

Tímto svoluji k zapůjčení své diplomové práce pro studijní a vědecké potřeby a žádám, aby byla vedena řádná evidence vypůjčovatelů. Všechna data a informace z ní převzatá musí být řádně ocitována.

UNIVERZITA KARLOVA  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Studijní program:

BIOLOGIE

Studijní obor:

GENETIKA, MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE A VIROLOGIE



**MICHAL MRKÁČEK**

STUDIUM INTERAKCÍ HLAVNÍHO STRUKTURNÍHO PROTEINU POLYOMAVIRŮ  
SE STRUKTURAMI HOSTITELSKÝCH BUNĚK

MAJOR STRUCTURAL PROTEIN OF POLYOMAVIRUSES: INTERACTIONS WITH  
HOST CELL STRUCTURES

Diplomová práce

Školitelka: RNDr. Lenka Horníková, Ph.D.

Praha, 2018

**Prohlášení:**

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

V Praze, 13.08.2018

Podpis

Tato práce vznikla v letech 2016–2018 za finanční podpory Grantové agentury České republiky. Číslo grantu je 16-07977S a jeho název zní, Polyomaviry: Buněčné odpovědi na složky virové částice.

Na tomto místě bych rád poděkoval celé své rodině za veškerou podporu, kterou mi poskytli, a to nejenom při psaní této práce ale i během celého mého pětiletého studia na Přírodovědecké fakultě. Dále bych chtěl poděkovat paní docentce RNDr. Jitce Forstové, Csc. za to, že mě před třemi lety přijala do kolektivu Laboratoře molekulární virologie. Největší poděkování pak patří mé školitelce RNDr. Lence Horníkové, Ph.D. za její neuvěřitelnou trpělivost a pomoc při sepisování této diplomové práce.

## ABSTRAKT

Hlavní strukturální protein VP1 je produktem pozdních polyomavirových genů a jedná se o největší a zároveň také nejvíce zastoupený protein celé polyomavirové kapsidy. Vzhledem k nízké kódující kapacitě polyomavirových genomů se uvažuje, že kromě strukturální role by protein VP1 mohl mít v pozdní fázi infekčního cyklu i řadu dalších funkcí. Právě na jejich studium je tato diplomová práce zaměřena. V případě proteinu VP1 myšího polyomaviru bylo pozorováno, že je schopen vázat se na strukturu buněčných mikrotubulů. Prvním cílem této práce bylo otestovat, jestli jsou pentamery proteinu VP1 schopny této vazby i bez účasti dalších buněčných (či virových) proteinů. Na základě *in vitro* experimentu můžeme říci, že se protein VP1 ke struktuře mikrotubulů váže velmi neefektivně. Druhým cílem této práce bylo připravit detekční systém, který by umožnil identifikovat potenciální interakční partnery proteinu VP1 polyomaviru BK. Proto byly připraveny expresní plazmidy produkující N a C koncově značený protein VP1, jenž měl tu vlastnost, být v transfekovaných buňkách biotinylován. Pomocí následné afinitní chromatografie byly izolovány celé proteinové komplexy, jež tento modifikovaný protein obsahovaly. Hmotnostní spektrometrií byly identifikovány jednotlivé izolované proteiny a po následné analýze a filtraci dat byl sestaven seznam 128 potenciálních interakčních partnerů proteinu VP1 polyomaviru BK.

**Klíčová slova:** myší polyomavirus, BK polyomavirus, protein VP1, VLPs, mikrotubuly, interakční partneři

## ABSTRACT

The main structural protein VP1 is the product of late polyomaviral genes and it is the largest and the most abundant protein of the whole polyomaviral capsid. Because of the low coding capacity of the polyomaviral genomes, it is considered that in addition to its structural role the VP1 protein might have some additional functions in the late phase of the infectious cycle. This diploma thesis is exactly on these additional functions. In the case of the VP1 protein of mouse polyomavirus, it was observed that the protein is capable of binding to the structure of cellular microtubules. The first objective of this work was to test whether pentamers of the VP1 protein are able of this binding without the participation of other cellular (or viral) proteins. Based on an *in vitro* experiment, we showed that protein VP1 binds to the structure of microtubules very inefficiently. The second objective of this work was to prepare a detection system that would allow an identification of potential interaction partners of BK polyomavirus VP1 protein. Therefore, expression plasmids producing the N and C-terminally tagged VP1 protein were prepared. These tagged proteins had the property of being biotinylated whilst being produced in the transfected cells. By using affinity chromatography, the entire protein complexes containing the modified protein were isolated. Using mass spectrometry, individual isolated proteins were identified and after a subsequent analysis and data filtering, a list of 128 potential interaction partners of BK polyomavirus VP1 protein was compiled.

**Keywords:** mouse polyomavirus, BK polyomavirus, VP1 protein, VLPs, microtubules, interactions partners

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

<b><math>\alpha</math>-SNAP</b>	rozpustný N-ethylmaleimid senzitivní protein zprostředkující vazbu a fúzy váčků
<b>AcNPV</b>	virus tvořící polyhedra v jádrech buněk mola <i>Autographa californica</i>
<b>AP-1</b>	aktivační protein 1
<b>APS</b>	amonium persulfát
<b>ATM</b>	protein mutovaný u syndromu Ataxia telangiectasia
<b>BBSome</b>	komplex proteinu, jejichž defektu se projevuje jako Bardet-Biedl syndrom
<b>BKPyV</b>	BK polyomavirus
<b>BSA</b>	bovinní sérový albumin
<b>CCC DNA</b>	kovalentně uzavřená kruhová forma DNA
<b>CstF</b>	faktor stimulující štěpení (při polyadenylaci mRNA)
<b>CT-VP1</b>	C koncově značený protein VP1
<b>DAPI</b>	4',6-diamidin-2-fenylindol
<b>DEAD/DEAH helikázy</b>	RNA helikázy s konzervovaným motivem aspartát-glutamát-alanin-aspartát/histidin
<b>DMEM</b>	Eaglovo médium modifikované Dulbeccem
<b>DTT</b>	1,4-dithiotreitol
<b>E2F</b>	časný faktor 2
<b>EDTA</b>	kyselina ethylendiamintetraoctová
<b>EGTA</b>	kyselina egtazidová
<b>ERAD</b>	degradační dráha asociovaná s endoplazmatickým retikulem
<b>ERdj5</b>	protein 5 endoplazmatického retikula obsahující doménu DNA J
<b>FBS</b>	fetální bovinní sérum
<b>FEN1</b>	endonukléza 1 štěpící DNA přesah (u Okazakiho fragmentu)
<b>GFP</b>	zelený fluorescenční protein
<b>GTB</b>	obecný tubulinový pufr

<b>HEK293</b>	lidské ledvinné embryonální epiteliální buňky (klon 293)
<b>Hsc70</b>	protein teplotního šoku (70 kDa)
<b>Hsp90</b>	protein teplotního šoku (90 kDa)
<b>Hsp105</b>	protein teplotního šoku (105 kDa)
<b>ICTV</b>	Mezinárodní výbor pro taxonomii virů
<b>JCPyV</b>	JC polyomavirus
<b>LB médium</b>	Luria-Bertani médium
<b>MAP</b>	mikrotubul asociované proteiny
<b>MBA</b>	N,N'-methylenbisakrylamid
<b>MPyV</b>	myší polyomavirus
<b>NCCR</b>	nekódující kontrolní oblast
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	jaderný faktor $\kappa$ B
<b>NRZ komplex</b>	komplex proteinů NAG, RINT1 a ZW10
<b>NT-VP1</b>	N koncově fúzovaný protein VP1
<b>OC DNA</b>	otevřená kruhová forma DNA
<b>OD</b>	optická denzita
<b>p53</b>	protein 53
<b>PARP1</b>	poly(ADP-ribóza) polymeráza 1
<b>PBS</b>	fosfátový pufr
<b>PCNA</b>	jaderný antigen proliferujících buněk
<b>PI3K</b>	fosfatidylinositol 3 kináza
<b>Pipes</b>	1,4-Piperazindiethansulfonová kyselina
<b>PP2A</b>	protein fosfatáza 2A
<b>pRB</b>	retinoblastomový protein
<b>rpm</b>	počet otáček za minutu
<b>RPTE buňky</b>	renální epiteliální buňky proximálních tubulů
<b>SDS-PAGE</b>	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s dodecylsíránem sodným
<b>Sf9</b>	linie buněk z ovaríí můry <i>Spodoptera frugiperda</i> (klon 9)



<b>SGTA</b>	malý protein $\alpha$ obsahující repetice tetratrikopeptidu bohatého na glutamin
<b>siRNA</b>	malé interferující RNA
<b>SOC</b>	super optimální bujón (bakteriální médium)
<b>SV40</b>	opičí vakuolizující virus 40
<b>tAg</b>	malý t antigen
<b>TAg</b>	velký T antigen
<b>TBE pufr</b>	tris-borátový pufr s EDTA
<b>TE pufr</b>	tris pufr s EDTA
<b>TEMED</b>	tetramethylethyldiamin
<b>TEV</b>	virus leptající rostlinu tabáku
<b>TPN</b>	total parental nutrition (bakteriální médium)
<b>Tris</b>	tris(hydroxymethyl)aminomethan
<b>truncAg</b>	zkrácený T antigen
<b>VLPs</b>	viru podobné částice
<b>VP1 (2,3)</b>	virový protein 1 (2,3)
<b>YY1</b>	transkripční faktor Yin Yan 1

# OBSAH

<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>1. LITERÁRNÍ PŘEHLED</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1 ČELEĎ <i>POLYOMAVIRIDAE</i></b> .....	<b>4</b>
<b>2.2 MYŠÍ <i>POLYOMAVIRUS</i></b> .....	<b>6</b>
<b>2.3 BK <i>POLYOMAVIRUS</i></b> .....	<b>6</b>
<b>2.4. STRUKTURA A ORGANIZACE GENOMU</b> .....	<b>7</b>
<b>2.5. PRŮBĚH INFEKČNÍHO CYKLU NA PŘÍKLADU BK <i>POLYOMAVIRU</i></b> .....	<b>11</b>
<b>2.6. STRUKTURA A ORGANIZACE VIRIONU</b> .....	<b>14</b>
<b>2.7. DALŠÍ STRUKTURY VZNIKLÉ Z KAPSIDOVÝCH PROTEINŮ</b> .....	<b>18</b>
<b>2.8 HLAVNÍ KAPSIDOVÝ PROTEIN <i>VP1</i></b> .....	<b>18</b>
<b>2.9. INTERAKCE MEZI MIKROTUBULY A <i>VP1</i> MYŠÍHO <i>POLYOMAVIRU</i></b> .....	<b>22</b>
<b>3. CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>24</b>
<b>4. MATERIÁLY A METODY</b> .....	<b>26</b>
<b>4.1 MATERIÁLY</b> .....	<b>27</b>
<b>4.1.1 ROZTOKY</b> .....	<b>27</b>
<b>4.1.2 ANTIBIOTIKA</b> .....	<b>27</b>
<b>4.1.3 BAKTERIÁLNÍ MÉDIA</b> .....	<b>27</b>
<b>4.1.4 MÉDIA PRO TKÁŇOVÉ KULTURY</b> .....	<b>28</b>
<b>4.1.5 BAKTERIÁLNÍ KMENY</b> .....	<b>28</b>
<b>4.1.6 BUNĚČNÉ LINIE</b> .....	<b>28</b>
<b>4.1.7 BAKULOVÍROVÉ VEKTORY</b> .....	<b>28</b>
<b>4.1.8 PLAZMIDOVÉ VEKTORY</b> .....	<b>28</b>
<b>4.1.9 KOMERČNÍ KITY</b> .....	<b>30</b>
<b>4.1.10 PROTILÁTKY</b> .....	<b>31</b>
<b>4.1.11 MARKERY MOLEKULOVÝCH HMOTNOSTÍ</b> .....	<b>31</b>
<b>4.2 PRÁCE S BAKTERIÁLNÍMI KMENY</b> .....	<b>32</b>
<b>4.2.1 PŘÍPRAVA ELEKTROKOMPETENTNÍCH BUNĚK</b> .....	<b>32</b>
<b>4.2.2 TRANSFORMACE ELEKTROKOMPETENTNÍCH BUNĚK ELEKTROPORACÍ</b> .....	<b>32</b>
<b>4.2.3 KULTIVACE BAKTERIÍ V SUSPENZI</b> .....	<b>33</b>
<b>4.2.4 KULTIVACE BAKTERIÍ NA PEVNÝCH MEDIÍCH</b> .....	<b>33</b>
<b>4.2.5 KONZERVACE BAKTERIÍ PRO DLOUHODOBÉ SKLADOVÁNÍ</b> .....	<b>33</b>

<b>4.3 PRÁCE S BUNĚČNÝMI KULTURAMI .....</b>	<b>34</b>
<b>4.3.1 PASÁŽOVÁNÍ SAVČÍCH BUNĚK LINIE HEK293 .....</b>	<b>34</b>
<b>4.3.2 STANOVENÍ POČTU BUNĚK V SUSPENZI .....</b>	<b>34</b>
<b>4.3.3 TRANSFEKCE BUNĚK LINIE HEK293.....</b>	<b>35</b>
<b>4.3.4 NEPŘÍMÁ IMUNOFLUORESCENCE .....</b>	<b>36</b>
<b>4.3.5 FRAKCIONACE BUNĚK LINIE HEK293 (JÁDRO/CYTOPLAZMA).....</b>	<b>36</b>
<b>4.3.6 PASÁŽOVÁNÍ HMYZÍCH BUNĚK LINIE Sf9.....</b>	<b>37</b>
<b>4.3.7 INFEKCE HMYZÍCH BUNĚK LINIE Sf9 REKOMBINANTNÍM BAKULOVIREM .....</b>	<b>37</b>
<b>4.4 PRÁCE S DNA.....</b>	<b>38</b>
<b>4.4.1 IZOLACE PLAZMIDOVÉ DNA POMOCÍ KOMERČNÍCH SOUPRAV .....</b>	<b>38</b>
<b>4.4.2 MINIPREPARACE PLAZMIDŮ Z BAKTERIÍ POMOCÍ ALKALICKÉ METODY .....</b>	<b>39</b>
<b>4.4.3 STANOVENÍ KONCENTRACE A ČISTOTY DNA .....</b>	<b>40</b>
<b>4.4.4 REKOMBINACE PLAZMIDŮ SYSTÉMEM GATEWAY .....</b>	<b>40</b>
<b>4.4.5 RESTRIKČNÍ ŠTĚPENÍ PLAZMIDOVÉ DNA .....</b>	<b>41</b>
<b>4.4.6 AGARÓZOVÁ DNA ELEKTROFORÉZA.....</b>	<b>41</b>
<b>4.5 PRÁCE S PROTEINY.....</b>	<b>42</b>
<b>4.5.1 PŘÍPRAVA BUNĚČNÝCH LYZÁTŮ PRO PROTEINOVOU ELEKTROFORÉZU .....</b>	<b>42</b>
<b>4.5.2 MĚŘENÍ KONCENTRACE PROTEINŮ METODOU BRADFORDA .....</b>	<b>42</b>
<b>4.5.3 PROTEINOVÁ ELEKTROFORÉZA (SDS-PAGE) .....</b>	<b>42</b>
<b>4.5.4 PROTEINOVÁ ELEKTROFORÉZA V GRADIENTOVÉM GELU .....</b>	<b>43</b>
<b>4.5.5 BARVENÍ PROTEINŮ V POLYAKRYLAMIDOVÉM GELU.....</b>	<b>44</b>
<b>4.5.6 IMOBILIZACE PROTEINŮ NA MEMBRÁNĚ.....</b>	<b>44</b>
<b>4.5.7 IMUNODETEKCE PROTEINŮ IMOBILIZOVANÝCH NA MEMBRÁNĚ .....</b>	<b>44</b>
<b>4.5.8 PŘÍPRAVA BUNĚČNÝCH LYZÁTŮ PRO IZOLACI PROTEINOVÝCH KOMPLEXŮ .....</b>	<b>45</b>
<b>4.5.9 AFINITNÍ CHROMATOGRAFIE .....</b>	<b>45</b>
<b>4.5.10 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE .....</b>	<b>47</b>
<b>4.5.11 PŘÍPRAVA LYZÁTŮ Z BUNĚK LINIE Sf9 PRO IZOLACI VLPs.....</b>	<b>47</b>
<b>4.5.12 IZOLACE VLPs ULTRACENTRIFUGACÍ.....</b>	<b>48</b>
<b>4.5.13 HEMAGLUTINACE .....</b>	<b>49</b>
<b>4.5.14 ROZKLAD VLPs.....</b>	<b>49</b>
<b>4.5.15 TESTOVÁNÍ VAZBY PENTAMER PROTEINU VP1 K MIKROTUBULŮM.....</b>	<b>50</b>
<b>4.5.16 TRANSMISNÍ ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE – METODA NEGATIVNÍHO BARVENÍ .....</b>	<b>51</b>

<b>5. VÝSLEDKY</b> .....	52
<b>5.1 <i>IN VITRO</i> TESTOVÁNÍ VAZBY PROTEINU VP1 MÝŠÍHO POLYOMAVIRU KE STRUKTUŘE MIKROTUBULŮ</b> .....	53
5.1.1 IZOLACE, PURIFIKACE A KVANTIFIKACE VIROVÝCH ČÁSTIC SLOŽENÝCH Z PROTEINU VP1.....	53
5.1.2 ROZKLAD VLPS NA JEDNOTLIVÉ PENTAMERY PROTEINU VP1.....	58
5.1.3 <i>IN VITRO</i> VAZBA PENTAMER PROTEINU VP1 K MIKROTUBULŮ.....	60
<b>5.2 PŘÍPRAVA DETEKČNÍHO SYSTÉMU PRO VYHLEDÁVÁNÍ POTENCIÁLNÍCH INTERAKČNÍCH PARTNERŮ PROTEINU VP1 POLYOMAVIRU BK A ANALÝZA ZÍSKANÝCH DAT</b> .....	66
5.2.1 PŘÍPRAVA PLAZMIDŮ EXPRIMUJÍCÍCH HLAVNÍ KAPSIDOVÝ PROTEIN VP1.....	66
5.2.2 FRAKCIONACE BUNĚK LINIE HEK293 EXPRIMUJÍCÍ PROTEIN VP1.....	72
5.2.3 TESTOVÁNÍ ROZPUSTNOSTI PROTEINU VP1.....	74
5.2.4 IZOLACE PROTEINOVÝCH KOMPLEXŮ OBSAHUJÍCÍCH PROTEIN VP1 AFINITNÍ CHROMATOGRAFIÍ S VYUŽITÍM BIOTIN-STREPTAVIDINOVÉ INTERAKCE.....	76
5.2.5 ANALÝZA DAT ZÍSKANÝCH Z Hmotnostní spektrometrie.....	79
<b>6. DISKUZE</b> .....	82
<b>6.1 PROTEIN VP1 MÝŠÍHO POLYOMAVIRU NENÍ SCHOPEN SE <i>IN VITRO</i> EFEKTIVNĚ VÁZAT MIKROTUBULY</b> .....	83
<b>6.2. IDENTIFIKACE POTENCIÁLNÍCH INTERAKČNÍCH PARTNERŮ PROTEINU VP1 POLYOMAVIRU BK</b> .....	87
<b>7. ZÁVĚRY</b> .....	93
<b>8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	95
<b>9. PŘÍLOHY</b> .....	104
9.1 MAPY POUŽITÝCH PLAZMIDŮ.....	105
9.2 SEZNAM POTENCIÁLNÍCH INTERAKČNÍCH PARTNERŮ PROTEINU VP1 POLYOMAVIRU BK.....	113

# 1. ÚVOD

Jsou viry živé nebo neživé? To je otázka, na jejíž odpovědi se vědci ani v roce 2018 stále nedokáží shodnout. At již má kdokoliv na tuto otázku jakoukoliv odpověď, tak pravdou zůstává, že viry vždy byly, jsou ale i budou nedílnou součástí života na Zemi. Existuje jich nepřeberné množství a často se od sebe jednotlivé virové řády či čeledě liší více než rostliny od zvířat. Jedna věc je ale spojuje. Vždy se totiž jedná o obligátní parazity, kteří pro svoji úspěšnou replikaci vyžadují translační aparát hostitelské buňky. A je jedno, jestli se jedná o bakteriofágy infikující bakterie či megaviry napadající améby. To, jakým způsobem viry dokáží infikované buňky přeprogramovat pro účely své vlastní replikace, se ale může značně lišit. Některé viry kódují velké množství proteinů, pomocí kterých mohou jemně modulovat prostředí infikované buňky. Jiné viry dokáží to samé, a to jen s hrstkou proteinů. Do této skupiny patří i polyomaviry, jejichž studiu je tato práce věnována.

Polyomaviry jsou malé viry s jen velmi nízkou kódující kapacitou. V molekulární biologii polyomaviry donedávna hrály velkou roli v objasnění řady klíčových procesů účastnících se zpracování genetické informace a procesu tumorigeneze. S objevem lidských polyomavirů BK a JC a nedávno popsaném polyomaviru karcinomu Merkelových buněk se studium této čeledi ale spíše přesouvá směrem ke studiu jejich patogenních vlivů na lidský organismus. Vzhledem k tomu, že polyomaviry kódují většinou jen kolem 6 proteinů, tak tyto viry vyvinuly dvě strategie. Jednak během svého replikačního cyklu využívají co nejvíce proteinů hostitelské buňky. Kromě translačního aparátu tedy využívají i aparát transkripční či replikační a mimo jiné regulují svou genovou expresi podobným způsobem jako jejich hostitelské buňky. Druhým typem polyomavirové strategie je kódování multifunkčních proteinů, které jsou schopny plnit vícero úloh při virové infekci. Tato strategie se v plné míře uplatňuje u časných proteinů polyomavirů a nejlépe je charakterizována u velkého T antigenu. Tento protein v buňce plní řadu úloh od zablokování předčasné apoptózy až po iniciaci replikace virového genomu. V případě pozdních proteinů, jež tvoří převážně kapsidové proteiny, se o takovýchto funkcích rovněž uvažuje, ale nejsou příliš prozkoumané. Tématem této diplomové práce je studium právě těchto možných funkcí, a to u dvou modelových virů čeledi *Polyomaviridae*, myšího polyomaviru a lidského BK polyomaviru.

# **1. LITERÁRNÍ PŘEHLED**

## 2.1 ČELEĎ *POLYOMAVIRIDAE*

Čeď *Polyomaviridae* je taxonomické označení skupiny malých neobalených DNA virů, které mají potenciál vyvolat onkogenní onemocnění u svých hostitelů. Podle Baltimorova schématu patří polyomaviry spolu s papilomaviry, adenoviry a dalšími viry do skupiny číslo I, neboť jejich genetická informace je kódována kruhovou dvouřetězcovou DNA molekulou. Na základě podobnosti ve struktuře jejich genomu a kapsidy patřily polyomaviry dříve spolu s papilomaviry do jedné čeledi, která nesla označení *Papovaviridae*. V roce 1999 však Mezinárodní komise pro taxonomii virů (ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses) taxon *Papovaviridae* zrušila, a tím byly polyomaviry ustaveny jako samostatná čeď (Regenmortel *et al.*, 1999). V současnosti je čeď *Polyomaviridae* rozdělena do čtyř rodů, a to *Aflapolyomavirus*, *Betapolyomavirus*, *Gamapolyomavirus* a *Deltapolyomavirus*. Mezi tyto čtyři rody je podle rozhodnutí ICTV dnes rozděleno celkem 83 známých druhů polyomavirů, přičemž nejvíce se jich nachází v rodech *Alfapolyomavirus* (38) a *Betapolyomavirus* (32). Kromě toho se v čeledi nachází ještě dalších pět druhů polyomavirů, které v současnosti nejsou zařazeny do žádného z výše uvedených rodů (<https://talk.ictvonline.org/taxonomy>, 03.08.2018).

Název polyomavirus pochází z řečtiny. Slovo poly se překládá jako mnoho a označená nádor. Ve volném překladu je tedy polyomavirus označení viru způsobujících mnoho typů nádorů. Tento název byl poprvé použit v roce 1958 (Stewart *et al.*, 1958) při studiu prvního objeveného polyomaviru, a to myšího polyomaviru (MPyV). Druhým objeveným polyomavirem pak byl Opičí vakuolizující virus 40 (SV40, Simian vacuolating virus 40), který byl objeven v roce 1960 jako kontaminanta starších poliovirových vakcín (Sweet a Hilleman, 1960). Vzhledem k potenciální onkogenitě polyomavirů, která byla prokázána i u viru SV40 (Eddy *et al.*, 1962; Girardi *et al.*, 1962), toto zjištění vyvolalo řadu obav. Nicméně do dneška nebyla prokázána žádná asociace viru SV40 s lidským rakovinným onemocněním.

První lidské polyomaviry byly objeveny až v roce 1971. V tomto roce byly vyizolovány hned dva viry, a to polyomavirus BK (Gardner *et al.*, 1971) a polyomavirus JC (Padgett *et al.*, 1971). Poté dlouhou dobu nebyl nalezen žádný nový lidský polyomavirus a to až do roku 2007, kdy byly opět objeveny hned dva nové viry (Allander *et al.*, 2007; Gaynor *et al.*, 2007). Další rok pak byl objeven polyomavirus karcinomu Merkelových buněk, který okamžitě vzbudil zájem odborné veřejnosti, neboť se jedná o původce agresivního lidského nádorového onemocnění (Feng *et al.*, 2008). Následně se seznam lidských polyomavirů velmi rychle rozrůstal a k dnešku jich bylo identifikováno již celkem 14. Jejich výčet je shrnut v tabulce číslo 1.



**Tabulka č. 1 – Seznam popsaných lidských polyomavirů**

<b>Druh</b>	<b>Rod</b>	<b>Název viru</b>	<b>Zkratka</b>	<b>Publikace</b>
Lidský polyomavirus 1	Beta-	BK polyomavirus	BKPyV	Gardner <i>et al.</i> , 1971
Lidský polyomavirus 2	Beta-	JC polyomavirus	JCPyV	Padgett <i>et al.</i> , 1971
Lidský polyomavirus 3	Beta-	KI polyomavirus	KIPyV	Allander <i>et al.</i> , 2007
Lidský polyomavirus 4	Beta-	WU polyomavirus	WUPyV	Gaynor <i>et al.</i> , 2007
Lidský polyomavirus 5	Alfa-	Polyomavirus karcinomu Merkelových buněk	MCPyV	Feng <i>et al.</i> , 2008
Lidský polyomavirus 6	Delta-	Lidský polyomavirus 6	HPyV6	Schowalter <i>et al.</i> , 2010
Lidský polyomavirus 7	Delta-	Lidský polyomavirus 7	HPyV7	Schowalter <i>et al.</i> , 2010
Lidský polyomavirus 8	Alfa-	Polyomavirus asociovaný s nemocí Trichodysplasia spinulosa	TSPyV	van der Meijden <i>et al.</i> , 2010
Lidský polyomavirus 9	Alfa-	Lidský polyomavirus 9	HPyV9	Scuda <i>et al.</i> , 2011
Lidský polyomavirus 10	Delta-	MW polyomavirus	MWPyV	Siebrasse <i>et al.</i> , 2012
Lidský polyomavirus 11	Delta-	STL polyomavirus	STLPyV	Lim <i>et al.</i> , 2013
Lidský polyomavirus 12	Alfa-	Lidský polyomavirus 12	HPyV12	Korup <i>et al.</i> , 2013
Lidský polyomavirus 13	Alfa-	New Jersey polyomavirus	NJPyV	Mishra <i>et al.</i> , 2014
Lidský polyomavirus 14	Zatím nezařazen	Lyon IARC polyomavirus	LIPyV	Gheit <i>et al.</i> , 2017

Hostitelské spektrum polyomavirů však není vázáno pouze na savce. Další široce infikovanou třídou obratlovců jsou například ptáci. U těchto tvorů však bývá průběh infekce poměrně odlišný. Zatímco u savců vyvolávají polyomaviry většinou persistentní infekce, které mohou způsobovat komplikace až po imunosupresi či imunodeficienci, tak u ptáků polyomaviry vyvolávají vážné akutní infekce, které velmi často končí smrtí (přehledně shrnuto v Johna a Muller, 2007). Mimo to byly identifikovány i polyomaviry infikující ryby jako například polyomavirus Kytarovce jemenského (*Rhynchobatus djiddensis polyomavirus 1*). Na základě stále nových a nových sekvenčních dat se v současnosti předpokládá, že každý druh obratlovce je hostitelem minimálně jednoho viru z této čeledi.

## 2.2 MYŠÍ POLYOMAVIRUS

Myší polyomavirus byl prvním popsaným polyomavirem, jehož rakvinotvorné vlastnosti daly název celé čeledi. Z taxonomického hlediska patří MPyV do rodu *Alfapolyomavirus* a jak již z názvu vyplývá jedná se o zvířecí patogen, jenž se přenáší mezi hlodavci. Název polyomavirus byl sice poprvé použit až v roce 1958, ale virus samotný virus byl vůbec poprvé zdokumentován již v roce 1953 doktorem Ludwigem Grosse. Doktor Gross původně studoval možnost přenosu leukémie u myší pomocí bezbuněčných extraktů a hledal infekční agens za to zodpovědné. Když ale inokuloval extrakty do novorozených myší, všimnul si, že kromě leukémie část myší vyvinula i párové nádory slinných žláz. Zároveň demonstroval, že tento nový infekčního agens se oproti tomu leukemickému liší ve své velikosti a dalších fyzikálních vlastnostech (Gross, 1953). Kromě indukce nádorů u myší byly jeho rakvinotvorné vlastnosti popsány i u krys, morčat a křečků. Nádory bylo možné vyvolat i u novorozených králíků. Ty se ale po určité době sami odhojily (Stewart *et al.*, 1958; Eddy a Stewart, 1959). O epidemiologii se v případě MPyV vzhledem k jeho hostitelskému spektru příliš neví. Bylo publikováno, že virus je mezi hlodavci relativně hojně rozšířen a že vyvolává celoživotní perzistentní infekci. Je možné ho detekovat v moči, výkalech i slinách infikovaných myší (Rowe, 1961). Vznik nádorů patrně vyvolává jen u novorozených či u imunosuprimovaných jedinců. Normálně jsou novorozené myši před virem chráněny mateřskými protilátkami (Law *et al.*, 1962).

## 2.3 BK POLYOMAVIRUS

BK polyomavirus nebo také *Lidský polyomavirus 1* byl prvním zdokumentovaným lidským polyomavirem. Taxonomicky je BKPyV řazen do rodu *Betapolyomavirus* a v současnosti se podle polymorfismu v hlavním kapsidovém proteinu VP1 dělí BKPyV na celkem 4 subtypy, které se mezi sebou liší frekvencí výskytu i geografickou distribucí. Subtyp I je rozšířen celosvětově, zatímco subtyp IV se vyskytuje skoro výhradně jen v Evropě a Východní Asii. Výskyt subtypů II a III je pak ve světové populaci méně častý (Jin *et al.*, 1993; Yogo *et al.*, 2009). Poprvé byl BKPyV izolován v roce 1971 poté, co byly Vero buňky inokulovány vzorkem moči odebrané od 39letého pacienta súdánského původu (iniciály B.K.), který byl v imunosupresi po transplantaci ledvin (Gardner *et al.*, 1971). Co se týče patologických onemocnění tak BKPyV je problém právě pro pacienty po transplantaci ledvin, u kterých může vyvolat tzv. polyomavirem způsobenou nefropatii (Ramos *et al.*, 2009). Kromě toho působí problémy i u lidí po transplantaci kostní dřeně, u kterých je v některých případech BKPyV asociován s tzv. hemoragickou cystitidou (Dropulic a Jones, 2008). Klíčovým faktorem při vzniku těchto onemocnění je patrně uměle

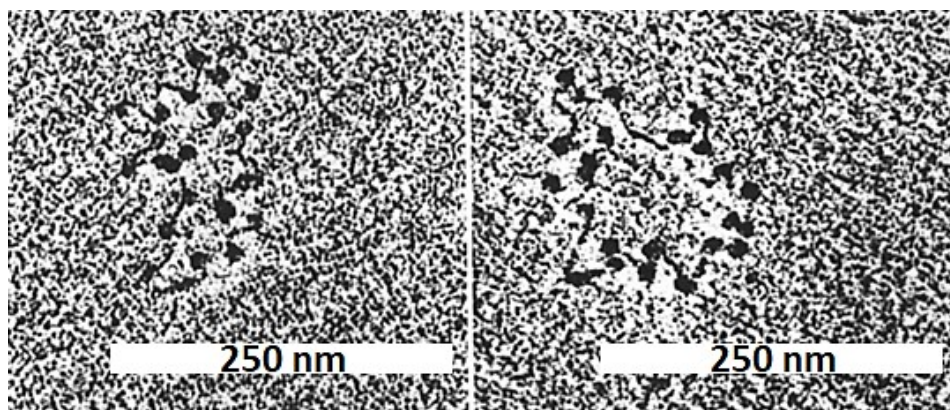
navozená imunosuprese, která má zabránit odmítnutí štěpu, protože na základě sérologické studie z roku 2009 má 82 % světové populace protilátky proti BKPyV již k 21. roku života. Virus je tedy v populaci hojně rozšířen a k primární infekci dochází zřejmě již v dětství (Kean *et al.*, 2009). Poté BKPyV patrně perzistuje v ledvinách a urogenitálním traktu, kde je infekce kontrolována imunitním systémem (Heritage *et al.*, 1981). Při imunosupresi se ale tato křehká rovnováha může narušit a BKPyV se začne nekontrolovaně replikovat.

Ke vstupu BKPyV do lidského organismu dochází s největší pravděpodobností respirační či orální cestou a primárním místem infekce jsou nejspíše krční mandle, ve kterých lze u dětí detekovat virovou DNA. Obecně vzato však bývá primární infekce asymptomatická nebo jí provází jen mírné respirační potíže (Goudsmit *et al.*, 1982). Nejsou vyloučeny ani další způsoby přenosu viru jako například ejakulátem, transfúzí krve, transplacentárně či infikovaným štěpem při transplantaci (diskutováno v Hirsch a Steiger, 2003). K šíření viru organismem využívá BKPyV nejspíše cirkulující buňky imunitního systému, protože DNA BKPyV s archetypálním či rekombinovaným NCCR lze nalézt v leukocytech periferní krve (Chatterjee *et al.*, 2000). Přes leukocyty se BKPyV zřejmě dostává i do ledvin, kde celoživotně perzistuje. Pomocí imunohistochemie bylo ukázáno, že virus lze detekovat v epiteliálních buňkách ledvin, močovodu i močového měchýře (Shinohara *et al.*, 1993). Občas pak může dojít k reaktivaci viru u zdravých jedinců a k jeho uvolnění do moči a pak dále do vnějšího prostředí (Arthur a Shah, 1989). Jak již bylo psáno výše, tak v některých případech se při imunosupresi může virus dostat zpod kontroly imunitního systému a působit závažná patologická onemocnění (Dropulic a Jones, 2008; Ramos *et al.*, 2009).

## 2.4. STRUKTURA A ORGANIZACE GENOMU

Jak již bylo zmíněno, tak genom všech polyomavirů je tvořen kruhovou dvouřetězcovou molekulou DNA. Délka této molekuly se liší mezi jednotlivými polyomaviry, ale vždy se pohybuje kolem 5 000 páru bází. Vzhledem k tomu, že se všechny polyomaviry replikují v jádře infikovaných buněk, tak podobně jako hostitelská DNA jsou i jejich genomy asociované s buněčnými histony, jež vytváří struktury nukleosomu. Virový genom se tedy vyskytuje ve formě kruhového minichromosomu (Griffith, 1975; Howe a Tan, 1977), jehož přibližnou strukturu můžeme na příkladu viru SV40 pozorovat na obrázku č. 1. Tuto strukturu můžeme nalézt nejen v jádrech infikovaných buněk ale také uvnitř maturované kapsidy (Germond *et al.*, 1975). Rozdíl mezi virovou a hostitelskou DNA je však v přítomnosti histonu H1. Ten sice s virovou DNA asociuje během replikačního cyklu, ale v průběhu enkapsidace je z minichromosomu odstraněn a opět s ní asociuje až při dalším kole infekce (Varshavsky *et al.*, 1976; La Bella a Vesco, 1980). Přítomnost histonů na virové DNA rovněž

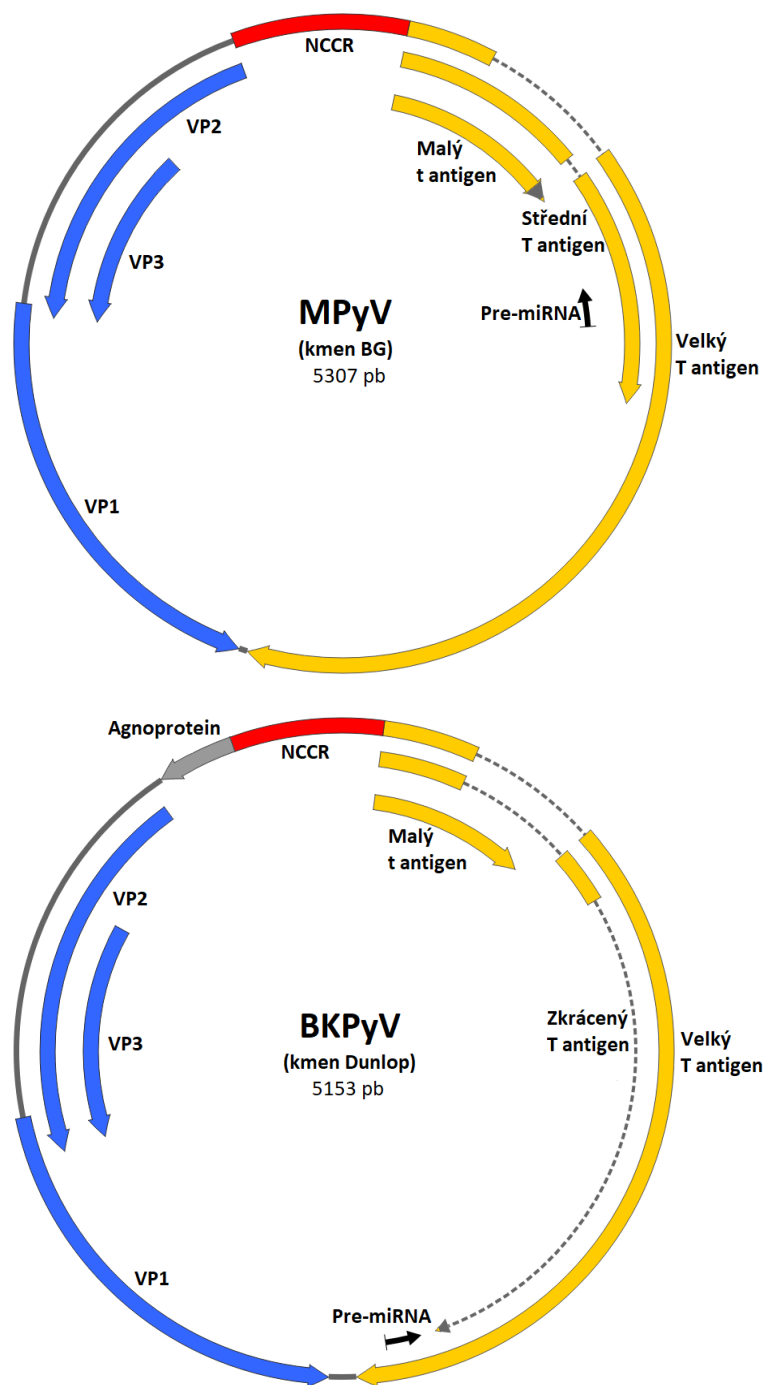
umožňuje polyomavirům využít i systém epigenetických modifikací, kterými buňka reguluje svou genovou expresi (přehledně shrnuto v Milavetz a Balakrishnan, 2015).



**Obrázek č. 1 – Struktura minichromosomu viru SV40**

Na obrázku z elektronového mikroskopu můžeme pozorovat minichromosomy viru SV40, které byly izolovány z virionů. Patrné jsou struktury odpovídající nukleosomům, jež jsou nabalené na virové DNA. Převzato a upraveno z Germond *et al.*, 1975.

Co se týče samotné organizace polyomavirového genomu, tak ten můžeme rozdělit na celkem tři funkční oblasti. Grafické znázornění této organizace je ukázáno na příkladu MPyV a BKPyV na obrázku č. 2. První z těchto oblastí je nekódující kontrolní oblast označovaná anglickou zkratkou NCCR (Non-Coding Control Region). V této oblasti genomu se nachází jak virový počátek replikace, tak i dva promotory, jeden regulující expresi časných genů a druhý pro regulaci exprese pozdních genů. Při pozorování minichromosomu v elektronovém mikroskopu se rovněž ukázalo, že v této oblasti se prakticky nevyskytují žádné nukleosomy (Jakobovits *et al.*, 1980). To je pochopitelné vzhledem k tomu, že tato oblast slouží jako dvojitý promotor i jako místo vazby různých buněčných transkripčních faktorů, jako například AP-1 či NF- $\kappa$ B (přehledně shrnuto ve White *et al.*, 2009). Délka NCCR je velmi variabilní, a to nejen mezi různými druhy polyomavirů ale i v rámci jednoho druhu. Zpravidla se však pohybuje mezi 300-500 páry bází. Důvodem, proč je délka NCCR variabilní, i v rámci jednoho druhu polyomaviru, je bezesporu vysoká frekvence delecí a duplikací, ke kterým zde dochází při replikaci virové DNA. Tyto změny pak vedou k tomu, že se zvyšuje počet vazebných míst pro transkripční faktory, a díky tomu dochází k jakési selekci replikačně nejvíce kompetentního viru. To bylo pozorováno například u JC polyomaviru (JCPyV), kde bylo experimentálně prokázáno, že viry s rekombinativním NCCR mají vyšší úroveň transkripce i replikace než virus s nerekombinativním tzv. archetypálním NCCR (Gosert *et al.*, 2010). Zajímavé je, že právě tyto viry, i přes horší schopnost replikace, jsou formou, která se přirozeně šíří v populaci. K rekombinaci NCCR tedy musí docházet až v průběhu virové perzistence v novém hostiteli a vzniklé NCCR jsou tedy vždy unikátní (přehledně shrnuto v Yogo a Sugimoto, 2001).



**Obrázek č. 2 – Schéma organizace polyomavirového genomu na příkladu myšího polyomaviru (MPyV) a BK polyomaviru (BKPyV).**

Na obrázku je znázorněno základní funkční rozdělení polyomavirového genomu na příkladu MPyV a BKPyV. Červeně je označená nekódující kontrolní oblast (NCCR) zatímco žlutě jsou označeny časné geny polyomavirů. Pozdní geny jsou označeny modrou barvou. Navíc u BKPyV je v pozdní oblasti kódován i nestrukturní Agnoprotein (označen šedivě). Grafické znázornění genomů bylo připraveno v programu SnapGene (<http://www.snapgene.com>), za použití sekvencí dostupných v databázi GenBank pod AC čísla NC\_001515 (MPyV) a V01108.1 (BKPyV).

Dalším funkčně důležitým úsekem polyomavirového genomu je oblast tzv. časných genů, k jejichž transkripci dochází bezprostředně po vstupu viru do jádra infikované buňky. Exprese těchto genů slouží polyomavirům především k tomu, aby v buňce navodili vhodné prostředí pro vlastní replikaci. Proteiny, jež tato oblast kóduje, se rovněž nazývají jako T antigeny, protože pokud jsou samostatně exprimovány v buňce, dokáží navodit její nádorovou transformaci. Největším virovým produktem této oblasti je tzv. velký T antigen (TAg). Tento protein má v infikované buňce řadu funkcí. První z nich je, že vyvazuje pRB z vazby s E2F transkripčními faktory, čímž stimuluje buňky k přechodu do S fáze a k produkci proteinů nutných pro replikaci (DeCaprio *et al.*, 1988; Zalvide a DeCaprio, 1995). Zároveň se TAg váže do virového počátku replikace (Tenen *et al.*, 1983), kam přivádí i proteiny replikačního komplexu. TAg pak pomocí své helikázové aktivity pomáhá iniciovat replikaci polyomavirového genomu (Stahl *et al.*, 1986; Collins a Kelly, 1991; Dornreiter *et al.*, 1992; Melendy a Stillman, 1993). Třetí, velmi důležitou funkcí je, že TAg rovněž váže a inaktivuje p53 a tím brání zástavě buněčného cyklu či předčasné apoptóze (Linzer a Levine, 1979; Jiang *et al.*, 1993). Zajímavé je, že například TAg MPyV sice neváže p53, ale i tak tento protein dokáže negativně interferovat s funkcí p53 (Doherty a Freund, 1997). Druhým konzervovaným produktem časné oblasti genů je pak tzv. malý t antigen (tAg), jehož hlavním interakčním partnerem je fosfatáza PP2A (Yang *et al.*, 1991). Tím, že se tAg váže na tuto fosfatázu, ji inaktivuje, a tím způsobuje hyperaktivaci drah signální transdukce (přehledně shrnuto v Skoczylas *et al.*, 2004).

Mimo TAg a tAg pak ještě polyomaviry v časné oblasti kódují další „doplňkové“ proteiny, které se však mezi jednotlivými viry často liší. Například MPyV v časné oblasti kóduje ještě tzv. střední T antigen. Tento protein se v infikovaných buňkách nachází v blízkosti buněčných membrán (Dilworth *et al.*, 1986), kde pomocí svého C konce interaguje s proteiny signálních kaskád a způsobuje, podobně jako malý t antigen, jejich hyperaktivaci. Co se týče interakčních partnerů středního T antigenu, tak se jedná například o Src kinázu (Courtneidge a Smith, 1983), PI3 kinázu (Courtneidge a Heber, 1987) či fosfolipázu C (Su *et al.*, 1995). BKPyV naopak v časné oblasti kóduje ještě tzv. zkrácený T antigen (truncAg), což je v zásadě kratší verze velkého T antigenu s limitovanou možností interakce (Abend *et al.*, 2009).

V posledních letech se ukázalo, že v časné oblasti genomu polyomavirů jsou kódovány i prekurzory pro miRNA. Ty jsou ale na rozdíl od časných genů kódovány na opačném řetězci, a proto jsou přepisovány až z pozdního promotoru. Jejich hlavním úkolem je v pozdních fázích infekce snížit produkci časných proteinů, jež už nejsou zapotřebí (Sullivan *et al.*, 2005, 2009; Broekema a Imperiale, 2013). Mimo to můžou teoreticky regulovat i expresi některých

hostitelských genů. To bylo ukázáno například u MPyV, jehož miRNA snižovala expresi proapoptotického proteinu Smad2 (Sung *et al.*, 2014).

Poslední funkční oblastí polyomavirového genomu je úsek kódující tzv. pozdní geny, k jejichž expresi dochází po zahájení replikace genomu. Na rozdíl od časných genů, které mají za úkol navodit v infikované buňce podmínky vhodné pro virovou replikaci, jsou pozdní geny odpovědné za produkci strukturálních proteinů. Jedná se o celkem tři proteiny. První z nich, VP1, je hlavní kapsidový protein. Další dva kapsidové proteiny, označované jako minoritní, jsou pak VP2 a VP3. Co se týče těchto dvou proteinů, tak jsou oba translatovány ze stejného čtecího rámce, ale VP2 má navíc ještě N-koncovou oblast, která bývá myristylována (Krauzewicz *et al.*, 1990). Mimo kapsidové proteiny kódují některé polyomaviry (jako např. BKPyV) v pozdní oblasti jeden nestrukturní protein, jenž se nazývá Agno. Funkce tohoto proteinu není doposud úplně objasněna. Experimenty provedené na JCPyV a BKPyV naznačují, že jednou z hlavních rolí bude rozrušení jaderného obalu a uvolnění virionů ven z buňky (Okada *et al.*, 2005; Panou *et al.*, 2018). Mimo to bylo u BKPyV ukázáno, že díky interakci s proteinem  $\alpha$ -SNAP Agnoprotein negativně reguluje exocytózu materiálu ven z buňky (Johannessen *et al.*, 2011).

