

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta



PhD thesis summary

Autoreferát disertační práce

Host-virus interactions of mammalian endogenous
retroviruses

Interakce savčích endogenních retrovirů a jejich
hostitelů

Mgr. Helena Farkašová

Praha 2017

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: prof. RNDr. Zdena Pálková, CSc.

Školící pracoviště: Oddělení virové a buněčné genetiky,
Ústav molekulární genetiky AV ČR, v. v. i.



Autor: Mgr. Helena Farkašová

Školitel: MUDr. Daniel Elleder, Ph.D.

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

Summary

Endogenous retroviruses (ERVs) make up a major part of mammalian genomes and originate by germ line infection and subsequent mendelian inheritance of their exogenous counterparts.

We discovered an endogenous Lentivirus in the genome of Malayan colugo (*Galeopterus variegatus*) denoted ELVgv (endogenous Lentivirus of *G. variegatus*).

We detected the remnants of a first described endogenous Deltaretrovirus in the genome of Natal Long-fingered Bat (*Miniopterus natalensis*).

ERV in mule deer (*Odocoileus hemionus*) forms new germline insertions in the natural host population in the present time and might serve as important model of the retrovirus endogenization process. We performed experiments to characterize CrERV from virological perspective and explain the inefficiencies in its replication cycle.

We also tried to elucidate the occurrence of a replication block of viruses with amphotropic envelope in Chinese hamster ovary cells which might occur due to the presence of an endogenous retrovirus in their genome.

Souhrn

Endogenní retroviry (ERV) tvoří podstatnou část savčích genomů a vznikají infekcí zárodečné linie a následným přenosem do dalších generací podle pravidel mendelovské dědičnosti.

V genomu letuchy malajské (*Galeopterus variegatus*) jsme objevili endogenní Lentivirus nazvaný ELVgv (endogenous Lentivirus of *G. variegatus*).

Dále jsme popsali pozůstatek dosud prvního objeveného endogenního Deltaretroviru v genomu netopýra létavce malajského (*Miniopterus natalensis*).

V populaci jelenců (*Odocoileus hemionus*) dochází v současné době k tvorbě nových zárodečných kopií ERV, které mohou sloužit jako důležitý model procesu retrovirové endogenizace. Tento virus, CrERV, jsme z virologického hlediska charakterizovali a popsali blok v jeho replikačním cyklu.

Pokusili jsme se také objasnit replikační blok retrovirů s amfotropní obálkou u buněk čínské křečka, ke kterému pravděpodobně dochází v důsledku přítomnosti endogenního retroviru v křeččím genomu.

Contents/ Obsah

Souhrn	2
Contents/ Obsah	3
Introduction	4
Hypotheses and aims	6
Materials and methods	7
Úvod	17
Materiál a metody	20
Výsledky a diskuze	23
Závěry	28
Curriculum vitae (english)	31
Curriculum vitae (czech)	33
References/ Citace	39

Introduction

Retroviruses are RNA viruses capable of integrating into the host genome and subsequent exploitation of the host transcription machinery. Their life cycle strategy predestines them to become endogenized if they infect germline cells and are further inherited in the mendelian fashion. Such inheritable retroviruses are present in the vertebrate genomes abundantly.

The current availability of newly sequenced and assembled genomes allows for an *in silico* search of such retroviruses. Some retroviral genera form endogenous copies often; some were presumed not to be able to form an endogenous copy until recently.

Alpha-, Beta-, Gamma-, and Epsilonretroviruses are found in the genomes quite abundantly. However, lentiviruses were so far detected only in three genomes: rabbit, lemur, and a ferret. The existence of endogenous Deltaretrovirus was not reported yet. Endogenous Spumavirus was detected in the genome of sloths.

However, the process of endogenization is still poorly elucidated. This might be due to the lack of an appropriate model to study this process. We propose an endogenous retrovirus (denoted Cervid endogenous retrovirus - CrERV) in the genome of mule deer (*Odocoileus hemionus*) to be used for such studies.

CrERV is a polymorphic ERV currently infecting the wild population of mule deer. CrERV sequences are well characterized, but studies about its virological properties are lacking.

The presence of an endogenous retrovirus in the genome might not be a burden for the host, might be lethal or pathogenic for some or sometimes even provide an asset for the host. The provirus not having an impact on the host whatsoever is probably the most common case, but other retroviruses have carcinogenic potential. The best studied retrovirus element serving as an asset for the host is the *Syncytin*, which produces *env* with a fusogenic potential utilized in the formation of placenta.

The retrovirus presence in the cell is sensed by defense mechanisms of the host. The cell counteracts the viral life cycle in probably all of the steps of retroviral infection. Some of the blocks are mediated by restriction factors, which are part of the innate immunity. Some viruses have evolved accessory genes to counteract the host restriction factors.

The host might use the presence of an endogenous retrovirus in the genome as a source of defective viral particles or retroviral proteins to block or aid the infection by exogenous retroviruses. Such a situation occurs with MLV (murine leukaemia virus), FLV (feline leukaemia virus) or JSRV (Jaagsiekte sheep retrovirus).

