycení k buňce slouží nesialované receptory, tzv. glykosaminoglykany s typickým zástupcem heparan sufátem (*Schowalter et al., 2011; Neu et al., 2012*). Sialovaný glykolipid, gangliosid GT1b hraje spíše roli koreceptoru, který se účastní až post adsorpčních procesů, internalizace nebo „sortingu“ virových částic. Proto by příčina zhoršeného vstupu VLPs do buněk mohla být v zastoupení glykosaminoglykanu (nebo naopak gangliosidu) na buněčném povrchu, nebo také ve vzájemné lokalizaci obou potřebných receptorů. Při analýze pohybu VLPs buňkou byly značeny následující buněčné struktury: caveolin1, aktin, časný endozóm, pozdní endozóm, a endoplazmatické retikulum. Zajímavé je, že v lidských fibroblastech byla pozorována mnohem vyšší kolokalizace VLPs s caveolinem1 než v případě myších 3T3 fibroblastů. Produktivní cesta přes caveolae do tzv. caveosomů a z nich do endoplazmatického retikula byla popsána pro virus SV40 (*Pelkmans et al. 2001*) Autoři však své práce později přehodnotili a caveosom prohlásili za artefakt vysoké exprese caveolinu fúzovaného s EGFP a soudí, že caveosom původně popsáný jako organela s neutrálním pH, je vlastně endolyzozomální kompartment. (*Hayer et al., 2010*). Ukazuje se tedy, že cesta polyomavirů k produktivní infekci vede přes časný a pozdní endozómy, a že kyselé pH endozómů je podmínkou pro dopravu genomů do buněčného jádra (*Liebl et al 2006; Qian et al., 2009*). Při studiu role cytoskeletu v produktivní infekci MPyVv naši laboratoři bylo ukázáno, že dynamický aktin řídí váčky obsahující virové částice do caveolárních struktur, což není pro produktivní infekci příznivé. Virové částice sortované do váček odvozených od caveol nemusí skončit produktivní infekcí (*Žila et al., nepublikované výsledky*). Předběžná konfokální analýza provedená v této práci, ale identifikovala, i když sporadicky, také

kolokalizace VLPs MCPyV s časnými i pozdními endozómy a s endoplazmatickým retikulem tj. s endozomálními kompartmenty považovanými za součást produktivní dráhy jiných polyomavirů (MPyV, SV40, BKV). V dalších studiích bude vhodné (pokud nebude dostupný infekční virus a permisivní buněčná linie) použít místo VP1 VLPs tzv. pseudoviriony, připravené expresí všech tří strukturních proteinů a enkapsidací MCPyV genomu nebo plazmidu s reportérovým genem v buňkách 293TT. Takový systém je nyní dostupný (Neumann *et al.*, 2011).

6.2 KONSTRUKCE VHODNÝCH EXPRESNÍCH VEKTORŮ PRO PRODUKCI A STUDIUM BUNĚČNÝCH LOKALIZACÍ MINORITNÍCH STRUKTURNÍCH PROTEINŮ VP2 A VP3 POLYOMAVIRU KARCINOMU MERKELOVÝCH BUNĚK

Celá tato diplomová práce je zaměřena na studium nedávno objeveného polyomaviru karcinomu Merkelových buněk (MCPyV). Jedním z cílů práce byla konstrukce expresních vektorů pro produkci minoritních strukturních proteinů MCPyV v savčích buňkách. Exprese pozdních proteinů polyomavirů není jednoduchá a konstrukty pro jejich expresi s použitím běžně užívaných promotorů a autentických genových sekvencí byly nefunkční. V naší laboratoři bylo ukázáno (Huerfano *et al.*, 2010), že pokud se minoritní strukturní proteiny MPyV fúzují s EGFP sekvencí a to jak z N- konce tak z C- konce, exprese probíhá i z běžných promotorů. Problém je, že některé varianty fúzovaných proteinů se mohou chovat arteficiálně v důsledku ovlivnění jejich vyšší struktury přidanými sekvencemi. Proteiny fúzované s EGFP se např. mohou chovat jako dominantně negativní mutanty přirozených proteinů např. EGFP-caveolin1 (Liebl *et al.* 2006). Pokud není k dispozici kontrolní exprese nefúzovaného proteinu, není jistota, že získané výsledky budou věrohodné. Pro minoritní proteiny MPyV se ukázalo, že pokud je EGFP připojeno na 3'konci minoritních proteinů, mají tyto fúzní proteiny vlastnosti srovnatelné s přirozeným proteinem (Huerfano *et al.* 2010). Ke studiu chování minoritních proteinů MCPyV byly nedávno v laboratoři konstruovány fúzní proteiny VP2-EGFP a VP3-EGFP (Cibulka J., diplomová práce). Pro kontrolu jejich chování jsou v naší laboratoři nyní k dispozici komerčně dostupné optimalizované vektory Ch. Bucka (Addgene) pro expresi VP1 a VP2 MCPyV a podobný vektor by nyní připraven v rámci této práce i pro expresi delší z možných variant VP3. Problém je, že dosud není

