

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

# **Univerzita Karlova v Praze**

## **Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



**Bc. Tomáš Hron**

**Vývoj experimentálního systému založeného na Cre/loxP rekombinaci pro produkci polyomavirových mutant**

**Development of the experimental system based on Cre/loxP recombination for polyomavirus mutant production**

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Hana Španielová, PhD.

Praha, 2013

**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, 10. 8. 2013

Tomáš Hron

Tato práce byla vypracována v letech 2011-2013 s finanční podporou Grantové agentury České republiky GAČR č. P302-10-P118, projektu Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky MSM0021620858, SVV-2013267205, Grantové agentury Univerzity Karlovy GAUK č. 913613 a UNCE 204013/2013.

Rád bych poděkoval Haně Španielové, která mi byla milou a ochotnou školitelkou. Její rady a schopnost probudit v lidech vědecké nadšení byly pro mou práci neocenitelným přínosem. Dále jsem velmi vděčný Doc. Jitce Forstové za vřelé přijetí do laboratoře a ochotné jednání. Děkuji také Jiřině Suchanové, jež mi byla výtečným sousedem u pracovního stolu; Martinovi Fraiberkovi, Jakubovi Cibulkovi a Borisovi Ryabchenkovi za poučné vědecké diskuze; Vlastě Sakařové a Ivaně Polívkové za vřelou ochotu a pomoc. Díky patří samozřejmě i zbylému kolektivu za četné rady, pomoc a přátelskou atmosféru v laboratoři.

## Abstrakt

Myší polyomavirus je významným zástupcem čeledi *Polyomaviridae* s potenciálním využitím v genové terapii a imunoterapii. Práce s virovými mutantami je důležitou součástí jeho studia, ale současné metody jejich produkce jsou pracné a poskytují nízký výtěžek. Tato práce se zabývá vývojem nového experimentálního systému, který umožňuje pomocí Cre/loxP rekombinace generovat intaktní polyomavirový genom z rekombinantního plazmidu *in vivo*. Během rekombinace dochází k nevyhnutelnému vložení jednoho loxP místa do vzniknuvšího virového genomu. Byly připraveny dvě varianty produkčních plazmidů, které vytvářejí virový genom divokého typu s loxP místem vloženým mezi poly(A) signální sekvence časných a pozdních genů, nebo v intronové oblasti časných genů. Inzerce loxP místa mezi poly(A) signální sekvence měla dramatický dopad na expresi virových genů a vedla k úplné ztrátě infekivity viru. Naopak, substituce loxP místa v intronové oblasti časných genů produkci infekčního viru umožnila. Pro zajištění exprese Cre rekombinázy jsem také vytvořil stabilně transfekované buněčné linie, které mohou přípravu viru zjednodušit. Tato práce ukazuje, že nově navržený systém poskytuje uspokojivý výtěžek viru, řeší omezení vyskytující se u běžně používaných metod a může být využit pro produkci málo infekčních virových mutantů.

**Klíčová slova:** myší polyomavirus, MPyV, Cre rekombináza, loxP, produkce viru, inducibilní exprese, modifikace virového genomu

## Abstract

Murine polyomavirus is an important member of *Polyomaviridae* family offering potential applications in gene therapy and immunotherapy. Viral mutant analysis is crucial for study of the virus, however, commonly used methods of its production are laborious and give low yields. This thesis involves development of the new experimental system that can produce intact viral genome from recombinant plasmid *in vivo* using Cre/loxP-mediated recombination. One loxP site is unavoidably introduced into newly generated viral genome during recombination. Two variants of production plasmids generating wild type viral genome with incorporation of loxP between the poly(A) signal sites of early and late genes or into the intronic region of early genes were prepared. LoxP insertion between the poly(A) signal sites has a dramatic effect on viral gene expression and leads to complete loss of virus infectivity. Conversely, the infectious virus was obtained from the viral genome containing loxP site in the early intronic region. To ensure expression of Cre recombinase I also prepared stably transfected cell lines which can simplify the virus production. This thesis shows that newly designed system gives satisfactory yield of the virus, solves restrictions connected with commonly used methods and can be used for low infectious viral mutant production.

**Key words:** Murine polyomavirus, MPyV, Cre recombinase, loxP, virus production, inducible expression, viral genome modification

# Obsah

1. Úvod.....	9
2. Cíle práce .....	10
3. Přehled literatury.....	11
3.1 Myší polyomavirus.....	11
3.1.1 Organizace virového genomu.....	11
3.1.2 Časná a pozdní fáze virové infekce .....	12
3.1.3 Metody produkce viru .....	13
3.2 Cre/loxP rekombinační systém a jeho využití.....	14
3.2.1 Cre rekombináza bakteriofága P1 .....	14
3.2.2 Obecné vlastnosti Cre/loxP systému .....	16
3.2.3 Podmíněná Cre rekombinace.....	17
3.2.4 Cre/loxP systém ve virologii .....	19
3.3 Další místně specifické rekombinační systémy .....	22
3.3.1 Rekombinázy tyrozinového typu.....	23
3.3.2 Rekombinázy serinového typu .....	23
4. Materiál a metody .....	25
4.1 Materiál .....	25
4.1.1 Buněčné linie, bakteriální kmeny a viry.....	25
4.1.2 Vektory .....	25
4.1.3 Protilátky a fluorescenční barviva .....	26
4.1.4 Markery molekulových hmotností .....	26
4.1.5 DNA oligonukleotidy .....	28
4.1.6 Použité chemikálie.....	29
4.1.7 Nejčastěji používané roztoky a média.....	30
4.2 Metody .....	31
4.2.1 Sterilizace nádobí a náčiní.....	31
4.2.2 Práce s buněčnými kulturami .....	31
4.2.3 Příprava linie se stabilní expresí transgenů .....	32
4.2.4 Transfekce cizorodé DNA.....	32
4.2.5 Infekce savčích buněk .....	33
4.2.6 Plaková zkouška .....	33
4.2.7 Imunofluorescenční analýza.....	34
4.2.8 SDS-PAGE a western blot.....	35

4.2.9 Práce s DNA .....	36
4.2.10 Práce s bakteriálními kulturami .....	40
5. Výsledky .....	41
5.1 Příprava Cre/loxP systému pro produkci MPyV .....	41
5.1.1 Navržení produkčních plazmidů pBS-PyI a pBS-PyA .....	41
5.1.2 Konstrukce plazmidů pBS-PyI a pBS-PyA .....	43
5.2 Ověření účinnosti Cre/loxP systému pro produkci MPyV .....	45
5.2.1 Příprava virového genomu pomocí <i>in vitro</i> religace .....	45
5.2.2 Transfekce pBS-Py-I/A do buněk a analýza exprese virových proteinů .....	47
5.2.3 Produkce viru pomocí Cre/loxP systému .....	51
5.3 Další charakterizace systému pro produkci MPyV .....	52
5.4 Využití buněčné linie se stabilní expresí Cre rekombinázy pro produkci MPyV .....	56
5.4.1 Konstrukce vektoru exprimujícího Cre rekombinázu .....	56
5.4.2 Selektce stabilně transfekované buněčné linie s inducibilní expresí Cre rekombinázy .....	57
5.4.3 Ověření účinnosti produkce viru v buňkách se stabilní expresí Cre rekombinázy .....	58
6. Diskuze .....	61
6.1 Produkce MPyV pomocí Cre/loxP rekombinace .....	61
6.2 Využití stabilně transfekovaných buněk s expresí Cre rekombinázy .....	63
6.3 Genetické manipulace genomu MPyV .....	65
6.4 Využití navrženého systému pro produkci MPyV v praxi .....	66
7. Souhrn .....	67
8. Seznam použité literatury .....	68
Příloha .....	73



## Seznam zkratek

<b>PAS</b>	polyadenylační signál
<b>APS</b>	amonium persulfate (persulfát amonný)
<b>ASFV</b>	African Swine Fever Virus (prasečí virus africké horečky)
<b>bp</b>	base pair (pár bází)
<b>BSA</b>	bovine serum albumine (bovinní sérový albumin)
<b>DAPI</b>	4',6'-diamino-2-phenylindole (fluorescenční barvivo)
<b>DMEM</b>	Dullecco's Modified Eagle's Medium (médium pro tkáňové kultury)
<b>DMSO</b>	dimethyl sulfoxid
<b>DTT</b>	dithiothreitol
<b>EDTA</b>	ethylendiamin tetraacetate (kyselina ethylendiamintetraoctová)
<b>FBS</b>	fetální bovinní sérum
<b>GAPDH</b>	glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenáza
<b>HPV</b>	Human Papillomavirus (lidský papilomavirus)
<b>IgG</b>	imunoglobulin typu G
<b>LT</b>	large tumorogenic antigen (velký tumorogenní antigen myšího polyomaviru)
<b>LTR</b>	long terminal repeats (dlouhé terminální repetice retrovirového genomu)
<b>MCPyV</b>	Merkel Cell Polyomavirus (virus karcinomu Merkelových buněk)
<b>MPyV</b>	Murine Polyomavirus (myší polyomavirus)
<b>MT</b>	middle tumorogenic antigen (střední tumorogenní antigen myšího polyomaviru)
<b>nt</b>	nukleotid/y
<b>PBS</b>	phosphate-buffered saline (fosfátový pufr)
<b>pBS-PyA</b>	produkční plazmid obsahující genom myšího polyomaviru rozdělený mezi poly(A) sekvencemi
<b>pBS-PyI</b>	produkční plazmid obsahující genom myšího polyomaviru rozdělený v intronu časných genů

<b>PEG</b>	polyethylen glykol
<b>PMSF</b>	fenylmethylsulfonylfluorid
<b>Ptet</b>	tetracyklinový promotor
<b>Py-A</b>	virový genom s loxP místem mezi poly(A) sekvencemi připravený <i>in vitro</i>
<b>Py-I</b>	virový genom s loxP místem v intronu časných genů připravený <i>in vitro</i>
<b>Py-wt</b>	virový genom divokého typu připravený <i>in vitro</i>
<b>rpm</b>	rotation <b>p</b> er <b>m</b> inutes (otáčky za minutu – jednotky úhlové rychlosti)
<b>rtAT</b>	reverse tetracycline-controlled <b>t</b> ransactivator <b>p</b> rotein (transkripční aktivátor využívaný v tet-on systému regulace genové exprese)
<b>SDS</b>	sodium <b>d</b> odecylsulphate (dodecylsírán sodný)
<b>ST</b>	small <b>t</b> umorogenic antigen (malý tumorogenní antigen myšního polyomaviru)
<b>tAT</b>	tetracycline-controlled <b>t</b> ransactivator protein (transkripční aktivátor využívaný v tet-off systému regulace genové exprese)
<b>TEMED</b>	tetramethylethylendiain
<b>tet</b>	tetracyklin
<b>VP1</b>	viral <b>p</b> rotein <b>1</b> (majoritní kapsidový protein myšního polyomaviru VP1)
<b>VP2</b>	viral <b>p</b> rotein <b>2</b> (minoritní kapsidový protein myšního polyomaviru VP2)
<b>VP3</b>	viral <b>p</b> rotein <b>3</b> (minoritní kapsidový protein myšního polyomaviru VP3)

# 1. Úvod

Studium virů v dnešní době napomáhá nejen hlubšímu pochopení jejich životního cyklu a interakcí s hostitelem, ale vede také k rozvoji jejich terapeutického využití. Myší polyomavirus je významným zástupcem své čeledě a původně byl zkoumán především pro své tumorogenní schopnosti. Studium tohoto viru vedlo k odhalení funkce jeho genů a také pomohlo objasnit řadu buněčných mechanismů. Již v minulosti se také ukázalo, že je vhodným kandidátem pro potenciální využití v genové terapii, imunoterapii a biomedicíně.

Pro výzkum myšího polyomaviru a vývoj jeho terapeutických uplatnění je klíčová příprava a následná produkce virových mutant. Při mutagenezi je virus zpravidla zaklonován do bakteriálního plazmidu. Pro jeho následnou produkci je tedy zapotřebí virový genom z plazmidu izolovat a transfekovat do permissivní buněčné linie, kde dojde k produktivní infekci a tvorbě virového potomstva. Takto produkovaný virus lze poté využít pro studium jeho fenotypu či pro jiné účely.

Současná metoda přípravy virového genomu, používaná i v naší laboratoři, však skýtá řadu omezení. Nejprve je třeba virovou DNA vyštěpit z nosičového plazmidu pomocí restričních endonukleáz. Restriční směs je dále výrazně naředěna, což při následné ligační reakci upřednostní intramolekulární spojení virového genomu. I přesto částečně dochází k ligaci mezi jednotlivými molekulami DNA a tvorbě konkatemerů virového genomu či jeho opětovnému uzavření do nosičového plazmidu. To snižuje výtěžek intaktního virového genomu a omezuje reproducibilitu preparace. Přítomnost znečištění ve formě vedlejších produktů ligace představuje také značný problém pro následnou transfekci ligační směsi do buněk.

V důsledku výše zmíněných faktů je tato metoda pro některé aplikace (např. produkce málo infekčních mutant) nevhodná a je třeba pátrat po nových přístupech.

Pro překonání problémů s produkcí a propagací viru v buněčné kultuře byl u lidského papilomaviru vyvinut systém založený na Cre/loxP rekombinaci (Lee et al., 2004). S jeho pomocí je možné generovat intaktní virový genom z nosičového vektoru přímo v buňce pomocí rekombinace mezi loxP místy. Tento systém je potenciálně využitelný u všech dsDNA virů s kruhovým genomem a nabízí se pro řešení problémů s produkcí myšího polyomaviru a jeho málo životaschopných mutant.

V mé práci nabízím novou strategii produkce myšího polyomaviru, která je založena na Cre/loxP rekombinačním systému. Tento přístup skýtá alternativu k běžně používaným metodám přípravy viru a řeší některé jejich nedostatky.

## 2. Cíle práce

Cílem této práce bylo připravit experimentální systém založený na Cre/loxP rekombinaci, který by umožňoval produkci myšího polyomaviru a jeho mutant. Dále bylo třeba tento systém podrobně charakterizovat, srovnat s běžně používanou metodou produkce viru a zhodnotit jeho využití v praxi. Dílčí cíle byly následující:

- Navrhnout a připravit dvě varianty rekombinantních plazmidů využitelných k produkci myšího polyomaviru divokého typu.
- Ověřit, zda u produkovaného viru nedochází k narušení exprese virových proteinů či snížení jeho infekivity.
- Stanovit a porovnat výtěžek virové produkce pomocí běžné metody a nově navrženého systému.
- Připravit stabilně transfekovanou buněčnou linii exprimující Cre rekombinázu.
- Ověřit využití této buněčné linie pro produkci viru pomocí nově navrženého systému.

## 3. Přehled literatury

### 3.1 Myší polyomavirus

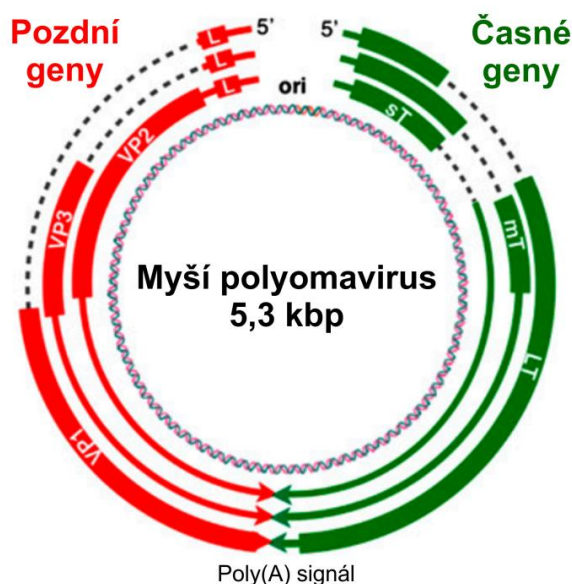
Myší polyomavirus (MPyV) patří do čeledě *Polyomaviridae*, rod *Polyomavirus* (ICTV – *International Committee on Taxonomy of Viruses*). Celá čeleď zahrnuje malé neobalené viry s ikosahedrální kapsidou o průměru 40-50 nm. Jejich genom tvoří kruhová dsDNA. Hostitelské spektrum polyomavirů zahrnuje ptáky, savce i člověka. Mezi významné lidské polyomaviry a oportunní patogeny patří například BK virus (Gardner et al., 1971) a JC virus (Padgett et al., 1971). Dalším, v současné době často diskutovaným, polyomavirem je virus karcinomu Merkelových buněk (MCPyV), který se pravděpodobně účastní vývoje kožních nádorů (Feng et al., 2008).

Myší polyomavirus, který byl objeven roku 1953 (Gross), je jedním z nejvíce prostudovaných virů této čeledě. Podobně jako ostatní zástupci polyomavirů je schopen nádorové transformace hostitelských buněk. V průběhu let se stal významným modelovým organismem a napomohl objevit řadu buněčných mechanismů. V současné době je studován především pro jeho možné využití v genové terapii (Krauzewicz a Griffin, 2000; shrnuto v Raniqvist et al., 2007) a imunoterapii (Eriksson et al., 2011; Hruskova et al., 2009). (Zhang et al., 2012)

#### 3.1.1 Organizace virového genomu

Genom myšího polyomaviru je tvořen kruhovou molekulou dsDNA o velikosti 5,3 kbp (**obr. 1**). Jeho organizace je značně komplexní. Virový replikační počátek (ori) je z obou stran obestřen regulačními oblastmi, které mimo jiné zahrnují promotorové sekvence takzvaných časných a pozdních genů.

Časné geny kódují virové regulační onkoproteiny: velký T antigen (LT), střední T antigen (MT) a malý T antigen (ST). Ty jsou transkribovány v časně fázi virové infekce ve formě společné pre-mRNA, která je dále sestřihána buněčným aparátem na konkrétní mRNA. Mechanismus, kterým jsou časné mRNA pomocí alternativního sestřihu produkovány, je poměrně neobvyklý. Sekvence časných genů obsahuje jeden intron pro každou ze tří mRNA. Introny pro MT a ST mRNA jsou nezvykle malé, činí pouze 62 a 48 nukleotidů (Huang a Carmichael, 2009). Také se ukazuje, že 3' sestřihová místa těchto mRNA spolu kooperují. Bodová mutace v MT sestřihovém místě vede k blokaci sestřihu jak MT, tak i ST mRNA *in vitro* (Ge et al., 1990). Všechny tři introny časných genů mají společný průnik, který tvoří 44 nukleotidů. Uvnitř tohoto úseku se nachází bod větvení (tzv. branch point - konzervovaný adenosin, nezbytný pro sestřih intronu) pro LT, ST i MT intron.



Obrázek 1. Schematické vyobrazení genomu myšího polyomaviru. Virový genom je tvořen kruhovou molekulou dsDNA. Ta obsahuje virový počátek replikace (ori) a dvě protisměrné transkripční jednotky, tzv. časné (vyznačeny červeně) a pozdní geny (vyznačeny zeleně). Časné geny kódují virové onkoproteiny LT, MT a ST. Pozdní oblast kóduje kapsidové proteiny VP1, VP2 a VP3. Převzato a upraveno (Gu et al., 2009).

Pozdní geny kódují majoritní protein VP1 a dva minoritní proteiny VP2 a VP3, které tvoří virovou kapsidu. Podobně jako u časných genů, pozdní oblast je přepisována do společné pre-mRNA, která je dále pomocí alternativního sestřihu upravena do konkrétní mRNA pro VP1, VP2 či VP3. Pre-mRNA produkovaná z pozdních genů má však, na rozdíl od časných transkriptů, nejednotnou délku (Treisman a Kamen, 1981), což je způsobeno neefektivní terminací transkripce a polyadenylace.

Virové transkripční jednotky časných a pozdních genů jsou protisměrně orientované a svým koncem obsahujícím polyadenylační signální (PAS) sekvence se překrývají (Gu et al., 2009). Otevřené čtecí rámce proteinů končí ještě před překrývajícím se úsekem. Oblast PAS sekvencí je tedy společně s regulační oblastí okolo ori a intronem časných genů jediné místo, které nekóduje žádný protein.

### 3.1.2 Časná a pozdní fáze virové infekce

Pro vstup do buňky využívá virus receptorem zprostředkovanou endocytózu. Jako receptor na buněčném povrchu slouží gangliosid (Tsai et al., 2003). Po internalizaci je virová DNA dopravena do jádra, kde dojde k okamžité produkci časných virových proteinů LT, MT a ST. LT antigen je schopen vazby do virového ori, kde hraje klíčovou úlohu při replikaci virového

genomu. Kromě toho také interaguje s řadou buněčných faktorů, a napomáhá tak navození S-fáze buněčného cyklu.

Jakmile dojde k replikaci virového genomu, spouští se exprese pozdních genů kódujících kapsidové proteiny (Liu a Carmichael, 1993) a nastává přechod do pozdní fáze virové infekce - tzv. „early-late switch“. Po vzestupu transkripce pozdních mRNA dojde k deregulaci exprese časných genů mechanismem, který není zcela objasněn. Nabízí se model regulace časných virových mRNA pomocí tvorby dsRNA duplexu s komplementární RNA (Huang a Carmichael, 2009; Liu a Carmichael, 1993). Při tvorbě pozdních mRNA dochází k neefektivní terminaci transkripce, což vede k pročtení polyadenylační sekvence a tvorbě dlouhých primárních transkriptů, které jsou komplementární k oblasti časných genů. V důsledku toho dochází k tvorbě dsRNA s časnými mRNA. Tyto dsRNA molekuly podléhají editingu (změna adenosinu na inosin) pomocí enzymu ADAR. Takto upravené mRNA jsou poté zadržovány v jádře a nedochází k jejich translaci. Editovaný úsek pozdních transkriptů je sestřižen buněčným aparátem, takže k jejich zadržení v jádře nedochází.

Po transportu sestřižených pozdních mRNA do cytoplazmy dochází k produkci kapsidových proteinů VP1, VP2 a VP3. Tyto proteiny jsou hlavními „markery“ pozdní fáze virové infekce. Po translaci jsou transportovány do jádra, kde tvoří společně s replikovaným virovým genomem intaktní viriony. Ty jsou po lyzi buňky uvolněny do prostředí.

### **3.1.3 Metody produkce viru**

Pro výzkum virových a buněčných mechanismů či rozvoj nových terapeutických aplikací je nezbytná práce s virovými mutanty. Mutantní myší polyomavirus je zpravidla produkován ve formě rekombinantního plazmidu obsahujícího virový genom. Pro charakterizaci mutantního fenotypu je zapotřebí z tohoto plazmidu připravit virové inokulum. K produkci infekčního viru dochází pouze po transfekci permisivní buněčné linie intaktním virovým genomem (kruhová forma dsDNA). Pro tyto účely musí být virový genom z nosičového plazmidu vyjmut a religován.

K tomu se využívají restriční endonukleázy, které vyštěpí virový genom z plazmidu. Restriční směs je dále přečištěna a naředěna do finální koncentrace DNA 3-4 g/ml či méně (Mannová, 2002). Naředěním se při následné ligační reakci upřednostní intramolekulární spojení virového genomu (Katinka a Yaniv, 1983). I přesto dochází ve větší, či menší míře k ligaci mezi jednotlivými molekulami DNA, což vede k tvorbě konkatemerů virového genomu nebo jeho opětovnému uzavření do nosičového plazmidu. To snižuje výtěžek intaktního virového genomu. Přítomnost konkatemerů protisměrně orientovaných virových DNA představuje také potenciální problémem pro následnou transfekci ligační směsí do buněk, protože jejich transkripce by teoreticky mohla zapříčinit tvorbu cytotoxických dsRNA.

Ligační směs se dále přečistí a zakoncentruje. Takto připravená ligační směs je poté transfekována do permisivní buněčné linie, kde dojde k produktivní infekci a tvorbě virového potomstva. Po několika dnech jsou transfekované buňky společně s médiem sklizeny a virus je izolován.

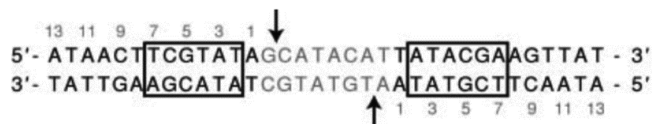
## 3.2 Cre/loxP rekombinační systém a jeho využití

### 3.2.1 Cre rekombináza bakteriofága P1

Cre rekombináza patří do rodiny rekombináz tyrozinového typu (UniProt, P06956) a umožňuje místně specifickou rekombinaci. Skládá se z 343 aminokyselin, které tvoří větší C-koncovou a menší N-koncovou doménu. N-koncová doména není mezi příbuznými proteiny konzervována a je flexibilně spojena s C-koncovou doménou nesoucí aktivní místo enzymu. To obsahuje RHR triádu, která je, společně s konzervovaným tyrozinovým reziduem, hlavním znakem této rodiny. (Gopaul a Van Duyne, 1999)

Funkce tohoto proteinu byla poprvé popsána v roce 1981 u bakteriofága P1 (Sternberg et al., 1981). Bakteriofág P1 patří mezi temperátní fágy s lineárním dsDNA genomem. Ve svém životním cyklu uplatňuje jak lytickou, tak lyzogenní fázi, čili může v hostitelské buňce existovat ve formě kruhové DNA, jež je přenášena do dceřiných buněk. Cre rekombinaci využívá ve svém přirozeném replikačním cyklu. Cre rekombináza je kódována v jeho genomové DNA a zastává několik funkcí: i) po vstupu lineární formy bakteriofágové DNA do hostitelské buňky katalyzuje jeho cirkularizaci, ii) umožňuje rozdělení multimerních forem virové DNA, které vznikají při replikaci, iii) napomáhá při alternativní replikaci virového genomu pomocí mechanismu „rolling circle“.