Hypotheses and aims

- 1) The first aim of the thesis is to characterize the findings of the computational screening of all publicly available genomes, aimed at the discovery of novel ERVs. This included a discovery of an endogenous Lentivirus in *Galeopterus variegatus* (Malayan colugo) denoted ELVgv (Endogenous lentivirus in *G. variegatus*) and a discovery of the first endogenous Deltaretrovirus found in the genomes of Miniopteridae bats denoted MINERVa (Miniopterus endogenous retrovirus).
- 2) The second aim of the thesis was to induce CrERV from mule deer cells by cocultivation with susceptible cells to characterize this virus by virological methods.
- 3) The third aim was to describe the host-virus interactions of CrERV using gammaretroviral pseudotypes and a marker rescue assay.
- 4) The fourth aim is the further description of host-virus interactions of CrERV by assembling the host restriction factors *in silico* and estimating the magnitude of the positive selection towards them.
- 5) The fifth aim of the study was to analyze whether the infection block of Chinese hamster ovary (CHOK1) cells occurs due to the presence of endogenous retrovirus fragments secreted by the CHOK1 cells.

Materials and methods

Screens of publicly available mammalian genomes for unusual endogenous retroviruses

The first step of the best bidirectional hit (BBH) strategy was performed by tBLASTn (Johnson et al., 2008) search in vertebrate genome database (including 104 vertebrate genomes available in GenBank).

The sequences detected were further analyzed and re-sequenced by Sanger sequencing. Samples of related host species were checked for orthologous viral sequences in their genome and the related proviruses were sequenced. The sequences were annotated and open reading frames were predicted. The obtained sequences were analyzed by various bioinformatical approaches: phylogeny trees using the obtained sequence were constructed, the evolutionary age was estimated by multiple methods, and presumed secondary structures of response elements were predicted.

Methods related to the CrERV characterization

Human embryonal kidney (HEK293T) cells and their derivatives, human A673 rhabdomyosarcoma cell line, and primary cells from three cervidae species were maintained in Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM) with serum supplements.

CrERV was induced from primary mule deer cells by cocultivation with susceptible human A673 cells for several months. Reverse transcription (RT) activity was monitored by product enhanced reverse transcription (PERT) assay.

The medium with induced retrovirus was concentrated and Iodixanol gradient ultracentrifugation was performed. RT activity in the gradient fractions was estimated by PERT.

The particles of induced endogenous CrERV were visualized by electron microscopy.

Expression vectors with CrERV *env*, truncated CrERV *env*, and CrERV *env* with FLAGtag were constructed. Expression vectors with amphotropic MLV *env* and amphotropic MLV with FLAGtag were constructed.

Pseudotypes with MLV *gag-pol* and either CrERV *env* or amphotropic MLV *env* were generated.

In order to perform marker rescue experiments, cells bearing a molecular copy of CrERV and a plasmid with green fluorescent protein (GFP) were transfected with plasmid expressing a VSV-G *env*.

We obtained several constructs with various retrovirus envelopes by co-transfection and marker rescue. These were used for infection of human (HEK293T) and cervidae (mule deer, fallow deer, red deer) cells.

We also tried to assemble the retrovirus restriction factors present in the mule deer genome using the CLC genomics workbench software and determine the possible presence of positive selection towards them using the algorithms included in the DataMonkey package.

Methods related to the CHOK1 project

In order to avoid the infection block of amphotropic viruses on CHOK1 cells, the cells were treated with tunicamycin.

To determine the fraction of the medium with inhibitory activity, conditioned medium (medium in which CHOK1 cells were grown for 24 hours) was size-fractionated and tested. The test was performed by addition of the individual fractions to tunicamycin-treated cells upon infection with the amphotropic virus.

The fractions determined as the ones containing the inhibitory factors were submitted for the mass spectrophotometry (mass-spec) analysis. The output of the mass-spec analysis was analyzed using a tailored hamster endogenous retrovirus database using the tBLASTn algorithm.

Results and discussion

Screens of publicly available mammalian genomes for unusual endogenous retroviruses

The screen of 104 available mammalian genomes yielded two main findings. ELVgv - an endogenous Lentivirus in the genome of Malayan cougo (*Galeopterus variegatus*) and MINERVa (Miopteris endogenous retrovirus) - an endogenous Deltaretrovirus sequence in the genomes of Miopteridae bats.

ELVgv

The fourth documented case of an endogenous Lentivirus, ELVgv, was further analyzed and the presumption that it is by far the oldest endogenous lentivirus up to date was confirmed. Besides, the discovery of ELVgv was the first finding of an endogenous Lentivirus in Asian mammal (Hron, Fabryova, Paces, & Elleder, 2014).

MINERVa

An endogenous Deltaretrovirus was discovered in the genomes of Miopteridae bats (MINERVa). This retrovirus was found in the genome only in a single copy, which contained large internal deletion. We found orthologous sequences in related bat species (Miopteridae bat family) but not in Vespertilionidae and Cistugonidae, Molossidae, and Pteropodidae bats. The predicted gag sequence robustly

clustered with known Deltaretroviruses in phylogenetic analyses. Moreover, the sequence possessed other features of Deltaretroviruses (presence of Rex-response element-like structure in the LTR, richness in cytosine, two open reading frames organized in the manner as Tax and Rex are in HTLV and BLV). Thus, this is the first report of an endogenous Deltaretrovirus sequence.