dokončena příprava specifické protilátky pro detekci minoritních proteinů. Proto jsme vytvořili konstrukty VP2-pFLAG-CMV5a a VP3-pFLAG-CMV5a. Základem obou konstruktů je vektor pFLAG-CMV5a, který umožňuje produkci proteinů fúzovaných s FLAG sekvencí (8 aminokyselin) na jejich C- konci. Užitím protilátky namířené proti FLAG, pak bylo možno minoritní protein-FLAG v buňkách vizualizovat a porovnat výsledky s těmi, které poskytly proteiny fúzované s EGFP (*Cibulka J., diplomová práce*). Vzhledem ke krátkosti fúzované sekvence je sníženo riziko arteficielního chování fúzovaných proteinů. Vektoru nesoucího FLAG bylo také užito v předešlé práci provedené v naší laboratoři, která tohoto konstruktů užila prakticky ke stejnému účelu, ale pro minoritní proteiny MPyV (*Huerfano et al, 2010*).

Soudí se, že minoritní strukturní proteiny polyomavirů jsou odpovědné za únik polyomavirů z endozómů. V naší laboratoři byl ukázán zajímavý fenomén u minoritních proteinů MPyV. Ukázalo se, že pokud jsou minoritní proteiny produkovány samostatně, jsou silně cytotoxické. Cytotoxicita souvisela s jejich afinitou k vnitrobuněčným membránám (*Huerfano et al 2010*). V této práci bylo ukázáno, že jak VP2 tak VP3 interagují s vnitrobuněčnými membránami a narušují je, což je zřejmě příčinou velmi rychlé indukce na kaspázách závislé apoptózy. Tyto vlastnosti byly zjištěny jednak u minoritních proteinů divokého typu viru, ale i u proteinů fúzovaných na C-konci s EGFP. Proteiny fúzované s EGFP na N-konci tyto vlastnosti neměly. V této diplomové práci jsme chtěli zjistit, zdali také VP2 a VP3 MCPyV mají podobné vlastnosti. Proteiny fúzované s FLAG byly produkovány v buňkách myších fibroblastů linie 3T3 a analyzovány v čase 4,5 hodiny po transfekci. Konfokální mikroskopie ukázala, že naprostá většina obou proteinů zůstávala v cytoplasmě (přestože, podobně jako VP2 a VP3 MPyV mají na C- konci bazickou sekvenci, která je považována za jaderný lokalizační signál). To je rozdíl od minoritních proteinů BK viru, které se i při samostatné expresi dostávaly účinně do jádra (*M. Stančíková, M. Fraiberk, nepublikované výsledky*). Tyto proteiny mají ovšem na C- konci další bazickou doménu. Překvapivě, kolokalizace obou minoritních proteinů MCPyV s membránami jaderného obalu nebo endoplazmatického retikula nebyla zdaleka tak přesvědčivá jako tomu je u VP2 a VP3 MPyV (*Huerfano et al. 2010*). V souladu s tím nebyl pozorována cytotoxický efekt jejich produkce a to ani 21 hodin po transfekci. To dokládá zjištění, že histon H1 si i v této době zachoval jadernou lokalizaci. Při apoptóze je histon H1 translokován do cytoplasmy (*Ohsawa et al., 2008*) Při samostatné produkci VP2 a VP3 MPyV byla ztráta histonu z jádra pozorována. (*Bouřa 2004; Vít 2010*).

