

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie

Zaměření: Virologie



**David Přikryl**

Studium replikace a patogeneze retrovirů s rozšířeným hostitelským rozsahem.

Study of replication and pathogenesis of retroviruses with extended host range.

Diplomová práce

Školitel: Ing. Vladimír Pečenka, Ph.D.

Praha, 2015

**Poděkování:**

Děkuji Ing. Vladimíru Pečenkovi, Ph.D. za cenné připomínky a rady při vypracování této diplomové práce, za jeho čas a za jeho snahu zabránit mi odevzdat tuto práci v jejím současném stavu. Dále děkuji RNDr. Vítu Kafariátovi za provedení in vivo experimentů, které se týkaly živých zvířat nad zákonný rámec práce s laboratorními vzorky a za jejich analýzu. Děkuji pracovníkům Fingerlandova ústavu patologie v Hradci Králové za analýzu histologických vzorků. Rád bych také poděkoval RNDr. Jiřímu Hejnarovi PhD. za četné a cenné připomínky. Dík patří i celému kolektivu bývalé Laboratoře molekulární virologie a členům Laboratoře virové a buněčné genetiky za jejich četné intelektuální i hmotné impulzy, které vedly ke zvednutí úrovně této práce. Dále děkuji Karolíně Sedřové a svým rodičům za podporu v časech dobrých i zlých. Neposlední dík patří neznámému vandalovi, který umístil na sloupořadí u stanice metra Kačerov nápis NEVZDÁVEJTE SE!, který dokázal nejednou zázračně pozvednout pracovní a vědeckou morálku.

**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, 4.5.2015

.....

## Abstrakt

Koevoluce patogenů a jejich hostitelů vedla k selekci celé řady mutací. Z pohledu hostitele se dají nahromaděné mutace v jeho genomu charakterizovat jako restriční faktory bránící efektivní replikaci cílového patogenu, například retroviru. Tyto faktory působí na úrovni vstupu virionu do buňky, jeho integrace, exprese a maturace. Naopak z pohledu viru se mutace projevují ve schopnosti výše zmíněné restriční faktory překonávat. Jedním z mechanismů je například změna receptorové specifity, která umožňuje viru infikovat hostitele i v případě, že původní specifický receptor je z nějakého důvodu nedostupný. Tato práce se zabývá efektem bodové mutace L154S v obalovém glykoproteinu viru MAV-B a jeho vlivem na replikaci a patogenezí *in vitro* a *in vivo*. Pro tyto účely byly infikovány a analyzovány kuřecí plemena bílých a hnědých leghornek a rozličné buněčné kultury. Výsledky infekce kuřat ukázaly zvýšenou incidenci osteopetrózy, onemocnění projevující se zbytněním kostní tkáně. V souladu s literaturou jsme prokázali, že se jedná o neoplázii polyklonálního původu. Řadou experimentů jsme odhalili abnormální chování obalového glykoproteinu kódovaného virem způsobující toto onemocnění. Abnormalita tkví v teplotní labilitě a neutralizaci nízkým pH. Na základě našich pozorování navrhuje model předčasné aktivace glykoproteinu, který tak dovoluje nesespecifické splynutí s cílovou membránou nezávisle na receptoru.

Klíčová slova: retrovirus, ASLV, receptor, env, kur domácí, osteopetróza, receptorová interference, MAV-B, rozšířený hostitelský rozsah

## Abstract

Coevolution of pathogens and their hosts leads to selection of series mutations. From the hosts point of view we can these accumulated mutations characterize as restriction factors preventing effective replication of target pathogen, for example retrovirus. These factors acts on level of virion entry into cell, its intergation, expression and maturation. On the other hand, from the viruses point of view these mutations manifests the ability to overcome restriction factors mentioned earlier. One of the mechanizms is for example shift in receptor specificity, which allows to virus infect hosts in case, where original specific receptor is for some reason unavailable. This thesis focus on effect point mutation L154S in envelope glycoprotein of virus MAV-B and its influence in replication and pathogenesis *in vitro* and *in vivo*. For this purpose we infected and analyzed chicken breed of white and brown leghorns and different cell cultures. Results of infection of chickens displayed increased incidence of osteopetrosis, disease displaying the hyperthrophy of bone matter. In consistence with literature, we shown polyclonal origin of this neoplasia. With series of experiments we discovered abnormal behavior of envelope glycoprotein coded by virus causing this disease. Abnormality lies in termal lability and neutralization by low pH. Based on our observation we suggest model of premature activation of glycoprotein, which cause nonspecific fusion with target membrane in a receptor independent way.

Key words: retrovirus, ASLV, receptor, env, gallus, osteopetrosis, receptor interference, MAV-B, extended host range

# Obsah

Abstrakt .....	3
Abstract .....	4
Obsah .....	5
Seznam zkratk .....	8
Úvod .....	12
Přehled literatury .....	14
Vstup retroviru do buňky .....	14
Obalové glykoproteiny viru a povrchové receptory buňky .....	16
Struktura a mechanika glykoproteinu .....	16
Receptory .....	18
Mutace – přírodní a umělý výběr .....	22
Rozšíření hostitelské specifity .....	25
Cíle práce .....	27
Materiál a metody .....	28
Použité kmeny virů a buněčné kultury .....	28
Pulverizace tkáně kapalným dusíkem .....	28
Izolace vysokomolekulární DNA fenol-chloroformovou extrakcí .....	28
Izolace fragmentů DNA .....	29
Měření koncentrace DNA .....	30
Fúzní PCR mutageneze ASLV-B .....	30
Inverzní polymerázová řetězová reakce .....	31
Design linker-primerů .....	32
Selektivní amplifikace PCR .....	32
Konstrukce vektorů třídy MCAS .....	33
Příprava kuřecích embryonálních fibroblastů .....	34
Pasážování buněčných kultur .....	34
Transfekce buněčných kultur .....	34
Pozitivní antibiotiková selekce .....	35

Produkce viru .....	36
Semikvantitativní PCR pro detekci provirů .....	36
Elektroforetogram agarózového gelu .....	37
Štěpení DNA restrikčními endonukleázami.....	37
Ligace .....	37
Příprava kompetentních bakterií .....	37
Transformace bakterií .....	38
Molekulární klonování .....	38
Produkce zásobních roztoků virů .....	39
Infekce kuřecí linie 7 <sub>2</sub> vektory třídy MCAS .....	39
Testování receptorové interference .....	39
Vliv pH na vstup viru .....	39
Teplotní stabilita viru .....	40
Infekce kuřecích embryí.....	41
Odebírání vzorků tkání.....	41
Seznam roztoků a chemikálií .....	42
Seznam enzymů .....	46
Seznam přístrojů.....	46
Seznam software .....	47
Výsledky.....	48
Biologická aktivita viru MAV-B nesoucího mutaci L154S v obalovém glykoproteinu..	48
Analýza patologie infikovaných kuřat .....	52
Poškození imunitního systému a tvorby kostí virem MAV-EHR .....	56
Polyklonální charakter osteopetrózy indukované viry .....	60
Zvýšený počet provirů v osteopetrických vzorcích .....	62
Konstrukce vektorů třídy MCAS .....	63
Infekce kuřecí linie 7 <sub>2</sub> vektory třídy MCAS .....	80
Test receptorové interference .....	83
Vliv pH na vstup viru do buňky .....	85
Teplotní stabilita viru .....	88
Diskuze .....	89

Funkčnost mutace L154S v kontextu glykoproteinu MAV-B .....	89
Molekulární mechanizmy .....	90
Patogeneze.....	96
Shrnutí.....	99
Závěr .....	100
Použitá literatura .....	101

## Seznam zkratk

6HB	six helix bundle	šesti helikální svazek
ASLV	avian sarcoma and leukosis viruses	ptačí sarkomové a leukosové viry
ASLV-A	avian sarcoma and leukosis viruses subgroup A	ptačí sarkomové a leukosové viry podskupiny A
ASLV-B	avian sarcoma and leukosis viruses subgroup B	ptačí sarkomové a leukosové viry podskupiny B
ASLV-C	avian sarcoma and leukosis viruses subgroup C	ptačí sarkomové a leukosové viry podskupiny C
ASLV-D	avian sarcoma and leukosis viruses subgroup D	ptačí sarkomové a leukosové viry podskupiny D
ASLV-E	avian sarcoma and leukosis viruses subgroup E	ptačí sarkomové a leukosové viry podskupiny E
ALV-J	avian sarcoma and leukosis viruses subgroup J	ptačí sarkomové a leukosové viry podskupiny J
BSD	blasticidine s-deaminase	s-deamináza blasticidinu
cDNA	complementary DNA	komplementární DNA
CPZ	chlorpromazine	chlorpromazin
DC-SIGN	dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin	intercelulární adhesivní molekulu 3 vázající ne-integrin specifický pro dendritické buňky
DNA	deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
EGF	epidermal growth factor	epidermální růstový faktor
EGFR	epidermal growth factor receptor	receptor epidermálního růstového faktoru
EHR	extended host range	rozšířená hostitelská základna
env	envelope glycoprotein	obalový glykoprotein
EnvA	envelope glycoprotein subgroup A	obalový glykoprotein podskupina A
EnvB	envelope glycoprotein subgroup B	obalový glykoprotein podskupina B
EnvD	envelope glycoprotein subgroup D	obalový glykoprotein podskupina D
EnvE	envelope glycoprotein subgroup E	obalový glykoprotein podskupina E



EnvJ	envelope glycoprotein subgroup J	obalový glykoprotein podskupina J
FACS	Fluorescence-activated cell sorting	fluorescenčně aktivované třídění buněk
gag	group of antigens	skupina antigenů
GATE	guided adaptors for targeted entry	provázené adaptory pro cílený vstup
GFP	green fluorescent protein	zelený fulorescenční protein
HA	hemagglutinin	hemagglutinin
HA1	hemagglutinin subunit 1	hemagglutininová podjednotka 1
HA2	hemagglutinin subunit 2	hemagglutininová podjednotka 2
HIV	human immunodeficiency virus	virus lidské imunitní nedostatečnosti
hr1	host range 1	hostitelský rozsah 1
hr2	host range 2	hostitelský rozsah 2
HR1	heptad repeat 1	opakování skupiny sedmi 1
HR2	heptad repeat 2	opakování skupiny sedmi 2
HR-A	heptad repeat A	sedmerná repetice A
HR-B	heptad repeat B	sedmerná repetice B
chNHE1	chicken Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> exchanger type 1	kuřecí Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> výměník typu 1
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1	intercelulární adhezivní molekula 1
iPCR	inverse PCR	inverzní PCR
JSRV	jaagsiekte sheep retrovirus	jaagsiekte ovčí retrovirus
LDL	low density lipoprotein	lipoprotein o nízké hustotě
LDLR	low density lipoprotein receptor	receptor lipoproteinů o nízké hustotě
LTR	long terminal repeat	dlouhé koncové repetice
MAV	myeloblastosis-associated virus	virus asociovaný s myeloblastózou
MAV-2	MAV type 2	MAV typu 2
MAV-B	MAV subgroup B	MAV podskupiny B
mDR5	mouse death receptor 5	myší receptor smrti 5
mRNA	messenger RNA	mediátorová RNA
neo	neomycin	neomycin
NH <sub>4</sub> Cl	ammonium chloride	chlorid amonný
NTRE-4	nontransforming recombinant	netransformující rekombinantní

	subgroup E-4	podskupina E-4
PAE	porcine aortic endothelial	prasečí aortální endotel
PCR	polymerase chain reaction	polymerázová řetězová reakce
pH	potential of hydrogen	vodíkový potenciál
pol	polymerase	polymeráza
RNA	ribonucleic acid	ribonukleová kyselina
RSV	Rous sarcoma virus	virus Rousova sarkomu
SA	splice acceptor	přijímač spojení
SEAR	subgroup E ASLV receptor	receptor ASLV podskupiny E
SEM	semenogelin	semenogelin
SEVI	semen-derived enhancers of viral infection	amyloidy odvozené ze semene zesilující virovou infekci
SNV	spleen necrosis virus	virus slinivkové nekrózy
src	sarcoma	sarkom
SR-D RSV	Schmidt-Ruppin D Rous Sarcoma virus	Schmidt-Ruppinův D kmen Rousova sarkoma viru
sTva	soluble form of Tva	rozpustná forma Tva
SU	surface subunit	povrchová podjednotka
TM	transmembrane subunit	transmembránová podjednotka
TNF	tumor necrosis factor	faktor nádorové nekrózy
TRAILR	tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor	receptor ligandu indukujícího apoptózu příbuzný nádor nekrotizujícího faktoru
Tva	tumor virus a	tumorový virus a
Tva800	tumor virus a 800	tumorový virus a 800
Tva950	tumor virus a 950	tumorový virus a 950
Tvb	tumor virus b	tumorový virus b
Tvc	tumor virus c	tumorový virus c
Tvf	tumor virus f	tumorový virus f
Tvg	tumor virus g	tumorový virus g
Tvh	tumor virus h	tumorový virus h