## 2.5. PRŮBĚH INFEKČNÍHO CYKLU NA PŘÍKLADU BK POLYOMAVIRU

Replikační cyklus polyomavirů je u všech zástupců této čeledi v zásadě stejný a mezi jednotlivými viry se liší pouze v několika málo ohledech. Rozdíly jsou například v typu buněčného receptoru, na který se jednotlivé polyomaviry vážou, či v typu váčku, kterým jsou internalizovány dovnitř buňky. V této kapitole je celý replikační cyklus polyomavirů shrnut na příkladu lidského BKPyV a jeho zjednodušené schéma je znázorněno na obrázku č. 3.

Replikační cyklus BKPyV začíná vazbou na buněčný receptor. V případě BKPyV jsou buněčnými receptory gangliosidy b-řady a to GD1b a GT1b (Low *et al.*, 2006). Později bylo ukázáno, že BKPyV je schopen vstoupit do buňky i pomocí dalších gangliosidů b-řady, GD2 a GD3, avšak s nižší účinností (Neu *et al.*, 2013). Částí gangliosidu, která je rozpoznávána BKPyV, je terminálně vázaná sialová kyselina, přesněji řečeno N-acetylneuraminová kyselina, která je  $\alpha(2,8)$  glykosidickou vazbou vázána na další N-acetylneuraminovou kyselinu (Neu *et al.*, 2013). Díky tomu, že BKPyV váže sialovou kyselinu je rovněž jako některé další polyomaviry schopen hemaglutinace červených krvinek (Sinibaldi *et al.*, 1987). Mimo interakce s gangliosidy bylo v roce 2005 také popsáno, že BKPyV potřebuje pro vstup do Vero buněk i N-glykosylovaný glykoprotein s  $\alpha(2,3)$  vázanou sialovou kyselinou (Dugan *et al.*, 2005). Jestli je toto pozorování relevantní i pro lidské RPTE buňky, které se v současnosti pro studium infekčního cyklu BKPyV používají, zůstává otázkou. Po vazbě na receptor dojde k internalizaci viru buňkou. K tomu

pravděpodobně dochází v místech membránových raftů, které jsou bohaté na výskyt gangliosidů (Sonnino *et al.*, 2007). K samotné internalizaci pak dochází pomocí váčků bohatých na kaveolin, což bylo pozorováno jak ve Vero buňkách (Eash *et al.*, 2004) tak i v lidských RPTE buňkách (Moriyama *et al.*, 2007). Tím se BKPyV liší od JCPyV, který ke vstupu využívá klatrinem obalené váčky (Pho *et al.*, 2000). V roce 2016 Zhao *et al.* publikovali data, které poukazují na to, že v lidských RPTE buňkách byl BKPyV internalizován alternativní cestou, která byla nezávislá jak na klatrinu tak kaveolinu (Zhao *et al.*, 2016). Zůstává tedy otázkou, jakým přesným způsobem je virus internalizován a patrně dosti závisí i na fyziologickém stavu buňky. Další výzkum je zapotřebí pro objasnění tohoto problému.

Poté co BKPyV vstoupí do buňky se částice dostávají do časného a následně pozdního endozómu. Pokusy s inhibitory, jež brání acidifikaci buněčných organel, poukazují na to, že v prvních 2 hodinách po absorpci je pro virus zásadní nižší pH pozdního endozómu pro další fázi infekce (Jiang *et al.*, 2009). Z pozdního endozómu se pak virus dostává retrográdním transportem do endoplazmatického retikula (Low *et al.*, 2006). V roce 2017 pak bylo popsáno, že virus při transportu do endoplazmatického retikula využívá Rab18 pozitivních váčků a že pro fúzi je zapotřebí proteinů NRZ komplexu a Syntaxinu 18 (Zhao a Imperiale, 2017). Co se týče doby po absorpci viru, tak se BKPyV dostává do endoplazmatického retikula mezi 6 a 10 hodinou (Moriyama a Sorokin, 2008). Virus se při retrográdním transportu zřejmě kompletně vyhýbá Golgiho aparátu, ve kterém doposud nebyl vůbec detekován. Pro transport BKPyV je také zapotřebí funkční mikrotubulární síť ale již není potřeba molekulární motor dynein a ani aktinový cytoskelet (Eash a Atwood, 2005; Moriyama a Sorokin, 2008).

O tom, co se děje s BKPyV po vstupu do endoplazmatického retikula, se toho moc neví a většinou se při popisu této fáze infekce využívají data publikována na polyomaviru SV40. Obecně lze říci, že polyomaviry (tedy i včetně BKPyV) využívají rezidentních enzymů endoplazmatického retikula k rozvolnění a remodelaci kapsidy, což ve výsledku umožní viru dostat se přes membránu endoplazmatického retikula do cytoplazmy. V případě BKPyV bylo například ukázáno, že protein disulfid izomeráza ERdj5 je potřebná pro redukci S-S můstků kapsidy a pro další postup infekce (Inoue *et al.*, 2015). Mimo to bylo ukázáno, že BKPyV potřebuje pro únik z endoplazmatického retikula funkční proteazomální a ERAD dráhu, což podporují pokusy s inhibitory těchto drah, které poukazují na hromadění částečně rozbalených virionů s exponovanými proteiny VP2/VP3 v endoplazmatickém retikulu (Bennett *et al.*, 2013). Rovněž byla popsána i interakce hlavního kapsidového proteinu VP1 viru BKPyV s proteinem Derlin1, jenž je součástí právě ERAD dráhy (Jiang *et al.*, 2009). Poté, co je rozvolněna struktura kapsidy a dochází k rozpoznání spatně sbalených proteinů pomocí ERAD dráhy, se viriony pomocí hydrofobních částí proteinů VP2/VP3 váží

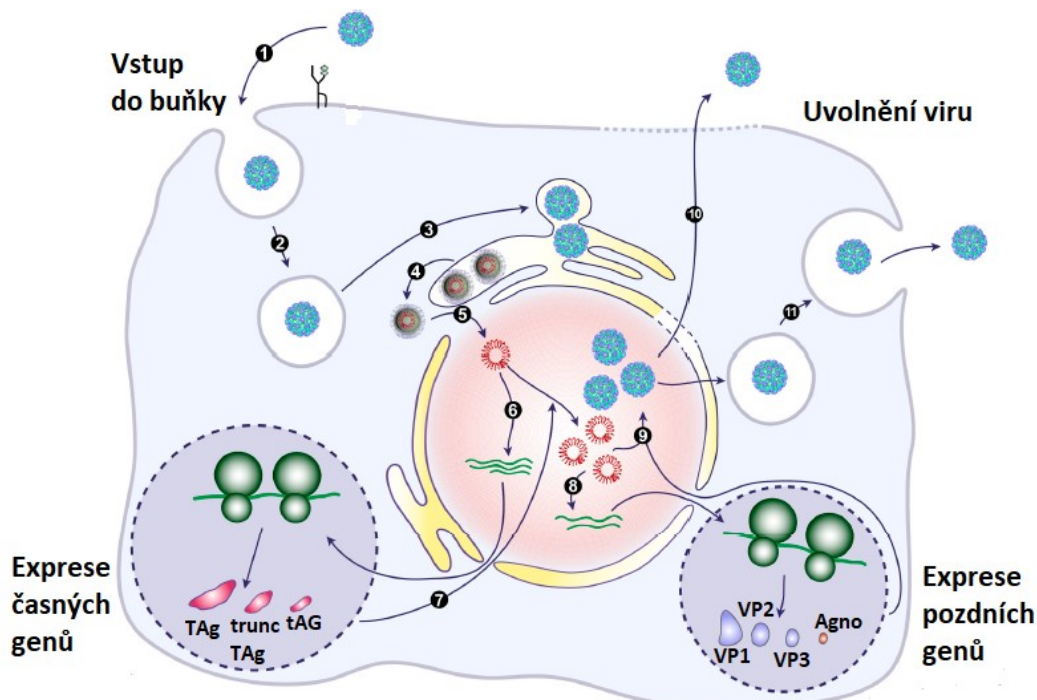


na membránu retikula. Při studiu viru SV40 pak byl navržen model, podle kterého jsou viriony, jež jsou adherované na membráně retikula, translokovány do cytoplazmy pomocí souhry proteinů rodiny J (B12, B14), Hsp105 a SGTA (Goodwin *et al.*, 2011; Walczak *et al.*, 2014; Ravindran *et al.*, 2015). Detailnější popis celého procesu je přehledně shrnut v Dupzyk a Tsai (2016).

Nakonec jsou rozvolněné viriony transportovány do jádra pomocí importinu  $\alpha$  a  $\beta 1$ . Tento transportní komplex rozeznává jaderný lokalizační signál na společném C konci proteinů VP2 a VP3 a využívá ho pro efektivní transport BKPyV skrze jaderný pór (Bennett *et al.*, 2015). Zároveň ale bylo ukázáno, že se virus dokáže dostat do jádra i alternativní cestou, která je ale méně účinná. Uvažuje se, že k vstupu může dojít i pasivně při dělení buňky, když se rozpadá jaderný obal. Další možností je, že k importu skrze jaderný pór může být využit i jaderný lokalizační signál proteinu VP1. Ten je normálně schovaný uvnitř kapsidy, ale při jejím rozvolnění po úniku z retikula by mohlo dojít k jeho omezenému využití (Bennett *et al.*, 2015). Další krok replikačního cyklu je již velmi podobný u všech studovaných polyomavirů.

Po vstupu do jádra je v prvním kroku zahájena transkripce časných genů, a to v případě BKPyV genů pro velký, malý a zkrácený T antigen. Poté co je v cytoplazmě translatován TAg dochází k jeho translokaci do jádra, kde jednak díky vyvázání pRb „žene“ buňky do S fáze buněčného cyklu a zároveň brání buněčné apoptóze a aktivaci stresových drah díky tomu, že inaktivuje p53 (Shivakumar a Das, 1996). Souběžně s tím tAg antigen inaktivací fosfatázy PP2A hyperaktivuje buněčné signální dráhy (pro SV40 přehledně shrnuto v Skoczylas *et al.*, 2004). Po vstupu do S fáze se TAg spolu s proteiny replikačního aparátu váže na virový počátek replikace. K její iniciaci patrně dochází stejným způsobem jako tomu je viru SV40. Spolu s replikací genomů dochází i k transkripci pozdních genů a produkci virových miRNA, jež snižují transkripci časných genů (Broekema a Imperiale, 2013). Po translaci kapsidových VP1, VP2 a VP3 dochází i k jejich translokaci do jádra, kde následně začíná morfogeneze nových virionů. K tomu dochází zhruba 48 hodin po infekci (Low *et al.*, 2004).

Posledním krokem v životním cyklu BKPyV je uvolnění nových virionů pro infekci dalších buněk. K rozpadu jaderné membrány a úniku nových virionů z jádra je pravděpodobně důležitý protein Agno (Panou *et al.*, 2018). Do okolního prostředí se pak viriony dostávají po tom, co buňka lyzuje. (Low *et al.*, 2004). Kromě lyze buněk byl v případě BKPyV popsán i alternativní, nelytický, způsob uvolnění, který bylo možné zablokovat inhibicí aniontových kanálů. Po inhibici kanálů se pak část nových virionů začala hromadit v organelách připomínající pozdní endosom. Tímto způsobem dochází k uvolnění zhruba 1 % virového potomstva a mohl by hrát důležitou roli při perzistenci viru v organismu (Evans *et al.*, 2015).



**Obrázek č. 3 – Schéma životního cyklu BKPyV**

V prvním kroku životního cyklu dochází k vazbě BKPyV na gangliosidy b-řady na povrchu buňky (1). Poté dochází k internalizaci viru do váčku, a to na kaveolin závislém, ale i nezávislém mechanismu (2). Virus poté vstupuje do endosomálního systému a je transportován do endoplazmatického retikula (3). V retikulu dále nastává částečné rozvolnění kapsidy a virus je následně pomocí buněčných chaperonů translokován do cytoplazmy (4). Z cytoplazmy je poté virus transportován do jádra pomocí importinu  $\alpha$  a  $\beta 1$  (5). V jádře je pak okamžitě zahájena exprese časné oblasti genomu (6). V případě BKPyV jsou produktem časné oblasti celkem tři proteiny, a to velký T antigen (TAg), zkrácený T antigen (truncAg) a malý t antigen (tAg). TAg pak stimuluje přechod do S fáze a brání předčasné apoptóze. Dále se TAg váže na virový počátek replikace a pomáhá při iniciaci replikace (7). Následně nastává transkripce pozdních genů a produkce kapsidových proteinů VP1, VP2, VP3 a pozdního proteinu Agno. Kapsidové proteiny poté vstupují do jádra, váží virový minichromosom a začíná morfogeneze nových virionů (9). Nakonec nové virové potomstvo opouští infikovanou buňku po její lyzi (10). Velmi malé procento virionů patrně dokáže opustit buňku i nelytickým způsobem přes váčkový transport (11). Převzato a upraveno z Helle *et al.*, 2017

## 2.6. STRUKTURA A ORGANIZACE VIRIONU

Polyomavirová kapsida je multimerní proteinová struktura, jejíž 3D uspořádání i stavební organizace je evolučně zachována v rámci celé čeledi *Polyomaviridae*. Její tvar je sférický s velikostí mezi 45 až 50 nm a je složena z celkem tři strukturních proteinů, a to VP1, VP2 a VP3. Zároveň kapsida neobsahuje ani žádný membránový obal, a tudíž je tato proteinová struktura rezistentní k lipidickým rozpouštědlům. Nejvíce zastoupeným proteinem kapsidy je hlavní kapsidový protein VP1, jenž tvoří skoro 83 % všech proteinů. Tento kapsidový protein se v buňce nikdy nevyskytuje volně ve formě monomeru, ale hned poté, co je translatován, pentamerizuje do cylindrické struktury. Průměr této pentamery je zhruba 80 angströmů, zatímco její výška je kolem 70 angströmů. Uvnitř pentamery se nachází prázdná dutina,

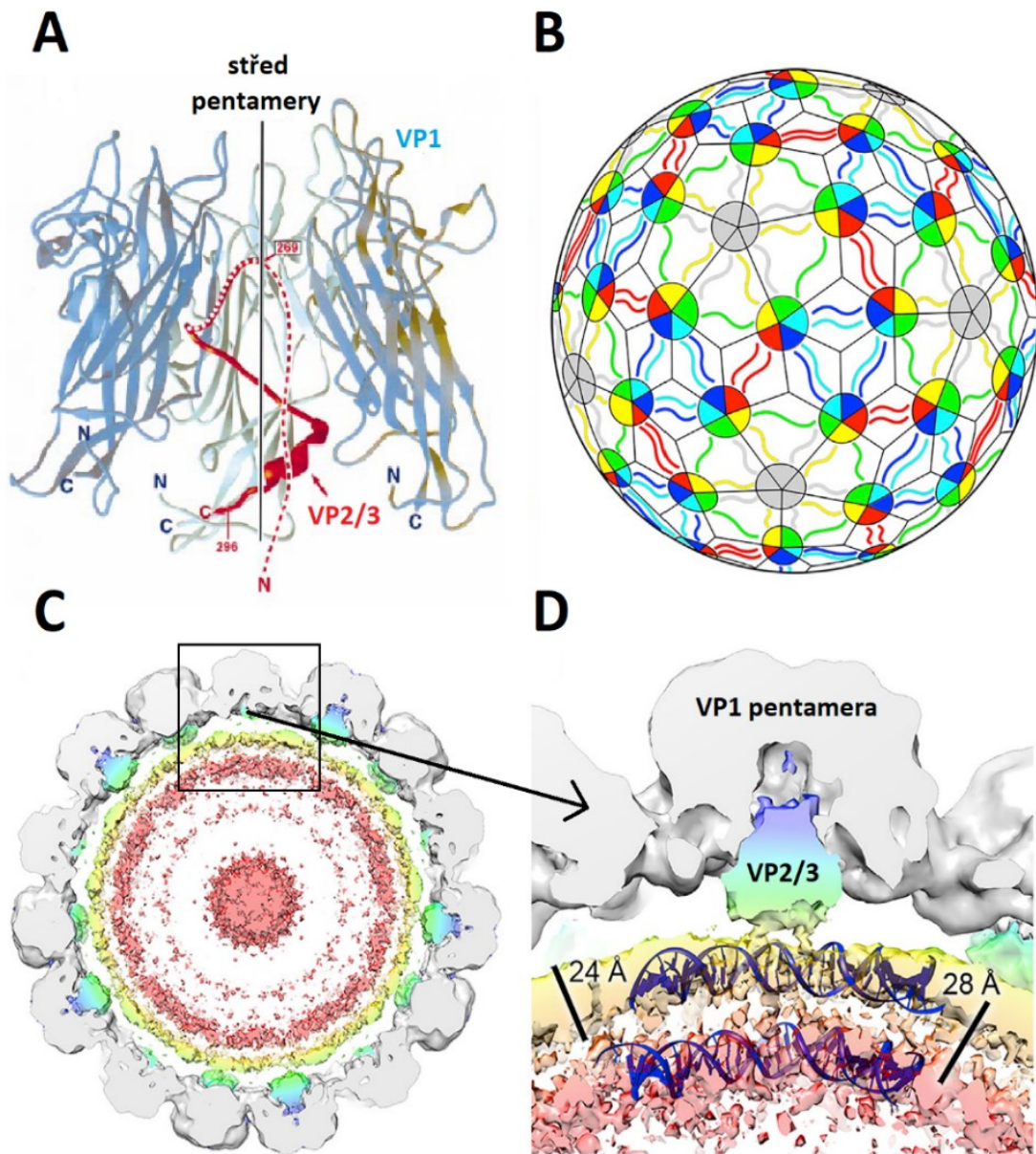
která je u základny cylindru široká zhruba 50 angströmů a pak se směrem k vrcholu zužuje až na pouhých 12 angströmů (Liddington *et al.*, 1991). Tato dutina za normálních okolností není prázdná, ale je do ní vložena jedna molekula minoritního kapsidového proteinu VP2 či VP3, jež tvoří zbylých 17 % proteinů kapsidy. Minoritní kapsidové proteiny VP2/3 jsou uvnitř pentamery VP1 vloženy takovým způsobem, že vytváří jakousi smyčku. Od N konce polypeptid směřuje směrem k vrcholu pentamery, kde se stáčí a svým C koncem se vrací zpět směrem k centru kapsidy. V případě proteinu VP2 směřuje jeho delší N konec ještě více zpátky do centra kapsidy, než je tomu u proteinu VP3 (Chen *et al.*, 1998). Minoritní kapsidové proteiny jsou tedy schovány uvnitř pentamery a na povrchu maturované kapsidy se vůbec nevyskytují, což je znázorněno na obrázku 4A.

Polyomavirová kapsida je složena z celkem 72 pentamer. Celkem je tedy na stavbu jedné virové částice zapotřebí 360 molekul hlavního kapsidového proteinu VP1 a 72 molekul minoritních kapsidových proteinů. Struktura celé kapsidy, i přesto že je sférického tvaru, je podobně jako u dalších virů podřízena ikosahedrální symetrii s triangulačním číslem 7. Graficky je toto uspořádání znázorněno na obrázku 4B. V kapsidě můžeme nalézt celkem 60 pentamer, jež označujeme jako hexavalentní, protože interagují s 6 dalšími pentamerami ve svém okolí. Zbylých 12 pentamer má pentavalentní charakter a interaguje pouze s 5 sousedními pentamerami. Těchto 12 pentamer pak tvoří vrcholy pomyslného ikosahedronu a právě ony jsou nejvíce odpovědné za zakřivení povrchu kapsidy do sférického tvaru. Na základě těchto informací pak vyvstává otázka, jakým způsobem jsou jednotlivé pentamery propojeny, když dokáží zaujmout tyto dva odlišné způsoby uspořádání. Odpověď na tuto otázku přinesla v roce 1991 studie, jež pomocí rentgenové krystalografie určila strukturu kapsidy viru SV40 s rozlišením 3,8 angströmů. Ze studie vyplynulo, že jednotlivé pentamery jsou v rámci celé kapsidy propojeny C konci svých proteinů VP1, jež vyčnívají z jádra každé pentamery. Tyto C konce pak invadují jeden z proteinů VP1 sousední pentamery a vytváří sekundární struktury, pomocí kterých dále stabilizují celkovou terciární strukturu VP1. Jedna pentamera VP1 tedy dokáže svými C konci navázat kontakt až s 5 sousedními pentamerami. Zároveň ale může i 5 C konců od okolních pentamer přijmout. Přitom se vůbec nemusí jednat o C konce pentamer, s kterými již ona sama interaguje. Právě díky tomuto mechanismu může jedna pentamera VP1 interagovat nejen s 5 ale i s 6 okolními pentamerami (Liddington *et al.*, 1991).

Celá kapsida je dále stabilizována přítomností vápenatých iontů (Bradyet *al.*, 1977). Na jednu molekulu VP1 připadají dvě vazebná místa pro vápník. Tato místa se nachází v oblasti proteinu VP1, kde dochází k interakci s C koncem sousední pentamery. Zde vápenaté ionty slouží k další stabilizaci terciární struktury VP1 a invadujícího C konce. Pro vazbu iontů jsou důležité zejména glutamátové a aspartové zbytky, které se nachází jak na proteinu VP1,

tak na invadujícím C konci a které celou vazbu vápníku koordinují (Liddington *et al.*, 1991; Stehle *et al.*, 1996). Roli v stabilitě kapsidy rovněž hrají i disulfidické můstky. Aminokyselina cystein je v proteinu VP1 přítomná jen na pár místech, přičemž pro tvorbu disulfidických můstků je nejvhodnější cysteinový zbytek v tzv. CD smyčce. Ty leží u základny pentamery a pravděpodobně mezi nimi může docházet k náhodné tvorbě disulfidických můstků. Výsledkem této interakce je další zpevnění virové kapsidy (Stehle *et al.*, 1996a).

V roce 2015 byla publikována krystalografická studie popisující strukturu virionu BKPyV. Průřez celou částicí je znázorněn na obrázcích 4C a 4D. Na publikaci o této struktuře je zajímavé zejména to, že kromě dat o uspořádání strukturních proteinů autoři získali i data o struktuře virového minichromosomu uvnitř kapsidy. Zjistili, že DNA je uvnitř kapsidy lokalizována v koncentrických kružnicových vrstvách. Jejich počet a přesná struktura ale není zcela jasná, neboť data o elektronové hustotě z těchto oblastí již nebyla získána v dostatečném rozlišení. Šířka jedné vrstvy byla zhruba 24 angströmů, což přibližně odpovídá šířce jedné dvoušroubovice DNA. Vzdálenost vrchních dvou vrstev minichromosomu odpovídala zhruba 28 angströmům. To je podle autorů podobná vzdálenost jako mezi řetězci DNA v rámci nukleosomu (Hurdiss *et al.*, 2016). Bohužel díky nízkému rozlišení nebylo možné rozlišit jakým způsobem jsou histony na virové DNA uspořádány. Autorům se také povedlo určit konformaci prvních 15 aminokyselin na N konci proteinu VP1, jež tvoří DNA vazebnou doménu. Ukázalo se, že elektronová hustota z této oblasti se překrývá s hustotou minichromosomu v horních vrstvách virionu. To naznačuje, že VP1 je ve virionu schopen vázat virový genom po celé jeho délce. Rovněž se ukázaly překryvy mezi elektronovými hustotami minichromosomu a minoritních proteinů VP2/3. Minoritní kapsidové proteiny primátích polyomavirů, totiž na svém C konci obsahují DNA vazebnou doménu, která je rovněž schopna vázat DNA. Přítomnost této domény byla původně potvrzena u viru SV40 (Clever *et al.*, 1993). I přes tato pozorování zůstává konformace virového minichromosomu uvnitř kapsidy stále nedostatečně charakterizována.



#### Obrázek č. 4 – Struktura a organizace polyomavirové kapsidy

Na obrázku (A) je znázorněn model pentamery VP1 MPyV (v odstínech modré) spolu s centrálně uloženým minoritním proteinem VP2/3 (označen červenou). Čárkovaná linie proteinu VP2/3 značí oblast, u které nebylo možné přesně určit krystalografickou strukturu. Zhruba v půlce čárkované linie se rovněž nachází N konec proteinu VP3. Zbytek čáry je oblast proteinu VP2, která je pro něj unikátní a kterou s proteinem VP3 nesdílí. Na obrázku (B) je schématické znázornění organizace polyomavirové kapsidy. Kapsida je založena na ikosahedrání symetrii a pentamery, jež leží v pomyslných vrcholech ikosahedronu, jsou označeny šedě. Na obrázku je barevně znázorněno, jakým způsobem si sousední pentamery vyměňují své C konce, tak aby dosáhly jak pentavalentního tak hexavalentního uspořádání. Obrázek (C) představuje průřez virionem BKPyV, kde jsou jednotlivé struktury znázorněny pomocí své elektronové hustoty. Světle šedou barvou je znázorněna elektronová hustota proteinu VP1, jenž tvoří horní vrstvu virionu. V každé pentamere je uložen jeden z minoritních proteinů VP2 či VP3 (modrá až zelená barva). Pod vrstvou kapsidových proteinů je uložen virový minichromosom v koncentrických kružnicových vrstvách (žlutá až červená barva). Na obrázku D je detailní zobrazení uspořádání virového minichromozomu pod pentamerou VP1 s vyznačenými vzdálenostmi mezi jednotlivými vlákny dvoušroubovice DNA. Obrázek (A) byl převzat a upraven z Chen *et al.*, 1998. Obrázky (B-D) byly převzaty a upraveny z Hurdiss *et al.*, 2016.

## 2.7. DALŠÍ STRUKTURY VZNIKLÉ Z KAPSIDOVÝCH PROTEINŮ

Kromě schopnosti vytvářet viriony dokáže protein VP1 tvořit i další alternativní typy částic. První z nich jsou tzv. pseudoviriony. Jedná se o částice, které jsou stejně velké jako viriony, ale neobsahují virovou DNA. Pentamery hlavního kapsidového proteinu VP1 totiž nejsou schopny sami o sobě rozeznat virovou DNA od té buněčné a mohou tedy enkapsidovat i fragment hostitelského genomu. Pro enkapsidaci buněčné DNA je důležité zejména to, aby její velikost byla přibližně stejná jako velikost virového genomu (Gillock *et al.*, 1997).

Dalším typem struktury jsou tzv. viru podobné částice (VLPs, z anglického Virus-like particles). V tomto případě se jedná o prázdné částice, které neobsahují vůbec žádnou DNA. Protein VP1 a z něj složené pentamery jsou totiž schopny se samouspořádat do kapsidových struktur pomocí svých C konců i bez přítomnosti DNA. Pro tvorbu těchto struktur dokonce nejsou nutné ani minoritní kapsidové proteiny. Většinou VLPs zaujímají sférický tvar, který má ikosahedrální symetrii s triangulačním číslem 7. Na první pohled jsou tyto VLPs svou strukturou stejné jako viriony či pseudoviriony. Pentamery VP1 mohou rovněž vytvořit VLPs, které nejsou sférického ale trubkovitého tvaru a které mají helikální symetrii. Dalšími atypickými VLPs jsou 32nm částice tvořené 24 pentamerami proteinu VP1 uspořádané podle oktahedrální symetrie či 26 nm VLPs tvořené jen z 12 pentamer (Salunke *et al.*, 1989).

Vzhledem k tomu, že je protein VP1 schopen vytvářet prázdné kapsidy sám o sobě, tak je využíván v heterologních expresních systémech k produkci velkého množství VLPs. Prvním expresním systémem použitým pro tvorbu VLPs byla bakterie *Escherichia coli* (Salunke *et al.*, 1986). Rovněž se ukázalo, že VLPs je možné efektivně produkovat i v kvasince *Saccharomyces cerevisiae* (Sasnauskas *et al.*, 1999). Vysoké produkce VLPs lze dosáhnout i v hmyzích buňkách s použitím bakulovirového expresního systému (Montross *et al.*, 1991). VLPs jsou takto připravovány z několika důvodů. Jednak jsou používány v základním výzkumu při studiu raných fází infekčního cyklu či kurčení struktury polyomavirových částic. Další možné využití mají VLPs v biomedicíně, kde mohou sloužit v přípravě diagnostických testů, vakcín či vektorů pro genovou terapii (přehledně shrnuto v Teunissen *et al.*, 2013).

## 2.8 HLAVNÍ KAPSIDOVÝ PROTEIN VP1

Hlavní strukturální protein VP1 je největším a zároveň nejvíce zastoupeným proteinem polyomavirové kapsidy. Jeho přesná velikost a sekvence se mezi jednotlivými polyomaviry mírně liší. Například protein VP1 myšího polyomaviru je dlouhý 384 zatímco protein VP1 BK polyomaviru je dlouhý jen 362 aminokyselin I přes odlišnou velikost jsou ale oba proteiny stejně organizovány a zaujímají obdobné prostorové uspořádání.

Co se týče terciární struktury, tak protein VP1 můžeme rozdělit na celkem 3 oblasti. Prostorové uspořádání proteinu VP1 spolu se sekundárními strukturami je znázorněno na obrázku 5A. Nejkratší strukturální oblastí je N konec proteinu, ve kterém se nachází jak jaderný lokalizační signál, tak i DNA vazebná doména. Po pentamerizaci proteinu VP1 se tato oblast peptidu nachází ve spodu pentamery a po morfogenezi virionu směřuje dovnitř částice. DNA vazebná doména proteinu VP1 není sekvenčně specifická a je schopna se vázat na jakoukoli sekvenci DNA (Morela *et al.*, 1991). Proto se uvažuje, že VP1 svým N koncem může regulovat uspořádání virového minichromosomu uvnitř virionu. Tato interakce je ale limitována pouze na tu část DNA, která se nachází pod pentamerou VP1 (Hurdiss *et al.*, 2016).

Centrální oblast proteinu VP1 je nejdelší ze všech a tvoří jádro celého proteinu. Tato oblast je velmi bohatá na sekundární struktury, a to zejména na antiparalelní  $\beta$  skládané listy, které jsou složeny do kompaktní terciární struktury. Mimo to můžeme v proteinu VP1 rovněž nalézt krátké úseky tvořené helixy. Jednotlivé  $\beta$  listy jsou mezi sebou propojeny několika smyčkami. Nejdůležitější z nich jsou DE, HI a BC smyčky. Ty se nachází v horní části pentamery VP1 a rovněž i na povrchu sestavené kapsidy. Díky tomu se jedná o hlavní antigenní determinanty proteinu VP1. Smyčka EF se nachází z boku celé struktury a hraje roli ve vazbě vápenatých iontů a stabilizaci invadujícího C konce ze sousední pentamery (Liddington *et al.*, 1991; Stehle *et al.*, 1996). Poslední důležitou smyčkou je smyčka CD. Ta se nachází ve spodu pentamery a obsahuje cysteinový zbytek, který je pravděpodobně schopen vytvořit disulfidický můstek mezi dalšími proteiny VP1 v pentamere (Stehle *et al.*, 1996). Jak již bylo zmíněno dříve, tak se protein VP1 nikdy v buňce nevyskytuje ve formě monomeru, ale ihned asociuje s dalšími proteiny VP1 za vzniku pentamery. To je způsobeno díky vysoké komplementaritě povrchů mezi jednotlivými proteiny VP1. Interakční rozhraní mezi dvěma proteiny VP1 je velké zhruba 2 800 čtverečních angströmů (Stehle *et al.*, 1996b). Z toho důvodu, když se podíváme na struktury všech proteinů VP1 v jedné pentamere, tak můžeme vidět, že do sebe jednotlivé proteiny zapadají jako puzzle.

Poslední strukturální oblastí proteinu VP1 je jeho C koncová část, která hraje roli ve vazbě jednotlivých pentamer mezi sebou. V případě, že k takovéto interakci nedochází, je většina C konce proteinu VP1 v přirozeně neuspořádaném stavu. K organizaci do sekundárních struktur dojde teprve až poté, co C konec invaduje jádro proteinu VP1 sousední pentamery. Způsob, jakým C konec interaguje s jádrem proteinu VP1, je ve všech případech stejný, nicméně jeho přesné uspořádání se může lehce lišit podle toho, kde se interagující pentamery v rámci kapsidy vyskytují (Liddington *et al.*, 1991; Stehle *et al.*, 1996).

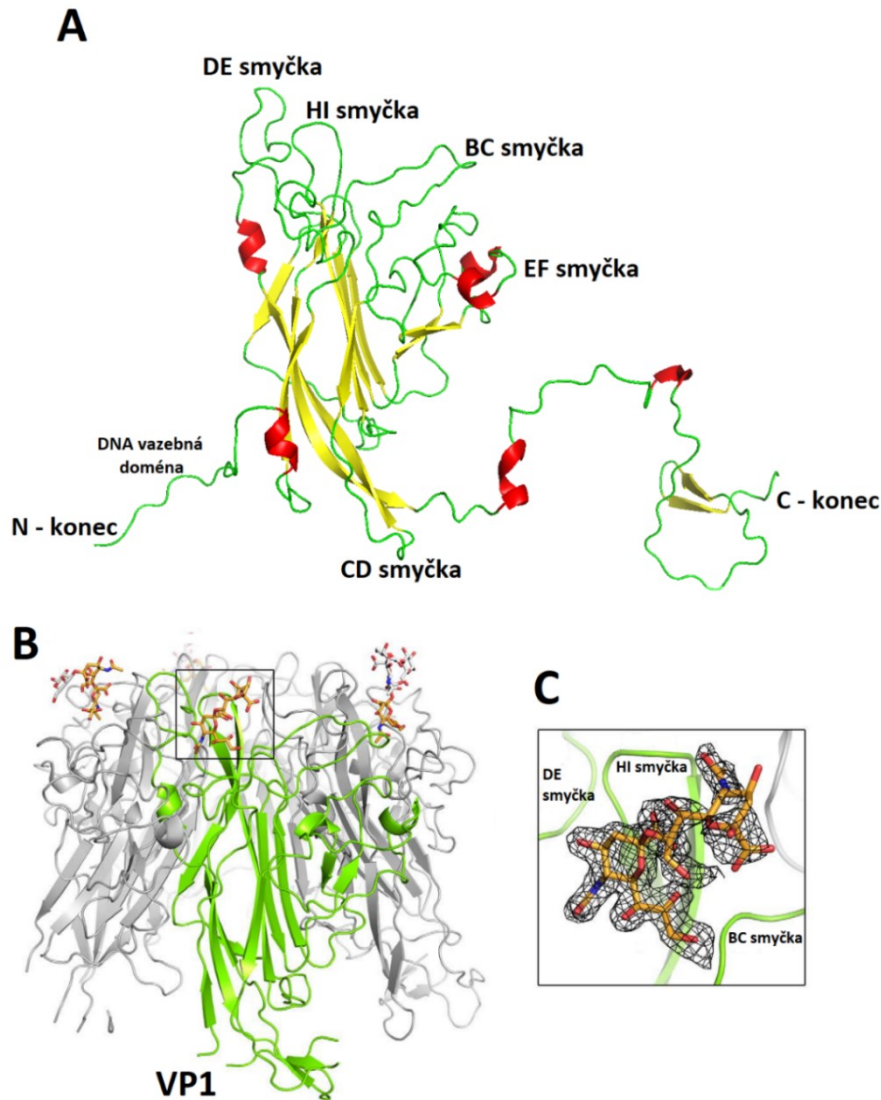


Hlavní kapsidový protein VP1 je také zodpovědný za vazbu k buněčnému povrchu. Je totiž schopný vázat sialovou kyselinu, jež je součástí mnoha povrchových molekul včetně různých glykoproteinů a gangliosidů. Vazebné místo pro sialovou kyselinu se nachází z boku pentamery v místě mezi povrchovými smyčkami DE, BC a HI (Stehle a Harrison, 1996; Neu *et al.*, 2013). Přesné místo vazby je znázorněno na obrázku 5B a 5C. Každý protein VP1 je tedy schopen teoreticky vázat sialovou kyselinu a vzhledem k počtu jeho kopií v jedné kapsidě, se ve výsledku může virion absorbovat k buněčné membráně pomocí velké části svého povrchu.

Stejně jako spousta proteinů podléhá i hlavní kapsidový protein VP1 posttranslačním modifikacím. Již v roce 1981 vyšla publikace, která identifikovala ve virionu MPyV různé subpopulace proteinu VP1 na základě jejich rozdílného izoelektrického bodu. Autoři ale byli schopni část těchto rozdílů v izoelektrickém bodu připsat odlišným posttranslačním modifikacím proteinu VP1, a to zejména fosforylacím a acetylacím (Bolen *et al.*, 1981). Poté následovalo objevení dalších typů modifikací jako sulfurylace tyrosinu (Ludlow a Consigli, 1987), hydroxylace prolinu (Ludlow a Consigli, 1989) či methylace lysinu a argininu (Burton a Consigli, 1996). Dokonce v případě BKPyV byla provedena detailní analýza, která u proteinu VP1 identifikovala až 9 různých typů modifikací na celkem 56 aminokyselinách (Fang *et al.*, 2010). Pro MPyV byla ukázána zejména důležitost fosforylace proteinu VP1. Jako jedny z míst fosforylace byly identifikovány threonin 63 (BC smyčka) a threonin 156 (DE smyčka). Vzhledem k jejich pozici ve smyčkách proteinu VP1 by jejich fosforylace mohla hrát důležitou roli ve vazbě buněčného receptoru. Co se ale ukázalo je, že při mutaci threoninu 156 není virus schopný morfogeneze nových virionů (Li a Garcea, 1994). Mimo threoninu dochází i k fosforylacím serinů. Například serin 66 byl identifikován jako místo potenciální fosforylace pomocí kasein kinázy II. Bohužel serinové mutanty nebylo možné pomnožit v buněčné kultuře. Proto byl protein s mutovaným serinem exprimován heterologně v *E. coli* a jeho fosforylace kasein kinázou II byla potvrzena až *in vitro* (Li *et al.*, 1995). Roli ve správné modifikaci proteinu VP1 patrně hrají i minoritní strukturní proteiny. V hmyzích buňkách Sf9 bylo ukázáno, že při expresi pouze proteinu VP1 nebo koexpresi proteinu VP1 a VP3 dochází k nefyziologickým fosforylacím serinů a k poklesu fosforylace threoninů 63 a 156. Když se ale s proteinem VP1 expimoval i protein VP2, tak se snížilo množství nefyziologických fosforylací serinů a rovněž se zvedla i fosforylace na threoninu 63 (Li *et al.*, 1995). Interakce s proteinem VP2 tedy zřejmě vede ke změně konformace proteinu VP1, a tím i ke změně přístupnosti fosforylačních míst. Co se týče fosforylace threoninu 156, tak ta stále zůstala nízká. Hmyzí buňky Sf9 buď tedy oproti myším buňkám postrádají kinázu schopnou fosforylace tohoto threoninu a nebo je k této fosforylace potřebná souhra dalších virových proteinů (Li *et al.*, 1995). Role ve správné fosforylaci proteinu VP1 MPyV byla prokázána u středního T antigenu



(Li a Garcea, 1994). V případě BKPyV bylo ukázáno, že v proteinu VP1 dochází pouze k fosforylacím serinů a nikoli threoninů (Fang *et al.*, 2010). Ze všech tří potenciálních fosforylovaných míst je navíc pro úspěšnou propagaci viru v tkáňových kulturách důležitá jen fosforylace serinu 80 (Chen *et al.*, 2011).



### Obrázek č. 5 – Struktura hlavního kapsidového proteinu VP1

Na obrázku (A) je znázorněno prostorové uspořádání hlavního kapsidového proteinu VP1 MPyV. Oblast nejvíce bohatá na sekundární struktury se nachází uprostřed proteinu. Žlutě jsou vyznačeny sekundární struktury antiparalelních  $\beta$  skládaných listů, jež tvoří jádro celé struktury. Tyto listy jsou pospojovány pomocí smyček. Červeně jsou vyznačeny oblasti proteinu s helikální sekundární strukturou. Znázorněna je i konformace N a C konce proteinu. Obrázek (B) je pohled z boku na pentameru proteinu VP1 BKPyV v komplexu se sialovými kyselinami. Detail tohoto komplexu je prezentován na obrázku (C). Zde si můžeme všimnout, že vazebné místo pro sialovou kyselinu je v proteinu VP1 tvořeno povrchovými smyčkami DE, BC a HI. Obrázek (A) byl připraven v programu PyMOL na základě dat z Liddington *et al.*, 1991 a Stehle *et al.*, 1996. Struktura na obrázku pochází z databáze PDB a je dostupná pod kódem 1SIE. Obrázky (B) a (C) byly upraveny a převzaty z Neu *et al.*, 2013.

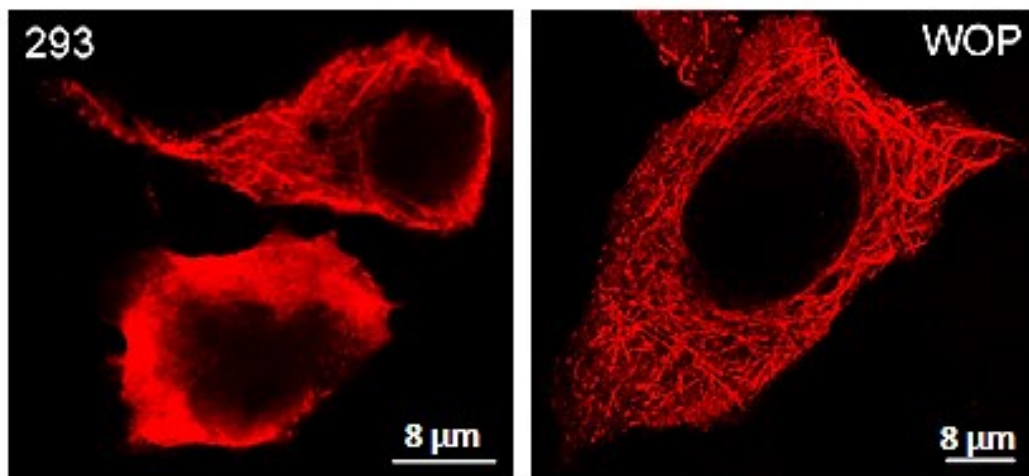
## 2.9. INTERAKCE MEZI MIKROTUBULY A VP1 MYŠÍHO POLYOMAVIRU

Kromě interakce s minoritními strukturními proteiny VP2 a VP3 je protein VP1 rovněž schopen vazby i s řadou dalších buněčných proteinů. Prozatím jich ale bylo identifikováno jen velmi omezené množství. Experimentálně byla například prokázána interakce s proteinem Hsc70, který patrně brání předčasné tvorbě prázdných kapsid v cytoplazmě (Cripe *et al.*, 1995; Chromy *et al.*, 2003). Dalším interakčním partnerem proteinu VP1 je poly(ADP-ribóza) polymeráza 1 (Carbone *et al.*, 2006) či transkripční faktor YY1 (Palková *et al.*, 2000). *In vitro* byla také potvrzena interakce mezi proteinem VP1 a buněčnými importiny  $\alpha 2$  a  $\beta 1$  (Bird *et al.*, 2008). Nedávno byla tato interakce potvrzena i *in vivo* (Soldatova *et al.*, 2018).

Protein VP1 MPyV je rovněž schopen vázat strukturu mikrotubulů. Pokud je totiž v buňkách exprimován pouze protein VP1 dochází k jeho akumulaci v cytoplazmě a jen zhruba 10-20 % je transportováno do jádra. V cytoplazmě je protein VP1 lokalizován jednak disperzně ale zároveň tvoří i dlouhá nerozpustná vlákna, která jsou podobná mikrotubulům. Fotografie těchto struktur je zobrazena na obrázku č. 6. K efektivnímu transportu proteinu VP1 do jádra dochází teprve až poté, co je koexprimován spolu s minoritními kapsidovými proteiny. I při koexpresi ale část proteinu VP1 stále zůstává v cytoplazmě a opět vytváří nerozpustná vlákna. K tomuto jevu rovněž dochází i při infekci, což naznačuje, že by tyto struktury skutečně mohly mít relevantní fyziologický význam pro životní cyklus MPyV (Horníková *et al.*, 2017).

Při postupné frakcionaci buněk transientně exprimujících protein VP1 se ukázalo, že vláknité struktury proteinu VP1 jsou vysoce stabilní a téměř nerozpustné. Nakonec bylo prokázáno, že se skutečně jedná o vlákna mikrotubulů, která jsou ale tak obalena a stabilizována proteinem VP1, že ani nemohou být při imunofluorescenci rozpoznány protilátkami specifickými proti tubulinu. Tvorbu těchto vláken bylo rovněž možné zastavit inkubací buněk s látkami destabilizujícími mikrotubulární síť, což dále potvrzujeme roli mikrotubulů v jejich vzniku (Horníková *et al.*, 2017). Součástí komplexu proteinu VP1 a mikrotubulů je i další buněčný chaperon, Hsp90. Zprvu bylo navrženo, že by tento protein mohl zprostředkovávat vazbu mezi VP1 a mikrotubuly, ale i po jeho inhibici stále docházelo k tvorbě VP1 vláken i když se sníženou účinností. Spíše než tedy zprostředkovatel interakce by protein Hsp90 mohl pomáhat organizovat protein VP1 podél mikrotubulů (Horníková *et al.*, 2017). Buňky infikované MPyV či transfekované plazmidem zajišťujícím expresi proteinu VP1 mají rovněž zvýšenou úroveň acetylace  $\alpha$ -tubulinu, což je známkou jejich zvýšené mechanické stability (Xu *et al.*, 2017). Ukázalo se ale, že tato acetylace není nutná pro vazbu proteinu VP1 k mikrotubulům (Horníková *et al.*, 2017).

Při expresi proteinu VP1 navíc dochází i k zástavě buněčného cyklu v G2/M přechodu (Horníková *et al.*, 2017). To je pochopitelné vzhledem k tomu, že protein VP1 způsobuje petrifikaci mikrotubulů. Pro úspěšnou mitózu je totiž zapotřebí jejich funkční dynamiky. Vazba proteinu VP1 k dělicímu vřeténku byla zdokumentována již dříve, a to při heterologní expresi v buňkách *S. cerevisiae*, kde VP1 bránil růstu kvasinkových kolonií (Palková *et al.*, 2000). V pozdní fázi infekce MPyV by tedy protein VP1 mohl kromě funkce v morfogenezi nových virionů hrát i roli v zástavě buněčného cyklu a vstupu buněk do mitózy, jejíž průběh by patrně mohl negativně interferovat s replikačním cyklem MPyV.



**Obrázek č. 6 – Expresí proteinu VP1 MPyV v savčích buňkách vede ke vzniku vláknitých struktur**

Na obrázcích z konfokálního mikroskopu můžeme vidět vláknité struktury (značeny červeně) tvořené proteinem VP1, které vznikají 24 hodin po transfekci buněk HEK293 a WOP. Převzato a upraveno z publikace Horníková *et al.*, 2017.

## **3. CÍLE PRÁCE**

Dlouhodobým cílem naší laboratoře je, co nejvíce objasnit životní cyklus myšího polyomaviru. Studujeme události spojené s časnou fází infekce včetně toho, jakým způsobem dochází ke vstupu viru do jádra hostitelské buňky. Také studujeme, jakou další funkci, kromě té strukturní, mohou hrát kapsidové proteiny v infikované hostitelské buňce. Posledních pár let se rovněž naše laboratoř věnuje i roli přirozené imunity v rozpoznání polyomavirové infekce. V rámci své diplomové práce se zabývám právě druhým bodem našeho studia myšího polyomaviru, a to hledáním nových funkcí hlavního kapsidového proteinu VP1. Zde navazuji na práce Palková *et al.*, 2000 a Horníková *et al.*, 2017, kde bylo zjištěno, že VP1 myšího polyomaviru je schopen jak při heterologní expresi, tak i v pozdní fázi infekce vázat struktury hostitelských mikrotubulů.