Také současně prováděná měření koncentrace laktát dehydrogenázy uvolňované z mrtvých buněk do media s časem po transfekci potvrzují nízkou cytotoxicitu VP2 a delší varianty VP3 (*Horníková L., nepublikované výsledky*).

V dalších pokusech bude nutno především ověřit (až bude k dispozici specifická protilátka), že vlastnosti proteinů nebyly ovlivněny přítomností FLAG sekvence přesto, že je to málo pravděpodobné. Také budou zkoumány jednotlivé hydrofobní části proteinů a jejich schopnosti interagovat s membránami při různém pH. Je totiž možné, že interakce s membránami u těchto proteinů probíhá pouze v kyselém prostředí endozómů. Existuje hypotéza, že minoritní proteiny fungují jako viroporiny při uvolňování virových částic z endoplazmatického retikula do cytoplazmy. Je však možné, že MCPyV se dostává na cestě k jádru do cytoplazmy dříve, např. z kyselého pozdního endozómu.

7 SHRNU TÍ

Získání monoklonální protilátky proti hlavnímu kapsidovému proteinu VP1 polyomaviru karcinomu Merkelových buněk

- Podařilo se získat monoklonální protilátku namířenou proti hlavnímu strukturnímu kapsidovému proteinu VP1 polyomaviru karcinomu Merkelových buněk (MCPyV). Protilátka byla připravena na principu hybridomové technologie a byla získána ze stabilních hybridomových buněk odvozených z monoklonie. Celkem bylo nasbíráno a otestováno 11 protilátek, které ale pochází z jednoho společného klonu a proto mají stejné vlastnosti.
- Bylo zjištěno, že protilátka je patrně neutralizační, protože zabraňuje vazbě VLPs na kyselinu sialovou v hemaglutinačním testu.
- Bylo zjištěno, že protilátka rozpoznává konformační epitop VLPs, a proto není využitelná pro detekci denaturovaného antigenu metodou Western blot. Byla ale ověřena její využitelnost pro metodu nepřímé imunfluorescence. Protilátka nerozpoznává VLPs lidského BK viru, avšak slabě interaguje s VLPs MPyV
- Protilátka byla využita pro předběžnou studii pohybu VP1 VLPs buňkou. V této pilotní studii bylo ukázáno, že VP1 VLPs vstupují do myších i lidských fibroblastů neúčinně. Přesto byly zaznamenány kolokalizace VP1 VLPs se strukturami obsahujícími caveolin1, dále také s markerem časného endozómu EEA1 a markerem pozdního endozómu Lamp2. Cca 3 hodiny po adsorpci VLPs, byla detekována sporadická kolokalizace s BiP markerem endoplazmatického retikula. Tyto předběžné výsledky naznačují, že by se VLPs MCPyV mohly pohybovat ve fibroblastech v podobných endocytických kompartmentech jako částice MPyV.

Konstrukce vhodných expresních vektorů pro produkci a studium buněčných lokalizací minoritních strukturních proteinů VP2 a VP3 polyomaviru karcinomu Merkelových buněk

- Byly konstruovány expresní vektory pro produkci minoritních strukturních proteinů VP2 a VP3 MCPyV v savčích buňkách. Jednak byly vytvořeny vektory pro expresi minoritních proteinů fúzovaných s epitopem FLAG pro studium VP2 a VP3, protože ještě není k dispozici specifická protilátka proti těmto proteinům.
- Konstrukty produkující proteiny VP2 a VP3 MCPyV fúzované s FLAG byly použity pro zjištění jejich lokalizací v buňce. VP2 protein byl nalezen převážně v cytoplazmě,

pouze velmi malá část byla detekována v jádře, VP3 protein se nalézal v cytoplazmě. Na rozdíl od VP2 a VP3 proteinů MCPyV, nebyla pozorována výrazná afinita obou proteinů k buněčným membránám ani výrazná cytotoxicita.

- Byl připraven expresní vektor pro produkci delší ze dvou možných variant proteinu VP3 MCPyV. Vektor je připraven pro srovnání vlastností fúzovaných variant minoritních proteinů (konstrukt pro produkci VP2 byl získán od firmy Addgene) po té co bude dokončena příprava specifické protilátky. Konstrukce byla ověřena sekvenováním

8 SEZNAM UŽITÉ LITERATURY

Angermeyer S., Hesbacher S., Becker J.C., Schrama D. and Houben R. (2013) Merkel cell polyomavirus positive Merkel cell carcinoma cells do not require expression of the viral small T antigen. *The Journal of Investigative Dermatology*, doi 10.1038, needitovaný manuskript

Arora R., Chang Y. and Moore P.S. (2012) MCV and Merkel cell carcinoma: a molecular success story. *Current Opinion in Virology* 2, 489-498.