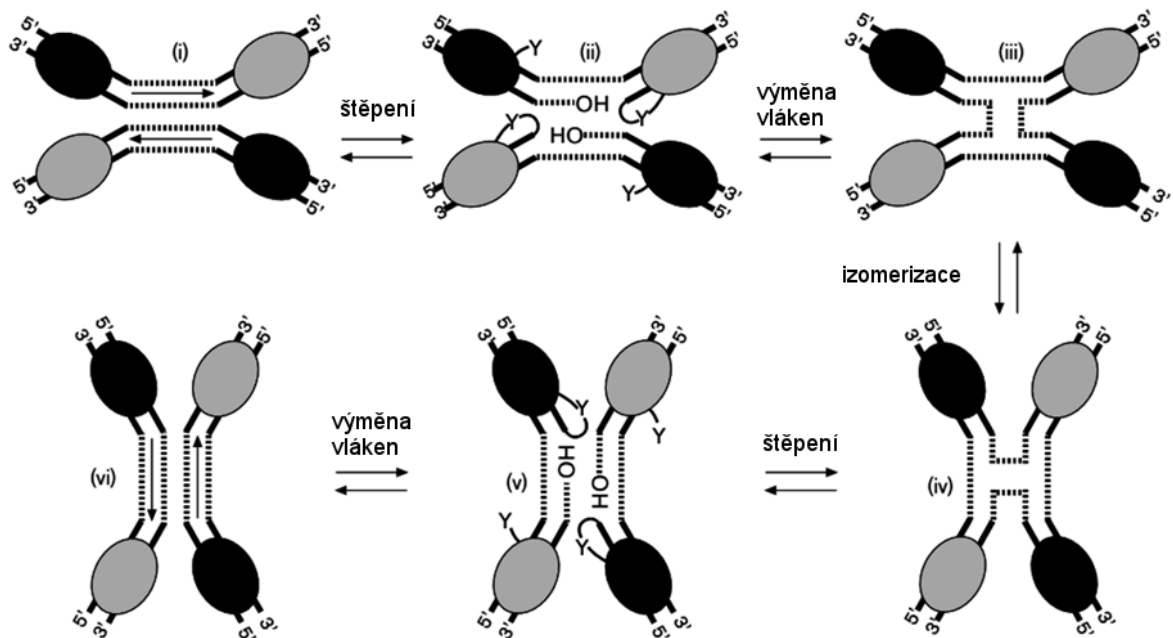
Podstatou reakce Cre rekombinázy je homologní rekombinace mezi dvěma specifickými sekvencemi, tzv. loxP místy (Hoess a Abremski, 1984). Jejich sekvence se skládá z 34 párů bází (bp), které tvoří 8 bp dlouhou asymetrickou centrální část a 13 bp dlouhé palindromatické sekvence umístěné na obou koncích (**obr. 2**). Díky asymetrii v centrální části je loxP místo orientované.



Obrázek 2. Sekvence loxP místa bakteriofága P1. Sekvence obsahuje dva 13bp palindromatické úseky (vyznačeno tučným písmem) a centrální 8 bp dlouhou oblast, která je při Cre rekombinaci štěpena v místech vyznačených šipkami. Nejvíce konzervované úseky zodpovídající za nasednutí Cre rekombinázy jsou vyznačeny čtverci. Přejato od Santoro a Schultz (2002).



Rekombinace zprostředkovaná Cre rekombináзой je vícekrokový proces (**obr. 3**). Nejprve dojde k nasednutí enzymu na 13bp palindromatické sekvence loxP míst (na každý palindrom připadá jeden monomer proteinu) a utvoření tetramerní struktury, což vede k paralelnímu přiblížení dvou loxP míst. Hydroxylová skupina tyrozinového rezidua v aktivním místě enzymu poté iniciuje transesterifikační reakci, jejímž výsledkem je přerušení vlákna DNA v 8bp asymetrické oblasti obou loxP míst a navázání koncových 3' fosfátových skupin DNA k enzymu. Volné 5' OH konce DNA jsou poté ligovány s 3' koncem protilehlého řetězce DNA, který byl kovalentně vázán na tyrozinový zbytek Cre rekombinázy. Tím dojde k tvorbě Hollidayovy struktury. V této fázi nejspíše nedochází k migraci ramen (Van Duyne, 2001), jak je postulováno v klasickém modelu homologní rekombinace. Finální fázi tvoří transesterifikační reakce druhých vláken DNA a jejich vzájemná ligace, čímž je rekombinace mezi loxP místy dokončena. Neboť ke štěpení dochází v centrální asymetrické části (naznačeno na **obr. 2**), výsledné produkty rekombinace obsahují jednu polovinu původního loxP místa a druhou polovinu loxP místa z rekombinovaného úseku DNA. (Gopaul a Van Duyne, 1999; Hoess a Abremski, 1985)

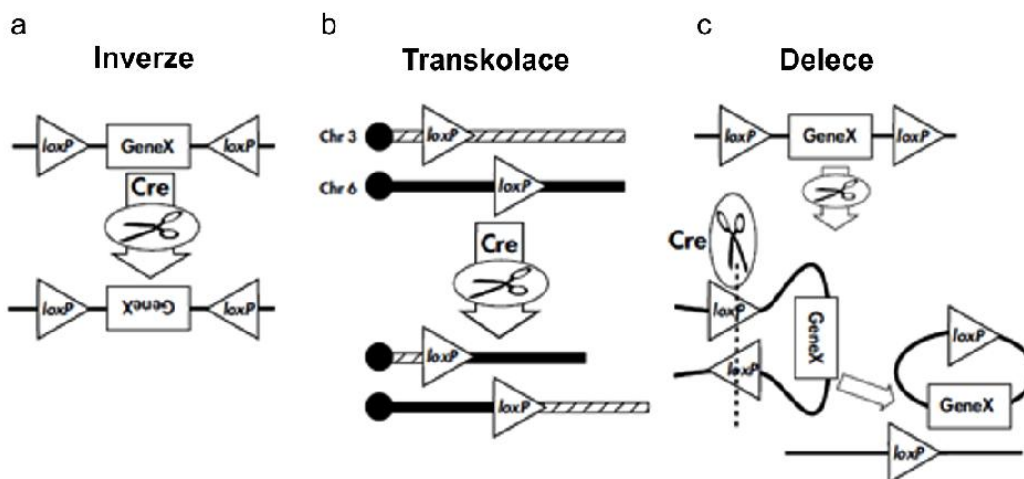


Obrázek 3. Mechanismus rekombinace zprostředkované Cre rekombináзой. Šedý a černý ovál znázorňuje monomery Cre rekombinázy navázané na oba konce loxP míst (přerušovaná čára). Řetězce DNA jsou rozštěpeny pomocí tyrozinového rezidua v aktivním místě enzymu, což vede k tvorbě volných 5' OH konců DNA (ii). Ty mohou následně atakovat protilehlé 3' konce a vytvořit Hollidayovu strukturu (iii/iv). Následně opětovné štěpení (v) a ligace protilehlých konců DNA vede k rekombinaci mezi lokusy (vi). Převzato od Gopaul a Van Duyne (1999) a upraveno.

### 3.2.2 Obecné vlastnosti Cre/loxP systému

Po objevu Cre rekombinace u bakteriofága P1 (Sternberg et al., 1981) začal být Cre/loxP systém využíván pro účely genetických modifikací. V roce 1988 (Sauer a Henderson) byla Cre rekombinace poprvé provedena v savčích buňkách. Dále se ukázalo, že je tento systém použitelný ve všech obecně užívaných modelových organismech.

Sekvence loxP míst jsou asymetrické a v průběhu reakce zprostředkované Cre rekombinázou jsou rekombinovány vždy v konkrétní orientaci. Cre rekombinace tedy může vytvářet různé typy úprav DNA podle zvoleného uspořádání loxP míst (**obr. 4**). To umožňuje téměř neomezenou škálu genetických manipulací, jako je genový „knock-out“ (Gao et al., 2004), „knock-in“ (Michel et al., 2010), Cre rekombinací indukovaná exprese transgenů (vyštěpení STOP sekvence z transgenů) (Dragatsis a Zeitlin, 2001) či tvorba rozsáhlých chromozomálních přestaveb (Adams et al., 2004; Uemura et al., 2010).



Obrázek 4. Výsledek Cre rekombinace v závislosti na pozici a orientaci loxP míst. (a) Pokud se nacházejí loxP místa na jedné molekule DNA v protisměrné orientaci, Cre rekombinace způsobí inverzi vnitřního úseku DNA. (b) Pokud se loxP místa nacházejí na dvou různých molekulách DNA, Cre rekombinace způsobí translokaci segmentů DNA. (c) Pokud se nacházejí loxP místa na jedné molekule DNA v přímé orientaci, Cre rekombinace způsobí delecí vnitřního úseku DNA. Tento typ rekombinace se dá také využít v opačném uspořádání, kdy dochází k vložení kruhového vektoru do cílové sekvence DNA obsahující loxP místo. Převzato a upraveno ([cre.jax.org/introduction.html](http://cre.jax.org/introduction.html)).

Hlavní výhodou Cre/loxP systému je fakt, že pro jeho použití jsou zapotřebí pouze dva elementy (Cre rekombináza a loxP sekvence) bez jakýchkoliv kofaktorů. Cre rekombinace je navíc velmi efektivní a pokud je zajištěna exprese Cre rekombinázy ze silného promotoru a loxP místa se nacházejí na jedné molekule dostatečně blízko u sebe, není nutné používat selekční marker (Nagy et al., 1998).

Potenciálním omezením Cre/loxP systému u organismů s komplexnějším genomem je možnost výskytu sekvencí analogních s loxP místem, což může teoreticky vést k nežádoucí aktivitě Cre rekombinázy. Pravděpodobnost výskytu loxP místa v náhodné sekvenci nukleotidů je  $1 : 10^{20}$ , což prakticky vylučuje, že by se originální loxP místo v genomu modelového organismu objevilo. Nicméně ke Cre rekombinaci dochází s určitou frekvencí i u míst, které nejsou s originálním loxP striktně homologní. Takovéto sekvence obsažené v genomu modifikovaného organismu se označují jako pseudo-loxP. U některých savčích pseudo-loxP míst se ukazuje, že jsou po zaklonování do bakteriálního genomu schopny rekombinovat v přítomnosti Cre rekombinázy s efektivitou blízkou se originálnímu loxP místu (Thyagarajan et al., 2000). V souladu s tím je i fakt, že při vysoké expresi Cre rekombinázy v savčích buňkách dochází k tvorbě chromozomálních aberací (Schmidt et al., 2000). Na druhou stranu vzdálenost dvou loxP míst v prostoru je klíčovým faktorem ovlivňujícím efektivitu rekombinace, což pravděpodobnost ovlivnění Cre/loxP systému pseudo-loxP sekvencemi značně snižuje.

Po Cre rekombinaci může teoreticky dojít ke zpětné reakci, při níž je produkt znovu rekombinován v místě loxP sekvencí, což vede k obnově původního uspořádání DNA. Například, pokud jsme provedli inverzi úseku DNA, který byl na obou stranách opatřen protisměrně orientovanými loxP místy, stále přítomná Cre rekombináza může provést opětovnou rekombinaci mezi loxP místy, a tím invertovaný úsek navrátit do výchozí polohy. Aby se tomuto jevu předešlo, bylo vyvinuto několik strategií. Jednou z možností je užití mutovaných loxP míst, které po Cre rekombinaci brání zpětné reakci (Albert et al., 1995; Suzuki et al., 2007). K potlačení zpětné rekombinace dochází také při použití regulované exprese Cre rekombinázy (Cre se produkuje pouze po dobu nezbytnou k přímé reakci) či při vnesení selekčního markeru, který upřednostňuje cílový produkt.

### 3.2.3 Podmíněná Cre rekombinace

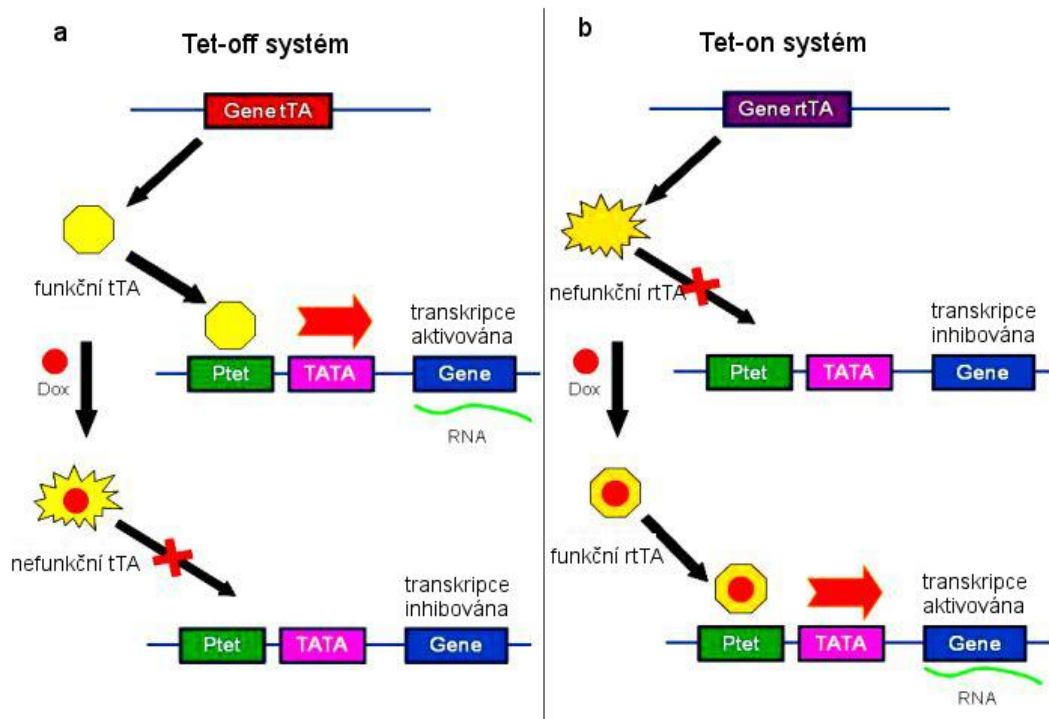
Především z důvodu letality některých genetických modifikací v embryonálním stádiu modelových organismů (nejčastěji myší model) byly vytvořeny systémy umožňující podmíněnou genetickou manipulaci.

Nejdříve vyvinutý systém řešící tento problém je založen na místně specifické expresi Cre rekombinázy. Modifikovaný organismus má v genomu vložený gen pro Cre rekombinázu umístěný za tkáňově specifický promotor, což zaručuje expresi tohoto proteinu pouze v konkrétním místě/tkáni. K mutagenезi úseku DNA obsahujícího loxP místa dojde výhradně v buňkách produkujících Cre rekombinázu, a nikoliv v celém organismu (Orban et al., 1992).

Další variantou je použití indukibilní exprese Cre rekombinázy (shrnuto v Albanese et al., 2002). Tímto mechanismem je možné nejen zajistit mutagenезi pomocí Cre/loxP systému

v konkrétním stádiu vývoje organismu, ale také omezit zpětnou rekombinaci mezi loxP místy či minimalizovat následky cytotoxicity Cre rekombinázy.

Jedním z nejpoužívanějších variant inducibilní exprese je tetracyklinový systém (**obr. 5**) (Gossen a Bujard, 1992; Gossen et al., 1995). Tento systém je založen na aktivitě inducibilního transkripčního aktivátoru, který spouští expresi cílového genu - v našem případě Cre rekombinázy. Tento transkripční aktivátor je reverzibilně regulován pomocí tetracyklinu. Systém existuje v uspořádání tet-on (Gossen et al., 1995) a tet-off (Gossen a Bujard, 1992). Tet-off systém využívá transkripční aktivátor tAT (tetracycline-controlled transactivator protein), který je schopen v nepřítomnosti tetracyklinu aktivovat expresi cílového genu vazbou na operátor tetracyklinového promotoru  $P_{tet}$ . Pokud je v systému přítomen tetracyklin, dochází k jeho navázání na tAT. V takovémto stavu není tAT schopen aktivace  $P_{tet}$  promotoru a exprese cílového genu je zastavena. Na druhou stranu tet-on systém využívá transkripční aktivátor rtAT (reverse tetracycline-controlled transactivator protein), který je po navázání tetracyklinu aktivován, což vede k expresi cílového genu. Pro regulaci tohoto systému se namísto tetracyklinu používají i jeho deriváty, jako je například doxycyklin.



Obrázek 5. Tetracyklinový systém inducibilní exprese. (a) Tet-off systém. Transkripční aktivátor tTA je aktivní v nepřítomnosti doxycyklinu (nebo tetracyklinu). Po přidání doxycyklinu dojde k inaktivaci tTA a exprese transgenu pod promotorem  $P_{tet}$  neprobíhá. (b) Tet-on systém. V přítomnosti doxycyklinu transkripční aktivátor rtTA aktivuje expresi transgenu pod promotorem  $P_{tet}$ . Pokud doxycyklin není přítomen, rtTA je inaktivní a k expresi transgenu nedochází. Převzato a upraveno (Zhang et al., 2012).

Pro regulovanou aktivaci Cre rekombinace se využívají také varianty fúzních proteinů s Cre rekombinázy, které umožňují Cre/loxP rekombinaci pouze po přidání daného ligandu. Nejvíce užívaný systém se nazývá creER T2 a je založen na fúzi Cre rekombinázy s mutovanou ligand vázící doménou estrogenového receptoru (Feil et al., 1997; Heimer-McGinn a Young, 2011; Indra et al., 1999). Tato mutovaná část estrogenového receptoru je schopná po navázání tamoxifenu translokovat celý fúzní protein do jádra, kde může dojít ke Cre rekombinaci. Aktivita Cre rekombinázy je tedy regulována změnou buněčné lokalizace v závislosti na přidání tamoxifenu.

Výše zmíněné metody se často kombinují, což nabízí nejrůznější varianty místně a časově regulované exprese Cre rekombinázy. V současné době je tedy Cre/loxP systém univerzálním a lehce modifikovatelným nástrojem pro cílenou modifikaci DNA v konkrétní tkáni či buněčném typu a v přesně definované dobu.

### **3.2.4 Cre/loxP systém ve virologii**

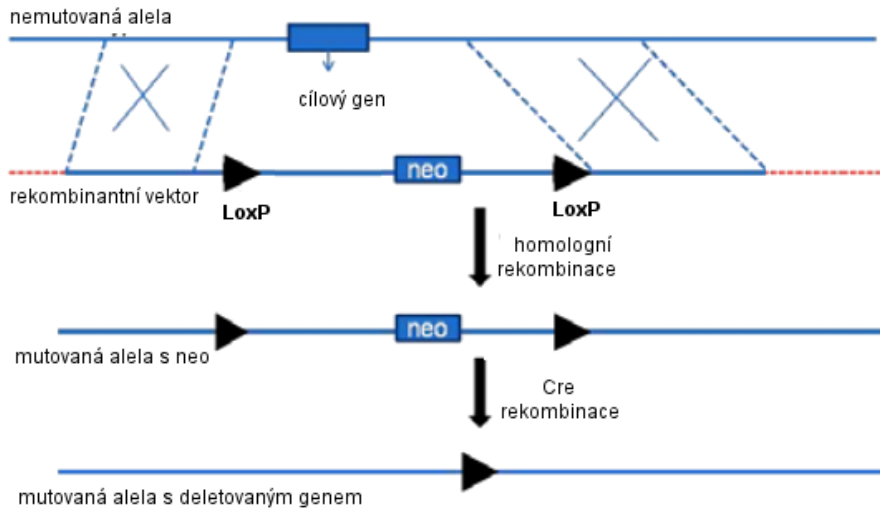
Cre/loxP systém se využívá pro genetické manipulace u nejrůznějších organismů. Největší uplatnění má v přípravě geneticky modifikovaných myších linií (shrnutí v Zhang et al., 2012) či v biotechnologii rostlin (shrnutí v Gilbertson, 2003). Jeho široké využití se však nabízí i ve virologii.

#### ***Delece ve virovém genomu***

Cre/loxP systém umožňuje cílené delece DNA (**obr. 6**) a tvorbu virových mutant, které mohou být použity pro studium funkce konkrétních genů či funkčních oblastí jejich genomu. Delece oblasti DNA zpravidla probíhá ve dvou krocích: i) Pomocí homologní rekombinace je do cíleného lokusu vnesena kazeta s dvěma loxP místy, které ohraničují deletovanou oblast. Kazeta často obsahuje také selekční marker. ii) Po selekci rekombinant je vložená oblast odstraněna pomocí Cre rekombinace mezi přítomnými loxP místy.

Abrams et al. (2012) s úspěchem použili tuto metodu pro tvorbu několikanásobného „knock-out“ u viru ASFV (African swine fever virus). Delece části virového genomu pomocí Cre/loxP systému se také využívá při produkci virových vektorů pro genovou terapii (Logvinoff a Epstein, 2001; Maeda et al., 2003; Zaupa et al., 2003). Transgenní vektory odvozené od adenovirů (Clemens et al., 1996; Mitani et al., 1995) či herpes simplex viru typu 1 (Epstein, 2009) jsou produkovány pomocí superinfekce permisivní buněčné linie společně s tzv. pomocným virem, který nese elementy esenciální pro replikaci a enkapsidaci virového vektoru. Tím je zajištěno, že vzniknuvší virový vektor nebude v cílovém jedinci schopen produktivní infekce. Problémem je však znečištění vyprodukovaného terapeutického vektoru pomocným virem. Pro omezení schopnosti pomocného viru enkapsidovat do virových částic je

tedy jeho enkapsidační sekvence obklopena loxP místy a terapeutický virový vektor je produkován v buněčné linii exprimující Cre rekombinázu. V takovémto uspořádání dochází k vyštěpení enkapsidačního signálu pomocného viru, a tím k snížení možnosti kontaminace v izolovaném terapeutickém vektoru.

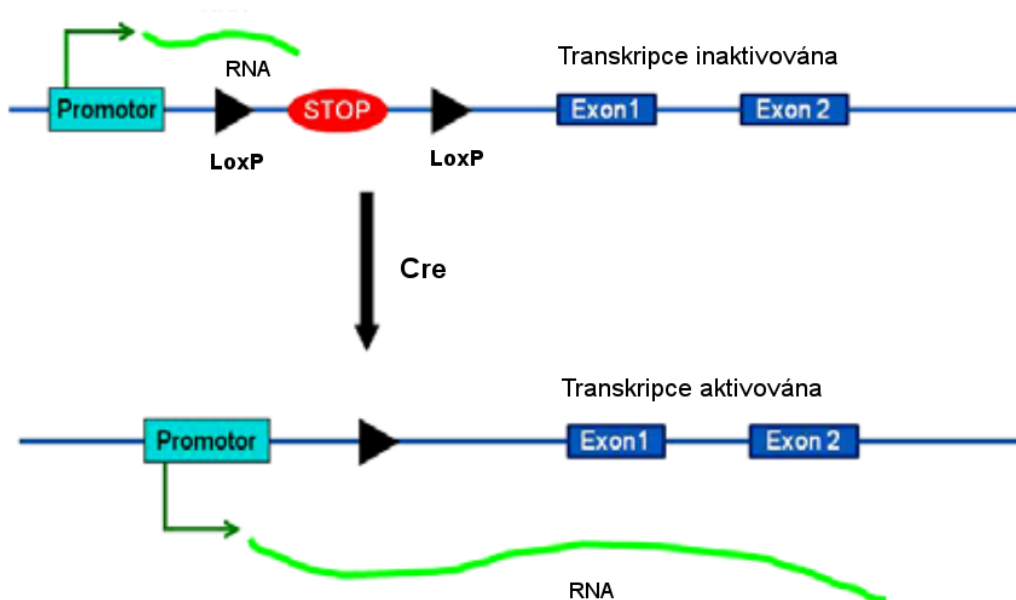


Obrázek 6. Delece lokusu DNA pomocí Cre/loxP systému. DNA vektor vnesený do buněk rekombinuje s cílovým lokusem pomocí dvou homologních ramen. Po rekombinaci je původní úsek DNA nahrazen kazetou obsahující selekční marker (neo) a dvě stejnosměrně orientovaná loxP místa. Pomocí vneseného markeru může být rekombinovaný klon selektován. Kazeta je posléze odstraněna pomocí Cre rekombinázy. Převzato a upraveno (Zhang et al., 2012).

### ***Aktivace genové exprese zprostředkovaná Cre rekombinázou***

Pro výzkum funkce virových proteinů a jejich interakcí s hostitelským organismem jsou často využívány transgenní organismy, které je exprimují. Řada virových proteinů však interaguje s imunitním systémem hostitele nebo má cytotoxické účinky, což přípravu takových modelů značně komplikuje. Pro tvorbu transgenní myši lineje obsahující core protein viru hepatitidy typu C byl navrženo systém podmíněné aktivace transgenů pomocí Cre rekombinázy, který výše zmíněný problém řeší (Xiao et al., 2004). Podobný přístup byl použit také pro přípravu buněčné linie s expresí proteinu X viru hepatitidy typu B (Shintani et al., 1999).

Systém podmíněné aktivace transgenů pomocí Cre rekombinázy byl poprvé vyvinut u myšičího modelu (Dragatsis a Zeitlin, 2001) a je založen na inzerci terminačního signálu transkripce (obklopeného loxP místy) do cílového genu, jehož exprese je takto zrušena (**obr. 7**). K obnově exprese genu může dojít po vyštěpení terminačního úseku pomocí rekombinace mezi loxP místy. Tímto lze docílit exprese cílového genu v přesně definované dobu po aplikaci Cre rekombinázy či transfekci vektoru, který ji exprimuje. Alternativou je také regulovaná transkripce pomocí inducibilního promotoru, kde však může docházet k částečné expresi i ve vypnutém stavu (tzv. leaky exprese).



Obrázek 7. Aktivace exprese genu pomocí Cre rekombinace. Terminační signál transkripce obklopený loxP místy je vložen za promotor cílového genu. Pro spuštění exprese transgenu je třeba přítomnost Cre rekombinázy, která terminační kazetu vyštěpí. Převzato a upraveno (Zhang et al., 2012).