Cervid endogenous retrovirus (CrERV)

CrERV was described previously as a DKV (deer kidney virus) (Aaronson, Tronick, & Stephenson, 1976). We were able to prove that CrERV and DKV are identical retroviruses by replicating the original cocultivation experiment performed by Aaronson. We sequenced the induced CrERV genome, proved its particles sediment in the iodixanol density gradient in the fraction characteristic for retroviruses, and visualized it by electron microscopy.

This virus was previously analyzed with respect to its high insertional polymorphism in mule deer populations in North America (Elleder et al., 2012), but we performed the first experiments to characterize the retrovirus from the virological aspect (Aaronson et al., 1976).

Despite the fact that CrERV is very effective in generating new germline copies, it exhibits xenotropic behavior (it is not able to infect its original host). Therefore we hypothesized that the replication block of CrERV might

occur at the receptor-mediated entry level. We constructed pseudotypes with CrERV envelope and MLV core and performed a marker rescue by transfecting cells bearing a CrERV copy and a GFP plasmid with a plasmid with VSV-G. The constructs with CrERV envelope were not entering the mule deer, nor red deer and fallow deer cells but infected human cells. However, the rescued virus was able to infect all of the aforementioned deer species.

Subsequent detection of RT activity after cultivation of the cells with the rescued virus for two weeks showed that RT activity is present in the medium from human cells but not in the medium from cervidae cells. Therefore we propose the replication block of CrERV is present also in the later stages of the retrovirus life cycle in the deer cells.

We also performed pattern-PCR assay to detect polymorphic integration pattern of CrERV in red deer cells as was previously shown in the mule deer. These attempts did not detect major insertional CrERV polymorphism.

Further we tried to assemble retrovirus restriction factors from the mule deer genome and to estimate the presence of the positive selection towards them. Due to the low coverage data we had available at the time we were able to reliably assemble only SAMHD1. SAMHD1 was proved not to be under positive selection based on the analyses from the DataMonkey package performed.

CHOK1 cells and infection blocks to amphotropic viruses

We were successful in replicating previous results indicating the presence of a secreted inhibitor to amphotropic virus infection in CHOK1 hamster cells (Miller & Miller, 1992).

We harvested a conditioned medium (medium in which CHOK1 cells were grown for 24 h) that presumably contains the secreted inhibitor. The collected medium was concentrated and separated into 32 fractions by gel filtration. Individual fractions were tested for inhibitory activity to amphotropic MLV. The inhibitory activity was detected mainly in the fractions 7, 8, and 9. These fractions were mixed and submitted for the mass spectrometry analysis.

The output from mass spectrometry analysis was analyzed using a tBLASTn (BLAST search of translated nucleotide databases using a protein query) search of a tailored protein database containing predicted CHOK1 endogenous retroviruses. Importantly, two of the peptides were scored as high confidence hits (NW_003617793.1_49834_49998 and NW_003614069.1_559612_559788). Each of the identified proteins was present only on one peptide, which might be caused by the short sequences provided currently in the database.

Analysis of protein sequences of these two hits showed that they originate from gammaretrovirus envelopes related to, but not identical, to FeLV.

Conclusions

Screens of publicly available mammalian genomes for unusual endogenous retroviruses

ELVgv

- ELVgv is present in more than three copies in the genome of *G. variegatus*.
- Orthologous provirus sequences were detected in the only other extant dermopteran species- *Cynocephalus volans*.
- The estimation of the age of provirus integration confirm, that ELVgv is by far the oldest known Lentivirus up to date.

MINERVa

- An endogenous Deltaretrovirus sequence was detected in the genome of *Miniopterus natalensis* and denoted MINERVa (Miniopterus endogenous retrovirus).
- MINERVa is present in the genomes of all analysed Miniopteridae bats, but not in other phylogenetically

closest bat families (Vespertilionidae, Cistugonidae, Molossidae, and Pteropodidae).

- The sequence has features of Deltaretroviruses (C-rich, presence of ORFs in similar position as Tax and Rex ORFs in HTLV, phylogenetic relatedness of gag to deltaretroviral gag genes).

Characterization of CrERV

- An endogenous CrERV was induced by cocultivation with susceptible human cells.
- The induced virus sediments in the Iodixanol gradient as another well characterized gammaretrovirus (PERV).
- The particles induced by cocultivation were visualised by electron microscopy.
- The virus was shown to be infectious and xenotropic (in accordance to previously described deer kidney virus- DKV).
- The xenotropic nature of the retrovirus is probably caused by a receptor and a later block in deer cells.

CHOK1 cells and infections by amphotropic viruses

- The conditioned medium from CHOK1 cells was shown to have an inhibitory effect on amphotropic virus infection.
- The condition medium from CHOK1 cells was size-fractionated and the fractions with inhibitory effect were determined and submitted for a mass spectrometry analysis.
- Two hits resembling *env* of endogenous gammaretrovirus were identified.