Ashok A. and Atwood, W.J. (2003) Contrasting roles of endosomal pH and the cytoskeleton in infection of human Glial cells by JC virus and Simian virus 40. *Journal of Virology* 77, 347-1356.

Barouch D.H. and Harrison S.C. (1994) Interactions among the major and minor coat proteins of polyomavirus. *Journal of Virology* 68, 3982-3989.

Bouřa E. (2004) Studium minoritních strukturních proteinů myšičího polyomaviru. Diplomová práce, Katedra genetiky a mikrobiologie, Př.F. U.K., Praha.

Caparrós-Wanderley W. et al. (2004) Effect of dose and longterm storage on immunogenicity of murine polyomavirus VP1 virus-like particles. *Vaccine* 22, 1571-1578.

Cibulka J. – diplomová práce před dokončením. Katedra genetiky a mikrobiologie, Př.F. U.K., Praha.

Demetriou S.K., Ona-Vu K., Sullivan E.M., Dong T.K., Hsu S.W., Oh D.H. (2012) Defective DNA repair and cell cycle arrest in cells expressing Merkel cell polyomavirus T antigen. *Journal International du Cancer* 131, 1818 – 1827.

Duncavage E.J., Zehnbauser B.A., Pfeifer J.D. (2009) Prevalence of Merkel cell polyomavirus in Merkel cell carcinoma. *Modern Pathology* 22, 516 - 521.

Dubensky T.W. and Villarreal L.P. (1984) The primary site of replication alters the eventual site of persistent infection by polyomavirus in mice. *Journal of Virology* 50, 541-546.

Eash S., Querbes W. and Atwood W.J. (2004) Infection of Vero cells by BK virus is dependent on caveolae. *Journal of Virology* 78, 11583-11590.

Eddy B.E., Borman G.S., Berkeley W.H. and Young R.D. (1961) Tumors induced in hamsters by injection of rhesus monkey kidney cell extracts. *Proc.Soc. Exper.Biol and Med.* 107, 191-197.

Engel S., Heger T., Mancini R., Herzog F., Kartenbeck J., Hayer A. and Helenius A. (2011) Role of endosomes in Simian Virus 40 entry and infection. *Journal of Virology* 85, 4198-4211.

Erickson K., Garcea R.L. and Tsai B. (2009) Ganglioside GT1b is a putative host cell receptor for the Merkel cell polyomavirus. *Journal of Virology* 83, 10275-10279.

Faust H., Pastrana D.V., Buck Ch.B., Dillner J. and Ekström J. (2011) Antibodies to Merkel cell polyomavirus correlate to presence of viral DNA in the skin. *The Journal of infectious diseases* 203, 1096-1100.

Feng H., Kwun H.J., Liu X., Gjoerup O., Stolz D.B., Chang Y. and Moore P.S. (2011) Cellular and viral factors regulating Merkel cell polyomavirus replication. *PLoS ONE* 6, e22468, 1-11.

Feng H., Shuda M., Chang Y., Moore P.S. (2008) Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science* 319, 1096-1100.

Forstova J., Krauzewicz N., Sandig V., Elliot J., Palkova Z., Strauss S. and Griffin B.E. (1995) Polyoma virus pseudocapsids as efficient carriers of heterologous DNA into mammalian cells. *Human Gene Therapy* 6, 297-306.

Forstova J., Krauzewicz N., Wallace S., Street A.J., Dilworth S.M., Beard S. and Griffin, B.E. (1993) Cooperation of structural proteins during late events in the life cycle of polyomavirus. *Journal of Virology* 67, 1405–1413.

