

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta



Autoreferát disertační práce
Mechanismy kontroly endogenních retrovirů v hostitelské buňce

Magda Matoušková

Praha, datum (2011)

Doktorské studijní programy v biomedicině

*Univerzita Karlova v Praze
a Akademie věd České republiky*

Program: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

Předseda oborové rady: Stanislav Zadražil, Prof.RNDr., DrSc

S disertací je možno se seznámit v příslušných knihovnách Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

<u>1</u>	<u>SOUHRN</u>	<u>4</u>
<u>2</u>	<u>ÚVOD</u>	<u>5</u>
<u>3</u>	<u>CÍLE</u>	<u>5</u>
<u>4</u>	<u>LITERÁRNÍ PŘEHLED</u>	<u>6</u>
<u>5</u>	<u>MATERIÁLY A METODY</u>	<u>7</u>
5.1	BUNĚČNÉ KULTURY	7
5.2	TKÁNĚ A DNA VZORKY	7
5.3	PLAZMIDY	8
5.4	PŘÍPRAVA CHROMOZOMÁLNÍ DNA	8
5.5	BISULFITOVÁ KONVERZE DNA	9
5.6	METHYLAČNĚ SPECIFICKÁ KVANTITATIVNÍ PCR (MS QPCR)	9
5.7	BISULFITOVÁ SEKVENACE	9
5.8	EXTRAKCE RNA, REVERZNÍ TRANSKRIPCE A QPCR (RT-PCR)	9
5.9	TRANSFEKCE, PRODUKCE VIRU A INFEKCE	10
<u>6</u>	<u>VÝSLEDKY</u>	<u>11</u>
6.1	REGULACE EXPRESE HERV SESTRÍHEM RNA A METHYLACÍ 5'LTR	11
6.2	REGULACE EXPRESE PERV METHYLACÍ DNA	12
6.3	RŮZNÉ MECHANISMY REZISTENCE BUNĚK VŮČI VSTUPU PERV-A.	13
<u>7</u>	<u>DISKUZE</u>	<u>14</u>
<u>8</u>	<u>ZÁVĚRY</u>	<u>15</u>
<u>9</u>	<u>LITERATURA</u>	CHYBA! ZÁLOŽKA NENÍ DEFINOVÁNA.
<u>10</u>	<u>ŽIVOTOPIS</u>	<u>19</u>
<u>11</u>	<u>SEZNAM PUBLIKACÍ</u>	<u>20</u>
11.1	PUBLIKACE POUŽITÉ JAKO PODKLAD PRO DIZERTAČNÍ PRÁCI:	20
11.2	POPULARIZAČNÍ ČLÁNKY:	20

Seznam použitých zkratek

HERV	<i>human endogenous retrovirus</i> (lidský endogenní retrovirus)
PERV	<i>porcine endogenous retrovirus</i> (prasečí endogenní retrovirus)
ERV	endogenní retroviry
LTR	<i>long terminal repeats</i> (dlouhé terminální repetice)
PAR	receptor pro PERV-A
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i> (periferní krevní mononukleární buňky)
MS qPCR	methyl-specifické kvantitativní PCR
HA	hemagglutinin
huPAR	<i>human PAR</i> (lidský receptor pro PERV-A)
muPAR	<i>murine PAR</i> (myší receptor pro PERV-A)
ratPAR	<i>rat PAR</i> (potkanní receptor pro PERV-A)
RPII	RNA polymeráza 2a

1 Souhrn

Ve své práci se zabývám lidskými endogenními retroviry (HERV), které se účastní vývoje placenty a prasečími endogenními retroviry (PERV) v souvislosti s nebezpečím jejich přenosu na člověka při transplantaci prasečích orgánů. Ukázali jsme, že methylace DNA je důležitý umlčující mechanismus regulující expresi HERV i PERV. (1) V placentě je demethylace dvou HERV, ERVWE1 a ERVFRDE1, nezbytná pro její správný vývoj, zatímco ve varlatech je spojená se vznikem seminomů. (2) Methylace PERV je zřejmě zodpovědná za jejich nízkou expresi v tkáních, čímž značně snižuje nebezpečí zoonotického přenosu při xenotransplantacích. (3) Určité riziko však zůstává, protože na rozdíl od myších a potkanních buněk jsou lidské buňky *in vitro* vysoce permissivní vůči PERV, a to především díky funkčnímu receptoru a neschopnosti umlčet integrovaný PERV.

2 Úvod

Endogenní retroviry (ERV) tvoří značnou část savčího genomu. Zatím není jasné, jaké výhody a nebezpečí představují pro své hostitele. Oba tyto aspekty jsou předmětem mé práce. Některé ERV jsou pro svého hostitele nezbytné, ale přesto je důležitá jejich přísná regulace pro zachování neporušeného genomu a kvůli ochraně před onkogenními, fúzogenními a jinými patogenními projevy ERV. Koevoluce ERV a hostitele vede k navození tolerance, avšak replikačně kompetentní ERV může nakazit i hostitele jiného druhu. Mezidruhový přenos je obvykle doprovázen zvýšenou patogenicitou viru.