Potenciálním omezením této metody je skutečnost, že po vyštěpení terminační sekvence pomocí Cre rekombinázy je v cílovém genu uchováno jedno loxP místo (viz **obr. 7**). To může vést k ovlivnění jeho exprese. LoxP sekvence obsahuje v jednom směru dva ATG start kodony (v druhém nikoliv). Při návrhu konkrétního uspořádání loxP míst je tedy třeba zvolit jejich správnou orientaci.

### ***Další využití Cre/loxP systému***

Cre/loxP systém může být využit také pro sledování perzistentní infekce v hostitelském organismu či tkáňové kultuře. Klasický přístup využívá viry s vloženým reportérovým genem, který je exprimován po infekci hostitelské buňky (Boldogkoi et al., 1999; Shimeld et al., 2001). Exprese genů z viru bývá v průběhu latentní fáze často umlčena, proto je třeba zvolit promotor, který tomuto efektu nepodléhá. I přesto může být míra produkce reportéru pro detekci nedostatečná. Dutia et al. (2009) navrhuje systém pro sledování virové infekce, při němž využívají myší herpes virus 68 exprimující Cre rekombinázu. Při použití myší linie s reportérovým genem pod silným promotorem, který je aktivován pomocí Cre rekombinace (Gilchrist et al., 2003), je možné sledovat šíření infekce v jednotlivých buňkách.

Cre rekombinace se dále využívá pro efektivní propagaci lidského papilomaviru (HPV) v tkáňových kulturách. HPV je dsDNA virus s kruhovým genomem zodpovědný za tvorbu nádorů u lidí. V hostiteli se vyskytuje ve formě epizomu a produktivní infekce je schopen pouze v diferencovaných epiteliálních buňkách (Fields et al., 2007). Pro jeho studium se používají

tzv. raftové kultury lidských keratinocytů (McLaughlin-Drubin et al., 2003). Jejich transfekce HPV genomem a následné šíření viru v kultuře je však neefektivní, což vyžaduje selekci pozitivních buněk (shrnutí v McLaughlin-Drubin a Meyers, 2005). Pro překonání těchto omezení byl vyvinut systém založený na Cre rekombinaci, který umožňuje produkci virového genomu z nosičového plazmidu přímo v buňkách (Lee et al., 2004). Tento systém byl použit pro efektivní infekci kultury lidských keratinocytů adenovirovým vektorem, jež obsahoval HPV genom z obou stran ohraničený loxP místy. Při superinfekci s druhým adenovirovým vektorem exprimujícím Cre rekombinázu tedy došlo k vyštěpení kruhové formy genomu HPV schopného produktivní infekce. Později byla obdoba tohoto systému využita pro zvýšení výtěžku produkce HPV a jeho mutant (Chow et al., 2009; Wang et al., 2009). V tomto případě byl HPV genom zaklonován do plazmidu obsahujícího selekční marker a transfekován do buněk společně s vektorem exprimujícím Cre rekombinázu. Transfekované buňky mohly být s využitím vneseného markeru selektovány. Zároveň s tím byl v buňkách pomocí Cre rekombinace mezi loxP místy generován virový genom, což umožnilo jeho produktivní infekci.

### 3.3 Další místně specifické rekombinační systémy

Kromě Cre rekombinázy bakteriofága P1 existuje řada dalších místně specifických rekombinačních systémů, které jsou přirozenou součástí života různých organismů. Některé z těchto systémů jsou také ve větší, či menší míře využívány v metodách genomového inženýrství a mohou skýtat výhodnou alternativu k výše popsanému Cre/loxP systému (shrnutí v Turan a Bode, 2011) (**tab.1**). Podle sekvenční podobnosti a struktury aktivního místa jsou místně specifické rekombinázy děleny do dvou rodin: i) rekombinázy tyrozinového typu, ii) rekombinázy serinového typu.

#### 3.3.1 Rekombinázy tyrozinového typu

Mezi nejvíce využívané rekombinázy tyrozinového typu patří kromě Cre také Flp rekombináza, objevená v 2 $\mu$ m plazmidu *S.cerevisiae* (Andrews et al., 1985), a integráza bakteriofága  $\lambda$  (Weil a Signer, 1968). Mechanismus rekombinace těchto enzymů je shodný a využívá tvorby Hollidayovy struktury.

Flp rekombináza je schopná, podobně jako Cre, obousměrné rekombinace mezi 48 bp dlouhými FRT sekvencemi. Minimální velikost FRT místa potřebná k rekombinaci je však 34 bp. Pro vylepšení vlastností Flp/FRT systému a zabránění zpětné rekombinace byla vyvinuta řada variant FRT míst (Buchholz et al., 1998; Turan et al., 2010). Fakt, že tento systém nevyžaduje žádné další buněčné kofaktory, jej činí společně s Cre/loxP rekombinací široce využitelným. Cre/loxP a Flp/FRT systémy se také často kombinují, což dále rozšiřuje možnosti použití.



Integráza bakteriofága  $\lambda$  je další místně specifickou rekobinázou tyrozinového typu. Zprostředkovává rekombinaci mezi dvěma heterologními sekvencemi attP (cca 250 bp) a attB (cca 25 bp). Na rozdíl od Cre a Flp rekombináz je schopna jednosměrné integrace fragmentu DNA do cílového lokusu bez zpětné rekombinace. Její využití má však řadu zásadních omezení. Pro rekombinaci vyžaduje další buněčné faktory a konkrétní topologickou formu DNA - negativní nadšroubovici. (shrnuto v Hirano et al., 2011)

### 3.3.2 Rekombinázy serinového typu

Rekombinázy serinového typu obsahují proteiny spadající do dvou skupin: i) resolvázy/invertázy, mezi které patří např. resolváza bakteriálního transpozonu Tn3 či Hin invertáza; ii) integrázy, které zahrnují např. integrázu bakteriofága  $\phi$ C31 (Kuhstoss a Rao, 1991). Mechanismus místně specifické rekombinace těchto enzymů se od rekombináz tyrozinového typu značně liší. Místo postupného štěpení řetězců DNA v rekombinačním komplexu a tvorby Hollidayovy struktury jsou oba řetězce každé molekuly DNA štěpeny zároveň. Bezprostředně poté dochází k tzv. podjednotkové rotaci o 180°, což má za následek výměnu ramen a rekombinaci DNA molekul (Smith et al., 2010).

Využití resolváz/integráz v genovém inženýrství je omezené. Pro rekombinaci totiž vyžadují velmi uspořádanou nadšroubovicovou strukturu DNA a rekombinační místa v cis orientaci. Většina z těchto enzymů navíc využívá dalších buněčných faktorů. Nicméně některé mutantní formy integráz/invertáz tyto problémy částečně překonávají (Arnold et al., 1999). V nedávné době byly také navrženy programovatelné fúzní proteiny těchto enzymů, které umožňují velice přesné integrace transgenů do lidského genomu (Gordley et al., 2009).

Asi nejužívanější rekombinázou serinového typu je integráza bakteriofága  $\phi$ C31. Tento enzym nepotřebuje pro rekombinaci žádné další faktory ani konkrétní topologickou formu DNA. Provádí místně specifickou rekombinaci mezi dvěma heterologními místy attP a attB. Ta probíhá pouze v přímém směru, což zamezuje zpětnou rekombinaci produktů (ke které dochází např. u Cre/loxP systému). Potenciální nevýhodou tohoto systému je výskyt pseudo-attP míst v savčím genomu. Bylo ukázáno, že po transfekci savčích buněk plazmidem nesoucím attB dochází k jeho integraci v těchto pseudo-attP místech (Thyagarajan et al., 2001). I přesto je  $\phi$ C31 integráza široce využívána pro nejrůznější genetické manipulace (Lu et al., 2011; Robert et al., 2012).

Tabulka 1. Přehled nejčastěji využívaných místně specifických rekombináz. Citace jsou uvedeny v textu práce.

	Rodina	Zástupce	Směr rekombinace	Cílové sekvence	Další požadavky	
					Hostitelské faktory	Topologie DNA
Rekombinázy tyr. typu	Fágové integrázy	<b>Cre rek.</b>	obousměrná	loxP (34nt)	ne	ne
	Fágové integrázy	<b>Flp rek.</b>	obousměrná	FRT (48nt)	ne	ne
	Fágové integrázy	<b>λ int.</b>	jednosměrná	attP (~250nt) attB (~25nt)	ano	nadšroubovice
Rekombinázy ser. typu	Resolvázy/invertázy	<b>Tn3 res.</b>	jednosměrná	res (114nt)	ne	nadšroubovice, rek. místa v cis
	Resolvázy/invertázy	<b>Hin inv.</b>	obousměrná	hixL, hixR (26nt)	ano	nadšroubovice, rek. místa v cis
	Fágové integrázy	<b>φC31 int.</b>	jednosměrná	attP, attB (~40nt)	ne	ne

# 4. Materiál a metody

## 4.1 Materiál

### 4.1.1 Buněčné linie, bakteriální kmeny a viry

3T6 Swiss Albino - permanentní buněčná linie embryonálních myších fibroblastů, adherentní, kat.č. ACC 202 (DSMZ)

WOP - permanentní buněčná linie embryonálních myších fibroblastů odvozená od 3T3 linie, adherentní, kat.č. ATL99011 (ICLC)

MEF – permanentní buněčná linie myších embryonálních fibroblastů, adherentní, (Pier Paolo Pandolfi, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York)

TOP10 *E. coli* - elektrokompetentní bakterie *E. coli*, genotyp: *hsdR*, *mcrA*, *lacZΔM15*, *endA1*, *recA1*, kat. č. C4040-03 (Life Technologies)

Myší polyomavirus (MPyV) - kmen BG, poskytnula B. Griffin (Royal Postgraduate School, Londýn)

### 4.1.2 Vektory

pMJG - rekombinantní plazmid bakteriálního typu odvozený od pMJ1 s vloženým genomem myšího polyomaviru, kmen BG, který byl linearizován pomocí restriční endonukleázy EcoRI, rezistence na ampicilin (Krauzewicz et al., 1990)

pBluescript-SK - rekombinantní plazmid bakteriálního typu, rezistence na ampicilin (Agilent Technologies)

pPuro.Cre empty - rekombinantní plazmid pro expresi transgenu v savčích buňkách, exprese Cre rekombinázy, rezistence na ampicilin (Addgene plasmid 17408, (Kumar et al., 2008))

pNIT - expresní retrovirový vektor pro přípravu buněčné linie s regulovanou expresí transgenu (tet off), regulace exprese pomocí doxycyklinu, rezistence na G418, poskytnul Zbyněk Kozmik (GenBank: AF311318.1)

pCALNL-DsRed - expresní vektor odvozený od vektoru pCALNL5 , inducibilní exprese fluorescenčního proteinu DsRed závislá na Cre rekombináze, slouží ke kontrole přítomnosti/funkce Cre rekombinázy, rezistence na ampicilin, poskytnul Zbyněk Kozmik (Addgene plasmid 13769) (Matsuda a Cepko, 2007)

### 4.1.3 Protilátky a fluorescenční barviva

#### ***Primární protilátky***

$\alpha$ GAPDH - králíčí polyklonální protilátka reaktivní s GAPDH, použita pro western blot, ředění 250x (Abcam)

$\alpha$ PyVP1-A - myší monoklonální IgG reaktivní s VP1 proteinem myšího polyomaviru, použita pro western blot, ředění 50x (Forstova et al., 1993)

$\alpha$ PyVP1-D4 - myší monoklonální IgG reaktivní s VP1 proteinem myšího polyomaviru, použita pro imunofluorescenci, ředění 20x (připravena v naší laboratoři)

$\alpha$ PyLT1 - krysí monoklonální IgG reaktivní s LT antigenem myšího polyomaviru, použita pro imunofluorescenci, ředění 100x (Dilworth a Griffin, 1982)

$\alpha$ PyC1 - krysí monoklonální IgG reaktivní se všemi třemi T-antigeny myšího polyomaviru, použita pro western blot, neředěna (Dilworth a Griffin, 1982)

$\alpha$ PyC4 - krysí monoklonální IgG reaktivní se všemi třemi T-antigeny myšího polyomaviru, použita pro western blot, neředěna (Dilworth a Griffin, 1982)

#### ***Sekundární protilátky***

anti-mouse A488 - oslí IgG proti myši, konj. s fluoroforem Alexa Flour 488 (Invitrogen)

anti-rat A546 - kozí IgG proti potkanovi, konj. s fluoroforem Alexa Flour 546 (Invitrogen)

anti-rabbit HR - kozí IgG proti králíkovi, konj. s křenovou peroxidázou (BioRad)

anti-mouse HR - kozí IgG proti myši, konj. s křenovou peroxidázou (BioRad)

anti-rat HR - kozí IgG proti potkanovi, konj. s křenovou peroxidázou (Sigma-Aldrich)

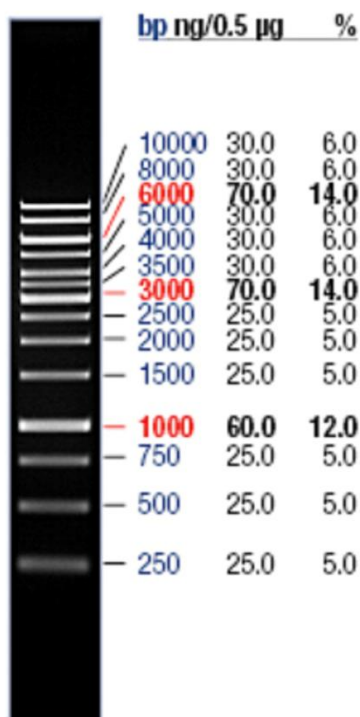
#### ***Fluorescenční barviva***

DAPI - 4',6'-diamino-2-fenylindol, koncentrace 0,1  $\mu$ g/ml (Sigma-Aldrich)

### 4.1.4 Markery molekulových hmotností

DNA marker - GeneRuler 1 kb DNA Ladder, obr. 8, (Thermo Fisher Scientific)

Proteinový marker - SDS7B2 - Prestained Molecular Weight Marker, tab. 2, (Sigma-Aldrich)



Obrázek 8. Popis DNA markeru "GeneRuler 1 kb DNA Ladder". Agarózová DNA elektroforéza 0,5 µg markeru, 7 V/cm, 1x TAE, 45 min. Obrázek znázorňuje molekulové hmotnosti a množství jednotlivých DNA fragmentů v markeru. Převzato a upraveno. ([www.thermoscientificbio.com](http://www.thermoscientificbio.com))

Tabulka 2. Složení proteinového markeru "SDS7B2". Převzato z <http://www.sigmaaldrich.com>.

Prestained Protein	Native* Subunit Molecular Mass (Da)
$\alpha_2$ -Macroglobulin from equine serum	180,000
$\beta$ -Galactosidase from <i>E. coli</i>	116,000
Lactoferrin from human milk	90,000
Pyruvate Kinase from rabbit muscle	58,000
Fumarase from porcine heart	48,500
Lactic Dehydrogenase from rabbit muscle	36,500
Triosephosphate Isomerase from rabbit muscle	26,600

#### 4.1.5 DNA oligonukleotidy

Veškeré uvedené oligonukleotidy byly syntetizovány na objednávku firmou Integrated DNA Technologies. Sekvence jsou psány od 5' konce a případné modifikace jsou uvedeny v popisu každého oligonukleotidu.

Tabulka 3. Přehled použitých DNA oligonukleotidů.

Název	Sekvence	Popis
<b>loxP-loxP_fw</b>	<u>ATAACTTCGTATAGCATACATTATA</u> <u>CGAAGTTATCTCGAGGCGGCCGCGT</u> CGACATAACTTCGTATAGCATACAT TATACGAAGTTAT	Oligonukleotidy použité na přípravu dsDNA fragmentu pro konstrukci plazmidů pBS-PyI/A, sekvence obsahuje dvě stejnosměrně uspořádaná loxP místa (podtrženo), která jsou oddělena restrikcí místy pro XhoI, NotI a Sall, modifikace: 5' fosforylace.
<b>loxP-loxP_rv</b>	<u>ATAACTTCGTATAATGTATGCTATA</u> <u>CGAAGTTATGTCGACGCGGCCGCGCT</u> CGAGATAACTTCGTATAATGTATGC <u>TATACGAAGTTAT</u>	
<b>Py-I_fw</b>	TTCTTACAGGGCTCTCCCCCTAG	Klonovací PCR primery použité pro konstrukci plazmidu pBS-PyI
<b>Py-I_rv</b>	CTTACTTGGATTATACACGCTGTGC	
<b>Py-A_fw</b>	GAATAAACATTAATTTCCAGG	Klonovací PCR primery použité pro konstrukci plazmidu pBS-PyA.
<b>Py-A_rv</b>	CAATAAACTGTGTATTTCAGC	
<b>pMJG-966_rv</b>	TTCTGAGCAACCCGACCTA	Sekvenační primer komplementární k sekvenci v časně oblasti genomu myšího polyomaviru.
<b>pMJG-740_fw</b>	GATGTGCACAGCGTGTA	Sekvenační primer komplementární k sekvenci v časně oblasti genomu myšího polyomaviru.
<b>pMJG-5322_rv</b>	TATGACGCGCTATGTTGACC	Sekvenační primer komplementární k sekvenci v pozdní oblasti genomu myšího polyomaviru.
<b>pMJG-4108_rv</b>	GAGGCCTGGCTTATTTTCTG	Sekvenační primer komplementární k sekvenci v časně oblasti genomu myšího polyomaviru.
<b>M13_fw</b>	GTAAAACGACGGCCAGT	Sekvenační primer.
<b>M13_rv</b>	CAGGAAACAGCTATGACC	Sekvenační primer.
<b>T3</b>	ATTAACCCTCACTAAAGGGA	Sekvenační primer.

#### 4.1.6 Použité chemikálie

Agaróza pro elektroforézu (Amresco)  
Agar pro bakteriologii (Sigma-Aldrich)  
Akrylamid (Serva)  
Ampicilin (Sigma-Aldrich)  
APS - persíran amonný (Serva)  
Bisakrylamid (Serva)  
Bromfenolová modř (Serva)  
BSA - bovinní sérový albumin (Sigma-Aldrich)  
CBBG250 - Coomassie Brilliant Blue (Serva)  
Deoxycholát sodný (Lachema)  
Doxycyklin (Sigma-Aldrich)  
DMSO - dimethyl sulfoxid (Sigma-Aldrich)  
dNTPs - směs deoxyribonukleosid trifosfátů (Sigma-Aldrich)  
DTT - dithiothreitol (Roche)  
EDTA - kyselina ethylendiamintetraoctová (Serva)  
Ethanol (Penta)  
Fenol - upravený saturací Tris-HCl, pH=8 (Sigma-Aldrich)  
Glycerol (Penta)  
Glycin (Serva)  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - peroxid vodíku (Sigma-Aldrich)  
HCl - kyselina chlorovodíková (Lachema)  
HClO<sub>4</sub> - kyselina chloristá (Lachema)  
Chloroform - chloroform s izoamylalkoholem v poměru 24:1 (Lachema)  
Izopropylalkohol (Penta)  
KAc - octan draselný (Lachema)  
Kanamycin (Sigma-Aldrich)  
Kyselina boritá (Serva)  
Kyselina octová (Lachema)  
Methanol (Lachema)  
MgCl<sub>2</sub> - chlorid hořečnatý (Lachema)

NaAc - octan sodný (Lachema)  
NaCl - chlorid sodný (Lachema)  
NaOH - hydroxid sodný (Penta)  
Paraformaldehyd (Sigma-Aldrich)  
PEG 4000 - polyethylen glykol 4000 (Thermo Fisher Scientific)  
PMSF - fenylmethylsulfonyl fluorid (Sigma-Aldrich)  
SDS - dodecylsírán sodný (Sigma-Aldrich)  
TEMED - tetramethylethylendiamin (Sigma-Aldrich)  
Tris - tris(hydroxymethyl)aminomethan (Serva)  
Triton X-100 (Serva)  
Želatina z prasečí kůže (Sigma-Aldrich)  
 $\beta$ -merkapt ethanol (Serva)

#### **4.1.7 Nejčastěji používané roztoky a média**

Pokud není uvedeno jinak, jako rozpouštědlo při přípravě roztoků byla použita destilovaná voda.

##### ***Roztoky***

Barvicí roztok - 0,5% (w/v) CBBG250, 3,5% (v/v) HClO<sub>4</sub>

Blotovací pufr - 25mM Tris, 192mM glycine, 20% (v/v) methanol

Elektroforetický pufr na SDS-PAGE - 25mM Tris, 192mM glycin, 0,1% (w/v) SDS, pH=8,3

HD hybridizační pufr - 70 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 50 mM NaCl, pH=7,6

PBS (Phosphate-Buffered Saline) - 1,37M NaCl, 27mM KCl, 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O, 18mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH=7,4

RIPA pufr - 150mM NaCl, 5mM EDTA, 50mM Tris-HCl, 0,05% (v/v) NP-40, 1% (w/v) deoxycholát sodný, 0.1% (w/v) SDS, pH=7,4

Roztok trypsinu - 0,25% (w/v) trypsin v PBS (Sigma-Aldrich)

Roztok verzenu - 0,25% (w/v) EDTA v PBS (Sevac)

TAE elektroforetický pufr - 40mM Tris-kys. octová, 1mM EDTA, pH=8,0

TBE elektroforetický pufr - 44mM Tris-HCl, 44mM kyselina boritá, 1mM EDTA, pH=8,0

TE pufr - 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH=7,5



### ***Kultivační média***

SOC médium - 2% (w/v) pepton pro bakteriologii, 0,5% (w/v) kvasničný autolyzát, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgSO<sub>4</sub>, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 20mM glukóza

LB médium - 1% (w/v) pepton pro bakteriologii, 0,5% (w/v) kvasničný autolyzát, 1% (w/v) NaCl

DMEM (Dublecco's Modified Eagle's Medium, Sigma-Aldrich) - přidán 2mM L-glutamin (Gibco), směs antibiotik pro tkáňové kultury a 5% fetální bovinní sérum (FBS; Sigma-Aldrich), v některých případech bez séra

RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) - přidáno 5 % fetálního bovinního séra (Sigma-Aldrich)

## **4.2 Metody**

### **4.2.1 Sterilizace nádobí a náčiní**

Většina užitých roztoků, mikrozkuřavky a špičky k automatickým pipetám byly sterilizovány pomocí autoklávu po dobu 30 minut (127 °C, 120 kPa). Roztoky choulostivé na teplo byly sterilizovány pomocí filtrace přes 0,22μm filtr. Chemické sklo bylo sterilizováno horkým vzduchem o teplotě 160 °C po dobu 3 hodin. Pinzety, mikrobiologické hokejky a očka byly před použitím namočeny do ethanolu a vyžihány.

### **4.2.2 Práce s buněčnými kulturami**

#### ***Pasážování a kultivace***

Z misky s konfluentně narostlými buňkami bylo odsáto médium a buňky byly opláchnuty roztokem verzenu. Poté byl na misku přidán roztok trypsinu předeřhřátý na 37 °C (cca 500 μl na Ø6cm misku). Buňky byly inkubovány v termostatu při 37 °C, dokud se neodpoutaly od povrchu - ne však déle než 5 minut. Poté byly buňky důkladně resuspendovány v přiměřeném množství DMEM média s 5% sérem a pasážovány na novou misku v poměru 1:6 u buněčné linie 3T6 a 1:12 u buněčné linie WOP. Médium bylo doplněno do objemu 10 ml u Ø10cm misky a 6 ml u Ø6cm misky. V některých případech byla koncentrace buněk v suspenzi počítána pomocí Bürknerovy komůrky a přesné množství poté vyseto na misku. Buňky byly uchovávány v 5% atmosféře CO<sub>2</sub> při 37 °C.

#### ***Konzervování***

Pro přípravu konzerv byly použity buňky v exponenciální fázi růstu (70-90% konfluence). Z misky bylo odsáto médium a buňky byly opláchnuty roztokem verzenu. Poté byl na misku přidán roztok trypsinu předeřhřátý na 37 °C (1 ml na Ø10cm misku). Buňky byly inkubovány

v termostatu při 37 °C, dokud se neodpoutaly od povrchu - ne však déle než 5 minut. Poté byly buňky resuspendovány v přiměřeném množství DMEM média s 5% sérem a pomocí centrifugace sedimentovány 10 minut při 1500 rpm (Beckman Centrifuge GS-15R, rotor S4180). Peleta buněk byla opatrně resuspendována v zamrazovacím roztoku (70% DMEM, 20% FBS, 10% DMSO) a suspenze plněna do 1ml kryozkumavek. Na 1 ml konzervované suspenze byla použita jedna Ø10cm miska buněk. Naplněné kryozkumavky byly umístěny do mrazícího kontejneru, přes noc zchlazeny na -80 °C a uskladněny v tekutém dusíku.

#### **4.2.3 Příprava linie se stabilní expresí transgenu**

Do savčí buněčné linie byl pomocí elektroporace (viz kapitola 4.2.4) transfekován expresní plazmid nesoucí daný transgen. Buňky ( $4 \times 10^6$  buněk z jedné transfekce) byly vysety na dvě Ø10cm misky a doplněny do 10 ml sérovým DMEM médiem obsahujícím selekční antibiotikum. Účinná koncentrace selekčního antibiotika byla stanovena předem. Buňky byly kultivovány po dobu několika týdnů. Každé tři dny jim bylo měněno médium s čerstvým antibiotikem. Během kultivace došlo k vyhubení buněk, které neobsahovaly rekombinantní plazmid nesoucí příslušnou rezistenci a utvoření monoklonálních kolonií s plazmidem integrovaným do genomu. Poté byla každá miska opláchnuta 5 ml roztoku verzeny a jednotlivé kolonie resuspendovány v 10 µl roztoku trypsinu, přeneseny na 24jamkové plato a doplněny do 1 ml sérovým DMEM médiem s příslušným antibiotikem. Každá monoklonální kultura byla kultivována, pasážována a následně zamražena (viz kapitola 4.2.2). Jednotlivé monoklonální linie byly dále testovány na expresi daného transgenu. Stabilně transfekované linie byly vždy pasážovány v médiu se selekčním antibiotikem.