- Gheule M., Khan M.T.H., Ehlers B. and Moens U. (2012) Genome analysis of the new human polyomaviruses. *Reviews in Medical Virology* 22, 354-377.
- Gilbert J. M., Benjamin T. L. (2004) Uptake pathway of polyomavirus via ganglioside GD1a. *Journal of Virology* 78, 12259-12267.
- Gross L. (1953) A filterable agent, recovered from Ak leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine* 83, 414-21.
- Halata Z., Grim M. and Bauman K.I. (2003) Friedrich Sigmund Merkel and his „Merkel Cell“, morphology, development, and physiology: Review and New results. *The anatomical record part A* 271A, 225-239.
- Hayer A., Stoeber M., Ritz D., Engel S., Meyer H.H., and Helenius A. (2010) Caveolin-1 is ubiquitinated and targeted to intraluminal vesicles in endolysosomes for degradation. *Journal of Cell Biology* 191, 615-629.
- Hodgson N.C (2005) Merkel cell carcinoma: changing incidence trends. *Journal of Surgical Oncology* 89, 1-4.
- Holländerova D., Raslova H., Blangy D., Forstova J. and Berebbi M. (2003) Interference of mouse polyomavirus with the c-myc gene and its products in mouse mammary adenocarcinomas. *International Journal of Oncology* 23, 333-341.
- Horníková L. (2012) Hlavní strukturní protein myšního polyomaviru: Interakce s buněčnými strukturami. *Disertační práce. Katedra genetiky a mikrobiologie, Př.F. U.K., Praha.*
- Houben R., Shuda M., Weinkam R., Schrama CD., Feng H., Chang Y., Moore P.S. and Becker J.C. (2010) Merkel cell carcinoma cells require expression of viral T antigens. *The Journal of Virology* 84, 7064-7072.
- Huerfano S., Žíla V., Bouřa E., Španielová H., Štokrová J. and Forstová J., (2010) Minor capsid proteins of mouse polyomavirus are inducers of apoptosis when produced individually but are only moderate contributors to cell death during the late phase of viral infection. *FEBS Journal* 227, 1270-1283.
- Chang D., Cai X., Consigli R.A. (1993) Characterization of the DNA binding properties of polyomavirus capsid proteins. *Journal of Virology* 67, 6327-6331.
- Chen X.S., Stehle T. and Harrison S.C. (1998) Interaction of polyomavirus internal protein VP2 with the major capsid protein VP1 and implications for participation of VP2 in viral entry. *The EMBO Journal* 17, 3233-3240.
- Jiang M., Abend J. R., Tsai B. and Imperiale, M. J. (2009) Early events during BK virus entry and disassembly. *Virology* 83, 1350-1358.
- Kalderon D., Richardson W.D., Markham A.F. and Smith A.E (1987) Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large- T antigen. *Nature* 311, 33-38.
- Kassem A., Schopflin A., Diaz C., Weyers W., Stickeler E, Wermer M. and Zur Hausen A. (2008) frequent Detection of Merkel Cell Polyomavirus in Human Merkel Cell Carcinomas and Identification of a Unique Deletion in the VP1 Gene. *Cancer Research* 68, 5009-5013.
- Knipe D.M. and Howley P. *Fields Virology*. 5th edition. Lippincott Williams and Wilkins, a Wolters Kluwer business, Philadelphia, 2007, ISBN 978-0-7817-6060-7. *str.* 2265
- Krausewicz N., Štokrová J., Jenkins C., Elliot M., Higgins C.F. and Griffin B.E. (2000) Virus-like gene transfer into cells mediated by polyomavirus pseudocapsids. *Gene Therapy* 7, 2122-2131.
- Lane D.P. and Crawford L.V. (1979) T antigen is bound to a host protein in SV40 transformed cells. *Nature* 278, 261-263.