Ve své práci se zabývám dvěma HERV, ERVWE1 a ERVFRDE1, kódujícími proteiny *syncytin-1* a 2, které se účastní vývoje placenty a jsou podezřelí z podílu na vzniku některých nádorů.

Dále se zabývám replikačně kompetentními PERV, které představují nebezpečí především při léčbě pomocí xenotransplantace prasečích orgánů, neboť lidské buňky mají, na rozdíl od řady zvířecích buněk, funkční receptory pro PERV. *In vitro* byl pozorován přenos některých PERV z prasečích buněk na lidské, ale přenos na pacienta léčeného prasečím materiálem prokázáný nebyl.

3 Cíle

Hlavním tématem mé práce je studium regulace exprese ERV a buněčné rezistence vůči zoonotickému přenosu PERV.

(1.1) Prvním cílem naší práce bylo zjistit, zda jsou ERVWE1 a ERVFRDE1 umlčeny mimo placentu metylací DNA. (1.2) Dále nás zajímala exprese, sestřih RNA a methylace DNA těchto HERV v nádorech.

Dalším předmětem našeho výzkumu bylo umlčování PERV. (2.1) Rozhodli jsme se zjistit, zda schopnost prasečích buněk přenášet PERV je

spojená s hypomethylací jejich LTR PERV. (2.2) Dále jsme testovali, zda má některá prasečí tkáň nebo jednotlivé prase celkově sníženou metylaci a zvýšenou expresi PERV a hledali jsme jednotlivé hypometylované lokusy v buňkách se zvýšenou expresí PERV. (2.3) Dále jsme zkoušeli schopnost lidských buněk umlčovat provirus PERV.

(3) Nakonec jsme vyšetřovali příčinu rezistence myších a potkaních buněk vůči vstupu PERV-A.

4 Literární přehled

První ERV byly objeveny na přelomu 60. a 70. let minulého století (přehledně Weiss, 2006). ERV tvoří asi jednu desetinu savčího genomu, v lidském genomu zabírají 8% DNA (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001; Mouse Genome Sequencing Consortium, 2002). Jejich funkce v genomu není jasná. Zřejmě hrají spolu s dalšími repetitivními elementy klíčovou roli v jeho evoluci. Díky častému opakování v genomu navozují časté rekombinace, což z dlouhodobého hlediska vede k zvyšování genomové komplexity (přehledně Kazazian, 2004)

Některé sekvence a proteiny ERV byly přímo využity hostitelem. Obalové glykoproteiny zvané syncytiny se účastní vývoje placenty. Dva HERV, ERVWE1 a ERVFRDE1, nesoucí geny *syncytin-1* a *-2*, jsou nezbytné pro vývoj lidské placenty (Mi a spol., 2000; Blond a spol., 2000; Blaise a spol., 2003). Oba HERV jsou exprimované pouze v placentě. Jejich exprese v jiných tkáních je spojena s rakovinným či neurodegenerativním onemocněním (Bjerregaard a spol., 2006; Larsen a spol., 2009; Strick a spol., 2007; Sun a spol., 2010; Antony a spol., 2004; Frank a spol., 2005) a jejich přísná regulace je nutná. Mezi nejdůležitější mechanismy umlčování ERV patří metylace DNA a modifikace histonů (Walsh a spol., 1998; Okano a spol., 1999; Matsui a spol., 2010).

Replikačně kompetentní viry mohou být přeneseny jak vertikálně, tak horizontálně. Přenos viru na nový druh je obvykle doprovázen zvýšenou patogenicitou v novém hostiteli (přehledně Takeuchi, 2000). Nejznámější příklad retrovirové zoonózy je přenos téměř neškodného opičeho viru SIV na člověka, kde se z něj vyvinul HIV způsobující AIDS (Gao a spol., 1999). Poslední dobou je značná pozornost věnovaná možnému přenosu PERV na člověka, protože prase je považováno za vhodný zdroj orgánů pro xenotransplantaci. Byl prokázán přenos PERV z prasečích buněk na lidské *in vitro* (Patience a spol., 1997), ale přenos na pacienta léčeného prasečí tkání prokázán nebyl (Paradis a spol., 1999; Di Nicuolo a spol., 2005; Wang a spol., 2006; Hermida-Prieto a spol., 2007). Mechanismy zajišťující ochranu lidského organismu před infekcí PERV zatím nejsou příliš známé. Umlčování PERV methylocí DNA by mohlo hrát v této ochraně určitou roli.