Úvod

Retroviry jsou RNA viry, které integrují svou DNA do genomu hostitele a následně využívají hostitelského transkripčního aparátu. Jejich replikační strategie umožňuje jejich endogenizaci v případě, že infikují zárodečné buňky a jsou dále předávány do dalších generací podle pravidel mendelovské dědičnosti. Tyto endogenní formy retrovirů jsou hojně přítomny v genomech obratlovců.

Současná dostupnost nově sekvenovaných a sestavených genomů umožňuje vyhledávání těchto retrovirů *in silico*. Některé retrovirové rody tvoří endogenní kopie často; o jiných rodech se však do nedávné doby předpokládalo, že endogenní kopie netvoří.

Endogenní sekvence alfa-, beta-, gama, a epsilonretrovirů se nacházejí v genomech poměrně hojně. Nicméně, lentiviry byly dosud zjištěny pouze ve třech genomech: králíka, lemura a fretky. Existence endogenních deltaretrovirů doposud prokázána nebyla. Endogenní spumavirus byl detekována v genomu lenochoda.

Proces endogenizace je stále nedostatečně objasněn. To může být zapříčiněno absencí vhodného modelu pro jeho studium. V naší práci popisujeme endogenní retrovirus (CrERV - cervid endogenous retrovirus) v genomu

severoamerických jelenců (*Odocoileus hemionus*), který je vhodný jako model právě pro takovéto studie.

CrERV je integračně polymorfní ERV, který v nedávné době infikoval populaci divoce žijících jelenců. Integrace CrERV byly důkladně popsány, avšak virologická charakterizace tohoto viru stále chybí.

Přítomnost endogenní kopie retroviru v genomu buď nemusí být pro hostitele zátěží, nebo má patogenní až letální účinek, nebo dokonce může poskytovat hostiteli evoluční výhodu. Přestože většina integrovaných provirů nemá na hostitele žádný dopad, některé z nich mohou mít karcinogenní potenciál. Nejvíce prostudovaným případem endogenního retroviru, který představuje pro hostitele pozitivní přínos, je syncytin – gen produkující env s fuzogenním potenciálem, účastnící se při tvorbě placenty.

Přítomnost retroviru v buňce je detekována pomocí hostitelských obraných mechanismů. Buňka je schopna potlačovat prakticky všechny kroky virové infekce. Některé z těchto antivirových bloků jsou zprostředkovány pomocí tzv. restričních faktorů, které se řadí mezi složky vrozené imunity. Některé retroviry si vyvinuly doplňkovou sadu genů (tzv. accessory genes), které eliminují funkci buněčných restričních faktorů.

Hostitelský organismus je schopen také využít přítomnost endogenních kopií retroviru jako zdroj defektních

virových částic či virových proteinů, které blokují infekci jinými exogenními retroviry. Tento případ je popsán u MLV (murine leukaemia virus), FLV (feline leukaemia virus), nebo JSRV (Jaagsiekte sheep retrovirus).

Cíle a hypotézy

- 1) Prvním cílem této práce je charakterizace nálezů bioinformatických skrínů veřejně přístupných genomů zameraných na hledání nových endogenních retrovirů. Toto zahrnovalo nález lentivirů v genomu letuchy malajské (*G. variegatus*), nazvaný ELVgv (endogenous Lentivirus in *G. variegatus*), a dále nález prvního endogenního Deltaretroviru v genomu netopýra létavce natalského (*M. natalensis*), nazvaného MINERVa (Miniopterus endogenous retrovirus).
- 2) Druhým cílem této práce bylo indukování produkce viru CrERV z jelenčích buněk kokultivací s citlivými lidskými buňkami, a jeho charakterizace pomocí virologických metod.
- 3) Třetím cílem bylo popsání interakce CrERV a hostitele pomocí gammaretrovirových pseudotypů a experimentů využívajících tzv. marker rescue assay.
- 4) Čtvrtým cílem byla další charakterizace interakce viru a hostitele, pomocí sestavení sekvencí retrovirových restričních faktorů *in silico*, a určení míry jejich pozitivní selekce během evoluce.

5) Pátým cílem této práce bylo zjistit zda je blok infekce amfotropním virem v křeččích CHOK1 buňkách zapříčiněn přítomností endogenního retroviru, jehož produkty mohou být sekretovány CHOK1 buňkami.

Materiál a metody

Skríning veřejně dostupných savčích genomů, zaměřený na nalezení neobvyklých endogenních retrovirů

Prvním krokem v strategii BBH (best bidirectional hit) bylo hledání pomocí algoritmu tBLASTn (Johnson et al., 2008) v databázi genomů obratlovců (obsahovala 104 genomů obratlovců dostupných v GenBank).

Detekované sekvence byly dále analyzovány a znovu ověřeny pomocí Sangerova sekvenování. Vzorky z příbuzných druhů byly testovány na přítomnost ortologních virových sekvencii. Sekvence byly anotované a predikovali jsme v nich přítomnost otevřených čtecích rámců. Získané sekvence byly analyzované pomocí různých bioinformatických přístupů: konstrukce fylogenetických stromů s použitím těchto sekvencí, věk provirů byl odhadnut různými přístupy, a také jsme provedli predikci sekundárních struktur determinujících retrovirové tzv. „response elements“.