Tvi	tumor virus i	tumorový virus i
Tvj	tumor virus j	tumorový virus j
TRAIL	tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligands	faktor nádorové nekrózy-příbuzné apoptózu-navozující ligandy
TRAILR	tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing receptor	faktor nádorové nekrózy-příbuzné apoptózu-navozující ligandy
TRAILR2	tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing receptor typ 2	faktor nádorové nekrózy-příbuzné apoptózu-navozující ligandy
UT	untranslated	nepřekládané
UV	ultraviolet	ultrafialová
VEGF	vascular endothelial growth factor	vaskulární endoteliální růstový faktor
vr1	variable region 1	variabilní oblast 1
vr2	variable region 2	variabilní oblast 2
vr3	variable region 3	variabilní oblast 3
v-src	viral src	virový src
wt	wild type	divoký kmen

## Úvod

Když za Peytonem Rousem před více než sto lety zavítala neznámá stařenka, která ve svých poněkud artritických rukou držela plymutku s mohutným nádorem, asi jen těžko tušil, že stojí na prahu velkého objevu (Weiss and Vogt, 2011). Zjistil totiž, že nádor, který tato slepička měla, je způsoben infekčním agens, které se dá přenášet mezi zvířaty (Rous, 1910, 1911). Toto agens bylo později zařazeno mezi viry a pojmenováno RSV (Rous sarcoma virus, virus Rousova sarcomu). Další analýzou byla odhalena celá plejáda těchto virů, známých jako ASLV (avian sarcoma leukosis virus, ptačí sarkoma a leukózní viry), které napadají drůbež a volně žijící ptáky, a které odstartovaly intenzivní výzkum mechanismů nádorové transformace.

Retroviry patří mezi viry s genomem ve formě jednořetězcové RNA. Tato genomová nebo také mRNA však nestačí k infekci buněk. Pro konverzi v infekční molekulu musí být tato RNA převedena do své DNA kopie, cDNA, která je následně integrována do hostitelského genomu (Temin, 1976). K této přeměně RNA na DNA slouží enzym zvaný reverzní transkriptáza, který si každý virion přináší s sebou. Aby bylo něco takového možné, potřebuje každá virová partikule kromě nukleoproteinu chránící genetickou informaci také další obal, fosfolipidovou dvojvrstvou membránu, která zabraňuje ztrátě důležitých komponent retroviru. Tuto membránu získávají retroviry při pučení z hostitelské buňky, nese proto některé její povrchové molekuly. Ty mohou hrát důležitou roli v nespecifických interakcích, v adhezi viru na buněčnou membránu anebo také v „signalizaci“ viru (Moller-Tank and Maury, 2014).

Existuje několik způsobů, jakým mohou retroviry způsobit nádorové bujení. Jeden z nich je inserční mutagenese a chronická transformace, kdy při integraci virového genomu do hostitelské DNA dojde buďto k poškození exprese nádorového supresoru nebo naopak zvýšení exprese proto-onkogenu (Hayward et al., 1981; Neel et al., 1981). Další je obecně známá akutní transformace pomocí onkogenu, jakým je například v-src RSV (Rohrschneider, 1980). Mimo src může jako onkogen sloužit i obalový glykoprotein retrovirů (Caporale et al., 2006). U některých případech patogeneze však ještě není odhalen mechanismus vzniku nádoru jako je tomu například u osteopetrózy, což je onemocnění kostí vyvolané zvýšenou proliferací osteoblastů, buněk tvořících kost (Foster et al., 1994; Joliot et al., 1993).

Viry drůbeže jsou významné hlavně díky faktu, že jejich hostitelé patří mezi největší producenty živočišných bílkovin. V poslední době se šíří ASLV podskupiny J, který decimuje chovy drůbeže v asijských zemích. ASLV jsou významné také díky svému unikátnímu mechanismu fúze, který dovoluje systematické zkoumání tohoto procesu. Avšak ani kuře jakožto modelový organismus nezahálí a poskytuje nám mnoho informací z oblasti vývojové (Starostová et al., 2014) a nádorové biologie (Dvořáková et al., 2013; Kosla et al., 2013).

## Přehled literatury

### Vstup retroviru do buňky

První nebezpečí, které na volný virion čeká, je nenavázání kontaktu s buňkou, ať už cílovou, permissivní, nebo náhodnou, nepermissivní. Tento krok, až na výjimky v podobě řízených experimentů probíhá nespecificky v závislosti na fyzikálních zákonech.

V nespecifických interakcích a adhezi viru na membránu hrají velkou roli glukosaminoglykany, bez účasti obalových proteinů (Guibinga et al., 2002; Pizzato et al., 1999, 2001; Sherer et al., 2010) ale často za pomoci polykationtů, které maskují negativní náboje membrán a dovolují jejich přiblížení na minimální vzdálenost (Davis et al., 2002; Roan et al., 2011). Toto pravidlo ale není absolutní, protože polykationty někdy mohou také kompetovat o receptor či ligand a tím inhibovat následný vstup viru do buňky (Jang et al., 2012; Rong et al., 1997; Toyoshima and Vogt, 1969). Někdy však náhodné mutace mohou naopak vytvářet přidatná vazebná místa například právě pro heparan sulfát, což může posilovat infekci konkrétních buněčných typů (Jinno-Oue et al., 2001). Uměle se dá infekce viru ještě více posílit i dalšími způsoby, například spinokulací, což je centrifugace buněk společně s virovými partikulami (Forestell et al., 1996). Spinokulace se však nedá vysvětlit pouhou zvýšenou fyzickou blízkostí viru a buňky, ale spíše změnou buněčného povrchu (Guo et al., 2011; O'Doherty et al., 2000). Povrchové molekuly získané při pučení mají o něco více specifické interakce, jako například ICAM-1 (Capobianchi et al., 1994), který je často přítomen na povrchu viru HIV (human imunodeficiency virus, virus lidské imunodeficiency). HIV je navíc vázán molekulou DC-SIGN (dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin, intercelulární adhesivní molekulu 3 vázající ne-integrin specifický pro dendritické buňky) přítomnou na dendritických buňkách, která je důležitá v interakci dendritických buněk a T buněk (Geijtenbeek et al., 2000).

Majoritní část membrány však tvoří obalový glykoprotein zajišťující jeden z kritických kroků v životním cyklu retroviru, přesněji řečeno, zajišťující ten úplně první krok. Zprostředkovává totiž mimo nespecifické, také specifickou interakci s buněčnými povrchovými proteiny, receptory, a následnou řízenou fúzi buněčné a virové membrány. Princip zmíněného procesu je konzervován napříč všemi druhy obalených virů i přes drobné rozdíly. U všech jsou totiž virové obalové proteiny ukotveny do jejich membrán a

obsahují část, která je hydrofobní a před svojí aktivací skryta uvnitř trimeru (či trimer heterodimerů). Zmíněným způsobem může být tento úsek chráněn v okolí hydrofobních aminokyselinových zbytků (v jakési kapse) v semistabilním stavu (Colman and Lawrence, 2003; Jurgens et al., 2015). V tomto stavu fúzní peptid setrvá až do své aktivace. Po aktivaci je tato část pomocí série konformačních změn vystavena na povrch viru, kde ale nesetrvá příliš dlouho. Hydrofobnost totiž zajišťuje reaktivnost s okolními membránami a schopnost zanořit se do nich. Po spojení fúzního peptidu a membrány dojde opět k přiblížení tohoto úseku a transmembránové kotvy proteinu, čímž dojde také k přiblížení obou membrán do vzdálenosti umožňující míšení membrán, hemifúzi a smíšení obsahu cytoplasmy a virové partikule (viz obrázek 2.). Následující kroky v životním cyklu virů (retrovirů) již nejsou předmětem této diplomové práce.

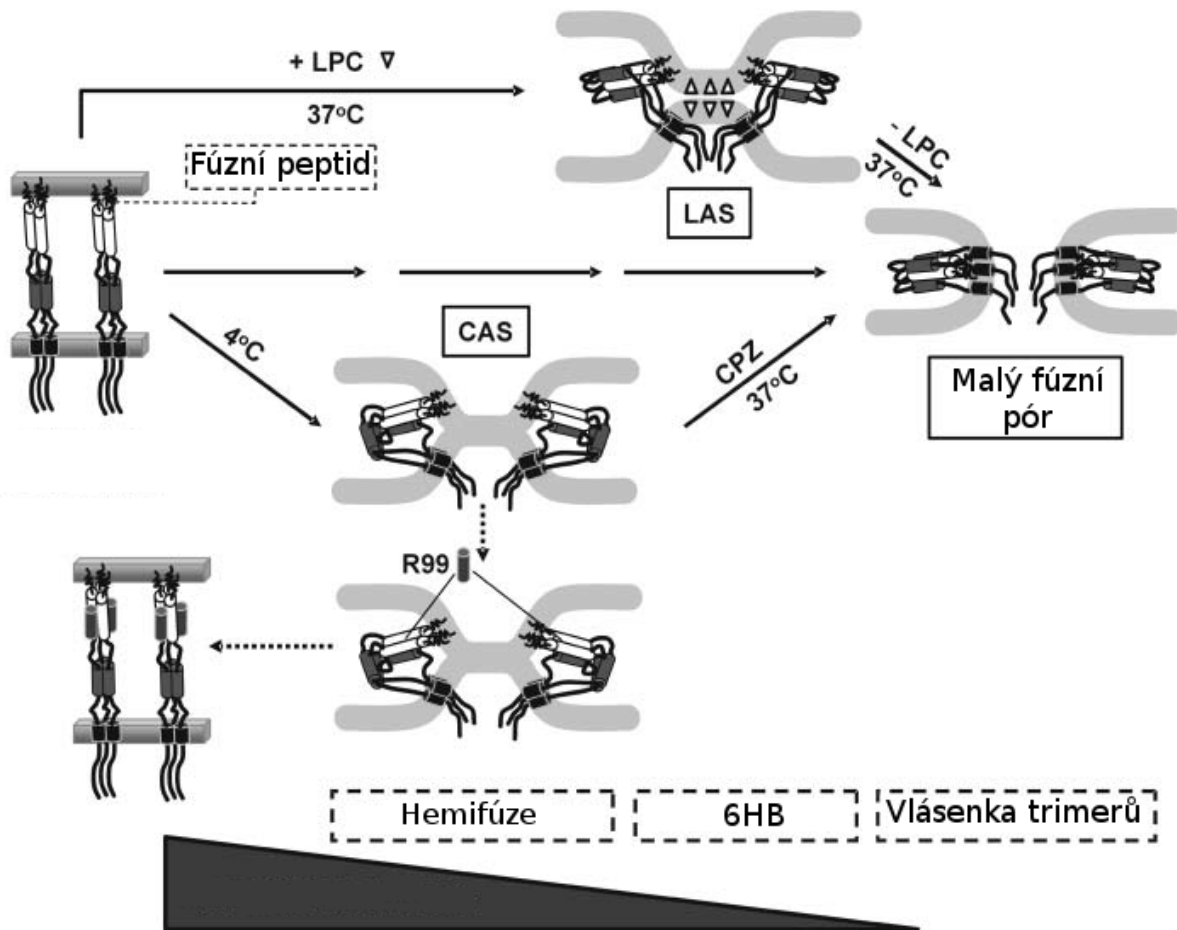
## Obalové glykoproteiny viru a povrchové receptory buňky

### Struktura a mechanika glykoproteinu

Jak již bylo nastíněno v předchozí kapitole, k úspěšnému vstupu viru do hostitelské buňky je potřeba obalového glykoproteinu. I přes popsané společné charakteristiky těchto struktur existují u jednotlivých zástupců virů rozdíly, jak ve struktuře glykoproteinu, tak v přístupu k zajištění fúze. Dosud byly charakterizovány 3 třídy glykoproteinů: třída I., mezi které patří například HIV, virus chřipky anebo ALSV, třída II., kam patří například alfaviry nebo paramyxoviry, a konečně nedávno popsaná třída III., která zahrnuje například virus vesikulární stomatitidy a herpesviry.