Přítomnost funkčních receptorů je základní podmínkou pro vstup viru do buňky. V lidském genomu byly rozpoznány dva funkční homology receptoru pro PERV-A (PAR), huPAR1 a huPAR2. Myší homolog muPAR není jako PAR funkční (Ericsson a spol., 2003)

5 Materiály a metody

5.1 Buněčné kultury

Pro tuto práci byly použity následující buněčné linie: lidské HeLa, BeWo, JEG-3 a 293T; prasečí PK15 a ST-IOWA; potkaní NRK, HSN a XC; myší MDTF a křepelčí QT6.

5.2 Tkáně a DNA vzorky

Analyzovali jsme lidské terminální placenty, nádorové prsní buňky, vzorky DNA z periferních krevních mononukleárních buněk (PBMC)

z pacientů se syndromem ICF, zdravé a nádorové (seminomy a ne seminomy) tkáně z varlat, nádor děložního čípku a děložní sliznice.

Analyzovali jsme prasečí kůže, slinivky, plíce, srdce, mozky, ledviny, vaječníky, játra, svaly, varlata, terminální placenty a PBMC z prasat pocházejících z České Republiky nebo z Velké Británie.

Všechny vzorky byly okamžitě zamražené na suchém ledu nebo v tekutém dusíku.

5.3 Plazmidy

Reportérové vektory pLTR-W-luc, pLTR-A-luc a pLTR-B-luc byly připraveny záměnou promotoru vektoru pGL3-promoter za 5'LTR různých ERV. Část plazmidů byla popsána dříve: retrovirový vektor pCFCR s genem eGFP založený na myším leukemickém viru (MLV) (Neil a spol., 2001) a pCFCR (Ylinen a spol., 2005), plazmid CMV exprimující MLV *gagpol* (Towers a spol., 2000), expresní plazmid pMDG s proteinem viru vezikulární stomatitidy VSV-G s G, (Naldini a spol., 1996) a plazmidy s replikačně kompetentními PERV14/220 a PERV3a (Bartosch a spol., 2004). Vektory s receptory pro PERV-A (PAR) huPAR-1, huPAR-2, muPAR a ratPAR byly získány zaklonováním PCR nebo RT-PCR produktů do pcDNA3/huPAR-2HA kódující huPAR s hemagglutininovou značkou HA-tag. Následně byly všechny receptory překlonovány do pCFCR. HA-tag byl vložena do pcDNA3/huPAR-2HA pomocí primeru.

5.4 Příprava chromozomální DNA

DNA byla izolována z lyzovaných buněk pomocí směsi fenolu a chloroformu a následně přesrážena ethanolom.

5.5 Bisulfitová konverze DNA

DNA byla konvertována pomocí komerčních souprav EZ DNA Methylation™ Kit (Zymoresearch) a EpiTect bisulfite kit (Qiagen) podle návodu výrobce.

5.6 Methylačně specifická kvantitativní PCR (MS qPCR)

Konvertovaná DNA byla kvantitativně amplifikovaná pomocí primerů na bázi LNA, které jsou specifické pro hypometylované LTR ERV. Počet molekul byl normalizovaný na genom pomocí kvantitativní PCR (qPCR) s primery nerozlišujícími methylační vzorec referenční sekvence.

5.7 Bisulfitová sekvenace

Konvertovaná DNA byla amplifikovaná pomocí primerů navržených mimo CpG dinukleotidy a specifických pro konvertovanou zkoumanou sekvenci. Produkty PCR byly zaklonovány do pGEM-T easy vektoru (Promega) a sekvenovány pomocí univerzálního primeru pUC/M13 reverse společností GATC-biotech.

5.8 Extrakce RNA, reverzní transkripce a qPCR (RT-PCR)

RNA jsme izolovali pomocí TriReagent (Sigma) nebo RNeasy kit (Qiagen), tkáň byla předem homogenizovaná pomocí TissueRuptor (Qiagen). Vzorky RNA jsme ošetřili DNase I a reverzně transkribovali pomocí M-MLV za použití náhodných hexanukleotidů nebo oligo(dT) primerů. Získaná cDNA byla amplifikovaná kvantitativně nebo nekvantitativně. Při qPCR jsme v části pokusů využívali detekci zmnožené cDNA založenou na interkalaci barviva SYBR Green I a v části pokusů vazby specifických oligonukleotidových sond. Hladina analyzované RNA byla normalizována na expresi *housekeeping* genu.