Metody týkající se charakterizace CrERV

Linie lidských embryonálních buněk ledvin (HEK293T) a z ní odvozené linie, lidská buněčná linie A673 pocházející z rhabdomyosarkomu, a primární buňky ze tří druhů jelenovitých, byly kultivovány v médiu DMEM (Dulbecco's modified Eagles medium) s přidavkem séra.

CrERV byl indukován z primárních buněk jelence, kokultivací s citlivými lidskými A673 buňkami po dobu několika měsíců. Aktivita reversní transkriptázy (RT) byla monitorována pomocí metody PERT (product enhanced reverse transcription).

Médium obsahující indukovaný retrovirus bylo zakoncentrováno a dále centrifugováno v hustotním lodixanolovém gradientu. RT aktivita v jednotlivých frakcích byla stanovena pomocí PERT.

Virové partikule indukovaného endogenního CrERV jsme vizualizovali pomocí elektronové mikroskopie.

Zkonstruovali jsme expresní vektory s CrERV *env* genem, dále se zkráceným CrERV *env*, a CrERV *env* s FLAGtag značkou. Také jsme zkonstruovali expresní vektory s amfotropním *env* genem a amfotropním MLV *env* genem s FLAGtag značkou.

S použitím těchto vektorů jsme vygenerovali pseudotypy s MLV *gag-pol* a CrERV *env* nebo amfotropním MLV *env*.

Pro použití tzv. marker rescue přístupu jsme připravili buňky obsahující CrERV a dále reportérový gen GFP a gen pro obalový protein VSV-G.

Získali jsme několik konstruktů s různými retrovirovými obálkami pomocí kotransfekce a marker rescue. Tyto byly dále použity na infekci lidských (HEK293T) a jelenovitých (jelenec, daněk, jelen) buněk.

Dále jsme se pokoušeli sestavit sekvence retrovirových restričních faktorů přítomných v genomu jelence, pomocí programu CLC genomics workbench, a určit možnou přítomnost pozitivní selekce v těchto genech pomocí algoritmů využívaných v programu DataMonkey.

Metody týkající se analýzy křeččích CHOK1 buněk

Pro odstranění bloku pro replikaci amfotropního MLV v křeččích CHOK1 buňkách jsme použili přidání tunikamycinu.

Na určení toho, která frakce v médiu má inhibiční aktivitu, jsme kondiciované médium (t.j. médium ve kterém byly buňky po dobu 24 hodin kultivované) frakcionovali podle velikosti a testovali inhibiční aktivitu frakcí. Test byl proveden přidáním jednotlivých frakcí k buňkám s tunikamycinem při infekci amfotropním virem.

Frakce určené jako inhibiční byly spojené a analyzované pomocí hmotnostní spektrometrie. Výstup z této analýzy byl bioinformaticky zpracován pomocí algoritmu tBLASTn a databáze predikovaných endogenních elementů z křeččího genomu.

Výsledky a diskuze

Skrínování veřejně dostupných savčích genomických dat zaměřené na nalezení vzácných endogenních retrovirů

Skrínování 104 dostupných savčích genomů přineslo zejména dva hlavní nálezy. ELVgv - endogenní Lentivirus v genomu letuchy malajské (*Galeopterus variegatus*) a MINERVa (Miniopterus endogenous retrovirus) - endogenní retrovirová sekvence v genomu netopýrů čeledi Miniopteridae.

ELVgv

Analýzovali jsme teprve čtvrtý známý případ endogenního Lentiviru, a potvrdili jsme, že se jedná o dosud zdaleka nejstarší lentivirový nález. Kromě toho, jedná se o první popsany endogenní Lentivirus u savce původem z asijského kontinentu (Hron et al., 2014).

MINERVa

Nalezli jsme endogenní Deltaretrovirus v genomu netopýrů čeledi Miniopteridae (nazván MINERVa). MINERVa

se v genomu nalézají v jedné kopii, která navíc obsahuje rozsáhlou vnitřní delecí. Ortologní sekvence byly popsány v příbuzných rodech netopýrů (čeledi Miniopteridae), ale ne v čeledích Vespertilionidae, Cistugonidae, Molossidae, a Pteropodidae. Predikovaná sekvence MINERVa *gag* byla fylogenetickou analýzou zařazena mezi Deltaretroviry. Dále, tato sekvence obsahovala další deltaretrovirové znaky (přítomnost Rex-response element sekvence v LTR, bohatost na cytosin, dva otevřené čtecí rámce s polohou podobnou genům Tax a Rex u virů HTLV a BLV). Jedná se tedy o první publikovaný nález endogenní deltaretrovirové sekvence.

Cervid endogenous retrovirus (CrERV)

CrERV byl již dříve popsán jako DKV (deer kidney virus)(Aaronson et al., 1976). Prokázali jsme, že CrERV a DKV jsou totožné viry, pomocí zopakování původního Aaronsonova experimentu, ve kterém kokultivoval lidské a jelenčí buňky a tím indukoval produkci viru. Genom indukovaného CrERV jsme osekvenovali, dále jsme prokázali že jeho částice sedimentují v předpokládané hustotě na gradientu, a získali jsme fotografie z elektronové mikroskopie.