#### **4.2.4 Transfekce cizorodé DNA**

##### ***Elektroporace plazmidové DNA***

Pro vnesení plazmidové DNA do savčích buněk byl použit elektroporátor Amaxa® Cell Line Nucleofector® V a reagentie Amaxa Nucleofector Solution (Lonza). Na jednu reakci bylo použito  $4 \times 10^6$  buněk v exponenciální fázi růstu, které byly před elektroporací sklizeny z misek a sedimentovány pomocí centrifugace (10 min, 1500 rpm; Beckman Centrifuge GS-15R, rotor S4180). Buňky byly resuspendovány ve 100 µl transfekčního roztoku s 6 µg plazmidové DNA a přeneseny do Ø2mm elektroporační kyvety. Bezprostředně poté byl aplikován elektrický pulz podle programu přednastaveného výrobcem. Buněčná suspenze byla dále naředěna 500 µl RPMI média a inkubována 15 min, 37 °C. Následně byly buňky vysety na misky a kultivovány v 5% atmosféře CO<sub>2</sub> při 37 °C. Po šesti hodinách jim bylo vyměněno médium.

### ***Transfekce DNA pomocí TurboFect reagentie***

Pro transfekci DNA do savčích buněk pomocí lipofekce byl použit produkt TurboFect Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific). Transfekovány byly buňky v exponenciální fázi růstu (70-90% konfluence) vyseté na 24jamkové plato (2,0 cm<sup>2</sup>/jamka) s 1 ml DMEM média se sérem. Pro jednu transfekci byl rozpuštěn 1 µg DNA ve 100 µl bezsérového DMEM média a 2 µl Turbofect reagentie. Po 15minutové inkubaci při pokojové teplotě byl roztok nakapán na buňky a ty byly dále kultivovány v 5% atmosféře CO<sub>2</sub> při 37 °C.

### **4.2.5 Infekce savčích buněk**

#### ***Preparace viru***

Jako virové inokulum byly v této práci použity buněčné extrakty transfekovaných buněk, které byly připraveny následovně: Buňky transfekované virovou DNA byly 6 dní po transfekci sklizeny společně s médiem. Tato suspenze byla dále třikrát zmrazena a rozmrazena, což vedlo k lyzi buněk, a umožnilo uvolnění intracelulárního viru. Buněčný lyzát byl dále centrifugován po dobu 15 minut, 10000 g při laboratorní teplotě. Supernatant byl odebrán a použit pro infekci buněk.

#### ***Infekce buněk***

Den před infekcí byly buňky myších fibroblastů 3T6 vysety na krycí sklíčka usazená v 24jamkovém platu (3x10<sup>4</sup> buněk na jamku). Buňky byly opláchnuty bezsérovým DMEM médiem a inkubovány se 100 µl virového inokula po 1 hodinu při 37 °C. Poté byl do každé jamky přidán 1 ml DMEM média se sérem a buňky byly dále kultivovány v 5% atmosféře CO<sub>2</sub> při 37 °C.

### **4.2.6 Plaková zkouška**

Plaková zkouška byla použita pro stanovení infekitivity virového inokula. Buňky MEF byly vysety na 3,5cm misky v koncentraci 5x10<sup>5</sup> buněk/miska. Druhý den byly buňky infikovány testovaným inokulem (viz kapitola infekce buněk), které bylo předem naředěno (obvykle použita desítková ředící řada 10<sup>-2</sup> až 10<sup>-6</sup>). Po infekci byly buňky zality DMEM médiem s 0,8% SeaPlaque agarózou, 7,5% FBS a 0,5% DMSO. Po zatuhnutí média (cca 30 min, pokojová teplota) byly buňky inkubovány v termostatu po dobu 7-10 dní. Pro lepší viditelnost plaků byly buňky obarveny vitálním barvivem a inkubovány další 3 hodiny v termostatu. Misky byly poté fotografovány a vyhodnoceny.

#### 4.2.7 Imunofluorescenční analýza

##### ***Fixace buněk a imunodetekce***

Buňky rostoucí na sklíčkách byly opláchnuty PBS a fixovány 3% (w/v) paraformaldehydem v PBS po dobu 30 minut. Paraformaldehyd byl odsán, buňky 2x opláchnuty PBS a permeabilizovány 0,5% Tritonem X-100 v PBS po dobu 5 minut. Poté byly 3x důkladně opláchnuty PBS.

Fixované buňky byly 30 minut inkubovány v blokačním roztoku (0,25% bovinní sérový albumin, 0,25% želatina v PBS). Blokační roztok byl odsán a preparáty byly inkubovány 60 minut s primární protilátkou ředěnou v blokačním roztoku za stálého kývání. Poté byly buňky 3x důkladně promyty v PBS a inkubovány se sekundární protilátkou ředěnou v blokačním roztoku po dobu 30 minut za stálého kývání. Po opakovaném promytí v PBS byly sklíčka s buňkami opláchnuty v ddH<sub>2</sub>O, 15 minut sušeny při laboratorní teplotě a montovány na podložní sklíčko do 50% glycerolu s DAPI.

##### ***Mikroskopie a vyhodnocení výsledků***

Preparáty byly pozorovány mikroskopem Olympus BX-60. Fotografie byly pořízeny s využitím kamery Olympus U-CMAD-2 a upraveny pomocí softwaru Lucia G ver. 5.10. Ve většině případů byl použit mód autoexpozice (nastavení Auto-Exposure a Auto-White-Balance). Pokud bylo cílem porovnat intenzitu signálu mezi jednotlivými vzorky, byl použit mód konstantní expozice s parametry: Exposition 200 ms, Gain 2,00.

Pro kvantifikaci buněk pozitivních na detekovaný protein byly vzorky zpravidla připraveny v duplikátech. Z každého sklíčka bylo pořízeno 10 náhodných snímků, ve kterých byly spočítány buňky pozitivní na daný protein. K počítání buněk byl použit program ImageJ 1.46r (Wayne Rasband). U každého vzorku bylo určeno relativní množství pozitivních buněk vztažené na vzorek pozitivní kontroly (PK). Pro každé počítané pole byl tedy použit následující vzorec:

1) *Relativní množství pozitivních buněk vzorku x*

$$\frac{\% \text{ pozitivních b. vzorku } x}{\% \text{ pozitivních b. vzorku PK}} = \frac{(\text{počet pozitivních b. vzorku } x / \text{počet všech b. vzorku } x)}{(\text{počet pozitivních b. vzorku PK} / \text{počet všech b. vzorku PK})}$$

Směrodatná odchylka byla určena z jednotlivých počítaných polí (oba duplikáty dohromady) a korigována pro normalizovaná data (tj. pro hodnoty vypočítané podle vzorce 1). Korekce směrodatné odchylky vzorku x (SD<sub>x</sub>) byla provedena podle následujícího vzorce:

2) *Normalizovaná směrodatná odchylka vzorku x*

$$\sqrt{\left( \left( \frac{SD_x}{\% \text{ pozitivních b. vzorku } x} \right)^2 + \left( \frac{SD_{PK}}{\% \text{ pozitivních b. vzorku PK}} \right)^2 \right)} \times \text{relativní množství pozitivních b. vzorku } x$$

#### 4.2.8 SDS-PAGE a western blot

##### ***Příprava vzorku***

Buňky rostoucí na 6jamkovém platu (9,5 cm<sup>2</sup>/jamka) byly 48 hodin po transfekci opláchnuty PBS a sklizeny do 1 ml PBS. Buněčná suspenze byla centrifugována 15 minut, 6000g při laboratorní teplotě a peleta resuspendována v 60 µl RIPA pufru s PMSF. Buňky byly 20 minut lyzovány na ledu a poté centrifugovány 15 minut, 15000g při 4 °C. Supernatant byl smíchán s Laemmliho pufrem (Sigma-Aldrich), 5 minut povařen a nanesen na polyakrylamidový gel.

##### ***SDS polyakrylamidová elektroforéza (SDS-PAGE)***

Složení spodního a vrchního (tzv. zaostřovacího) gelu bylo následující:

##### Příprava spodního 10% gelu (celkový objem 12 ml):

- 4 ml 30% akrylamidu
- 4,5 ml 1M Tris-HCl (pH=8,8)
- 120 µl 10% SDS
- 3,25 ml demineralizované vody
- 40 µl 10% amonium persulfátu
- 8,5 µl TEMED

##### Příprava vrchního 5% gelu (celkový objem 3 ml):

- 0,5 ml 30% akrylamidu
- 0,375 ml 1M Tris-HCl (pH=6,8)
- 30 µl 10% SDS
- 2,11 ml demineralizované vody
- 20 µl 10% amonium persulfátu
- 5 µl TEMED

Gel byl umístěn do aparatury (Hoefler) a přelit elektroforetickým pufrem. Po nanesení 15 µl vzorku do každé dráhy byl aplikován elektrický proud o intenzitě 80 V/cm po dobu 20 min, poté 120 V/cm dokud nedorazilo čelo ke spodnímu okraji gelu.

##### ***Western blot***

Po elektroforéze byl polyakrylamidový gel inkubován 10 minut v blotovacím pufrem. Poté byl gel umístěn do blotovací soupravy (Hoefler) a pomocí metody mokrého blotu byly proteiny přeneseny na nitrocelulózovou membránu (nitrocelulose-NC45, Serva). Přenos probíhal 3 hodiny při 250 mA.

### ***Imunodetekce***

Nitrocelulózová membrána byla blokována 30 minut v roztoku 5% odtučněného mléka v PBS a poté 1 hodinu inkubována s primární protilátkou. Po několikanásobném promytí v PBS byla membrána 30 minut inkubována se sekundární protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidázou. Primární i sekundární protilátka byly ředěny v 5% odtučněném mléce v PBS. Po intenzivním promytí v PBS byla membrána vyvolána pomocí reagentie Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific) a exponována na rentgenový film CP-BU NEW (Agfa).

### ***Barvení gelu***

Po western blotu byl polyakrylamidový gel obarven pomocí CBBG250, čímž se zviditelnily zbylé proteiny, které nebyly přeneseny na nitrocelulózovou membránu. Gel byl inkubován přes noc v barvicím roztoku a po obarvení několik hodin odbarvován promýváním v destilované vodě.

## **4.2.9 Práce s DNA**

### ***Izolace plazmidové DNA***

Pro izolaci plazmidové DNA byla používána komerční souprava XNAPS Plasmid FlexSpin Kit (Renogen Biolab Inc.). Monokolonie bakteriální kultury nesoucí plazmid byla zaočkována do LB média s příslušným antibiotikem (viz kapitola 4.2.9) a inkubována 16 hodin na třepače (200 rpm). Poté byla z bakteriální suspenze izolována plazmidová DNA podle protokolu přiloženého výrobcem.

DNA pro účely transfekce do savčích buněk byla izolována soupravou XNAPS Plasmid Endofree FlexSpin Kit (Renogen Biolab Inc.). Tímto byla zaručena preparace čisté plazmidové DNA bez kontaminace bakteriálním endotoxinem.

### ***Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA***

Koncentrace DNA v roztoku byla stanovena spektrofotometricky při 260 nm pomocí přístroje Nanodrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific).

### ***DNA elektroforéza***

DNA byla elektroforeticky dělena v 1% agarózovém gelu. Pro přípravu gelu bylo rozpuštěno příslušné množství agarózy v TBE pufru pomocí krátkého povaření. V případě preparativní elektroforézy byl použit TAE pufr. Po zchlazení na teplotu cca 50 °C byla přidána fluorescenční barva a roztok agarózy byl nalit do plastového bloku s hřebenem. Po zatuhnutí gelu byl blok vsazen do elektroforetické aparatury (multiSub Mini, Cleaver) a zalit TBE pufrem (TAE pufr, v případě preparativní elektroforézy). Na gel byl nanesen marker molekulových hmotností a vzorky smíchané s nanášecím pufrem (Orange DNA Loading Dye; Thermo Fisher Scientific). Elektroforéza probíhala zpravidla 60 minut při napětí 5 V/cm. Po elektroforetické separaci byl gel prohlédnut pomocí UV transluminátoru (BioLum).

### ***Štěpení DNA***

Pro analytické účely byl zpravidla štěpen 1 µg DNA v objemu 20 µl. Pokud byla restriční směs dále separována pomocí DNA elektroforézy a izolována z gelu, bylo štěpeno 5 µg DNA v objemu 50 µl. Složení restriční směsi, doba a teplota inkubace byla určena podle doporučení výrobce ([www.thermoscientificbio.com](http://www.thermoscientificbio.com)). Štěpení DNA při přípravě virového genomu bylo provedeno podle upraveného protokolu (viz příprava virového genomu).

#### Složení restriční směsi:

- x µl ddH<sub>2</sub>O
- 2-5 µl 10x doporučený pufr pro restriční endonukleázu
- 1-5 µg substrátová DNA
- 5-10 u/µg DNA restriční endonukleáza

konečný objem: 20-50 µl

Pokud byla DNA štěpena více restričními endonukleázami naráz, byl použit optimální pufr podle doporučení výrobce. Výsledek štěpení byl ověřen pomocí agarózové DNA elektroforézy.

### ***Defosforylace konců a ligace DNA***

Konce DNA molekul byly po restričním štěpení v některých případech defosforylovány pomocí FastAP termosenzitivní alkalické fosfatázy (Thermo Fisher Scientific). Reakční směs byla inkubována 10 minut při 37 °C. Enzym byl poté teplotně inaktivován 10 minut při 75 °C.

#### Složení reakční směsi:

- x µl ddH<sub>2</sub>O
- 1 µg linearizovaná plazmidová DNA
- \*2 µl 10x FastAP pufr
- 1 u FastAP

konečný objem: 20 µl

\*alternativně probíhala reakce v pufru restriční endonukleázy, ve kterém byla DNA před defosforylací štěpena

Při ligaci konců DNA byla použita T4 DNA ligáza (Thermo Fisher Scientific). Ligován byl zpravidla defosforylovaný vektor a DNA inzert v molárním poměru 1:3. Pokud byly ligovány DNA konce bez přesahů (tupé), byl do reakce přidán PEG 4000 a zvýšeno množství ligázy. Ligační směs byla inkubována přes noc při pokojové teplotě. Ligace DNA při přípravě virového genomu byla provedena podle upraveného protokolu (viz příprava virového genomu).

#### Složení směsi pro ligaci kohezních a tupých konců:

- x  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O
- 20-100 ng linearizovaný vektor
- x ng DNA inzert
- \*2  $\mu\text{l}$  50% PEG 4000
- 2  $\mu\text{l}$  10x DNA lig. pufr
- 1 u, \*5 u T4 DNA ligáza

konečný objem: 20  $\mu\text{l}$

\* ligace tupých konců

#### ***Izolace DNA z gelu***

Restrikční směs obsahující DNA fragment našeho zájmu byla separována pomocí agarózové DNA elektroforézy (viz DNA elektroforéza). Část gelu obsahující požadovaný fragment byla vyříznuta a DNA izolována pomocí komerční soupravy NucleoSpin® Extract II (Clontech). Postupováno bylo podle protokolu přiloženého výrobcem.

#### ***Polymerázová řetězová reakce (PCR)***

Metoda PCR byla využita k amplifikaci celého genomu myšího polyomaviru. Aby nedošlo k zanesení mutací do amplifikované DNA, byl použit enzym s vysokou efektivitou a přesností polymerace, Advantage® HD Polymerase (Clontech). Složení PCR reakce bylo následující:

#### Složení PCR reakce:

- x  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O
- 5  $\mu\text{l}$  5x Advantage HD Buffer (5mM MgCl<sub>2</sub>)
- 2  $\mu\text{l}$  směs dNTPs (2,5mM každý)
- 0,75  $\mu\text{l}$  primer 1 (10 $\mu\text{M}$ )
- 0,75  $\mu\text{l}$  primer 2 (10 $\mu\text{M}$ )
- 1  $\mu\text{l}$  plazmidová DNA (5 ng/ $\mu\text{l}$ )
- 0,25  $\mu\text{l}$  Advantage HD Polymerase (2,5 u/ $\mu\text{l}$ )

konečný objem: 25  $\mu\text{l}$



PCR reakce byly míchány na ledu a enzym byl do směsi přidán jako poslední. Amplifikace probíhala v přístroji Mastercycler EPgradient S (Eppendorf) s následujícím programem:

Program PCR reakce:

- počáteční denaturace - 95 °C, 1 minut
- denaturace - 98 °C, 10 sekund
- \*nasedání primerů - 50-60 °C, 5 sekund
- polymerace - 72 °C, 8 minut
- konenčná polymerace - 72 °C, 10 minut

\*při prvním použití primerů byl zpravidla testován gradient teplot 50, 55, 60 °C

***Příprava virového genomu***

Pro účely transfekce do savčích buněk byl genom myšího polyomaviru vyštěpen z plazmidu pMJG a religován do cirkulární formy, která je infekční. Štěpeno bylo 100 µg pMJG ve 400 µl restriční směsi pomocí enzymu EcoRI (30 U). Úspěšnost štěpení byla ověřena pomocí DNA elektroforézy (viz DNA elektroforéza). Restriční směs byla dále přečištěna fenol/chloroformovou extrakcí. DNA byla precipitována přidáním 2,5x objemu 96% ethanolu a 0,1x objemu 3M octanu sodného a inkubována v -20 °C přes noc. Vzniklá sraženina byla 30 min centrifugována (15000g, 4 °C) a sediment rozpuštěn ve 100 µl ddH<sub>2</sub>O. Koncentrace DNA byla stanovena spektrofotometricky. Následně byla namíchána ligační směs:

Složení ligační směsi:

- x ml ddH<sub>2</sub>O
- 1,4 ml T4 DNA lig. pufr
- 70 µg štěpená a přečištěná DNA
- 15 u T4 DNA ligáza

konečný objem: 14 ml

Ligace probíhala 18 hodin při teplotě 16 °C. Poté byla DNA opět srážena pomocí 2,5x objemu 96% ethanolu a 0,1x objemu 3M octanu sodného přes noc při -20 °C. Sraženina byla sedimentována pomocí centrifugace (30 000g, 2 hodiny při 4 °C). Vysušený sediment byl rozpuštěn ve 100 µl ddH<sub>2</sub>O a koncentrace DNA byla stanovena spektrofotometricky. Kvalita připravené směsi obsahující religovaný virový genom byla ověřena pomocí DNA elektroforézy (viz DNA elektroforéza).

### ***DNA sekvenace***

Správnost vytvořených DNA konstruktů byla ověřena pomocí sekvenační analýzy provedené servisním pracovištěm přírodovědecké fakulty, UK (Laboratoř sekvenace DNA). Sekvenační reakce byla analyzována pomocí přístroje 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

### **4.2.10 Práce s bakteriálními kulturami**

#### ***Kultivace a skladování bakterií***

Bakteriální kultury byly kultivovány v tekutém LB médiu na třepačce Duomax 1030 (Heidolph) při 200 rpm, nebo na agarových plotnách (LB médium + 15 g/l agar pro bakteriologii) v teplotě 37 °C. Doba kultivace byla zpravidla 16 hodin. Bakterie transformované rekombinantním plazmidem byly kultivovány v médiu s příslušným selekčním antibiotikem (ampicilin 100 mg/l). Pro kultivaci bakterií za účelem izolace plazmidové DNA byla zaočkována vždy čerstvě narostlá monoklonální kolonie. Krátkodobě byly bakterie rostoucí na pevném médiu skladovány při 4 °C. Pro dlouhodobé skladování byly vytvořeny bakteriální konzervy (700 µl kultury v LB médiu + 300 µl 50% glycerolu), které byly prudce zmrazeny v tekutém dusíku a uchovávány v -80 °C.

#### ***Transformace bakterií pomocí elektroporace***

Suspenze 50 µl elektrokompetentních bakterií byla pozvolna rozmrazena na ledu a smíchána s 1-2 µl DNA (10 ng plazmidové DNA). V případě ligační směsi byl použit 1 µl DNA. Suspenze byla přenesena do vychlazené Ø2mm elektroporační kyvety a elektroporována (2,5 kV, 200 µF, 5 sekund) pomocí přístroje Gene Pulser Apparatus (Bio-Rad). Poté byla buněčná suspenze převedena do 1 ml SOC média, třepána 1 hodinu při 37 °C a vyseta na bakteriální plotny v přiměřeném ředění (podle množství a charakteru elektroporované DNA).

# 5. Výsledky

## 5.1 Příprava Cre/loxP systému pro produkci MPyV

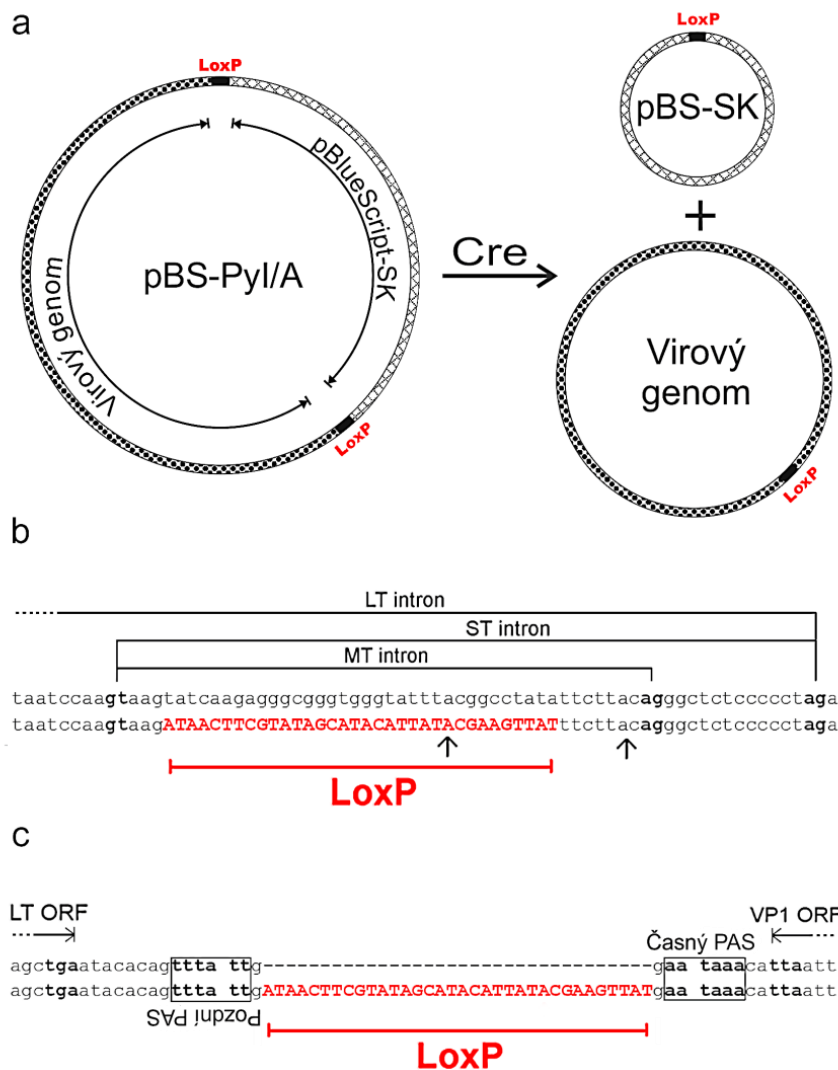
Pro produkci myšího polyomaviru v permisivních buňkách pomocí Cre/loxP systému bylo nejprve potřeba vytvořit rekombinantní vektor obsahující virový genom na obou koncích opatřený loxP místy (produkční plazmid). Prostřednictvím loxP míst může v buňkách exprimujících Cre rekombinázu dojít k rekombinaci, jejímž výsledkem je uvolnění virového genomu z nosičového plazmidu a jeho recirkularizace (**obr. 9a**). Takováto forma virové DNA je infekční a schopná v buňce tvořit viriony, které jsou poté uvolněny do prostředí.

### 5.1.1 Navržení produkčních plazmidů pBS-PyI a pBS-PyA

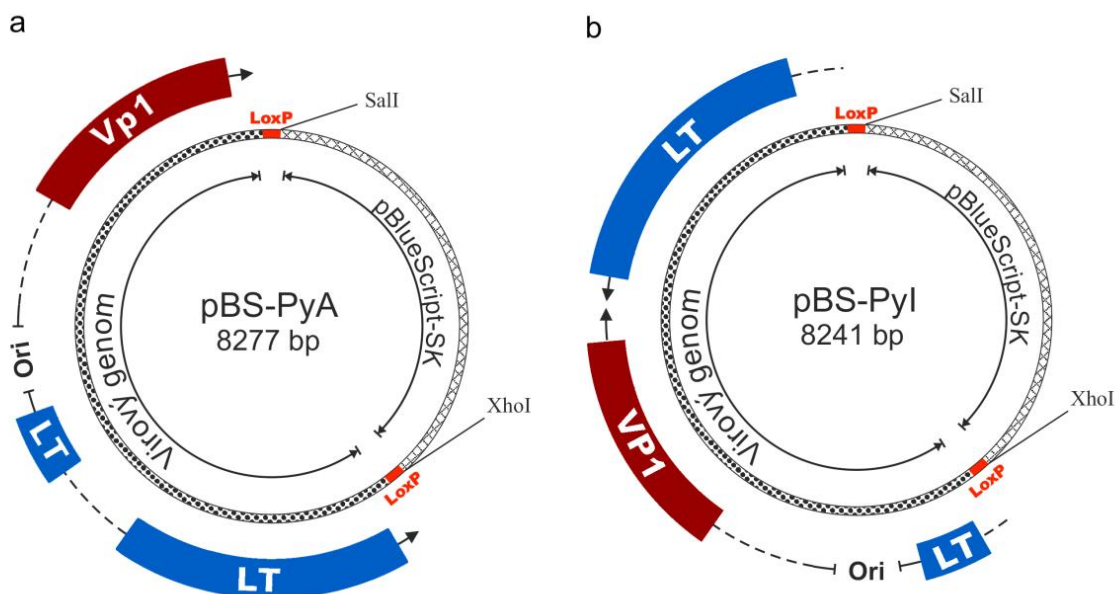
Výsledkem enzymatické reakce zprostředkované Cre rekombinázou je homologní rekombinace mezi dvěma loxP sekvencemi. To zapříčiňuje fakt, že po vyštěpení virové DNA z produkčního plazmidu dojde k uchování jednoho loxP místa v genomu viru (**obr. 9a**). Tato mutace je přenesena do vzniklého virového potomstva a může vést k narušení životního cyklu viru. Aby byla šance, že dojde ke snížení infekivity takto produkovaného viru co nejnižší, byla ve virovém genomu navržena dvě místa integrace loxP sekvence (**obr. 9b, c**). V těchto místech by nemělo dojít k narušení kódujících sekvencí ani regulačních oblastí viru.