Viry patřící do I. třídy kódují protein, který tvoří homotrimer a který je posttranslačně štěpen na dvě podjednotky, povrchovou a transmembránovou, které drží pospolu. Tyto podjednotky se u viru chřipky nazývají HA1 a HA2 (hemagglutinin 1 a 2), zatímco u retrovirů se nazývají SU (surface unit, povrchová jednotka) a TM (transmembrane unit, transmembránová jednotka) a jsou spojeny cysteinovými můstky (Einfeld and Hunter, 1988; England et al., 1977; Leamnson and Halpern, 1976; Moelling and Hayami, 1977). I v rámci této třídy ale existuje ještě několik podtypů. Retroviry, až na údajné výjimky, jsou schopné fúze s hostitelskou membránou nezávisle na pH. Po vzniku vazby glykoprotein-receptor dojde ke konformačním změnám SU podjednotky, která dovolí odhalení fúzního peptidu a jeho vnoření do buněčné membrány. Série dalších strukturních změn pak vede k přiblížení virové a buněčné membrány a jejich následnému spojení (Gilbert et al., 1995; Moore et al., 1990; Sattentau and Moore, 1991). To je umožněno tím, že úsek TM podjednotky mezi transmembránovým a fúzním peptidem obsahuje dva segmenty oddělené od sebe flexibilním oligopeptidem zvané HR1 a 2 či HR-A a HR-B (heptad repeat, opakování skupiny sedmi). Ty vykazující vzájemnou afinitu. Výsledný komplex zvaný 6HB (six helix bundle, šesti helikální svazek) vede i k přiložení obou membrán. Naproti tomu u viru chřipky po navázání hemagglutininu (konkrétně HA1 podjednotky) na kyselinu sialovou k fúzi nedojde okamžitě. Musí totiž dojít k endocytóze partikule, která se tak dostane do prostředí s klesajícím pH. Při dosažení hodnoty zhruba pH 5,4 dojde ke konformačním změnám v HA2 podjednotce a následné fúzi, stejně jako u retrovirů (Colman and Lawrence,





### Obrázek 1. Druhá fáze fúze lipidických membrán

Jako výchozí stav tvorby vlásenky je „narovnané“ TM se zanořeným fúzním peptidem do cílové membrány. Přimícháním LPC (lyzofosfatyldilcholinu) a inokulací v 37°C nedochází k výměně lipidů mezi oběma membránami, což je označováno jako LAS (lipid-arrested stage, stádium zadržené lipidy). Při vystavení 4°C bez LPS naopak k hemifúzi dochází, ne však k tvorbě fúzního póru, což je nazýváno jako stádium zadržené chladem (cold-arrested stage, CAS). K tomu dojde až po navýšení teploty na 37°C a přidání CPZ (chlorpromazinu). Je-li však před zvýšením teploty přidán peptid R99 odvozený od TM podjednotky ASLV, dojde k reverzi stavu až do napřímení celé TM podjednotky. Tmavý trojúhelník udává úroveň pH, zleva doprava klesá. Převzato z Markosyan et al., 2004.

2003). Naprosto unikátní systém představuje skupina ptačích retrovirů, které v sobě spojují oba výše popsané mechanismy. Tyto viry jsou v podstatě závislé na nízkém pH v endozomech, ale na rozdíl od viru chřipky (a jim podobným) je ale nelze cíleně tímto

okyselením prostředí inaktivovat. Důvod je ten, že aktivace fúze u nich vyžaduje předchozí interakci s receptorem (Earp et al., 2003; Jha et al., 2011; Markosyan et al., 2004; Matsuyama et al., 2004; Melikyan et al., 2004, 2005; Mothes et al., 2000). První fáze zahrnuje navázání SU na příslušný receptor a konformační změny v obou podjednotkách vedoucí až k odhalení fúzního peptidu a jeho zanoření do buněčné membrány. Druhá fáze zahrnuje další konformační změny v reakci na snížení pH a dokončení fúze. Tento systém se v minulosti osvědčil jako výhodný právě pro studium mezikroků vstupu viru do buňky (obrázek 1., Markosyan et al., 2004; Matsuyama et al., 2004; Netter et al., 2004).

II. třídu fúzních peptidů charakterizuje hydrofobní smyčka (oproti hydrofobnímu zakončení podjednotky) uvnitř samostatného proteinu (obdoba TM/HA2 podjednotky) a existence samostatného druhého proteinu, který zajišťuje vazbu na receptor (obdoba SU/HA1 podjednotky). Tyto dva nezávislé proteiny tvoří heterodimer a následně trimer těchto dimerů. Vazba na receptor nakonec vede k endocytóze, snížení pH a aktivaci proteinu obsahujícího fúzní smyčku (Vaney and Rey, 2011).

III. třída fúzních peptidů sestává z dvojité hydrofobní smyčky, jako například v poměrně složitě strukturovaném gB proteinu herpesvirů (Heldwein et al., 2006) nebo proteinu G viru vesikulární stomatitidy (Roche et al., 2006). Tato třída, na rozdíl od předchozích, vykazuje známky reverzibility celého procesu, kdy kritická hodnota pH pro konformační změny je 6, zatímco hodnota vyšší než 7 vrací strukturu do téměř původního stavu (Backovic et al., 2007).

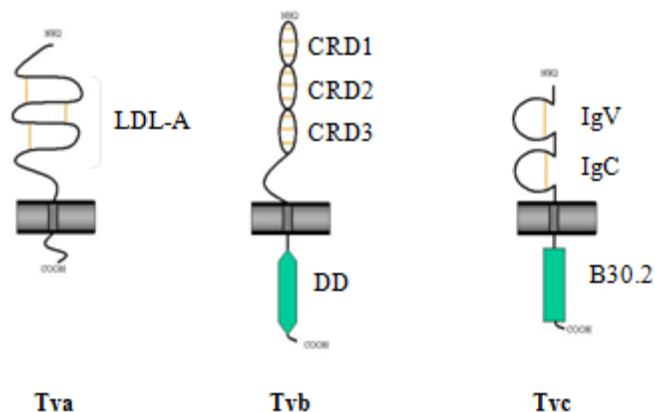
## **Receptory**

Kromě obalových proteinů virů je k úspěšné fúzi zapotřebí ještě jedna neméně důležitá složka – receptor. Díky evoluci a selekčním tlakům dnes existuje velké množství rozmanitých buněčných receptorů využívaných retroviry. Celý problém navíc komplikuje fakt, že jsou známy případy receptorů rozeznávané více viry a zároveň viry, které rozeznávají více receptorů (Jurgens et al., 2015; Miller, 1996; Miller and Chen, 1996; Weiss, 1993). Lze však vysledovat určité zákonitosti, jako například časté využívání kyseliny sialové nebo heparan sulfátu u virů se závislostí na pH, kterým stačí vyčkat na endocytózu (Colman and Lawrence, 2003; Vaney and Rey, 2011), nebo využití chemokinových či transportních proteinů, vícenásobně procházejících

membránou, u virů nezávislých na pH (Logg et al., 2007; Miller, 1996). Toto pravidlo však není absolutní, existují i viry vyžadující ko-receptory a navíc nebyly stále všechny příslušné receptory identifikovány.

Jedním z příkladů receptorové diverzity jsou receptory ALSV (viz obrázek 2.). V průběhu jejich vývoje se totiž od sebe oddělilo asi 10 vývojových větví, pojmenovaných podskupiny A - J, ne všechny však využívají rozdílné receptory. Zatímco podtypy A, C a J využívají unikátní receptory, podtypy B, D a E sdílejí společný receptor. Receptory pro podskupiny F až I dosud nebyly identifikovány.

Receptor pro ALSV A, pojmenovaný Tva (tumor virus a), se svojí strukturou podobá LDL receptoru (low density lipoprotein



**Obrázek 2. Receptory podskupin A, B a C**

Tva patří do rodiny LDL receptorů (Low Density Lipoprotein, nízko hustotní lipoprotein).

Tvb patří do rodiny TNF receptorů (Tumour necrosis factor, faktor nekrotizující tumor) a obsahuje 3 domény bohaté na cysteiny (cystein rich domain, CRD) a doménu smrti (death domain, DD), která se u savců uplatňuje v apoptóze.

Tvc obsahuje dvě imunoglobulinové domény a doménu B30.2, která má schopnost vázat různé substráty v imunitní odpovědi. Převzato od Daniela Elledera (nepublikováno).

receptor, receptor lipoproteinů o nízké hustotě) a byl identifikován jako první (Bates et al., 1993; Young et al., 1993). Přestože je hojně exprimován v rozmnožovacích orgánech (Elleder et al., 2005), jeho forma není vždy stejná. Vlivem alternativního sestřihu vznikají dvě formy, TVA950 a TVA800 (Bates et al., 1993). Zatímco TVA950 je ukotven vlastní transmembránovou doménou, TVA800 tato doména chybí a musí být proto ukotven pomocí GPI (glykofosfatidilinositol) kotvy v lipidových raftech (Bates et al., 1993). Jejich rozdílnost ale není jen strukturální, ale také funkční (Narayan et al., 2003). Zatímco TVA950 je po spojení s ligandem recyklován endozom-lysosomální degradační dráhou a vykazuje proto znaky s tím spojené (kinetika, citlivost viru na  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), TVA800 je zřejmě internalizován neznámou dráhou typickou pro lipidové rafty, protože kinetika

infekce je odlišná, a nebyla zjištěna citlivost viru na  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (Padilla-Parra et al., 2012). Navíc se ukazuje, že interakce TVA950 a TVA800 s virem není stejná, protože pro úspěšnou internalizaci viru je potřeba jeho mnohočetný kontakt s TVA800 oproti jedinému kontaktu s TVA950 (Gray et al., 2011).