Tento virus byl dříve studován proto, že vykazuje vysoký stupeň inzerčního polymorfizmu, v populaci severoamerických jelenců (Elleder et al., 2012). Současné experimenty jsou první, které CrERV charakterizují

virologickými metodami (Fabryova, Hron, Kabickova, Poss, & Elleder, 2015).

Přesto, že CrERV velmi efektivně vytváří nové kopie v zárodečné linii, vykazuje xenotropní vlastnosti (neschopnost infikovat původního hostitele). Vytvořili jsme hypotézu, že replikační blok je způsoben na úrovni receptorového vstupu do buňky. Zkonstruovali jsme virové pseudotypy s obálkou CrERV a virovým core z MLV. Dalším metodickým přístupem byly tzv. marker rescue pokusy, pomocí buněk infikovaných CrERV a transfekovaných GFP vektorem a VSV-G genem. Virové konstrukty nesoucí CrERV obálku do jelenčích buněk nevstupovaly (ani do buněk z jiných druhů jelenovitých), ale byly schopny infikovat lidské buňky. Konstrukty z marker rescue experimentu byly schopny vstupovat do buněk všech zmíněných druhů.

Následná detekce RT aktivity po kultivaci buněk infikovaných v marker rescue experimentu ukázala pozitivitu u lidských buněk a negativitu u buněk z jelenovitých. To ukazuje na přítomnost dalšího replikačního bloku pro CrERV, ve fázi pozdní virové replikace na jelenčích buňkách.

Dále jsme analyzovali přítomnost inserčního polymorfismu pomocí metody založené na PCR (pattern-PCR). Na vybraných vzorcích genomové DNA z jelenovitých druhů jsme neprokázali výrazný polymorfismus podobný situaci u severoamerického jelence.

Pokusili jsme se sestavit sekvence retrovirových restričních faktorů z genomických dat jelence, a analyzovat zda je detekovatelná pozitivní selekce v těchto genech. Kvůli nízkému pokrytí stávajících genomických dat jsme byli schopni kompletně sestavit pouze gen pro restriční faktor SAMHD1. Tento gen nevykazoval známky pozitivní selekce (detekce provedena programem DataMonkey).

CHOK1 cells and infection blocks to amphotropic viruses

Úspěšně jsme zopakovali předchozí experimenty, ukazující na přítomnost sekretovaného inhibitoru amfotropního MLV u linie buněk z čínského křečka (CHOK1) (Miller & Miller, 1992).

Bylo sbíráno kondicionané médium z CHOK1 buněk (médium ve kterém byly buňky kultivované po 24 hodin), které mělo podle předpokladu obsahovat sekretovaný inhibiční faktor. Toto médium bylo koncentrováno a rozděleno na gelové filtraci do 32 frakcí. Frakce byly testovány na inhibiční aktivitu k amfotropnímu MLV, nejsilněji byla detekována ve frakcích 7-9. Tyto frakce byly spojeny a vzorky z nich zpracovány pro měření hmotnostním spektrometrem.

Výsledky měření z hmotnostního spektrometru byly analyzovány bioinformaticky metodou tBLASTn (BLAST analýza *in silico* translatované nukleotidové databáze pomocí proteinových sekvencí), s využitím databáze proteinových sekvencí endogenních retrovirů predikovaných v genomu

CHOK1 buněk. Dva z takto predikovaných peptidů vykazovaly v analýze vysokou signifikanci (NW_003617793.1_49834_49998 a NW_003614069.1_559612_559788). Z každého predikovaného proteinu byl naměřen pouze jeden peptid, což je zřejmě dáno přítomností velmi krátkých sekvencí v současné verzi databáze CHOK1 endogenních elementů.

Analýza proteinové sekvence zmíněných dvou peptidů ukázala, že pocházejí z genů pro gamaretrovirovou obálku (Env) viru podobného, ale ne totožného, s virem FeLV.

Závěry

Skríning veřejně dostupných savčích genomů na přítomnost neobvyklých endogenních retrovirů

ELVgv

- ELVgv je přítomen ve více než třech kopiích v genomu *G. variegatus*.
- Ortologní provirové sekvence byly detekovány v jediném dalším žijícím druhu řádu Dermoptera - *Cynocephalus volans*.
- Odhad věku integrace proviru potvrzuje, že ELVgv je zdaleka nejstarší dosud známý Lentivirus.

MINERVa

- Endogenní sekvence Deltaretroviru byla nalezena v genomu *Miniopterus natalensis* a nazvána MINERVa (Miniopterus endogenous retrovirus).
- MINERVa je přítomna v genomech všech analyzovaných druhů čeledi Miniopteridae, ale ne v jiných fylogeneticky příbuzných družích (čeledi Vespertillionidae, Cistugonidae, Molossidae, a Pteropodidae).

- Sekvence má vlastnosti Deltaretrovirů (je bohatá na cytosin, obsahuje čtecí rámce v podobném uspořádání jako jsou geny Tax and Rex u Deltaretroviru HTLV, byla detekována fylogenetická příbuznost *gag* genu k jiným deltaretrovirovým *gag* genům).