5.9 Transfekce, produkce viru a infekce

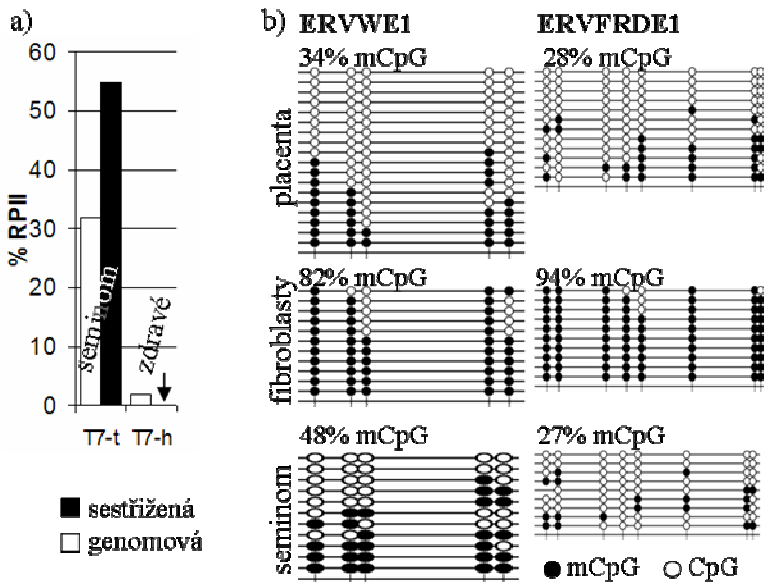
Pro analýzu receptorů byly připraveny buňky s různými PAR s navázaným H-tag transdukcí retrovirového vektoru založeného na bázi MLV nesoucí příslušný PAR. Virové částice EGFP(PERV-A) byly připraveny transfekcí PERV14/220 pomocí lipofekčního činidla FuGene-6 do buněk 293T exprimujících reportérový gen EGFP s enkapsidačním signálem MLV. Virus PERV3a byl připraven v buňkách 293T transfekcí plasmidu PERV3a. 48 h po infekci byl virus odebrán.

Pro změření exprese PAR a účinnosti infekce EGFP(PERV-A) byla využita průtoková cytometrie. PAR byly označeny myší protilátkou proti hemaglutininu a sekundární protilátkou proti myšimu IgG nesoucí fluorescein izothiokyanát (FITC). Účinnost infekce PERV-A značeného eGFP byla měřena 48 h po infekci. Vzorky byly analyzovány FACScan cytometrem (Becton-Dickinson) a výsledky vyhodnoceny pomocí programu CellQuest.

6 Výsledky

6.1 Regulace exprese *HERV* sestřihem RNA a methylací 5'LTR

Ukázali jsme hypomethylaci 5'LTR *ERVWE1* a *ERVFRDE1* v placentě (obr. 1b). 5'LTR *ERVWE1* je silně methylován ve všech ostatních tkáních. Methylace 5'LTR *ERVFRDE1* vykazuje v ostatních tkáních větší různorodost. Ze všech zkoumaných nádorů jsme pozorovali nárůst exprese a sníženou methylaci *ERVWE1* pouze v testikulárních seminomech. V ostatních vzorcích s nízkou expresí *ERVWE1* jsme navíc ukázali nízkou účinnost RNA sestřihu.

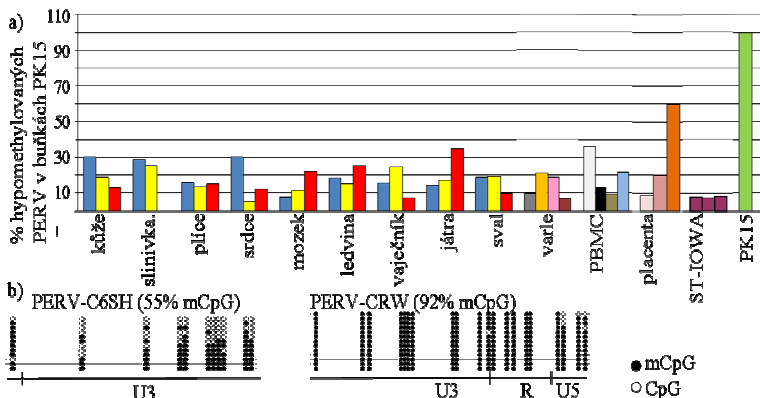


Obrázek 1- Exprese a sestřih RNA a methylace DNA *HERV* (a) Exprese sestřižené a neseštížené formy *ERVWE1* RNA v seminomech je ukázána v procentech exprese RNA polymerázy 2a (RPII); (b) Methylace DNA 5'LTR *ERVWE1* a *ERVFRDE1* ve vzorcích placenty, fibroblastů a

testikulárních seminomů analyzovaná bisulfitovou sekvenací. Procenta methylovaných CpG (mCpG) jsou vyznačena nad jednotlivými schématy. Šipka ukazuje nedetekovatelnou expresi sestřižené RNA.