**Mým prvním cílem v rámci diplomové práce bylo otestovat, jestli jsou pentamery složené jen z proteinu VP1, schopny vázat strukturu mikrotubulů bez přítomnosti dalších proteinů. V rámci tohoto cíle bylo mým úkolem.**

- **Připravit, izolovat a purifikovat VLPs myšího polyomaviru složené pouze z hlavního kapsidového proteinu VP1**
- **Izolované částice rozložit na jednotlivé pentamery, které byly následně testovány, jestli jsou *in vitro* schopny vázat mikrotubuly bez přítomnosti jiných proteinů**

V naší laboratoři jsme se rovněž nedávno začali věnovat studiu dalšího polyomaviru, a to lidského BK polyomaviru. Stejně jako v případě myšího polyomaviru nás zajímají další možné interakce jeho hlavního kapsidového proteinu VP1 s buněčnými proteiny či strukturami.

**Proto bylo mým druhým cílem připravit detekční systém, který nám umožní identifikovat potenciální interakční partnery proteinu VP1. Dílčí cíle zahrnovaly:**

- **Připravit rekombinantní geny pro protein VP1 s N a C koncově vázanou capTEV™ kotvou**
- **Otestovat expresi tohoto rekombinantního proteinu v savčích buňkách a následně pomocí afinitní chromatografie izolovat proteinové komplexy, ve kterých se nachází**
- **Analyzovat data získaná pomocí hmotnostní spektrometrie a identifikovat nové potenciální interakční partnery proteinu VP1**

## **4. MATERIÁLY A METODY**

## 4.1 MATERIÁLY

### 4.1.1 ROZTOKY

Jediným roztokem, který byl univerzálně používán v celé diplomové práci bylo PBS o složení: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH ~ 7,4

Ostatní použité roztoky byly většinou používány jen pro jeden typ metody. Proto je jejich název a složení vždy přiloženo v příslušné kapitole.

### 4.1.2 ANTIBIOTIKA

**Ampicilin** (Biomedika)

- pracovní koncentrace 100 µg/ml

**Chloramfenikol** (Sigma-Aldrich)

- pracovní koncentrace 25 µg/ml

**Kanamycin sulfát** (MP Biomedicals)

- pracovní koncentrace 50 µg/ml

**Zeocin** (ThermoFisher Scientific)

- pracovní koncentrace 50 µg/ml

### 4.1.3 BAKTERIÁLNÍ MÉDIA

**LB médium** (Sigma-Aldrich)

- 10 g/l peptonu, 5 g/l kvasničného autolyzátu, 10 g/l chloridu sodného, pH ~ 7,5

**LB médium s přidaným agarem** (Sigma-Aldrich)

- 10 g/l peptonu, 5 g/l kvasničného autolyzátu, 10 g/l chloridu sodného, 15 g/l agaru, pH ~ 7,5

**LB médium s nízkým obsahem soli** (Sigma-Aldrich)

- 10 g/l peptonu, 5 g/l kvasničného autolyzátu, 5 g/l chloridu sodného, pH ~ 7,5

**LB médium s nízkým obsahem soli a přidaným agarem** (Sigma-Aldrich)

- 10 g/l peptonu, 5 g · l<sup>-1</sup> kvasničného autolyzátu, 5 g/l chloridu sodného, 15 g/l agaru, pH ~ 7,5

**SOC médium**

- 20 g/l peptonu, 5 g/l kvasničného autolyzátu, 10 mM chlorid sodný; 2,5 mM chlorid draselný, 20 mM glukóza, 10 mM síran hořečnatý, 10 mM chlorid hořečnatý, pH ~ 7,5

**TPN médium**

- 20 g/l peptonu, 5 g/l kvasničného autolyzátu, 5 g/l chloridu sodného, pH ~ 7,5

#### 4.1.4 MÉDIA PRO TKÁŇOVÉ KULTURY

##### DMEM médium se sérem

- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma-Aldrich), 5% (V/V) FBS (Sigma-Aldrich)

##### DMEM médium bez séra

- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma-Aldrich),

##### Médium pro hmyzí buňky se sérem

- TNM-HF hmyzí médium (Sigma-Aldrich), 5% (V/V) FBS (Sigma-Aldrich), směs antibiotik pro tkáňové kultury (Sigma-Aldrich)

#### 4.1.5 BAKTERIÁLNÍ KMENY

##### *Escherichia coli* kmen TOP10 (ThermoFisher Scientific)

- Genotyp: F- *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74* *recA1* *araD139*  $\Delta$ (*ara leu*)7697 *galU galK rpsL* (StrR) *endA1 nupG*

#### 4.1.6 BUNĚČNÉ LINIE

##### Hmyzí buněčná linie Sf9 (ATCC)

- epiteliální buňky izolované z ovarií kukly můry Blýskavky kukuřičné (*Spodoptera frugiperda*)

##### Lidská buněčná linie HEK 293 (ATCC)

- embryonální epiteliální buňky izolované z ledvin plodu *Homo Sapiens* a imortalizované lidským adenovirem 5

#### 4.1.7 BAKULOVÍROVÉ VEKTORY

##### Rekombinantní bakulovirus VL-VP1

Mutanta divokého bakuloviru AcNPV exprimující hlavní kapsidový protein VP1 myšího polyomaviru, kmen BG (Forstova *et al.*, 1993).

#### 4.1.8 PLAZMIDOVÉ VEKTORY

##### pENTR-VP1

Donorový plazmid určený pro klonování pomocí systému GateWay. Obsahuje gen pro hlavní kapsidový protein VP1 polyomaviru BK (subtyp IV), který je ohraničen sekvencemi attL1 a attL2. Tyto sekvence mohou pomocí enzymu LR klonázy rekombinovat se sekvencemi attR1 a attR2, jež jsou přítomny na cílovém vektoru určeném pro expresi. Vektor rovněž kóduje gen pro kanamycinovou rezistenci, což umožňuje selekci pomocí antibiotik (Horníková, nepublikovaná data).



### **pENTR-VP1ΔSTOP**

Donorový plazmid určený pro klonování pomocí systému GateWay. Obsahuje naklonovaný gen pro hlavní kapsidový protein VP1 polyomaviru BK (subtyp IV), jenž má deletovaný stop kodón UGA. Díky tomu je možné tento gen pro protein VP1 použít pro tvorbu C terminálních fúzí. I v tomto případě je gen ohraničen sekvencemi attL1 a attL2, jež mohou rekombinovat se sekvencemi attR1 a attR2 v cílovém expresním vektoru. Vektor rovněž kóduje gen pro kanamycinovou rezistenci, což umožňuje selekci pomocí antibiotik (Horníková, nepublikovaná data).

### **pcDNA3.2/capTEV-NT/V5-DEST**

Expresní plazmid určený pro expresi proteinů s N koncově fúzovanou capTEV™ kotvou. Hlavní součástí této kotvy je BioEase™ peptid, který má vlastnost být v savčích buňkách přirozeně biotinylován. Tato modifikace umožňuje N terminálně fúzované proteiny afinitně purifikovat pomocí streptavidinu. Downstream od capTEV™ kotvy jsou sekvence attR1 a attR2, které umožňují rekombinaci s attL1 a attL2 sekvencemi přítomnými na donorovém plazmidu. Mimo to vektor obsahuje geny pro rezistenci na ampicilin, neomycin/kanamycin a chloramfenikol (ThermoFisher Scientific).

### **pcDNA3.2/capTEV-CT/V5-DEST**

Expresní plazmid určený pro expresi proteinů s C koncově fúzovanou capTEV™ kotvou. Hlavní součástí této kotvy je BioEase™ peptid, který má vlastnost být v savčích buňkách přirozeně biotinylován. Tato modifikace umožňuje C terminálně fúzované proteiny afinitně purifikovat pomocí streptavidinu. Upstream od capTEV™ kotvy jsou sekvence attR1 a attR2, které umožňují rekombinaci s attL1 a attL2 sekvencemi přítomnými na donorovém plazmidu. Pro úspěšnou produkci C koncově fúzovaného proteinu je důležité, aby geny pro klonované proteiny měly deletovaný stop kodón. Mimo to vektor obsahuje geny pro rezistenci na ampicilin, neomycin/kanamycin a chloramfenikol (ThermoFisher Scientific).

### **capTEV-NT-VP1**

Expresní plazmid, který vznikl LR rekombinací mezi donorovým vektorem pENTR-VP1 a cílovým vektorem pcDNA3.2/capTEV-NT/V5-DEST. Tento vektor je schopen po transfekci exprimovat rekombinantní protein VP1 BKPyV, jenž je N koncově fúzován s capTEV™ kotvou. Díky této kotvě je fúzní protein VP1 v savčích buňkách přirozeně biotinylován a je možné ho vyizolovat pomocí afinitní chromatografie s využitím streptavidinu. Součástí plazmidu jsou rovněž geny pro rezistenci na antibiotika ampicilin a neomycin/kanamycin. Chloramfenikolová rezistence byla ztracena při LR rekombinaci.

### **capTEV-CT-VP1**

Expresní plazmid, který vznikl LR rekombinací mezi donorovým vektorem pENTR-VP1ΔSTOP a cílovým vektorem pcDNA3.2/capTEV-CT/V5-DEST. Tento vektor je schopen po transfekci exprimovat rekombinantní protein VP1 BKPyV, jenž je C koncově fúzován s capTEV™ kotvou. Díky této kotvě je fúzní protein VP1 v savčích buňkách přirozeně biotinylován a je možné ho vyizolovat pomocí afinitní chromatografie s využitím streptavidinu. Součástí plazmidu jsou rovněž geny pro rezistenci na antibiotika ampicilin a neomycin/kanamycin. Chloramfenikolová rezistence byla ztracena při LR rekombinaci.

### **pGwf**

Expresní plazmid, který je cílovým vektorem pro rekombinaci pomocí GateWay systému. Obsahuje sekvence attR1 a attR2, které pomocí LR klonázy mohou rekombinovat se sekvencemi attL1 a attL2 na donorovém plazmidu. Vektor rovněž obsahuje gen pro GFP, který ulehčuje rozpoznání transfekovaných buněk. Vektor není určen pro expresi fúzních proteinů a neobsahuje žádný typ afinitní kotvy. Součástí plazmidu jsou geny pro chloramfenikolovou a zeocinovou rezistenci (Pastrana *et al.*, 2009).

### **pGwf-VP1**

Expresní plazmid, jenž vznikl LR rekombinací mezi donorovým vektorem pENTR-VP1 a cílovým vektorem pGwf. Tento vektor je schopen v savčích buňkách exprimovat hlavní kapsidový protein VP1 BKPyV. Protein je v buňce produkován bez přídatných sekvencí na N či C konci. Podobně jako cílový vektor pGwf obsahuje i pGwf-VP1 gen pro GFP, který ulehčuje rozpoznání transfekovaných buněk. Tento vektor obsahuje pouze gen pro zeocinovou rezistenci.

Fyzikální mapy všech použitých plazmidů jsou k dispozici pro prohlédnutí v sekci Přílohy, kapitola 9.1, Mapy použitých plazmidů. Všechny použité mapy byly připraveny pomocí programu SnapGene (<https://www.snapgene.com>).

## **4.1.9 KOMERČNÍ KITY**

- GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich)
- JetStar™ Endotoxin-free Plasmid Purification Kit (Genomed)
- Gateway™ LR Clonase™ II Enzyme Mix (ThermoFisher Scientific)
- TurboFect Transfection Reagent (ThermoFisher Scientific)
- Nuclear & Cytoplasmic Extraction Kit (G-Biosciences)
- NativePure™ Affinity Purification Kit (ThermoFisher Scientific)
- Microtubule Binding Protein Spin-down Assay Kit (Cytoskeleton, Inc.)

## 4.1.10 PROTILÁTKY

### PRIMÁRNÍ PROTILÁTKY

#### M $\alpha$ -MPyV VP1

- Myší monoklonální protilátka specifická proti hlavnímu kapsidovému proteinu VP1 myšího polyomaviru, ředěna 100x (Forstova *et al.*, 1993).

#### Rb $\alpha$ -BKPyV VP1

- Králičí polyklonální protilátka specifická proti hlavnímu kapsidovému proteinu VP1 BK polyomaviru, ředěna 500x (připraveno v naší laboratoři).

#### Rb $\alpha$ -biotin

- Králičí polyklonální protilátka specifická proti molekule biotinu, ředěna 1000x (Bethyl Laboratories).

### SEKUNDÁRNÍ PROTILÁTKY

#### G $\alpha$ M-HRP

- Kozí polyklonální protilátka specifická proti myším imunoglobulinům, která byla konjugována s křenovou peroxidázou, ředěna 1000x (BioRad Laboratories).

#### G $\alpha$ Rb-HRP

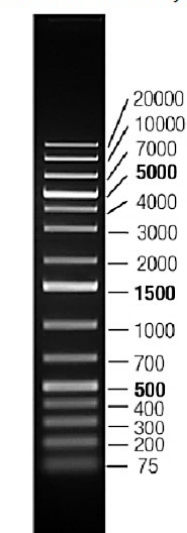
- Kozí polyklonální protilátka specifická proti králičím imunoglobulinům, která byla konjugována s křenovou peroxidázou, ředěna 1000x (BioRad Laboratories).

#### G $\alpha$ Rb-Alexa Fluor 546

- Kozí polyklonální protilátka specifická proti králičím imunoglobulinům, která byla konjugována s fluorescenční barvou Alexa Fluor 546, ředěna 1000x (ThermoFisher Scientific).

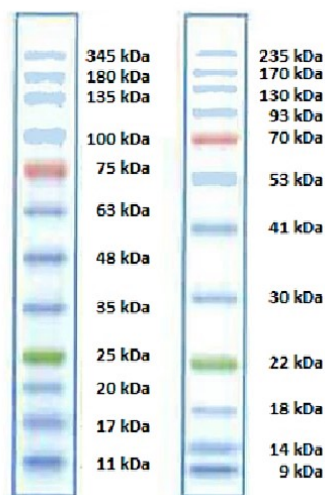
## 4.1.11 MARKERY MOLEKULOVÝCH HMOTNOSTÍ

**DNA marker**  
GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder  
(ThermoFisher Scientific)



1% agaróza  
1x TAE pufr

**Proteinový marker**  
Black Protein Ladder  
(Central European Biosystems)



4-20%  
Tris-glycinový gel

MOPS pufr  
Bis-Tris gel

## 4.2 PRÁCE S BAKTERIÁLNÍMI KMENY

### 4.2.1 PŘÍPRAVA ELEKTROKOMPETENTNÍCH BUNĚK

Bakteriální kmen *E. coli* TOP10 byl zaočkován sterilním párátkem do 10 ml TPN média a kultivován přes noc (zhruba 16 hodin) v orbitálním inkubátoru při 37 °C a 200 rpm. Druhý den byl z bakteriální kultury odebrán vzorek suspenze, který byl zředěn 25x a u kterého byla při 560 nm změřena jeho optická denzita (OD) ve spektrofotometru. Následně byla část bakteriální kultury naředěna TPN médiem tak, aby v 500 ml činila OD<sub>560</sub> 0,1. Takto připravená suspenze pak byla inkubována při 37 °C, 200 rpm.

Po dosažení hodnoty OD<sub>560</sub> v rozmezí 0,5-0,7 byla kultivace ukončena. Následující kroky byly prováděny na ledu a byla dodržována maximální sterilita práce, aby nedošlo ke kontaminaci. Bakteriální suspenze byla po dobu 10 minut centrifugována při teplotě 4 °C a 4 000 g. Bakteriální pelet byl resuspendován v 500 ml vychlazené demi H<sub>2</sub>O, suspenze byla centrifugována za stejných podmínek jako předtím a pelet byl znovu resuspendován ve 250 ml demi H<sub>2</sub>O. Suspenze byla opět centrifugována a pelet byl resuspendován ve 20 ml 10% (V/V) vychlazeného glycerolu. Po další centrifugaci byl pelet rozpuštěn v 10 ml 10% glycerolu. Nakonec byly buňky ještě jednou centrifugovány a pelet byl rozpuštěn v 1 ml 10% glycerolu. Tato suspenze byla rozdělena na aliquoty po 50 µl, které byly prudce zmrazeny v tekutém dusíku a uchovány v -80 °C.

### 4.2.2 TRANSFORMACE ELEKTROKOMPETENTNÍCH BUNĚK ELEKTROPORACÍ

Aliquot (50 µl) elektrokompetentních buněk *E. coli* byl rozmrazen na ledu a byl k němu přidán 1 µl vzorku DNA (v našem případě inaktivovaná rekombinační reakce plazmidů). Směs DNA a bakterií byla důkladně promíchána a následně ponechána na ledu po dobu 1 minuty. Poté byla celá směs přenesena do elektroporační kyvety (BioRad, vzdálenost elektrod 2 mm). Tato kyveta byla umístěna do elektroporátoru Eporator (Eppendorf) a byl aplikován stejnosměrný elektrický puls (2,5 kV, 25 µF a 200 Ω5 ms). Okamžitě po doběhnutí programu byly bakterie v kyvetě zředěny a promíchány 1 ml SOC média. Buněčná suspenze pak byla přenesena pipetou do sterilní Erlenmeyerovy baňky, ve které byla suspenze aerobně třepána (37 °C, 200 rpm) po dobu 1 hodiny. Po skončení inkubace byly buňky *E. coli* vysety na agarové plotny (s příslušným antibiotikem) v objemu 10 µl, 100 µl a 900 µl a kultivovány v termostatu (37 °C) do druhého dne.

### **4.2.3 KULTIVACE BAKTERIÍ V SUSPENZI**

Pro suspenzní kultivaci byla v bakteriálním boxu sterilně zaočkována část bakteriálního biomasy (buď z konzervy anebo z plotny seškrábnutá monokolonie) do příslušného objemu kultivačního média. Pro minipreparaci a ověření rekombinace expresních plazmidů byly bakterie inokulovány do 700 µl média, zatímco pro izolaci soupravou GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit byly zaočkovány do 5 ml média. JetStar™ Endotoxin-free Plasmid Purification Kit byl použit pro izolaci velkého množství expresních plazmidů, které sloužily pro transfekci buněk v tkáňových kulturách. Pro izolaci tímto kitem byla nejprve sterilním párátkem část bakteriální biomasy (z konzervy uskladněné v – 80 °C) zaočkována do 5 ml média a inkubována do druhého dne. Poté byl 1 ml z této kultury inokulován do 100 ml média a buňky byly kultivovány 16 hodin při 37 °C a 200 rpm na orbitální třepače. Pro selekci bakterií rezistentních na ampicilin či chloramfenikol bylo použito LB (Luria-Bertani) médium (Sigma Aldrich), zatímco pro selekci bakterií nesoucí plazmid se zeocinovou rezistencí bylo nutné použít LB médium s nízkým obsahem solí tzv. low-salt (výsledná koncentrace NaCl v médiu byla 5g/l). Všechna antibiotika byla do příslušných médií přidána po sterilizaci a jejich následném zchladnutí.

### **4.2.4 KULTIVACE BAKTERIÍ NA PEVNÝCH MEDIÍCH**

Pro kultivaci bakterií na pevných médiích bylo použito LB médium s přídavkem agaru (Sigma Aldrich) a příslušných antibiotik. Pro selekci bakterií pomocí zeocinu bylo použito low-salt LB médium rovněž s přídavkem agaru. Bakteriální suspenze byla nakapána do středu Petriho misky a rozetřena po celém povrchu nebo byla část bakteriální biomasy z narostlé monokolonie přenesena sterilním párátkem na Petriho misku. Bakterie byly kultivovány dnem vzhůru v termostatu při 37 °C, 12-16h.

### **4.2.5 KONZERVACE BAKTERIÍ PRO DLOUHODOBÉ SKLADOVÁNÍ**

Pro dlouhodobé skladování bakterií s rekombinantními plazmidy bylo v 1,5ml zkumavce smícháno 0,5 ml bakteriální kultury spolu s 0,5 ml 40% (V/V) roztoku glycerolu. Takto připravená suspenze byla okamžitě přenesena do – 80 °C a uschována pro budoucí použití.

## 4.3 PRÁCE S BUNĚČNÝMI KULTURAMI

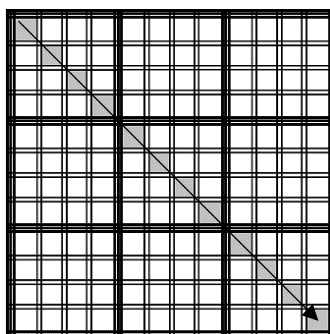
### 4.3.1 PASÁŽOVÁNÍ SAVČÍCH BUNĚK LINIE HEK293

Z Petriho misky s konfluentně narostlými buňkami linie HEK293 bylo pomocí sterilní skleněné pipety odsáto médium a buňky byly omyty verzenem (0,02% EDTA v PBS). Následně byl k buňkám přidán 0,5% roztok trypsinu rovněž v PBS. Množství přidaného trypsinu se lišilo v závislosti na průměru použité Petriho misky. Do 60mm misky bylo přidáno 300  $\mu$ l trypsinu, zatímco do 100mm bylo přidáno 500  $\mu$ l trypsinu. Misky byly přeneseny do termostatu a inkubovány zhruba 2-5 minut. Po skončení inkubace byly uvolněné buňky resuspendovány v DMEM médiu se sérem. Pasážování buněk HEK293 probíhalo jednou za tři či čtyři dny, a to v poměru 1:10. Pro jednotlivé experimenty bylo v Bürkerově komůrce spočítáno množství buněk a v závislosti na typu pokusu, pak byly buňky naředěny médiem do požadované koncentrace a vysety na nové sterilní misky/destičky. Pokud byly buňky kultivovány pro následnou imunofluorescenční detekci proteinů, tak byly do 24-jamkové destičky ještě před vysetím buněk přidány sterilní sklíčka jako podklad. Buňky byly inkubovány v termostatu, který byl nastaven na 37 °C a 5% atmosféru CO<sub>2</sub>.

### 4.3.2 STANOVENÍ POČTU BUNĚK V SUSPENZI

Při pasážování buněk linie HEK293 bylo odebráno 10  $\mu$ l suspenze s uvolněnými buňkami a celý tento objem byl na nakapán na jedno ze dvou velkých počítacích polí Bürkerovy komůrky. Na vršek komůrky pak bylo přiloženo krycí sklíčko, což vedlo k rozprostření kapky po celém povrchu pole. Takto připravená počítací komůrka byla následně vložena do světelného mikroskopu a byly spočítány buňky. Počítací pole Bürkerovy komůrky bylo rozděleno na 9 velkých čtverců, z nichž každý byl ještě dále rozdělen na 16 menších čtverců. Buňky byly počítány v těchto menších čtvercích v diagonálním směru, tak jak to je naznačeno na obrázku č. 7. Co se týče buněk na stranách počítacího čtverce, tak se počítaly pouze buňky na pravé a spodní straně (tvar písmena L).

Obrázek č. 7 – Schéma směru počítání buněk v Bürkerově komůrce



Byly tedy celkem spočítány buňky ve 12 menších čtvercích. Jeden tento čtverec měl obsah 0,04 mm<sup>2</sup>. Výška počítací komůrky byla 0,1 mm. Objem suspenze nad jedním počítacím čtvercem tudíž byl 0,004 mm<sup>3</sup>. Počet buněk v suspenzi můžeme tedy určit dle následujícího vzorce, kde  $n$  je celkový počet buněk ve všech 12 spočítaných čtvercích a  $c_1$  je koncentrace naší buněčné suspenze (počet buněk na 1 ml).

$$c_1 [\text{počet buněk na ml}] = \frac{n \text{ buněk}}{12 \cdot 4 \cdot 10^{-6} \text{ ml}} = \frac{n \text{ buněk}}{4,8 \cdot 10^{-5} \text{ ml}}$$

Pro potřeby experimentů byly buňky naředěny do požadované pracovní koncentrace. K tomuto účelu byla použita upravená směšovací rovnice uvedená níže. V této rovnici je  $c$  požadovaná koncentrace buněk a  $c_1$  je koncentrace počáteční.  $V$  je konečný objem suspenze o koncentraci  $c$ , do kterého je nutné naředit počáteční objem  $V_1$  (o koncentraci  $c_1$ ).

$$V [\text{ml}] = \frac{c_1 \cdot V_1}{c}$$

### 4.3.3 TRANSFEKCE BUNĚK LINIE HEK293

K transfekci pomocí transfekčního činidla TurboFect Transfection Reagent (ThermoFisher Scientific) byly použity buňky linie HEK293, které byly pasážovány do požadované koncentrace nejméně 24 hodin před transfekcí. Pro transfekci ve 24-jamkové destičce byly vysety buňky v koncentraci  $2-6 \cdot 10^4$  buněk/jamku, aby bylo dosaženo 70-90% konfluence. Transfekční směs pro transfekci jedné jamky byla připravena dle instrukcí výrobce následovně. Nejprve byl rozpuštěn 1 µg DNA ve 100 µl DMEM média. Ke směsi byly přidány 2 µl transfekčního činidla TurboFect, celá směs byla důkladně promíchána a inkubována 20 minut při laboratorní teplotě. Po skončení inkubace pak bylo do každé jamky s buňkami přidáno 100 µl připravené transfekční směsi, která byla opatrně promíchána s médiem a buňky byly inkubovány 24-72 hodin v termostatu (37 °C, 5% atmosféra CO<sub>2</sub>).

Transfekce pomocí TurboFectu byla prováděna i v jiném formátu než jen ve 24-jamkové destičce. V rámci diplomové práce byly prováděny transfekce i v 6-jamkové destičce a 60mm Petriho miskách. Rozdíly v množství přidané DNA a činidel v závislosti na použité kultivační destičce/misce jsou shrnuty v tabulce č. 2.

## Tabulka č. 2 – Rozdíly v množství látek při přípravě transfekční směsi TurboFect v závislosti na použitém typu kultivačního plastu.

Tabulka byla převzata z oficiálního návodu od společnosti ThermoFisher Scientific

	Objem kultivačního média (ml/jamku)	Koncentrace buněk HEK293 (buněk/jamku)	Množství přidané DNA (μg)	Objem média pro resuspendování DNA (μl)	Objem přidaného TurboFectu (μl)
24-jamková destička	1	$2-6 \cdot 10^4$	1	100	2
6-jamková destička	4	$0,8-2,4 \cdot 10^5$	4	400	6
60mm Petriho miska	6	$2-6,3 \cdot 10^5$	6	600	12

### 4.3.4 NEPŘÍMÁ IMUNOFLUORESCENCE

Buňky narostlé na krycích sklíčkách ve 24-jamkové destičce byly promyty roztokem PBS. V dalším kroku byly buňky fixovány po dobu 15 minut ve 3,7% (w/V) roztoku paraformaldehydu v PBS. Po skončení fixace byl paraformaldehyd z buněk odsán a následovala 5minutová permeabilizace v 0,5% (V/V) roztoku Triton X-100 v PBS. Po těchto 5 minutách byl z buněk odsán i roztok Tritonu X-100 a buňky byly 3krát promyty malým množstvím PBS (každé promytí zhruba 10 minut).

Po fixaci a permeabilizaci byly buňky dále inkubovány 30 minut v blokačním roztoku a poté byly inkubovány po dobu 60 minut s primární protilátkou naředěnou ve stejném blokačním roztoku. Buňky byly opět promyty PBS (3x 10 minut) a následně inkubovány 30 minut s fluorescenčně značenou sekundární protilátkou opět naředěnou v blokačním roztoku. Následovalo další promytí v PBS (opět 3x 10 minut) a pak byly buňky opláchnuty demi H<sub>2</sub>O. Nakonec byla vyndána sklíčka s obarvenými buňkami z jamek a byla položena na kapku 50% glycerolu (V/V) s přísadkou DAPI. Samotné pozorování buněk bylo provedeno v invertovaném fluorescenčním mikroskopu Olympus IX71.

#### • Složení použitých roztoků/pufrů

Blokovací roztok:

0,25% (w/V) BSA; 0,25% (w/V) želatina v PBS

### 4.3.5 FRAKCIONACE BUNĚK LINIE HEK293 (JÁDRO/CYTOPLAZMA)

Buňky narostlé na 60mm Petriho miskách byly transfekovány a 48 hodin po transfekci byly frakcionovány. Frakcionace buněk linie HEK293 byla provedena komerčním kitem Nuclear & Cytoplasmic Extraction (G-Biosciences). V prvním kroku frakcionace byly buňky HEK293 uvolněny z podkladu Petriho misky kombinací verzenu a roztoku trypsinu. Uvolněné buňky byly přeneseny do 1,5 ml zkumavky a okamžitě přeneseny na led, aby se zabránilo působení



proteáz. Sklizené buňky pak byly centrifugovány po dobu 5 minut při 4 °C a 500 g. Buněčný pelet byl promyt 1 ml vychlazeného PBS. Tato suspenze byla zcentrifugována po dobu 5 minut při 4 °C a 500 g. K buněčnému peletu (o objemu zhruba 30 µl) bylo přidáno 300 µl pufru SubCell I (obsahující inhibitory proteáz), ve kterém byly buňky resuspendovány. Tento vzorek byl poté inkubován 10 minut na ledu a dále k němu bylo přidáno 15 µl SubCell lyzačního činidla. Celý objem byl promíchán, a nakonec byl vzorek opět inkubován na ledu po dobu 1 minuty. Jako další krok byl vzorek centrifugován při 16 000 x g a 4 °C po dobu 5 minut. Supernatant (zhruba 300 µl), který vznikl při této centrifugaci, byl přenesen do vychlazené 1,5ml zkumavky, označen jako cytoplazmatická frakce a uskladněn v -80 °C. Pelet byl resuspendován ve 60 µl jaderného extrakčního pufru. Suspenze byla 30 minut inkubována na ledu, přičemž byl vzorek každých 10 minut důkladně promíchán. Na závěr byl vzorek centrifugován při 16 000 x g a 4 °C po dobu 10 minut. Supernatant (zhruba 60 µl) byl odebrán, přenesen do 1,5 ml zkumavky, označen jako jaderná frakce a uskladněn v -80 °C.

Vyhodnocení toho, kolik proteinů se nacházelo v jednotlivých frakcích proběhlo pomocí Western blotu. Signál jednotlivých proteinů byl normalizován na celkové množství proteinu ve vzorku a procento proteinů v jaderné frakci bylo vyjádřeno podle následujících rovnic:

$$\text{Procento proteinů v jádře} = \frac{\text{signál v jaderné frakci}}{\text{signál v cytoplazmatické frakci} + \text{signál v jaderné frakci}} \cdot 100\%$$

$$\text{Signál v jaderné frakci} = (\text{signál proteinů po Western blotu} / \text{použitý objem vzorku}) \cdot 60 \mu\text{l}$$

$$\text{Signál v cytoplazmatické frakci} = (\text{signál proteinů po Western blotu} / \text{použitý objem vzorku}) \cdot 300 \mu\text{l}$$

#### **4.3.6 PASÁŽOVÁNÍ HMYZÍCH BUNĚK LINIE Sf9**

Hmyzí buňky linie Sf9 byly kultivovány pro potřebu izolace velkého množství VLPs a zpravidla byly pasážovány každé čtyři dny. Nejprve byly buňky linie Sf9 (konfluente 80-90 %) pomocí sterilního plastového škrabátka seškrábány z povrchu kultivační misky (díky nízké míře adheze) do stávajícího média. Tato buněčná suspenze pak byla promíchána a rozdělena v poměru 1:4 do čtyř nových 100mm Petriho misek, které byly doplněny do 10 ml hmyzím médiem se sérem. Pasážované buňky linie Sf9 byly následně inkubovány v termostatu při 28 °C.

#### **4.3.7 INFEKCE HMYZÍCH BUNĚK LINIE Sf9 REKOMBINANTNÍM BAKULOVIREM**

Buňky linie Sf9 byly pasážovány v poměru 1:2 do hmyzího média bez séra a inkubovány 1 hodinu při 27°C. Z misek bylo opatrně odsáto médium a místo toho k nim byl přidán 1 ml infekčního inokula (supernatant z předešle infikovaných buněk). Následně byly buňky inkubovány 60-90 minut při laboratorní teplotě. Po skončení inkubace bylo k buňkám linie Sf9 přidáno 9 ml hmyzího média se sérem a buňky byly inkubovány v termostatu při 28 °C 3-4 dny.

## 4.4 PRÁCE S DNA

### 4.4.1 IZOLACE PLAZMIDOVÉ DNA POMOCÍ KOMERČNÍCH SOUPRAV

#### **GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich)**

Pro izolaci bylo 3-5 ml přes noc narostlé bakteriální kultury centrifugováno při 4 000 x g po dobu 7 minut. Pelet byl rozpuštěn ve 200 µl “resuspendačního roztoku”. K této suspenzi bylo přidáno 200 µl lyzačního pufru a celá směs byla promíchána opatrným otáčením zkumavky (zhruba 6–8 otočení). Výsledný lyzát byl inkubován 5 minut při pokojové teplotě. Po skončení inkubace bylo k lyzátu přidáno 350 µl neutralizačního/vazebného pufru a vzniklá směs byla opět promíchána opatrným otáčením zkumavky (nyní zhruba 4–6krát). Vysrážené buněčné zbytky byly peletovány při 12 000 x g po dobu 10 minut.

V průběhu výše provedené inkubace byla připravena kolona pro vazbu DNA. Do vazebné kolony bylo nejprve napipetováno 500 µl roztoku, jenž připravil kolonu na vazbu DNA. Poté byla kolona centrifugována při 12 000 x g po dobu 1 minutu a proteklý eluát byl vyhozen. Nyní byl do kolony napipetován supernatant ze zlyzovaných bakterií, který byl také stočen skrze kolonu při 12 000 x g. Proteklý lyzát byl vyhozen a kolona byla promyta 500 µl promývacího roztoku I. Dále následovalo promytí v 750 µl promývacího roztoku II. Zbytky promývacího roztoku II byly odstraněny z kolony další centrifugací (12 000 x g, 1 minuta). Nakonec byla kolona s navázanou DNA přenesena do nové mikrocentrifugační zkumavky, bylo do ní napipetováno 100 µl elučního roztoku a DNA byla vymyta centrifugací při 12 000 x g po dobu 1 minuty. Izolovaná DNA byla uskladněna v –20 °C.

#### **JetStar™ Endotoxin-free Plasmid Purification Kit (Genomed)**

Předtím než bylo přistoupeno k samotné izolaci DNA z bakterií, byla nejprve připravena JetStar Maxi izolační kolona, jež byla součástí kitu. Do kolony bylo napipetováno 30 ml ekvilibračního roztoku E4, který se ponechal pomalu protékat otevřeným dnem kolony. Proteklý roztok byl vyhozen.

Pro izolaci plazmidů byla přes noc narostlá bakteriální kultura o objemu 100 ml centrifugována po dobu 3 minut při 12 000 x g a vzniklý pelet byl resuspendován v 10 ml resuspendačního pufru E1. V dalším kroku byly buňky lyzovány přidáním 10 ml roztoku E2, který byl předeřhán na 37 °C. Celý objem suspenze byl promíchán opatrným převrácením falkony (zhruba 4-6 otočení) a roztok byl inkubován při pokojové teplotě po dobu 5 minut. Po uplynutí inkubační doby bylo k lyzátu přidáno 10 ml precipitačního pufru E3, který byl rovněž se suspenzí promíchán opakovaným otáčením falkony. Poté byly vysrážené zbytky bakterií centrifugovány na dno falkony při pokojové teplotě a přetíženy 12 000 x g

po dobu 10 minut. Následně byla k supernatantu přidána 1/10 objemu pufru Endo-1, vzorek byl promíchán a ihned přenesen na připravenou izolační kolonu. Lyzát, jenž kolonou protekl, byl vyhozen, zatímco DNA navázaná na koloně byla promyta 30 ml pufru Endo-2 a poté ještě 30 ml promývacího pufru E5.

Samotná DNA byla z kolony uvolněna přidáním 15 ml elučního pufru E6. Získaný eluát byl na to promíchán s 10,5 ml 100% (V/V) izopropanolu a centrifugován po dobu 30 minut při 12 000 x g a teplotě 4 °C. Pelet byl promyt v 5 ml 70% ethanolu (V/V). Následovala další centrifugace po dobu 10 minut při 4 °C a přetížení 12 000 x g. Pelet obsahující plazmidovou DNA byl na vzduchu vysušen (zhruba 10-15 minut). Nakonec byla DNA rozpuštěna ve vhodném objemu TE pufru, přenesena do mikrozkušavky a uskladněna v -20 °C.

#### **4.4.2 MINIPREPARACE PLAZMIDŮ Z BAKTERIÍ POMOCÍ ALKALICKÉ METODY**

Pro minipreparace plazmidů byly použity bakteriální kultury pocházející z monoklonií, jež byly zaočkovány do 700 µl bakteriálního média a inkubovány přes noc. Druhý den ráno byly bakterie peletovány při 13 000 x g a teplotě 4 °C po dobu 1 minuty. Pelety byly poté důkladně resuspendovány ve 250 µl roztoku I. Následně bylo k bakteriálním suspenzím přidáno 250 µl lyzačního roztoku II, který byl s bakteriemi promíchán opatrným převrácením zkumavek (zhruba 4x). Vzorky byly inkubovány 10 min při laboratorní teplotě. Vzniklé lyzáty byly dále neutralizovány přidáním 200 µl vychlazeného roztoku III. Poté byly vzorky znovu promíchány převrácením zkumavek a inkubovány na ledu 10 minut. Po skončení inkubace byly lyzáty centrifugovány 10 minut při 20 000 x g a 4 °C. K supernatantům bylo přidáno 0,5 ml 100% (V/V) izopropanolu, vzorek byl dobře promíchán a inkubován při 4°C nejméně 16h. Vysrážená DNA byla peletována při 10minutové centrifugaci s přetížením 20 000 x g a teplotě 4 °C. Poté byla DNA v peletech promyta 200 µl 70% (V/V) ethanolu a opět peletována. Nakonec byly pelety vysušeny na vzduchu a rozpuštěny ve 20 µl mastermixu restriční směsi (viz. kapitola 4.4.5).

- **Složení použitých roztoků/pufrů**

Roztok I:

25 mM Tris-HCl (pH ~ 8), 10 mM EDTA

Lyzační roztok II:

0,2 M NaOH, 1% (w/V) SDS

Neutralizační roztok III:

3 M octan draselný; 11,5% (V/V) kyselina octová

### 4.4.3 STANOVENÍ KONCENTRACE A ČISTOTY DNA

Pro stanovení koncentrace DNA byl použit spektrofotometr Nanodrop 2000 UV-Vis (ThermoFisher Scientific). Před samotným měřením koncentrace byl přístroj zkalibrován pomocí slepého vzorku (čistého elučního roztoku). Poté byla teprve změřena koncentrace DNA ve všech vzorcích. Kromě koncentrace DNA byla na základě absorpčního spektra zhodnocena i čistota DNA v měřených vzorcích.

### 4.4.4 REKOMBINACE PLAZMIDŮ SYSTÉMEM GATEWAY

Veškeré expresní plazmidy byly připraveny pomocí komerčního kitu Gateway™ LR Clonase™ II Enzyme Mix (ThermoFisher Scientific). Celkem byly provedeny 3 rekombinační reakce o objemu 8 µl, které byly připraveny podle tabulky č. 3. Všechny reakce byly založeny na rekombinaci mezi donorovým vektorem s naklonovaným genem pro VP1 a cílovým plazmidem určeným pro expresi v savčích buňkách.

**Tabulka č. 3 – Složení 3 rekombinačních reakcí pro přípravu expresních plazmidů**

Tabulka byla připravena na základě oficiálního návodu, jež byl součástí kitu.

	1	2	3
<b>Cílové vektory (150 ng)</b>			
pcDNA3.2/capTEV-NT/V5-DEST	5 µl	–	–
pcDNA3.2/capTEV-CT/V5-DEST	–	5 µl	–
pGwf	–	–	2 µl
<b>Donorové vektory (150 ng)</b>			
pENTR-VP1	1,3 µl	–	1,3 µl
pENTR-VP1ΔSTOP	–	1,2 µl	–
<b>TE pufr (pH ~ 8)</b>	1,7 µl	1,8 µl	4,7 µl

V dalším kroku byly přidány 2 µl LR Clonase™ II enzymatického mixu do každé rekombinační reakce a vše bylo důkladně promícháno. Poté byly reakce inkubovány ve 25 °C po dobu 1 hodiny. Rekombinace plazmidů byly ukončeny přidáním 1 µl roztoku proteinázy K k reakcím a následné 10minutové inkubaci ve 37 °C. Inaktivované reakce byly poté okamžitě použity k transformaci elektrokompetentních buněk *E. coli* kmene TOP10.

- **Složení použitých roztoků/pufrů**

TE pufr:

10 mM Tris-HCl (pH ~ 8), 1 mM EDTA

#### 4.4.5 RESTRIKČNÍ ŠTĚPENÍ PLAZMIDOVÉ DNA

Pro ověření správné rekombinace DNA byly restričními endonukleázami štěpeny jednotlivé minipreparace plazmidů získané pomocí alkalické metody. V případě minipreparací plazmidů capTEV-NT-VP1 a capTEV-CT-VP1 byla izolovaná DNA štěpena ve 20  $\mu$ l mastermixu enzymu *Mlu*I. Na jednu štěpící reakci bylo složení mastermixu 2  $\mu$ l roztoku RNázy A (10  $\mu$ g/ml), 2  $\mu$ l 10x koncentrovaného pufru R, 15  $\mu$ l demi H<sub>2</sub>O a 1  $\mu$ l enzymu *Mlu*I (10 U/ $\mu$ l). Minipreparace plazmidů pGwf-VP1 byly také štěpeny ve 20  $\mu$ l mastermixu ale již enzymu *Xho*I. Složení jedné reakce tohoto mastermixu bylo naprosto stejné jako v případě plazmidů capTEV-NT-VP1 a capTEV-CT-VP1 až na to, že místo 1  $\mu$ l enzymu *Mlu*I byl použit 1  $\mu$ l enzymu *Xho*I (10 U/ $\mu$ l).

Všechny štěpící reakce byly inkubovány po dobu 16 hodin při 37 °C. Poté byly reakce inaktivovány zahřátím na 80 °C po dobu 20 minut a analyzovány pomocí DNA elektroforézy.

- **Složení použitých roztoků/pufrů**

10x koncentrovaný pufr R:

100 mM Tris-HCl (pH ~ 8,5), 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 1M KCl, 1 mg/ml BSA

#### 4.4.6 AGARÓZOVÁ DNA ELEKTROFORÉZA

Agarózová DNA elektroforéza byla používána jednak ke kontrole správného restričního štěpení plazmidů ale i ke kontrole integrity izolované DNA. V obou případech byl použit 1% agarózový gel (w/V) rozpuštěný v 0,5x koncentrovaném TBE pufru s 10 000krát naředěným interkalačním činidlem značky GelRed Nucleic Acid Stain (Biotium). Na jednu jamku bylo nanášeno zhruba 10  $\mu$ l vzorku spolu s vhodně naředěnou 6x koncentrovanou nanášecí barvou (6x DNA Gel Loading Dye, ThermoFisher Scientific). Pro určení velikosti DNA bylo do jedné jamky napipetováno 2,5  $\mu$ l markeru DNA molekulových hmotností značky GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (ThermoFisher Scientific). Elektroforetická separace DNA probíhala při napětí 5 V/cm. Separované fragmenty byly vizualizovány pod UV světlem v transiluminátoru značky InGenius3 (Syngene).

- **Složení použitých roztoků/pufrů**

0,5x koncentrovaný TBE pufr:

5 mM Tris-borát, 2 mM EDTA (pH ~8,3)

6x DNA Gel Loading Dye:

10 mM Tris-HCl (pH ~ 7,6), 60 mM EDTA; 0,03% (w/V) bromfenolová modř; 0,03% (w/V) Xylen kyanol, 60% (V/V) glycerol

## 4.5 PRÁCE S PROTEINY

### 4.5.1 PŘÍPRAVA BUNĚČNÝCH LYZÁTŮ PRO PROTEINOVOU ELEKTROFORÉZU

Z miseks narostlými buňkami bylo nejprve odsáto médium a poté byly buňky opláchnuty PBS. K buňkám byl přidán RIPA pufr s přísávkem proteazových inhibitorů (cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail, Roche). Poté byly buňky ze dna jamky seškrábány do RIPA pufru pomocí plastového škrábátka a přeneseny do vychlazené 1,5ml zkumavky. Vzorek byl následně inkubován na ledu po dobu 30 minut. Nakonec byl vzniklý lyzát centrifugován po dobu 30 minut při 4 °C a 20 000 x g. Supernatant byl odebrán, přenesen do nové zkumavky a uskladněn v -20 °C.

- **Složení použitých roztoků/pufrů**

RIPA pufr:

50 mM Tris-HCl (pH ~ 7,4), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% (w/V) deoxycholát sodný; 0,1% (w/V) SDS, 1% (V/V) Triton x-100; 0,05% (V/V) NP-40

### 4.5.2 MĚŘENÍ KONCENTRACE PROTEINŮ METODOU BRADFORDA

Ze zásobních roztoků (BSA o koncentraci 5 mg/ml) byla pro každé měření naředěna čerstvá ředící řada o koncentracích 0 – 0,25 – 0,5 – 0,75 – 1 mg/ml. Zároveň byl vhodně naředěn i malý objem vzorku, jehož koncentraci proteinů jsme chtěli změřit.

Pro samotné měření bylo smícháno 20 µl ředěného vzorku či jednoho ze standardů BSA s 1 ml Bradfordova činidla, celý objem byl promíchán a směs byla inkubována 2 minuty. Absorbance vzorků při 595 nm byla změřena spektrofotometrem Heliosβ (ThermoFisher Scientific). Následně byla v programu Microsoft Excel ze standardů sestavena kalibrační křivka BSA a stanovena její směrnice. Z této rovnice pak byla dopočtena koncentrace proteinů v ředěném, a nakonec i neředěném vzorku našeho zájmu.

- **Složení použitých roztoků/pufrů**

Činidlo Bradforda:

0,12 mM Coomassie Brilliant Blue G-250; 4,75% (V/V) ethanol; 8,5% (V/V) H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

### 4.5.3 PROTEINOVÁ ELEKTROFORÉZA (SDS-PAGE)

Podle návodu výrobce byla sestavena aparatura Mighty Small™ II Mini Vertical Electrophoresis (Hoefer) a pomocí destilované vody byla ověřena její těsnost. Roztok 10% separačního gelu byl napipetován mezi dvě skla separační aparatury (do výšky zhruba 8 cm) a převrstven izobutanolem. Po 30 minutách (po polymeraci gelu), byl izobutanol odstraněn a prostor mezi skly byl vysušen kouskem filtračního papíru. Poté byl roztok 5% zaostřovacího gelu napipetován nad spodní gel a byly do něj zasunuty

hřebeny pro tvorbu jamek. Polymerace zaostřovacího gelu trvala zhruba 20 minut. Mezitím byl k připraveným vzorkům přidán definovaný objem 5x koncentrovaného Laemmliho pufru, tak aby výsledná koncentrace byla 1x koncentrovaná. Vzorky byly poté denaturovány při 100 °C po dobu 2 minut.

Po polymeraci horního gelu byl ze skel vyndán plastový hřeben a připravený gel byl přenesen do samotné elektroforetické soupravy, jejíž objem byl naplněn 1x koncentrovaným Tris-HCl elektroforetickým pufrům. Do jedné jamky bylo poté nanášeno 5 µl markeru značky Black Protein Ladder (Central European Biosystems), zatímco do zbylých jamek bylo nanášeno 10-20 µl denaturovaných vzorků. Nakonec byla celá aparatura uzavřena a připojena ke zdroji napětí. Prvních 30 minut probíhala elektroforéza při 8 V/cm gelu a poté 2-3 hodiny při 14 V/cm gelu.