Characterize CrERV

- Endogenní CrERV byl indukován kokultivací s citlivými lidskými buňkami.
- Indukovaný virus sedimentuje v lodixanolovém denzitním gradientu v oblasti stejné jako jiný dobře charakterizovaný gammaretrovirus (PERV).
- Indukované virové partikule byly vizualizovány pomocí elektronové mikroskopie.
- Indukovaný virus je infekční a xenotropní (stejně jako v minulosti popsáný DKV - deer kidney virus).
- Xenotropní vlastnost retroviru je pravděpodobně zapříčiněna receptorovým a také pozdním replikačním blokem v buňkách jelenovitých druhů.

CHOK1 buňky a infekce amfotropním virem

- Kondiciované médium z křeččích CHOK1 buněk ma prokazatelně inhibiční efekt na infekci amfotropním virem.
- Kondiciované medium z CHOK1 buněk jsme rozdělili na velikostní frakce. Určili jsme frakce s inhibičním účinkem a zaslali je na analýzu pomocí hmotnostní spektrometrie.
- Identifikovali jsme produkty dvou *env* genů endogenního gammaretroviru přítomného v genomu CHOK1 buněk.

Curriculum vitae (english)

Name: Helena Farkašová (Fábryová)

Date and place of birth: 25.5. 1989, Bratislava, Czechoslovakia

Nationality: slovak

Workplace: Institute of Molecular Genetics, AS CR, Vídeňská 1083, 142 20 Prague 4

E-mail: helena.farkasova@img.cas.cz

Education:

09/2013- (2017) graduate school, Charles University, Czech republic

09/2011-06/2013 master degree, Comenius University in Bratislava, field of study: molecular genetics

09/2011-11/2012 joint master degree, Comenius University in Bratislava, field of study: general medicine; studies abandoned

09/2008-06/2011 bachelor degree, Comenius University in Bratislava, field of study: biology

Scientific praxis:

07/2013- (07/2017) Laboratory of viral and cellular genetics, Institute of Molecular genetics, AS CR, Prague

07/2011- 06/2013 Institute of Molecular Biomedicine,
Faculty of Medicine, Comenius University in Bratislava

Methods:

- Molecular biology: isolation of DNA and RNA, PCR (quantitative PCR, RT-PCR, digital droplet PCR), molecular cloning, sequencing, Western blot
- Tissue cultures: transfection, infection, virus preparation, flow cytometry
- Basic bioinformatics analyses

Active participation at the conferences during graduate school:

- 7. IMG PhD conference 2014, Prague– talk
- Genetická konference Genetické Společnosti Gregora Mendela 2014, Průhonice -poster
- 8. IMG PhD conference 2015, Prague- talk, 2nd place
- The Society for Molecular Biology and Evolution meeting 2015, Vienna- poster
- The Biomania Student Scientific Meeting 2015, Brno- poster
- 9. IMG PhD conference 2016, Prague- talk
- Frontiers of Retrovirology 2016, Erlangen- poster
- Retroviral Pathogenesis 2016, New Orleans-poster

Curriculum vitae (czech)

Jméno: Helena Farkašová (Fábryová)

Datum a místo narození: 25.5. 1989, Bratislava, Československo

Občanství: Slovenská republika

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

E-mail: helena.farkasova@img.cas.cz

Vzdělání:

09/2013- (2017) doktorantské studium, Karlova univerzita v Praze, ČR

09/2011-06/2013 Magisterské studium, Univerzita Komenského v Bratislave, obor molekulární biologie

09/2011-11/2012 Magisterský studijní program, Univerzita Komenského v Bratislave, obor Všeobecné lékařství; zanechání studia

09/2008-06/2011 Bakalářské studium, Univerzita Komenského v Bratislave, obor Biologie

Vědecká praxe:

07/2013- (07/2017) Oddělení virové a buněčné genetiky, Ústav molekulární biologie, AV ČR, Praha

07/2011- 06/2013 Ústav molekulárnej biomedicíny, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave

Metodologické zručnosti:

- Molekulárna biológia: izolácia DNA a RNA, PCR (kvantitatívna PCR, RT-PCR, digitálna droplet PCR), klonovanie, sekvenovanie, Western blot
- Tkáňové kultúry: transfekcia, infekcia, príprava viru, prútoková cytometria
- Základné bioinformatické analýzy

Aktívna účasť na konferenciách počas doktorského štúdia:

- 7. IMG PhD conference 2014, Praha – prednáška
- Genetická konferencia Genetické spoločnosti Gregora Mendela 2014, Práhonice -poster
- 8. IMG PhD conference 2015, Praha- prednáška, 2. miesto
- The Society for Molecular Biology and Evolution meeting 2015, Viedeň- poster
- The Biomania Student Scientific Meeting 2015, Brno- poster
- 9. IMG PhD conference 2016, Praha- prednáška
- Frontiers of Retrovirology 2016, Erlangen- poster
- Retroviral Pathogenesis 2016, New Orleans-poster

The list of publications of the student/ Seznam publikaci doktoranda:

1. Publications connected to the thesis
Publikace *in extenso*, které jsou podkladem disertace

a) With IF/ s IF

Fábryová, H., Hron, T., Kabickova, H., Poss, M., Elleder, D. 2015. Induction and characterization of a replication competent cervid endogenous gammaretrovirus (CrERV) from mule deer cells. *Virology*. 485: 96-103. IF=3.2