První místo se nachází v intronové oblasti společné pro všechny tři časné mRNA (**obr. 9b**). Substituce loxP místa v této pozici zachovává veškeré známé sekvence účastníci se sestřihu mRNA časných genů včetně 3' a 5' sestřihového místa a tzv. bodu větvení (branch point) (Huang a Carmichael, 2009). Druhá pozice pro integraci loxP místa se nachází mezi překryvnými polyadenylačními sekvencemi (PAS) protisměrně orientovaných transkripčních jednotek časných a pozdních genů (Gu et al., 2009) (**obr. 9c**).

Pro obě varianty byly navrženy sady PCR primerů (**tab. 3**) umožňující namnožení lineární formy virové DNA, která je rozdělena buď v intronové oblasti časných genů (Py-I\_fw/rv) nebo v místě PAS (Py-A\_fw/rv). Tyto primery byly dále použity pro konstrukci dvou variant produkčních plazmidů označených pBS-PyI a pBS-PyA (**obr. 10**).



Obrázek 9. Princip Cre/loxP systému pro produkci MPyV. (a) Cre rekombinace. V buňkách kotransfekovaných produkčním plazmidem pBS-Pyl/A s vektorem exprimujícím Cre rekombinázu dochází ke Cre rekombinaci. Výsledkem je vyštěpení a recirkularizace virového genomu, což umožní jeho následnou replikaci a produkci virového potomstva. Černé čtverce znázorňují loxP sekvence umístěné v produkčních plazmidech na obou koncích virového genomu. Po rekombinaci dojde k zachování jednoho loxP místa ve vyštěpeném virovém genomu, druhé loxP místo je integrováno do vzniklého plazmidu pBlueScript-SK. Byla navržena dvě místa ve virovém genomu, vhodná pro včlenění loxP sekvence (b, c). (b) Substituce loxP místa do intronové oblasti společné pro všechny tři časné geny. Horní nukleotidová sekvence představuje intronovou oblast myšího polyomaviru divokého typu, dolní sekvence ukazuje substituci části intronu za loxP sekvenci (velká písmena). Bod větvení (tzv. branch point) a sestřihová místa všech tří intronů zůstávají zachována a jsou znázorněna šipkou a tučným písmem. (c) Inzerce loxP místa mezi PAS. Otevřené čtecí rámce časných a pozdních genů jsou vyznačeny šipkami. Na rozdíl od kódujících sekvencí, transkripty časných a pozdních genů se překrývají, což je způsobeno protisměrným umístěním PAS sekvencí. Horní sekvence představuje oblast PAS míst myšího polyomaviru divokého typu. Spodní sekvence ukazuje inzerce loxP místa mezi PAS.



Obrázek 10. Schéma produkčních plazmidů pBS-PyA a pBS-PyI. Plazmidy se skládají z bakteriálního vektoru pBlueScript-SK, který nese genom myšního polyomaviru oddělený z obou stran loxP místy (vyznačeno červeně). Za loxP sekvence jsou umístěna restrikční místa pro Sall, či XhoI endonukleázu. Ve virovém genomu je vyznačen počátek replikace (Ori) a geny kódující LT a VP1 protein. (a) pBS-PyA obsahuje virový genom rozdělený mezi PAS sekvencemi. (b) pBS-PyI obsahuje virový genom rozdělený v místě intronu časných genů.

### 5.1.2 Konstrukce plazmidů pBS-PyI a pBS-PyA

Pro konstrukci produkčních plazmidů pBS-PyI a pBS-PyA byl použit podobný přístup jako v práci Wang et al. (2009). Konstrukce probíhala v několika krocích, které zahrnovali: i) přípravu fragmentu dsDNA s dvěma loxP místy, ii) amplifikaci lineárních molekul plazmidu pMJG (**obr. 11b**), obsahujícího virový genom, iii) inzerci loxP fragmentu do virového genomu, iv) zaklonování virového genomu, opatřeného loxP místy, do plazmidu pBlueScript (**obr. 11a**).

Nejprve byl připraven fragment dvouřetězcové DNA (loxP-loxP) obsahující dvě stejnosměrně orientované loxP sekvence, které byly odděleny restrikčními místy pro enzymy XhoI, NotI a Sall.

Sekvence loxP-loxP dsDNA fragmentu (loxP místa podtržena):

ATAACTTCGTATAGCATAACATTATAACGAAGTTATCTCGAGGCGGCCGCGTCGACATAAC  
TTCGTATAGCATAACATTATAACGAAGTTAT

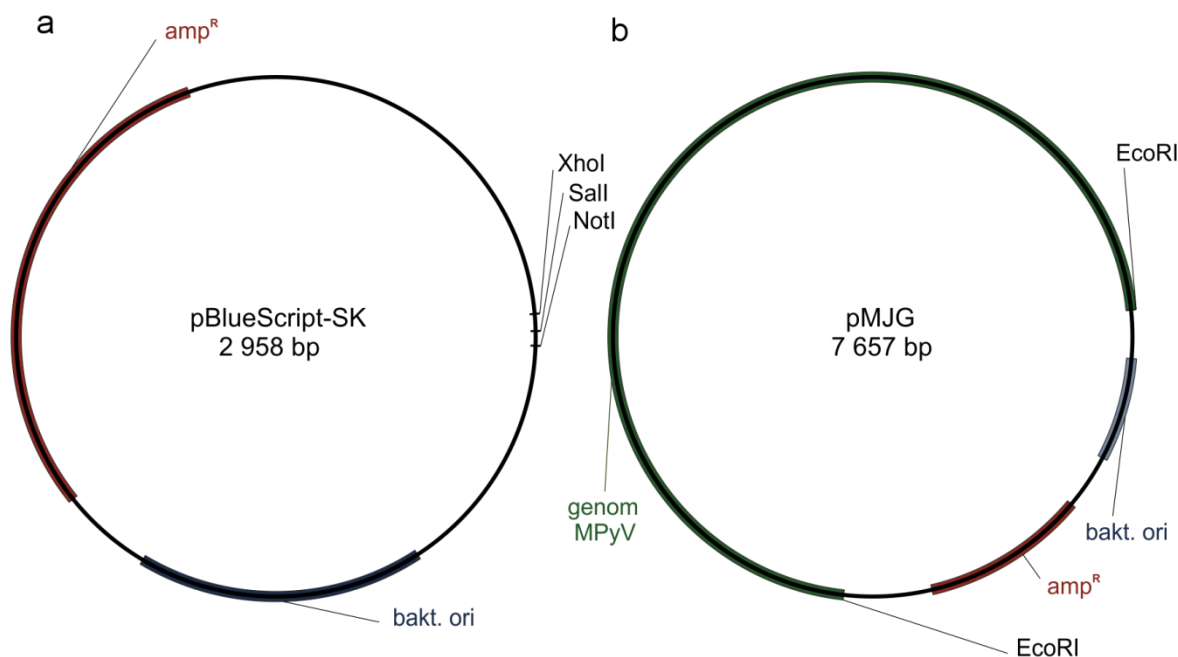
LoxP-loxP dsDNA jsem připravil hybridizací dvou jednořetězcových oligonukleotidů, které byly na 5' konci fosforylovány. Hybridizováno bylo 300 pmol každého oligonukleotidu v 30  $\mu$ l HD pufru po dobu 5 hodin při kontinuálně klesající teplotě z 99 na 25  $^{\circ}$ C. Teoretický výtěžek

hybridizace činil 0,61 µg/µl dsDNA (Mw jednoho páru nukleotidů = 700 g/mol). Reálná koncentrace dsDNA byla stanovena spektrofotometricky a činila 0,21 µg/µl.

Plazmid pMJG, obsahující genom myšího polyomaviru, byl amplifikován pomocí PCR. Pro konstrukci pBS-PyI byly použity primery *Py-I\_fw*, *Py-I\_rv* a pro konstrukci pBS-PyA byly použity primery *Py-A\_fw*, *Py-A\_rv*. Při PCR došlo k amplifikaci lineární DNA obsahující nosičový plazmid a virovou DNA rozdělenou buď v intronové oblasti časných genů (*Py-I\_fw/rv*), nebo v místě PAS (*Py-A\_fw/rv*).

Obdržený PCR produkt byl poté ligován s loxP-loxP inzertem (ligace tupých konců). Tím došlo k vytvoření upraveného plazmidu pMJG, který nesl virový genom s inzercí loxP-loxP fragmentu v příslušném místě. Výsledná ligační směs byla elektroporována do bakterií. Z vyselektovaných bakteriálních monoklonií byla izolována plazmidová DNA. Správnost klonovaného konstruktů byla ověřena pomocí restriční analýzy a plazmidová DNA z 3 pozitivních kolonií byla dále sekvenována. K sekvenaci byly použity primery *pMJG-966\_rv* (pro ověření pBS-PyI) a *pMJG-5322\_rv* (pro ověření pBS-PyA). Po srovnání sekvenačních dat s teoretickou sekvencí se mi podařilo u obou variant klonovaného plazmidu ověřit jeho správnost.

Takto připravený konstrukt byl dále odděleně štěpen enzymy EcoRI a XhoI, nebo EcoRI a NotI. Tím jsem docílil vyštěpení dvou fragmentů virového genomu, každý opatřený na jednom konci loxP místem. Oba fragmenty byly elektroforeticky rozděleny, izolovány z gelu a společně ligovány do bakteriálního vektoru pBlueScript-SK linearizovaného pomocí enzymů XhoI a NotI. Tím došlo k vytvoření produkčního plazmidu pBS-PyI nebo pBS-PyA, který nese genomovou sekvenci myšího polyomaviru opatřenou loxP místy na obou koncích (**obr. 10**). Po elektroporaci ligační směsi do kompetentních bakterií se mi podařilo vyselektovat monoklonální kolonie nesoucí bezchybně ligované obě varianty produkčních plazmidů. Správnost konstruktů byla ověřena restriční analýzou a sekvenací DNA. Jako sekvenační primery byly použity *pMJG-740\_fw*, *T3* (pro pBS-PyI) a *pMJG-4108\_rw*, *M13\_fw*, *M13\_rv* (pro pBS-PyA).



Obrázek 11. Schéma rekombinantních vektorů použitých při konstrukci produkčních plazmidu pBS-PyA/I. (a) Vektor bakteriálního typu pBlueScript-SK. Vyobrazeno je přibližné umístění použitých restrikčních míst, bakteriálního počátku replikace (bakt. ori) a ampicilinové rezistence (amp<sup>R</sup>). (b) Vektor bakteriálního typu pMJG nesoucí genomovou sekvenci MPyV. Vyobrazeno je přibližné umístění použitých restrikčních míst, bakteriálního počátku replikace (bakt. ori), ampicilinové rezistence (amp<sup>R</sup>) a genomu MPyV. O těchto vektorech viz také kapitola 4.1.2.

## 5.2 Ověření účinnosti Cre/loxP systému pro produkci MPyV

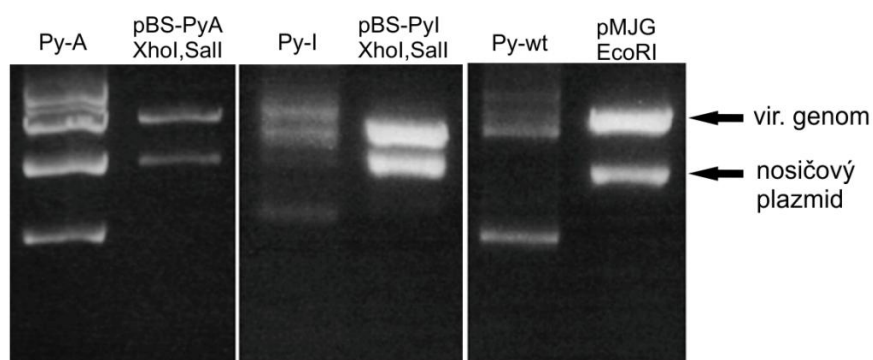
### 5.2.1 Příprava virového genomu pomocí *in vitro* religace

Aby mohl být nově navržený systém na produkci polyomaviru otestován, připravil jsem příslušné pozitivní kontroly ve formě *in vitro* religovaného virového genomu. Kromě genomové DNA viru divokého typu (Py-wt) byl připraven také virový genom obsahující loxP sekvence v intronové oblasti časných genů (Py-I) a v oblasti mezi PAS sekvencemi (Py-A).

K přípravě virové DNA divokého typu byl použit plazmid pMJG, který obsahuje genom myšího polyomaviru vložený v unikátním restrikčním místě pro EcoRI. Tento plazmid byl tedy štěpen pomocí restrikční endonukleázy EcoRI. Štěpená DNA byla posléze naředěna a ligována. Naředění směsi je nezbytné pro podpoření intramolekulární ligační reakce, která vede k tvorbě intaktního virového genomu. Výsledná ligační směs obsahovala recirkularizovaný virový genom a vedlejší produkty ligace, které zahrnují: kruhovou formu nosičového plazmidu, znovu uzavřený virový genom v plazmidu a různé formy konkatemerů virové DNA a plazmidu. Kvalita takto

připraveného virového genomu, tj. míra znečištění vedlejšími produkty ligace, byla ověřena pomocí DNA elektroforézy (**obr. 12**).

Příprava genomů obsahujících loxP sekvence byla provedena obdobně. Jako zdroj virové DNA byl použit plazmid pBS-PyI (příprava varianty virového genomu Py-I), či pBS-PyA (příprava varianty Py-A). Pro vyštěpení virového genomu z plazmidu byly využity restriktivní místa (XhoI, Sall) vnesená za loxP sekvence nacházející se na obou stranách virové DNA (**obr. 10**). Po religaci štěpené DNA jsem tedy obdržel kruhovou formu virového genomu, který obsahoval sekvenci dvou loxP míst, buď v intronové oblasti časných genů (Py-I), nebo mezi PAS sekvencemi (Py-A). U obou variant byla pomocí DNA elektroforézy ověřena kvalita přípravy virového genomu (**obr. 12**). Nutno poznamenat, že tyto produkty se liší od virového genomu generovaného pomocí Cre rekombinace z konstruktů pBS-PyI/A, kde dochází k vnesení pouze jednoho loxP místa. Při použití Py-I a Py-A jako pozitivní kontroly je tedy třeba brát tento fakt na zřetel.



Obrázek 12. Ověření kvality virového genomu religovaného *in vitro*. Ligační směsi obsahující religovaný virový genom Py-A, Py-I a Py-wt byly elektroforeticky rozděleny v 1% agarózovém gelu. Pro přibližné určení produktů ligační směsi byly elektroforeticky rozděleny také plazmidy použité k přípravě ligačních směsí (pBS-PyA/I a pMJG) štěpené XhoI a Sall, či EcoRI. Poloha vyštěpeného virového genomu a prázdného nosičového plazmidu je znázorněna šipkami.



## 5.2.2 Transfekce pBS-Py-I/A do buněk a analýza exprese virových proteinů

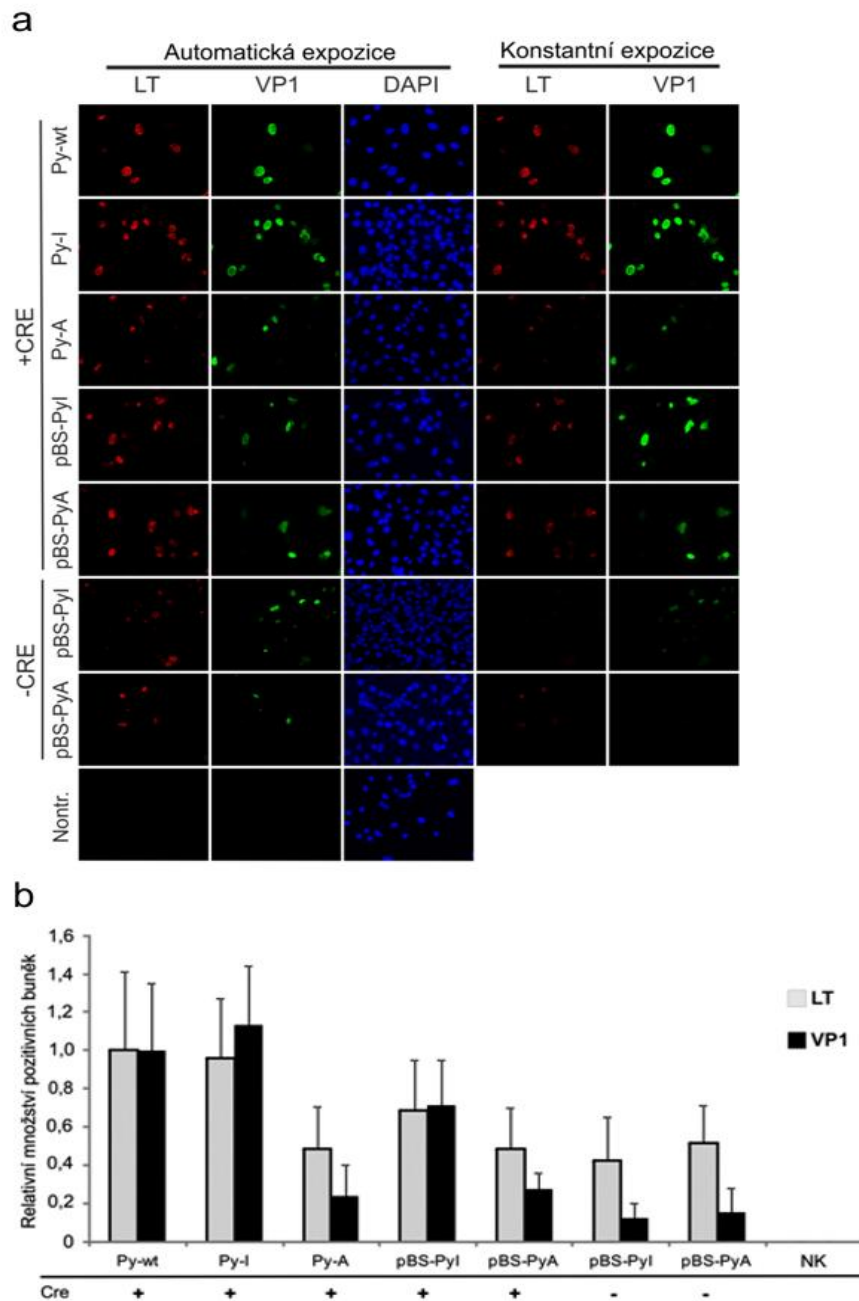
Pro ověření produkce viru pomocí Cre/loxP systému jsem kotransfekoval plazmid pBS-PyI, nebo pBS-PyA s vektorem pPuro.Cre empty, exprimujícím Cre rekombinázu, (značeno jako + Cre) do permisivní buněčné linie myších fibroblastů 3T6. Jako negativní kontrola byly transfekovány produkční plazmidy pBS-PyI/A bez přítomnosti Cre rekombinázy. V těchto podmínkách by nemělo docházet k tvorbě infekčního virového genomu, a tudíž ani produkci virového potomstva. Jako pozitivní kontrola byla transfekována virová DNA divokého typu připravená *in vitro* (Py-wt) a také její varianty nesoucí loxP sekvence v intronové oblasti časných genů (Py-I) a mezi PAS signály (Py-A). Tyto varianty virového genomu byly brány jako analogie k DNA vzniklé z plazmidů pBS-PyI/A pomocí rekombinace. Přehled veškeré DNA, která byla při experimentech transfekována do buněk, znázorňuje **tabulka 4**.

Tabulka 4. Přehled DNA molekul transfekovaných do savčích buněk.

Název	Typ DNA	Množství	Cre <sup>a</sup> (3 µg)	Výsledek po transfekci
<b>Py-wt</b>	virový genom religovaný <i>in vitro</i>	3 µg	+	genom divokého typu
<b>Py-I</b>	virový genom religovaný <i>in vitro</i>	3 µg	+	genom s dvojicí loxP v intronové oblasti
<b>Py-A</b>	virový genom religovaný <i>in vitro</i>	3 µg	+	genom s dvojicí loxP mezi PAS sekvencemi
<b>pBS-PyI</b>	plazmid	3 µg	+	genom s jedním loxP v intronové oblasti
		6 µg	-	původní plazmid, obr. 10b
<b>pBS-PyA</b>	plazmid	3 µg	+	genom s jedním loxP mezi PAS sekvencemi
		6 µg	-	původní plazmid, obr. 10a

<sup>a</sup> Kotransfekce plazmidem exprimujícím Cre rekombinázu (pPuro.Cre empty)

Abych určil, zda včlenění loxP místa do virového genomu ovlivňuje expresi virových proteinů v transfekovaných buňkách, provedl jsem imunofluorescenční detekci velkého T antigenu (LT) a majoritního kapsidového proteinu (VP1), viz **obr. 13a**. Přítomnost LT antigenu je důkazem toho, že virová DNA dosáhla jádra a je schopna transkribovat časné geny, zatímco VP1 protein je hlavním markerem pozdní fáze virové infekce a tudíž i replikace virového genomu (viz kapitola 3.1.2). Buňky vyšetě na sklíčka a fixované paraformaldehydem 24 hodin po transfekci jsem barvil protilátkami  $\alpha$ PyLT1 (anti-LT) a  $\alpha$ PyVP1-D4 (anti-VP1). Při pořizování fotografií byla kamera nastavena na mód autoexpozice nebo konstantní expozice (tj. parametry nastaveny manuálně na konstantní hodnotu pro všechny snímky).



Obrázek 13. Imunofluorescenční analýza exprese virových proteinů v transfekovaných buňkách. Transfekce byly provedeny podle Tabulky 4. Produkční plasmidy pBS-PyI/A a virové genomy religované *in vitro* (Py-wt, Py-I, Py-A) byly kotransfekovány s vektorem exprimujícím Cre rekombinázu do 3T6 buněk. Jako negativní kontrola byly transfekovány samotné produkční plasmidy. Buňky byly fixovány 24 hodin po transfekci. Pro detekci virových proteinů LT a VP1 byly použity primární protilátky  $\alpha$ PyLT1 a  $\alpha$ PyVP1-D4. Fotografie byly pořízeny jak v módu automatické expozice, tak i konstantní expozice (a). U vzorků bylo spočítáno procentuální zastoupení buněk pozitivních na LT a VP1 protein (podíl pozitivních buněk z celkového počtu buněk). Tyto hodnoty jsou vyneseny v grafu (b) jako relativní množství pozitivních buněk vztažené ke vzorku Py-wt. Množství pozitivních buněk ve vzorku transfekovaném Py-wt je tedy zastoupeno hodnotou 1 na ose y. Pro každý vzorek bylo spočítáno nejméně 2000 buněk. Chybové úsečky představují směrodatnou odchylku mezi počítanými poli u každého vzorku. NK - netransfekované buňky

Analýza dat z imunofluorescence ukázala, že z virového genomu generovaného *in vitro* i *in vivo* dochází k expresi jak LT, tak VP1 proteinu. Avšak u vzorku transfekovaného Py-A variantou byla intenzita signálu výrazně nižší (**obr. 13a ,auto- vs. konstantní expozice**). Podobný výsledek byl pozorován i u buněk kotransfekovaných produkčním plazmidem pBS-PyA a pPuro.Cre. Na rozdíl od toho po transfekci pBS-PyI v přítomnosti Cre rekombinázy byla intenzita LT a VP1 signálu srovnatelná s pozitivní kontrolou Py-wt. Pokud byly buňky transfekovány produkčními plazmidy pBS-PyI/A bez vektoru eximujícím Cre rekombinázu, byl pozorován slabý, ale zřetelný signál LT i VP1 proteinu (**obr. 13a, autoexpozice**). Tento výsledek je zajímavý především u plazmidu pBS-PyI, kde je virový genom rozdělen nosičovým plazmidem v intronu LT. Přítomnost LT antigenu byla navíc testována protilátkou vážící C-konec tohoto proteinu, což naznačuje, že dochází k sestříhu celého intronu, obsahujícího téměř 3 000 bp dlouhý vektor pBlueScript-SK.

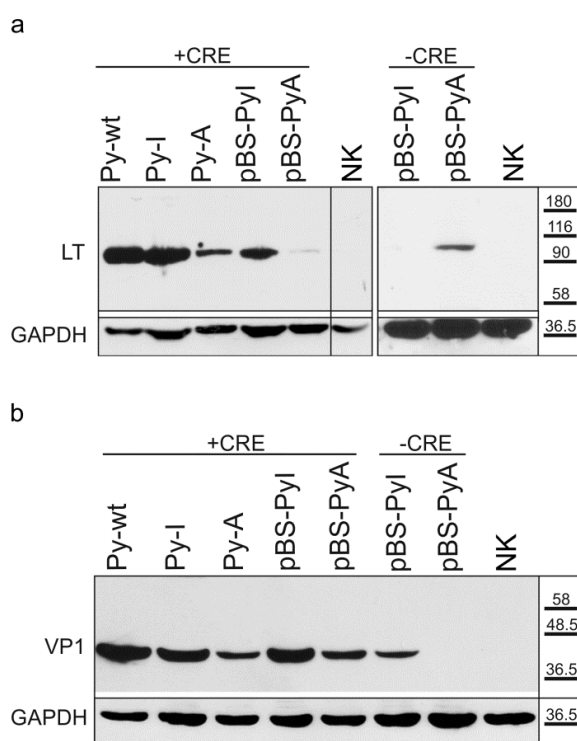
Pro kvantifikaci těchto dat bylo u každého vzorku spočítáno procentuální zastoupení pozitivních buněk (podíl pozitivních buněk z celkového počtu buněk), které jsem dále normalizoval hodnotou obdrženu po transfekci Py-wt (**obr. 13b**). Buňky transfekované Py-I variantou virového genomu obsahovaly srovnatelné množství buněk pozitivních na LT i VP1 jako transfekce Py-wt. U vzorku kotransfekovaného plazmidy pBS-PyI a pPuro.Cre jsem pozoroval přibližně 70% zastoupení pozitivních buněk na LT a VP1 ve srovnání s transfekcí Py-wt. Na druhou stranu jsem však pozoroval výrazně nižší počet pozitivních buněk u transfekce Py-A varianty virového genomu. U tohoto vzorku se navíc vyskytoval značný rozdíl mezi procentuálním zastoupením buněk pozitivních na LT a buněk pozitivních na VP1 protein. Tento trend vykazoval i vzorek kotransfekovaný plazmidy pBS-PyA a pPuro.Cre.