Tvb (tumor virus b), patřící do rodiny TRAILR (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor, receptory apoptózu-indukujícího ligandu podobného faktoru nekrózy tumoru, Brojatsch et al., 1996; Smith et al., 1998) slouží jako receptor nejen pro ASLV B, ale také pro podskupiny D a E. Existuje však mnoho alel tohoto genu a ne každá podskupina rozeznává všechny (Reinišová et al., 2008; Weiss, 1993). Jako první byla identifikována  $\text{Tvb}^{\text{S3}}$ , která je rozeznávána pouze podskupinami B a D, naproti tomu  $\text{Tvb}^{\text{S1}}$  je rozeznávána všemi podskupinami kdežto  $\text{Tva}^{\text{f}}$  receptor ztratil svoji schopnost podporovat vstup viru úplně (Adkins et al., 2000). Krocaní embryonální fibroblasty však vykazují rezistenci ke zbylým podskupinám B a D, proto byla krocaní alela původně pojmenována jako SEAR (subgroup E ASLV receptor, receptor E podskupiny ASLV - Adkins et al., 1997), a až následně jako  $\text{Tvb}^{\text{t}}$ .  $\text{Tvb}^{\text{S1}}$  se vyznačuje netradičním způsobem interference. Normálně vede infekce retroviru k následné rezistenci buňky k dalším virům využívajícím stejný receptor, protože ten je vysycen a nemůže sloužit ke vstupu další partikule (Liu and Eiden, 2011; Vogt and Ishizaki, 1966). Infekce podskupinami B a D skrze  $\text{tvb}^{\text{S1}}$  vede k rezistenci ke všem třem podskupinám, zatímco infekce podskupinou E vede pouze k rezistenci vůči podskupině E, ne však podskupinám B a D. Fenomén by se dal vysvětlit existencí dvou forem tohoto proteinu (možná podobnost s TVA950 a TVA800), přičemž podskupina E reaguje jen s jednou formou (Adkins et al., 2001). Tuto představu podporuje také existence polypeptidu o délce 15-ti aminokyselin, který dokáže aktivovat obalové glykoproteiny podskupiny B (a pravděpodobně D), ne však E (Knauss and Young, 2002). Další důkaz o rozdílné interakci podskupiny E a podskupin B a D je také objevení mutace C125S v Tvb, která oslabuje citlivost kuřat na podskupiny B a D, avšak pro podskupinu E se kuřata stávají kompletně rezistentními. Tato alela byla proto nazvána jako  $\text{Tvb}^{\text{r2}}$  (Reinišová et al., 2008). Velké množství alel se dá vysvětlit snahou hostitele uniknout z dosahu zmíněných podskupin. B a D totiž jsou známé vysokou cytotoxicitou nejspíš zapříčiněnou právě jejich schopností vnikat do buňky ve vysokých počtech a s

obrovským množstvím integrovaných i neintegrovaných provirů usmrtit infikovanou buňku (Weller et al., 1980), zatímco podskupina E se postupně stala endogenním retrovirem a mohla tak selekčně působit na vývoj svého hostitele v čase (Robinson et al., 1981). Vysoká cytotoxicita však bývá také dávana do souvislosti s Tvb, který, jak již bylo řečeno, je z rodiny TRAILR (Diaz-Griffero et al., 2003). Tyto výsledky však bývají často zpochybňovány (Klucking et al., 2005).

Tvc (tumor virus c), receptor ASLV-C, je pravděpodobně blízký příbuzný skupině savčí imunoglobulinové superrodině, butyrofilinům (Arnett and Viney, 2014; Elleder et al., 2004a, 2005).

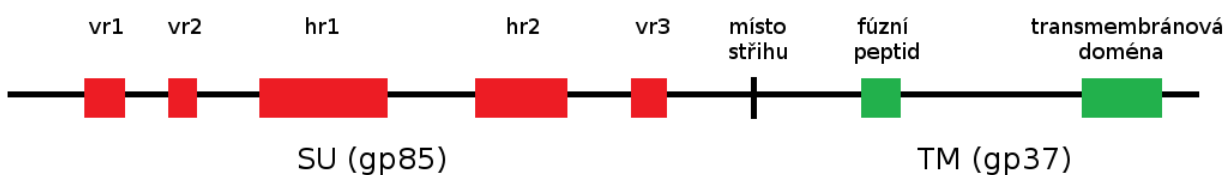
Tvj (tumor virus j) je poslední identifikovaný receptor ASLV, konkrétně pro podskupinu J a jedná se o chNHE1 (chicken hydrogenium natrium exchanger 1, kuřecí Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> výměník typu 1, (Chai and Bates, 2006). Tento protein, stejně jako podskupina J mají mezi kuřecími retroviry zvláštní postavení, protože chHNE1 jako jediný z receptorů pro tyto viry prochází membránou vícenásobně a ASLV-J jako jediný nevznikl hromaděním mutací, ale rekombinací s celou řadou endogenních a exogenních virů (Benson et al., 1998; Sacco et al., 2000).

Tvf, Tvg, Tvh a Tvi, neboli tumor virus f, g, h a i, receptory pro odpovídající skupiny dosud nebyly identifikovány.

V přírodě se vlivem koevoluce parazitů a jejich hostitelů objevilo několik mutovaných variant virových receptorů, které zajišťují rezistenci ke konkrétním druhům virů (Van Valen, 1973). Tyto mutace mají mnoho podob, ať už jde o bodové mutace či čtyřbodový inzert narušující čtecí rámeček jako v případě receptoru Tva (Elleder et al., 2004b) nebo předčasný stop kodon v případě Tvb (Klucking et al., 2002) a Tvc (Elleder et al., 2005). Tyto mutanty jsou hojně využívány při zkoumání událostí při vstupu retroviru do buňky, stejně jako jejich rozpustné formy. Jedna z nejužívanějších je Tva, respektive sTva, která v minulosti přispěla k pochopení dvoukrokového mechanismu fúze ptačích alfaretrovirů (Damico and Bates, 2000)

## Mutace - přírodní a umělý výběr

Typickým příkladem evoluce interakce virů a jejich receptorů jsou ASLV. Tyto viry, zřejmě pocházející z jediného společného předka, jsou si navzájem i dnes stále dosti podobné. Největší změny postihly gen *env*, kódující stejnojmenný protein, povrchový glykoprotein *env*. Ten, kromě místa pro proteázu, fúzního peptidu a transmembránové kotvy obsahuje také pět oblastí, které zodpovídají za interakci s receptorem. Tyto oblasti se nazývají *vr1*, *vr2*, *hr1*, *hr2* a *vr3* (variable region, hypervariable region, variabilní oblast, hypervariabilní oblast) a nacházejí se na SU podjednotce v tomto pořadí (viz obrázek 3.). Právě v těchto oblastech je akumulováno nejvíce záměn a rozdílů mezi jednotlivými podskupinami.



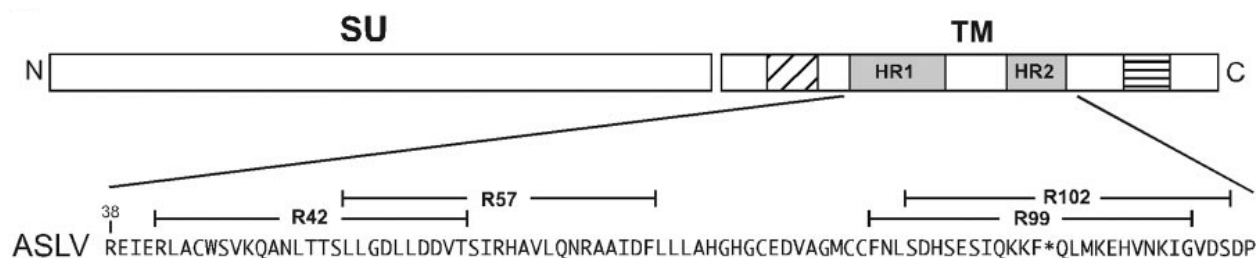
**Obrázek 3. Grafické zobrazení SU ASLV**

Grafické zobrazení prekursoru gp95. V oblasti SU jsou červenou barvou zvýrazněny části zodpovědné za hostitelskou specifitu (*vr1-3*, *hr1-2*), v oblasti TM jsou zelenou barvou zvýrazněny hydrofilní části procházející membránou (transmembránová doména a fúzní peptid). Mezi SU a TM je znázorněno i místo proteolytického stříhu.

Jak již bylo řečeno, tyto mutace jsou nejspíš výsledkem evolučních závodů ve zbrojení mezi hostitelem (kořistí) a parazitem (predátorem). Zbraně užitě v této nikdy nekončící bitvě jsou rozmanité: produkce plně funkčního obalového glykoproteinu hostitelem a jeho sekrece díky endogenizaci původně infekčního viru, čímž je zabráněno infekci exogenním virem například u křeččích buněk (Miller and Miller, 1992; Robinson et al., 1981) či rekombinace různých obalových glykoproteinů, čímž může virus obejít interferenci či jiný druh restrikce získáním nového receptoru, jako tomu bylo nejspíš u ASLV-J a NTRE4 (Chai and Bates, 2006; Tschlis et al., 1980). Někdy se toto zbrojení může ale vymknout z rukou, jako je tomu v případě koček, jejichž buňky sekretují část funkčního endogenního glykoproteinu, který komplementuje částečně defektní exogenní glykoprotein viru kočičí leukemie (Anderson et al., 2000).

Přírodní výběr nám však někdy nestačí pro důkladné prozkoumání různých jevů, můžeme však využít umělý výběr. Ten se dá zprostředkovat mnoha způsoby. Jedním

z nich je aplikace rozpustných forem receptorů, které zablokují efektivní infekci viru skrze předčasnou aktivaci obalového glykoproteinu. Takovým příkladem je i selekce ASLV-A, která dokázala infikovat buňky skrze receptor Tvb (Holmen and Federspiel, 2000; Melder et al., 2003). Dalším způsobem je využití inhibitorů fúze, jako je například peptid R99 odvozený od HR2 oblasti TM ASLV (obrázek 4., Netter et al., 2004). Tento peptid kompetuje s HR2 o „interkalaci“ do HR1. I tato strategie vede k selekci množství mutant se změnou specifitou (Amberg et al., 2006).



#### Obrázek 4. Grafické zobrazení HR oblastí

Grafické zobrazení oblastí HR1 a HR2 v TM podjednotce ptačích sarkoma a leukóзовých virů. V sekvenci jsou znázorněny oblasti, od kterých byly odvozeny peptidy inhibující fúzi, například R99. Upraveno z Netter et al., 2004.

Ne všechny mutace ale vedou ke změně specifity, jak by se mohlo zdát. Malá účinnost nekontrolované mutagenese pomocí selekčních tlaků sice generuje preferenčně replikačně kompetentní viry, není ale možné ovlivnit výslednou nově získanou schopnost viru. Jednotlivé izoláty sice poskytly informace, které vylepšily naše chápání procesů fúze (Babel et al., 2007), interakce s receptory (Dorner and Coffin, 1986; Dorner et al., 1985; Miller and Chen, 1996) a mechanismech překlenutí hostitelských bariér (Bova-Hill et al., 1991; Brown and Robinson, 1988; Lavillette and Kabat, 2004; Taplitz and Coffin, 1997), kterým ale bude věnována největší pozornost v následující kapitole.

Aplikace snah pochopit a změnit interakci je jasná: využití v genové terapii a léčbě. Mnoho onemocnění totiž provází atypická exprese proteinů, z nichž některé jsou vystaveny na buněčném povrchu a mohou tak sloužit jako cíle virů (Valsesia-Wittmann et al., 1994; Wong et al., 1992). Manipulace však může vést k poškození různé přirozené funkce glykoproteinu, od poškození transportu (Valsesia-Wittmann et al., 1994), snížení titru (Chu and Dornburg, 1995; Somia et al., 1995) anebo úplný blok fúze i přes zachování interakce s receptorem (Cosset et al., 1995). Jedním z východisek

tohoto problému je nahrazení fragmenty o stejné nebo menší délce jako původní úsek, které navíc nenaruší skládání proteinu a jeho konformaci (Bahrami et al., 2012; Katane et al., 2002; Miyakawa et al., 2008). I zde však byla často využita selekce na životaschopné klony opakovanou infekcí buněčných kultur (Barsov et al., 2001; Logg et al., 2007).

Další v řadě pokusů přeměrovat viry do buněk našeho zájmu byl koncept takzvaných GATE (guided adaptors for targeted entry), což jsou ligand-receptorové můstky, které dokáží zprostředkovat specifický kontakt buňky a viru (Snitkovsky and Young, 1998). Jako receptor slouží nativní receptor pro virus a jako ligand slouží protein, který je specificky a hojně exprimován na buňkách našeho zájmu, například EGFR, který je považován za znak provázející nádorové bujení (Batra et al., 1995; Moscatello et al., 1995; Wong et al., 1992). Metodika byla vypracována na modelu ASLV-A/EGFR (epidemiální růstový faktor receptor, receptor pro epidemiální růstový faktor), kdy byl GATE vytvořen spojením Tva (přírodního receptoru pro ASLV-A) a EGF (epidemiální růstový faktor, epidemiální růstový faktor) a bylo dosaženo 10% až 23% účinnosti infekce v porovnání s buňkami produkujícími Tva. I při použití dalších ligandů nebylo nikdy dosaženo uspokojivého výsledku (Snitkovsky and Young, 2002; Snitkovsky et al., 2000, 2001). V souvislosti s těmito zjištěními byla odhalena řada podivností, totiž schopnost ASLV-A pronikat do buněk bez příslušného receptoru (Fisher et al., 1999) a rozdílné chování viru s GATE, kdy společná inkubace před přidáním na buněčné kultury u ASLV-A nevede k produktivní infekci, zatímco u ASLV-B jde o poměrně úspěšnou metodu (Boerger et al., 1999).