6.2 Regulace exprese PERV methylací DNA

Ukázali jsme, že methylace PERV LTR hraje významnou roli v určení schopnosti buňky přenášet PERV a dále ukazujeme, že PERV LTR jsou v prasečích tkáních většinou methylované (obr. 2a). V žádné tkáni kromě placenty jsme nedetkovali výrazné zvýšení počtu kopií hypomethylovaných PERV. Podobně žádné prase nemělo globálně hypomethylované PERV. Pouze vysoce infekční prasečí buněčná linie PK15 obsahuje velké množství hypomethylovaných PERV. Podařilo se nám identifikovat hypomethylovaný lokus PERV-C6SH v infekčních prasečích PBMC (obr. 2b). Dále jsme ukázali, že vysoká permissivita lidských buněk vůči PERV *in vitro* je zřejmě částečně daná jejich neschopností umlčet PERV methylací.

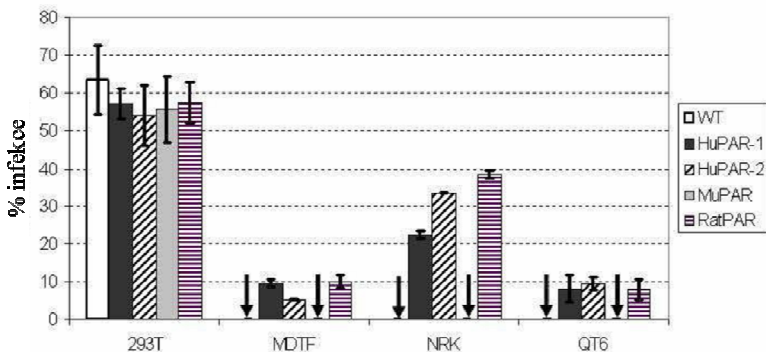


Obrázek 2 – Methylace LTR PERV v prasečích tkáních a buněčných liniích. (a) Počty hypomethylovaných kopií LTR PERV na buňku byly zjištěny pomocí MS a jsou udány v procentech hypomethylovaných LTR

PERV/genom v buňkách PK15 qPCR. (b)PERV-C6SH lokus byl analyzovaný bisulfitovou sekvenací.

6.3 Různé mechanismy rezistence buněk vůči vstupu PERV-A.

Ukázali jsme dva různé mechanismy, jakými buňky hlodavců získaly rezistenci vůči PERV-A. Myší receptor muPAR je nefunkční díky mutacím, zatímco krysí ratPAR je funkční podobně jako lidský huPAR1 a 2, ale jeho exprese v testovaných buňkách je nedostatečná. Vysoká exprese ratPAR navodí permisivitu transdukovaných buněk (Obr. 3)



Obrázek 3 – Funkčnost huPAR a jeho homologů jako receptorů pro PERV-A. Různé buňky transdukované lidským, myším a potkaním PAR byly infikované EGFP(PERV-A) a analyzované průtokovou cytometrií. Účinnost infekce byla určena procenty buněk pozitivních na EGFP. Šipky naznačují infekci pod úrovní detekce.

7 Diskuze

Studovali jsme různé mechanismy kontroly ERV v hostitelské buňce a mechanismy rezistence buněk vůči horizontálnímu přenosu ERV.

Ukázali jsme, že methylace DNA je důležitý mechanismus v umlčování exprese ERVWE1 a ERVFRDE1 kódující *syncytiny 1* a 2. ERVWE1 je fyziologicky hypometylovaný pouze v placentě. Ve varlatech je jeho demethylace spojena se zvýšenou expresí a se vznikem testikulárního seminomu. Příčinná souvislost tohoto jevu není zatím jasná. Byla ukázána zvýšená exprese řady HERV v různých nádorech (Yi a spol., 2004; Yi a spol., 2006; Wang-Johanning a spol., 2003). *Syncytin-1* navozuje buněčnou fúzi a tímto způsobem může přispívat k destabilizaci genomu a změně genové exprese a tím k vývoji rakoviny (Duelli a Lazebnik, 2007). Transformované buňky však obecně prochází značnými epigenetickými změnami a zvýšená exprese HERV může být jejich důsledkem, aniž by měla dopad na vznik nádoru (přehledně Egger a spol., 2004). ERVFRDE1 není tak silně methylován v tkáních mimo placentu. Je možné, že jeho aktivitu není třeba tak přísně kontrolovat, protože jeho náhodná exprese není tak nebezpečná jako ERVWE1, nebo že pro jeho umlčení stačí částečná methylace (Gimenez a spol., 2010; Kitazawa et al., 2007).