- **Složení použitých roztoků/pufrů:**

10% separační gel:

10% (w/V) akrylamid (poměr akrylamidu k MBA 29:1), 375 mM Tris-HCl (pH ~ 6,8); 0,1% (w/V) SDS; 0,7% (w/V) APS; 8,5 µl TEMED na 12 ml gelu

5% zaostřovací gel:

5% (w/V) akrylamid (poměr akrylamidu k MBA 29:1), 125 mM Tris-HCl (pH ~ 6,8); 0,1% (w/V) SDS; 0,7% (w/V) APS, 10 µl TEMED na 6 ml gelu

Tris-HCl elektroforetický pufr:

25 mM Tris-HCl (pH ~ 8,3), 195 mM glycin; 0,1% (w/V) SDS

5x Laemmliho pufr:

50 mM Tris-HCl (pH ~ 6,8), 5% (w/V) SDS, 50% (V/V) glycerol, 25% (V/V) β-merkapt ethanol; 0,005% (w/V) bromfenolová modř

#### 4.5.4 PROTEINOVÁ ELEKTROFORÉZA V GRADIENTOVÉM GELU

Bis-Tris gradientový polyakrylamidový gel značky NuPAGE® (Life Technologies) byl vyndán z balení a přesunut do elektroforetické aparatury. Před nanášením na gel bylo k 10 µl vzorku přidáno 5 µl 4x koncentrovaného NuPAGE® LDS vzorkového pufru, 2 µl 10x koncentrovaného NuPAGE® redukčního činidla a 3 µl demi H<sub>2</sub>O do konečného objemu 20 µl. Takto připravený vzorek byl inkubován 10 minut při 70 °C a poté bylo celý jeho objem nanášeno na gradientový gel. Spodní část elektroforetické aparatury byla naplněna 600 ml 1x koncentrovaného NuPAGE® MOPS SDS elektroforetického pufru. Horní část aparatury byla naplněna 200 ml tohoto pufru, ve kterém bylo navíc ještě přidáno 500 µl NuPAGE® antioxidantu. Celá aparatura byla poté uzavřena a připojena ke zdroji napětí. Elektroforetická separace trvala zhruba 50 minut při konstantním napětí 200 V.

- **Složení použitých roztoků/pufrů:**

NuPAGE® MOPS SDS elektroforetický pufr:

50 mM MOPS, 50 mM Tris, 1 mM EDTA; 0,1% (w/V) SDS, pH ~ 7,7

#### 4.5.5 BARVENÍ PROTEINŮ V POLYAKRYLAMIDOVÉM GELU

Po skončení elektroforézy byl spodní separační gel celkem 3x (vždy po 10 minutách) promyt v demi H<sub>2</sub>O. Poté byl gel barven po dobu 1 hodiny ve 20 ml barvy Imperial™ Protein Stain (ThermoFisher Scientific). Po skončení inkubace byla barva vylita a pozadí gelu bylo přes noc odbarveno v demi H<sub>2</sub>O. Obarvený gel byl dokumentován pomocí přístroje Amersham™ Imager 680 (GE Healthcare Life Sciences) a získaná data byla analyzována v programu Fiji.

#### 4.5.6 IMOBILIZACE PROTEINŮ NA MEMBRÁNĚ

Pro specifickou imunodetekci proteinů po denaturační elektroforéze (SDS-PAGE) bylo nutné proteiny nejprve imobilizovat na membráně. K tomuto účelu byla využita metoda zvaná Western blot. V našem případě byla provedena varianta tzv. polosuchého blotu („semi-dry blot), ke kterému byl použit přístroj TE77X (Hoefer). Spodní deska přístroje, která fungovala jako anoda, byla lehce navlhčena menším množstvím blotovacího pufru. Dále pak byla na desku přiložena mylarová plastová maska s vystřiženým čtvercem o velikosti 8x8,5 cm. Právě na tomto čtverci byl následně sestaven blotovací sendvič z pufrem navlhčených Whatman a filtračních papírů, a to v tomto pořadí: 1x Whatman, 4x filtrační papír a 1x Whatman. Dále byla na sendvič položena navlhčená nitrocelulózová membrána od společnosti GE Healthcare Life Sciences a na ní byl konečně položen polyakrylamidový gel. Horní část sendviče byla již stejná jako ta spodní, a tedy 1x Whatman, 4x filtrační papír a 1x Whatman. Nakonec byl celý blot uzavřen horní navlhčenou deskou přístroje, jež sloužila jako katoda, a vše bylo připojeno ke zdroji napětí. Samotný blot trval 1,25 hodiny při napětí 0,8 mA/cm<sup>2</sup>.

V případě metody dot blot nebylo nutné proteiny přenášet na membránu pomocí elektrického proudu. Místo toho byly vzorky proteinů na kousek nitrocelulózové membrány nakapány pomocí pipety bez nutnosti je předem denaturovat. Potom, co byly vzorky nakapány, se nechala membrána zaschnout a přistoupilo se k imunodetekci.

- **Složení použitých roztoků/pufrů:**

Blotovací pufr:

25 mM Tris-HCl (pH ~ 8,3), 195 mM glycin, 20% (V/V) methanol



#### 4.5.7 IMUNODETEKCE PROTEINŮ IMOBILIZOVANÝCH NA MEMBRÁNĚ

Nitrocelulózová membrána s navázanými proteiny byla inkubována minimálně 1 hodinu v 5% odtučněném mléce (w/V) rozpuštěném v PBS. Poté byla membrána 1 hodinu inkubována s primární protilátkou naředenou ve stejném roztoku mléka. V dalším kroku byla membrána 3x po 10 minutách opláchnuta v PBS a následně inkubována 30 minut se sekundární protilátkou. Po skončení inkubace pak byla membrána ještě znovu 3x po 10 minutách promyta v PBS. Nakonec byly proteiny detekovány pomocí chemiluminiscence. Ta se vyvolala 30sekundovou inkubací membrány v čerstvě smíchaných roztocích A a B. Vzniklý signál byl zaznamenán a zpracován přístrojem Amersham™ Imager 680 (GE Healthcare Life Sciences), zatímco analýza dat byla provedena v softwaru Fiji.

- **Složení použitých roztoků/pufřů:**

Roztok A:

100 mM Tris-HCl (pH ~ 8,5), 250 mM luminol, 90 mM kyselina kumarová

Roztok B:

100 mM Tris-HCl (pH ~ 8,5), 0,0015% (V/V) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

#### 4.5.8 PŘÍPRAVA BUNĚČNÝCH LYZÁTŮ PRO IZOLACI PROTEINOVÝCH KOMPLEXŮ

Proteinové komplexy byly izolovány z transfekovaných buněk 2 dny po transfekci. Z misek s buňkami bylo opatrně odsáto médium a ihned nato byly buňky opláchnuty PBS. Poté byl k buňkám přidán lyzační pufr. Buňky byly seškrabány plastovým škrabátkem a přeneseny do 1,5ml zkumavky. Následně byly buňky rozbity 3x opakovaným cyklem rychlého zmrazení v tekutém dusíku a následném rozmražení při pokojové teplotě. Lyzát byl centrifugován po dobu 10 minut při 10 000 x g a 4 °C. Supernatant byl odebrán a naředěn lyzačním pufrem do celkové koncentrace 15 mg proteinů na 8 ml pufru. Takto připravený lyzát byl uskladněn v -80 °C.

- **Složení použitých roztoků/pufřů:**

Lyzační pufr:

100 mM Tris-HCl (pH ~ 8), 100 mM KCl, 200 μM EDTA; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 700 ng/ml pepstatinu, 1x koncentrované proteázové inhibitory značky cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail (Roche)

#### 4.5.9 AFINITNÍ CHROMATOGRAFIE

Pro afinitní chromatografii byla použita komerční souprava NativePure™ Affinity Purification Kit (ThermoFisher Scientific), která využívá silné interakce mezi proteinem streptavidinem a molekulou biotinu pro vysoce specifickou izolaci proteinů. Prvním krokem v izolaci komplexů VP1 byla příprava purifikační kolony. Pomalým otáčením láhve byl promíchán roztok obsahující streptavidin-agarózové kuličky, jež sedimentovaly během uskladnění ve 4 °C. Poté bylo odebráno 750 µl suspenze kuliček a celý tento objem byl napipetován do 10ml NativePure™ purifikační kolony. Dále bylo do kolony napipetováno 6 ml vazebného pufru a celá kolona byla uzavřena zátkami (dno i vršek). Vazebný pufr byl se streptavidin-agarózovými kuličkami promíchán pomalým otáčením celé kolony na orbitální míchačce po dobu 5 minut. Po této době byla kolona opět otevřena a vazebný pufr protekl dnem kolony. Takto byly kuličky promyty vazebným pufrem celkem 3x.

Lyzát určený pro izolaci komplexů byl následně rozmrazen ve vodní lázni o pokojové teplotě. K lyzátu bylo přidáno 80 µl 10% roztoku (V/V) NP-40 do finální koncentrace 0,1%, případně DNáza a RNáza A do konečné koncentrace 100 ng/ml. Takto připravený lyzát byl nanesen na purifikační kolonu, jež byla následně uzavřena. Lyzát byl v koloně inkubován se streptavidin-agarózovými kuličkami po dobu 3 hodin při teplotě 4 °C za stálého otáčení na orbitální míchačce.

Po skončení inkubace byla kolona opět otevřena a lyzát spolu s nenavázanými proteiny protekl jejím dnem do prázdné falkony. Do kolony bylo dále přidáno 8 ml vazebného pufru a kolona byla opět uzavřena. Tento pufr byl s kuličkami, na nichž byly navázány proteinové komplexy, promícháván při 4 °C zhruba 10 minut. Po této době byla kolona znovu otevřena a pufr protekl jejím dnem. Poté bylo toto promývání zopakováno ještě jednou. Následně bylo do kolony s kuličkami napipetováno 8 ml TEV štěpícího pufru, jenž byl s kuličkami rovněž promícháván zhruba 10 minut při 4 °C. TEV štěpícího pufr byl následně také odkapán dnem kolony, přičemž následovaly ještě dvě promytí tímto pufrem.

V dalším kroku byly streptavidin-agarózové kuličky resuspendovány v 1 ml TEV štěpícího pufru. Dále bylo do kolony napipetováno 15 µl 100 mM DTT (do finální 1mM koncentrace). Do kolony bylo následně přidáno 40 µl proteázy AcTEV™, která byla s kuličkami inkubována přes noc při 4 °C na orbitální míchačce. Následně byl zbytek suspenze prokapán dnem kolony do 1,5ml zkumavky, která byla okamžitě přenesena na led. Purifikační kolonou byl dále do čisté 1,5ml zkumavky prokapán 1 ml TEV elučního pufru, jehož hlavním cílem bylo z kolony vypláchnout zbylé proteinové komplexy. Toto vypláchnutí TEV elučním pufrem bylo zopakováno ještě 2x. V této fázi chromatografie byla použita kolona i se streptavidin-agarózovými kuličkami vyhozena.

V této chvíli byl z balení vyndán NativePure™ koncentrátor, do kterého byly napipetováno 4 ml demi H<sub>2</sub>O. Tento objem byl stočen skrze koncentrátor centrifugací (30 minut, 1 600 x g, 4 °C). Poté byly do koncentrátoru přepipetovány eluáty ze všech 4 zkumavek, jež byly doposud chlazeny na ledu. Celý tento objem byl poté zakoncentrován na přibližně 100 µl centrifugací při 1 600 x g. I tato centrifugace byla provedena při 4 °C a trvala zhruba 25 minut. Nakonec byl po skončení centrifugace odebrán zakoncentrovaný eluát, který byl přenesen do sterilní zkumavky a uskladněn v -80 °C. Jednotlivé proteiny, jež byly vyizolovány v komplexu s VP1, byly identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie.

- **Složení použitých roztoků/pufrů:**

Vazebný pufr:

100 mM Tris-HCl (pH ~ 8), 100 mM KCl, 200 µM EDTA; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,1% (V/V) NP-40, 700 ng/ml pepstatinu, 1x koncentrované proteázové inhibitory značky cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail (Roche)

TEV eluční pufr:

10 mM Tris-HCl (pH~ 8), 150 mM NaCl, 50 µM EDTA

TEV štěpící pufr:

10 mM Tris-HCl (pH~ 8), 150 mM NaCl, 50 µM EDTA; 0,1% (V/V) NP-40

#### **4.5.10 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE**

Veškerá měření i příprava vzorků pro hmotnostní spektrometrii byla provedena servisní laboratoří hmotnostní spektrometrie, která je součástí Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy.

#### **4.5.11 PŘÍPRAVA LYZÁTŮ Z BUNĚK LINIE Sf9 PRO IZOLACI VLPs**

Hmyzí buňky linie Sf9, jež byly sklizeny 4 dny po infekci rekombinantním bakulovirem, byly pomocí plastového škrabátka seškrábány do média a následně přeneseny do 50ml falkony. Buňky pak byly peletovány po dobu 5 minut při 500 x g a 4 °C. Buněčný pelet byl resuspendován v 10 ml pufru B. Poté byly buňky lyzovány sonikací pomocí přístroje Soniprep150 (Schoeller Pharmacia Praha). Buňky byly sonikovány celkem 3x a to vždy 30 sekund s amplitudou 5-10 mikronů. Zároveň byly buňky během celé doby sonikace chlazeny na ledu. Získaný lyzát byl přečištěn centrifugací po dobu 10 minut při 12 000 x g a 4 °C. Po centrifugaci byl supernatant odebrán a použit v následné izolaci VLPs.

- **Složení použitých roztoků/pufrů:**

Pufr B:

10 mM Tris-HCl (pH ~ 7,4), 150 mM NaCl, 0,01 mM CaCl<sub>2</sub>

#### 4.5.12 IZOLACE VLPs ULTRACENTRIFUGACÍ

Supernatant, který byl připraven sonikací infikovaných buněk, byl rozdělen do dvou čistých ultracentrifugačních zkumavek, ve kterých byl podvrstven přibližně 1 ml 10% roztoku sacharózy (w/V) v pufru B. Ultracentrifugační zkumavky byly poté vyváženy na stejnou hmotnost a centrifugovány v ultracentrifuze Optima L-90K (Beckman), v rotoru SW41 po 3 hodiny při 35 000 rpm a teplotě 4 °C. Po skončení ultracentrifugace byly supernatanty opatrně odsány a pelety byly přes noc rozplaveny v 250 µl pufru B. Druhý den ráno byl pufr B i rozplavené pelety přeneseny do ručního homogenizátoru, ve kterém byly pelety důkladně homogenizovány. Vzniklá suspenze byla opět rozdělena na dvě poloviny a přenesena do čistých ultracentrifugačních zkumavek. V těchto zkumavkách byly oba vzorky doplněny pufrům B na konečnou hmotnost 8 g, dále v nich bylo rozpuštěno přesně 3,79 g chloridu cesného (CsCl), vše bylo převrstveno parafínovým olejem a zkumavky byly vyváženy. Suspenze byla centrifugována v ultracentrifuze Optima L-90K v rotoru SW41, a to po dobu 20-24 hodin při 35 000 rpm a teplotě 18 °C.

Po skončení této izopyknické ultracentrifugace byly zkumavky opatrně vyndány z ultracentrifugy, tak aby nebyl rozrušen vzniklý koncentrační gradient CsCl. V případě, že byl ve zkumavce viditelný jasný opaleskující proužek částic, tak byl tento pruh odebrán injekční stříkačkou. V opačném případě byl gradient rozebrán na rozebírači frakcí (Beckman) do plastových mikrozkušavek. Pomocí refraktometru pak byl u každé frakce (cca 0,5 ml) změřen index lomu. Frakce s indexem vyšším než 1,366 neobsahovaly žádné částice a už dále použity nebyly. Frakce v rozmezí 1,366 až 1,363 obsahovaly pseudoviriony, a proto byly pospojovány do jedné suspenze. Pospojovány do jedné suspenze byly i frakce s indexem lomu nižším než 1,363; neboť právě tyto frakce obsahovaly VLPs.

V dalším kroku byly vzorky s pseudoviriony i VLPs přepipetovány do dialyzační membrány (Serva) a poté dvojestupňově dialyzovány vůči 1,5 l pufru B. Po skončení dialýzy byly vzorky z membrány vyndány a přeneseny do nových ultracentrifugačních zkumavek. Do zkumavek byl přidán pufr B, a vzorky byly podvrstveny 1 ml 10% roztoku sacharózy (w/V) v pufru B. Vzorky byly vyváženy a centrifugovány v ultracentrifuze Optima L-90K, v rotoru SW41 po 3 hodiny při 35 000 rpm a teplotě 4 °C. Po konci ultracentrifugace byly supernatanty opatrně slity a zbylé pelety, jež obsahovaly buď pseudoviriony nebo VLPs, byly přes noc rozplaveny ve 200 µl pufru B. Na závěr byly vzorky ještě opatrně resuspendovány pipetou v pufru B a pak přeneseny do mikrozkušavek, ve kterých byly uskladněny při -20 °C.

- **Složení použitých roztoků/pufrů:**

Pufr B:

10 mM Tris-HCl (pH ~ 7,4), 150 mM NaCl, 0,01 mM CaCl<sub>2</sub>

### 4.5.13 HEMAGLUTINACE

Do jamek 96-jamkové mikrotitrační U-destičky (jeden řádek na jeden vzorek) bylo napipetováno 50  $\mu$ l 0,2% roztoku BSA v PBS. Poté bylo do jamek v prvním sloupci destičky přidáno 50  $\mu$ l vhodně naředěných virových částic. Dále byly vzorky naředěny dvojkovou řadící řadou. Obsah jamek byl v prvním sloupci důkladně promíchán a pomocí multikanálové pipety bylo z každé jamky odebráno 50  $\mu$ l suspenze, jež byla přenesena do jamek ve vedlejším sloupci. V těchto jamkách byla suspenze opět promíchána a pak znovu bylo 50  $\mu$ l přeneseno do jamek ve vedlejším sloupci. Tento postup byl opakován, dokud nebylo dosaženo posledního sloupce destičky. V posledním sloupci bylo také z každé jamky odebráno 50  $\mu$ l suspenze. Těchto 50  $\mu$ l již ale bylo vyhozeno. Nakonec bylo do každé jamky přidáno 50  $\mu$ l 0,4% morčecích erytrocytů. Destička se vzorky poté byla inkubována v lednici při 4 °C do druhého dne.

Výsledný počet hemaglutinačních jednotek (*HAU*) byl stanoven podle následující rovnice, kde *n* značí počet jamek, ve kterých byla hemaglutinace vzorku ještě pozitivní, tedy kdy krvinky nesedimentovaly na dno jamky.

$$HAU [\text{počet částic na ml}] = \text{počáteční ředění vzorku} \cdot 2^{(n+1)} \cdot 20$$

Z počtu jednotek *HAU* se pak dopočítal počet virových částic, které byly v neředěném vzorku přítomny. Jedna *HAU* totiž v našem případě odpovídá  $1 \cdot 10^7$  částic (Horníková *et al.*, 2015).

### 4.5.14 ROZKLAD VLPS

(podle Suchanová, 2012 – Cílení umělých virových partikulí polyomaviru na buňky nádoru prostaty)

Celkem 50  $\mu$ l vzorku, jenž obsahoval přečištěné VLPs, bylo napipetováno do Slide-A Lyzer® MINI Dialysis Device (ThermoFisher Scientific). Poté byl vzorek dialyzován při 4 °C po dobu 1,5 hodiny proti roztoku pro rozklad I za neustálého míchání na magnetické míchačce. Po skončení této inkubace byl vzorek dialyzován vůči 100 ml roztoku pro rozklad II za neustálého míchání opět po dobu 1,5 hodiny při 4 °C. Po ukončení dialýzy byl dialyzát odebrán a přenesen do čisté zkumavky. Vzorek byl poté centrifugován po dobu 30 minut při 20 000 x g a při 4 °C. Supernatant obsahující rozpadlé pentamery byl nakonec odebrán a uskladněn v -20 °C.

- **Složení použitých roztoků/pufrů:**

Roztok pro rozklad I:

20 mM Tris-HCl (pH ~ 8.8), 50 mM NaCl, 2 mM DTT, 5 mM EDTA

Roztok pro rozklad II:

20 mM Tris-HCl (pH ~ 8.8), 50 mM NaCl, 2 mM DTT, 2 mM EDTA

#### 4.5.15 TESTOVÁNÍ VAZBY PENTAMER PROTEINU VP1 K MIKROTUBULŮM

K otestování toho, jestli se pentamery VP1 myšího polyomaviru váží na mikrotubuly, byla použita komerční souprava Microtubule Binding Protein Spin-down Assay Kit (Cytoskeleton, Inc.). Do zkumavky bylo napipetováno 200  $\mu$ l pufru GTB („General Tubulin Buffer“), jenž byl zahřát na 35 °C. Aliquot tubulinu (5 mg/ml), byl rozmražen ve vodní lázni o pokojové teplotě. Jakmile byl tubulin rozmražen, tak byl okamžitě přenesen na led a byly k němu přidány 2  $\mu$ l tzv. Cushion pufru. Obsah zkumavky byl opatrně promíchán a pak byl tubulin po 20 minut inkubován ve 35 °C, aby došlo k polymeraci v mikrotubuly. Po ukončení polymerace tubulinu byly k předeřátému pufru GTB napipetovány 2  $\mu$ l 2 mM roztoku taxolu a celým tímto objemem byl okamžitě zředěn roztok tubulinu na zhruba 0,45 mg/ml proteinu. V tuto chvíli byly připraveny mikrotubuly o délce 5-10  $\mu$ m, které byly stabilizovány taxolem. Po zbytek experimentu byly již mikrotubuly ponechány při pokojové teplotě. Reakční směsi byly připraveny v 8 zkumavkách podle tabulky č. 4. Připravené reakce pak byly inkubovány při pokojové teplotě po dobu 30 minut. Roztoky s proteiny MAP frakce (1 mg/ml) i BSA (5 mg/ml) byly také dodány jako součást kitu.

**Tabulka č. 4 – Složení 8 reakčních směsí pro testování vazby pentameru VP1 ke struktuře mikrotubulů**

Tabulka byla připravena podle návodu, který byl součástí zakoupeného kitu.

Zkumavka	Sledovaný protein	Objem sledovaného proteinu ( $\mu$ l)	Objem mikrotubulů ( $\mu$ l)	Objem GTB pufru ( $\mu$ l)
1	Žádný	–	20	30
2	MAP frakce	16	20	14
3	BSA	1,5	20	28,5
4	MAP frakce	16	–	34
5	BSA	1,5	–	48,5
6	VP1 (5 $\mu$ g)	3,6	–	46,4
7	VP1 (5 $\mu$ g)	3,6	20	27,7
8	VP1 (2 $\mu$ g)	1,5	20	29,1

Mezitím bylo v průběhu inkubace do 1 ml Cushion pufru přidáno 10  $\mu$ l 2mM roztoku taxolu, tak aby v pufru nevznikly žádné bubliny. Poté bylo 100  $\mu$ l tohoto pufru napipetováno na dno celkem 8 ultracentrifugačních zkumavek o maximálním objemu 1 ml.

Po skončení inkubace bylo 100  $\mu$ l připraveného Cushion pufru převrstveno 30  $\mu$ l reakční směsí. To vše bylo ještě převrstveno 200  $\mu$ l parafinového oleje. Ultracentrifugační zkumavky byly následně vyváženy na stejnou hmotnost a stočeny v ultracentrifuze Optima™ MAX-XP (Beckman) při pokojové teplotě a přetížení 100 000 x g po dobu 40 minut. Když ultracentrifugace skončila, tak byl nejprve z vršku zkumavek odsán parafinový olej. Následně byly opatrně odsány supernatanty. Pelety byly resuspendovány ve 20  $\mu$ l GTB pufru

a 5  $\mu$ l 5x koncentrovaného Laemmliho pufru (dohromady 25  $\mu$ l). Poté byly uschovány v  $-20^{\circ}$  C. Ke zbylým 20  $\mu$ l reakční směsi bylo také přidáno 5  $\mu$ l 5x koncentrovaného Laemmliho pufru. Tento vzorek byl rovněž uschován v  $-20^{\circ}$  C a sloužil nám jako reference vstupního množství materiálu pro následnou analýzu.

Přítomnost proteinů v peletu byla detekována buď po obarvení polyakrylamidového gelu pomocí Coomassie anebo po imobilizaci proteinů na membráně pomocí specifické protilátky. Procento proteinů, které se vyskytovaly v peletu, bylo vztaženo k množství vstupního materiálu podle rovnice uvedené níže.

$$\text{Procento proteinů v peletu} = \frac{3 \cdot (\text{signál v peletu/použitý objem vzorku}) \cdot 25 \mu\text{l}}{2 \cdot (\text{signál referenčního vzorku/použitý objem vzorku}) \cdot 25 \mu\text{l}} \cdot 100\%$$

- **Složení použitých roztoků/pufrů:**

GTB pufr:

80 mM PIPES (pH  $\sim$  7), 2 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 0,5 mM EGTA

Cushion pufr:

80 mM PIPES (pH  $\sim$  7), 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM EGTA, 60% (V/V) glycerol

#### **4.5.16 TRANSMISNÍ ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE – METODA NEGATIVNÍHO BARVENÍ**

Na hydrofobní vrstvu parafilmu byla nanesena 5 $\mu$ l kapka vzorku. Na vršek této kapky pak byla pomocí pinzety opatrně položena měděná elektronmikroskopická síťka s pouhlíkovanou stranou směrem dolů. Tato síťka byla na kapce vzorku ponechána 5 minut a pak byla přenesena na 75 $\mu$ l kapku demi  $\text{H}_2\text{O}$ , kde se vzorek promýval 30 sekund. Poté byla síťka přenesena na ještě jednu kapku demi  $\text{H}_2\text{O}$ , kde byl vzorek promýván dalších 30 sekund. V dalším kroku byl vzorek na síťce kontrastován minutovou inkubací na vrchu 50 $\mu$ l kapky 2% (V/V) roztoku kyseliny fosfowolframové (pH  $\sim$  7). I tato inkubace byla provedena dvakrát za sebou. Nakonec byl zbytek kyseliny ze síťky opatrně odsán kouskem filtračního papíru. Po dosušení na vzduchu byl vzorek na síťce pozorován transmisním elektronovým mikroskopem JEOL JEM-1011 který je dostupný v rámci servisní laboratoře elektronové mikroskopie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy.

## **5. VÝSLEDKY**



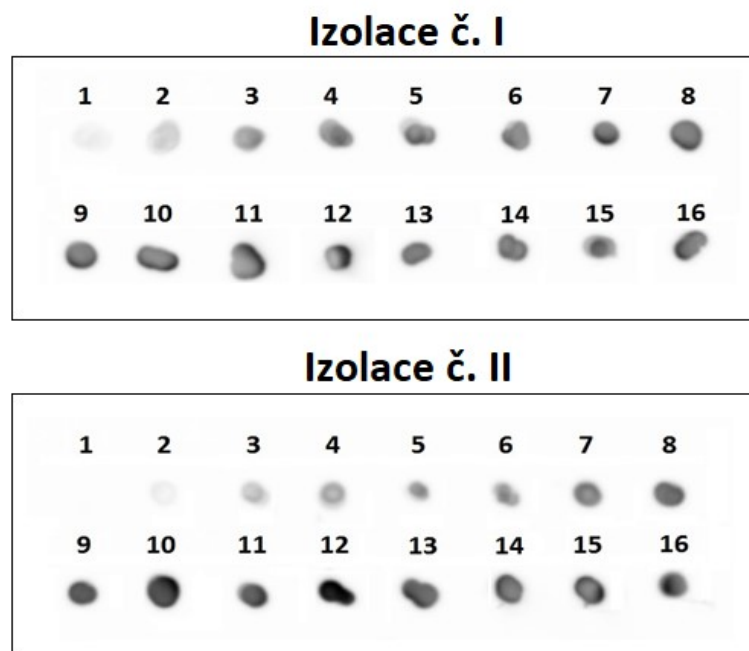
## 5.1 ***IN VITRO* TESTOVÁNÍ VAZBY PROTEINU VP1 MYŠÍHO POLYOMAVIRU KE STRUKTUŘE MIKROTUBULŮ**

V naší laboratoři se již dlouhodobě zabýváme vlastnostmi polyomavirových strukturních proteinů na příkladu modelového viru čeledi, myšího polyomaviru. V rámci tohoto výzkumu bylo pozorováno, že v savčích buňkách při heterologní expresi hlavního kapsidového proteinu VP1 dochází k akumulaci tohoto proteinu v cytoplazmě a k tvorbě dlouhých nerozpustných vláken. Jak se později ukázalo, tak se jedná o buněčné mikrotubuly, které VP1 obaluje, a tím zvyšuje jejich stabilitu. Podobný fenotyp jako při koexpresích může pozorován i při infekci MPyV (Horníková et al., 2017).

Vazba VP1 na mikrotubuly tedy pravděpodobně není artefakt vzniklý při heterologní expresi, ale jedna z fyziologických vlastností viru. Proto jsme se rozhodli *in vitro* otestovat, jestli je protein VP1 sám o sobě schopen vazby k mikrotubulům. K tomuto účelu jsme využili Microtubule Binding Protein Spin-down Assay kit (Cytoskeleton, Inc.), jenž obsahuje všechny věci potřebné pro *in vitro* experiment. Logicky jediné, co chybělo, byl náš protein zájmu, jehož vazbu jsme chtěli testovat. Pro produkci a následnou izolaci velkého množství proteinu VP1 jsme se proto rozhodli využít bakulovirový expresní systém, s nímž má naše laboratoř bohaté zkušenosti. Jelikož se ale protein VP1 při heterologní expresi v hmyzích buňkách samsopřádává v jádře do struktury virových částic, bylo nutné před *in vitro* experimentem částice rozložit na jednotlivé pentamery.

### 5.1.1 **IZOLACE, PURIFIKACE A KVANTIFIKACE VIROVÝCH ČÁSTIC SLOŽENÝCH Z PROTEINU VP1**

Pro získání dostatečného množství proteinu VP1 jsme provedli celkem dvě na sobě nezávislé izolace částic. Při první izolaci byly rekombinantním bakulovirem, jenž exprimoval pouze protein VP1, infikovány hmyzí buňky linie Sf9 na celkem osmi 100mm Petriho miskách. V případě druhé izolace jsme chtěli získat více materiálu, a proto jsme infikovali buňky na dvanácti 100mm Petriho miskách. Buňky linie Sf9 byly nejprve lyzovány a částice byly od zbytku rozpustných proteinů odděleny ultracentrifugací přes sacharózový polštář. Jednotlivé populace částic složených z VP1 jsme pak separovali pomocí centrifugace v hustotním gradientu CsCl. Vzniklé gradienty byly při obou izolacích rozebrány na celkem 16 frakcí. Přítomnost proteinu VP1 v jednotlivých frakcích byla potvrzena metodou dot blot, jejíž výsledek můžeme vidět na obrázku č. 8. V případě první izolace byl protein VP1 přítomen ve všech frakcích. Při druhé izolaci byl protein VP1 detekován až na frakci 1 také ve všech frakcích.



**Obrázek č. 8 – Při obou izolacích byl protein VP1 po izopyknické centrifugaci přítomen v jednotlivých frakcích gradientu CsCl.**

Přítomnost proteinu VP1 ve frakcích CsCl gradientu byla určena pomocí imunodetekce. Pro detekci jsme využili myší mnonoklonální protilátku specifickou pro VP1 a kozí polyklonální protilátku rozeznávající myší imunoglobuliny, jež byla konjugována s enzymem křenovou peroxidázou.

Když jsme ověřili, že je protein VP1 přítomen v gradientu CsCl, tak byl pro jednotlivé frakce změřen jejich index lomu, jejichž hodnoty můžeme vidět v tabulce č. 5. Pseudoviriony MPyV se nacházejí ve frakcích gradientu CsCl, jejichž index lomu se nachází v rozmezí 1,366 až 1,363. Ve frakcích, jejichž index lomu je nižší než 1,363, se pak nacházejí VLPs. V případě první izolace tedy byly pospojovány frakce 5-9 do společné frakce pseudovirionů a frakce 10-16 do společné frakce zvané VLPs. Při druhé izolaci byly do frakce pseudovirionů pospojovány frakce 7-12 a do frakce VLPs pak frakce 13-16. Ve frakcích s indexem lomu vyšším než 1,366 byl podle dot blotu protein VP1 také detekován, ale v nižší míře a zároveň nebyl ve formě virových částic. Proto jsme s těmi to frakcemi již dále nepracovali. Po odstranění CsCl dialyzací byly částice v pospojovaných frakcích zakoncentrovány přes sacharózový polštář a následně dále charakterizovány.

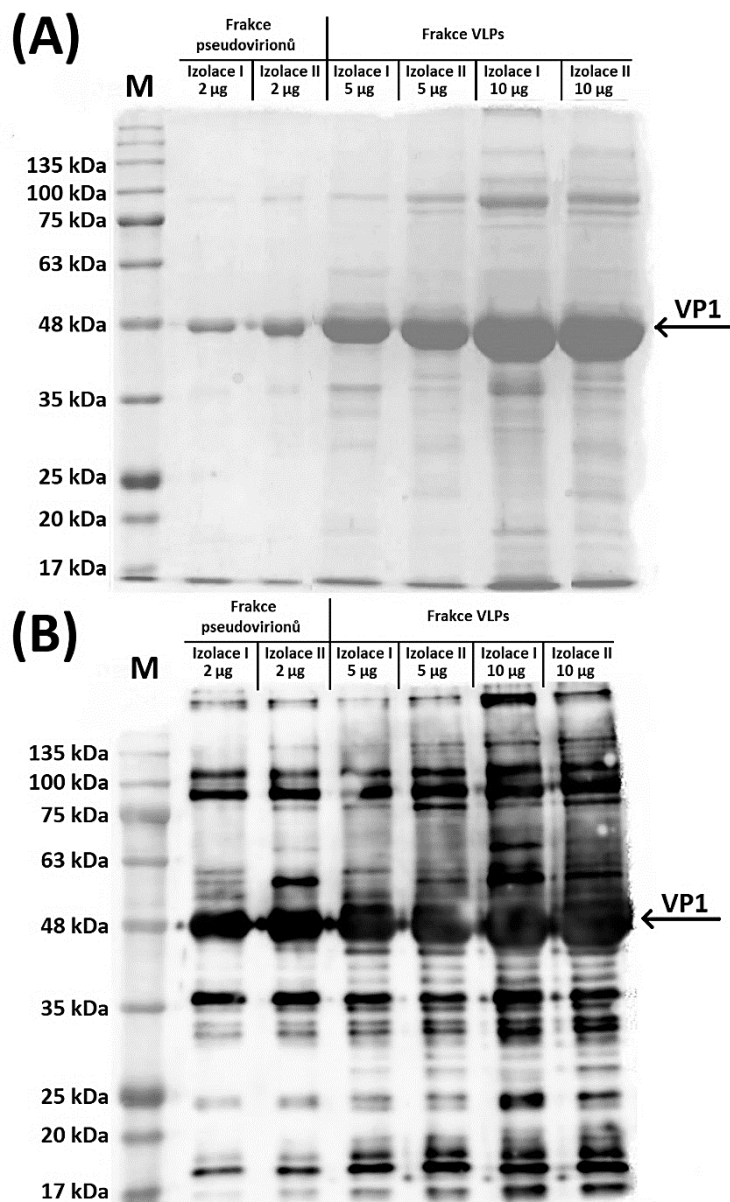
V první řadě jsme změřili koncentraci proteinů ve frakcích pseudovirionů a frakci VLPs, a to metodou podle Bradforda. Na základě směrnice kalibrační křivky (hodnota spolehlivosti  $R^2 = 0,9991$ ) jsme stanovili, že ve frakci pseudovirionů z první izolace je 0,3 mg/ml proteinu. Ve frakci VLPs ze stejné izolace byla koncentrace proteinů 1,51 mg/ml. Z druhé izolace byla koncentrace proteinů ve frakci pseudovirionů velmi podobná a to 0,25 mg/ml. Frakce VLPs z druhé izolace pak obsahovala 2,27 mg/ml proteinu. Poté jsme se stanovili přibližný počet částic (pseudovirionů i VLPs) ve všech frakcích pomocí hemaglutinace.

Ve frakci VLPs z první izolace bylo na základě hemaglutinace přibližně  $6,4 \cdot 10^{10}$  částic/ml. V té samé frakci, ale z druhé izolace bylo přibližně  $5,76 \cdot 10^{11}$  částic/ml. Co se týče koncentrace částic ve frakcích obsahující pseudoviriony, tak ta byla pod detekčním limitem metody.

**Tabulka č. 5 – Indexy lomu pro jednotlivé frakce z obou izolací virových částic**

Frakce	Index lomu	
	Izolace č. I	Izolace č. II
1	1,3745	1,3770
2	1,3710	1,3745
3	1,3690	1,3710
4	1,3670	1,3695
5	1,3660	1,3680
6	1,3650	1,3670
7	1,3645	1,3660
8	1,3640	1,3650
9	1,3630	1,3645
10	1,3625	1,3640
11	1,3620	1,3640
12	1,3610	1,3635
13	1,3600	1,3625
14	1,3590	1,3620
15	1,3570	1,3610
16	1,3565	1,3585

V dalším kroku jsme ověřili čistotu částic. Vzorky z obou izolací jsme separovali pomocí proteinové elektroforézy a separované proteiny jsme vizualizovali pomocí barvy Coomassie (obrázek č. 9A). Na gelu byl nejpatrnější proužek odpovídající 45-48 kDa, který by odpovídal velikosti proteinu VP1. Mimo to ale v gelu byla přítomná řada dalších proužků různých molekulových hmotností, jejichž identitou jsme si nebyli jisti. Proto jsme vzorky z obou izolací rozdělili pomocí SDS-PAGE, separované proteiny jsme přenesli na membránu a protein VP1 jsme detekovali specifickou protilátkou (obrázek č. 9B). Jak můžeme pozorovat, tak protein VP1 byl detekován v řadě proužků. Dominantní proužek v oblasti 45-48 kDa odpovídá denaturovanému proteinu VP1. Pruhy s nižší molekulovou hmotností jsou patrně různé formy degradovaného proteinu VP1. Proužky o větší molekulové hmotnosti než 48 kDa jsou pravděpodobně posttranslačně modifikované formy proteinu VP1. Vzor proužků proteinu VP1 detekované při Western blotu se překrýval s proužky na gelu obarveném pomocí Coomassie. Z tohoto důvodu jsme usoudili, že obě naše izolace jsou relativně čisté a obsahují velké množství proteinu VP1.

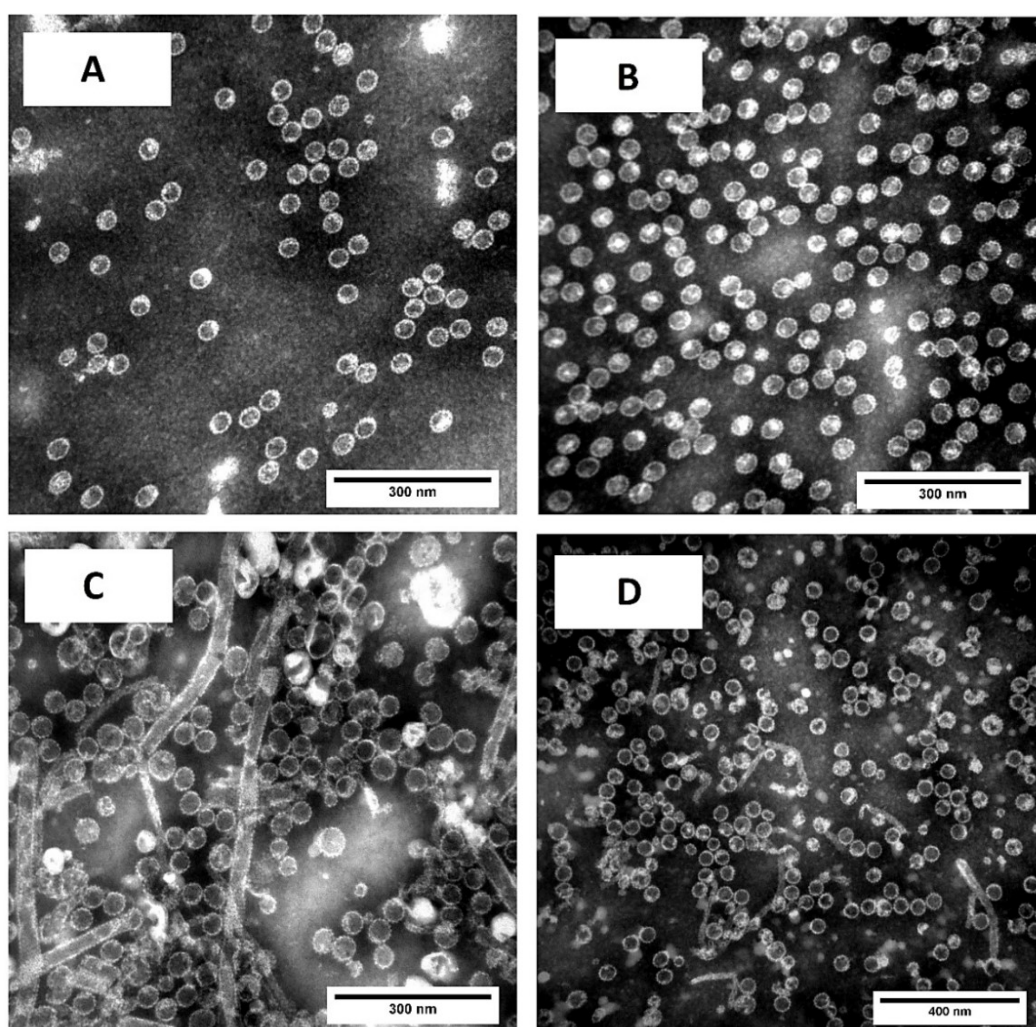


**Obrázek č. 9 – Obě izolace polyomavirových částic obsahují čistý protein VP1**

Na obrázku (A) byly pomocí SDS-PAGE separovány frakce s pseudoviriony (2 μg) a frakce obsahující VLPs (5 i 10 μg) z obou izolací. Separované proteiny byly vizualizovány barvou Coomassie nebo byly přeneseny na membránu a protein VP1 byl detekován specifickou protilátkou (B). Protein VP1 byl při Western blotu detekován v řadě proužků, které se překrývaly s pozicí proužků přítomných na obarveném polyakrylamidovém gelu. Výsledky z obou proteinových separací tedy značí, že jsme jednak vyizolovali protein VP1 ve velkém množství, ale i v relativně čisté podobě.

Na závěr jsme čistotu frakcí ověřili pomocí elektronové mikroskopie. Jak ukazují obrázky 10A-D, tak ve všech případech jsme vyizolovali protein VP1 ve formě virových částic. Na obrázcích 10A a 10B můžeme pozorovat směs pseudovirionů (sférické částice, kde vnitřky částic nebyly kontrastovány barvou, neboť byly vyplněny DNA z hmyzích buněk, kolem kterých se kapsida z proteinu VP1 uspořádala) a VLPs (sférické částice, kde vnitřky částic jsou kontrastovány barvou) z první a druhé izolace. Na obrázcích 10C a 10D jsou pouze VLPs, jež byly purifikovány během první a druhé izolace. Na rozdíl od snímků 10A a 10B zde můžeme

pozorovat vyšší hustotu částic, což je v souladu s naměřenou koncentrací proteinů. Na obrázku 10C se kromě VLPs se sférickým tvarem vyskytovaly i VLPs s trubkovitou strukturou. Jak již bylo popsáno v kapitole 2.7., tak tyto struktury se často vyskytují v preparacích VLPs. Jejich zvýšená přítomnost v první izolaci, přináší i možné vysvětlení toho, proč i přes podobnou koncentraci proteinů vycházely tak rozdílné koncentrace částic při měření pomocí hemaglutinace. Přítomnost dlouhých trubkovitých struktur mohla totiž ovlivnit hemaglutinaci a tím pádem, i když byla koncentrace proteinů podobná, tak ve výsledku tento vzorek obsahoval menší počet částic schopných hemaglutinace erytrocytů, což mohlo způsobit pozorovaný rozdíl. V každém případě se ale jedná jen o hypotézu, kterou jsme dále netestovali.



**Obrázek č. 10 – Protein VP1 je v případě obou izolací uspořádán do struktury pseudovirionů či VLPs**

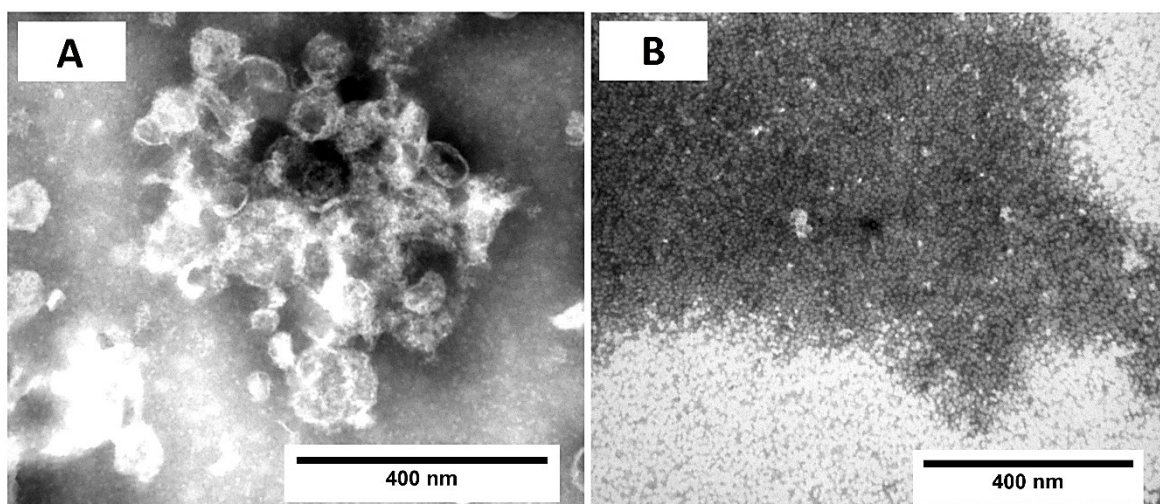
Ze vzorků izolovaných polyomavirových částic byly připraveny preparáty pro transmisní elektronovou mikroskopii. Jednotlivé částice byly kontrastovány metodou negativního barvení ve 2% (V/V) roztoku kyseliny fosfowolframové. Na obrázku (A) je frakce pseudovirionů získaná při první izolaci, zatímco na obrázku (B) jsou pseudoviriony z druhé izolace. Na obrázku (C) jsou pak prázdné VLPs z první izolace. Na obrázku (D) jsou rovněž VLPs ale tentokrát z druhé izolace částic. Jak můžeme vidět ze všech čtyř obrázků, tak jsme vyizolovali plně sestavené částice.



### 5.1.2 ROZKLAD VLPs NA JEDNOTLIVÉ PENTAMERY PROTEINU VP1

Abychom mohli otestovat vazbu proteinu VP1 na mikrotubuly, bylo nejprve nutné částice rozložit na jednotlivé pentamery. Pro samotný rozklad jsme se rozhodli použít pouze frakce s VLPs, neboť oproti pseudovirionům jsme byli schopni je vyizolovat v dostatečném množství. Částice jsme rozkládali dvojstupňovou dialýzou oproti pufru obsahujícím DTT a EDTA za zvýšeného pH (~ 8,8). V tomto pufru dochází k destabilizaci S-S můstků a postupnému rozpadu částice na jednotlivé pentamery.