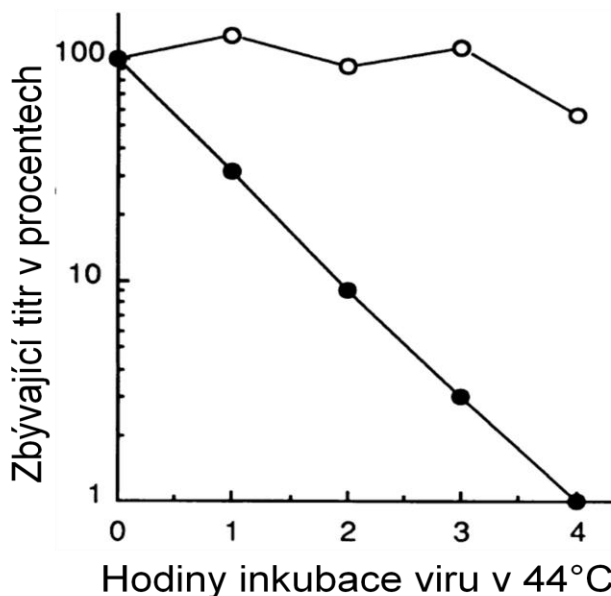


## Rozšíření hostitelské specifity

V průběhu let se v přírodě a v laboratořích nashromáždila celá řada mutant, která tak trochu nabourávají klasický pohled na vstup viru do buňky, konkrétně model specifity ligandu a receptoru. Z říše ptačích retrovirů je typickým představitelem tohoto fenoménu ASLV-D, evolučně velice blízký podskupinám B a E. Liší se však svojí schopností interferovat a schopností pronikat do savčích buněk (Svoboda and Dourmashkin, 1969; Svoboda et al., 1963; Weiss, 1993). Tato vlastnost byla podrobena zkoumání a ukázalo se, že koreluje s termostabilitou obalového glykoproteinu (obrázek 5., Bova-Hill et al., 1991).

Ani umělá selekce v laboratořích však nezůstává pozadu a vyprodukovala celou řadu mutant, které jsou schopny překlenovat

hostitelské bariéry. Příkladem může být mutace (Y142N/E149K) v glykoproteinu ASLV-A, která vedla ke schopnosti viru pronikat do savčích buněk (Melder et al., 2015). Navíc bylo zjištěno, že k fenotypu mezihostitelského přesunu stačí pouze záměna E149K. Podobný případ představuje i mutace glykoproteinu ASLV-B (L154S/T155I), která taktéž dovoluje vstup viru do savčích buněk (Taplitz and Coffin, 1997). I u této mutanty bylo zjištěno, že stačí pouze jedna z těchto záměn, konkrétně L154S k celkovému



**Obrázek 5. Teplotní stabilita ANV-D**

Data byla získána měřením zbývajících infekčních částic pro ANV-B8 (divoký kmen, světlá kolečka) a ANV-D (mutantní kmen, tmavá kolečka). Média s virem byla zahřáta na 44°C a v indikovaných časech odebrány pro titraci na kuřecích embryonálních fibroblastech. Procenta jsou odvozena od původního titru virů ( $9,9 \times 10^2$  ANV-B8 a  $4,5 \times 10^3$  ANV-D (Bova-Hill et al., 1991).

fenotypu (Rainey et al., 2003). T155I slouží pouze ke zmírnění některých jevů, jako je například cytopatický efekt (Rainey and Coffin, 2005).

Výše zmíněné práce naznačují, že pro změnu tropismu je potřeba snížit aktivační energii konformační změny (Babel et al., 2007; Matsuyama et al., 2004). Tento jev se neomezuje jen na říši retrovirů, ale i na nepříbuzné viry, jako je například virus spalniček, který destabilizací fúzního proteinu zvýšil svoji schopnost způsobovat neurodegenerativní onemocnění (Jurgens et al., 2015). Existují však i případy, kdy mutace pouze mění afinitu k povrchovým proteinům, které sice váží obalové proteiny virů, ale nezpůsobují konformační změny vedoucí až k fúzi. Příkladem je myší retrovirus, který změnou v povrchové oblasti glykoproteinu vytváří nové místo vázající heparan sulfát a tím posiluje vazbu na neurony (Jinno-Oue et al., 2001).

Je nutné zmínit, že po vstupu ptačího retroviru do savčí hostitelské buňky čekají na každý replikačně kompetentní virion nástrahy v podobě různých bloků jeho životního cyklu. Mezi ně patří například aberantní splicing (Lounková et al., 2014).

Právě téma rozšířené hostitelské specifity nás zaujalo a rozhodli jsme se ho blíže prozkoumat a určit mechanismy, které za ním stojí. Případné poznání totiž umožní rozšířit naše základní znalosti týkající se mechanismů fúze a případného využití těchto vědomostí v konstrukci nové generace vektorů, predikce chování virových proteinů a jejich nově vzniklé patogenity.

## Cíle práce

Cíle této práce bylo zavést mutaci L154S do obalového glykoproteinu retroviru MAV-B a ověřit jeho popsané schopnosti pronikat do nepermissivních buněčných kultur a snížit receptorové interference v permissivních buněčných kulturách. Dalším cílem byla snaha o vysvětlení zmíněných vlastností, a také prozkoumání patogenicity tohoto mutantního kmene v infikovaných plemenech kuřete hnědých a bílých leghornek. Dílčí experimenty proto byly:

- cílená mutagenese viru MAV-B záměnou leucinu za serin v pozici 154 obalového glykoproteinu a ověření popsaných vlastností na pozadí odlišného genetického pozadí
- infekce vybraných plemen kuřete, analýza projevu infekce a detekce přítomnosti proviru
- konstrukce vektorů MCAS založených na viru MAV-B obsahující rozdílné glykoproteiny a sestřihové místo pro expresi reportérových genů
- infekce nepermissivních buněčných kultur a detekce exprese GFP
- analýza změn chování virové partikule při vstupu do buněk za různých fyzikálně-chemických podmínek

Výsledky této práce poslouží jako odrazový můstek pro analýzu mutací vybraných konzervovaných aminokyselin v glykoproteinech ptačích sarkoma a leukózových retrovirů.

## **Materiál a metody**

### **Použité kmeny virů a buněčné kultury**

V práci byly použity kmeny virů MAV-B, MAV-2(O) a MAV-EHR. MAV-B vznikl plakovou purifikací z původního MAV-2(N), jak bylo popsáno (Pečenka et al., 1988). Vysoce patogenní MAV-2(O) vznikl plakovou purifikací z původního kmene MAV-2(O), jak bylo popsáno (Aurigemma et al., 1991). MAV-EHR vznikl cílenou mutagenezí, jak bude popsáno v následujícím textu.

Použité buněčné kultury byly kuřecí Blef (Brown leghorn embryo fibroblasts), savčí NRK (Normal rat kidney) a 3T3 a kuřecí buněčná kultura 7<sub>2</sub>. Kultury kuřecích buněk Blef byly získány, jak bude popsáno dále. Buněčné komerční imortalizované kultury krysích NRK a myších 3T3 byly štědrým darem Víta Karafiáta, buněčné kultury kuřecích 7<sub>2</sub> byly štědrým darem Daniela Elledera. Tyto buňky postrádají receptory pro ASLV podskupiny A a B(D,E) a byly získány izolací embryonálních fibroblastů v McArdlově laboratoři výzkumu rakoviny, Univerzita Wisconsin, Madison (Klucking et al., 2002).

### **Pulverizace tkáně kapalným dusíkem**

Každý vzorek kuřecí tkáně byl důkladně rozmělněn tloučkem v předchlazené třecí misce v přítomnosti kapalného dusíku. Poté byl ke vzorku přidán 1 ml lyzačního roztoku DNA lysis a po zmrznutí důkladně rozmělněn a smíchán s rozdrčeným vzorkem tkáně. Vzniklý prášek byl převeden do kádinky a rozpuštěn ve vodní lázni o teplotě 66°C a převeden do centrifugační zkumavky o objemu 2 ml.

### **Izolace vysokomolekulární DNA fenol-chloroformovou extrakcí**

Každý vzorek tkáně rozpuštěný v 1 ml lyzačního pufru byl převeden do 2 ml centrifugační mikrozukavky a inkubován v 50°C 1-5 dní. Pro vyčištění vzorku od RNA byl každý vzorek inkubován 0,5 - 2 hodiny v 70°C a následně ke každému bylo přidáno 15 µl roztoku TE+RNAse, směs byla vortexována a inkubována při pokojové teplotě 30 minut. Po této proceduře byl každý vzorek smíchán s 0,5 ml směsí fenolu a chloroformu v poměru 1:1. Obsah mikrozukavky byl poté vortexován po dobu 15-ti sekund na stolním vortexu a stáčen ve stolní chlazené centrifuze po dobu 15-ti minut při 16873 násobku g při teplotě 7°C. Po stočení byl supernatant převeden do nové 1,5 ml centrifugační mikrozukavky a smíchán s 96% EtOH (ethylakoholem) v poměru 1:1,

promíchán a poté stočen ve stolní centrifuze po dobu 10-ti minut 16873×g při pokojové teplotě. Po stočení byl supernatant odsán a k peletu je přidán 80% EtOH o objemu 0,5 ml. Vzorek byl opět stáčen ve stolní centrifuze po dobu 5-ti minut 16873×g při pokojové teplotě. Po stočení byl supernatant odsán a pelet byl ponechán v biologickém inkubátoru temperovaným na 50°C na dobu 30-ti minut. Po uplynutí této doby byl vyschlý pelet resuspendován v příslušném objemu (dle velikosti peletu) pufru TE +NaN<sub>3</sub> a uchován při 4°C.

### **Izolace fragmentů DNA**

Izolace proužků amplifikované DNA byla provedena z 1% gelu nízko tající agarózy rozpuštěné v pufru 2× TBE+100 mM NaAc. Po uplynulé elektroforéze byl příslušný proužek DNA zviditelněn UV zářením a vyříznut a přenesen do centrifugační zkumavky o objemu 2 ml. Ke každému vzorku byl přidán 1 ml roztoku 2M LiCl a glykogenu, načež jsou mikrozukavky inkubovány na stole při pokojové teplotě po dobu jedné minuty. Po inkubaci byly mikrozukavky přeneseny do vyhřívacího bločku (70°C) na dobu 5-ti minut. Po teplotní inkubaci byly mikrozukavky vortexovány na stolním vortexu po dobu 15-ti vteřin a přeneseny do vyhřívacího bločku (40°C) na dobu 5-ti minut. Poté byl ke každému vzorku přidán fenol o objemu 0,5 ml. Obsah mikrozukavky je poté vortexován po dobu 15-ti sekund na stolním vortexu a stáčen ve stolní chlazené centrifuze po dobu 15-ti minut při 16873g při teplotě 7°C. Po stočení byl supernatant rozdělen do dvou nových 1,5 ml centrifugačních mikrozukavek a každý aliquot smíchán s iPrOH (izopropylalkoholem) v poměru 1:1, opatrně promíchán otáčením mikrozukavky, inkubován na stole při pokojové teplotě po dobu 30-ti minut a poté stočen ve stolní centrifuze po dobu 30-ti minut při 16873g při pokojové teplotě. Po stočení byl supernatant odsán a k peletu by přidán 80% EtOH o objemu 0,5 ml. Vzorek byl opět stáčen ve stolní centrifuze po dobu 5-ti minut při 16873×g při pokojové teplotě. Po stočení byl supernatant odsán a pelet byl ponechán v biologickém inkubátoru temperovaným na 50°C na dobu 30-ti minut. Po uplynutí této doby byl jeden z vyschlých peletů z každé série (každý vzorek byl po stáčení s fenolem rozdělen na 2) resuspendován v 6-ti  $\mu$ l TE+NaN<sub>3</sub> a převeden k druhému peletu ze série. Poté byla ještě každá první mikrozukavka vypláchnuta dalšími 6-ti  $\mu$ l pufru TE +NaN<sub>3</sub> a opět byl celý obsah převeden ke druhému vzorku ze série, který byl uchován při 4°C.