Ukázali jsme, že se CpG methylace také účastní umlčování PERVů. Vysoká infekčnost prasečí buněčné linie PK15 koreluje s nízkou methylací PERVů v těchto buňkách. V neinfekčních ST-IOWA (Patience et al., 1997) a všech prasečích tkáních kromě placenty je počet hypometylovaných PERV několiknásobně nižší. To by mohl být alespoň částečný důvod, proč se PERV zatím nepřenesl na pacienty léčené prasečím materiálem (Paradis a spol., 1999). Pro přenos viru však stačí jedna aktivní kopie. Detekovali jsme hypometylovaný provirus PERV-C 6SH v infekčních prasečích PBMC. Aktivní PERV-C mohou být zodpovědné za účinný přenos, protože rekombinantní viry s čásí PERV-C produkují nejvyšší titr (Harrison a spol., 2004)

Methylační umlčování je častý způsob ochrany hostitelské buňky před retrovirovou infekcí. Ukázali jsme, že lidské buňky 293T nejsou schopné

účinně methylovat PERV. Během dvou měsíců se zvýšila methylace LTR maximálně na 14%. LTR viru Rusova sarkomu, lentiviru nebo MMLV jsou umlčeny methylací během týdnů (Senigl a spol., 2008, He a spol., 2005, Stewart a spol., 1982). To by mohlo částečně vysvětlit vysokou permisivitu 293T buněk vůči PERV.

Lidské buňky jsou permisivní vůči PERV díky expresi funkčního receptoru. Ukázali jsme, že dva druhy hlodavců, potkan a krysa, získaly resistenci vůči PERV-A různými nezávislými způsoby. MuPAR obsahuje aminokyselinovou mutaci ve vazebné oblasti receptoru (Mattiuzzo a spol., 2007), zatímco ratPAR je plně funkční, ale v potkaních buňkách není dostatečně exprimován. Je možné, že rezistence vznikla dvakrát nezávisle náhodou, ale lze spekulovat, že hlodavci rezistentní vůči PERV-A přežili důsledkem přirozeného výběru epidemii retroviru podobného PERV-A.

8 Závěry

Ukázali jsme, že methylace DNA je důležitý umlčující mechanismus regulující expresi HERV i PERV. (1) V placentě je demethylace ERVWE1 a ERVFRDE1 nezbytná pro její správný vývoj, zatímco ve varlatech je spojená se vznikem seminomů. (2) Methylace PERV je zřejmě zodpovědná za jejich nízkou expresi v tkáních, čímž značně snižuje nebezpečí zoonotického přenosu při xenotransplantacích. (3) Určité riziko však zůstává, protože na rozdíl od myších a potkaních buněk jsou lidské buňky permisivní vůči PERV především díky funkčnímu receptoru a neschopnosti umlčet integrovaný PERV.

9 Literatura

Antony JM, van Marle G, Opii W, Butterfield DA, Mallet F, Yong VW, Wallace JL, Deacon RM, Warren K, Power C. Human endogenous retrovirus glycoprotein-mediated induction of redox reactants causes oligodendrocyte death and demyelination. *Nat Neurosci.* 2004 Oct;7(10):1088-95.

Bartosch B, Stefanidis D, Myers R, Weiss R, Patience C, Takeuchi Y. Evidence and consequence of porcine endogenous retrovirus recombination. *J Virol.* 2004 Dec;78(24):13880-90.

Bjerregaard B, Holck S, Christensen IJ, Larsson LI. Syncytin is involved in breast cancer-endothelial cell fusions. *Cell Mol Life Sci.* 2006 Aug;63(16):1906-11.

Blaise S, de Parseval N, Bénit L, Heidmann T. Genomewide screening for fusogenic human endogenous retrovirus envelopes identifies syncytin 2, a gene conserved on primate evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Oct 28;100(22):13013-8.

Blond JL, Lavillette D, Cheynet V, Bouton O, Oriol G, Chapel-Fernandes S, Mandrand B, Mallet F, Cosset FL. An envelope glycoprotein of the human endogenous retrovirus HERV-W is expressed in the human placenta and fuses cells expressing the type D mammalian retrovirus receptor. *J Virol.* 2000 Apr;74(7):3321-9.

Di Nicuolo G, D'Alessandro A, Andria B, Scuderi V, Scognamiglio M, Tammaro A, Mancini A, Cozzolino S, Di Florio E, Bracco A, Calise F, Chamuleau RA. Long-term absence of porcine endogenous retrovirus infection in chronically immunosuppressed patients after treatment with the porcine cell-based Academic Medical Center bioartificial liver. *Xenotransplantation.* 2010 Nov-Dec;17(6):431-9. doi: 10.1111/j.1399-3089.2010.00617.x.

Di Nicuolo G, van de Kerkhove MP, Hoekstra R, Beld MG, Amoroso P, Battisti S, Starace M, di Florio E, Scuderi V, Scala S, Bracco A, Mancini A, Chamuleau RA, Calise F. No evidence of in vitro and in vivo porcine endogenous retrovirus infection after plasmapheresis through the AMC-bioartificial liver. *Xenotransplantation.* 2005 Jul;12(4):286-92.