Abychom ověřili, že se částice efektivně rozložily, tak jsme z rozloženého vzorku připravili preparáty pro transmisní elektronovou mikroskopii. Celkem jsme připravili dva preparáty. První preparát byl z peletu, který vznikl po centrifugaci rozložených VLPs. Fotografii tohoto preparátu můžeme vidět na obrázku 11A. Z obrázku je patrné, že v peletu se nacházely zbytky nerozložených částic, různé amorfní proteinové agregáty a malá část struktur připomínající volné pentamery. Fotografii druhého preparátu pro elektronovou mikroskopii pak můžeme vidět na obrázku 11B. V tomto případě se jednalo se o vzorek

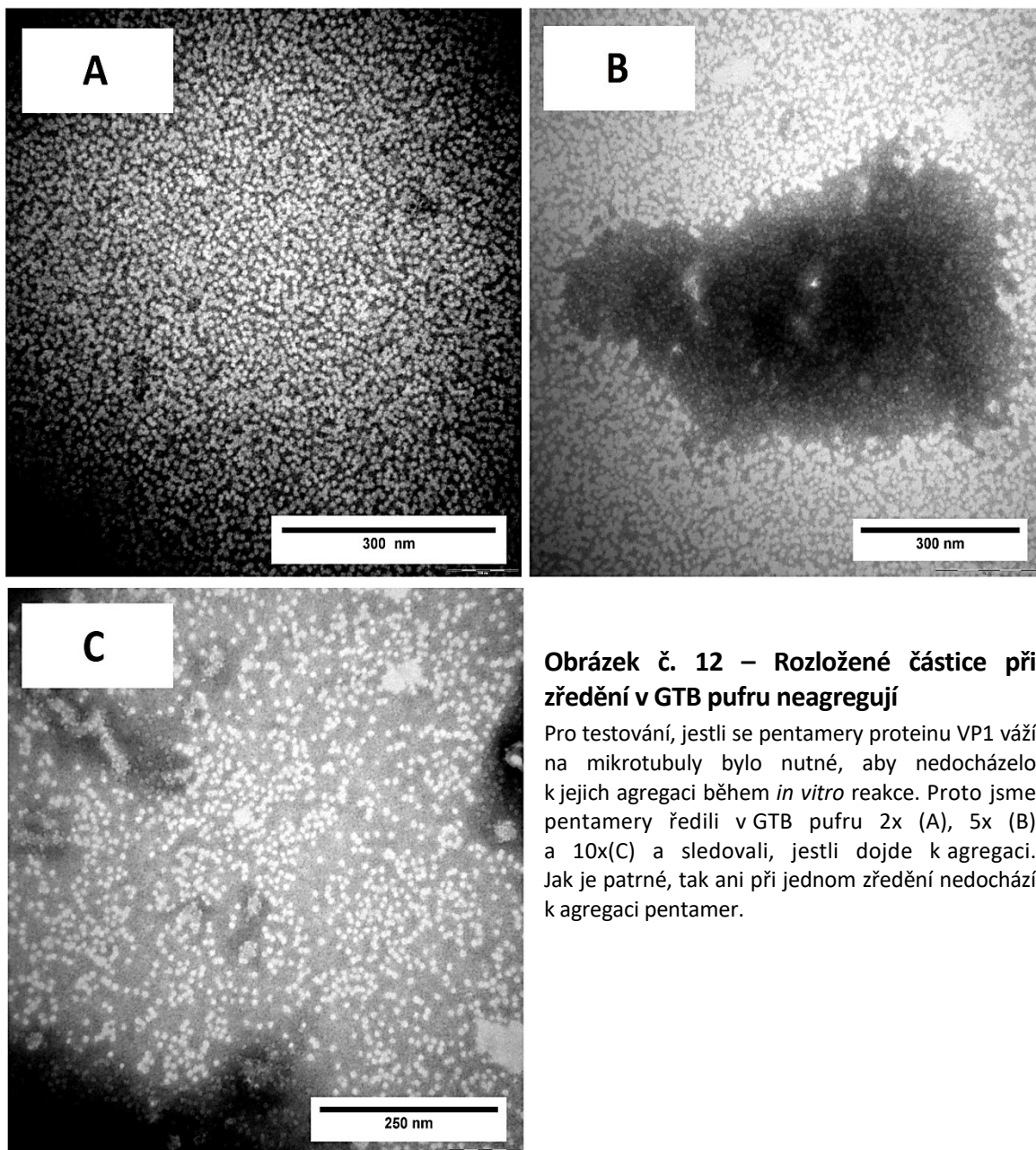


**Obrázek č. 11 – Po centrifugaci rozložených VLPs jsme získali supernatant obsahující nesražené pentamery proteinu VP1**

Po rozkladu VLPs byly volné pentamery odděleny od nerozložených částic či agregovaných proteinů pomocí centrifugaci. Ze vzniklého peletu i supernatantu byly následně připraveny vzorky pro transmisní elektronovou mikroskopii. Na obrázku (A) můžeme vidět vzorek peletu z rozložených částic. Z obrázku je patrné, že obsahoval nerozložené částice či agregované pentamery. Mimo to je možno při bližším pohledu vidět i pár struktur, které odpovídají volným pentamerům proteinu VP1. Na obrázku (B) pak můžeme vidět vzorek supernatantu z rozložených částic. Jak je z obrázku patrné, tak v supernatantu se vyskytovali pouze struktury, jejichž velikost odpovídala pentamerům proteinu VP1. Co je hlavní, je to, že nedošlo k jejich agregaci a že mohly být použity pro další experimenty.

supernatantu z rozložených částic. Jak je patrné, tak v tomto případě vzorek neobsahoval žádné proteinové agregáty, ale pouze homogenní směs struktur, jejichž velikost se podle měření v programu Fiji pohybovala kolem 8-10 nm. Tato velikost odpovídá rozměrům pentamery VP1, tak jak byla určena pomocí krystalové difrakce (Liddington *et al.*, 1991). Na základě tohoto výsledku jsme usoudili, že metoda rozkladu fungovala velmi dobře a že supernatant s rozloženými pentamerami jsme mohli použít dále. Zároveň jsme nepozorovali žádný rozdíl v rozkladu VLPs z první či druhé izolace, a v průběhu dalších experimentů jsme je volně zaměňovali.

Předtím než jsme ale mohli přistoupit k pokusu s *in vitro* vazbou pentamer, tak jsme museli vyřešit jednu komplikaci. Jednalo se o nekompatibilitu mezi pufrům určeným pro rozklad částic a pufrům GTB, který se používá pro pokus s mikrotubuly. Pro rozklad částic totiž slouží pufr s 50mM NaCl, ale koncentrace NaCl vyšší než 25 mM nepříznivě ovlivňuje vazbu proteinů k mikrotubulům. Negativně ovlivňuje vazbu k mikrotubulům i pH menší než 5 či vyšší než 9. V případě pufru pro rozklad částic je ale pH dosti vysoké a to kolem 8,8. Proto jsme původně zkoušeli, jestli se VLPs dají rozložit v pufru GTB s přídavkem 2 mM DTT a zvýšenou koncentrací EGTA (na 5 mM). V tomto pufru ale k rozkladu VLPs nedošlo (data neukázána). Následně jsme se tedy rozhodli dialyzovat rozložené pentamery, jež byly připraveny podle původní návodu, do pufru GTB. Dialyzace ale dopadla bez úspěchu a došlo k velké agregaci pentamer (data neukázána). Na úplný závěr jsme se tedy pokusili pentamery do pufru GTB přímo naředit. Z toho důvodu byly připraveny tři preparáty pro elektronovou mikroskopii, kde byly pentamery VP1 zředěny pufrům GTB. Na obrázku č. 12A můžeme vidět pentamery proteinu VP1, jež byly zředěny 2x. Na obrázku č. 12B pak byly pentamery 5x zředěné a obrázek č. 12C pochází z 10x zředěného vzorku. Z obrázku je patrné, že tentokrát nedošlo k agregaci ani u jednoho vzorku. Když jsme si ověřili, že při přímém zředění nedochází ke sražení proteinu VP1, tak jsme změřili koncentraci proteinů v rozložených částicích (1,38 mg/ml) a přistoupili jsme k testování vazby v *in vitro* experimentu.



**Obrázek č. 12 – Rozložené částice při zředění v GTB pufru neagregují**

Pro testování, jestli se pentamery proteinu VP1 váží na mikrotubuly bylo nutné, aby nedocházelo k jejich agregaci během *in vitro* reakce. Proto jsme pentamery ředili v GTB pufru 2x (A), 5x (B) a 10x(C) a sledovali, jestli dojde k agregaci. Jak je patrné, tak ani při jednom zředění nedochází k agregaci pentamer.

### 5.1.3 *IN VITRO* VAZBA PENTAMER PROTEINU VP1 K MIKROTUBULŮ

Poté co bylo ověřeno, že dochází k rozpadu VLPs na jednotlivé pentamery a že se tyto pentamery při zředění v GTB pufru nesráží, pokročili jsme k přípravě *in vitro* experimentu. Ten byl připraven dle návodu, jenž byl přiložen spolu s Microtubule Binding Protein Spin-down Assay Kitem (Cytoskeleton, Inc.). Principem této metody bylo, že se nejprve nechal *in vitro* polymerovat tubulin do struktury mikrotubulů. K mikrotubulům bylo následně přidáno definované množství testovaného proteinu (2 či 5  $\mu\text{g}$ ) a reakce byla inkubována po dobu 30 minut. Poté byl navázaný protein od toho nevázaného oddělen ultracentrifugací přes 60% (V/V) glycerolový polštář (tzv. Cushion pufr). V případě, že se protein vázal na mikrotubuly,

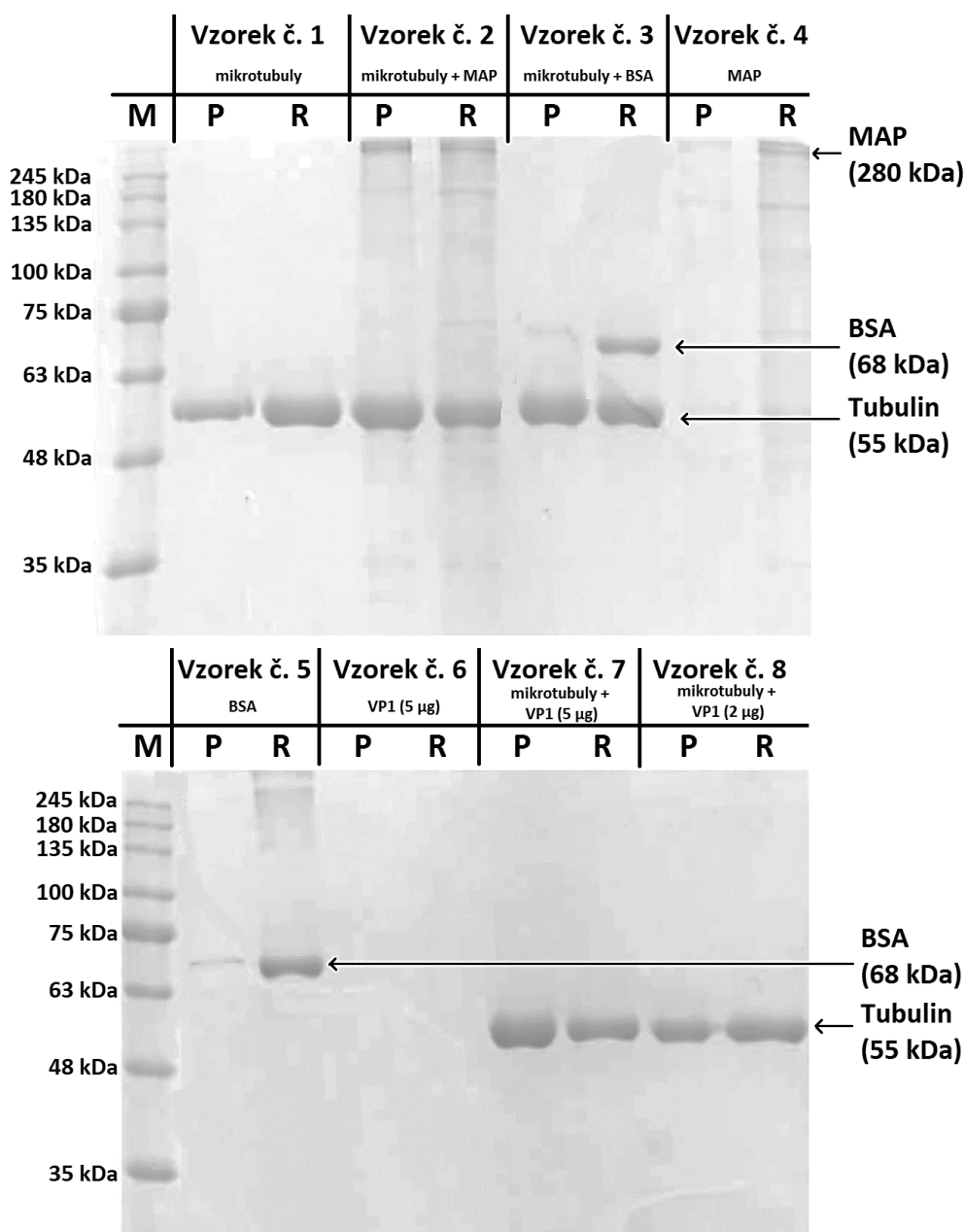


tak při ultracentrifugaci spolu s mikrotubuly peletoval na dno zkumavky. Pokud se protein nevázal, měl zůstat v supernatantu. Proto bylo důležité otestovat, jestli se pentamery proteinu VP1 v GTB pufru nesráží, protože kdyby ano, mohly by rovněž sedimentovat srže Cushion pufr. Kromě samotného testovaného proteinu jsme v rámci experimentu připravili i řadu kontrol, které nás měli ujistit, že naše reakční podmínky fungují. Kromě reakcí s proteinem VP1 jsme připravili i reakce, kde byly k mikrotubulům přidány proteiny MAP frakce s prokázanou schopností vázat mikrotubuly (pozitivní kontrola) či protein BSA, jenž tuto schopnost neměl (negativní kontrola). Celkem se takto během jednoho experimentu připravilo osm vzorků.

Při prvním pokusu jsme tento experiment provedli celý dle návodu výrobce a Cushion pufr jsme převrstvili veškerým objemem reakční směsi (50  $\mu$ l). Po ultracentrifugaci jsme poté z vrchu vzorku odebrali znovu 50  $\mu$ l supernatantu, protože se předpokládalo, že se nenavázané proteiny do Cushion pufru vůbec nedostanou. Dále se opatrně odebral zbytek Cushion pufru a resuspendoval se pelet. Při následné separaci proteinů pomocí SDS-PAGE a obarvením gelu pomocí Coomassie jsme ale protein VP1 vůbec nebyli schopni v supernatantu detekovat, a to ani u vzorků, kde žádné mikrotubuly přidány nebyly. Protein VP1 nebyl detekován ani pomocí Western blotu (data neukázána). Je tedy pravděpodobné, že i když pentamery proteinu VP1 nebyly schopny bez mikrotubulů sedimentovat na dno zkumavky, zaputovaly do 100  $\mu$ l Cushion pufru, a proto je nebylo možné detekovat ve vrchní části supernatantu. Proto jsme pokus modifikovali tak, jak je popsán v kapitole 4.5.15. Místo 50  $\mu$ l jsme Cushion pufr převrstvili pouze 30  $\mu$ l reakční směsi a zbylých 20  $\mu$ l jsme si ponechali pro určení referenčního množství vstupního materiálu. Při této úpravě postupu jsme již vzorky supernatantu neodebírali. Podobně jako v prvním případě jsme proteiny v 8 vzorcích separovali pomocí SDS-PAGE a proteiny jsme obarvili pomocí barvy Coomassie. Výsledek můžeme pozorovat na obrázku č. 13. Pomocí programu Fiji jsme pro jednotlivé proužky v gelu stanovili jejich intenzitu, která byla normalizována, tak aby odpovídala původnímu množství proteinů v reakční směsi před ultracentrifugací (podrobněji v kapitole 4.5.15). Množství proteinu v peletu jsme nakonec vyjádřili jako procento původního množství proteinu v reakční směsi před ultracentrifugací. Získané hodnoty jsou shrnuty v tabulce č. 6.

Jak můžeme pozorovat na obrázku č. 13, tak ve všech vzorcích, kde byly přidány mikrotubuly (vzorek č. 1, 2, 3, 7 a 8) došlo k sedimentaci tubulinu. Podle informací výrobce kitu by v případě tubulinu mělo v peletu být více jak 80 % vstupního množství proteinu. To bylo splněno pouze v případě vzorků č. 2, 3 a 7. U vzorků č. 1 a 8 tato hodnota byla menší, a to 44 % a 56 %. To proč u těchto vzorků sedimentovala jen zhruba polovina mikrotubulů je těžké říci. Roli by v tomto případě mohla hrát i metodika měření. Tubulin byl totiž v reakčních směsích oproti ostatním proteinům ve velkém přebytku, a tudíž byl jeho signál velmi přesycený. To by pak mohlo vést ke zkreslení skutečných hodnot. Vzhledem k tomu,

že ale v ostatních vzorcích mikrotubuly sedimentovaly podle očekávání a také na základě toho, že sedimentace ostatních kontrolních proteinů rovněž odpovídala předpokladu, jsme se tímto problémem dále nezaobírali.



**Obrázek č. 13 – Mikrotubuly a kontrolní proteiny sedimentují podle našeho očekávání**

Po přípravě vzorků byly proteiny jak v peletu (P) tak v referenčním vzorku (R) separovány pomocí SDS-PAGE a následně vizualizovány barvením v Coomassie. Kontrolní proteiny sedimentovaly dle očekávání. Tubulin, jež tvořil strukturu mikrotubulů, byl ve vzorcích č. 1, 2, 3, 7 a 8 jak v referenčním množství, tak i v peletu. Frakce MAP proteinů byla podle očekávání přítomná v peletu spolu s mikrotubuly (vzorek č. 2) a naopak chyběla v peletu, když ve vzorku nebyly přítomny mikrotubuly (vzorek č. 4). Protein BSA nebyl přítomen v peletu u vzorku č. 3 ani č. 5. Tedy tento protein není schopen vázat mikrotubuly a ani nedokáže sedimentovat skrze Cushion pufr sám o sobě. V případě proteinu VP1, ale nebylo možné určit, jestli se na mikrotubuly váže anebo ne, protože jeho množství bylo pod detekčním limitem barvení pomocí Coomassie.

**Tabulka č. 6 – Procento proteinu v peletu po analýze obarvených gelů**

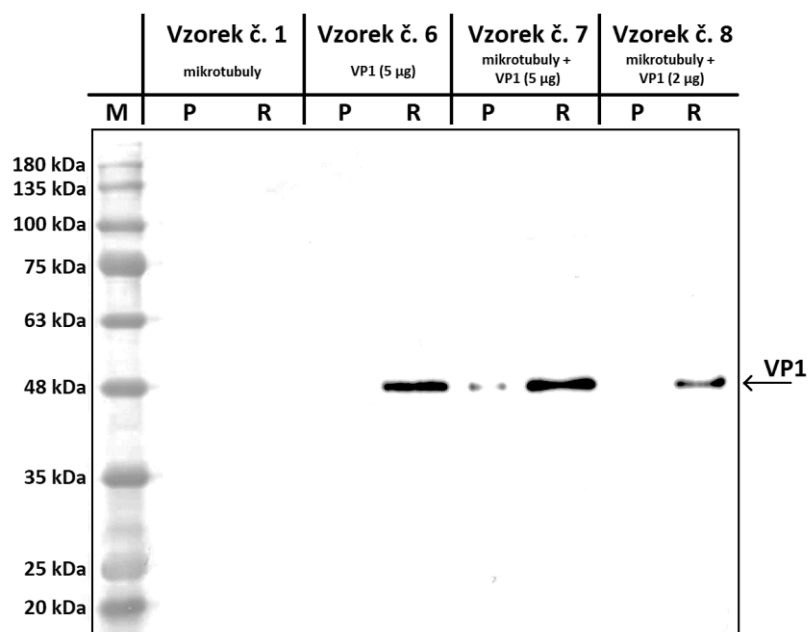
Vztaženo k celkovému množství proteinu v reakční směsi

	<b>Tubulin</b>	<b>MAP</b>	<b>BSA</b>	<b>VP1</b>
Vzorek č. 1	44 %	–	–	–
Vzorek č. 2	82 %	81 %	–	–
Vzorek č. 3	81 %	–	13 %	–
Vzorek č. 4	–	10 %	–	–
Vzorek č. 5	–	–	4 %	–
Vzorek č. 6	–	–	–	nedetekován
Vzorek č. 7	99 %	–	–	nedetekován
Vzorek č. 8	56 %	–	–	nedetekován

Na obrázku č. 13 můžeme rovněž pozorovat, že všechny kontrolní proteiny interagovali s mikrotubuly dle očekávání. Jako pozitivní kontrola, že se za našich reakčních podmínek proteiny mohly vázat na mikrotubuly, nám sloužila MAP frakce, která obsahovala několik proteinů s prokázanou schopností vázat mikrotubuly. V případě vzorku č. 2, kde se kromě proteinů MAP frakce nacházely i mikrotubuly, můžeme vidět, že došlo k jejich kosedimentaci. Podle návodu by vazba proteinů k mikrotubulům měla vyústit ve více jak 80% sedimentaci proteinů frakce MAP. V našem případě jsme naměřili, že se v peletu nachází zhruba 81 % proteinů. Zároveň jsme ve vzorku č. 4, kde nebyly žádné mikrotubuly, naměřili, že došlo k sedimentaci pouze 4 % proteinů MAP frakce, což nám potvrzuje, že bez vazby k mikrotubulům tyto proteiny nemohly sedimentovat na dno ultracentrifugační zkumavky.

Jako negativní kontrola nám sloužil protein BSA, který se ke struktuře mikrotubulů není schopen vázat. To nám potvrzuje i vzorek č. 3, kde se nacházely jak mikrotubuly, tak protein BSA. V tomto vzorku můžeme vidět, že došlo k sedimentaci více jak 81 % všech mikrotubulů. Protein BSA ale sedimentoval jen ze 13 %. Pokud by došlo k jeho vazbě na mikrotubuly, tak by v peletu muselo být více jak 80 % použitého proteinu. Podle očekávání protein BSA nebyl schopen sedimentovat ani v nepřítomnosti mikrotubulů. Ve vzorku č. 5 bylo v peletu jen 4 % proteinu BSA.

Bohužel jsme ale na obarveném gelu nebyly schopni detekovat protein VP1, a to nejen v peletech, ale ani v referenčních vzorcích. Proto jsme se rozhodli detekovat protein VP1 ve vzorcích 6-8 specifickou protilátkou a výsledek ukazuje obrázek č. 14. Podobně jako v případě obarvených gelů jsme i po Western blotu změřili signál proteinu v peletu (P) a referenčním vzorku (R) a získané hodnoty jsme normalizovali na původní množství proteinu v reakci. Procento proteinu VP1 v peletu bylo vyjádřeno jako podíl normalizovaného signálu v peletu a normalizovaného signálu v referenčním vzorku. Vypočtené hodnoty tohoto měření jsou prezentovány v tabulce č. 7.



**Obrázek č. 14 – Protein VP1 je přítomen v peletech v přítomnosti tubulinu ve velmi malém množství**

Vzorky č. 1, 6, 7 a 8 byly separovány pomocí SDS-PAGE a následně byly proteiny pomocí Western blotu přeneseny na nitrocelulóзовou membránu. Protein VP1 byl detekován pomocí specifické protilátky. Vzorek č. 6 ukázal, že protein VP1 není schopen sám o sobě sedimentovat přes Cushion pufr. U vzorku č. 7 se protein v peletu vyskytoval ve velmi malém množství a u vzorku č. 8 jsme protein v peletu již nebyli schopni detekovat.

**Tabulka č. 7 – Procento proteinu VP1 v peletu po imunodetekci protilátkou**

Vztaženo k celkovému množství proteinu v reakční směsi

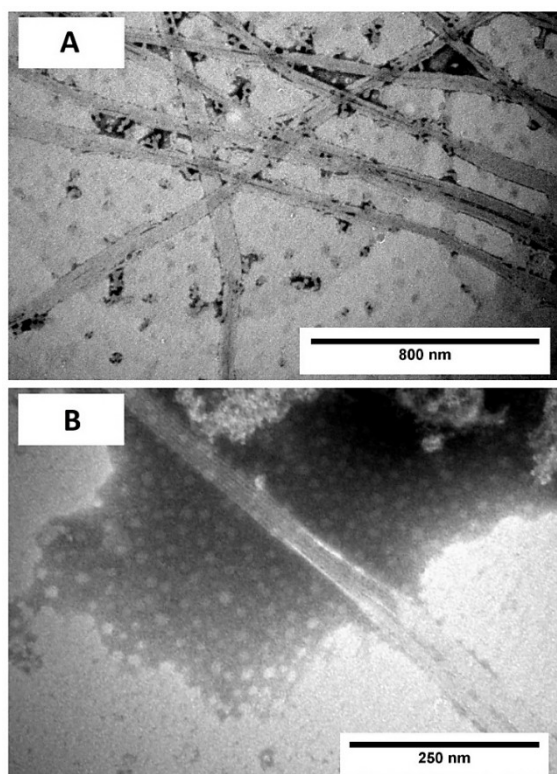
	VP1
Vzorek č. 6	0 %
Vzorek č. 7	3 %
Vzorek č. 8	0 %

Z obrázku č. 14 a tabulky č. 6 je patrné, že se pentamery proteinu VP1 myšího polyomaviru na mikrotubuly neváží buď vůbec anebo jen velmi neefektivně. Na vzorku č. 6 můžeme vidět absenci proteinu VP1 v peletu, ale jeho přítomnost v referenčním vzorku. To nám potvrdilo, že pentamery VP1 nebyly při ultracentrifugaci schopny sedimentovat na dno zkumavky sami o sobě. Ve vzorku č. 7 již malé množství proteinu v peletu bylo, ale jen zhruba 3 % z celkového množství, které bylo do reakce použito. V případě vzorku č. 8, kde byly použity pouze 2 µg proteinu VP1 v reakci s mikrotubuly, nebyl v peletu přítomný již vůbec žádný signál proteinu VP1.

Na konec jsme se ještě rozhodli připravit preparáty pro transmisní elektronovou mikroskopii. Chtěli jsme totiž ověřit, jestli se na strukturu mikrotubulů neváží malé shluky pentamer proteinu VP1, které by mohly odpovídat oněm 3 % proteinů v peletu (viz. obrázek 14). Samotné preparáty pro elektronovou mikroskopii byly připraveny z malého objemu reakčních směsí vzorku č. 1 a 7 po 30minutové inkubaci, ale předtím než byly

ultracentrifugovány. Obávali jsme se totiž, že po rozplavení peletu by mohlo dojít i k fragmentaci struktury mikrotubulů. Ve vzorku č. 1 (obrázek 15A), který sloužil jako negativní kontrola, můžeme pozorovat vláknité struktury mikrotubulů, jejichž šířka se pohybovala kolem 22-24 nm, což odpovídá publikovaným hodnotám. Preparát ze vzorku č. 7, který obsahoval jak mikrotubuly, tak pentamery proteinu VP1, můžeme vidět na obrázku 15B. I v tomto případě můžeme pozorovat strukturu mikrotubulů. Rovněž můžeme v pozadí pozorovat i struktury pentamer VP1, které ale nejsou na mikrotubulech vázané a ani nevytváří žádné pozorovatelné shluky. Na obrázku lze ještě pozorovat i kousek agregovaného materiálu, který se ale na mikrotubuly nevázal. Jeho složením jsme si nebyli jisti, pravděpodobně se mohlo jednat o směs nezpolymerovaného tubulinu a proteinu VP1. Tento agregát by mohl být také zodpovědný za slabý signál proteinu VP1 v peletu vzorku č. 7, jež byl detekován při Western blotu, ale přímý důkaz pro toto tvrzení postrádáme.

Získaná data naznačují, že pentamery proteinu VP1 nejsou schopny se efektivně vázat na strukturu mikrotubulů. Velmi malé procento jsme sice na mikrotubulech detekovali, ale abychom mohli odlišit, jestli se jedná o nespecifitu anebo o velmi nízkou afinitu k mikrotubulům bude potřeba dalších experimentů.



**Obrázek č. 15 – Fotografie z elektronového mikroskopu potvrzují, že se pentamery proteinu VP1 efektivně neváží na strukturu mikrotubulů**

Na obrázku (A) můžeme pozorovat vláknité struktury mikrotubulů ve vzorku č. 1 (negativní kontrola). Na obrázku (B) pak můžeme pozorovat stejnou strukturu u dvou překrývajících se mikrotubulů ze vzorku č. 7, kde byly kromě mikrotubulů přítomné i pentamery proteinu VP1. Z tohoto obrázku nebyla patrná žádná změna v morfologii mikrotubulů po inkubaci s pentamerami. Ty naopak zůstaly v nenavázaném stavu na pozadí obrázku.

## 5.2 PŘÍPRAVA DETEKČNÍHO SYSTÉMU PRO VYHLEDÁVÁNÍ POTENCIÁLNÍCH INTERAKČNÍCH PARTNERŮ PROTEINU VP1 POLYOMAVIRU BK A ANALÝZA ZÍSKANÝCH DAT

V současnosti se naše laboratoř rovněž věnuje i studiu BK polyomaviru, který je lidským oportunním patogenem. Podobně jako v případě MPyV nás i u BKPyV zajímají potenciální interakční partneři jeho hlavního kapsidového proteinu VP1. Na rozdíl od MPyV se ale v případě proteinu VP1 BKPyV příliš neví o tom, s jakými buněčnými proteiny či strukturami interaguje. Proto jsme se rozhodli připravit detekční systém, který umožnil izolovat protein VP1 v komplexech s jinými buněčnými proteiny, jejichž identita byla následně stanovena pomocí hmotnostní spektrometrie. Základem tohoto detekčního systému byla příprava rekombinantního proteinu VP1 BKPyV fúzovaného s capTEV™ kotvou. Právě díky této kotvě mohl být protein VP1 v transfekovaných buňkách posttranslačně modifikován biotinylací, která umožnila jeho purifikaci pomocí streptavidinu. Fúzní protein VP1 byl připraven ve dvou variantách, a to s N koncově fúzovanou kotvou (NT-VP1) ale i s C koncově fúzovanou kotvou (CT-VP1). To bylo provedeno z toho důvodu, kdyby afinitní kotva na jednom konci proteinu VP1 negativně interferovala s vazbou nějakého interakčního partneru, tak aby existovala druhá varianta proteinu VP1, kde je tento konec dostupný pro interakci.

V rámci tohoto úkolu byly pomocí systému GateWay připraveny expresní plazmidy produkující tyto dva fúzní proteiny. Dále byla v savčích buňkách ověřena jejich exprese, rozpustnost a lokalizace. Nakonec byly proteinové komplexy s proteinem VP1 izolovány afinitní chromatografií pomocí komerčního NativePure™ Affinity Purification Kitu (ThermoFisher Scientific). Jednotlivé proteiny pak byly identifikovány a analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie.

### 5.2.1 PŘÍPRAVA PLAZMIDŮ EXPRIMUJÍCÍCH HLAVNÍ KAPSIDOVÝ PROTEIN VP1

Pro přípravu fúzního proteinu VP1 s N nebo C koncově vázanou capTEV™ kotvou, byla použita rekombinace plazmidů pomocí systému GateWay. Jako donorové vektory byly použity plazmidy pENTR-VP1 a pENTR-VP1ΔSTOP. Tyto plazmidy obsahovaly gen pro hlavní strukturní protein VP1 BKPyV (subtyp IV), jenž pocházel z plazmidu pwB2b (Schowalter *et al.*, 2011). Jako cílové vektory pro expresi fúzních proteinů byly použity komerčně dostupné plazmidy pcDNA3.2/capTEV-NT/V5-DEST a pcDNA3.2/capTEV-CT/V5-DEST (ThermoFisher Scientific). Mimo to byl jako cílový vektor pro expresi proteinu VP1 (bez fúze s jakoukoliv kotvou) použit plazmid pGwf (Pastrana *et al.*, 2009).

Donorové a cílové plazmidy byly z bakterií izolovány pomocí GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kitu. Koncentrace izolované DNA pak byla stanovena pomocí spektrofotometru a její hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 8. Zároveň byla pomocí agarózové elektroforézy zkontrolována i integrita vyizolované DNA (data neukázána).

**Tabulka č. 8 – Koncentrace DNA donorových a cílových plazmidů**

	Koncentrace DNA (ng/μl)
pENTR-VP1	114,7
pENTR-VP1ΔSTOP	123,6
pcDNA3.2/capTEV-NT/V5-DEST	29,9
pcDNA3.2/capTEV-CT/V5-DEST	29,7
pGwf	75,5

Rekombinace byla provedena pomocí Gateway™ LR Clonase™ II enzymatického mixu (viz kapitola 4.4.4.). Rekombinací pENTR-VP1 a pGwf vznikl plazmid **pGwf-VP1**, rekombinací pENTR-VP1 a pcDNA3.2/capTEV-NT/V5-DEST vznikl plazmid **capTEV-NT-VP1** a rekombinací pENTR-VP1ΔSTOP a pcDNA3.2/capTEV-CT/V5-DEST vznikl plazmid **capTEV-CT-VP1**. Po skončení rekombinace byly inaktivovanými reakcemi okamžitě transformovány elektrokompetentní buňky *E. coli*, které byly vysety na misky s příslušnými antibiotiky. Pro selekci rekombinantních plazmidů capTEV-NT-VP1 a capTEV-CT-VP1 byly bakterie kultivovány na LB médiu s obsahem ampicilinu. Pro selekci rekombinantního plazmidu pGwf-VP1 bakterie rostly na LB médiu s nízkým obsahem solí a jako antibiotikum byl použit zeocin. Po nárůstu kolonií bylo v případě každého rekombinantního plazmidu přeneseno vždy 20 monoklonií na misky jak s ampicilinem či zeocinem tak na misky s chloramfenikolem. Při LR rekombinaci totiž dochází ke ztrátě genu pro chloramfenikolovou rezistenci, a tudíž pouze u těch klonů, které nerostou na chloramfenikolu ale na ampicilinu či zeocinu ano, došlo k úspěšné rekombinaci plazmidů. V případě plazmidu capTEV-NT-VP1 došlo k rekombinaci u 18 kolonií, zatímco u plazmidu capTEV-CT-VP1 došlo k rekombinaci pouze u 13 kolonií. Co se týče plazmidu pGwf-VP1, tak došlo k úspěšné rekombinaci u všech 20 plazmidů.

V dalším kroku jsme pomocí restriční štěpení ještě ověřili, že u vybraných klonů došlo ke vložení fragmentu ve správné orientaci. Proto byla z monoklonií, které nenarostly na chloramfenikolu, připravena minipreparace plazmidů pomocí alkalické metody. Izolovaná DNA byla poté štěpena pomocí restričních enzymů. V případě plazmidů capTEV-NT-VP1 a capTEV-CT-VP1 byly plazmidy štěpeny enzymem *MluI*. Tento enzym měl teoreticky rozštěpit plazmid capTEV-NT-VP1 na dva fragmenty o velikosti 4850 pb a 1979 pb. Plazmid capTEV-CT-VP1 měl být zase rozštěpen na tři fragmenty o velikosti 4996 pb, 1672 pb a 247 pb. Plazmid pGwf-VP1 byl štěpen enzymem *XhoI*. Získané fragmenty měly mít velikost

5685 pb a 759 pb. Fragmentace DNA byla ověřena pomocí agarózové elektroforézy (data neukázána). V případě plazmidů capTEV-NT-VP1 a capTEV-CT-VP1 se všechny jejich klony štěpily podle očekávání. U plazmidu pGwf-VP1 se štěpilo podle očekávání pouze 17 klonů. U zbylých 3 klonů byly na gelu pozorovány fragmenty s odlišnou velikostí. Pravděpodobně tedy u nich nedošlo ke správné rekombinaci a již dále použity nebyly.

Ze všech pozitivních klonů byl pro každý typ expresního plazmidu vybrán náhodně jeden klon, z kterého byly plazmidy izolovány pomocí GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kitu. U izolovaných plazmidů byla stanovena koncentrace DNA (tabulka č. 9) a elektroforeticky byla ověřena jejich integrita. Poté bylo přistoupeno k testování exprese proteinu VP1 v savčích buňkách, a to jak pomocí nepřímé imunofluorescence, tak pomocí Western blotu.

**Tabulka č. 9 – Koncentrace rekombinovaných plazmidů**

Po izolaci GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kitem

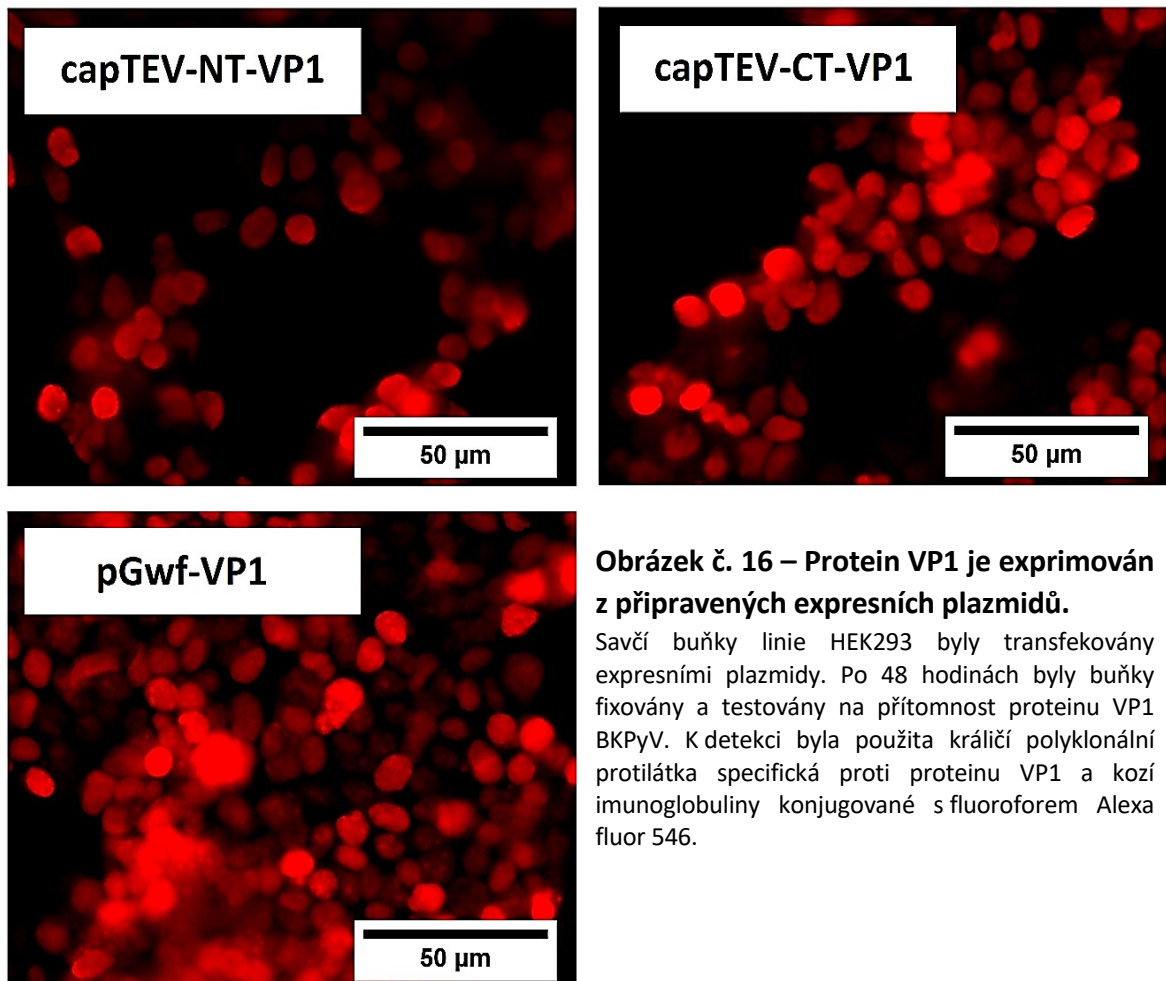
	Koncentrace DNA (ng/μl)
capTEV-NT-VP1	318,4
capTEV-CT-VP1	306,8
pGwf-VP1	270,4

Buňky linie HEK293 byly transfekovány expresními plazmidy a 48 hodin po transfekci byly fixovány. Protein VP1 byl v buňkách detekován pomocí specifické protilátky. Jak ukazuje obrázek č. 16, tak k produkci proteinu VP1 dochází ze všech připravených expresních plazmidů. Protilátka proti proteinu VP1 byla schopna rozeznat jak exprimovaný protein VP1, tak i jeho fúzní varianty. I když protein VP1 obsahuje ve své N koncové sekvenci jaderný lokalizační signál, byly všechny tři varianty proteinu VP1 detekovány v jádru i cytoplazmě.

Dále byla ověřena míra exprese proteinů metodou Western blot. Buňky linie HEK293 byly transfekovány expresními plazmidy, po 48 hodinách z nich byl pomocí RIPA pufru připraven lyzát a jednotlivé proteiny byly separovány pomocí SDS-PAGE. Poté byly proteiny přeneseny na nitrocelulósovou membránu metodou Western blotu a protein VP1 byl detekován specifickou protilátkou. Výsledek můžeme pozorovat na obrázku č. 17A. Jak je patrné, tak ve všech vzorcích jsme byli schopni detekovat protein o předpokládané molekulové hmotnosti. Protein VP1 BKPyV měl očekávanou molekulovou hmotnost 42 kDa. NT-VP1 měl předpokládanou molekulovou hmotnost zhruba 60 kDa zatímco CT-VP1 měl předpokládanou molekulovou hmotnost o něco nižší, a to zhruba 58 kDa. Rozdíl v molekulových hmotnostech fúzních proteinů je dán tím, že NT-VP1 je podle sekvence o 25 aminokyselin delší než CT-VP1.

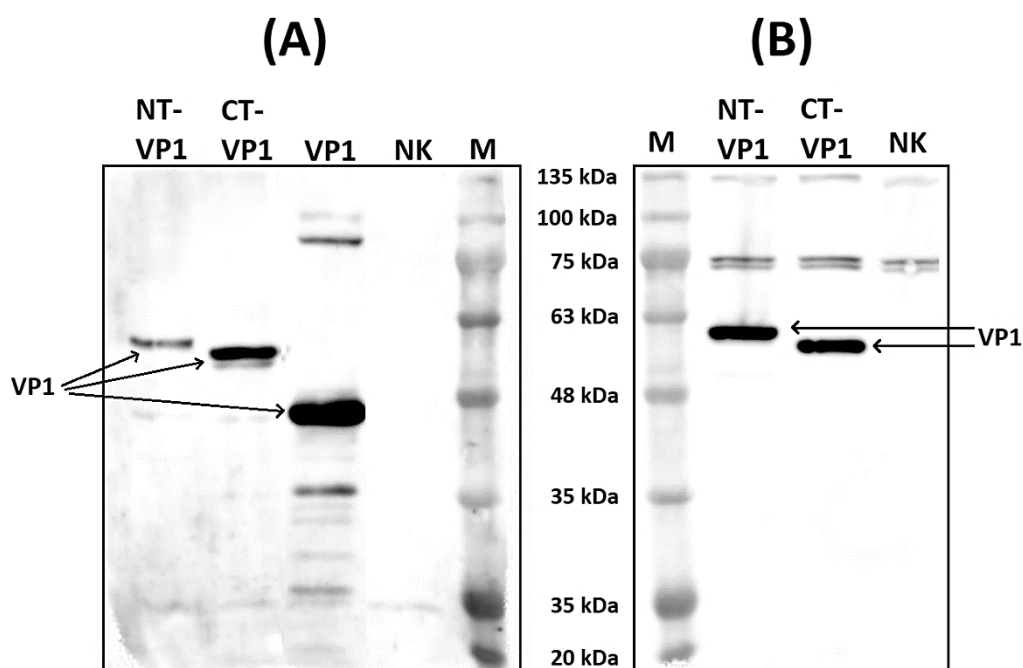


Následně jsme museli ověřit, zda skutečně dochází i k biotinylosti fúzních proteinů. Proto jsme znovu provedli Western blot a detekovali jsme jednotlivé proteiny protilátkou specifickou proti molekule biotinu. Jak je ukázáno na obrázku č. 17B, tak v případě vzorků NT-VP1 a CT-VP1 se v oblasti kolem 58 až 60 kDa vyskytují proužky, které svou molekulovou hmotností odpovídají fúzním proteinům VP1. Tyto proužky se zároveň nevyskytují u netransfekovaných buněk (NK). To prokazuje, že fúzní proteiny VP1 jsou *in vivo* biotinylovány. Další proužky, které jsme byli schopni detekovat, se zároveň vyskytují i v negativní kontrole a jedná se o buněčné proteiny, jež buňka biotinyluje přirozeně. Podle dostupné literatury se jedná o různé karboxylázy, které se uplatňují v metabolických drahách (Bramwell, 1987).



**Obrázek č. 16 – Protein VP1 je exprimován z připravených expresních plazmidů.**

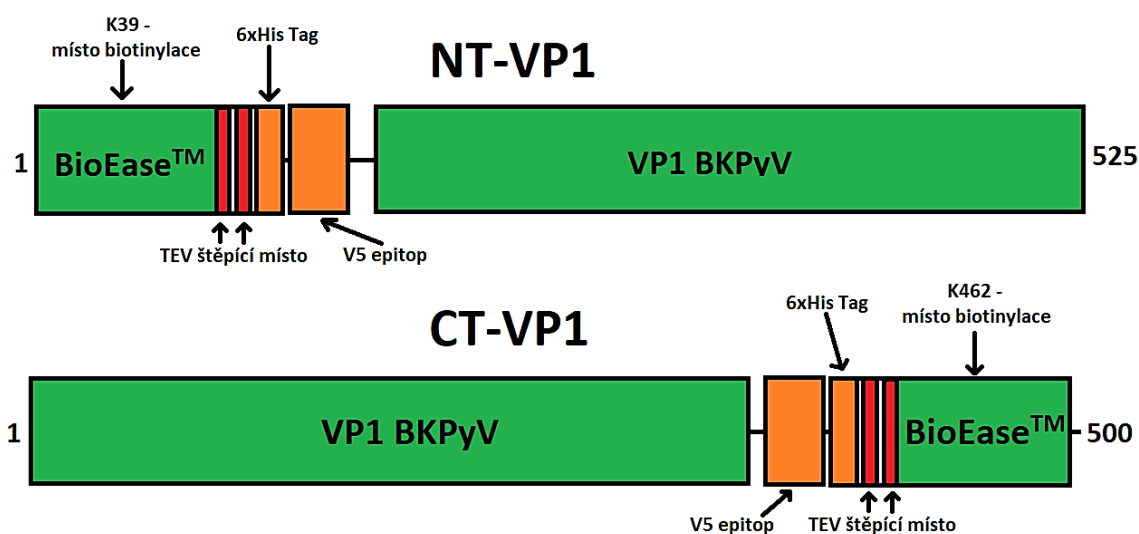
Savčí buňky linie HEK293 byly transfekovány expresními plazmidy. Po 48 hodinách byly buňky fixovány a testovány na přítomnost proteinu VP1 BKPyV. K detekci byla použita králičí polyklonální protilátka specifická proti proteinu VP1 a kozí imunoglobuliny konjugované s fluoroforem Alexa fluor 546.



**Obrázek č. 17 – U fúzních proteinů dochází po jejich expresi k posunu molekulových hmotných oproti proteinu VP1 a zároveň i k jejich *in vivo* biotinylaci**

Na obrázku (A) jsou znázorněny proužky odpovídající proteinům VP1, které byly exprimovány 48 hodin po transfekci buněk linie HEK293. Proteiny byly detekovány pomocí králičí polyklonální protilátky namířené proti proteinu VP1. Jak jde vidět u vzorků NT-VP1 a CT-VP1, tak při expresi dochází k posunu molekulových hmotností proteinu VP1 oproti jeho nefúzované variantě. To značí, že proteiny VP1 jsou exprimovány spolu s N či C koncově fúzovanou capTEV™ kotvou. Na obrázku (B) jsou pak znázorněny proteiny, které byly detekovány pomocí králičí polyklonální protilátky specifické proti biotinu. Oproti negativní kontrole (NK) jsou u vzorků NT-VP1 a CT-VP1 přítomny navíc dva proužky, které svou molekulovou hmotností odpovídají fúzním proteinům VP1, jež jsou přítomné na obrázku (A). To nám dokazuje, že fúzní proteiny VP1 jsou skutečně *in vivo* biotinylovány. Zbylé proužky odpovídají endogenním buněčným proteinům, které jsou rovněž biotinylovány.