## Měření koncentrace DNA

Měření koncentrace DNA probíhalo dle modifikovaného protokolu k zařízení Qubit fluorometer. Bylo smícháno 200  $\mu$ l pufru pro standardní měření a 1  $\mu$ l reakční barvičky na každý měřený vzorek a dva standardy. Do 0,5 ml centrifugačních zkumavek bylo poté přidáno po 190  $\mu$ l pro oba standardy a 199  $\mu$ l pro každý měřený vzorek. Do zkumavek pro standardy bylo přidáno 10  $\mu$ l Standardu 1 obsahujícího 0 ng DNA a 10  $\mu$ l Standardu 2 obsahujícího 100 ng DNA. Do zkumavek pro vzorky byl přidán 1  $\mu$ l vzorku. Všechny zkumavky byly vortexovány 3 vteřiny a inkubovány 3 minuty. Po ukončení inkubace byl Qubit fluorometr kalibrován měřením Standardu 1 a 2 a připraven k měření jednotlivých vzorků.

## Fúzní PCR mutagenese ASLV-B

Fúzní PCR probíhalo dle popsaného postupu „Selektivní amplifikace PCR“. Jako templát byl užit plazmid pMAV-right-B, použité primery pro amplifikaci mutované sekvence byly:

„SRA for env start“ 5'-AGCAACAAGCAAGAAAGACCCGGAGAAGA-3' – 65,8°C

„6400 left (2)“ 5'-GCGCGATCCCCACAAATGAGGAAA-3' – 67,9°C

Primery pro cílenou mutagenesi byly:

EHE right 5'-CACATCCTTT**C**GACCGACCCAGGG-3' – 61,9°C/66,9°C

EHR left 5'-CCCTGGGTCGGTC**G**AAAGGATGTG-3' – 63,2°C/66,9°C

Místo bodové substituce je označeno červeně, první uvedená teplota je teplota nasedání primerů před prvním kolem PCR, druhá teplota je teplota nasedání primerů po prvním kole PCR. PCR reakce probíhala ve dvou oddělených zkumavkách, kombinace užitých primerů byly „SRA for env start“ a „EHR left“ v jedné reakci a „6400 left (2)“ a „EHR right“ v reakci druhé. Konečná koncentrace primerů byla 100 nM.

Po ukončení PCR reakce byl produkt reakce zkontrolován agarózovou elektroforézou a poté přečištěn elucí z nízkotající agarózy dle postupů „Elektroforetogram agarózového gelu“ a „Izolace fragmentů DNA“. Po izolaci byly oba produkty smíchány dohromady společně s primery „SRA for env start“ a „6400 left (2)“ při konečné koncentraci obou primerů 100 nM a opět amplifikovány metodou PCR. Konečný produkt byl izolován elucí z nízkotající agarózy dle postupu „Izolace fragmentů DNA“ a štěpen restričními endonukleázami AgeI a MfeI dle postupu

„Štěpení DNA restrikčními endonukleázami“, stejně jako původní plazmid pMAV-right-B. Vektor i inzert byly ligovány dle postupu „Ligace“, čímž vznikl nový plazmid pMAV-right-B-EHR.

### **Inverzní polymerázová řetězová reakce**

V prvním kroku byla genomová DNA dvojitě štěpena restrikčními endonukleázami BstYI a BclI, které štěpí v genomu circa každých 500 páru bazí a každá také jednou v proviru. K 10-ti  $\mu\text{l}$  každého vzorku o koncentraci 100 ng/ $\mu\text{l}$  v 1,5 mililitrové mikrozkuhavce bylo přidáno 11,6  $\mu\text{l}$  digMixu.

Po 16-ti hodinové inkubaci směsí v inkubátoru temperovaném na 50°C bylo ke vzorkům přidáno 200  $\mu\text{l}$  DNA purif, byly vortexovány a poté k nim bylo přidáno 150  $\mu\text{l}$  směsi fenolu a chloroformu v poměru 1:1 vychlazené na teplotu -20°C. Po důkladném vortexu 15-ti sekund a 15-ti minutové centrifugaci 16873g ve vychlazené (8°C) centrifuze byla vodná fáze obsahující DNA přenesena do nových 1,5 mililitrových mikrozkuhovek. K vodné fázi o objemu 200  $\mu\text{l}$  bylo přidáno 200  $\mu\text{l}$  iPrOHu, načež byla celá směs promíchána inkubována při pokojové teplotě 15 minut. Poté byly vzorky centrifugovány v nechlazené centrifuze při 14000 RPM po dobu 15-ti minut. Supernatant bez DNA byl odsán a k peletu bylo přidáno 0,5 ml 80% EtOH. Vzorky jsme centrifugovali jako v předchozím kroku. Poté byl supernatant odsán a vzorky byly inkubovány půl hodiny v inkubátoru temperovaném na 50°C.

V druhém kroku byly vzorky rozpustěny v 40  $\mu\text{l}$  ligMixu, inkubovány 5 minut při pokojové teplotě, intenzivně vortexovány, inkubovány 5 minut při pokojové teplotě, intenzivně vortexovány a následně doplněny na celkový objem 400-ti  $\mu\text{l}$  ligMIXu doplněného o 0,05  $\mu\text{l}$  T4 ligázy. Směs byla poté inkubována 16 hodin při pokojové teplotě a následně opět přečištěna fenolchloroformovou metodou. K ligační směsi bylo přidáno 200  $\mu\text{l}$  DNA lysisu, vortexováno, poté 300  $\mu\text{l}$  fenolu a chloroformu v poměru 1:1 o teplotě - 20°C a vortexováno po dobu 15-ti sekund. Po 15-ti minutové centrifugaci ve vychlazené centrifuze na 8°C 16873g byla vodná fáze odebrána do nové 1,5 mililitrové mikrozkuhavky, ke které bylo přidáno 600  $\mu\text{l}$  iPrOH, směs byla promíchána a inkubována 30 minut při pokojové teplotě. Po inkubaci byla směs centrifugována v nechlazené centrifuze při 14000 RPM po dobu 30-ti minut. Po odsání supernatantu a přidání 0,5 ml 80% EtOH byly mikrozkuhavky znovu centrifugovány při 14000 RPM po

dobu 5-ti minut. Poté byl supernatant odsán a vzorky byly inkubovány v inkubátoru temperovaném na 50°C.

V třetím kroku byly cirkulární formy DNA linearizovány, přidáním 11 µl linMixu s 0,1 jednotkami restriční endonukleázy SphI na vzorek. Ty byly následně inkubovány při pokojové teplotě, vortexovány, inkubovány při pokojové teplotě a naposledy vortexovány, než byly inkubovány v inkubátoru temperovaného na 37°C po dobu 16-ti hodin.

V konečné fázi byly vzorky selektivně amplifikovány pomocí metody PCR a analyzovány pomocí gelové elektroforézy. Byla vytvořena PCR superMix přidáním směsi polymeráz TDV do PCR pufru TDVmix. PCR superMix byl rozdělen na 3 aliquoty a ke každému byla přidána rozdílná sada primerů L, C a R. Každý vzorek byl poté amplifikován v těchto specifických PCR pufrch a analyzován gelovou elektroforézou.

### Design linker-primerů

Pro design linker-primerů byl použit program Vector NTI 7. V zobrazené sekvenci vektoru LentiCRISPR-D10A-blast byla vybrána taková, která byla ve stejné čtecí fázi a asi 50 bp před startovním kodonem genu *bsd* (blasticidin-S deaminase, blasticidin-S deamináza), genu zajišťujícímu rezistenci vůči antibiotiku blasticidinu. Dále jsme vybrali sekvenci, která byla asi 50 bp za terminační sekvencí tohoto genu. Délky primerů byly upraveny dle vypočítané délky nasedání. Výpočet teploty nasedání byl prováděn serverem <http://eu.idtdna.com/> pomocí softwaru OligoAnalyzer 3.1. Na každý 5' konec primerů byla přidána sekvence ATCGAT, která je rozeznávána restriční endonukleázou ClaI a krátká pomocná sekvence pro efektivní štěpení endonukleázy.

Sekvence primerů pro selektivní amplifikaci genu *bsd* a jejich teplota nasedání, krátká pomocná sekvence, sekvence rozeznávaná ClaI a sekvence komplementární k vektoru LentiCRISPR-D10A-blast jsou pro přehlednost od sebe odděleny znakem „|“:

„2F“ 5'-CGCCG|ATCGAT|AACTTCAGCCTG-3' – 65,5°C

„1R“ 5'-GCCGG|ATCGAT|TGATTGTCGACTTAAC-3' – 68,8°C

### Selektivní amplifikace PCR

Selektivní amplifikace vybraných fragmentů DNA byla provedena pomocí specifických linker-primerů. Tyto linker-primery sestávají ze sekvence komplementární



k cílovému fragmentu DNA, místa rozeznávané restriční endonukleázou a krátké pomocné sekvence umožňující efektivní štěpení. PCR směs obsahovala pro jednu reakci 7,5 µl AccuMixu, 2,5 µl destilované vody, 0,5 µl 10mM primeru ve směru transkripce a 0,5 µl 10mM primeru proti směru transkripce a 0,1 µl TDV polymeráz. Samotná reakce byla provedena v PCR cyklovači s následujícím programem: 90°C, 10 sekund; 95°C, 15 sekund; 95°C, 10 sekund; 65°C, 2 minuty (tento a předchozí krok byl opakován 22×); 65°C, 3 minuty; 95°C, 10 sekund; 65°C, 5 minut a poslední cyklus 4°C po neomezenou dobu pro správné uchování amplifikovaných vzorků.

### **Konstrukce vektorů třídy MCAS**

Jako výchozí vektor byl použit plazmid pMAV-right-B, který byl štěpen restričními endonukleázami SacI a AelI. Linearizovaný vektor byl přečištěn izolací z nízkotajícího agarózového gelu, stejně jako vyštěpený fragment SacI-AelI. Tento fragment byl štěpen endonukleázou XhoI a opět přečištěn izolací z nízkotajícího agarózového gelu.

Jako inzert sloužil PCR fragment získaný po selektivní amplifikaci PCR segmentu z RCAS-B (BP) obsahující SA místo a místo pro restriční endonukleázu ClaI opatřený z jedné strany linker-primerem s místem pro restriční endonukleázu SacI a z druhé strany místem pro XhoI. Fragment byl štěpen těmito restričními endonukleázami a izolován z nízkotajícího agarózového gelu.

Byla připravena ligační směs obsahující linearizovaný vektor MAV-right-B (SacI-AelI), fragment RCAS-B (BP) (SacI-XhoI) a fragment MAV-right-B (XhoI-AelI). Ligace probíhala za přítomnosti koncentrované T4 ligáza po dobu 60 hodin.

Po ligaci byly bakterie TOP10 transformovány ligační směsí a pomocí restričního mapování byl vybrán správně konstruovaný klon. Po extrakci plazmidové DNA byl tento konstrukt štěpen a ligován s linearizovaným plazmidem pMAV-B-left. Po ligaci byly bakterie TOP10 opět transformovány touto směsí a vybrán správně konstruovaný klon pMCAS-B. Pro vytvoření vektorů pMCAS-A a pMCAS-EHR byly z plazmidů pAT-MAV-1 a pMAV-B-EHR vyštěpeny geny *envA* a *envEHR* a zaměněny ho za vyštěpený *envB* z plazmidu pMCAS-B-right a vzniklé plazmidy byly opět štěpeny a ligovány s linearizovaným plazmidem pMAV-B-left. Získané plazmidy byly pojmenovány pMCAS-A a pMCAS-EHR.