Duelli D, Lazebnik Y. Cell-to-cell fusion as a link between viruses and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2007 Dec;7(12):968-76.

Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature.* 2004 May 27;429(6990):457-63. Review.

Ericsson TA, Takeuchi Y, Templin C, Quinn G, Farhadian SF, Wood JC, Oldmixon BA, Suling KM, Ishii JK, Kitagawa Y, Miyazawa T, Salomon DR, Weiss RA, Patience C. Identification of receptors for pig endogenous retrovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 May 27;100(11):6759-64.

Frank O, Giehl M, Zheng C, Hehlmann R, Leib-Mösch C, Seifarth W. Human endogenous retrovirus expression profiles in samples from brains of patients with schizophrenia and bipolar disorders. *J Virol.* 2005 Sep;79(17):10890-901.

Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, Cummins LB, Arthur LO, Peeters M, Shaw GM, Sharp PM, Hahn BH. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes*. *Nature*. 1999 Feb 4;397(6718):436-41.

Gimenez J, Montgiraud C, Pichon JP, Bonnaud B, Arsac M, Ruel K, Bouton O, Mallet F. Custom human endogenous retroviruses dedicated microarray identifies self-induced HERV-W family elements reactivated in testicular cancer upon methylation control. *Nucleic Acids Res*. 2010 Apr;38(7):2229-46.

Harrison I, Takeuchi Y, Bartosch B, Stoye JP. Determinants of high titer in recombinant porcine endogenous retroviruses. *J Virol*. 2004 Dec;78(24):13871-9.

He J, Yang Q, Chang LJ. Dynamic DNA methylation and histone modifications contribute to lentiviral transgene silencing in murine embryonic carcinoma cells. *J Virol*. 2005 Nov;79(21):13497-508.

Hermida-Prieto M, Domenech N, Moscoso I, Diaz T, Ishii J, Salomon DR, Mañez R. Lack of cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus (PERV) to transplant recipients and abattoir workers in contact with pigs. *Transplantation*. 2007 Aug 27;84(4):548-50.

International Human Genome Sequencing Consortium. *Nature*. 2001 Feb 15;409(6822):860-921.

Kazazian HH Jr. Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science*. 2004 Mar 12;303(5664):1626-32. Review.

Kitazawa R, Kitazawa S. Methylation status of a single CpG locus 3 bases upstream of TATA-box of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) gene promoter modulates cell- and tissue-specific RANKL expression and osteoclastogenesis. *Mol Endocrinol*. 2007 Jan;21(1):148-58.

Larsen JM, Christensen IJ, Nielsen HJ, Hansen U, Bjerregaard B, Talts JF, Larsson LI. Syncytin immunoreactivity in colorectal cancer: potential prognostic impact. *Cancer Lett*. 2009 Jul 18;280(1):44-9.

Mattiuzzo G, Matouskova M, Takeuchi Y. Differential resistance to cell entry by porcine endogenous retrovirus subgroup A in rodent species. *Retrovirology*. 2007 Dec 14;4:93.

Mi S, Lee X, Li X, Veldman GM, Finnerty H, Racie L, LaVallie E, Tang XY, Edouard P, Howes S, Keith JC Jr, McCoy JM. Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature*. 2000 Feb 17;403(6771):785-9.

Mouse Genome Sequencing Consortium, Nature. 2002 Dec 5;420(6915):520-62
Naldini L, Blömer U, Gage FH, Trono D, Verma IM. Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Oct 15;93(21):11382-8.

Neil S, Martin F, Ikeda Y, Collins M. Postentry restriction to human immunodeficiency virus-based vector transduction in human monocytes. J Virol. 2001 Jun;75(12):5448-56.

Paradis K, Langford G, Long Z, Heneine W, Sandstrom P, Switzer WM, Chapman LE, Lockey C, Onions D, Otto E. Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue. The XEN 111 Study Group. Science. 1999 Aug 20;285(5431):1236-41.

Patience C, Takeuchi Y, Weiss RA. Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. Nat Med. 1997 Mar;3(3):282-6.

Senigl F, Plachý J, Hejnar J. The core element of a CpG island protects avian sarcoma and leukemia virus-derived vectors from transcriptional silencing. J Virol. 2008 Aug;82(16):7818-27.

Stewart CL, Stuhlmann H, Jähner D, Jaenisch R. De novo methylation, expression, and infectivity of retroviral genomes introduced into embryonal carcinoma cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1982 Jul;79(13):4098-102.

Strick R, Ackermann S, Langbein M, Swiatek J, Schubert SW, Hashemolhosseini S, Koscheck T, Fasching PA, Schild RL, Beckmann MW, Strissel PL. Proliferation and cell-cell fusion of endometrial carcinoma are induced by the human endogenous retroviral Syncytin-1 and regulated by TGF-beta. J Mol Med. 2007 Jan;85(1):23-38.