- 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. USA* 92, 5992-5996.
- Liddington R.C., Yan Y., Moulain J., Sahli R., Benjamin T.L. and Harrison S.C. (1991) Structure of simian virus 40 at 3.8-Å resolution. *Nature* 354, 278 – 284.
- Liebl D., Difato F., Horníková L., Mannová P., Štokrová J. and Forstová J. (2006) Mouse polyomavirus enters early endosomes, requires their acidic pH for productive infection, and meets transferrin cargo in Rab11-positive endosomes. *Journal of Virology* 80, 4610-4622.
- Lilley B. N., Gilbert J. M., Ploegh H. L. and Benjamin B. L. (2006) Murine polyomavirus requires the endoplasmic reticulum protein derlin-2 to initiate infection. *Journal of Virology* 80, 8739-8744.
- Manguson B., Rayney E. K., Benjamin T., Baryshev M., Mkrtchian S. and Tsai B. (2005) ERp29 triggers a conformational chase in polyomaviruses to stimulate membrane binding. *Molecular Cell* 20, 289-300
- Mannová P. and Forstová J. (2003) Mouse polyomavirus utilizes recycling endosomes for traffic pathway independent of COPI vesicle transport. *Journal of Virology* 77, 1672-1681.
- Mannová P., Liebl D., Krauzewicz N., Fejtová A., Štokrová J., Palková Z., Griffin B.E. and Forstová J. (2002) Analysis of mouse polyomavirus mutants with lesions in the minor capsid proteins. *Journal of General Virology* 83, 2309-2319.
- Martel Jantin C., Filippone C., Cassar O., Peter M., Tomasic G., Vielh P., Briere J, Petrella T., Aubriot-Lorton M.H., Mortier L. et al. (2012) Genetic variability and integration of Merkel cell polyomavirus in Merkel cell carcinoma. *Virology* 426, 134-142.
- Montross L., Watkins S., Moreland R.B., Mamon H., Caspar D.L.D., Garcea R.L. (1991) Nuclear assembly of polyomavirus capsids in insect cells expressing the major capsid protein VP1. *Journal of Virology* 65, 4991-4998.
- Moriyama T., Marquez J. P., Wakatsuki T. and Sorokin A. (2007) Caveolar endocytosis is critical for BK virus infection of human renal proximal tubular epithelial cells. *Journal of Virology* 81, 8552- 8562.
- Moriyama T. and Sorokin A. (2008) Intracellular trafficking pathway of BK virus in human renal proximal tubular epithelial cells. *Virology* 371, 336- 349.
- Nakamura T., Sato Y., Watanabe D., Ito H., Shimonohara N., Tsuji T., Nakajima N., Suzuki Y., Matsuo K. et al. (2010) Nuclear localization of Merkel cell polyomavirus large T antigen in Merkel cell carcinoma. *Virology* 398, 273-279.
- Nakanishi A., Shum D., Morioka H., Otsuka E. and Kasamatsu, H. (2002) Interaction of the VP3 nuclear localization signal with the importin alpha2/beta heterodimer directs nuclear entry of infecting simian virus 40. *Journal of Virology* 76, 9368-9377.
- Neu U., Hengel H., Blaum B.S., Scholwalter R.M., Macejak D., Gilbert M., Wakarchuk W.W., Imamura A., Ando H., Kiso M. et al. (2012) Structures of Merkel cell polyomavirus VP1 complexes define a sialic acid binding site required for infection. *PLoS Pathogens* 8, 1-11, e1002738.
- Neu U., Stehle T. and Atwood W.J. (2009) The Polyomaviridae: Contributions of virus structure to our understanding of virus receptors and infectious entry. *Virology* 384, 389-399.
- Neumann F., Borchert S., Schmidt C., Reimer R., Hohenberg H., Fischer N. and Grundhoff A. (2011) Replication, gene expression and particle production by consensus Merkel cell polyomavirus (MCPyV) genome. *Plos One* 6, e29112.