Pro konstrukci plazmidů nesoucí reportérový gen, *gfp* nebo *bsd* jsme vycházeli z plazmidů pMCAS-A-right, pMCAS-B-right a pMCAS-EHR-right, které jsme štěpili restriční endonukleázou ClaI. Stejným enzymem jsme štěpili i plazmid pRCAS-B (GP) GFP a PCR metodou amplifikovaný gen *bsd* nesoucí navíc sekvenci pro ClaI. Produkty štěpení jsme vyčistili pomocí izolace z nízkotající agarózy a ligovali. Vzniklé plazmidy jsme pojmenovali pMCAS-A GFP, pMCAS-B GFP, pMCAS-EHR GFP, pMCAS-A BSD, pMCAS-B BSD a pMCAS-EHR BSD.

### **Příprava kuřecích embryonálních fibroblastů**

Ve sterilním boxu s laminárním prouděním bylo vypreparováno 10-ti denní emryo kuřete hnědé leghornky (odstranění hlavy, křídel, běhů a vnitřností), zbylá tkáň omyta PBS a rozrušena nůžkami a pinzetou. Rozrušená tkáň byla inkubována v roztoku 1× Trypsin+EDTA při 37°C a výsledná suspenze byla přenesena do růstového média DMEM na misku s adhezivní úpravou povrchu o průměru 10 cm a kultivována v biologickém termostatu s teplotou 37°C a 5% CO<sub>2</sub>. Po dosažení konfluence byla miska pasážována.

### **Pasážování buněčných kultur**

Kultivace buněčných kultur probíhala v biologickém termostatu s teplotou 37°C a 5% CO<sub>2</sub>. Každé 2-3 dny, když buněčné kultury dosáhly konfluence, bylo potřeba je pasážovat. To probíhalo ve sterilním laminárním boxu. Každá plastová miska s adhezivní úpravou o průměru 6 cm byla zbavena média a opláchnuta ledovým roztokem PBS. Po jeho odstranění byl přidán 0,5 ml roztoku 1× Trypsin+EDTA a inkubován 2 minuty v 37°C. Uvolněné buňky byly strženy z povrchu misky proudem roztoku 1× Trypsin+EDTA a 100 µl suspenze buněk bylo převedeno do 15-ti ml centrifugační zkumavky obsahující 4 ml růstového média DMEM. Zředěná suspenze buněk byla poté převedena na novou plastovou misku s adhezivním povrchem.

### **Transfekce buněčných kultur**

Pro transfekci buněčných kultur byly zvoleny dvě metody: kalcium fosfátová a pomocí polyethyleniminu.

Pro kalcium fosfátovou metodu byly buněčné kultury vysety na misky s adhezivním povrchem o průměru 6 cm do 50% konfluence. Druhý den bylo jejich médium

vyměněno za čerstvé s polovičním obsahem séra. V 1,5-ti ml centrifugační zkumavce bylo smícháno 5 µg DNA, 220 µl destilované vody určené pro tkáňové kultury, a 25 µl 2,5M roztoku CaCl<sub>2</sub>, vortexováno a přidáno k 250 µl 2× HBS. Směs byla opět vortexována a inkubována při pokojové teplotě 30 minut. Směs byla poté přidána k buňkám, které byly kultivovány za standardních podmínek. Další den bylo médium vyměněno za čerstvé s plným obsahem séra.

Pro metodu pomocí PEI (polyethyleniminu) byly buněčné kultury vysety na misky s adhezivním povrchem o průměru 6 cm do 50% konfluence. Druhý den bylo jejich médium vyměněno za čistý DMEM. V 1,5-ti ml centrifugační zkumavce jsme smíchali 5 µg DNA, 250 µl DMEM a v druhé 1,5-ti ml centrifugační zkumavce jsme smíchali x µl PEI a x µl DMEM. Obsah obou centrifugačních zkumavek jsme smíchali, vortexovali a inkubovali 15 minut. Směs jsme poté přidali k buňkám, po dalších 3 hodinách jsme přidali 1 ml média s plným obsahem séra. Buňky jsme pak kultivovali za standardních podmínek. Další den bylo médium vyměněno za čerstvé s plným obsahem séra.

Pro transfekci komerčního plazmidu pVAX1 nesoucí mDR5 bez genu zajišťující selekční výhodu byl tento plazmid smíchán s komerčním plazmidem pcDNA3 nesoucí gen *neo* zajišťující rezistenci k antibiotiku G418 v poměru 1:100 a následně byla buněčná kultura selektována.

### **Pozitivní antibiotiková selekce**

Pro pozitivní selekci klonů nesoucí gen *neo* zajišťující rezistenci k antibiotiku G418 byla využita buněčná kultura 7<sub>2</sub> mDR5, která byla ko-transfekována plazmidy pVAX1 nesoucí mDR5 a pcDNA3 s genem *neo* v poměru 1:100. Samotná selekce byla provedena přidáním antibiotika G418 do rostoucího média v konečné koncentraci 500 µg/ml. Jako pozitivní kontrola sloužila buněčná linie 7<sub>2</sub> bez exogenního genu *neo* a jako negativní kontrola sloužila stejná linie, která však nebyla selektována antibiotikem. Po 2 týdnech pasážování a nepřetržité selekce byl obsah misek zkontrolován pomocí optického mikroskopu.

Pro pozitivní selekci klonů nesoucí integrovaný provirus exprimující gen *bsd* byla vyseta na 6-ti jamkovou misku do každé jamky buněčná kultura Blef v konfluenci 40%. Druhý den bylo do každé jamky přidáno antibiotikum blasticidin v koncentracích 1, 2, 5, 10, 20 a 50 mg/ml. Čtvrtý den po vyšetí byl optickým mikroskopem zkontrolován stav

buněčných kultur. Pro následující experimenty byla vždy využita koncentrace 10 mg/ml blastidinu v médiu, ve kterém byly buňky vysety na misku s adherentní úpravou povrchu.

## **Produkce viru**

Chronicky infikované buňky produkující požadovaný virus jsme vyseli do objemu růstového média 8 ml v konfluenci 33% na misky s adherentním povrchem a průměrem 10 cm. Druhý den jsme odebrali médium, buňky opláchli ledově chlazeným PBS a přidali 4 ml čerstvého růstového média. Po dvou dnech byl supernatant odebrán, centrifugován (pokojová teplota, 1377g) a odebrán objem 3 ml média.

## **Semikvantitativní PCR pro detekci provirů**

Polymerázová řetězová reakce (PCR, polymerase chain reaction) byla prováděna dle upraveného GoTaq protokolu. Připravili jsme GoTaq superMix a přidali k němu 0,4 µl 10mM specifického primeru ve směru forward a 0,4 µl 10mM specifického primeru ve směru reverse. Do každé reakční směsi byl přidán vzorek 1 µl DNA o koncentraci 100 ng/µl.

Selektivní amplifikace byla zajištěna různými sadami primerů, každý primer je označen svojí pozicí v DNA genomu proviru.

Pro detekci všech forem provirů pro analýzu lyzátů tkáňových kultur byl použity následující primery:

„500 left“ 5'-CCCCTCTATCAGGGTCATCGAACTCGC-3'

„50/7400 right“ 5'-CAAATAAGGGAATCGCCTGATGCACC-3'

Pro detekci cirkulárních forem provirů pro analýzu lyzátů tkáňových kultur byly použity následující primery:

„500 left“ 5'-CCCCTCTATCAGGGTCATCGAACTCGC-3'

„7200 right“ 5'-GGGCAAGGCTTGACCGAGGGGAC-3'

Pro detekci všech provirů pro analýzu lyzátů z experimentů s nízkým pH/vysokou teplotou byly použity následující primery:

„50/7400 left“ 5'-GCATCAGGCGATTCCCTTATTTGG-3'

„350/7650 right“ 5'-GGCCGGACCGTCGATTCCCTG-3'

Samotná reakce byla provedena v PCR cyklovači s následujícím programem: 90°C, 10 sekund; 95°C, 15 sekund; 95°C, 15 sekund; 65°C, 2 minuty (tento a předchozí krok byl opakován 22×); 65°C, 5 minut a poslední cyklus 4°C po neomezenou dobu pro správné uchování amplifikovaných vzorků.

### **Elektroforetogram agarózového gelu**

Horizontální gelovou elektroforézou jsme připravili krátkým povařením 0,6 g v 60 ml TBE pufru, rychlým ochlazením a přidáním 6  $\mu$ l EtBr. Směs jsme nalili do elektroforetické vany s hřebeny a nechali vychladnout v chladicí místnosti.

### **Štěpení DNA restrikčními endonukleázami**

Pro kontrolu kvality, kvantity a původu plazmidů bylo využito takzvané restrikční mapování. Teoreticky reakční směs pro endonukleázy obsahuje 1  $\mu$ l BSA+spermidin, 1  $\mu$ l 10× koncentrovaného pufru NEB specifického pro konkrétní restrikční endonukleázu, 8  $\mu$ l destilované vody a 0,5  $\mu$ l příslušné restrikční endonukleázy (2,5 – 5 jednotek enzymu). V praxi je ale část objemu destilované vody nahrazena roztokem s plazmidem o konečné koncentraci 1 mg. V případě dvojitého štěpení bylo ke směsi přidáno ještě 0,5  $\mu$ l druhé restrikční endonukleázy. Štěpení probíhalo 2 hodiny ve 37°C anebo přes noc v pokojové teplotě.

### **Ligace**

Pro ligaci vektoru a inzertu byla vytvořena ligační směs sestávající z 1  $\mu$ l ligačního pufru, 1  $\mu$ l BSA a 0,5  $\mu$ l T4 ligázy a teoreticky 8  $\mu$ l destilované vody. Objem vody býval nahrazen objemem roztoku s vektorem a roztoku s inzertem tak, aby ve směsi bylo 50 ng vektoru a 5 ng inzertu za jeho každých 100 bp v případě kohezních konců a 20 ng na každých 100 bp v případě tupých konců.

### **Příprava kompetentních bakterií**

Na bakteriální miskou bylo rozetřeno 5  $\mu$ l zásobního roztoku bakterií TOP10 a inkubováno 20 hodin v inkubátoru při 37°C. Poté byla pomocí bílé pipetovací špičky přenesena jedna kolonie do erlenmeyerovy baňky o obsahu 50 ml s 5-ti ml bakteriálního růstového média a třepali 8 hodin při teplotě 37°C. Poté bylo dvěma mililitry média s bakteriemi inokulováno 200 ml bakteriálního média, které bylo rozděleno do dvou erlenmeyerových baněk o obsahu 1 l a třepali 2 hodiny. Poté byla změřena optická

denzita při vlnové délce 600 nm a doředěno médiem na hodnotu 0,6. Obsah obou baněk byl převeden celkem do 4 centrifugačních zkumavek o objemu 50 ml a inkubován na ledě. Obsah zkumavek byl poté stočen na centrifuze (4°C, 1377g, 5 minut), odebrán supernatant a pelet byl resuspendován v 15-ti ml TFB I a 20 minut otáčen v chladové místnosti na otočném rotoru. Obsah zkumavek byl opět stočen na centrifuze (4°C, 1377g, 5 minut), supernatant byl odebrán a pelet resuspendován v 2 ml TFB II. Následně bylo do 1,5 ml centrifugačních zkumavek přenášeno po 50 µl suspenze bakterií, které byly uchovány v -80°C.

### **Transformace bakterií**

Aliquot bakterií o objemu 50-ti µl byl rozmražen a držen na ledu. Bylo k němu přidáno 5 µl ligační směsi, krátce protřepáno, inkubováno 25 minut na ledu, 1,5 minuty v 42°C a nakonec 10 minut na ledu. Poté byla směs rozetřena sterilní skleněnou tyčinkou ve tvaru hokejky na bakteriální misku o průměru 10-ti cm s ampicilinem nebo kanamycinem (100 µg/ml). Miska byla inkubována 20 hodin v inkubátoru temperovaném na 37°C.