Výsledky poukazují na to, že včlenění loxP místa do intronové oblasti časných genů nebrání přirozené produkci proteinů z virového genomu (**obr. 13b, Py-wt vs. Py-I**). Dále je zřejmé, že v přítomnosti Cre rekombinázy dochází k tvorbě intaktního virového genomu, což umožňuje expresi virových genů (**obr. 13b, pBS-PyI+Cre vs. -Cre**). Nicméně se také ukazuje, že inserce loxP místa mezi PAS signály virového genomu negativně ovlivňuje expresi jak LT, tak VP1 proteinu (viz **obr. 13b, Py-A, pBS-PyA+Cre**). To naznačuje, že tato modifikace vede k vážnému narušení virového replikačního cyklu, a varianta plazmidu pBS-PyA tudíž není k produkci viru vhodná.

Z důvodu ověření předešlých výsledků a přesnější kvantifikace množství proteinů exprimovaných z virového genomu jsem analyzoval transfekované buňky pomocí metody western blot. Buňky byly transfekovány (**viz tab. 4**) a po dvou dnech sklizeny. Lyzáty buněk byly rozděleny pomocí SDS-PAGE a přeneseny na membránu, kde byly s využitím specifických protilátek detekovány virové proteiny LT (**obr. 14a**) a VP1 (**obr. 14b**). V souladu s výsledky z imunofluorescenční analýzy jsem pozoroval normální produkci intaktního VP1 a LT u buněk transfekovaných virovou DNA s loxP místem v intronu časných genů (Py-I). U vzorku

kotransfekovaného produkčním plazmidem pBS-PyI s vektorem exprimujícím Cre, kde dochází k tvorbě virového genomu pomocí rekombinace, byla produkce proteinů LT a VP1 oproti transfekci Py-wt jen nepatrně nižší. Nicméně množství LT a VP1 bylo výrazně nižší u buněk transfekovaných virovou DNA obsahující loxP místo mezi PAS. Ještě razantnější snížení jsme pozorovali ve vzorku, kde byla tato varianta virového genomu generována pomocí Cre rekombinace (pBS-PyA +Cre).

K produkci virových proteinů docházelo i v buňkách transfekovaných produkčními plazmidy v nepřítomnosti Cre rekombinázy. Konkrétně u plazmidu pBS-PyI jsem detekoval nízkou hladinu proteinu VP1, avšak žádný LT. To naznačuje, že nosičový plazmid pBlueScript, který se u konstruktů pBS-PyI nachází v intronu časných genů, výrazně snižuje efektivitu sestříhu LT antigenu. Hladina intaktního proteinu v buňkách je tedy pod detekčním limitem použité metody. V případě vzorku transfekovaného plazmidem pBS-PyA bez Cre rekombinázy byla situace opačná. K produkci malého množství LT antigenu docházelo, VP1 protein však detekován nebyl.



Obrázek 14. Analýza exprese virových proteinů v transfekovaných buňkách pomocí metody western blot. Transfekce byla provedena podle tabulky 4. Produkční plazmidy pBS-PyI/A a virové genomy religované *in vitro* (Py-wt, Py-I, Py-A) byly kotransfekovány s vektorem exprimujícím Cre rekombinázu do 3T6 buněk. Jako negativní kontrola byly transfekovány samotné produkční plazmidy. Buňky byly sklizeny 2 dny po transfekci a produkce LT (a) a VP1 (b) proteinu byla ověřena pomocí metody western blot. Imunodetekce byla provedena s využitím primárních protilátek  $\alpha$ PyC1 (LT) a  $\alpha$ PyVP1-A (VP1). NK - netransfekované buňky.

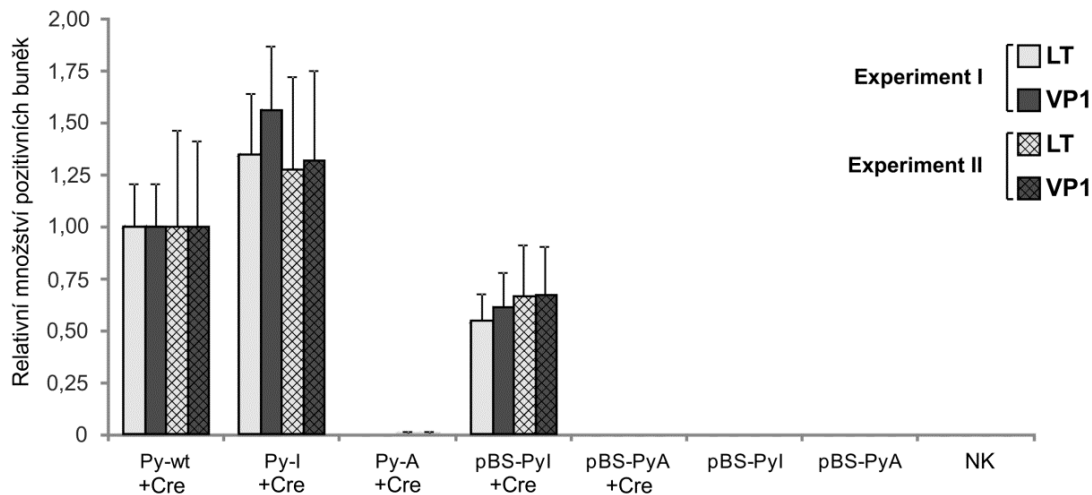
### 5.2.3 Produkce viru pomocí Cre/loxP systému

Abych ověřil, zda dochází pomocí navrženého systému k tvorbě infekčního viru, a zda je účinnost jeho produkce dostatečná, provedl jsem následující experiment. Buňky 3T6 byly transfekovány podle **tabulky 4**. Po šesti dnech byly společně s médiem sklizeny a lyzovány opakovaným zmražením a rozmražením. Buněčné debris bylo odstraněno centrifugací a supernatant byl použit jako virové inokulum. Tím jsem infikoval buňky, které byly vysety na krycí sklíčka předešlý den. 48 hodin po infekci byly buňky fixovány a imunofluorescenčně značeny na virové proteiny LT a VP1. U každého vzorku bylo vypočítáno procento buněk pozitivních na LT a VP1 (podíl pozitivních buněk z celkového počtu buněk). Výsledek byl dále normalizován na procentuální zastoupení pozitivních buněk ve vzorku infikovaném inokulem, které bylo obdrženo z buněk transfekovaných virovou DNA divokého typu (Py-wt). Tyto hodnoty, které odpovídají infekčnímu titru příslušného inokula, jsem vynesl do grafu (**obr. 15**). Procentuální zastoupení pozitivních buněk ve vzorku Py-wt činilo 38 % (LT) a 23 % (VP1); po nezávislém opakování experimentu pak 24 % (LT) a 22 % (VP1). V grafu jsou tyto hodnoty reprezentovány číslem 1 na ose y.

Varianta virového genomu Py-I se ukázala být infekční. Výtěžek produkovaného viru byl dokonce o něco vyšší než u virového genomu divokého typu (**Obr. 15, Py-I**). Pokud byly buňky infikovány virem produkovaným z plazmidu pBS-PyI pomocí Cre rekombinázy, pozoroval jsem přibližně 60 % buněk pozitivních na LT a VP1 oproti viru divokého typu (**obr. 15, pBS-PyI + Cre**). Pokud byl pBS-PyI transfekován bez vektoru exprimujícího Cre rekombinázu, žádný virus dle očekávání produkován nebyl (**obr. 15, pBS-PyI**).

Jak naznačovaly předchozí výsledky, buňky transfekované variantou virového genomu Py-A či produkčním plazmidem pBS-PyA netvořily infekční virus (**obr. 15, Py-A, pBS-PyA + Cre**), a to ani v přítomnosti Cre rekombinázy.

Z těchto výsledků vyplývá, že přítomnost loxP místa v intronové oblasti časných genů nemá výrazný negativní dopad na infektivitu viru, varianta produkčního plazmidu pBS-PyI je tedy použitelná pro produkci virionů pomocí navrženého systému. Na druhou stranu z plazmidu pBS-PyA nejsem schopen produkovat infekční virus, což je způsobeno defektem ve virovém replikačním cyklu v důsledku inserce loxP místa mezi polyadenylační sekvence virového genomu.



Obrázek 15. Efektivita produkce viru pomocí Cre/loxP systému. Buňky byly transfekovány podle tabulky 4. Produkční plazmidy pBS-PyI/A a virové genomy religované *in vitro* (Py-wt, Py-I, Py-A) byly kotransfekovány s vektorem exprimujícím Cre rekombinázu do 3T6 buněk. Jako negativní kontrola byly transfekovány samotné produkční plazmidy. Virus byl izolován 6 dní po transfekci a použit pro infekci 3T6 buněk, narostlých na sklíčkách. Buňky byly fixovány a imunofluorescenčně značeny 48 hodin po infekci. Pro detekci virových proteinů byly použity primární protilátky  $\alpha$ PyLT1 (detekce LT) a  $\alpha$ PyVP1-D4 (detekce VP1). U vzorků bylo spočítáno procentuální zastoupení buněk pozitivních na LT a VP1 protein (podíl pozitivních buněk z celkového počtu buněk). Tyto hodnoty jsou vyneseny v grafu jako relativní množství pozitivních buněk vztažené ke vzorku Py-wt. Množství pozitivních buněk ve vzorku Py-wt je tedy zastoupeno hodnotou 1 na ose y. V grafu jsou zobrazeny dva nezávislé experimenty. Pro každý vzorek bylo spočítáno nejméně 1000 buněk. Chybové úsečky představují směrodatnou odchylku mezi počítanými poli u každého vzorku. NK - falešně infikované buňky.

### 5.3 Další charakterizace systému pro produkci MPyV

Abych nově navržený systém pro produkci viru lépe charakterizoval, bylo třeba zjistit optimální množství produkčního plazmidu, kotransfekovaného do buněk společně s vektorem exprimujícím Cre rekombinázu. Lze si totiž představit možnost, že příliš velké množství transfekovaného produkčního plazmidu může podpořit další Cre rekombinaci již uvolněného virového genomu (obsahujícího jedno loxP) s původním plazmidem. Dále bylo také potřeba stanovit optimální dobu, po které z transfekovaných buněk izolovat virus. Z těchto důvodů jsem provedl následující experiment, ve kterém nebyl testován produkční plazmid pBS-PyA, jež se na základě předchozích výsledků (**obr. 15**) ukázal být pro produkci viru nepoužitelný.

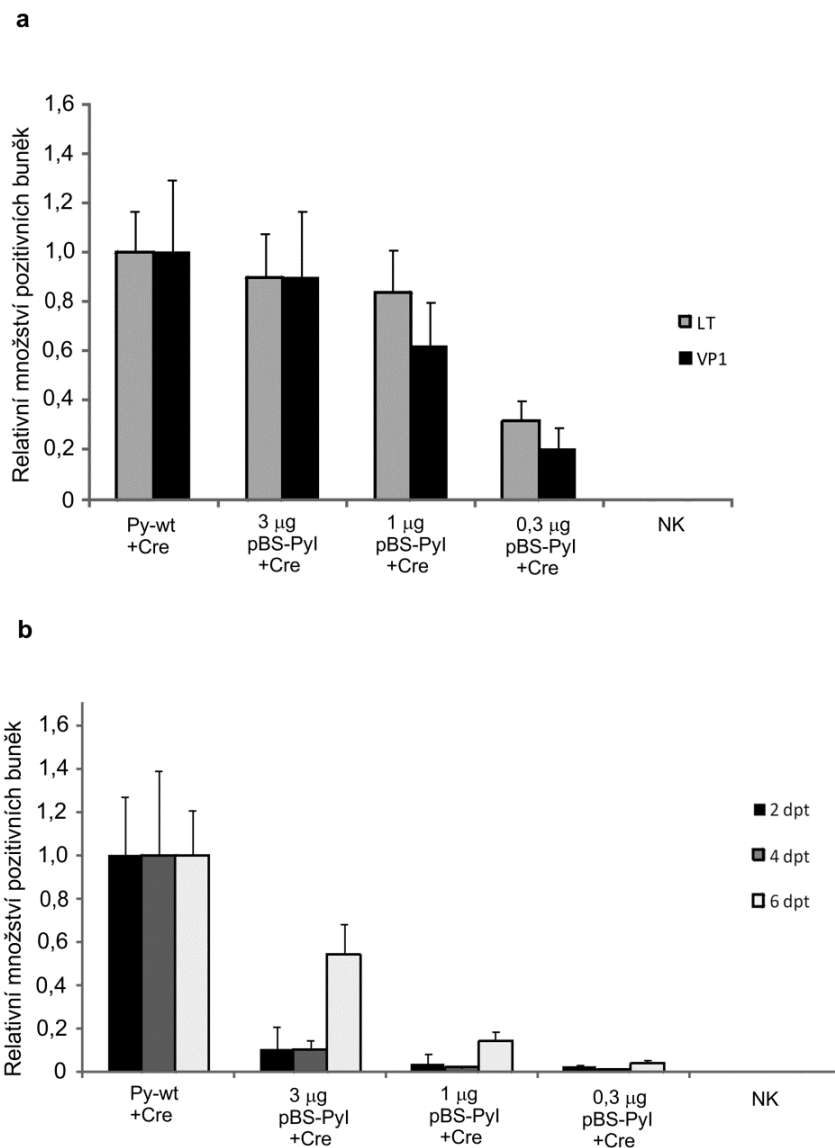
Buňky 3T6 byly kotransfekovány vektorem exprimujícím Cre rekombinázu a virovým genomem divokého typu připraveným *in vitro* (Py-wt, 3  $\mu$ g) či produkčním plazmidem pBS-PyI o různém množství (3, 1 a 0,3  $\mu$ g). Nejvyšší množství transfekované DNA tedy činilo 6  $\mu$ g, což je pro zvolenou metodu maximální doporučená hranice. Buňky byly fixovány 24 hodin

po transfekci a imunofluorescenčně značeny na virové proteiny LT a VP1. U každého vzorku bylo spočítáno procentuální zastoupení buněk exprimujících virové proteiny. Hodnoty byly normalizovány procentuálním zastoupením pozitivních buněk ve vzorku Py-wt + Cre a vyneseny do grafu na **obrázku 16a**. Tímto experimentem byla ověřena účinnost transfekce v jednotlivých vzorcích. Ve vzorku transfekovaném 3  $\mu\text{g}$  produkčního plazmidu byl počet VP1 a LT pozitivních buněk srovnatelný s transfekcí virové DNA divokého typu (Py-wt). Při snížení množství transfekovaného produkčního plazmidu došlo také k poklesu počtu pozitivních buněk. U transfekce 0,3  $\mu\text{g}$  produkčního plazmidu bylo množství LT a VP1 pozitivních buněk přibližně 30 % oproti transfekci Py-wt.

Buňky byly dále společně s médiem sklizeny (2, 4 a 6 dní po transfekci) a lyzovány opakovaným zmražením a rozmražením. Buněčné debris bylo odstraněno centrifugací a supernatant byl použit jako virové inokulum. Tím byly infikovány buňky vyseté na podložní sklíčka. Buňky byly fixovány a imunofluorescenčně značeny na virový protein LT 48 hodin po infekci. U každého vzorku bylo vypočítáno procentuální zastoupení pozitivních buněk (podíl pozitivních buněk z celkového množství buněk), které odpovídalo infekčnímu titru použitého inokula. Výsledek byl dále normalizován na zastoupení pozitivních buněk ve vzorku infikovaném divokým virem (inokulum obdržené z buněk kotransfekovaných Py-wt a pPuro.Cre). Tyto hodnoty byly vyneseny do grafu (**obr. 16b**).

U vzorků infikovaných divokým virem činilo zastoupení pozitivních buněk 2 dny po infekci 3 %, 4 dny po infekci 32 % a 6 dní po infekci 38 %. V grafu (**obr. 16b**) jsou tyto hodnoty reprezentovány číslem 1 na ose y. Hodnoty u ostatních vzorků tudíž představují množství infikovaných buněk vztahované ke vzorku infikovaného divokým virem, který byl izolován v příslušném čase po transfekci (2, 4 či 6 dní). Inokulum sklizené 2 a 4 dny po kotransfekci 3  $\mu\text{g}$  pBS-PyI a pPuro.Cre vykazovalo velmi nízký infekční titr (10 % infikovaných buněk oproti divokému viru). V případě transfekce 1 a 0,3  $\mu\text{g}$  bylo obdrženo inokulum s ještě nižším počtem infekčních částic (přibližně 2 % infikovaných buněk oproti divokému viru). Pokud bylo z buněk kotransfekovaných pBS-PyI a pPuro.Cre virové inokulum sklizené 6 dní po infekci, došlo k razantnímu zvýšení infekčního titru. Ten činil v případě transfekce 3  $\mu\text{g}$  pBS-PyI 55 % oproti inokulu divokého viru. V případě transfekce 1 a 0,3  $\mu\text{g}$  produkčního plazmidu byl výtěžek infekčního viru výrazně nižší, avšak 6 dní po transfekci byla opět patrná tendence "přiblížit se" infekčnímu titru inokula divokého viru.

Z výsledků tedy vyplývá, že snížení množství transfekovaného produkčního plazmidu pBS-PyI nevede k účinnější produkci infekčního viru. Naopak, v důsledku poklesu efektivity transfekce je množství vzniknuvšího viru nižší. Dále je patrné, že produkce viru z pBS-PyI je oproti transfekci virové DNA divokého typu zpomalena, přičemž toto zpoždění se zmenšuje až 6 dní po transfekci.

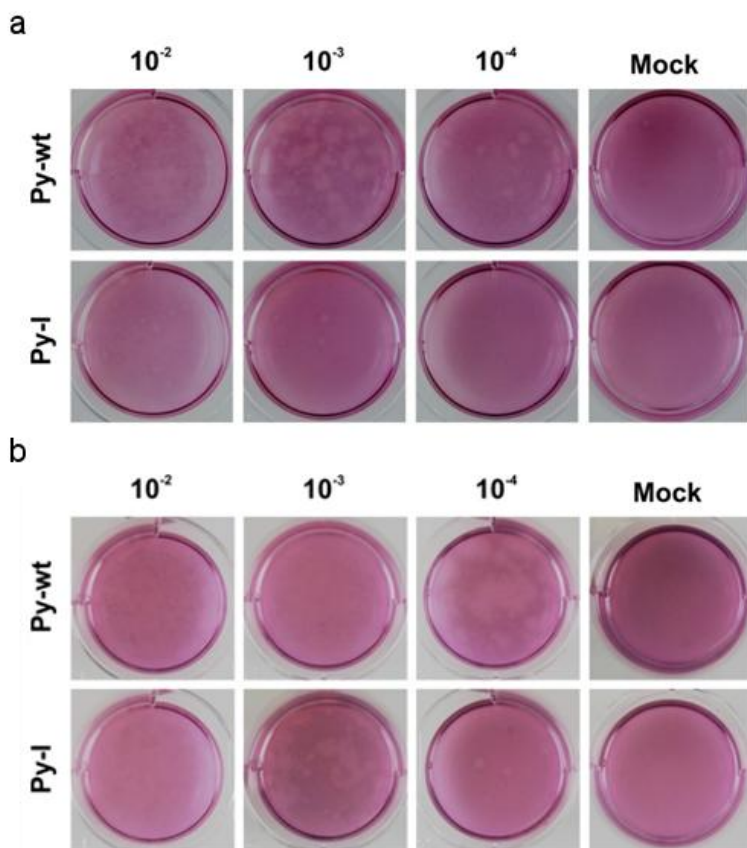


Obrázek 16. Optimalizace systému pro produkci viru. a) Ověření efektivity transfekce. Buňky 3T6 byly kotransfekovány vektorem exprimujícím Cre rekombinázu a virovým genomem divokého typu připraveným *in vitro* (Py-wt, 3 µg) či produkčním plazmidem pBS-Pyl o různém množství (3, 1 a 0,3 µg). Buňky byly fixovány 24 hodin po transfekci a imunofluorescenčně značeny na virové proteiny LT (protilátka  $\alpha$ PyLT1) a VP1 (protilátka  $\alpha$ PyVP1-D4). U vzorků bylo spočítáno procentuální zastoupení buněk pozitivních na LT a VP1 protein (podíl pozitivních buněk z celkového počtu buněk). Tyto hodnoty jsou vyneseny v grafu jako relativní množství pozitivních buněk vztahované ke vzorku Py-wt + Cre. Pro každý vzorek bylo spočítáno nejméně 2000 buněk. Chybové úsečky představují směrodatnou odchylku mezi počítanými poli u každého vzorku. NK - netransfekované buňky. b) Stanovení účinnosti produkce viru. Buňky byly sklizeny společně s médiem 2, 4 a 6 dní po transfekci. Z nich bylo připraveno virové inokulum použité pro infekci 3T6 buněk narostlých na sklíčkách. Ty byly fixovány a imunofluorescenčně značeny na LT antigen ( $\alpha$ PyLT1) 48 hodin po infekci. U vzorků bylo spočítáno procentuální zastoupení buněk exprimujících LT protein. Tyto hodnoty byly vyneseny do grafu jako relativní množství vztahované ke vzorku Py-wt + Cre. Pro každý vzorek bylo spočítáno nejméně 2000 buněk. Chybové úsečky představují směrodatnou odchylku mezi počítanými poli u každého vzorku. NK - falešně infikované buňky.



S virovým inokulem sklizeným 6 dní po transfekci byla provedena také plaková zkouška. Ta je často využívána pro ověření kvality virového inokula. V důsledku cytopatického efektu viru dojde na vrstvě infikovaných buněk k tvorbě plaků, které jsou zpravidla odvozeny od jedné infikované buňky. Velikost plaků tedy odráží efektivitu a rychlost infekce testovaného viru.

Inokulum bylo izolováno z buněk kotransfekovaných virovým genomem připraveným *in vitro* (Py-wt a Py-I) a pPuro.Cre, produkčním plazmidem pBS-PyI a pPuro.Cre či médiem bez viru, sloužícím jako negativní kontrola. Buňky MEF, narostlé na 6cm miskách, byly infikovány různým ředěním inokula a zality agarovým médiem, které zamezilo difuzi virionů produkovaných v průběhu infekce. Vzniknuvší plaky byly u buněk pozorovány 7 (**obr. 17a**) a 10 dní po infekci (**obr. 17b**). Vzorky infikované inokulem obdržným po kotransfekci pBS-PyI a pPuro.Cre bohužel nebylo možno vyhodnotit z důvodu chyby v průběhu experimentu.



Obrázek 17. Plaková zkouška virového inokula. Z buněk 3T6 transfekovaných virovým genomem divokého typu (Py-wt) či virovým genomem s inzercí dvou loxP míst v intronové oblasti časných genů (Py-I) bylo po 6 dnech izolováno virové inokulum. Buňky MEF, narostlé na 6cm miskách, byly infikovány různým ředěním tohoto inokula ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ) nebo médiem bez viru (Mock) a zality agarovým médiem. Vzorky byly barveny vitálním barvivem a vyhodnoceny 7 (a) a 10 dní po infekci (b).

Sedm dní po infekci inokulem Py-wt byl patrný rozvoj plaků ve všech třech zobrazených ředěních ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ). U vzorků infikovaných inokulem Py-I bylo po sedmi dnech pozorováno jen několik menších plaků (ředění  $10^{-2}$  a  $10^{-3}$ ), nikoliv však u ředění  $10^{-4}$ . Deset dní po infekci inokulem Py-wt došlo k výraznému nárůstu počtu a velikosti plaků ve všech ředěních. U vzorků infikovaných inokulem Py-I došlo také k značnému rozvoji plaků v ředění  $10^{-2}$  a  $10^{-3}$ ; v ředění  $10^{-4}$  bylo patrných několik menších plaků.

Z výsledků je zřejmé, že inokulum viru s vloženým úsekem dvou loxP míst (Py-I) je schopno tvorby plaků, avšak v nižší míře než virus divokého typu. To naznačuje, že inserce loxP místa do intronové části časných genů mírně, avšak prokazatelně, ovlivňuje virovou infektivitu.

## **5.4 Využití buněčné linie se stabilní expresí Cre rekombinázy pro produkci MPyV**

Nutnost kotransfekovat vektor exprimující Cre rekombinázu společně s produkčním plazmidem značně ztěžuje užívání navrženého systému v praxi a teoreticky také snižuje jeho efektivitu. Z těchto důvodů bylo potřeba připravit permisivní buněčnou linii, která stabilně exprimuje Cre rekombinázu. Takováto linie by zaručila produkci viru po transfekci samotného produkčního plazmidu. K tomuto účelu byly použity dvě buněčné linie permisivní pro MPyV: 3T6 a Wop. Wop je buněčná linie, která stabilně exprimuje LT antigen myšího polyomaviru. To umožňuje replikaci a následnou produkci virových mutantů defektních v LT.