Farkašová, H., Hron, T., Pačes, J., Hulva, P., Benda, P., Gifford, R., Elleder, D. 2017. Discovery of the first endogenous Deltaretrovirus, in the genome of long-fingered bats (Chiroptera: Miniopteridae). *In press*. PNAS. IF=7.06

Hron, T., **Fábryová, H.**, Pačes, J., & Elleder, D. 2014. Endogenous lentivirus in Malayan colugo (*Galeopterus variegatus*), a close relative of primates. *Retrovirology*. 11: 84. IF=3.989

Hron, T., **Farkašová, H.**, Padhi, A., Pačes, J., Elleder, D. 2016. Life History of the Oldest Lentivirus: Characterization of ELVgv Integrations in the Dermopteran Genome. *Molecular Biology and Evolution*. 33(10): 2659-2669. IF= 13.649

b) Without IF/ bez IF

Bao L., Elleder D., Malhotra R., DeGiorgio M., Maravegias T., Horvath L., Carrel L., Gillin C., Hron T., **Fábryová H.**, Hunter D., Poss M. 2014. Computational and statistical analyses of insertional polymorphic endogenous retroviruses in a non-model organism. *Computation*. 2: 221-245.

c) Proceedings

Elleder, D., Hron, T., **Farkašová, H.**, Padhi, A., Pačes, J. 2016. Life history of the oldest lentivirus: characterisation of ELVgv integrations and the TRIM5 selection pattern in *Dermoptera*. *Retrovirology*. 13(Suppl 1): P38.

Farkašová, H., Hron, T., Elleder, D. 2016. Recent invasion of the mule deer genome by a retrovirus. *Retrovirology*. 13(Suppl 1): P64.

Hron, T., **Farkašová, H.**, Elleder, D. 2016. High-throughput epigenetic analysis of evolutionarily young endogenous retrovirus presents in the mule deer (*Odocoileus hemionus*) genome. *Retrovirology*. 13(Suppl 1): P59.

2. Publications not related to the thesis/ Publikace *in extenso* bez vztahu k tématu disertace

a) With IF/ s IF

Fábryová, H., Celec, P. 2014. On the origin and diagnostic use of salivary RNA. *Oral Diseases*. 20(2): 146-152. IF=2.0

Durdiaková, J., **Fábryová, H.**, Koborová, I., Ostatníková, D., Celec, P. 2013. The effects of saliva collection, handling and storage on salivary testosterone measurement. *Steroids*. 78(14): 1325-1331. IF=2.513

Tóthová, L., Hodosy, J., Mettenburg, K., **Fábryová, H.**, Wagnerová, A., Babicková, J., Okuliarová, M., Zeman, M., Celec, P. 2013. No harmful effect of different Coca-cola beverages after 6 months of intake on rat testes. *Food and Chemical Toxicology*. 62: 343-348. IF=3.584

b) Without IF/ bez IF

Farkašová, H., Hron, T., Pačes, J., Pajer, P., Elleder, D. 2016. Identification of a GC-rich leptin gene in chicken. *Agri Gene*. 1: 88-92.

Fábryová, H., Celec, P. 2013. Preeklampsia a fetálna DNA. *Biológia, ekológia, chémia*. 17: 63-65.

c) Proceedings

Vlková, B., **Fábryová, H.**, Celec, P. 2013. Extracellular DNA as a potential cause of preeclampsia. *Human Gene Therapy*. 24(12): A64

Vlková, B., **Fábryová, H.**, Mettenburg, K., Hodosy, J., Celec, P. 2012. Administration of free extracellular DNA during pregnancy in mice. *Human Gene Therapy*. 23(10): A146

References/ Citace

- Aaronson, S. A., Tronick, S. R., & Stephenson, J. R. 1976. Endogenous type C RNA virus of *Odocoileus hemionus*, a mammalian species of New World origin. **Cell**, 9(3): 489-494.
- Elleder, D., Kim, O., Padhi, A., Bankert, J. G., Simeonov, I., Schuster, S. C., Wittekindt, N. E., Motameny, S., & Poss, M. 2012. Polymorphic integrations of an endogenous gammaretrovirus in the mule deer genome. **J Virol**, 86(5): 2787-2796.
- Fabryova, H., Hron, T., Kabickova, H., Poss, M., & Elleder, D. 2015. Induction and characterization of a replication competent cervid endogenous gammaretrovirus (CrERV) from mule deer cells. **Virology**, 485: 96-103.
- Hron, T., Fabryova, H., Paces, J., & Elleder, D. 2014. Endogenous lentivirus in Malayan colugo (*Galeopterus variegatus*), a close relative of primates. **Retrovirology**, 11: 84.
- Johnson, M., Zaretskaya, I., Raytselis, Y., Merezhuk, Y., McGinnis, S., & Madden, T. L. 2008. NCBI BLAST: a better web interface. **Nucleic Acids Res**, 36(Web Server issue): W5-9.
- Miller, D. G., & Miller, A. D. 1992. Tunicamycin treatment of CHO cells abrogates multiple blocks to retrovirus infection, one of which is due to a secreted inhibitor. **J Virol**, 66(1): 78-84.