- Ohsawa S., Hamada S., Yoshida H. and Miura M. (2008) Caspase-mediated changes in histoneH1 in early apoptosis: prolonged caspase activation in developing olfactory sensory neurons, *Cell Death and Differentiation*. 15, 1429–1439
- Qian M., Cai D., Verhey K.J. and Tsai B. (2009). A lipid receptor sorts polyomavirus from the endolysosome to the endoplasmic reticulum to cause infection. *PLoS Pathogens* 5, e1000465.
- Pastrana D.V., Pumphrey K.A., Cuburu N., Schowalter R.M. and Buck Ch.B. (2010) Characterization of monoclonal antibodies specific for the Merkel cell polyomavirus capsid. *Virology* 405, 20-25.
- Pelkmans L., Kartenbeck J. and Helenius, A. (2001) Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular transport pathway to the ER. *Nature Cell Biology* 3, 473-483.
- Pelkmans L., Burli T., Zerial M. and Helenius A. (2004) Caveolin-stabilized membrane domains as multifunctional transport and sorting devices in endocytic membrane traffic. *Cell* 118, 767–780.
- Pho M.T., Ashok A. and Atwood W.J. (2000) JC virus enters human glial cells by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. *Journal of Virology* 74, 2288-2292.
- Plevka P. (2002) Vliv polyomaviru a jeho strukturního proteinu VP1 na cytoskelet a organizaci vybraných jaderných proteinů. Diplomová práce. Katedra genetiky a mikrobiologie, P.F. U.K., Praha.
- Rayment I., Baker T.S., Caspar D.L.D. and Murakami W.T. (1982) Polyomavirus capsid structure at 22.5 Å resolution. *Nature* 295, 110-115.
- Richterová Z., Liebl D., Horák M., Palková Z., Štokrová J., Hozák P., Korb J. and Forstová J. (2001) Caveolae are involved in the trafficking of mouse polyomavirus virions and artificial VP1 pseudocapsids toward cell nuclei. *Journal of Virology* 75, 10880-10891.
- Sahli R., Freund R., Dubensky T., Garcea R., Bronson R. and Benjamin T. (1993) Defect in entry and altered pathogenicity of a polyoma virus mutant blocked in VP2 myristylation. *Virology* 192, 142-153.
- Salunke D. M., Caspar D. L. and Garcea R. L. (1986) Self assembly of purified polyomavirus capsid protein VP1. *Cell* 46, 895-904.
- Salunke D. M., Caspar D. L. and Garcea R. L. (1989) Polymorphism in the assembly of polyomavirus capsid protein, VP1. *Biophysical Journal*. 56, 887-900.
- Simmons D.T. (2000) SV40 large T antigen functions in DNA replication and transaformation. *Avances in virus research* 55, 75-134.
- Shuda M., Feng H., Kwun H.J., Rosen S.T., Gjoerup O., Moore P.S. and Chang Y. (2008) T antigen mutations are human tumor-specific signature for Merkel cell polyomavirus. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 16272 – 16277.
- Shuda M., Kwun H.J., Feng H., Chang J. and Moore P.S. (2011) Human Merkel cell polyomavirus small T antigen is an oncoprotein targeting the 4E-BP1 translation regulator. *The Journal of Clinical Investigation* 121, 3623-3634.
- Schelhaas M., Malmström J., Pelkmans L., Haugstetter J., Ellgaard L., Grünewald K. and Helenius A. (2007) Simian virus 40 depends on ER protein folding and quality control factors for entry into host cells. *Cell* 131, 516-529.
- Schmitt M., Wieland U., Kreuter A. and Pawlita M. (2012) C-terminal deletions of Merkel cell polyomavirus large T-antigen, a highly specific surrogate marker for virally induced malignancy. *International Journal of Cancer* 131, 2863-2868.
- Schowalter R.M., Pastrana D. and Buck Ch.B. (2011) Glycosaminoglycans and sialylated glycans sequentially facilitate Merkel cell polyomavirus infectious entry. *PLoS Pathogens* 7, e1002161, 1-18.

Spurgeon M.E. and Lambert P.F. (2013) Merkel cell polyomavirus: Newly discovered human virus with oncogenic potential. *Virology* 435, 118-130.

Stehle T., Yan Y., Benjamin T.L. and 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. and Harrison S.C. (1996) The structure of simian virus 40 refined at 3.1 Å resolution. *Structure* 4, 165-182.

Sweet B.H., Hilleman M.R. (1960) The vacuolating virus, S.V.40. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. Society for Experimental Biology and Medicine 105, 420-427.

Touzé A., Gaitan J., Arnold F., Cazal R., Fleury M.J., Combélas N., Sizaret P-Y, Guyétant S., Maruani A., Baay M., Tognon M. and Coursaget P. (2010) Generation of Merkel Cell Polyomavirus (MCV)-like particles and their application to detection of MCV antibodies. *Journal of Clinical Microbiology* 48, 1767-1770.

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

Vít O. (2010) Studium minoritních kapsidových proteinů myšního polyomaviru. Diplomová práce. Katedra genetiky a mikrobiologie, Př.F. U.K., Praha.

Waga S. and Stillman B. (1994) Anatomy of a DNA replication fork revealed by reconstitution of SV40 DNA replication in vitro. *Nature* 315, 239-242.

Wang J.W. and Roden R.B. (2013) Virus-like particles for the prevention of human papillomavirus-associated malignancies. *Expert Review of Vaccines* 12, 129-141.