### **5.4.1 Konstrukce vektoru exprimujícího Cre rekombinázu**

Pro konstrukci plazmidu exprimujícího Cre rekombinázu byl použit vektor pNIT. Ten zajišťuje regulovanou expresi transgenů pomocí tet-off systému. V přítomnosti doxycyklinu nedochází v plazmidu k expresi cílového genu. Navíc je tento plazmid opatřen retrovirovými LTR (Long Terminal Repeat) úseky, což zajišťuje jeho integraci do buněčného genomu. Varianta plazmidu s regulovanou expresí byla zvolena po zjištění, že konstitutivní produkce Cre rekombinázy v savčích buňkách vede k jejich negativní selekci (nepublikované výsledky). To způsobuje postupné naředení linie exprimující Cre rekombinázu populací buněk, které tento transgen již neprodukuje.

Gen pro Cre rekombinázu byl vyštěpen z plazmidu pPuro.Cre empty pomocí restričních endonukleáz PvuII a SmaI. Oba enzymy generují tupé konce DNA. Po štěpení byla restriční směs přečištěna pomocí DNA agarózové elektroforézy a izolací z gelu. Fragment kódující Cre rekombinázu společně s C-koncovou WPRE stabilizační sekvencí (1860 bp) byl poté zaklonován do plazmidu pNIT (linearizovaný enzymem PmeI a defosforylovaný) pomocí ligace tupých

konců DNA. Ligační směs byla elektroporována do kompetentních bakterií. Z vyselektovaných bakteriálních monoklonií byla izolována plazmidová DNA. Totožnost klonovaného konstruktů a správná orientace vloženého genu byla ověřena pomocí restriční analýzy. Zkonstruovaný plazmid je dále označován jako pNIT-Cre.

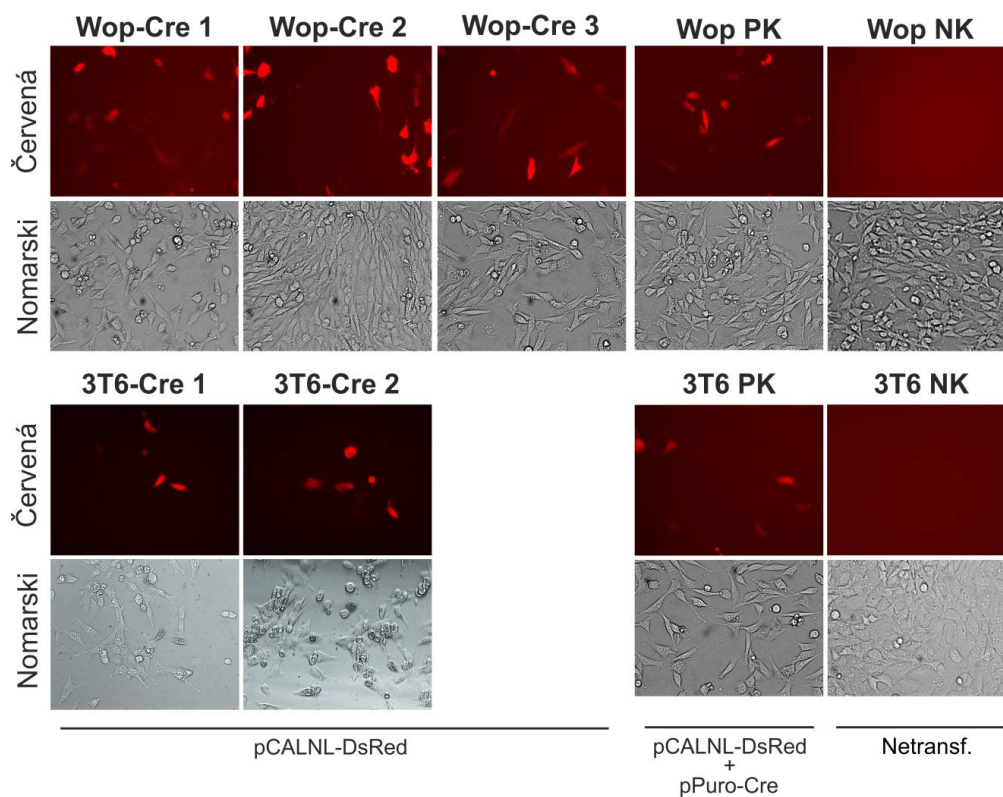
#### **5.4.2 Selektce stabilně transfekované buněčné linie s inducibilní expresí Cre rekombinázy**

Aby mohly být efektivně selektovány pouze transfekované buňky, byla předem stanovena účinná koncentrace antibiotika G418, jehož rezistenci plazmid pNIT-Cre nese. Buněčné linie 3T6 a Wop byly kultivovány po dobu dvou týdnů v médiu s různou koncentrací antibiotika. Účinná koncentrace odpovídá nevyššímu ředění antibiotika, ve kterém došlo do dvou týdnů k vyhubení všech buněk. U buněčné linie 3T6 činila tato koncentrace 800 µg/ml, u linie Wop 400 µg/ml.

Expresní plazmid pNIT-Cre byl transfekován do buněk 3T6 a Wop pomocí nukleofekce. Transfekované buňky byly selektovány pomocí antibiotika G418. Po selekci jsem obdržel stabilně transfekované buněčné monokolonie - tj. monoklonální linie, které nesou plazmid pNIT-Cre integrovaný v genomu. Tyto linie byly izolovány, uchovány v tekutém dusíku a testovány na expresi Cre rekombinázy.

Protože nebyla k dispozici fungující protilátka vážící Cre rekombinázu, bylo nutno stanovit přítomnost tohoto proteinu v selektovaných buněčných liniích pomocí kontrolního plazmidu pCALNL-DsRed. Tento plazmid obsahuje reportérový gen kódující fluorescenční protein DsRed. Produkce DsRed se spustí pouze v přítomnosti Cre rekombinázy, což je umožněno rekombinací v promotorové oblasti reportérového genu (Cre-dependentní aktivace promotoru). Tato metoda bohužel nemůže sloužit k absolutní kvantifikaci buněk pozitivních na Cre rekombinázu, neboť nelze přesně stanovit efektivitu transfekce kontrolního plazmidu v konkrétním experimentu.

Přibližně 20 vyselektovaných monoklonálních linií od každého buněčného typu (Wop a 3T6) bylo testováno na přítomnost Cre rekombinázy. Buňky byly transfekovány kontrolním plazmidem pCALNL-DsRed pomocí reagentie TurboFect. Jako pozitivní kontrola byl do původních, nemanipulovaných, buněčných linií 3T6 a Wop kotransfekován pCALNL-DsRed společně s plazmidem exprimujícím Cre rekombinázu (pPuro.Cre empty). Zastoupení buněk pozitivních na Cre rekombinázu bylo u všech klonů vyhodnoceno 24 hodin po transfekci pomocí fluorescenční mikroskopie. U linie Wop jsem obdržel 3 klony a u linie 3T6 pouze 2 klony pozitivní na Cre rekombinázu (**obr. 18**). Z výsledků bohužel nelze určit přesné procentuální zastoupení pozitivních buněk v jednotlivých liniích. V případě pozitivní kontroly byly buňky kotransfekovány dvěma plazmidy (pCALNL-DsRed+pPuro.Cre) a testované linie byly transfekovány pouze kontrolním plazmidem pCALNL-DsRed. V důsledku rozdílné efektivnosti transfekce poskytuje srovnání jednotlivých vzorků s pozitivní kontrolou pouze orientační informaci o kvalitě transgenní linie.

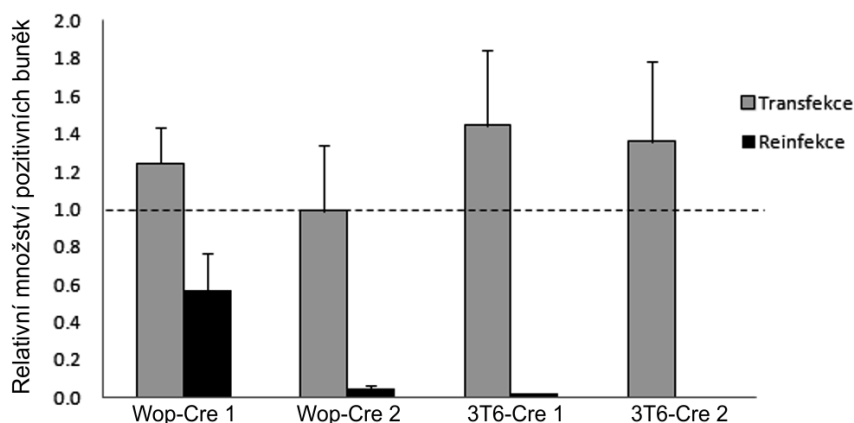


Obrázek 18. Test Wop a 3T6 buněčných linií s regulovanou expresí Cre rekombinázy. Buněčné linie 3T6 a Wop byly transfekovány vektorem s regulovanou expresí (tet-off) Cre rekombinázy - pNIT-Cre. Klony exprimující Cre rekombinázu byly selektovány. Pro ověření přítomnosti Cre rekombinázy byly buňky transfekovány kontrolním plazmidem pCALNL-DsRed v nepřítomnosti doxycyklinu (spuštěná exprese transgenu). Na obrázku jsou ukázány reprezentativní snímky pozitivních monoclonií (Wop-Cre 1/2/3, 3T6-Cre 1/2) 24 hodin po transfekci kontrolního plazmidu. PK – 3T6 či Wop buňky kotransfekované pCALNL-DsRed a pPuro.Cre Empty, NK – netransfekované buňky.

### 5.4.3 Ověření účinnosti produkce viru v buňkách se stabilní expresí Cre rekombinázy

Zvolil jsem dvě stabilně exprimující monoklonální linie Wop (Wop-Cre 1, 2) a 3T6 buněk (3T6-Cre 1, 2), které jsem dále použil k produkci viru pomocí navrženého Cre/loxP systému.

Do buněk byl pomocí nukleofekce transfekován produkční plazmid pBS-PyI (6 µg) nebo virový genom Py-wt (6µg), který sloužil jako pozitivní kontrola. Aby byla ověřena úspěšnost transfekce, byly buňky 24 hodin po transfekci fixovány a imunofluorescenčně značeny na virové proteiny. U 3T6 buněk byl detekován LT antigen, Wop buňky však musely být značeny na VP1 protein, neboť LT exprimují přirozeně a nezávisle na přítomnosti viru. U každého vzorku byl spočítán podíl buněk pozitivních na virové proteiny z celkového počtu buněk. Hodnoty byly normalizovány procentuálním zastoupením pozitivních buněk ve vzorcích transfekovaných Py-wt a vyneseny do grafu (**obr. 19, šedé sloupce**). Hodnota 1 na ose y tedy znázorňuje zastoupení pozitivních buněk u transfekce Py-wt. Výsledky ukazují, že účinnost transfekce produkčního plazmidu byla srovnatelná s transfekcí Py-wt, či dokonce vyšší.



Obrázek 19. Efektivita produkce viru v buňkách se stabilní expresí Cre-rekombinázy. Produkční plazmid pBS-PyI a virový genom religovaný *in vitro* Py-wt byly transfekovány do buněčných linií Wop-Cre 1, 2 a 3T6-Cre 1, 2. Buňky byly fixovány a imunofluorescenčně značeny 24 hodin po transfekci. U 3T6 buněk byl detekován LT antigen ( $\alpha$ PyLT1), Wop buňky byly značeny na VP1 protein ( $\alpha$ PyVP1-D4). U vzorků byl spočítán podíl buněk pozitivních na LT či VP1 z celkového počtu buněk. Hodnoty byly normalizovány na zastoupení pozitivních buněk ve vzorku transfekovaném Py-wt a vyneseny do grafu (transfekce, šedé sloupce). Z transfekovaných buněk byl dále izolován virus (6 dní po transfekci), který byl použit pro infekci 3T6 buněk, narostlých na sklíčkách. Buňky byly fixovány a imunofluorescenčně značeny na LT antigen 48 hodin po infekci. U vzorků byl spočítán podíl infikovaných buněk z celkového počtu buněk. Hodnoty byly normalizovány na zastoupení pozitivních buněk ve vzorku infikovaném divokým virem (inokulum obdržené z buněk transfekovaných Py-wt) a vyneseny do grafu (reinfekce, černé sloupce). Přerušovaná čára, označující hodnotu 1 na ose y, představuje zastoupení pozitivních buněk ve vzorku transfekovaném Py-wt nebo ve vzorku infikovaném virem divokého typu. Pro každý vzorek bylo spočítáno nejméně 2000 buněk. Chybové úsečky představují směrodatnou odchylku mezi počítanými poli u každého vzorku.

Transfekované buňky byly dále společně s médiem sklizeny (6 dní po transfekci) a lyzovány opakovaným zmražením a rozmražením. Buněčné debris bylo odstraněno centrifugací a supernatant byl použit jako virové inokulum. Tím byly infikovány 3T6 buňky, vyseté na podložní sklíčka. 48 hodin po infekci byly buňky fixovány a imunofluorescenčně značeny na virový protein LT, který byl zvolen jako marker infikovaných buněk. U každého vzorku byl spočítán podíl infikovaných buněk z celkového počtu buněk. Hodnoty byly normalizovány na zastoupení pozitivních buněk ve vzorku infikovaném divokým virem (inokulum obdržené z buněk transfekovaných Py-wt) a vyneseny do grafu (**obr. 19, černé sloupce**). U vzorků infikovaných divokým virem činilo zastoupení pozitivních buněk 45 % a 43 % (u linií Wop-Cre 1 a 2) či 25 % a 66 % (u linií 3T6-Cre 1 a 2). V grafu (**obr. 19**) jsou tyto hodnoty reprezentovány číslem 1 na ose y. Jako negativní kontrola byly použity netransfekované buňky.

Pomocí buněčné linie Wop-Cre 1 transfekované produkčním plazmidem bylo vyprodukováno 57 % infekčního viru oproti transfekci Py-wt. Tato hodnota je srovnatelná s výsledkem obdrženým po kotransfekci produkčního plazmidu s vektorem exprimujícím Cre

rekombinázu do čisté linie 3T6 buněk (**obr. 15**). Předpokládané zvýšení efektivity produkce viru s použitím buněčné linie stabilně exprimující Cre rekombinázu tedy dosaženo nebylo. Ostatní buněčné linie exprimující Cre rekombinázu nebyly schopny z produkčního plazmidu vyprodukovat více než 5% množství infekčního viru ve srovnání s buňkami transfekovanými Py-wt. Pro efektivní produkci viru v praxi jsou tedy nepoužitelné.

# 6. Diskuze

## 6.1 Produkce MPyV pomocí Cre/loxP rekombinace

V této práci jsem připravil nový experimentální systém pro produkci myšího polyomaviru a jeho mutant *in vivo*, který je plnohodnotnou alternativou k běžně používané metodě. Pro tvorbu viru v buňkách je zapotřebí pouze přítomnost Cre rekombinázy, jež virový genom vyštěpí z produkčního plazmidu pomocí rekombinace. Potenciální omezením je skutečnost, že po Cre rekombinaci dochází k vložení jednoho loxP místa do vzniknuvšího virového genomu.

Produkční plazmid pBS-PyI byl navržen tak, aby generoval virový genom se substitucí loxP místa v intronové oblasti společné pro všechny tři časné geny. Pokud jsem tento plazmid kotransfekoval do permisivní buněčné linie společně s vektorem exprimujícím Cre rekombinázu, došlo k tvorbě virového genomu. Tomu napovídá výrazně zvýšená exprese virových proteinů, pozorovaná u kotransfekovaných buněk, oproti vzorku bez Cre rekombinázy. Na Cre rekombinaci byla také striktně závislá produkce infekčního viru z tohoto plazmidu. Jak se předpokládalo, virový genom uzavřený v nosičovém plazmidu byl neinfekční.

Pomocí Cre rekombinázy jsem byl schopen z produkčního plazmidu pBS-PyI generovat řádově srovnatelné množství infekčního viru jako u běžně používané metody, kdy je do buněk transfekován virový genom připravený *in vitro*. Identita produkovaného viru byla ověřena dalšími členy laboratoře pomocí elektronové mikroskopie a PCR (Hron et al., 2013). Substituce loxP místa ve virovém genomu tedy nevedla ke ztrátě infekтивности. Z výsledků také vyplývá, že nedošlo k znatelnému narušení exprese virových proteinů LT a VP1. Metoda přípravy viru pomocí plazmidu pBS-PyI je vysoce reprodukcibilní a její efektivita činí přibližně 60 % oproti běžné metodě, pokud je virus z buněk izolován šest dní po transfekci.

Výtěžek virové produkce pomocí navrženého systému je potenciálně omezený z několika možných důvodů. Teoreticky je tvorba viru z produkčního plazmidu zdržena (oproti transfekci virového genomu připraveného *in vitro*) o dobu potřebnou k expresi Cre rekombinázy. To by mohlo vysvětlovat opoždění, patrné při izolaci viru z transfekovaných buněk v různých časech. Dva a čtyři dny po transfekci bylo ve srovnání s běžnou metodou dosaženo pouze 10% výtěžku produkce viru, šest dní po transfekci však výtěžek systému vzrostl na zmiňovaných 60 %. Po šesti dnech bylo pravděpodobně zpoždění způsobené expresí Cre rekombinázy částečně setřeno.

Produkce viru pomocí Cre/loxP systému je také výrazně omezena efektivitou kotransfekce produkčního plazmidu s vektorem exprimujícím Cre rekombinázu. Jak se ukazuje (Ma et al., 2007), kotransfekce dvou různých expresních plazmidů do savčích buněk je problematická

a významná populace buněk vykazuje expresi pouze jednoho transgenu. To, že výtěžek viru je závislý na efektivitě transfekce, dokládají také výsledky experimentu, při kterém bylo pozorováno úměrné snížení efektivity produkce viru po transfekci menšího množství produkčního plazmidu.

V účinnosti virové produkce pomocí pBS-PyI se samozřejmě může odrazit také snížená infektivita vznikajícího viru, který ve svém genomu obsahuje loxP místo. Ač se zdá, že exprese virových proteinů LT a VP1 nebyla narušena a virus byl bez problémů produkován, některé výsledky naznačují, že k částečnému snížení infekтивности přeci jen došlo. Pro vyloučení faktorů souvisejících s Cre rekombinací jsem použil kontrolu ve formě virového genomu obsahujícího zdvojené loxP místo v intronu časných genů připraveného *in vitro* (Py-I). Plaková zkouška inokula izolovaného z buněk transfekovaných Py-I ukázala, že k rozvoji plaků došlo později, tj. jejich počet a velikost byly ve stejném časovém okamžiku menší, než u viru divokého typu. Pokud uvážíme výsledky imunofluorescenční analýzy (kde nebyl pozorován nižší infekční titr viru Py-I izolovaného šest dní po transfekci oproti Py-wt), dá se předpokládat, že inokulum Py-I obsahovalo srovnatelný počet infekčních částic jako inokulum viru divokého typu. Rozdíl byl však v pomalejším průběhu infekce viru Py-I, který vedl k tvorbě viditelných plaků v pozdějším čase. Tento efekt se neprojevil změnou infekčního titru inokula zřejmě proto, že šest dní po transfekci již došlo k infekci všech buněk vyšetých na misce jak virem divokého typu, tak virem Py-I. Další produkce viru divokého typu byla tedy omezena a zpoždění mutantního viru Py-I bylo srovnáno.

V případě viru produkovaného pomocí plazmidu pBS-PyI bylo sice včleněno pouze jedno loxP místo (nikoliv dvě, jako u Py-I), nicméně další výsledky v naší laboratoři (Španielová, nepublikovaná data) ukazují, že k obdobnému efektu při plakové zkoušce přesto dochází.

Virus, produkovaný pomocí Cre/loxP systému, je tedy v budoucnu třeba přesněji charakterizovat. Vložená loxP sekvence sice nezasahuje do čtecího rámce žádného virového proteinu, ale může vést k problematickému sestřihu časných transkriptů, a tím ovlivnit jejich expresi. Odpověď by mohla poskytnout například analýza exprese MT a ST antigenu.

Kromě pBS-PyI byl vytvořen a testován také produkční plazmid pBS-PyA, který generoval virový genom s inzercí loxP místa mezi PAS sekvence časných a pozdních genů. Experimenty však ukazují, že tato varianta produkčního plazmidu nebyla schopna tvořit infekční virus. Úplná ztráta infekтивности viru byla způsobena výhradně inzercí loxP místa, neboť virový genom s loxP místem připravený *in vitro* (Py-A) vykazoval stejný defekt. Toto zjištění bylo překvapivé, neboť veškeré známé sekvence polyomavirů nezbytné pro terminaci transkripce se nacházejí mimo oblast včlenění loxP místa (Batt a Carmichael, 1995). Gu et al. (2009) také popisují plně infekční mutantu myšího polyomaviru, která obsahuje syntetickou PAS sekvenci, vloženou místo PAS pozdních genů.



Jak Py-A, tak i virový genom generovaný z pBS-PyA pomocí Cre rekombinace měl dále výrazně narušenou expresi LT a VP1 proteinu. Hladina LT antigenu byla 24 hodin po transfekci oproti divokému viru razantně snížena. VP1 protein se však produkoval, což by mohlo naznačovat, že k replikaci virového genomu docházelo (Liu a Carmichael, 1993). Cílem mojí práce nebylo stanovit příčinu ztráty infekтивности této virové mutanty, nicméně její budoucí studium by mohlo napomocť lepšímu pochopení mechanismů polyomavirového replikačního cyklu. Obdržené výsledky naznačují, že k vstupu do pozdní fáze virové infekce docházelo dříve, než byla dosažena potřebná hladina LT antigenu. Přítomnost loxP místa tedy mohla způsobit defekt v regulaci „přepnutí“ mezi časnou a pozdní fází virové infekce. Podle předpokládaného modelu regulace přechodu do pozdní fáze polyomavirové infekce hraje překrývající se oblast časných a pozdních genů klíčovou úlohu v deregulaci exprese LT antigenu (Gu et al., 2009). Vložením loxP místa mezi PAS sekvence časných a pozdních genů došlo k rozšíření oblasti jejich překryvu, což by mohlo umocnit deregulaci exprese LT antigenu a iniciovat předčasný vstup do pozdní fáze virové infekce. Je však pravděpodobné, že pouze tento efekt by nevedl k úplné ztrátě infekтивности viru, která byla u Py-A viru pozorována. Pro odhalení primární příčiny by bylo potřeba nejprve zjistit, zda dochází k produkci virových částic, případně proč nejsou schopny infikovat další buňky. Jednou z příčin vzniku neinfekčních virionů by mohlo být například narušení exprese minoritních kapsidových proteinů, které jsou pro produktivní infekci nezbytné (Mannová et al., 2002; Sahli et al., 1993).

## 6.2 Využití stabilně transfekovaných buněk s expresí Cre rekombinázy

Pro produkci myšího polyomaviru pomocí Cre/loxP systému je potřeba v použité buněčné linii zajistit vysokou hladinu exprese Cre rekombinázy, která je schopná z plazmidu pBS-PyI vyštěpit intaktní virový genom. Jednou z možností je transienční transfekce expresním vektorem nesoucím gen pro Cre rekombinázu. V takovémto případě však musí být expresní vektor kotransfekován společně s produkčním plazmidem, což komplikuje rutinní využití systému a také teoreticky snižuje jeho efektivitu. Tyto omezení mohou být řešeny pomocí stabilně transfekovaných buněčných linií. V mé práci jsem připravil a otestoval transgenní buněčné linie Wop a 3T6, schopné inducibilní exprese Cre rekombinázy. Variantu s inducibilní expresí jsem zvolil po zjištění, že konstitutivní produkce Cre rekombinázy v buňkách vede k jejich negativní selekci (nepublikované výsledky). To způsobuje postupné naředení linie exprimující Cre rekombinázu populací buněk, které tento transgen již neprodukují. Negativní selekce transgenní linie je nejspíše zapříčiněna cytotoxicitou Cre rekombinázy, což je v souladu s dříve publikovanými výsledky (Loonstra et al., 2001).

Přítomnost funkční Cre rekombinázy v připravených transgenních liniích jsem ověřil pomocí kontrolního vektoru pCALNL-DsRed (Matsuda a Cepko, 2007), který je schopen exprimovat reportérový gen pouze po Cre rekombinaci v jeho promotorové oblasti. Tento způsob však poskytl jen orientační informaci o čistotě transgenní linie, neboť výsledek byl zkreslen proměnlivou efektivitou transfekce. Přesné určení procentuálního zastoupení buněk exprimujících transgen by bylo možné s použitím specifické protilátky, která však nebyla k dispozici.