Sun Y, Ouyang DY, Pang W, Tu YQ, Li YY, Shen XM, Tam SC, Yang HY, Zheng YT. Expression of syncytin in leukemia and lymphoma cells. Leuk Res. 2010 Sep;34(9):1195-202

Towers G, Bock M, Martin S, Takeuchi Y, Stoye JP, Danos O. A conserved mechanism of retrovirus restriction in mammals. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Oct 24;97(22):12295-9.

Wang HH, Wang YJ, Liu HL, Liu J, Huang YP, Guo HT, Wang YM. Detection of PERV by polymerase chain reaction and its safety in bioartificial liver support system. World J Gastroenterol. 2006 Feb 28;12(8):1287-91.

Wang-Johanning F, Frost AR, Jian B, Azerou R, Lu DW, Chen DT, Johanning GL. Detecting the expression of human endogenous retrovirus E envelope transcripts in human prostate adenocarcinoma. *Cancer*. 2003 Jul 1;98(1):187-97.

Weiss RA. The discovery of endogenous retroviruses. *Retrovirology*. 2006; 3:67. Review

Yi JM, Kim HM, Kim HS. Human endogenous retrovirus HERV-H family in human tissues and cancer cells: expression, identification, and phylogeny. *Cancer Lett*. 2006 Jan 18;231(2):228-39.

Yi JM, Kim HS. Expression analysis of endogenous retroviral elements belonging to the HERV-F family from human tissues and cancer cells. *Cancer Lett*. 2004 Jul 28;211(1):89-96. PubMed PMID: 15194220.

Ylinen LM, Keckesova Z, Wilson SJ, Ranasinghe S, Towers GJ. Differential restriction of human immunodeficiency virus type 2 and simian immunodeficiency virus SIVmac by TRIM5alpha alleles. *J Virol*. 2005 Sep;79(18):11580-7.

10 Životopis

Jméno: Magda Matoušková

Datum a místo narození: 23.8. 1981, Praha, Československo

Stav: svobodná

Občanství: Česká republika

Telefonní číslo: 00420-296 443 589

Pracoviště: Ústav Molekulární genetiky, AV ČR, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4

E-mail: magda@img.cas.cz

Vzdělání:

2005- (2011) doktorantské studium, Karlova univerzita v Praze, ČR
2005-2006 University College of London, UK, stipendium Erasmus
1999-2004 Magisterské studium, Karlova univerzita v Praze, obor molekulární biologie

Vědecká praxe:

2000 – Oddělení virové a buněčné genetiky, Ústav molekulární biologie, AV ČR, Praha

2008 Department of Biological and Biomedical Sciences, Glasgow Caledonian University, UK,

2005-6 Wohl Virion Centre, Division of Infection and Immunity, University College London, UK

2002 měsíční pobyt INSERM, Marseille, France

2006- Účast na 6. rámcovém programu Evropské unie (FP6) Xenome,
<http://www.xenome.eu/>

Metodologické zkušenosti:

Molekulární biologie: izolace DNA a RNA, PCR (kvantitativní PCR, RT-PCR, methylačně specifické PCR, splinkerette PCR), sekvenování DNA, methylační analýza DNA (bisulfitové sekvenování, test celkové methylace DNA pomocí *Sss1*, methylace *in vitro*), klonování bakterií, Western blot, Southern blot

Tkáňové kultury: transfekce, infekce, příprava viru, klonování, demethylace DNA *in vitro*, průtoková cytometrie, luciferázová esej

Účast na konferencích:

2009 EMBO Conference on Chromatin and Epigenetics (poster)

2010 Pig genome III Meeting, Wellcome Trust Sanger Institute, Cambridge; Hypomethylace DNA jako znak aktivních PERV (ústní prezentace)

2011 Konference mladých biologů, biochemiků a chemiků, Žďár nad Sázavou, Umlčování PERV methylací DNA (ústní prezentace)

11 Seznam publikací

11.1 Publikace použité jako podklad pro dizertační práci:

Matoušková M, Blazková J, Pajer P, Pavlíček A, Hejnar J., CpG methylation suppresses transcriptional activity of human syncytin-1 in non-placental tissues., *Exp Cell Res.* 2006 Apr 15;312(7):1011-20. (IF 5,1)

Mattiuzzo G, Matoušková M, Takeuchi Y., Differential resistance to cell entry by porcine endogenous retrovirus subgroup A in rodent species., *Retrovirology.* 2007 Dec 14;4:93. (IF 3,6)

11.2 Popularizační články:

Matoušková M., Za co vděčíme genomovým parazitům, *Živa*, 1/2005