Na obrázku č. 18 je znázorněno schéma stavby výsledného N a C koncově fúzovaného proteinů VP1. Nejdelší oblastí je samotný protein VP1 z BKPyV (subtyp IV), který obsahuje 362 aminokyselin. Tento protein je pak na N či C konci připojen ke capTEV™ kotvě. Ta je složena z celkem pěti sekvencí. Nejdelší z nich je tzv. BioEase™ peptid (72 aminokyselin), který pochází z C konce  $\alpha$ -podjednotky oxalacetát dekarboxylázy bakterie *Klebsiella pneumoniae* a který je při expresi v savčích buňkách přirozeně biotinylován (Schwarz *et al.*, 1988). Dále jsou ve fúzním proteinu přítomny i dvě sedmi aminokyselinové TEV štěpící místa, které umožňují odštěpení BioEase™ peptidu při purifikaci. Tato štěpící místa jsou velmi vzácná v lidském proteomu. Součástí kotvy je i 6xHis tag, který podobně jako BioEase™ peptid umožňuje purifikaci proteinů. Nakonec je v sekvenci i tzv. V5 epitop z opičího viru 5, který je rozeznáván řadou komerčních protilátek. Díky tomu je tedy možné detekovat i fúzní proteiny, proti kterým nejsou dostupné protilátky.



**Obrázek č. 18 – Schéma stavby N a C koncově fúzaných proteinů VP1**

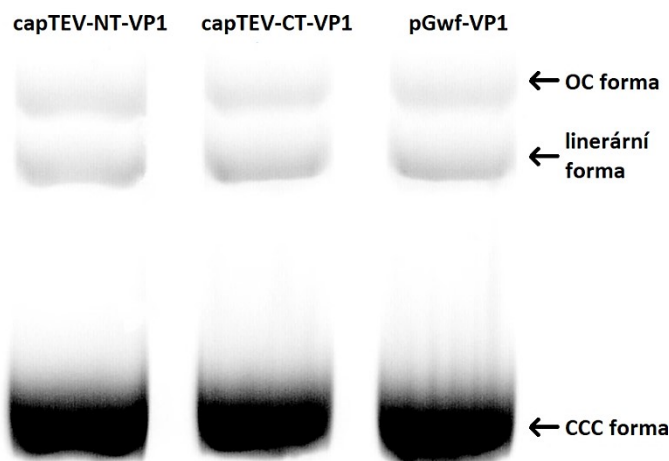
Nejdelší oblastí obou fúzních proteinů je hlavní kapsidový protein VP1 BKPyV. K tomuto proteinu je pak na N či C konci připojena capTEV™ kotva, která obsahuje pět sekvencí. Nejdůležitější z nich je BioEase™ peptid, který je v buňce přirozeně biotinylován, díky čemuž je možné fúzní proteiny purifikovat pomocí afinitní chromatografie. Dále jsou v kotvě přítomny dvě TEV štěpící místa, jeden 6xHis tag a V5 epitop opičího viru 5. N koncově fúzaný protein VP1 je dlouhý celkem 525 aminokyselin, zatímco C koncově fúzaný protein je dlouhý pouze 500 aminokyselin.

Poté co jsme ověřili, že dochází k expresi fúzních proteinů VP1 a že dochází i k jejich biotinylaci *in vivo*, jsme přešli k maxiprep izolaci expresních plazmidů. K tomu jsme použili JetStar™ Endotoxin-free Plasmid Purification Kit (Genomed), který zaručuje izolaci plazmidů bez kontaminace bakteriálními lipopolysacharidy. S těmito plazmidy jsme pak provedli zbytek experimentů. U plazmidů byla po izolaci změřena koncentrace DNA (tabulka č. 10) a pomocí elektroforézy byla ověřena i jejich integrita. Jak je možné vidět na obrázku č. 19, tak většina plazmidů se nacházela v CCC formě. Zbylé dvě izoformy byly rovněž přítomny v preparaci, ale bylo jich znatelně méně.

**Tabulka č. 10 – Koncentrace rekombinovaných plazmidů**

Po izolaci JetStar™ Endotoxin-free Plasmid Purification Kitem

	Koncentrace DNA ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )
capTEV-NT-VP1	2,23
capTEV-CT-VP1	1,49
pGwf-VP1	2,94



**Obrázek č. 19 – Plazmidy určené pro expresi proteinu VP1 obsahují všechny tři hlavní izoformy**

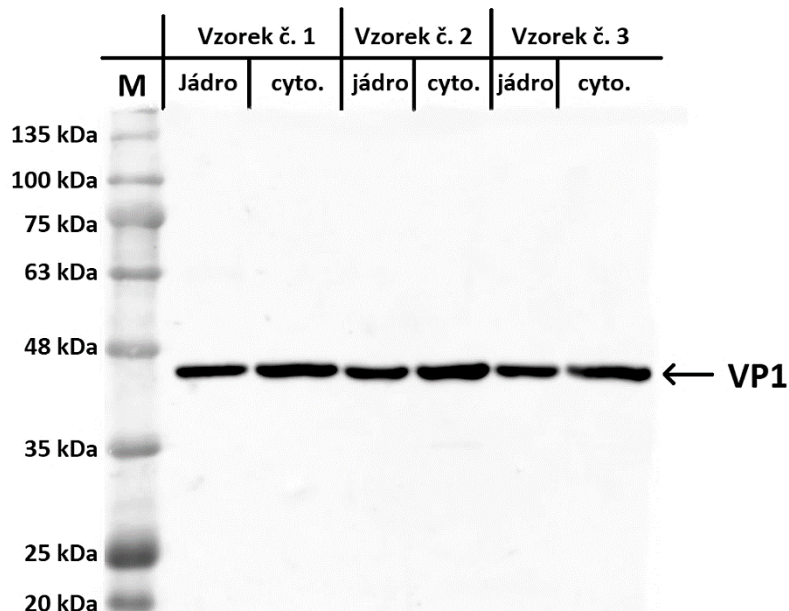
Maxipreparace plazmidů capTEV-NT-VP1, capTEV-CT-VP1 a pGwf-VP1 byly separovány v 1% agarózovém gelu. Naneseno bylo zhruba 0,5  $\mu$ g DNA. Izolované plazmidy byly převážně v CCC formě. Zbylé dvě izoformy (lineární i OC) byly v preparaci zastoupeny v menším množství.

## 5.2.2 FRAKCIONACE BUNĚK LINIE HEK293 EXPRIMUJÍCÍ PROTEIN VP1

Jak bylo patrné z obrázku č. 16, protein VP1 se nacházel jak v jádře, tak i v cytoplasmě. Abychom měli lepší představu o distribuci proteinu v buňce, změřili jsme množství proteinu VP1 v těchto dvou buněčných frakcích. Pro tento účel jsme využili expresní plazmid pGwf-VP1, který kóduje nefúzovaný protein VP1. V tomto experimentu totiž nebylo zapotřebí afinitní kotvy, která by nám umožnila purifikaci a ani jsme nepředpokládali, že by se lokalizace fúzních proteinů oproti variantě bez afinitní kotvy měla nějak výrazně lišit. Pomocí Nuclear & Cytoplasmic Extraction Kitu (G-Biosciences) jsme připravili 48 hodin po transfekci jaderné a cytoplazmatické frakce ze 3 vzorků transfekovaných buněk linie HEK293. Frakce byly separovány pomocí SDS-PAGE, proteiny byly přeneseny na nitrocelulózu membránu a protein VP1 byl imunodetekován pomocí králičí polyklonální protilátky. Výsledek tohoto experimentu ukazuje obrázek č. 20. Protein VP1 byl přítomen jak v cytoplazmatické, tak i jaderné frakci. Pro stanovení množství proteinu VP1 v jádře, jsme pomocí programu Fiji změřili intenzitu signálu proteinu VP1 ve vzorcích. Naměřené hodnoty byly poté normalizovány na celkové množství proteinu v jednotlivých frakcích (podrobněji viz kapitola 4.3.5.). Výsledné množství proteinu VP1 v jednotlivých frakcích po normalizaci je znázorněno v grafu č. 1.

Z těchto dat je patrné, že při expresi proteinu VP1 z plazmidu pGwf-VP1 byla většina proteinu i přes N koncový jaderný lokalizační signál přítomna v cytoplasmě (zhruba 77-78 %). V jádře se nenacházela ani ne jedna čtvrtina veškerého proteinu VP1. U všech 3 vzorků se

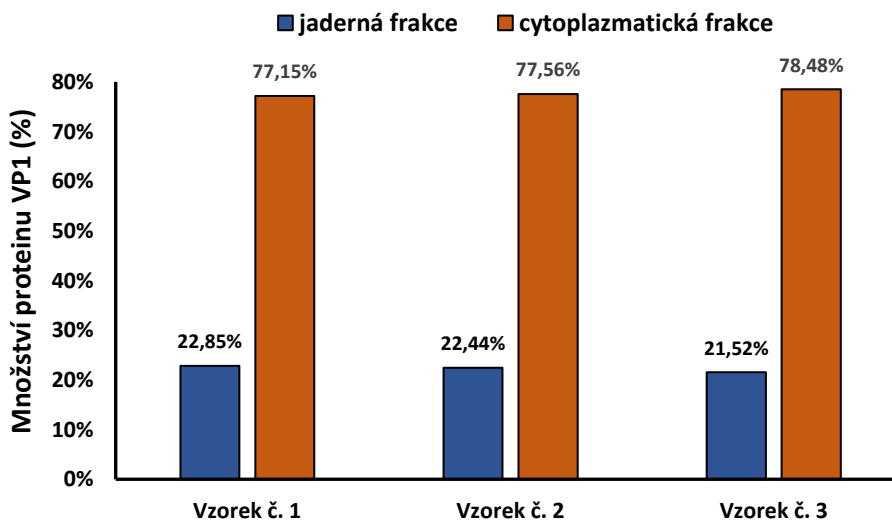
zároveň nevyskytoval příliš velký rozptyl mezi procenty proteinu VP1 v jádře či cytoplazmě (směrodatná odchylka pro obě frakce +/- 0,68 %), což nám značí reprodukcibilitu těchto dat. Je velmi pravděpodobné, že podobná distribuce proteinu VP1 byla i v buňkách exprimující NT-VP1 či CT-VP1. Kotva capTEV™ je totiž navržena, tak aby pokud možno neinterferovala s funkcí



**Obrázek č. 20 – Protein VP1 BKPyV je při heterologní expresi v savčích buňkách přítomen jak v jaderné, tak v cytoplazmatické frakci**

Buňky linie HEK293 byly transfekovány expresním plazmidem pGwf-VP1 produkujícím nefúzaný protein VP1 BKPyV. Po 48 hodinách pak byly vzorky buněk frakcionovány na dvě frakce, jádro a cytoplazma (zkratka cyto.). Proteiny byly separovány pomocí SDS-PAGE a přeneseny na nitrocelulózovou membránu metodou Western blotu. Protein VP1 byl imunodetekován králičí polyklonální protilátkou specifickou proti proteinu VP1. Jak je z výsledku patrné, tak protein VP1 byl přítomen u všech tří vzorků jak v jaderné, tak cytoplazmatické frakci.

**Graf č. 1 – Výskyt proteinu VP1 BKPyV v buněčných frakcích 48 hodin po transfekci**



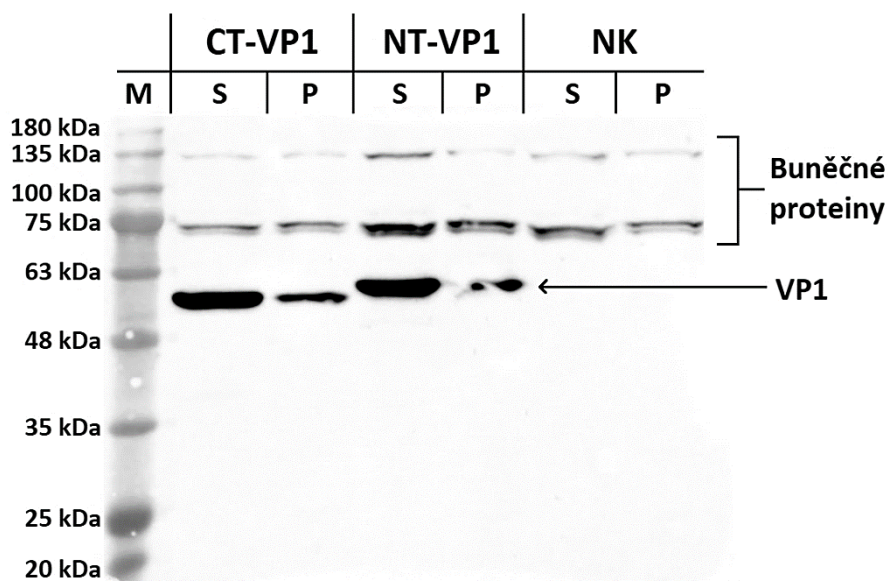


proteinu.

### 5.2.3 TESTOVÁNÍ ROZPUSTNOSTI PROTEINU VP1

Před samotnou purifikací proteinových komplexů, bylo nutné otestovat, že při přípravě lyzátů bude relativně rozumné množství proteinu VP1 přítomno v supernatantu v solubilní formě. Pro přípravu vzorků pro afinitní chromatografii je totiž vhodné lyzovat buňky bez přítomnosti detergentů, aby nedošlo k rozpadu proteinových komplexů. To ale může ovlivnit solubilitu proteinu, a proto jsme se rozhodli otestovat rozpustnost proteinu VP1 v lyzačním pufru.

Buňky linie HEK293 byly transfekovány plazmidem capTEV-NT-VP1 či capTEV-CT-VP1 a po 48 hodinách byly lyzovány ve 200  $\mu$ l lyzačního pufru podle návodu v kapitole 4.5.8. Po centrifugaci lyzátů byly rozpustné proteiny v supernatantu uschovány a agregované proteiny v peletech byly resuspendovány ve 200  $\mu$ l RIPA pufru, aby došlo k denuraci dříve nerozpustných proteinů. Následně byly proteiny ve frakcích separovány pomocí SDS-PAGE a přeneseny na nitrocelulózovou membránu pomocí Western blotu. Poté byl protein VP1 imunodetekován protilátkou proti biotinu a výsledek je možné pozorovat na obrázku č. 21.



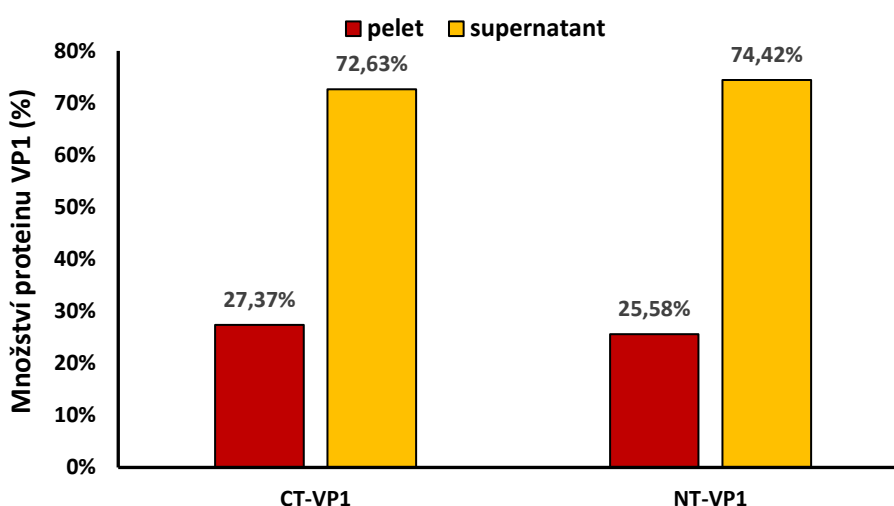
**Obrázek č. 21 – Fúzní proteiny VP1 jsou po přípravě lyzátů pro afinitní chromatografii přítomny v rozpustné formě**

Buňky linie HEK293 byly transfekovány plazmidy exprimující N či C koncově fúzovaný protein VP1. Po 48 hodinách byly z buněk připraveny lyzáty pro izolaci proteinových komplexů. Proteiny, které při přípravě lyzátu agregovaly, a tudíž byly v peletu, byly rozpuštěny denurací v RIPA pufru. Vzorky poté byly separovány pomocí SDS-PAGE a Western blotem přeneseny na membránu. K detekci proteinů byla použita králičí polyklonální protilátka specifická proti biotinu.

Jak je patrné, tak se protein VP1 vyskytoval, jak v rozpustné (supernatant, S) tak i nerozpustné (pelet, P) frakci. Intenzita signálu proteinu VP1 byla u všech vzorků změřena pomocí programu Fiji a získané hodnoty byly normalizovány na své původní objemy. K této normalizaci byly použity podobné rovnice jako v případě frakcionace buněk ale s upravenými hodnotami celkových objemů vzorků (v tomto případě to bylo 200  $\mu$ l jak pro pelet tak pro supernatant). Výsledek měření je znázorněn na grafu č. 2, kde množství proteinu VP1 v jednotlivých frakcích je prezentováno jako procento z celkového množství proteinu v buňce.

Z výsledku je patrné, že rozpustnost proteinu VP1 byla vysoká. V supernatantu, z něž se izolují proteinové komplexy, bylo přítomno více jak 70 % veškerého proteinu VP1, a to v případě obou fúzních konstruktů. Tak vysoká rozpustnost je pravděpodobně způsobena i cytoplazmatickou lokalizací proteinu VP1, kterou jsme pozorovali. Jaderné proteiny totiž bývají méně solubilní, a to zejména proto, že při lyzi agregují spolu s buněčnou DNA. Tato data ukazují, že fúzní protein VP1 je při přípravě lyzátů určených pro izolaci proteinových komplexů přítomen v supernatantu v solubilní formě, a tudíž že je ho možné pomocí afinitní chromatografie purifikovat z lyzátu spolu s jeho interakčními partnery.

**Graf č. 2 – Množství fúzních proteinů VP1 v peletu a supernatantu po přípravě lyzátů pro afinitní chromatografii**



## 5.2.4 IZOLACE PROTEINOVÝCH KOMPLEXŮ OBSAHUJÍCÍCH PROTEIN VP1 AFINITNÍ CHROMATOGRAFIÍ S VYUŽITÍM BIOTIN-STREPTAVIDINOVÉ INTERAKCE

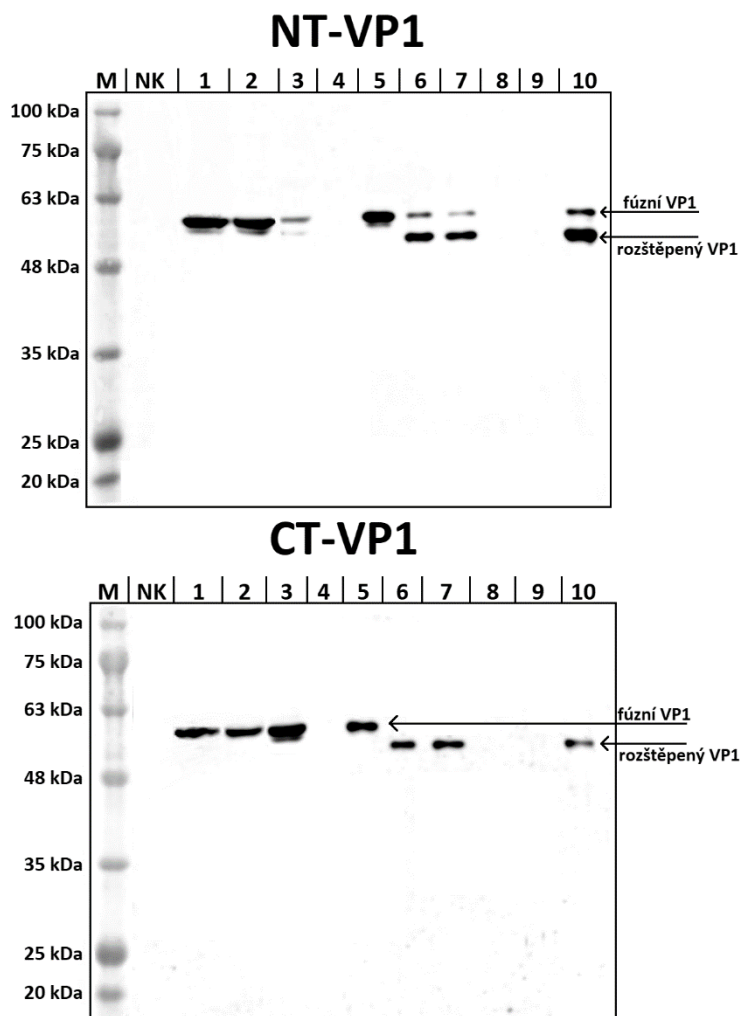
Pomocí afinitní chromatografie s využitím biotin-streptavidinové interakce byly izolovány proteinové komplexy z celkem tří typů lyzátů. První dva lyzáty (připraveny 48 hodin po transfekci) byly extrakty buněk linie HEK293, které transfekovány plazmidy capTEV-NT-VP1 či capTEV-CT-VP1. První lyzát obsahoval komplexy s NT-VP1, zatímco druhý lyzát naopak obsahoval komplexy s CT-VP1. Třetí lyzát pak byla negativní kontrola (NK). Jednalo se o lyzát buněk linie HEK293, které nebyly transfekovány žádným plazmidem, ale postup jejich zpracování byl úplně stejný jako u předešlých dvou lyzátů. Negativní kontrola nám sloužila jako kontrola proteinového pozadí, abychom při následné analýze dat z hmotnostní spektrometrie mohli eliminovat proteiny, které se nespecificky váží na streptavidin-agarózové kuličky, a tím kontaminují purifikované komplexy obsahující protein VP1. Všechny tři lyzáty byly připraveny z buněčného materiálu izolovaného z deseti 60mm Petriho misek. U každého lyzátu byla změřena koncentrace proteinů a pro purifikaci byly naředěny tak, aby v 8 ml bylo 15 mg proteinu. Samotná afinitní chromatografie byla provedena pomocí NativePure™ Affinity Purification Kitu (ThermoFisher Scientific). Přesný postup purifikace je detailně popsán v kapitole 4.5.9. Pro monitorování průběhu izolace komplexů byly po jednotlivých krocích odebírány vzorky pro následnou analýzu proteinovou elektroforézou. Celkem jsme tímto způsobem odebrali 10 vzorků pro každý typ použitého lyzátu. Popis toho, z jaké fáze purifikace tyto vzorky pocházely, je shrnut v tabulce č. 11.

**Tabulka č. 11 – Původ jednotlivých vzorků odebraných během izolace komplexů**

Vzorek	
1	Buněčný lyzát z transfekovaných buněk před oddělením solubilní proteinových komplexů.
2	Supernatant buněčného lyzátu obsahující pouze solubilní proteinové komplexy.
3	Proteinové komplexy, jež se nezachytily na streptavidin-agarózových kuličkách.
4	Proteiny vypláchnuté po 2. promyvu TEV štěpícím pufrem.
5	Streptavidin-agarózové kuličky s navázaným proteinem VP1.
6	Streptavidin-agarózové kuličky s rozštěpeným proteinem VP1 (16 hodin po přidání AcTEV™ proteázy).
7	Uvolněné komplexy proteinu VP1 po odštěpení BioEase™ peptidu.
8	Proteiny vypláchnuté po 3. promyvu TEV elučním pufrem.
9	Proteiny proteklé při zakoncentrování vzorku v NativePure™ koncentrátoru.
10	Purifikované komplexy proteinu VP1.

Proteiny ve všech 10 vzorcích jak pro NT-VP1 tak pro CT-VP1 byly spolu s negativní kontrolou (celkový lyzát z netransfekovaných buněk) separovány pomocí SDS-PAGE a následně imobilizovány na nitrocelulóзовé membráně. Protein VP1 byl v obou případech detekován pomocí specifické protilátky a výsledky jsou prezentovány na obrázku č. 22.





**Obrázek č. 22 – Přítomnost proteinu VP1 v jednotlivých fázích purifikace**

Průběh purifikace fúzních proteinů VP1 (jak NT-VP1 tak CT-VP1) jsme ověřili pomocí proteinové elektroforézy. Proteiny ve všech 10 vzorcích byly spolu s negativní kontrolou (NK) separovány pomocí SDS-PAGE a přeneseny na nitrocelulóзовou membránu. Protein VP1 byl detekován specifickou protilátkou. Jak je ze vzorků č. 1 a 2 patrné, tak protein VP1 se vyskytoval v lyzátu v dostatečném množství. Velké množství proteinu VP1 se ale rovněž při inkubaci nenařázovalo na streptavidin-agarózové kuličky (vzorek č. 3). Po 2. promyvu kolony se žádný protein VP1 z kolony již neuvolňoval (vzorek č. 4), ale zůstal navázaný na streptavidin-agarózových kuličkách (vzorek č. 5). Po inkubaci s AcTEV<sup>TM</sup> proteázou rovněž došlo k rozštěpení fúzních proteinů VP1 (vzorek č. 6) a k jejich uvolnění z kolony (vzorek č. 7). Po 3. promyvu se z kolony již žádný protein VP1 neuvolňoval (vzorek č. 8). Protein VP1 rovněž neprošel ani NativePure<sup>TM</sup> koncentrátorem při koncentraci eluátu (vzorek č. 9). V koncentrovaném eluátu protein VP1 detekován byl (vzorek č. 10).

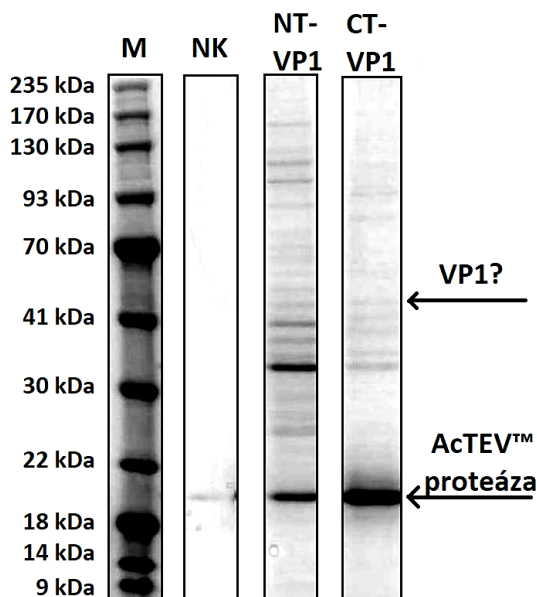
Protein VP1 byl v jednotlivých vzorcích detekován dle očekávání. Byl přítomen ve vstupním materiálu (vzorky č. 1 a 2) a také ve vzorcích č. 3 (nenavázané proteiny). Přítomnost ve vzorcích č. 3 ukazuje, že ne všichni protein VP1 byl „vychytán“ pomocí interakce jejich biotinylované kotvy a streptavidinu. Tato „propustnost“ systému nebyla způsobena slabou interakcí fúzních proteinů se streptavidinem, ale pravděpodobně nadbytkem proteinů v lyzátu, neboť u vzorků č. 4 (vzorky po druhém promytí kolony) již žádný protein VP1

detekován nebyl. To nám potvrdily vzorky č. 5 (streptavidin-agarózové kuličky s navázanými proteiny), kde byl patrný silný proužek proteinu VP1. Fungování izolačního postupu bylo rovněž potvrzeno vzorky č. 6. Jednalo se opět o streptavidin-agarózové kuličky s proteinem VP1, které ale byly 16 hodin inkubovány s AcTEV™ proteázou. Jak můžeme pozorovat, tak u proteinu VP1 došlo k poklesu molekulové hmotnosti, což značí úspěšné odštěpení BioEase™ peptidu proteázou. U proteinu CT-VP1 lze pozorovat, že došlo ke štěpení veškerého fúzního proteinu, zatímco u proteinu NT-VP1 zůstala část proteinu nerozštěpena a byla ve vzorku přítomna po celý zbytek purifikace. Vzorky č. 7 (eluované komplexy) potvrdily, že po štěpení BioEase™ peptidu se protein VP1 uvolnil z kolony. V případě proteinu NT-VP1 se uvolnila i část nerozštěpeného proteinu. Mohlo by se jednat o protein, jenž byl součástí navázaných komplexů, ale který nebyl svým biontylovaným BioEase™ peptidem přichycen ke streptavidinu. Vzorky č. 8 ukazují, že již po třetím promytí TEV elučním pufrům se z kolony neuvolňoval žádný protein VP1. Protein VP1 rovněž neprotekl ani NativePure™ koncentrátorem při zakoncentrování eluátu (vzorky č. 9). Vzorky č. 10 nám potvrdily, že protein VP1 byl úspěšně izolován, a to jak u vzorku NT-VP1, tak u vzorku CT-VP1. Kromě Western blotu jsme průběh purifikace rovněž sledovali i na gelech obarvených Commassie. Na tomto gelu bylo možné pozorovat postupný úbytek proteinů v průběhu afinitní chromatografie (data neukázána).

Dále jsme ověřili, že se v koncentrovaném eluátu nachází i potenciální interakční partneři proteinu VP1. Část (10 µl) každého eluátu (NT-VP1, CT-VP1 a NK) jsme separovali pomocí proteinové elektroforézy v Bis-Tris gradientovém gelu značky NuPAGE® (Life Technologies). Díky separaci v gradientovém gelu jsme získali optimální separaci proteinů v celém rozsahu molekulových hmotností. Separované proteiny byly poté obarveny v Coomassie a výsledek můžeme pozorovat na obrázku č. 23. V negativní kontrole se žádné viditelné proužky proteinů nevyskytovaly. Jediný proužek, který bylo možné slabě pozorovat odpovídal velikosti AcTEV™ proteázy (zhruba 20 kDa). U vzorků NT-VP1 a CT-VP1 již byly znatelně pozorovatelné proteinové proužky. Ve vzorcích byla rovněž jako v negativní kontrole přítomná i AcTEV™ proteáza. Celkově lze říci, že proteinů ve vzorku CT-VP1 bylo méně než u vzorku NT-VP1. Ani v jednom případě nebylo možné identifikovat proužek, který byl jasně odpovídal proteinu VP1. Jeho přítomnost v eluátu ale byla potvrzena pomocí Western blotu.

Ve zbytku eluátu byly hmotnostní spektrometrií identifikovány přítomné buněčné proteiny. Mezi identifikovanými proteiny (detaily analýzy dat viz. dále) bylo velké množství proteinů vázajících nukleové kyseliny. Při druhé purifikaci komplexů jsme proto k lyzátoům, jež se nanášely na purifikační kolony, přidali i DNázu a RNázu A do konečné koncentrace 100 ng/ml. Protein VP1 je totiž schopen vazby k DNA (a pravděpodobně i k RNA) a tímto krokem jsme chtěli odfiltrovat proteiny, jež jsou izolovány s proteinem VP1

ne díky tomu, že by s ním přímo interagovali ale proto, že je jsou propojeny přes molekulu DNA/RNA. Výsledek této purifikace jsme rovněž ověřili pomocí Western blotu a barvení gelu v Coomassie. Jejich výsledek byl obdobný jako u první purifikace (data neukázána).



**Obrázek č. 23 – Proteiny izolované v komplexu s proteinem VP1**

Vzorky negativní kontroly (NK), NT-VP1 a CT-VP1 byly separovány pomocí Bis-Tris gradientového gelu značky NuPage® (Life Technologies). Gel byl poté obarven pomocí Coomassie. V případě negativní kontroly se kromě AcTEV™ proteázy ve vzorku nevyskytovaly žádné další viditelné proužky proteinů. U NT-VP1 a CT-VP1 již další proužky proteinů viditelné byly. Více proteinů se vyskytovalo ve vzorku NT-VP1. Ani u jednoho vzorku ale nebyl vidět proužek, který by jasně odpovídal proteinu VP1.

## 5.2.5 ANALÝZA DAT ZÍSKANÝCH Z HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

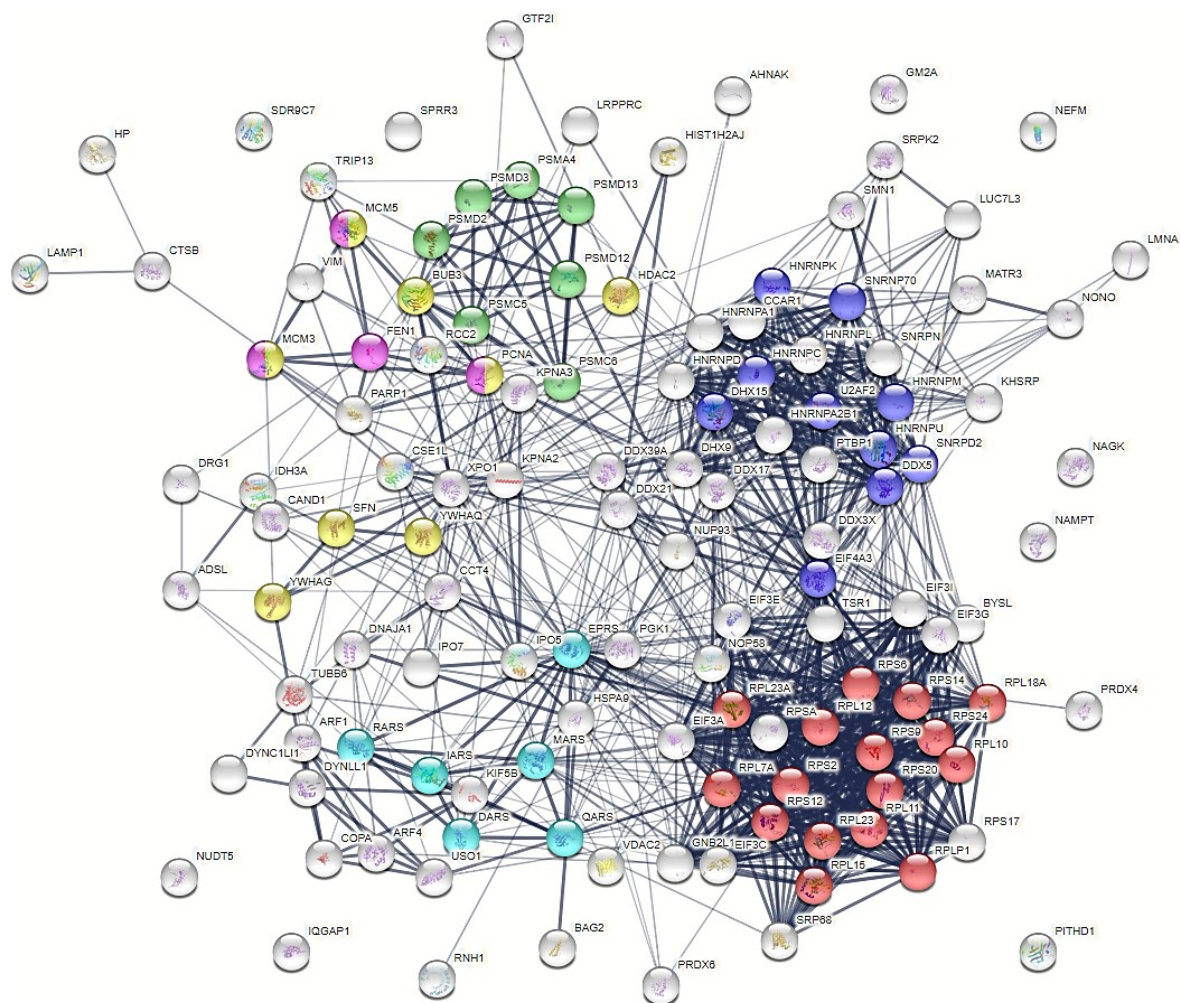
Identifikace jednotlivých proteinů, které byly izolovány v komplexu s NT-VP1 či CT-VP1, byla provedena servisní laboratoří Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy. Analyzovány byly jak vzorky NT-VP1 a CT-VP1 tak i negativní kontrola. Pomocí hmotnostní spektrometrie bylo tímto způsobem identifikováno více jak 8 000 proteinů, které mohly být potenciální interakční partneři proteinu VP1. Proto se přistoupilo k následné filtraci dat. Nejprve byly ze seznamu identifikovaných proteinů odstraněny ty proteiny, které byly pomocí hmotnostní spektrometrie identifikovány jen na základě jednoho peptidového štěpu. Dále byly ze seznamu odstraněny všechny proteiny, které byly identifikovány v negativní kontrole a které tedy byly nespecificky izolovány při afinitní chromatografii. Aby byl protein z negativní kontroly v seznamu proteinů ponechán, tak musel být ve vzorcích NT-VP1 či CT-VP1 nabohacen minimálně desetkrát. Z analýzy byla rovněž odstraněna i TEV proteáza, kterou jsme do vzorků přidali při purifikaci.

Po těchto krocích se seznam potenciálních interakčních partnerů proteinu VP1 rapidně snížil. Z první izolace zůstalo v seznamu potenciálních interakčních partnerů po výše zmíněné filtraci dat už jenom 1044 proteinů. Z tohoto celkového množství bylo u obou fúzních konstruktů identifikováno pouze 287 proteinů. V případě NT-VP1 bylo identifikováno ještě dalších 666 proteinů, které byly specifické pouze pro tento fúzní konstrukt a které nebyly identifikovány u CT-VP1. Naopak pro CT-VP1 bylo identifikováno pouze 91 proteinů, které nebyly přítomny i ve vzorku NT-VP1. Jak bylo zmíněno výše, tak jsme se obávali, že některé z těchto proteinů byly identifikovány ne proto, že by interagovaly přímo s proteinem VP1, ale proto že se vážaly na DNA (či RNA), kterou rovněž vázal i protein VP1. Z toho důvodu jsme tedy připravili i druhou izolaci komplexů, kde jsme DNA i RNA degradovali. Když jsme analyzovali data z této druhé purifikace, tak jsme v seznamu identifikovaných proteinů ponechali pouze 272 proteinů. U těchto proteinů jsme již nerozlišovali, jestli jsou specifické pro NT-VP1 či CT-VP1. Zajímavé je, že v této izolaci byly identifikovány i proteiny, které nebyly přítomné v izolaci první. Proto jsme do závěrečného výčtu proteinů, jež by mohly interagovat s proteinem VP1, zahrnuli průnik obou dvou izolací, který činil 128 proteinů. Jejich jmenný seznam v angličtině spolu s identifikačními čísly pro databázi UniProt a názvem genů, které je kódují, můžeme nalézt v Přílohách (kapitola 9.2).

Z proteinů jsme následně pomocí serveru STRING (<https://string-db.org/>) vytvořili mapu interakcí mezi jednotlivými identifikovanými proteiny. Je totiž velmi nepravděpodobné, že by protein VP1 fyzicky interagoval se všemi 128 identifikovanými proteiny. Protein VP1 nejspíše interaguje jen s několika proteiny, které tvoří komplexy s dalšími proteiny, které se tímto způsobem také dostaly do analýzy. Server STRING dokáže jednotlivé proteiny pospojovat na základě zdokumentovaných interakcí a asociací, a tím vytvořit jakési shluky funkčně propojených proteinů. Výsledný „interaktom“ proteinů interagujících s proteinem VP1 je vyobrazen na obrázku č. 24. Proteiny jsou v obrázku znázorněny jako kolečka. Pokud kolečko není prázdné, ale je v něm určitý nástin struktury, znamená to, že struktura proteinu je již známá. Jednotlivé proteiny lze v obrázku rozeznat na základě názvu genů, které je kódují a které jsou uvedeny v seznamu proteinů v Příloze. Čím silnější je tloušťka čar, která jednotlivé proteiny spojuje, tím více publikacemi je tato interakce podložena. U proteinů, které jsou na okraji interaktomu a které nejsou pospojovány s dalšími proteiny, zatím žádné interakce s dalšími identifikovanými proteiny popsány nejsou.

Co se týče shluků, tak ten největší odpovídá proteinům ribozómu (označeny červeně). Druhým velkým shlukem proteinů ve vyobrazeném interaktomu jsou překvapivě proteiny spliceosomu (označeny tmavě modře). Dále je v interaktomu možné rozeznat i proteiny proteasomu (označeny zeleně). Jako interakční partneři byly rovněž identifikovány i některé proteiny v syntéze aminoacyl-tRNA (označeny světle modře). Mezi dalšími proteiny s jasnou

funkcí byly identifikovány i proteiny regulující průchod buněčným cyklem (označeny žlutě) či proteiny účastníci se replikace (označeny fialově). Ostatní proteiny nejdou jednoduše přiřadit do zcela vyhraněné funkční skupiny, Schopnost interakce těchto proteinů (ať již konkrétní metabolické dráhy nebo „nezařazených“) stejně tak jejich případné zapojení a funkce v životním cyklu BK viru budou předmětem dalšího studia.



**Obrázek č. 24 – Interaktom proteinů izolovaných spolu s proteinem VP1 BKPyV**

Na obrázku je znázorněn interaktom 128 proteinů, které byly identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie jako potenciální interakční partneři proteinu VP1 BKPyV. Čím silnější jsou čáry propojující jednotlivé proteiny, tím vícero publikacemi je tato interakce podpořena. V případě, že na obrázku jsou proteiny nepropojené čarami s žádnými dalšími proteiny, je to proto že se o jejich interakci s dalšími proteiny v interaktomu zatím nic neví. Proteiny označené červeně jsou součástí ribosomu. Proteiny spliceosomu jsou označeny tmavě modře a zelené proteiny jsou součástí proteasomu. Světle modré proteiny hrají roli v syntéze aminoacyl-tRNA. Proteiny žluté barvy se účastní regulace buněčného cyklu, a nakonec fialové proteiny jsou potřebné při replikaci DNA. Proteiny, které jsou šedivé mají také zajímavé funkce, ale již je nelze seskupit do jasně definovaných skupin.

## **6. DISKUZE**

## 6.1

## 6.2 PROTEIN VP1 MYŠÍHO POLYOMAVIRU NENÍ SCHOPEN SE *IN VITRO* EFEKTIVNĚ VÁZAT MIKROTUBULY

Jedním ze základních předpokladů, abychom mohli co nejlépe pochopit kompletní infekční cyklus myšího polyomaviru, je nutné porozumět funkcím jeho jednotlivých proteinů. Funkce časných genů je relativně dobře prostudovaná stejně jako většina procesů časné fáze infekce. Větší mezery v našem pochopení infekčního cyklu se nachází až v pozdní fázi. Do dnešní doby stále není přesně objasněno například, jakým způsobem dochází k morfogenezi virového potomstva či k jeho uvolnění ven z buňky. Další z neobjasněných aspektů infekce myšího polyomaviru v pozdní fázi infekce je vazba hlavního kapsidového proteinu VP1 ke struktuře buněčných mikrotubulů. Ta byla popsána při heterologní expresi proteinu VP1 jak v *S. cerevisiae* (Palková *et al.*, 2000), tak i v savčích buňkách (Horníková *et al.*, 2017). Naše laboratoř by ráda tuto interakci detailně charakterizovala, a proto bylo mým cílem pomocí *in vitro* experimentu zjistit, jestli je protein VP1 schopen se vázat na mikrotubuly bez asistence dalších buněčných proteinů. K tomuto pokusu jsme tedy využili Microtubule Binding Protein Spin-down Assay Kit (Cytoskeleton, Inc.), který umožňuje testovat, zda se různé proteiny jsou schopny vázat na mikrotubuly. Abychom mohli reakci provést, tak zbývalo jenom vyizolovat protein VP1 v dostatečně velkém a čistém množství. Z toho důvodu jsme připravili VLPs v bakulovirovém expresním systému. Ten jsme zvolili pro jeho vysokou výtěžnost, a hlavně pro posttranslační modifikace proteinů, které jsou u hmyzích buněk mnohem podobnější těm savčím, než třeba modifikace u kvasinek. Když jsme ale částice vyizolovali, museli jsme se ještě rozhodnout v jaké formě protein VP1 k mikrotubulům přidáme. V žádném případě nepřípadlo v úvahu použít protein VP1 v monomerní podobě, protože v tomto stavu se protein v buňce nikdy nevyskytuje. Rozhodnutí tedy bylo mezi tím, jestli použít celé virové částice, anebo jestli částice rozložit a použít jednotlivé pentamery proteinu VP1. Nakonec jsme se rozhodli použít pro experiment právě rozložené pentamery, a to zejména ze dvou důvodů.

První důvod byl technického rázu. Když se totiž testuje, jestli se protein zájmu váže na mikrotubuly, dochází k oddělení vázané a nevázané formy pomocí ultracentrifugace přes 60% (V/V) glycerolový polštář. Volné proteiny se přes tento polštář dostat nemohou, pokud neváží mikrotubuly. Intaktní VLPs ale mohou být dostatečně hmotné na to, aby polštářem teoreticky projít mohly i bez této vazby. Tím pádem by na základě našeho experimentu nebylo možné odlišit, jestli se VLPs na mikrotubuly skutečně váží nebo ne.

Druhým důvodem, proč nepoužít intaktní VLPs, byly informace z dosud publikovaných dat. Již dlouho se totiž ví, že po translaci proteinu VP1 se na složenou pentameru váží buněčné

chaperony Hsc70, které brání agregaci proteinu v cytoplazmě. Tento protein zároveň s pentamerou translokuje do jádra, kde následně pomáhá regulovat správné složení nových virových částic (Cripe *et al.*, 1995; Chromy *et al.*, 2003). Z tohoto důvodu se tedy pentamery proteinu VP1 v cytoplazmě vlastně nevyskytují ve formě virových částic, které by se mohly na mikrotubuly vázat. Mimoto bylo v publikaci Palková *et al.* (2000) pomocí elektronové mikroskopie a ultratenkých řezů buňkou ukázáno, že je šířka mikrotubulů obalených proteinem VP1 zhruba 45 nm. Kdyby ale mikrotubuly, jejichž normální šířka je kolem 25 nm, byly obaleny celými částicemi, musela by jejich šířka být kolem 115-125 nm, protože šířka jedné virové částice je také kolem 45-50 nm. To také vyvrací hypotézu, že by se na mikrotubuly vázaly celé částice. Šířka jednoho mikrotubulu obaleného proteinem VP1 se ale shoduje se šířkou jedné polyomavirové částice. To nás tedy vedlo k postulování hypotézy, že se protein VP1 na mikrotubuly váže do podobné trubkovité struktury, jakou můžeme pozorovat při preparacích VLPs myšího polyomaviru. Vznik této struktury může být také v transfekovaných buňkách ulehčen díky tomu, že samotný protein VP1 se bez přítomnosti minoritních kapsidových proteinů jen velmi špatně dostává do jádra. Akumulace pentamer v cytoplazmě tedy může zvýšit pravděpodobnost toho, že se budou pentamery vázat na strukturu mikrotubulů. K této vazbě ale dochází nejen při heterologní expresi ale i při infekci divokým virem za situace kdy jsou pentamery do jádra transportovány již efektivně. Množství proteinu VP1 je ale v pozdní fázi infekce tak vysoké, že se i přesto v cytoplazmě vyskytuje v nezanedbatelné množství. Vznik mikrotubulů obalených proteinem VP1 tedy zřejmě není jenom artefaktem vzniklým při heterologní expresi, ale přirozenou vlastností viru.