Ze čtyř testovaných buněčných linií exprimujících Cre rekombinázu (2xWop a 2x3T6) byl pouze u jedné obdržen uspokojivý výtěžek vyprodukovaného viru z plazmidu pBS-PyI. Ten činil 57 % oproti produkci viru pomocí genomu religovaného *in vitro*. Byla tedy dosažena srovnatelná efektivita jako v případě transientní transfekce vektoru exprimujícího Cre rekombinázu. Pro skutečnost, že nedošlo k předpokládanému zvýšení výtěžku produkovaného viru, navrhuji několik vysvětlení. i) Použité transgenní linie mohly obsahovat významný podíl buněk s narušenou expresí či funkcí Cre rekombinázy. K tvorbě virového genomu tedy došlo pouze v malém procentu buněk transfekovaných produkčním plazmidem, což vedlo k nízké produkci viru. Pro ověření této hypotézy by bylo potřeba přesně stanovit čistotu transgenní linie pomocí specifické protilátky. ii) Shodný výtěžek produkce viru z pBS-PyI jak pomocí transientní exprese Cre rekombinázy, tak i s využitím transgení buněčné linie může naznačovat, že bylo dosaženo maximální efektivity systému. Proč však byla účinnost systému takto omezena, není jasné. Výsledky, diskutované v kapitole 6.1, naznačují, že zpomalení infekce u viru s loxP místem v intronové oblasti nemělo vliv na efektivitu produkčního systému, pokud byl virus z buněk izolován v dostatečně dlouhé době po transfekci (6 dní po transfekci). Omezený výtěžek produkovaného viru by tedy mohl souviset spíše s efektivitou Cre/loxP rekombinace. Je známo, že aktivita promotoru použitého pro transientní expresi Cre rekombinázy v buněčné linii výrazně ovlivňuje účinnost rekombinace (Araki et al., 1997). Stabilně transfekované buněčné linie mají obecně nižší aktivitu exprese transgenů oproti transientní transfekci. Nízká hladina Cre rekombinázy v připravených transgenních liniích by tedy mohla účinnost produkčního systému negativně ovlivnit. iii) Existuje také možnost, že použití stabilně transfekované buněčné linie mohla efektivitu produkce viru snížit z jiného důvodu. Představme si, že máme transgenní linii se 100% zastoupením buněk exprimujících Cre rekombinázu. Po transfekci produkčního plazmidu tedy dochází k tvorbě virového genomu a uvolnění virionů do média. Tyto viriony poté reinfikují okolní buňky, které však stále exprimují Cre rekombinázu. Internalizovaný replikující se virový genom (obsahující loxP místo) tedy může opět rekombinovat a tvořit konkatemerní molekuly DNA. To může vést k zpomalení produkce viru nejen u transfekovaných buněk, ale i ve všech následných kolech infekce. Tuto hypotézu je třeba v budoucnu ověřit. Pro případné řešení by

bylo možné využít inducibilní expresi Cre rekombinázy a v určitém čase po transfekci produkčního plazmidu v buněčné linii produkci Cre rekombinázy vypnout. Další možností by bylo také nahrazení Cre/loxP systému některou z variant poskytujících ireverzibilní místně specifickou rekombinaci (viz kapitola 3.3).

### 6.3 Genetické manipulace genomu MPyV

Před přípravou Cre/loxP systému pro produkci myšího polyomaviru bylo zapotřebí navrhnout místa virového genomu, do kterých by bylo možné včlenit loxP sekvenci dlouhou 34 bp, aniž by došlo k narušení replikačního cyklu viru. Zvolena byla intronová oblast společná pro všechny tři časné geny a oblast PAS sekvencí časných a pozdních genů. Jediné další místo, které nekóduje žádný virový protein, je regulační oblast v okolí ori. V minulosti se však ukázalo, že její narušení má dramatický dopad na virovou replikaci (Španielová, 2002).

Introny časných genů myšího polyomaviru jsou velice malé a překrývají se pouze 44 nukleotidy. Tato oblast navíc obsahuje konzervovaný adenosin, který je nezbytný pro sestřih časné pre-mRNA (Ge et al., 1990). Navržení vložení loxP místa bylo tedy velmi komplikované. Výsledky této práce však ukazují, že přítomnost loxP místa v intronové oblasti umožnila produkci infekčního viru, a to i v případě včlenění zdvojeného loxP místa, což bylo dokázáno při transfekci varianty virového genomu Py-I. To také naznačuje, že zachování vzdálenosti mezi 3' a 5' sestřihovými místy časných genů nemusí být pro tvorbu mRNA nezbytné. Bez zajímavosti není ani fakt, že k sestřihu intronu LT antigenu zřejmě částečně docházelo i v případě transkripce z produkčního plazmidu pBS-PyI, kde se v intronové oblasti nacházela téměř 3 000 bp dlouhá sekvence nosičového plazmidu pBlueScript. Tomu nasvědčuje imunofluorescenční analýza transfekovaných buněk, při které byla použita protilátka specifická pro C-konec LT antigenu.

Komplexita polyomavirového genomu výrazně komplikuje tvorbu geneticky manipulovaného viru bez ztráty jeho infekivity. Poznatky z analýzy virových mutant s vneseným loxP místem ve svém genomu jsou v tomto ohledu cenným přínosem. Intronová oblast časných genů se ukázala jako optimální místo pro inzerce cizorodé DNA. V této práci byl produkován infekční virus s včleněním dvou loxP míst v této oblasti (zvětšení intronové sekvence o 44 bp). Maximální velikost inzertu, která výrazně nenaruší infektivitu viru, by však mohla být mnohem větší. Možnost takovýchto manipulací nabízí upotřebení ve výzkumu myšího polyomaviru. Sekvenční podobnost mezi zástupci čeledě *Polyomaviridae* navíc umožňuje tyto poznatky využít i pro jiné polyomaviry.

## 6.4 Využití navrženého systému pro produkci MPyV v praxi

Nově navržený systém, založený na Cre/loxP rekombinaci, výrazně zjednodušuje produkci myšího polyomaviru a poskytuje uspokojivý výtěžek. Je tedy plnohodnotnou alternativou k běžně používané metodě, která zahrnuje pracnou přípravu virového genomu *in vitro*. Cre/loxP rekombinační systém navíc překonává některé problémy spojené s běžnou metodou produkce viru, jako je nízká reproducibilita preparace virového genomu či kontaminace vedlejšími produkty ligační reakce.

Zde navrhovaný systém je potenciálně využitelný pro přípravu málo infekčních virových mutant. Stejná strategie je již léta úspěšně používána pro produkci lidského papilomaviru, kde řeší problémy s jeho neefektivní propagací v tkáňové kultuře (Chow et al., 2009; Lee et al., 2004; Wang et al., 2009). Cre/loxP systém pro produkci MPyV je také vhodným nástrojem pro tvorbu knihoven virových mutant, neboť nevyžaduje oddělenou konstrukci mutantních plazmidů a přípravu virové knihovny. V naší laboratoři se v současné době plánuje jeho využití při mutagenезi MPyV metodou řízené evoluce.

Experimentální systém pro produkci myšího polyomaviru popsáný v této práci je tedy plně funkční, jednoduchý a skýtá uplatnění při přípravě virových mutant, jejichž produkce je s pomocí běžných metod problematická. V porovnání s klasickou metodou poskytuje také mnohadenní úsporu času a výrazně nižší spotřebu materiálu.

# 7. Souhrn

## **1. Připravil jsem experimentální systém založený na Cre/loxP rekombinaci, který umožňuje produkci myšího polyomaviru.**

- Vytvořil jsem dvě varianty produkčních plazmidů, pBS-PyA a pBS-PyI, které jsou schopny generovat virový genom divokého typu *in vivo* pomocí Cre rekombinázy. pBS-PyA produkuje virový genom s inzercí loxP místa mezi poly(A) signálními sekvencemi časných a pozdních genů. pBS-PyI generuje virový genom se substitucí loxP místa v intronu časných genů.
- Inzerce loxP místa mezi poly(A) signální sekvence měla dramatický dopad na expresi virových genů a vedla k úplné ztrátě infekтивности. Na druhou stranu substituce loxP místa v intronové oblasti časných genů produkci infekčního viru umožnila.

## **2. Pomocí Cre/loxP rekombinace lze dosáhnout řádově srovnatelného výtěžku produkovaného viru jako u běžně používané metody. Nově navržený systém je tedy využitelný v praxi a je možné ho uplatnit pro produkci málo infekčních virových mutant.**

- Myší polyomavirus divokého typu byl produkován: i) pomocí transfekce virového genomu připraveného *in vitro* (běžně používaná metoda), ii) pomocí Cre/loxP systému - kotransfekcí pBS-PyI a vektoru exprimujícího Cre rekombinázu.
- Výtěžek vyprodukovaného viru pomocí Cre/loxP systému činil asi 60 % oproti běžné metodě.

## **3. Pro zajištění exprese Cre rekombinázy jsem připravil stabilně transfekovanou buněčnou linii. Ta produkci myšího polyomaviru pomocí Cre/loxP rekombinace usnadňuje, avšak ke zvýšení výtěžku viru oproti transientní expresi Cre rekombinázy nevede.**

- Připravil jsem stabilně transfekované buněčné linie 3T6 a Wop s inducibilní expresí Cre rekombinázy
- Tyto buněčné linie jsem použil pro produkci myšího polyomaviru divokého typu pomocí Cre/loxP rekombinace. Ze čtyř testovaných linií pouze jedna poskytovala uspokojivý výtěžek produkovaného viru. Ten byl srovnatelný s výtěžkem po transientní transfekci vektorem exprimujícím Cre rekombinázu.

## 8. Seznam použité literatury

- Abrams, C.C., Dixon, L.K., 2012. Sequential deletion of genes from the African swine fever virus genome using the cre/loxP recombination system. *Virology* 433(1), 142-148.
- Adams, D.J., Biggs, P.J., Cox, T., Davies, R., van der Weyden, L., Jonkers, J., Smith, J., Plumb, B., Taylor, R., Nishijima, I., Yu, Y.J., Rogers, J., Bradley, A., 2004. Mutagenic insertion and chromosome engineering resource (MICER). *Nature Genetics* 36(8), 867-871.
- Albanese, C., Hult, J., Sakamaki, T., Pestell, R.G., 2002. Recent advances in inducible expression in transgenic mice. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 13(2), 129-141.
- Albert, H., Dale, E.C., Lee, E., Ow, D.W., 1995. Site-specific integration of DNA into wild-type and mutant lox sites placed in the plant genome. *Plant Journal* 7(4), 649-659.
- Andrews, B.J., Proteau, G.A., Beatty, L.G., Sadowski, P.D., 1985. The flp recombinase of the 2- $\mu$  circle DNA of yeast - interaction with its target sequences. *Cell* 40(4), 795-803.
- Araki, K., Imaizumi, T., Okuyama, K., Oike, Y., Yamamura, K., 1997. Efficiency of recombination by Cre transient expression in embryonic stem cells: Comparison of various promoters. *Journal of Biochemistry* 122(5), 977-982.
- Arnold, P.H., Blake, D.G., Grindley, N.D.F., Boocock, M.R., Stark, W.M., 1999. Mutants of Tn3 resolvase which do not require accessory binding sites for recombination activity. *Embo Journal* 18(5), 1407-1414.
- Batt, D.B., Carmichael, G.G., 1995. Characterization of the polyomavirus late polyadenylation signal. *Molecular and Cellular Biology* 15(9), 4783-4790.
- Boldogkoi, Z., Erdelyi, F., Sik, A., Freund, T.F., Fodor, I., 1999. Construction of a recombinant herpesvirus expressing the jellyfish green fluorescent protein. *Luminescence* 14(2), 69-U68.
- Buchholz, F., Angrand, P.O., Stewart, A.F., 1998. Improved properties of FLP recombinase evolved by cycling mutagenesis. *Nature Biotechnology* 16(7), 657-662.
- Chow, L.T., Duffy, A.A., Wang, H.K., Broker, T.R., 2009. A highly efficient system to produce infectious human papillomavirus. *Elucidation of natural virus-host interactions. Cell Cycle* 8(9), 1319-1323.
- Clemens, P.R., Kochanek, S., Sunada, Y., Chan, S., Chen, H.H., Campbell, K.P., Caskey, C.T., 1996. In vivo muscle gene transfer of full-length dystrophin with an adenoviral vector that lacks all viral genes. *Gene Therapy* 3(11), 965-972.
- Dragatsis, I., Zeitlin, S., 2001. A method for the generation of conditional gene repair mutations in mice. *Nucleic Acids Research* 29(3).
- Dutia, B.M., Reid, S.J., Drummond, D.D., Ligertwood, Y., Bennet, I., Rietberg, W., Silvia, O., Jarvis, M.A., Nash, A.A., 2009. A Novel Cre Recombinase Imaging System for Tracking Lymphotropic Virus Infection In Vivo. *Plos One* 4(8).
- Epstein, A.L., 2009. HSV-1-derived amplicon vectors: recent technological improvements and remaining difficulties - A Review. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 104(3), 399-410.
- Eriksson, M., Andreasson, K., Weidmann, J., Lundberg, K., Tegerstedt, K., Dalianis, T., Ramqvist, T., 2011. Murine Polyomavirus Virus-Like Particles Carrying Full-Length Human PSA Protect BALB/c Mice from Outgrowth of a PSA Expressing Tumor. *Plos One* 6(8), 9.

- Feil, R., Wagner, J., Metzger, D., Chambon, P., 1997. Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 237(3), 752-757.
- Feng, H.C., Shuda, M., Chang, Y., Moore, P.S., 2008. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science* 319(5866), 1096-1100.
- Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., 2007. *Fields virology*, 2264-2299 pp. 5 ed. *Polyomaviruses*, edited by Cole, N., 2. 2 vols. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Gao, J.G., Wu, X.D., Jian, Z., 2004. Targeting hearing genes in mice. *Molecular Brain Research* 132(2), 192-207.
- Gardner, S.D., Field, A.M., Coleman, D.V., Hulme, B., 1971. New human papovavirus (BK) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet* 1(7712), 1253-&.
- Ge, H., Noble, J., Colgan, J., Manley, J.L., 1990. Polyoma-virus small tumor-antigen pre-messenger-RNA splicing requires cooperation between 2 3' splice sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87(9), 3338-3342.
- Gilbertson, L., 2003. Cre-lox recombination: Cre-ative tools for plant biotechnology. *Trends in Biotechnology* 21(12), 550-555.
- Gilchrist, D.S., Ure, J., Hook, L., Medvinsky, A., 2003. Labeling of hematopoietic stem and progenitor cells in novel activatable EGFP reporter mice. *Genesis* 36(3), 168-176.
- Gopaul, D.N., Van Duyne, G.D., 1999. Structure and mechanism in site-specific recombination. *Current Opinion in Structural Biology* 9(1), 14-20.
- Gordley, R.M., Gersbach, C.A., Barbas, C.F., 2009. Synthesis of programmable integrases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(13), 5053-5058.
- Gossen, M., Bujard, H., 1992. Tight control of gene-expression in mammalian-cells by tetracycline-responsive promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89(12), 5547-5551.
- Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Muller, G., Hillen, W., Bujard, H., 1995. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian-cells. *Science* 268(5218), 1766-1769.
- Gross, L., 1953. A Filterable agent, recovered from ak leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 83(2), 414-421.
- Gu, R., Zhang, Z., Decerbo, J.N., Carmichael, G.G., 2009. Gene regulation by sense-antisense overlap of polyadenylation signals. *Rna-a Publication of the Rna Society* 15(6), 1154-1163.
- Heimer-McGinn, V., Young, P., 2011. Efficient inducible Pan-neuronal cre-mediated recombination in SLICK-H transgenic mice. *Genesis* 49(12), 942-949.
- Hirano, N., Muroi, T., Takahashi, H., Haruki, M., 2011. Site-specific recombinases as tools for heterologous gene integration. *Applied Microbiology and Biotechnology* 92(2), 227-239.
- Hoess, R.H., Abremski, K., 1984. Interaction of the bacteriophage-p1 recombinase Cre with the recombining site loxP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* 81(4), 1026-1029.
- Hoess, R.H., Abremski, K., 1985. Mechanism of strand cleavage and exchange in the Cre-lox site-specific recombination system. *Journal of Molecular Biology* 181(3), 351-362.
- Hron, T., Spanielova, H., Suchanova, J., Forstova, J., 2013. The Cre/loxP recombination system for production of infectious mouse polyomavirus. *Virus Res.* 176, 128-136.

- Hruskova, V., Moravkova, A., Babiarova, K., Ludvikova, V., Fric, J., Vonka, V., Forstova, J., 2009. Bcr-Abl fusion sequences do not induce immune responses in mice when administered in mouse polyomavirus based virus-like particles. *International Journal of Oncology* 35(6), 1247-1256.
- Huang, Y.Q., Carmichael, G.G., 2009. RNA processing in the polyoma virus life cycle. *Frontiers in Bioscience* 14, 4968-4977.
- Indra, A.K., Warot, X., Brocard, J., Bornert, J.M., Xiao, J.H., Chambon, P., Metzger, D., 1999. Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ERT and Cre-ERT2 recombinases. *Nucleic Acids Research* 27(22), 4324-4327.
- Katinka, M., Yaniv, M., 1983. DNA-replication origin of polyoma-virus - early proximal boundary. *Journal of Virology* 47(1), 244-248.
- Krauzewicz, N., Griffin, B.E., 2000. Polyoma and papilloma virus vectors for cancer gene therapy. *Cancer Gene Therapy* 465, 73-82.
- Krauzewicz, N., Streuli, C.H., Stuartsmith, N., Jones, M.D., Wallace, S., Griffin, B.E., 1990. Myristylated polyomavirus VP2 - Role in the life-cycle of the virus. *Journal of Virology* 64(9), 4414-4420.
- Kuhstoss, S., Rao, R.N., 1991. Analysis of the integration function of the streptomycete bacteriophage-PHI-C31. *Journal of Molecular Biology* 222(4), 897-908.
- Kumar, M.S., Erkeland, S.J., Pester, R.E., Chen, C.Y., Ebert, M.S., Sharp, P.A., Jacks, T., 2008. Suppression of non-small cell lung tumor development by the let-7 microRNA family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(10), 3903-3908.
- Lee, J.H., Yi, S.M.P., Anderson, M.E., Berger, K.L., Welsh, M.J., Klingelutz, A.J., Ozbun, M.A., 2004. Propagation of infectious human papillomavirus type 16 by using an adenovirus and Cre/LoxP mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(7), 2094-2099.
- Liu, Z., Carmichael, G.G., 1993. Polyoma-virus early-late switch - Regulation of late RNA accumulation by DNA-replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(18), 8494-8498.
- Logvinoff, C., Epstein, A.L., 2001. A novel approach for herpes simplex virus type 1 amplicon vector production, using the Cre-loxP recombination system to remove helper virus. *Human Gene Therapy* 12(2), 161-167.
- Loonstra, A., Vooijs, M., Beverloo, H.B., Al Allak, B., van Drunen, E., Kanaar, R., Berns, A., Jonkers, J., 2001. Growth inhibition and DNA damage induced by Cre recombinase in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(16), 9209-9214.
- Lu, J.J., Maddison, L.A., Chen, W.B., 2011. PhiC31 integrase induces efficient site-specific excision in zebrafish. *Transgenic Research* 20(1), 183-189.
- Ma, Z.L., Werner, M., Korber, C., Joshi, I., Hamad, M., Wahle, P., Hollmann, M., 2007. Quantitative analysis of cotransfection efficiencies in studies of ionotropic glutamate receptor complexes. *Journal of Neuroscience Research* 85(1), 99-115.
- Maeda, Y., Kimura, E., Uchida, Y., Nishida, Y., Yamashita, S., Arima, T., Uchino, M., 2003. Cre/loxP-mediated adenovirus type 5 packaging signal excision demonstrates that core element VI is sufficient for virus packaging. *Virology* 309(2), 330-338.
- Mannova, P., Liebl, D., Krauzewicz, N., Fejtova, A., Stokrova, J., Palkova, Z., Griffin, B.E., Forstova, J., 2002. Analysis of mouse polyomavirus mutants with lesions in the minor capsid proteins. *Journal of General Virology* 83, 2309-2319.



- Matsuda, T., Cepko, C.L., 2007. Controlled expression of transgenes introduced by in vivo electroporation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(3), 1027-1032.
- McLaughlin-Drubin, M.E., Meyers, C., 2005. Propagation of infectious, high-risk HPV in organotypic "raft" culture. *Methods Mol Med* 119, 171-186.
- McLaughlin-Drubin, M.E., Wilson, S., Mullikin, B., Suzich, J., Meyers, C., 2003. Human papillomavirus type 45 propagation, infection, and neutralization. *Virology* 312(1), 1-7.
- Michel, G., Yu, Y., Chang, T., Yee, J.K., 2010. Site-specific Gene Insertion Mediated by a Cre-loxP-carrying Lentiviral Vector. *Molecular Therapy* 18(10), 1814-1821.
- Mitani, K., Graham, F.L., Caskey, C.T., Kochanek, S., 1995. Rescue, propagation, and partial-purification of a helper virus-dependent adenovirus vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(9), 3854-3858.
- Nagy, A., Moens, C., Ivanyi, E., Pawling, J., Gertsenstein, M., Hadjantonakis, A.K., Pirity, M., Rossant, J., 1998. Dissecting the role of N-myc in development using a single targeting vector to generate a series of alleles. *Current Biology* 8(11), 661-664.
- Orban, P.C., Chui, D., Marth, J.D., 1992. Tissue-specific and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89(15), 6861-6865.
- Padgett, B.L., Walker, D.L., Zurhein, G.M., Eckroade, R.J., Dessel, B.H., 1971. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *Lancet* 1(7712), 1257-&.
- Raniqvist, T., Andreasson, K., Dalianis, T., 2007. Murine polyomavirus virus-like particles as vectors for gene and immune therapy and as vaccines. *Future Virology* 2(3), 247-253.
- Robert, M.A., Zeng, Y., Raymond, B., Desfosse, L., Mairey, E., Tremblay, J.P., Massie, B., Gilbert, R., 2012. Efficacy and Site-Specificity of Adenoviral Vector Integration Mediated by the Phage phi C31 Integrase. *Human Gene Therapy Methods* 23(6), 393-407.
- Sahli, R., Freund, R., Dubensky, T., Garcea, R., Bronson, R., Benjamin, T., 1993. Defect in entry and altered pathogenicity of a polyoma-virus mutant blocked in VP2 myristylation. *Virology* 192(1), 142-153.
- Santoro, S.W., Schultz, P.G., 2002. Directed evolution of the site specificity of Cre recombinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(7), 4185-4190.
- Sauer, B., Henderson, N., 1988. Site-Specific DNA Recombination in Mammalian Cells by the Cre Recombinase of Bacteriophage P1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85(14), 5166-5170.
- Schmidt, E.E., Taylor, D.S., Prigge, J.R., Barnett, S., Capecchi, M.R., 2000. Illegitimate Cre-dependent chromosome rearrangements in transgenic mouse spermatids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(25), 13702-13707.
- Shimeld, C., Efstathiou, S., Hill, T., 2001. Tracking the spread of a lacZ-tagged herpes simplex virus type 1 between the eye and the nervous system of the mouse: Comparison of primary and recurrent infection. *Journal of Virology* 75(11), 5252-5262.
- Shintani, Y., Yotsuyanagi, H., Moriya, K., Fujie, H., Tsutsumi, T., Kanegae, Y., Kimura, S., Saito, I., Koike, K., 1999. Induction of apoptosis after switch-on of the hepatitis B virus X gene mediated by the Cre/loxP recombination system. *Journal of General Virology* 80, 3257-3265.
- Smith, M.C.M., Brown, W.R.A., McEwan, A.R., Rowley, P.A., 2010. Site-specific recombination by phi C31 integrase and other large serine recombinases. *Biochemical Society Transactions* 38, 388-394.

- Spanielova, H., 2002. Analysis of regulation of polyomavirus promoters by a luciferase reporter system. *Acta Virologica* 46(4), 219-227.
- Sternberg, N., Hamilton, D., Austin, S., Yarmolinsky, M., Hoess, R., 1981. Site-specific recombination and its role in the life cycle of bacteriophage P1. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 45 Pt 1, 297-309.
- Suzuki, N., Inui, M., Yukawa, H., 2007. Site-directed integration system using a combination of mutant lox sites for *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 77(4), 871-878.
- Thyagarajan, B., Guimaraes, M.J., Groth, A.C., Calos, M.P., 2000. Mammalian genomes contain active recombinase recognition sites. *Gene* 244(1-2), 47-54.
- Thyagarajan, B., Olivares, E.C., Hollis, R.P., Ginsburg, D.S., Calos, M.P., 2001. Site-specific genomic integration in mammalian cells mediated by phage phi C31 integrase. *Molecular and Cellular Biology* 21(12), 3926-3934.
- Treisman, R., Kamen, R., 1981. Structure of polyoma virus late nuclear RNA. *Journal of Molecular Biology* 148(3), 273-301.
- Tsai, B., Gilbert, J.M., Stehle, T., Lencer, W., Benjamin, T.L., Rapoport, T.A., 2003. Gangliosides are receptors for murine polyoma virus and SV40. *Embo Journal* 22(17), 4346-4355.
- Turan, S., Bode, J., 2011. Site-specific recombinases: from tag-and-target- to tag-and-exchange-based genomic modifications. *Faseb Journal* 25(12), 4088-4107.
- Turan, S., Kuehle, J., Schambach, A., Baum, C., Bode, J., 2010. Multiplexing RMCE: Versatile Extensions of the Flp-Recombinase-Mediated Cassette-Exchange Technology. *Journal of Molecular Biology* 402(1), 52-69.
- Uemura, M., Niwa, Y., Kakazu, N., Adachi, N., Kinoshita, K., 2010. Chromosomal Manipulation by Site-Specific Recombinases and Fluorescent Protein-Based Vectors. *Plos One* 5(3).
- Van Duyne, G.D., 2001. A structural view of Cre-loxP site-specific recombination. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 30, 87-104.
- Wang, H.K., Duffy, A.A., Broker, T.R., Chow, L.T., 2009. Robust production and passaging of infectious HPV in squamous epithelium of primary human keratinocytes. *Genes & Development* 23(2), 181-194.
- Weil, J., Signer, E.R., 1968. Recombination in bacteriophage lambda .2. site-specific recombination promoted by integration system. *Journal of Molecular Biology* 34(2), 273-&.
- Xiao, D., Xu, K., Yue, Y., Guo, Z.M., Huang, B., Deng, X.Y., Tang, H., Chen, X.G., 2004. Temporal and tight hepatitis C virus gene activation in cultured human hepatoma cells mediated by a cell-permeable Cre recombinase. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica* 36(10), 687-694.
- Zaupa, C., Revol-Guyot, V., Epstein, A.L., 2003. Improved packaging system for generation of high-level noncytotoxic HSV-1 amplicon vectors using Cre-loxP site-specific recombination to delete the packaging signals of defective helper genomes. *Human Gene Therapy* 14(11), 1049-1063.
- Zhang, J., Zhao, J., Jiang, W.J., Shan, X.W., Yang, X.M., Gao, J.G., 2012. Conditional gene manipulation: Cre-ating a new biological era. *Journal of Zhejiang University-Science B* 13(7), 511-524.