Když jsme ale provedli *in vitro* experiment s rozloženými pentamerami proteinu VP1, tak jsme žádnou výraznou vazbu k mikrotubulům nepozorovali. V případě 5 µg proteinu VP1 se k mikrotubulům navázaly pouze 3 % tohoto množství, což bylo velmi málo. Nyní se tedy nabízí otázka, jestli tyto 3 % byly výsledkem velmi slabé afinity proteinu VP1 k mikrotubulům anebo jestli se jednalo o nespecifitu jako v případě kontrolního proteinu BSA. Ten i když není schopen vazby na mikrotubuly, tak se v jejich přítomnosti zhruba ze 13 % nacházel v peletu patrně kvůli tomu, že agregoval v síti mikrotubulů. S proteinem VP1 by to mohlo být dosti podobné. Sice jsme ověřili, že se pentamery proteinu VP1 při zředění v GTB pufru okamžitě nesrazí, ale nemohli jsme zaručit, že se tak nestane později během reakce. Mimo to k malé míře agregace pentamer docházelo vždy, když byl protein uschován do -20 °C. Proto jsme museli agregáty vždy peletovat na dno mikrozkuřavky a pro reakci použít pouze supernatant. V elektronmikroskopických snímcích z reakcí jsme sice přítomnost určitého proteinového agregátu i tak pozorovali, ale nemohli jsme, jak zjistit, že se jedná o pentamery a ne třeba o agregovaný, nepolymerovaný tubulin. Nicméně jak bylo ukázáno pomocí Western blotu, tak i kdyby došlo k malému srážení proteinu VP1, tak se tyto agregáty sami o sobě



nemohly dostat přes glycerolový polštář. Což nás opět přivádí k otázce, jestli ty 3 % procenta proteinu VP1 v peletu byly náhodné agregáty nabalené na mikrotubulech nebo výsledek nízké afinity proteinu VP1. Pro řešení této otázky je zapotřebí více experimentálních výsledků.

Jednou z možností, je provést *in vitro* experiment s vyšším množstvím proteinu VP1. Zajímalo by nás totiž, jaký to bude mít vliv na sedimentaci proteinu VP1. Pokud by se procento proteinu VP1 v peletu zvedlo úměrně s množstvím použitým při reakci a zároveň bychom nepozorovali ani žádnou zvýšenou agregaci proteinu v kontrole, tak by tento výsledek skutečně mohl znamenat, že protein VP1 se na mikrotubuly váže s nízkou afinitou a že je ho potřeba velké množství, tak jako při pozdních fázích infekce. Tato nízká afinita ale nedokáže vysvětlit, jak je možné, že protein VP1 je schopen vázat mikrotubuly po takové délce jakou lze pozorovat pomocí mikroskopie. Již teď můžeme skoro s určitostí říci, že pro vznik této struktury budou zapotřebí další buněčné proteiny.

Na prvním místě se nabízí, že pro tvorbu struktur budou zapotřebí buněčné chaperony. Jak již bylo zmíněno výše, protein Hsc70 se na protein VP1 váže ihned po translaci a brání mu v cytoplazmě ve formování kapsid. Když je ale protein VP1 v savčích buňkách exprimován sám, tak k jeho transportu do jádra skoro nedochází a v cytoplazmě se hromadí. Podle naší současné teorie, když se pentamery proteinu VP1 začnou hromadit v cytoplazmě, tak může v omezené míře dojít k jejich nízkoafinní vazbě na mikrotubuly. Pokud by se takto blízko na jeden mikrotubul navázalo vícero pentamer, tak by mohlo dojít s pomocí asociovaných chaperonů k výměně C konců jednotlivých pentamer tak jako při tvorbě kapsid a došlo by ke vzniku jakéhosi nukleárního centra. Toto nukleární centrum by pak usnadňovalo vazbu dalších pentamer a mikrotubul by se postupně obaloval proteinem VP1. To nás vrací k naší původní teorii, že takto obalený mikrotubul by pak mohl vypadat jako trubkovitý typ VLPs. Obalení mikrotubulu by tedy nemusela být konformace, která by byla proteinu VP1 vnucená ale která by mu byla přirozená. Struktura mikrotubulu by mohla sloužit pouze jako cytoplazmatická platforma, která by toto skládání s pomocí buněčných chaperonů usnadnila. Kromě Hsc70 by roli ve skládání pentamer podél mikrotubulů mohl hrát i chaperon Hsp90, který oproti Hsc70 hraje spíše roli ve skládání multimerních proteinových komplexů (přehledně shrnuto v Schopf *et al.*, 2017). Navíc tento protein byl již dříve identifikován jako součást komplexu mikrotubulů a proteinu VP1 (Horníková *et al.*, 2017). Původně se totiž myslelo, že tento protein zprostředkovává vazbu mezi proteinem VP1 a mikrotubuly. Pokusy s siRNA ale ukázaly, že tvorba vláken proteinu VP1 není na Hsp90 závislá, ale je jeho přítomností pouze ulehčena (Horníková *et al.*, 2017). Teoreticky bychom mohli protein Hsp90 (spolu s ATP) přidat do našeho *in vitro* systému a pozorovat, jestli se tím nějak razantně zvýší vazba pentamer proteinu VP1 k mikrotubulům.

Mimo typování možných interakčních partnerů bychom místo toho mohli přejít přímo k jejich detekci. Jak již bylo zmíněno v publikaci Horníková *et al.* (2017), tak mikrotubuly obalené proteinem VP1 jsou vysoce stabilní a při frakcionaci transfekovaných buněk zůstávají v poslední frakci nerozpustných proteinů. Teoreticky by se tato frakce mohla analyzovat pomocí hmotnostního spektrometru. Jednotlivé identifikované proteiny by nám pak mohly pomoci v dalším pochopení vzniku této zajímavé struktury.

Poslední otázkou, která zůstává, je proč vůbec takovéto struktury během pozdní fáze infekčního cyklu vznikají. Rolí můžou mít tyto struktury několik nicméně pravděpodobně k jejich vzniků dochází zejména proto, aby došlo k zablokování mitózy, která je velice energeticky náročná. V jejím průběhu například dochází k rozpadu jádra, což zřejmě nebude pro v jádře se replikující virus příliš výhodné. Zároveň dochází i k degradaci řady proteinů, které může myší polyomavirus pro svůj infekční cyklus potřebovat. Co se týče buněk infikovaných myším polyomavirem, tak je známo, že během infekce buňky prochází minimálně dvěma buněčnými cykly, které ale nejsou odděleny mitózou. Místo toho buňky opět vstupují do S fáze a pokračují v replikaci virové DNA dokud nedojde k jejich smrti (Chen a Fluck, 2001). Virus dokáže zastavit vstup do mitózy na několika úrovních. Jednak tím, že velký T antigen neustále stimuluje replikaci virové DNA a tím aktivuje ATM dráhu, která naopak blokuje vstup do mitózy tím, že inaktivuje cyklin dependentní kinázu 1 (Dahl *et al.*, 2005). Zároveň byla ukázána i role malého t antigenu, který dokáže buňky zadržet v prometafázi (Pores Fernando *et al.*, 2015). Rigidita mikrotubulů způsobená proteinem VP1 tedy zřejmě kooperuje s dvěma předešlými mechanismy a brání uskutečnění mitózy v infikovaných buňkách. O proteinu VP1 se ale ví, že dokáže mitózu zastavit i sám. Jak bylo ukázáno ve kvasinkách, tak heterologní exprese proteinu VP1 vedla k zástavě růstu kolonií po několik dnů (Palková, Spanielová, *et al.*, 2000). Hromadění buněk v pozdní G2 fázi bylo rovněž pozorováno i při expresi proteinu VP1 v savčích buňkách (Horníková *et al.*, 2017).

Na závěr můžeme tedy říci, že samotné pentamery proteinu VP1 myšího polyomaviru nejsou schopné *in vitro* se efektivně vázat na strukturu mikrotubulů. Ke vzniku těchto struktur bude bezesporu zapotřebí i dalších buněčných proteinů, zejména pak chaperonů. Fyziologická funkce vazby proteinu VP1 k mikrotubulům je zřejmě taková, že díky tomu dochází k zástavě buněčného cyklu a vstupu buněk do mitózy.

## 6.2. IDENTIFIKACE POTENCIÁLNÍCH INTERAKČNÍCH PARTNERŮ PROTEINU VP1 POLYOMAVIRU BK

V posledních letech neuvěřitelně vzrostl zájem o studium lidských polyomavirů, a to zejména proto, že se ukázalo jejich nebezpečí pro imunosuprimované či imunodeficientní jedince. Kromě toho polyomaviry mohou hrát roli i při vzniku lidských nádorových onemocnění. Jedním z nejvíce prozkoumaných lidských polyomavirů je BK polyomavirus, který je schopen dlouhodobě perzistovat v močové soustavě člověka bez jakýchkoliv zdravotních potíží. Bohužel se ale jedná o velmi nebezpečný oportunní patogen, který způsobuje řadu komplikací u lidí po transplantacích, a to zejména ledvin. U těchto lidí se může vyvinout tzv. polyomavirem způsobená nefropatie (Ramos *et al.*, 2009). Mimo to může BKPyV způsobit u pacientů po transplantaci ledvin i hemoragickou cystitidu močového měchýře (Dropulic a Jones, 2008). V současné době prozatím neexistuje žádná účinná léčba, která by byla specifická proti BKPyV. Všechny patologická onemocnění způsobená BKPyV se doposud léčí tím, že se sníží množství podávaných imunosupresiv, což ale naopak může vést ke zvýšené šanci na odmítnutí štěpu. Co se týče antivirotik, tak se uvažuje o použití některých typů látek, které se podávají při léčbě nemocí způsobených jinými typy DNA virů (přehledně shrnuto v Dropulic a Cohen, 2010).

Všechny tyto důvody tedy vedly k tomu, že se do popředí zájmu vědeckých týmů dostal výzkum infekčního cyklu BKPyV. V rámci naší laboratoře jsme se rozhodli identifikovat potenciální interakční partnery jeho hlavního kapsidového proteinu VP1, o jehož dalších funkcích se kromě té strukturní příliš neví. Proto jsme vytvořili detekční systém, který nám pomocí biotin-streptavidinové interakce umožnil purifikovat proteinové komplexy obsahující protein VP1. Celkem jsme vytvořili dva fúzní konstrukty s tzv. capTEV™ kotvu, která obsahuje biotinylační místo potřebné pro afinitní chromatografii. Jeden konstrukt tuto kotvu obsahoval na N konci proteinu VP1 a druhý jí obsahoval na C konci. Konstrukty byly dva z toho důvodu, kdyby kotva bránila vazbě nějakého proteinu, tak abychom tuto interakci mohli zachytit při použití druhého konstruktu. Podobný detekční systém jsme již dříve v naší laboratoři připravili pro protein VP1 myšího polyomaviru, a proto jsme již s postupem izolace komplexů měli určité zkušenosti. U připravených konstruktů jsme ověřili jejich produkci, velikost, schopnost být biotinylován, rozpustnost i přítomnost v buněčných frakcích. Když jsme poté přistoupili k samotné izolaci komplexů, tak jsme jednotlivé kroky purifikace ověřili pomocí Western blotu. Izolované proteiny v komplexu s proteinem VP1 pak byly identifikovány v suspenzi pomocí hmotnostního spektrometru. Tím se tato identifikace lišila od pokusů s VP1 MPyV, kdyby byly identifikovány pouze proteiny z nejtlustších proužků po proteinové elektroforéze. Námi získaná data jsou tedy detailnější.

Při první purifikaci jsme po filtrování dat získali 1044 potenciálních interakčních partnerů proteinu VP1 BKPyV, přičemž nejvíce proteinů bylo identifikováno u N koncově fúzaného proteinu (celkem 953). U C koncově fúzaného proteinu jich bylo identifikováno pouze 398, přičemž oba proteiny se překrývaly v 287 proteinech. Na základě tohoto výsledku je velice pravděpodobné, že pro interakce bude potřebný zřejmě C konec proteinu, který byl u CT-VP1 zablokovaný capTEV™ kotvou. Tento konec se totiž účastní interpentamerních interakcí v sestavené kapsidě tím, že se vsouvá do jádra proteinu VP1 v sousední pentamere a dále jeho terciární strukturu stabilizuje (Liddington *et al.*, 1991). Tento konec je tedy velmi flexibilní a teoreticky by mohl hrát hlavní roli i v interakci s jinými proteiny. Další variantou ale může být, že přítomnost kotvy na C konci proteinu VP1 může vést k destabilizaci proteinu a jeho degradaci. Při afinitní chromatografii, i když jsme používali stejné množství vstupního materiálu (15 mg proteinu), tak bylo z Western blotu patrné, že CT-VP1 je ve vzorcích mnohem méně. Podobnou věc jsme pozorovali i u C koncově fúzaného proteinu VP1 MPyV, který byl v naší laboratoři připraven (Horníková, nepublikovaná data).

Kromě této první purifikace jsme připravili i druhou izolaci komplexů proteinu VP1, ke které byly během vychytávání na streptavidin-agarózové kuličky přidány enzymy RNáza A a DNáza. To bylo kvůli tomu abychom limitovali interakce zprostředkované pomocí těchto dvou polymerních molekul. Protein VP1 má totiž nespecifickou DNA vazebnou doménu, skrze kterou by mohly přes vazbu na DNA kopurifikovat i další DNA vazebné proteiny. RNáza A pak byla ke komplexům přidána z podobného důvodu a to proto, aby RNA vazebné proteiny, jež by se mohly vázat na protein VP1, nepomáhaly kopurifikovat skrze vazbu RNA další proteiny. Tato naše úvaha se potvrdila, když po přidání DNázy a RNázy ke vzorkům, poklesl počet identifikovaných proteinů po filtraci dat na pouhých 272. Co je zvláštní je, že i když počet identifikovaných proteinů poklesl zhruba o tři čtvrtiny, i tak se v druhé izolaci vyskytovala řada proteinů (přesněji 144), které při první izolaci identifikovány nebyly (po filtraci dat). Vysvětlení bude pravděpodobně v principu izolace, kterou jsme používali. Neizolovali jsme totiž jenom proteiny, které interagovali s proteinem VP1 BKPyV, ale izolovali jsme proteinové komplexy, kterých je protein VP1 součástí. Spousta identifikovaných proteinů (ne-li většina) tedy s proteinem VP1 vůbec přímo interagovat nemusí, ale váže se na jeho skutečný interakční partner. Proteinové komplexy, které jsme vyizolovali, sice obsahovaly protein VP1, skrze který jsme je purifikovali, ale součástí těchto komplexů byly další „nabalené“ proteiny, které podle různých afinit zůstaly s komplexy asociovány. Během různých izolací se tedy vždy vyskytne variabilní počet proteinů, které budou přítomné v různém množství. Pouze ty proteiny, které jsou stabilní součástí komplexů s proteinem VP1, by měli být pokaždé identifikovány. Když jsme provedli průnik proteinů identifikovaných během těchto dvou izolací, zůstalo nám v seznamu pouze 128 proteinů. Proto by bylo zajímavé provést ještě jednu

izolaci komplexů a identifikaci proteinů a podívat se v kolika proteinech se shodují poté. Mimo jiné si musíme uvědomit, že všechny identifikované proteiny pocházely z komplexů, které byly při lyzi buněk v solubilním stavu. Řada proteinů, zejména membránových či jaderných, vůbec nemusela být identifikována, protože se do supernatantu z lyzovaných buněk vůbec nedostaly. Také je důležité podotknout, že tento experiment cílil pouze na proteiny, jež s proteinem VP1 mohou interagovat až v pozdní fázi infekce. Protein VP1 totiž může jako součást virové kapsidy interagovat s řadou dalších proteinů v rané fázi infekce, kdy dochází k transportu BKPyV do jádra hostitelské buňky. V této fázi virus prochází endosomálními kompartmenty a endoplazmatickým retikulem, kde, jak již bylo popsáno, protein VP1 interaguje s rezidentními enzymy jako například s protein disulfid izomerázou ERdj5 (Inoue *et al.*, 2015) či proteinem ERAD dráhy Derlin1 (Jiang *et al.*, 2009). Při heterologní expresi se ale protein VP1 bez tzv. targeting sekvence do těchto organel nedostane. Námi identifikovaný počet proteinů nemusí (a není) dozajista konečný.

Když se podrobněji podíváme na identifikované proteiny, tak mezi nimi můžeme nalézt i některé proteiny, jejichž interakce byla již dříve potvrzena pro protein VP1 MPyV. Jedním z nich je i poly(ADP-ribóza) polymeráza 1 (PARP1), která se účastní uvolnění proteinu VP1 z DNA viru, a tím pomáhá zahájit časnou transkripci (Carbone *et al.*, 2006). Rovněž jsme identifikovali několik buněčných importinů jako např. importin 5 či importin 7. To není nic překvapivého vzhledem k přítomnosti jaderného lokalizačního signálu na N konci proteinu VP1. Co už zvláštní je, že jsme v průniku obou experimentů identifikovali i 2 buněčné exportiny. Zejména zajímavý je pak exportin 1, který hraje roli v jaderném exportu řady proteinů či RNA (Fornerod *et al.*, 1997). Identifikace tohoto proteinu by mohla naznačovat určitou roli VP1 v regulaci jaderném exportu. Protein VP1 totiž nemá žádný jaderný exportní signál, na který by se mohl exportin 1 vázat, a proto by jejich interakce mohla mít úplně jinou funkci. Co se pak týče cytoskeletálních proteinů, tak byl jako součást proteinových komplexů identifikován i tubulin  $\beta$ . Protein VP1 BKPyV je tedy pravděpodobně také schopen interakce s mikrotubuly podobně jako protein VP1 MPyV. V případě BKPyV jsme si ale při heterologní expresi nevšimli, že by protein VP1 vytvářel podobné vláknité struktury jako je tomu u MPyV. Problematika vazby hlavního kapsidového proteinu na strukturu mikrotubulů ale nebyla v případě BKPyV tématem této práce, a proto jsme se jí detailně nezabývali. Kromě tubulinu  $\beta$  jsme při obou izolacích našli i další proteiny účastnících se fungování cytoskeletu jako např. dva řetězce molekulárního motoru dyneinu či těžký řetězec kinesinu-1. Rovněž byly identifikovány i intermediální filamenta jako vimentin či lamin. Všechny tyto identifikované proteiny by mohly potvrzovat, že protein VP1 při infekci BKPyV je schopen ovlivnit fungování buněčného cytoskeletu. Co nám přijde zvláštní je, že jsme spolu s proteinem VP1 nepurifikovali buněčné chaperony jako Hsc70 či Hsp90, jejichž interakce s proteinem VP1 MPyV byla

prokázána (Cripe et al., 1995; Chromy et al., 2003; Horníková et al., 2017). Místo toho jsme identifikovali dva kochaperony Hsc70, a to tzv. DnaJ homolog subfamily A member 1 a BAG family molecular chaperone regulator 2 (Terada a Mori, 2000; Rauch a Gestwicki, 2014). Velmi zajímavé bylo, že v seznamu proteinů se objevil i stresový protein 70, což je mitochondriální chaperon účastnící se role v biogenezi železo-sirných center (Shan a Cortopassi, 2016). Posledním identifikovaným chaperonem byl protein s anglickým názvem T-complex protein 1 subunit  $\delta$ . Primární funkcí tohoto chaperonu je pomoc při sestavení oktamerního proteinového komplexu BBSomu, který vytváří proteinový plášť na povrchu váčků cílených do tzv. primárních cilií buněk (Jin *et al.*, 2010; Seo *et al.*, 2010).

Celkově největší skupinou proteinů v seznamu byly proteiny ribosomální, kterých bylo identifikováno 16. To zjištění nás příliš nepřekvapilo, protože je logické, že při translaci proteinu VP1 může dojít ke kopurifikaci ribosomu. Právě translatovaný protein sice ještě nemusí být biotinylován, ale jak je známo tak již během translace začíná protein VP1 pentamerizovat. Tímto způsobem tedy může být ribosom izolován spolu s ještě nedotranslatovaným proteinem VP1, který již ale částečně asociuje s dalšími proteiny VP1 (již biotinylovanými). Kromě ribosomálních proteinů byly identifikovány i další proteiny účastnící se translace, a to celkem 5 podjednotek eukaryotického iniciačního faktoru 3 a 6 tRNA ligáz katalyzující syntézu aminoacyl-tRNA. Přítomnost tRNA ligáz v komplexech proteinu VP1 je překvapující, ale dá se to vysvětlit tím, že tyto enzymy kopurifikovaly spolu s ribosomy. Ví se totiž, že řada těchto ligáz je součástí velkého proteinového komplexu, který kolokalizuje v buňce spolu s translatujícími ribosomy (David *et al.*, 2011). Co se pak týče podjednotek eukaryotického iniciačního faktoru 3 tak jejich přítomnost v komplexech proteinu VP1 je překvapivá z několika důvodů. Zaprvé, proč jsme kromě faktoru 3 žádný jiný eukaryotický iniciační faktor při izolaci nezachytili a zadruhé, jestliže byly ribosomy izolovány spolu s již translatovanými proteiny VP1, tak jak to že byl jejich součástí i faktor účastnící se iniciace translace. Nedávno sice byl popsán případ, kdy tento faktor zůstal součástí již elongujícího ribosomu, ale to bylo při translacích mRNA, u nichž docházelo k reiniciaci translace (Mohammad *et al.*, 2017). Můžeme se tedy zamyslet, jestli byla kopurifikace tohoto faktoru náhodná anebo jestli protein VP1 není vázán na ribosomu (či iniciační faktor 3) i z jiného důvodu než při jeho právě probíhající translaci.

Podobné dilema jako v případě ribosomálních proteinů jsme měli i u proteinů proteosomu, kterých jsme v komplexech proteinu VP1 identifikovali celkem 7. Opět jedna z možností, proč byly tyto proteiny kopurifikovány spolu s proteinem VP1, je degradace tohoto proteinu v proteasomu. Na druhou stranu ani nemůžeme vyloučit, že by tato interakce měla jinou povahu než degradace proteinu VP1. Pomocí specifického inhibitoru lactacystinu bylo

již dříve ukázáno, že aktivita proteasomu je nezbytná pro časnou fázi infekce BKPyV (Jiang *et al.*, 2009).

Další zajímavou skupinou identifikovaných proteinů byly tři tzv. 14-3-3 proteiny, což jsou fosfoserin/fosfothreonin vazebné proteiny účastníci se různých signalizačních dějů (přehledně shrnuto ve Freeman a Morrison, 2011). Jak jsme již psali v literárním přehledu, tak protein VP1 má celkem 3 seriny na kterých může být fosforylován (Fang *et al.*, 2010). Interakce těchto proteinů s VP1 by tedy teoreticky mohla být zprostředkována pomocí těchto fosfoserinů. Jaký by ale mohla mít tato interakce význam zatím nevíme. Je ale pravdou, že se tyto proteiny účastní signalizací spojených s buněčnou proliferací. Možná by tedy protein VP1 mohl regulovat buněčný cyklus podobně jako velký T antigen. Jako další interakční partner proteinu VP1 byl identifikován i protein mitotického kontrolního bodu BUB3. Tento protein je jedním z esenciálních faktorů důležitých pro správný rozchod sesterských chromatid při mitóze (Logarinho *et al.*, 2008). Jestliže s ním protein VP1 interaguje mohl by tím ovlivnit průběh mitózy. Jak již bylo zmíněno výše, tak polyomaviry mají spoustu způsobů, jakým se snaží předejít vstupu buněk do mitózy. Tato interakce by mohla být také jedním z nich. Pro toto tvrzení ale nemáme žádné důkazy a jedná se tedy pouze o spekulaci.

Protein VP1 byl detekován i v komplexu s dvěma proteiny, jež se účastní replikace jaderného a v případě infekce BKPyV i virového genomu. Jednalo se o svorkový protein PCNA a endonukleázu FEN1. Přítomnost proteinu VP1 v komplexu s těmito proteiny je docela nečekaná. Kdyby se jednalo o izolaci komplexů z infikovaných buněk, tak bychom mohli říci, že tyto proteiny kopurifikovali s proteinem VP1 kvůli vazbě na replikující se virový minichromosom. Při této heterologní expresi jsme ale v buňce žádnou virovou DNA neměli. Tento výsledek nám tedy naznačuje, že by protein VP1 mohl podobně jako velký T antigen vázat (a regulovat) buněčný replikační komplex. K jakému účelu by protein VP1 mohl tyto proteiny vázat, se můžeme prozatím jenom dohadovat. Vzhledem k tomu, že protein VP1 má nesespecifickou DNA vazebnou doménu takto by proteiny replikačního aparátu mohly sloužit k vazbě proteinu VP1 na právě se replikující DNA. Díky tomu by kapsidový protein mohl lépe rozeznat virový minichromosom určený pro enkapsidaci. Dalším proteinem na seznamu potenciálních interakčních partnerů byly i různé varianty histonu H2A. Žádný jiný typ histonů (tedy H2B, H3 či H4) v průniku obou izolací identifikován nebyl. To by teoreticky mohlo znamenat, že protein VP1 se preferenčně váže na DNA v blízkosti tohoto histonu. Tato interakce by tedy mohla být důležitá pro enkapsidaci virového genomu a udržení vnitřní organizace ve virionu.

Co je ale dle našeho názoru nejvíce překvapivým výsledkem této studie interakčních partnerů proteinu VP1 je ohromný počet proteinů schopných vázat se na RNA. Z celkem 128 proteinů má podle analýzy serveru STRING přesně 73 identifikovaných proteinů

tuto vlastnost. V této skupině se nachází jak již zmíněné ribosomální proteiny, tak i tRNA ligázy. Také se zde ale nachází doposud nezmiňované proteiny spliceosomu, kterých je v seznamu 10. Mohlo by to tedy značit, že protein VP1 dokáže nějakým způsobem regulovat či jinak ovlivňovat splicing u hostitelské buňky? Co se týče polyomavirů, tak ty využívají velmi hojně mechanismů buněčného splicingu k produkci jak časných, tak i pozdních transkriptů. Zatím se ale vůbec nepředpokládalo, že by tento proces mohl být regulován kapsidovým proteinem. Tato asociace mezi proteinem VP1 a komponenty buněčného spliceosomu je podle nás velice zajímavá a rozhodně by si zasloužila další studium.

Poslední zajímavou skupinou proteinů, která byla pomocí hmotnostní spektrometrie a následné analýzy dat identifikována, byla skupina 7 RNA helikáz patřící mezi tzv. DEAD/DEAH box helikázy, jejichž název se odvíjí od 4 konzervovaných aminokyselinových zbytků podílejících se na tvorbě ATP vazebného místa. Jedná se o asparát, glutamát, alanin a aspartát/histidin. Tyto proteiny hrají v buňce nesmírně důležitou roli a účastní se prakticky jakéhokoli aspektu metabolismu RNA od transkripce až po degradaci RNA (přehledně shrnuto v Linder a Jankowsky, 2011). Přítomnost těchto proteinů v komplexu s proteinem VP1 tedy otevírá řadu otázek, k čemu by mohla být tato interakce přínosná. U JC polyomaviru bylo například ukázáno, že DEAD box helikáza 1 se spolu s proteinem CstF váže do NCCR viru v gliových buňkách a způsobuje transaktivaci obou jeho virových promotorů (Sunden *et al.*, 2007). Zrovna ale tato helikáza námi nebyla identifikována jako potenciální interakční partner proteinu VP1 BKPyV. Co se ale týče možné role identifikovaných RNA helikáz v životním cyklu BKPyV, tak ta by dle našeho názoru stála rovněž za podrobnější výzkum.

Kromě výše uvedených proteinů je na seznamu samozřejmě i řada dalších identifikovaných potenciálních interakčních partnerů, které mají spoustu zajímavých funkcí. Všechny tyto proteiny ale byly pouze identifikovány jako součást komplexů obsahující protein sVP1. Jestli s ním ale skutečně fyzicky interagují a jaká je jejich případná funkce v životním cyklu viru bude nutné dále ověřit pomocí více specifických metod.



## **7. ZÁVĚRY**

Všechny výsledky dosažené v této diplomové práci můžeme shrnout do následujících bodů.

**Prvním cílem v rámci této diplomové práce bylo otestovat, jestli se hlavní kapsidový protein VP1 myšího polyomaviru je schopen vázat *in vitro* na strukturu buněčných mikrotubulů.**

- Pomocí bakulovirového expresního systému byly připraveny virové částice složené jen z proteinu VP1. Tyto částice jsme poté pro potřebu experimentů purifikovali a zároveň jsme provedli jejich kvantifikaci.
- Izolované VLPs byly rozloženy na jednotlivé pentamery proteinu VP1 a poté jsme zředěním v pufru GTB ověřili, že nedochází k jejich okamžitému srážení.
- Na závěr jsme pomocí rozložených pentamer a mikrotubulů provedli *in vitro* experiment, který prokázal, že se pentamery proteinu VP1 vážou na strukturu buněčných mikrotubulů jen velice neefektivně. Z našich výsledků ale nebylo možné rozlišit, jestli se jednalo o nespecifitu anebo jen o nízkoafinní vazbu.

**Druhým cílem této diplomové práce bylo připravit detekční systém, který by umožnil izolaci a následnou identifikaci proteinových komplexů obsahující hlavní kapsidový protein VP1 polyomaviru BK.**

- Byly připraveny expresní plazmidy capTEV-NT-VP1 a capTEV-CT-VP1 produkující protein VP1 s N či C koncově fúzovanou capTEV<sup>TM</sup> kotvou, jež umožňovala *in vivo* biotinylní těchto proteinů. Zároveň jsme také připravili i expresní plazmid pGwf-VP1 produkující protein VP1 bez žádné koncové značky.
- Pomocí expresních plazmidů jsme ověřili produkci rekombinantních proteinů a také jejich biotinylní. Zároveň jsme pomocí frakcionace zjistili, že více jak 75 % proteinu VP1 je při heterologní expresi přítomno v cytoplazmě buněk.
- Otestovali jsme i rozpustnost proteinových komplexů obsahujících protein VP1. Tyto solubilní komplexy jsme dále purifikovali pomocí afinitní chromatografie a izolované proteiny byly identifikovány hmotnostní spektrometrií.
- Získaná data z hmotnostního spektrometru jsme analyzovali a identifikovali 128 potenciálních interakčních partnerů proteinu VP1 polyomaviru BK.

## **8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

Publikace označené \* jsou přehledové články.

- Abend, J. R. et al. (2009)** A truncated T antigen expressed from an alternatively spliced BK virus early mRNA., *The Journal of general virology*. Microbiology Society, 90(Pt 5), pp. 1238–45.
- Allander, T. et al. (2007)** Identification of a Third Human Polyomavirus, *Journal of Virology*, 81(8), pp. 4130–4136.
- Arthur, R. R. and Shah, K. V (1989)** Occurrence and significance of papovaviruses BK and JC in the urine., *Progress in medical virology. Fortschritte der medizinischen Virusforschung. Progres en virologie medicale*, 36, pp. 42–61.
- La Bella, F. and Vesco, C. (1980)** Late modifications of simian virus 40 chromatin during the lytic cycle occur in an immature form of virion, *J Virol*, 33(3), pp. 1138–1150.
- Bennett, S. M. et al. (2015)** Role of a nuclear localization signal on the minor capsid proteins VP2 and VP3 in BKPyV nuclear entry., *Virology*. NIH Public Access, 474, pp. 110–6.
- Bennett, S. M., Jiang, M. and Imperiale, M. J. (2013)** Role of Cell-Type-Specific Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation in Polyomavirus Trafficking, *Journal of Virology*, 87(16), pp. 8843–8852.
- Bird, G. et al. (2008)** Possible Role for Cellular Karyopherins in Regulating Polyomavirus and Papillomavirus Capsid Assembly, *Journal of Virology*, 82(20), pp. 9848–9857.
- Bolen, J. B. et al. (1981)** Differences in the subpopulations of the structural proteins of polyoma virions and capsids: biological functions of the multiple VP1 species., *Journal of virology*, 37(1), pp. 80–91.
- Brady, J. N., Winston, V. D. and Consigli, R. A. (1977)** Dissociation of polyoma virus by the chelation of calcium ions found associated with purified virions., *Journal of virology*, 23(3), pp. 717–24.
- Bramwell, M. E. (1987)** Characterization of biotinylated proteins in mammalian cells using 125I-streptavidin., *Journal of biochemical and biophysical methods*, 15(3–4), pp. 125–32.
- Broekema, N. and Imperiale, M. (2013)** miRNA regulation of BK polyomavirus replication during early infection, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(20), pp. 8200–8205.
- Burton, K. S. and Consigli, R. A. (1996)** Methylation of the polyomavirus major capsid protein VP1., *Virus research*, 40(2), pp. 141–7.
- Carbone, M. et al. (2006)** PARP-1 Interaction with VP1 Capsid Protein Regulates Polyomavirus Early Gene Expression†, *Journal of Molecular Biology*, 363(4), pp. 773–785.
- Chatterjee, M., Weyandt, T. B. and Frisque, R. J. (2000)** Identification of archetype and rearranged forms of BK virus in leukocytes from healthy individuals., *Journal of medical virology*, 60(3), pp. 353–62.
- Chen, L. and Fluck, M. (2001)** Kinetic analysis of the steps of the polyomavirus lytic cycle., *Journal of virology*, 75(18), pp. 8368–79.
- Chen, P. L. et al. (2011)** Phosphorylation of Ser-80 of VP1 and Ser-254 of VP2 is essential for human BK virus propagation in tissue culture, *Journal of General Virology*, 92(11), pp. 2637–2645.
- 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*. European Molecular Biology Organization, 17(12), pp. 3233–40.

- Chromy, L. R., Pipas, J. M. and Garcea, R. L. (2003)** Chaperone-mediated in vitro assembly of Polyomavirus capsids, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(18), pp. 10477–10482.
- Clever, J., Dean, D. A. and Kasamatsu, H. (1993)** Identification of a DNA binding domain in simian virus 40 capsid proteins Vp2 and Vp3., *The Journal of biological chemistry*, 268(28), pp. 20877–83.
- Collins, K. L. and Kelly, T. J. (1991)** Effects of T antigen and replication protein A on the initiation of DNA synthesis by DNA polymerase alpha-primase., *Molecular and cellular biology*, 11(4), pp. 2108–15.
- Courtneidge, S. A. and Heber, A. (1987)** An 81 kd protein complexed with middle T antigen and pp60c-src: a possible phosphatidylinositol kinase., *Cell*, 50(7), pp. 1031–7.
- Courtneidge, S. A. and Smith, A. E. (1983)** Polyoma virus transforming protein associates with the product of the c-src cellular gene., *Nature*, 303(5916), pp. 435–9.
- Cripe, T. P. et al. (1995)** In vivo and in vitro association of hsc70 with polyomavirus capsid proteins., *Journal of virology*, 69(12), pp. 7807–13.
- Dahl, J., You, J. and Benjamin, T. L. (2005)** Induction and utilization of an ATM signaling pathway by polyomavirus., *Journal of virology*, 79(20), pp. 13007–17.
- David, A. et al. (2011)** RNA binding targets aminoacyl-tRNA synthetases to translating ribosomes., *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 286(23), pp. 20688–700.
- DeCaprio, J. A. et al. (1988)** SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene., *Cell*, 54(2), pp. 275–83.
- Dilworth, S. M. et al. (1986)** Subcellular localisation of the middle and large T-antigens of polyoma virus., *The EMBO journal*. European Molecular Biology Organization, 5(3), pp. 491–9.
- Doherty, J. and Freund, R. (1997)** Polyomavirus large T antigen overcomes p53 dependent growth arrest, *Oncogene*, 14(16), pp. 1923–1931.
- Dornreiter, I. et al. (1992)** Interaction of DNA polymerase alpha-primase with cellular replication protein A and SV40 T antigen., *The EMBO journal*, 11(2), pp. 769–76.
- \*Dropulic, L. K. and Cohen, J. I. (2010)** Update on New Antivirals Under Development for the Treatment of Double-Stranded DNA Virus Infections, *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 88(5), pp. 610–619.
- Dropulic, L. K. and Jones, R. J. (2008)** Polyomavirus BK infection in blood and marrow transplant recipients., *Bone marrow transplantation*. NIH Public Access, 41(1), pp. 11–8.
- Dugan, A. S., Eash, S. and Atwood, W. J. (2005)** An N-Linked Glycoprotein with (2,3)-Linked Sialic Acid Is a Receptor for BK Virus, *Journal of Virology*, 79(22), pp. 14442–14445.
- \*Dupzyk, A. and Tsai, B. (2016)** How Polyomaviruses Exploit the ERAD Machinery to Cause Infection, *Viruses*, 8(9), p. 242.
- Eash, S. and Atwood, W. J. (2005)** Involvement of Cytoskeletal Components in BK Virus Infectious Entry, *Journal of Virology*, 79(18), pp. 11734–11741.
- Eash, S., Querbes, W. and Atwood, W. J. (2004)** Infection of Vero Cells by BK Virus Is Dependent on Caveolae, *Journal of Virology*, 78(21), pp. 11583–11590.
- Eddy, B. et al. (1962)** Identification of the oncogenic substance in rhesus monkey kidney cell culture as simian virus 40., *Virology*, 17, pp. 65–75.

- Eddy, B. and Stewart, S. (1959)** Characteristics of the SE polyoma virus., *American journal of public health and the nations health*, 49, pp. 1486–92.
- Evans, G. L. et al. (2015)** Anion homeostasis is important for non-lytic release of BK polyomavirus from infected cells, *Open Biology*, 5(8), p. 150041.
- Fang, C.-Y. et al. (2010)** Global analysis of modifications of the human BK virus structural proteins by LC-MS/MS., *Virology*, 402(1), pp. 164–76.
- Feng, H. et al. (2008)** Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma., *Science (New York, N.Y.)*. NIH Public Access, 319(5866), pp. 1096–100.
- Fornerod, M. et al. (1997)** CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals., *Cell*, 90(6), pp. 1051–60.
- Forstova, J. et al. (1993)** Cooperation of Structural Proteins during Late Events in the Life Cycle of Polyomavirus, *Journal of virology*, 67 (3), pp. 1405-13
- \*Freeman, A. K. and Morrison, D. K. (2011)** 14-3-3 Proteins: Diverse functions in cell proliferation and cancer progression, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 22(7), pp. 681–687.
- Gardner, S. et al. (1971)** New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation, *The Lancet*. Elsevier, 297(7712), pp. 1253–1257.
- Gaynor, A. M. et al. (2007)** Identification of a Novel Polyomavirus from Patients with Acute Respiratory Tract Infections, *PLoS Pathogens*, 3(5), p. e64.
- Germond, J. E. et al. (1975)** Folding of the DNA double helix in chromatin-like structures from simian virus 40., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(5), pp. 1843–7.
- Gheit, T. et al. (2017)** Isolation and characterization of a novel putative human polyomavirus, *Virology*, 506, pp. 45–54.
- Gillock, E. T. et al. (1997)** Polyomavirus major capsid protein VP1 is capable of packaging cellular DNA when expressed in the baculovirus system., *Journal of virology*, 71(4), pp. 2857–65.
- Girardi, A. et al. (1962)** Development of tumors in hamsters inoculated in the neonatal period with vacuolating virus, SV-40., *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 109, pp. 649–60.
- Goodwin, E. C. et al. (2011)** BiP and Multiple DNAJ Molecular Chaperones in the Endoplasmic Reticulum Are Required for Efficient Simian Virus 40 Infection, *mBio*, 2(3), pp. e00101-11.
- Gosert, R. et al. (2010)** Rearranged JC virus noncoding control regions found in progressive multifocal leukoencephalopathy patient samples increase virus early gene expression and replication rate., *Journal of virology*. American Society for Microbiology (ASM), 84(20), pp. 10448–56.
- Goudsmit, J. et al. (1982)** The role of BK virus in acute respiratory tract disease and the presence of BKV DNA in tonsils., *Journal of medical virology*, 10(2), pp. 91–9.
- Griffith, J. D. (1975)** Chromatin structure: deduced from a minichromosome., *Science (New York, N.Y.)*, 187(4182), pp. 1202–3.
- Gross, L. (1953)** Neck tumors, or leukemia, developing in adult C3H mice following inoculation, in early infancy, with filtered (Berkefeld N), or centrifugated (144,000 ×g), Ak-leukemic extracts, *Cancer*. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, 6(5), pp. 948–957.
- Helle, F. et al. (2017)** Biology of the BKPyV: An Update, *Viruses*, 9(11), p. 327.
- Heritage, J., Chesters, P. M. and McCance, D. J. (1981)** The persistence of papovavirus BK DNA sequences in normal human renal tissue., *Journal of medical virology*, 8(2), pp. 143–50.

- Hirsch, H. H. and Steiger, J. (2003)** Polyomavirus BK., *The Lancet. Infectious diseases*, 3(10), pp. 611–23.
- Horníková, L. et al. (2015)** Mouse Polyomavirus: Propagation, Purification, Quantification, and Storage, in *Current Protocols in Microbiology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., p. 14F.1.1-14F.1.26.
- Horníková, L. et al. (2017)** VP1, the major capsid protein of the mouse polyomavirus, binds microtubules, promotes their acetylation and blocks the host cell cycle., *The FEBS journal*, 284(2), pp. 301–323.
- Howe, C. C. and Tan, K. B. (1977)** Nucleoprotein complexes from simian virus 40-infected monkey cells: association of viral DNA with histones and the major viral structural protein., *Virology*, 78(1), pp. 45–56.
- Hurdiss, D. L. et al. (2016)** New Structural Insights into the Genome and Minor Capsid Proteins of BK Polyomavirus using Cryo-Electron Microscopy., *Structure (London, England: 1993)*. Elsevier, 24(4), pp. 528–536.
- Inoue, T. et al. (2015)** ERdj5 Reductase Cooperates with Protein Disulfide Isomerase To Promote Simian Virus 40 Endoplasmic Reticulum Membrane Translocation, *Journal of Virology*. Edited by T. S. Dermody, 89(17), pp. 8897–8908.
- Jakobovits, E. B., Bratosin, S. and Aloni, Y. (1980)** A nucleosome-free region in SV40 minichromosomes, *Nature*. Nature Publishing Group, 285(5762), pp. 263–265.
- Jiang, D. et al. (1993)** SV40 T antigen abrogates p53-mediated transcriptional activity., *Oncogene*, 8(10), pp. 2805–12.
- Jiang, M. et al. (2009)** Early events during BK virus entry and disassembly., *Journal of virology*. American Society for Microbiology (ASM), 83(3), pp. 1350–8.
- Jin, H. et al. (2010)** The conserved Bardet-Biedl syndrome proteins assemble a coat that traffics membrane proteins to cilia., *Cell*. NIH Public Access, 141(7), pp. 1208–19.
- Jin, L. et al. (1993)** BK virus antigenic variants: sequence analysis within the capsid VP1 epitope., *Journal of medical virology*, 39(1), pp. 50–6.
- Johannessen, M. et al. (2011)** BKV Agnoprotein Interacts with  $\alpha$ -Soluble N-Ethylmaleimide-Sensitive Fusion Attachment Protein, and Negatively Influences Transport of VSVG-EGFP, *PLoS ONE*. Edited by R. J. Geraghty, 6(9), p. e24489.
- \*Johne, R. and Muller, H. (2007)** Polyomaviruses of Birds: Etiologic Agents of Inflammatory Diseases in a Tumor Virus Family, *Journal of Virology*. American Society for Microbiology, 81(21), pp. 11554–11559.
- Kean, J. M. et al. (2009)** Seroepidemiology of Human Polyomaviruses, *PLoS Pathogens*. Edited by W. J. Atwood, 5(3), p. e1000363.
- Korup, S. et al. (2013)** Identification of a Novel Human Polyomavirus in Organs of the Gastrointestinal Tract, *PLoS ONE*. Edited by J. Qiu, 8(3), p. e58021.
- Krauzewicz, N. et al. (1990)** Myristylated polyomavirus VP2: role in the life cycle of the virus., *Journal of virology*. American Society for Microbiology (ASM), 64(9), pp. 4414–20.
- Law, L. et al. (1962)** Further studies on antibody status of mice and response of their litters to parotid-tumor (polyoma) virus., *Journal of the National Cancer Institute*, 28, pp. 629–47.
- Li, M. et al. (1995)** Polyomavirus VP1 phosphorylation: coexpression with the VP2 capsid protein modulates VP1 phosphorylation in Sf9 insect cells., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(13), pp. 5992–6.

- Li, M. and Garcea, R. L. (1994)** Identification of the threonine phosphorylation sites on the polyomavirus major capsid protein VP1: relationship to the activity of middle T antigen., *Journal of virology*, 68(1), pp. 320–7.
- Li, M., Lyon, M. K. and Garcea, R. L. (1995)** In vitro phosphorylation of the polyomavirus major capsid protein VP1 on serine 66 by casein kinase II., *The Journal of biological chemistry*, 270(43), pp. 26006–11.
- Liddington, R. C. et al. (1991)** Structure of simian virus 40 at 3.8-Å resolution, *Nature*, 354(6351), pp. 278–284.
- Lim, E. S. et al. (2013)** Discovery of STL polyomavirus, a polyomavirus of ancestral recombinant origin that encodes a unique T antigen by alternative splicing, *Virology*, 436(2), pp. 295–303.
- \*Linder, P. and Jankowsky, E. (2011)** From unwinding to clamping — the DEAD box RNA helicase family, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(8), pp. 505–516.
- Linzer, D. I. and Levine, A. J. (1979)** Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells., *Cell*, 17(1), pp. 43–52.
- Logarinho, E. et al. (2008)** The Human Spindle Assembly Checkpoint Protein Bub3 Is Required for the Establishment of Efficient Kinetochore–Microtubule Attachments, *Molecular Biology of the Cell*. Edited by S. Doxsey, 19(4), pp. 1798–1813.
- Low, J. et al. (2004)** BKV and SV40 infection of human kidney tubular epithelial cells in vitro, *Virology*, 323(2), pp. 182–188.
- Low, J. A. et al. (2006)** Identification of gangliosides GD1b and GT1b as receptors for BK virus., *Journal of virology*. American Society for Microbiology (ASM), 80(3), pp. 1361–6.
- Ludlow, J. W. and Consigli, R. A. (1987)** Polyomavirus major capsid protein VP1 is modified by tyrosine sulfuration., *Journal of virology*, 61(5), pp. 1708–11.
- Ludlow, J. W. and Consigli, R. A. (1989)** Hydroxyproline in the major capsid protein VP1 of polyomavirus., *Journal of virology*. American Society for Microbiology (ASM), 63(6), pp. 2881–4.
- van der Meijden, E. et al. (2010)** Discovery of a New Human Polyomavirus Associated with Trichodysplasia Spinulosa in an Immunocompromized Patient, *PLoS Pathogens*. Edited by M. J. Imperiale, 6(7), p. e1001024.
- Melendy, T. and Stillman, B. (1993)** An interaction between replication protein A and SV40 T antigen appears essential for primosome assembly during SV40 DNA replication., *The Journal of biological chemistry*, 268(5), pp. 3389–95.
- \*Milavetz, B. I. and Balakrishnan, L. (2015)** Viral Epigenetics, *Methods Mol Biol.*, 1238, pp. 569–596.
- Mishra, N. et al. (2014)** Identification of a Novel Polyomavirus in a Pancreatic Transplant Recipient With Retinal Blindness and Vasculitic Myopathy, *Journal of Infectious Diseases*, 210(10), pp. 1595–1599.
- Mohammad, M. P. et al. (2017)** In vivo evidence that eIF3 stays bound to ribosomes elongating and terminating on short upstream ORFs to promote reinitiation, *Nucleic Acids Research*, 45(5), p. gkx049.
- Montross, L. et al. (1991)** Nuclear assembly of polyomavirus capsids in insect cells expressing the major capsid protein VP1., *Journal of virology*, 65(9), pp. 4991–8.
- Moreland, R. B., Montross, L. and Garcea, R. L. (1991)** Characterization of the DNA-binding properties of the polyomavirus capsid protein VP1., *Journal of virology*, 65(3), pp. 1168–76.



- Moriyama, T. et al. (2007)** Caveolar Endocytosis Is Critical for BK Virus Infection of Human Renal Proximal Tubular Epithelial Cells, *Journal of Virology*, 81(16), pp. 8552–8562.
- Moriyama, T. and Sorokin, A. (2008)** Intracellular trafficking pathway of BK Virus in human renal proximal tubular epithelial cells, *Virology*, 371(2), pp. 336–349.
- Neu, U. et al. (2013)** A Structure-Guided Mutation in the Major Capsid Protein Retargets BK Polyomavirus, *PLoS Pathogens*. Edited by D. A. Galloway, 9(10), p. e1003688.
- Okada, Y. et al. (2005)** Dissociation of heterochromatin protein 1 from lamin B receptor induced by human polyomavirus agnoprotein: role in nuclear egress of viral particles, *EMBO reports*, 6(5), pp. 452–457.
- Padgett, B. L. et al. (1971)** Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy., *Lancet (London, England)*, 1(7712), pp. 1257–60.
- Palková, Z., Adamec, T., et al. (2000)** Production of polyomavirus structural protein VP1 in yeast cells and its interaction with cell structures., *FEBS letters*, 478(3), pp. 281–9.
- Palková, Z., Spanielová, H., et al. (2000)** The polyomavirus major capsid protein VP1 interacts with the nuclear matrix regulatory protein YY1., *FEBS letters*, 467(2–3), pp. 359–64.
- Panou, M.-M. et al. (2018)** Agnoprotein Is an Essential Egress Factor during BK Polyomavirus Infection, *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), p. 902.
- Pastrana, D. V. et al. (2009)** Quantitation of Human Seroresponsiveness to Merkel Cell Polyomavirus, *PLoS Pathogens*. Edited by R. L. Garcea, 5(9), p. e1000578.
- 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*. American Society for Microbiology (ASM), 74(5), pp. 2288–92.
- Pores Fernando, A. T. et al. (2015)** Polyoma small T antigen triggers cell death via mitotic catastrophe, *Oncogene*, 34(19), pp. 2483–2492.
- Ramos, E. et al. (2009)** The Decade of Polyomavirus BK-Associated Nephropathy: State of Affairs, *Transplantation*, 87(5), pp. 621–630.
- Rauch, J. N. and Gestwicki, J. E. (2014)** Binding of Human Nucleotide Exchange Factors to Heat Shock Protein 70 (Hsp70) Generates Functionally Distinct Complexes *in Vitro*, *Journal of Biological Chemistry*, 289(3), pp. 1402–1414.
- Ravindran, M. S. et al. (2015)** A Non-enveloped Virus Hijacks Host Disaggregation Machinery to Translocate across the Endoplasmic Reticulum Membrane, *PLoS Pathogens*. Edited by J. T. Schiller, 11(8), p. e1005086.
- Regenmortel, V. et al. (1999)** *ICTV 7<sup>th</sup> Report*. Available at: <https://talk.ictvonline.org/ICTV/proposals/ICTV7th>
- Rowe, W. P. (1961)** The epidemiology of mouse polyoma virus infection., *Bacteriological reviews*. American Society for Microbiology (ASM), 25(1), pp. 18–31.
- Salunke, D. M., Caspar, D. L. and Garcea, R. L. (1986)** Self-assembly of purified polyomavirus capsid protein VP1., *Cell*, 46(6), pp. 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(5), pp. 887–900.
- Sasnauskas, K. et al. (1999)** Yeast Cells Allow High-Level Expression and Formation of Polyomavirus-Like Particles, *Biological Chemistry*, 380(3), pp. 381–6.

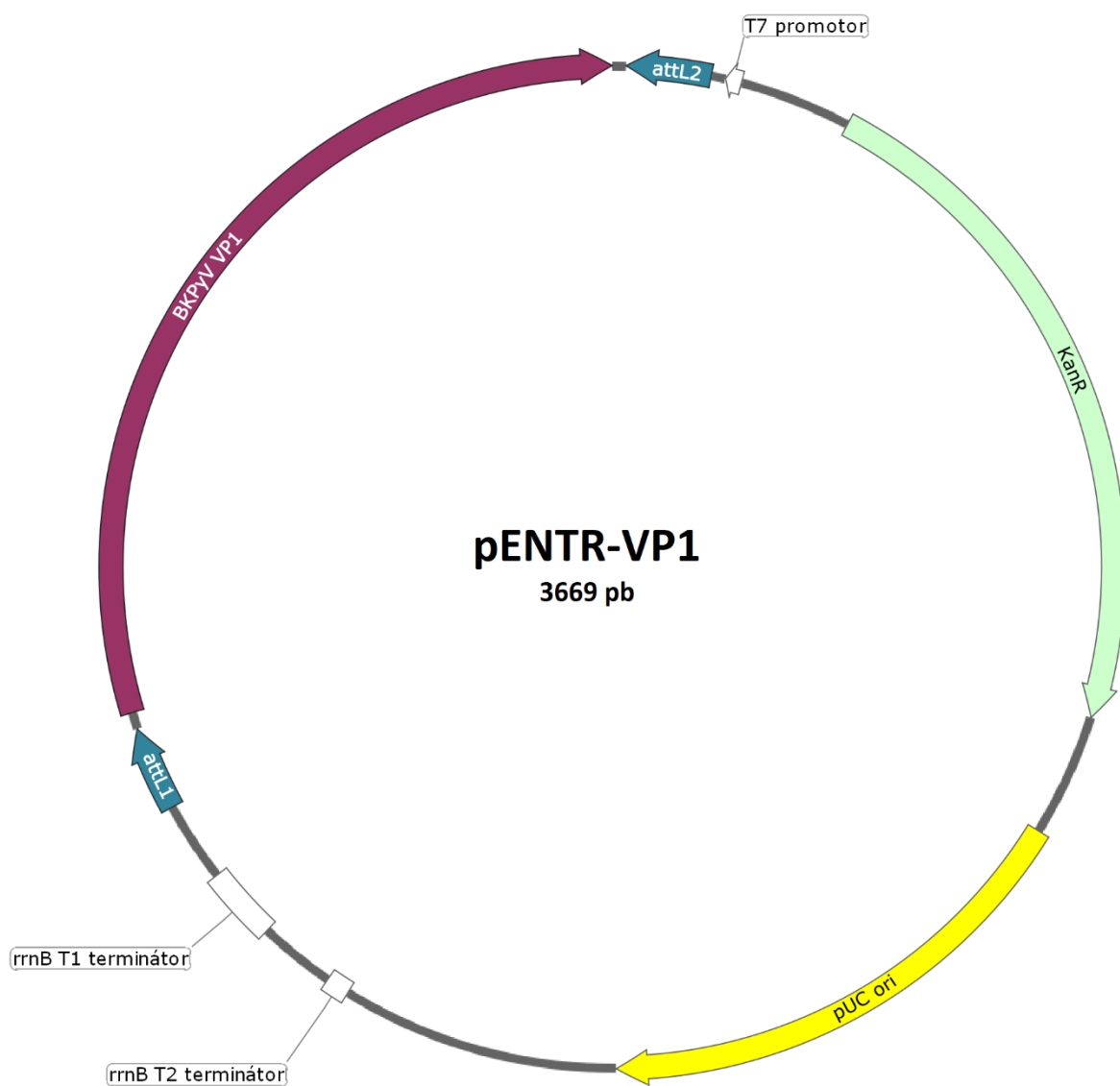
- \*Schopf, F. H., Biebl, M. M. and Buchner, J. (2017)** The HSP90 chaperone machinery, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(6), pp. 345–360.
- Schowalter, R. M. et al. (2010)** Merkel Cell Polyomavirus and Two Previously Unknown Polyomaviruses Are Chronically Shed from Human Skin, *Cell Host & Microbe*, 7(6), pp. 509–515.
- Schowalter, R. M., Pastrana, D. V and Buck, C. B. (2011)** Glycosaminoglycans and sialylated glycans sequentially facilitate Merkel cell polyomavirus infectious entry., *PLoS pathogens*. Public Library of Science, 7(7), p. e1002161.
- Schwarz, E. et al. (1988)** The sodium ion translocating oxalacetate decarboxylase of *Klebsiella pneumoniae*. Sequence of the biotin-containing alpha-subunit and relationship to other biotin-containing enzymes., *The Journal of biological chemistry*, 263(20), pp. 9640–5.
- Scuda, N. et al. (2011)** A Novel Human Polyomavirus Closely Related to the African Green Monkey-Derived Lymphotropic Polyomavirus, *Journal of Virology*, 85(9), pp. 4586–4590.
- Seo, S. et al. (2010)** BBS6, BBS10, and BBS12 form a complex with CCT/TRiC family chaperonins and mediate BBSome assembly, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(4), pp. 1488–1493.
- Shan, Y. and Cortopassi, G. (2016)** Mitochondrial Hspa9/Mortalin regulates erythroid differentiation via iron-sulfur cluster assembly, *Mitochondrion*, 26, pp. 94–103.
- Shinohara, T. et al. (1993)** BK virus infection of the human urinary tract., *Journal of medical virology*, 41(4), pp. 301–5.
- Shivakumar, C. V and Das, G. C. (1996)** Interaction of human polyomavirus BK with the tumor-suppressor protein p53., *Oncogene*, 13(2), pp. 323–32.
- Siebrasse, E. A. et al. (2012)** Identification of MW Polyomavirus, a Novel Polyomavirus in Human Stool, *Journal of Virology*, 86(19), pp. 10321–10326.
- Sinibaldi, L. et al. (1987)** Inhibition of BK Virus Haemagglutination by Gangliosides, *Journal of General Virology*, 68(3), pp. 879–883.
- \*Skoczylas, C., Fahrbach, K. M. and Rundell, K. (2004)** Cellular targets of the SV40 small-t antigen in human cell transformation., *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 3(5), pp. 606–10.
- Soldatova, I. et al. (2018)** Interaction of the Mouse Polyomavirus Capsid Proteins with Importins Is Required for Efficient Import of Viral DNA into the Cell Nucleus, *Viruses*, 10(4), p. 165.
- Sonnino, S. et al. (2007)** Gangliosides as components of lipid membrane domains, *Glycobiology*, 17(1), p. 1R–13R.
- Stahl, H., Dröge, P. and Knippers, R. (1986)** DNA helicase activity of SV40 large tumor antigen., *The EMBO journal*. European Molecular Biology Organization, 5(8), pp. 1939–44.
- Stehle, T. et al. (1996)** The structure of simian virus 40 refined at 3.1 Å resolution., *Structure (London, England : 1993)*, 4(2), pp. 165–82.
- Stehle, T. and Harrison, S. C. (1996)** Crystal structures of murine polyomavirus in complex with straight-chain and branched-chain sialyloligosaccharide receptor fragments., *Structure (London, England : 1993)*, 4(2), pp. 183–94.
- Stewart, S., Eddy, B. and Borgese, N. (1958)** Neoplasms in mice inoculated with a tumor agent carried in tissue culture., *Journal of the National Cancer Institute*, 20(6), pp. 1223–43.
- Su, W. et al. (1995)** Association of Polyomavirus middle tumor antigen with phospholipase C-gamma 1., *The Journal of biological chemistry*, 270(21), pp. 12331–4.

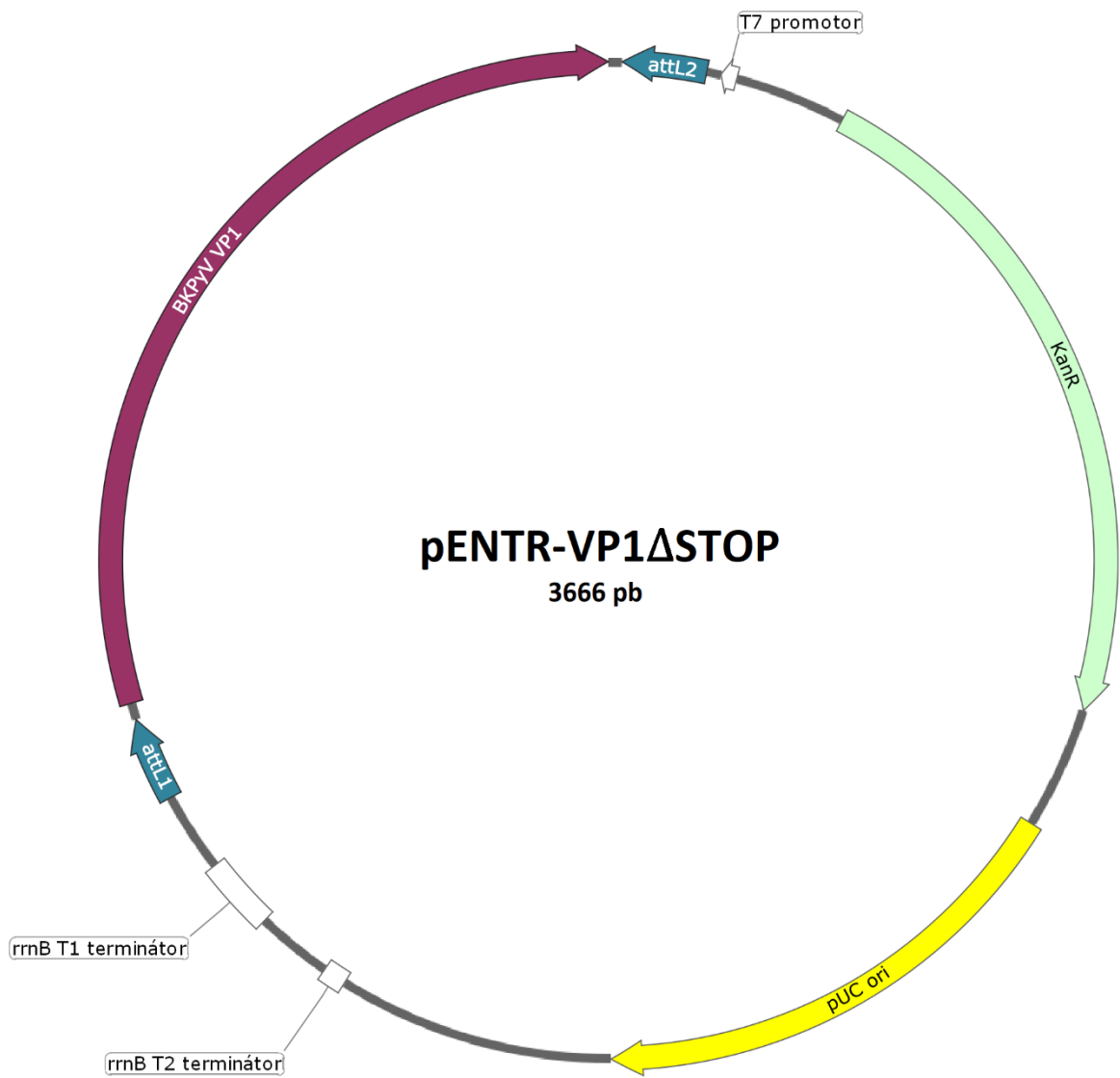
- Sullivan, C. S. et al. (2005)** SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells, *Nature*, 435(7042), pp. 682–686.
- Sullivan, C. S. et al. (2009)** Murine Polyomavirus encodes a microRNA that cleaves early RNA transcripts but is not essential for experimental infection., *Virology*. NIH Public Access, 387(1), pp. 157–67.
- Sunden, Y. et al. (2007)** DDX1 promotes proliferation of the JC virus through transactivation of its promoter., *Microbiology and immunology*, 51(3), pp. 339–47.
- Sung, C. K. et al. (2014)** A mouse polyomavirus-encoded microRNA targets the cellular apoptosis pathway through Smad2 inhibition., *Virology*. NIH Public Access, 468–470, pp. 57–62.
- Sweet, B. and Hilleman, M. (1960)** The vacuolating virus, S.V. 40., *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.), 105, pp. 420–7.
- Tenen, D. G. et al. (1983)** Binding of simian virus 40 large T antigen from virus-infected monkey cells to wild-type and mutant viral replication origins., *Journal of molecular biology*, 168(4), pp. 791–808.
- Terada, K. and Mori, M. (2000)** Human DnaJ Homologs dj2 and dj3, and bag-1 Are Positive Cochaperones of hsc70, *Journal of Biological Chemistry*, 275(32), pp. 24728–24734.
- \*Teunissen, E. A., de Raad, M. and Mastrobattista, E. (2013)** Production and biomedical applications of virus-like particles derived from polyomaviruses, *Journal of Controlled Release*, 172(1), pp. 305–321.
- Varshavsky, A. J. et al. (1976)** Minichromosome of simian virus 40: presence of histone H1., *Nucleic acids research*. Oxford University Press, 3(8), pp. 2101–13.
- Walczak, C. P. et al. (2014)** A Cytosolic Chaperone Complexes with Dynamic Membrane J-Proteins and Mobilizes a Nonenveloped Virus out of the Endoplasmic Reticulum, *PLoS Pathogens*. Edited by C. B. Buck, 10(3), p. e1004007.
- \*White, M. K., Safak, M. and Khalili, K. (2009)** Regulation of gene expression in primate polyomaviruses., *Journal of virology*, 83(21), pp. 10846–10856.
- Xu, Z. et al. (2017)** Microtubules acquire resistance from mechanical breakage through intraluminal acetylation, *Science*, 356(6335), pp. 328–332.
- Yang, S. I. et al. (1991)** Control of protein phosphatase 2A by simian virus 40 small-t antigen., *Molecular and cellular biology*. American Society for Microbiology (ASM), 11(4), pp. 1988–95.
- Yogo, Y. et al. (2009)** Evolution of the BK polyomavirus: epidemiological, anthropological and clinical implications, *Reviews in Medical Virology*, 19(4), pp. 185–199.
- \*Yogo, Y. and Sugimoto, C. (2001)** The archetype concept and regulatory region rearrangement, *Human Polyomaviruses: Molecular and Clinical Perspectives*, 7, pp. 127–148.
- Zalvide, J. and DeCaprio, J. A. (1995)** Role of pRb-related proteins in simian virus 40 large-T-antigen-mediated transformation., *Molecular and cellular biology*, 15(10), pp. 5800–10.
- Zhao, L. et al. (2016)** Caveolin- and clathrin-independent entry of BKPyV into primary human proximal tubule epithelial cells, *Virology*, 492, pp. 66–72.
- Zhao, L. and Imperiale, M. J. (2017)** Identification of Rab18 as an Essential Host Factor for BK Polyomavirus Infection Using a Whole-Genome RNA Interference Screen., *mSphere*. American Society for Microbiology (ASM), 2(4).

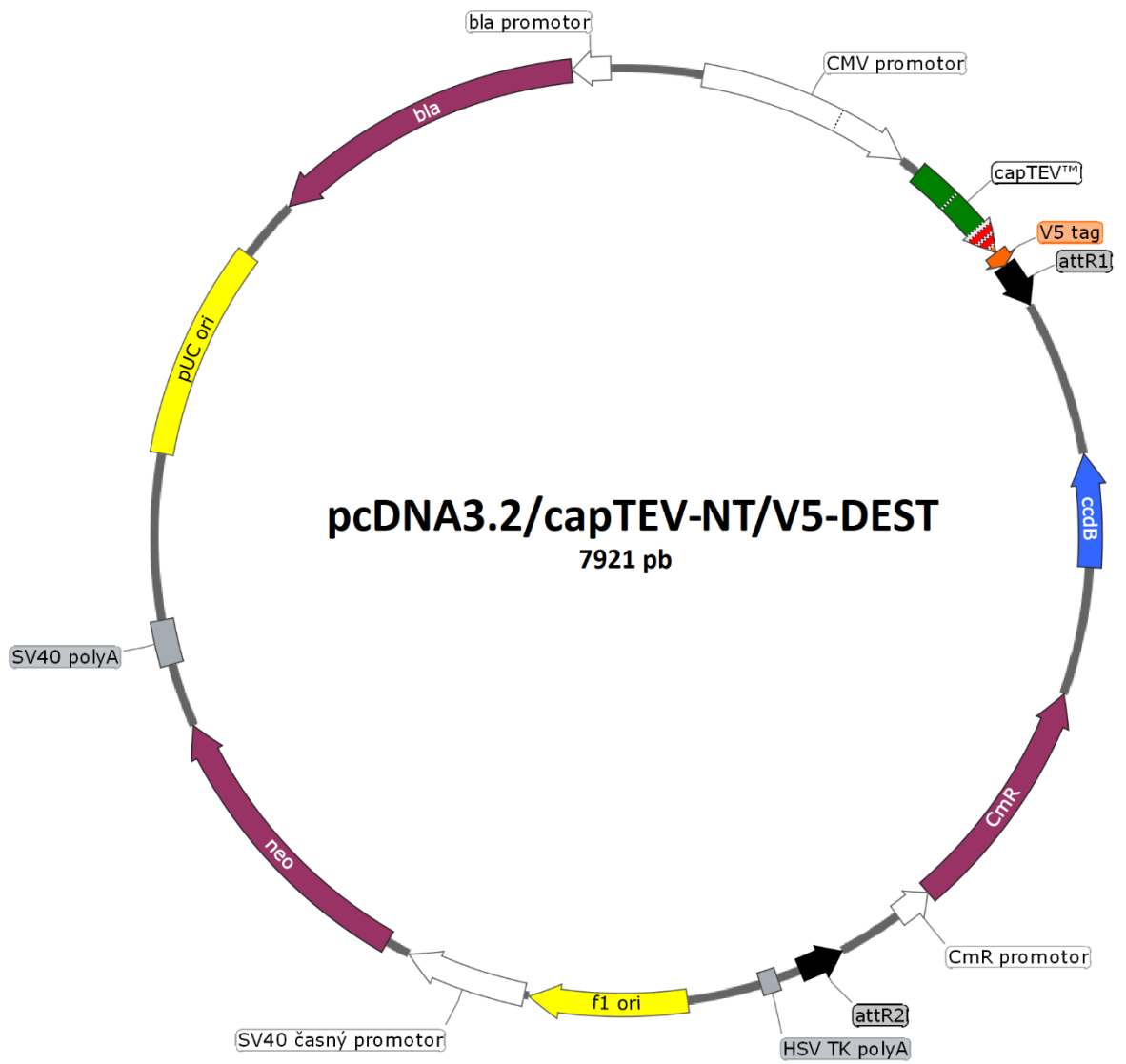
## **9. PŘÍLOHY**

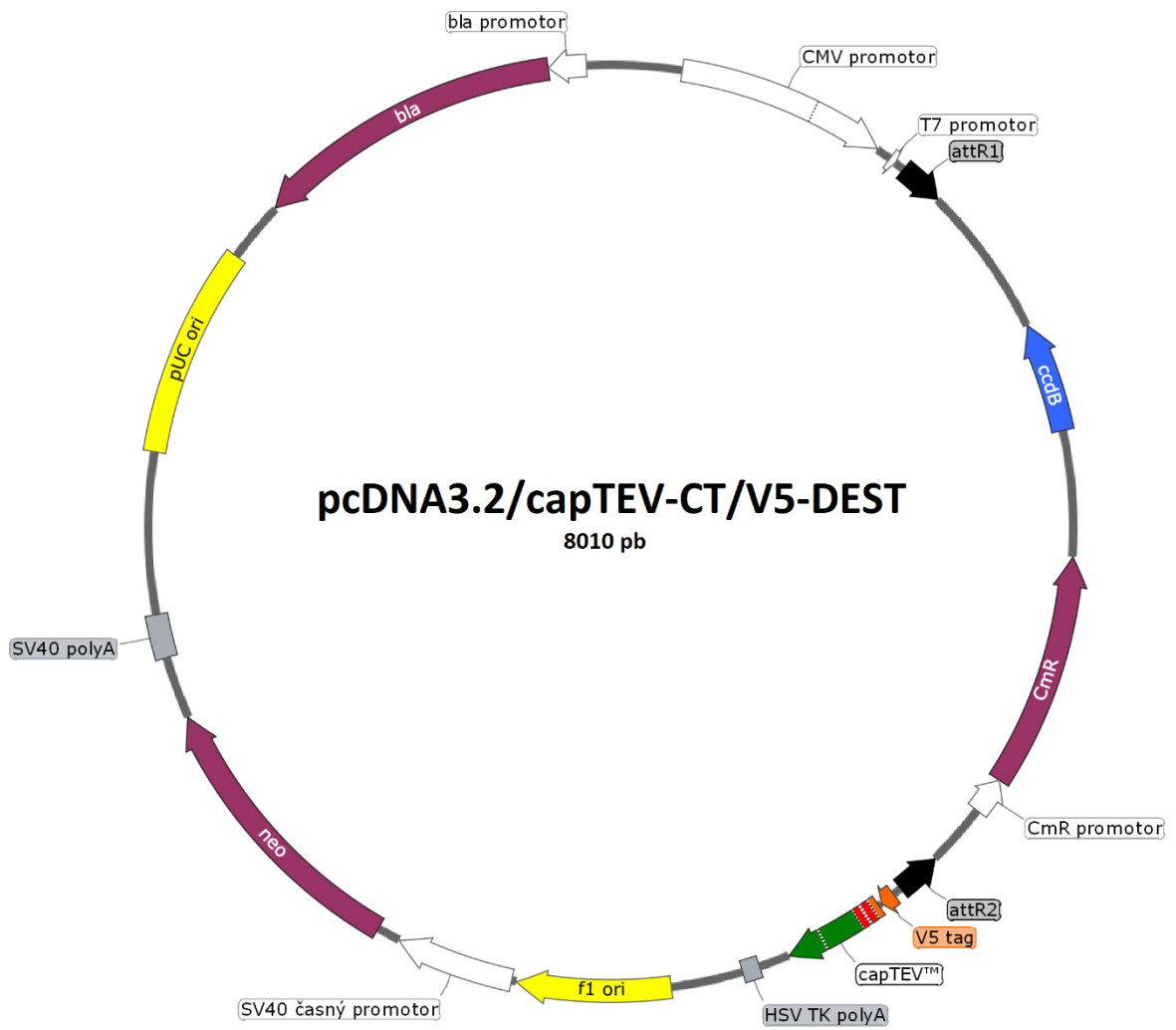
## 9.1 MAPY POUŽITÝCH PLAZMIDŮ

(Připravena v programu SnapGene, <http://www.snapgene.com>)

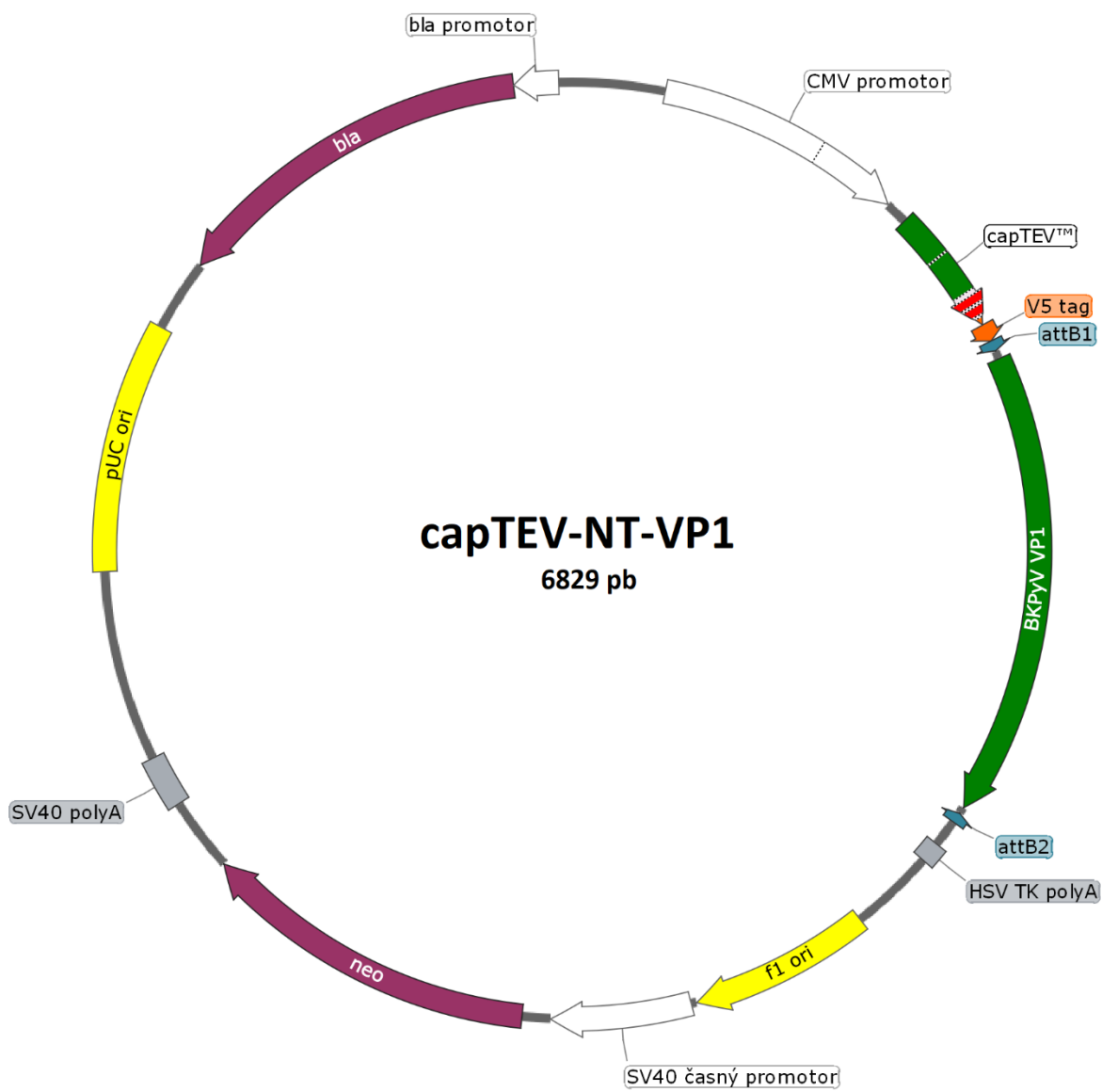


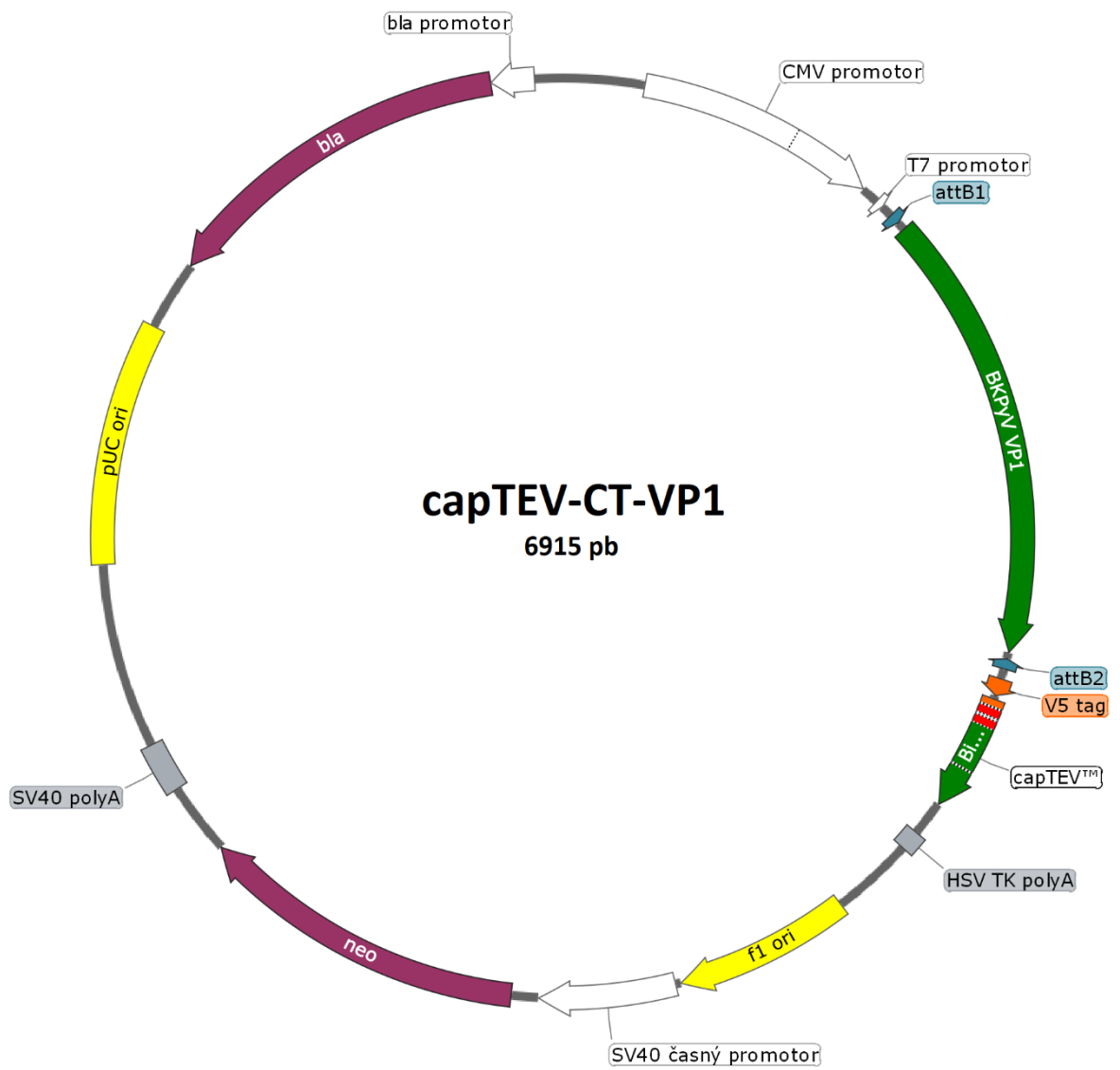


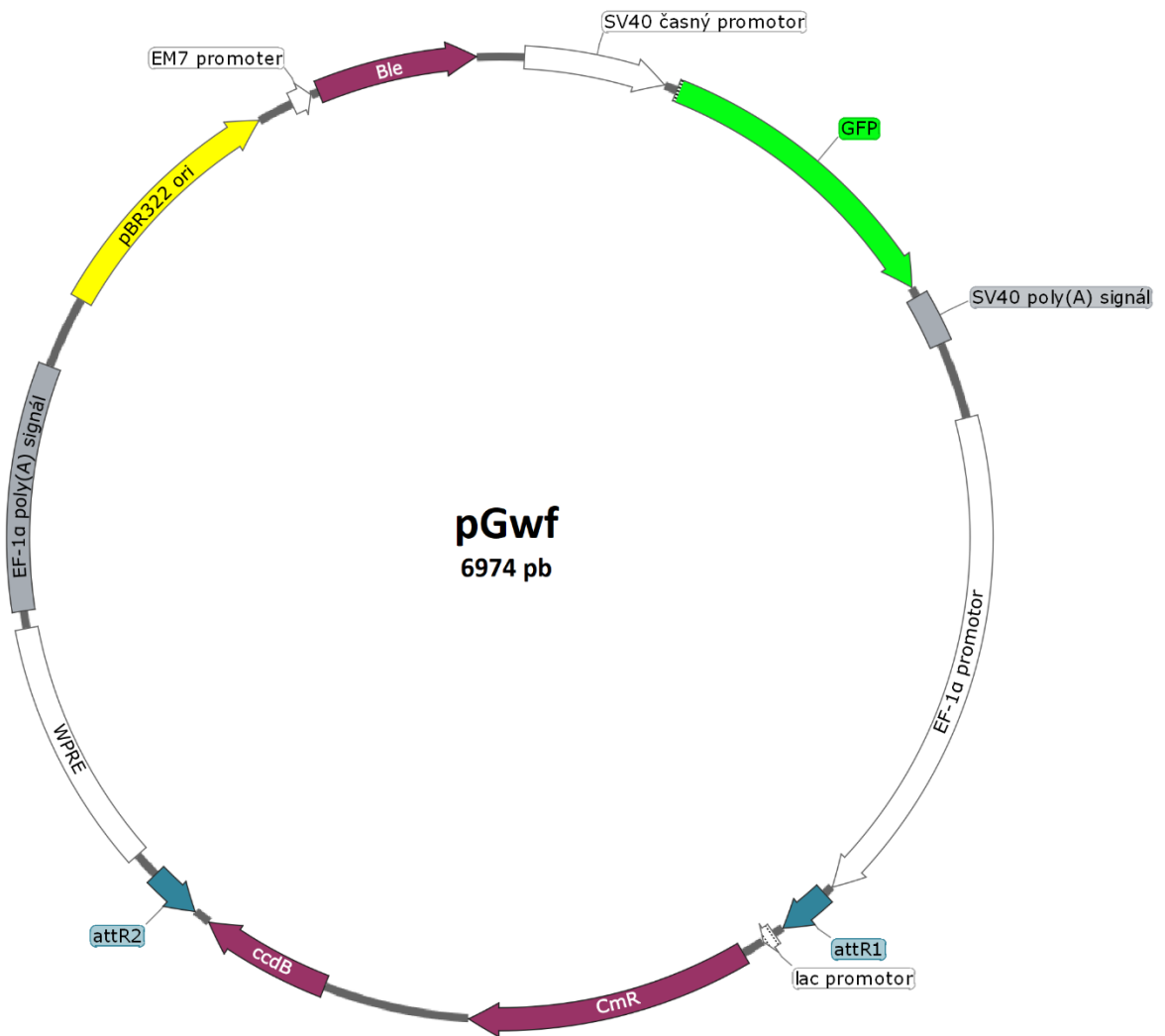


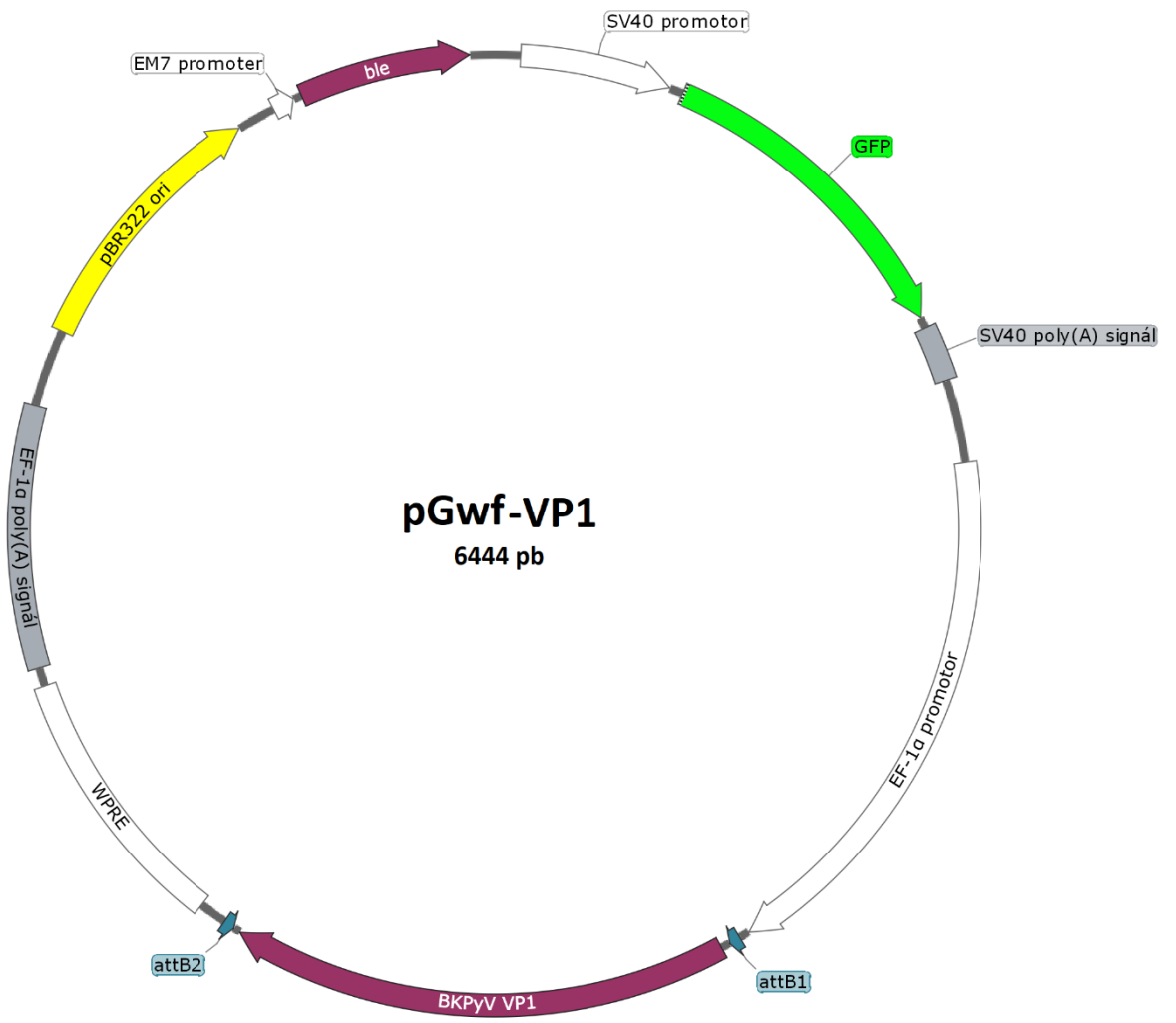












## 9.2 SEZNAM POTENCIÁLNÍCH INTERAKČNÍCH PARTNERŮ PROTEINU VP1 POLYOMAVIRU BK

ID V DATABÁZI UNIProt	NÁZEV GENU	NÁZEV PROTEINU V DATABÁZI UNIProt
P30566	ADSL	Adenylosuccinate lyase
Q09666	AHNAK	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK
P84077	ARF1	ADP-ribosylation factor 1
P18085	ARF4	ADP-ribosylation factor 4
O95816	BAG2	BAG family molecular chaperone regulator 2
O43684	BUB3	Mitotic checkpoint protein BUB3
Q13895	BYSL	Bystin
Q86VP6	CAND1	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1
Q8IX12	CCAR1	Cell division cycle and apoptosis regulator protein 1
P50991	CCT4	T-complex protein 1 subunit delta
P53621	COPA	Coatomer subunit alpha
P55060	CSE1L	Exportin-2
P07858	CTSB	Cathepsin B
P14868	DARS	Aspartate-tRNA ligase
Q92841	DDX17	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17
Q9NR30	DDX21	Nucleolar RNA helicase 2
O00148	DDX39A	ATP-dependent RNA helicase DDX39A
O00571	DDX3X	ATP-dependent RNA helicase DDX3X
P17844	DDX5	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5
O43143	DHX15	Pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15
Q08211	DHX9	ATP-dependent RNA helicase A
P31689	DNAJA1	DnaJ homolog subfamily A member 1
Q9Y295	DRG1	Developmentally-regulated GTP-binding protein 1
Q9Y6G9	DYNC1LI1	Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 1
P63167	DYNLL1	Dynein light chain 1
Q14152	EIF3A	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A
Q99613	EIF3C	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C

P60228	EIF3E	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E
O75821	EIF3G	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G
Q13347	EIF3I	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I
P38919	EIF4A3	Eukaryotic initiation factor 4A-III
P07814	EPRS	Bifunctional glutamate/proline-tRNA ligase
P39748	FEN1	Flap endonuclease 1
P17900	GM2A	Ganglioside GM2 activator
P63244	GNB2L1	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1
P78347	GTF2I	General transcription factor II-I
Q92769	HDAC2	Histone deacetylase 2
Q99878	HIST1H2AJ	Histone H2A type 1-J
P09651	HNRNPA1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1
P22626	HNRNPA2B1	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1
P07910	HNRNPC	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2
Q14103	HNRNPD	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0
P61978	HNRNPK	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K
P14866	HNRNPL	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L
P52272	HNRNPM	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M
Q00839	HNRNPU	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U
P00738	HP	Haptoglobin
P38646	HSPA9	Stress-70 protein, mitochondrial
P41252	IARS	Isoleucine-tRNA ligase
P50213	IDH3A	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha
O00410	IPO5	Importin-5
O95373	IPO7	Importin-7
P46940	IQGAP1	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1
Q92945	KHSRP	Far upstream element-binding protein 2
P33176	KIF5B	Kinesin-1 heavy chain
P52292	KPNA2	Importin subunit alpha-1
O00505	KPNA3	Importin subunit alpha-4
P11279	LAMP1	Lysosome-associated membrane glycoprotein 1
P02545	LMNA	Lamin-A/C
P42704	LRPPRC	Leucine-rich PPR motif-containing protein
O95232	LUC7L3	Luc7-like protein 3

P56192	MARS	Methionine-tRNA ligase
P43243	MATR3	Matrin-3
P25205	MCM3	DNA replication licensing factor MCM3
P33992	MCM5	DNA replication licensing factor MCM5
Q9UJ70	NAGK	N-acetyl-D-glucosamine kinase
P43490	NAMPT	Nicotinamide phosphoribosyltransferase
P07196	NEFL	Neurofilament light polypeptide
P07197	NEFM	Neurofilament medium polypeptide
Q15233	NONO	Non-POU domain-containing octamer-binding protein
Q9Y2X3	NOP58	Nucleolar protein 58
Q9UUK9	NUDT5	ADP-sugar pyrophosphatase
Q8N1F7	NUP93	Nuclear pore complex protein Nup93
P09874	PARP1	Poly [ADP-ribose] polymerase 1
P12004	PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
P00558	PGK1	Phosphoglycerate kinase 1
Q9GZP4	PITHD1	PITH domain-containing protein 1
Q13162	PRDX4	Peroxiredoxin-4
P30041	PRDX6	Peroxiredoxin-6
P25789	PSMA4	Proteasome subunit alpha type-4
P62195	PSMC5	26S protease regulatory subunit 8
P62333	PSMC6	26S protease regulatory subunit 10B
O00232	PSMD12	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12
Q9UNM6	PSMD13	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13
Q13200	PSMD2	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2
O43242	PSMD3	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3
P26599	PTBP1	Polypyrimidine tract-binding protein 1
P47897	QARS	Glutamine-tRNA ligase
P54136	RARS	Arginine--tRNA ligase, cytoplasmic
Q9P258	RCC2	Protein RCC2
P13489	RNH1	Ribonuclease inhibitor
P27635	RPL10	60S ribosomal protein L10
P62913	RPL11	60S ribosomal protein L11
P30050	RPL12	60S ribosomal protein L12
P61313	RPL15	60S ribosomal protein L15

Q02543	RPL18A	60S ribosomal protein L18a
P62829	RPL23	60S ribosomal protein L23
P62750	RPL23A	60S ribosomal protein L23a
P62424	RPL7A	60S ribosomal protein L7a
P05386	RPLP1	60S acidic ribosomal protein P1
P25398	RPS12	40S ribosomal protein S12
P62263	RPS14	40S ribosomal protein S14
P08708	RPS17	40S ribosomal protein S17
P15880	RPS2	40S ribosomal protein S2
P60866	RPS20	40S ribosomal protein S20
P62847	RPS24	40S ribosomal protein S24
P62753	RPS6	40S ribosomal protein S6
P46781	RPS9	40S ribosomal protein S9
P08865	RPSA	40S ribosomal protein SA
Q8NEX9	SDR9C7	Short-chain dehydrogenase/reductase family 9C member 7
P31947	SFN	14-3-3 protein sigma
Q16637	SMN1	Survival motor neuron protein
P08621	SNRNP70	U1 small nuclear ribonucleoprotein 70 kDa
P62316	SNRPD2	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2
P63162	SNRPN	Small nuclear ribonucleoprotein-associated protein N
Q9UBC9	SPRR3	Small proline-rich protein 3
Q9UHB9	SRP68	Signal recognition particle subunit SRP68
P78362	SRPK2	SRSF protein kinase 2
Q15645	TRIP13	Pachytene checkpoint protein 2 homolog
Q2NL82	TSR1	Pre-rRNA-processing protein TSR1 homolog
Q9BUF5	TUBB6	Tubulin beta-6 chain
P26368	U2AF2	Splicing factor U2AF 65 kDa subunit
O60763	USO1	General vesicular transport factor p115
P45880	VDAC2	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2
P08670	VIM	Vimentin
O14980	XPO1	Exportin-1
P61981	YWHAG	14-3-3 protein gamma
P27348	YWHAQ	14-3-3 protein theta