### **Molekulární klonování**

Bakterie narostlé na bakteriální misce nebo ze zásobní suspenze byly inokulovány do mikrobiologických zkumavek o objemu 15 ml s 1,25 ml bakteriálního média s antibiotikem (100 µg/ml) a inkubovány v biologickém inkubátoru při 37°C po dobu 8-12 hodin. Poté byl 1 ml bakteriální suspenze převeden do 2 ml centrifugační zkumavky a centrifugován (pokojová teplota, 1377g, 5 minut). Supernatantu byl odstraněn a pelet resuspendován v 100 µl roztoku TEG, poté bylo za stálého vortexování přidáno 200 µl roztoku NaOH+SDS a 300 µl ledově vychlazeného roztoku NH<sub>4</sub>Ac. K této směsi bylo přidáno 500 µl směsi fenol chloroformu (1:1), důkladně vortexováno a centrifugováno na stolní centrifuze (4°C, 16873×g, 15 minut). Po rozdělení fází byla vrchní převedena do nové 1,5-ti ml centrifugační zkumavky a smíchána s izopropylalkoholem v poměru 1:0,6. Směs byla centrifugována na stolní centrifuze (pokojová teplota, 16873g, 10 minut), supernatant byl odstraněn, přidáno 0,5 ml 80% ethylakoholu a opět centrifugováno na stolní centrifuze (pokojová teplota, 16873g, 5 minut). Naposledy byl

odebrán supernatant a pelet byl vysušen v biologickém inkubátoru temperovaným na 37°C na dobu 30-ti minut. Po vysušení byl pelet resuspendován v 50 µl TE+NaN<sub>3</sub> pufru.

### **Produkce zásobních roztoků virů**

Chronicky infikované kultury Blef produkující viry MCAS-A GFP, MCAS-B GFP a MCAS-EHR GFP byly vysety na plastové petriho misky o průměru 10 cm do semikonfluentní hustoty. Druhý den bylo odebráno médium a k buňkám opláchnutým PBS byly přidány 4 ml čerstvého média. Po dvou dnech bylo toto médium s vysokým obsahem virionů odebráno a sloužilo jako zásobní roztok virů.

### **Infekce kuřecí linie 7<sub>2</sub> vektory třídy MCAS**

Neinfikované kultury 7<sub>2</sub>, 7<sub>2</sub> mDR a Blef jsme vyseli na 3×4 petriho misky o objemu 6 cm do konfluencie 30%. Druhý den bylo jejich médium opět odebráno a místo nich přidán 1 ml ze zásobních roztoků virů. Po 3 hodinách byl objem média doplněn na 4 ml.

Buněčné kultury byly poté 3× pasážovány a analyzovány mikroskopií v UV spektru.

### **Testování receptorové interference**

Na 12-ti jamkovou misku bylo vyseto celkem 150000 buněk Blef infikovaných virem MCAS-A BSD selektovaných blasticidinem do celkem tří jamek (tzn. 50000 buněk na jednu jamku). Stejně taky byly vysety i Blef infikované MCAS-B BSD, Blef infikované MCAS-EHR BSD a neinfikované Blef. Druhý den bylo buňkám odebráno médium, byly promyty PBS a do jamičky od každého druhu (Blef/MCAS-A BSD, Blef/MCAS-B BSD, Blef/MCAS-EHR BSD a Blef/0) bylo přidáno 300 ul média obsahující virus MCAS-A GFP a 500 ul chudého růstového média. Stejně byly buňky infikovány i viry MCAS-B GFP a MCAS-EHR GFP.

Dva dny po infekci byla exprese GFP v superinfikovaných buňkách analyzována mikroskopií v UV spektru, poté byly buňky pasážovány. 4 dny po infekci byly buňky trypsinovány, převedeny do centrifugační zkumavky a vyšetřeny metodou FACS.

### **Vliv pH na vstup viru**

Růstové médium bylo smícháno s 12 mM roztokem kyseliny citronové v poměru 1:1 a změřeno na pH-metru. Poté bylo k této směsi přidáno růstové médium v poměru 1:3 a opět změřeno pH.

Po confirmaci změn pH v růstovém médiu po přidání kyseliny citronové a neutralizaci nadbytkem růstového média byl z chronicky infikovaných buněk Blef sklizen virus dle postupu „Produkce zásobních roztoků viru“ a takto získané médium bylo centrifugováno (pokojová teplota, 1377g). Odebrány byly pouze vrchní 2 ml, které byly rozděleny na 4 části, každá po 0,5 ml a převedeny do 1,5ml centrifugačních zkumavek. První a druhá část sloužily jako kontroly a bylo k nim přidáno médium bez přísad o objemu 0,5 ml. K třetí a čtvrté části bylo přidáno médium s 12mM kyselinou citronovou v poměru 1:1 o celkovém objemu 0,5 ml a 15 minut inkubováno na ledu. Po ukončení inkubace bylo pH těchto zásobních roztoků virů neutralizováno přidáním 3 ml objemu růstového média. Tímto byly převrstveny buněčné kultury Blef a 7<sub>2</sub> na miskách s průměrem 6 cm dorostle do semikonfluentní koncentrace. Ty byly předtím zbaveny média a opláchnuty roztokem PBS vychlazeným na 4°C. Kultury byly inkubovány po dobu 14-ti hodin v inkubátoru (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).

Po 14-ti hodinách byly buňky lyzovány, jejich DNA vyizolována a analyzována metodou semikvantitativního PCR a gelovou elektroforézou.

### **Teplotní stabilita viru**

Neinfikované kultury Blef a 7<sub>2</sub> byly vysety na dvě 12-ti jamkové misky s adhezivní úpravou povrchu o průměru 3,5 cm v počtu 3\*10<sup>5</sup> buněk/ml na misku. Do prvních šesti jamek obou misek bylo přidáno po 1 ml ze suspenze obsahující buňky kultury Blef a následně do dalších šesti jamek obou misek bylo přidáno po 1 ml ze suspenze obsahující buňky kultury 7<sub>2</sub>.

Aliquoty média s viry MCAS-B GFP a MCAS-EHR GFP byly rozděleny do celkem dvanácti pásků PCR zkumavek, 6 pro každý virus, v celkovém objemu 400 µl na pásek PCR zkumavek. Tyto pásky byly vloženy do tří PCR cyklovačů s rozdílnou délkou programu 44°C, kdy první délka byla 1 hodina, druhá 2 hodiny a třetí 8 hodin. Všechny programy byly ukončeny snížením teploty na 4°C po neomezenou dobu.

Po ukončení všech programů PCR cyklovačů byly viry, původně rozdělené do proužků PCR mikrozkušavek, opět spojeny do celkem 6-ti 1,5 ml centrifugačních mikrozkušavek, tzn. každá mikrozkušavka obsahovala obsah právě 2 proužků PCR mikrozkušavek každého viru z každého PCR cyklovače. Na každou odpovídající 12-ti jamkovou misku (s buněčnými kulturami Blef v jamkách 1-6 a 7<sub>2</sub> v jamkách 7-12) bylo



naneseno 300  $\mu$ l odpovídajícího viru. Na 1. a 7. jamku byly naneseny viry inkubované 1 hodinu při 44°C, na 2. a 8. jamku viry inkubované 2 hodiny a na jamky 3. a 9. viry inkubované 8 hodin. Na 4. a 10. jamku bylo přidáno 300  $\mu$ l viru, který byl inkubován přes noc při teplotě 4°C. Na zbývající jamky (5., 6., 11. a 12.) bylo přidáno 300  $\mu$ l čistého růstového média. Všechny jamky byly poté doplněny na celkový objem 800  $\mu$ l čistým médiem DMEM. Takto byly buňky inkubovány po dobu 14-ti hodin v inkubátoru (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).

Po uplynutí této doby byly obě 12-ti jamkové plastové misky nesterilně otevřeny, médium bylo odsáno, buňky byly opláchnuty roztokem PBS a následně zlyzovány roztokem DNA lysis. DNA byla izolována fenol-chloroformovou metodou, koncentrace byla změřena dle protokolu Qubit, DNA naředěna na konečnou koncentraci 25 ng/ $\mu$ l a analyzována metodou semikvantitativního PCR a gelovou elektroforézou.

### **Infekce kuřecích embryí**

Oplodněná vejce byla získána z Kolče a vložena do naklápěcího inkubátoru. 11. den po oplodnění byla vejce otočena do polohy špičkou dolů. 12. den po oplodnění byla prosvícena a identifikovány žíly, které byly označeny na skořápce pomocí tužky. V okolí značky byla vyříznuta ve skořápce otvor pomocí mikrobrusky. Před samotnou infekcí byla skořápka odstraněna a blanku pod ní byla namazána parafínovým olejem pro zprůsvitnění skořápky. Vejce byly znovu prosvíceny a pomocí inzulinové stříkačky byly do odhalené žíly injektovány média s virem o objemu 100  $\mu$ l anebo média s buňkami produkující virus o stejném objemu. Otvor po skořápce byl zakapán parafínovým voskem a vejce byly vráceny do naklápěcího inkubátoru.

### **Odebírání vzorků tkání**

Kuře bylo dekapitováno a vypreparováno. Vzorky krve, srdce, jater, plic, ledvin, sleziny a stehenních kostí byly uloženy do 2ml centrifugačních zkumavek, popsány a zamraženy na -20°C. Vzorky určené k histologii byly uchovány ve 1,5ml centrifugačních zkumavkách a fixovány 4% paraformaldehydem, načez byly odeslány k imunohistochemické analýze provedené pracovníky ve Fingerlandově ústavu patologie v Hradci Králové.

## Seznam roztoků a chemikálií

### Práce s DNA

<b>2,5 M NaAc</b>	340 g NaAc.3H <sub>2</sub> O doplněno 1000 ml H <sub>2</sub> O
<b>10 M NH<sub>4</sub>Ac</b>	1542 g NaAc Doplněno do 2000 ml H <sub>2</sub> O
<b>NaOH+SDS</b>	1 ml 10M NaOH 5 ml 20% SDS Doplněno do 50 ml H <sub>2</sub> O
<b>TEG</b>	2,25 g glukózy 6,25 ml 1M Tris (pH 8,5) 5 ml 500 mM EDTA (pH 8,5) 0,5 ml 5M NaN <sub>3</sub> Doplněno do 250 ml H <sub>2</sub> O
<b>3M TRIS-CI-7,0</b>	343 g TRIS – baze 450 ml H <sub>2</sub> O titrováno 200 ml HCl do pH 7,0 doplněno 1000 ml H <sub>2</sub> O
<b>10M LiCl</b>	doplněno 500 ml H <sub>2</sub> O
<b>10M NaOH</b>	340 g NaOH doplněno 1000 ml H <sub>2</sub> O
<b>0,5M EDTA</b>	187 g EDTA Na <sub>2</sub> .2 H <sub>2</sub> O 800 ml H <sub>2</sub> O titrováno 0,5 ml 10M NaOH do pH 8,5 1 ml 5M NaN <sub>3</sub> doplněno 1000 ml H <sub>2</sub> O
<b>5M NaN<sub>3</sub></b>	16,5 g NaN <sub>3</sub> doplněno 50 ml H <sub>2</sub> O
<b>10× BSA</b>	100 mg BSA doplněno 50 ml H <sub>2</sub> O
<b>10× BSAsp</b>	300 µl BSA

	150 µl spermidin doplněno 1000 ml H <sub>2</sub> O
<b>1M DTT</b>	1,55 g DTT doplněno 10 ml H <sub>2</sub> O
<b>10x lig</b>	25 ml 1M TRIS-7,5 5 ml 1M MgCl <sub>2</sub> 2,5 ml 1M DTT 0,5 ml 100mM ATP 17 ml H <sub>2</sub> O
<b>Fenol-chloroform</b>	25 ml fenol 25 ml chloroform ekvilibrace 0,1 M Tris pH 8,0
<b>DNApurif</b>	10 ml 2,5 M NaAc 2,5 ml 0,5 M EDTA 50 µl 5 M NaN <sub>3</sub> 250 µl glykogenu 20 mg/ml 250 µl 20% SDS 37 ml H <sub>2</sub> O
<b>DNAlysis</b>	125 ml 0,5M EDTA 2,5 ml 1M CaCl <sub>2</sub> 50 mg proteázaK 12,5 ml 20% SDS 110 ml H <sub>2</sub> O
<b>TE+NaN<sub>3</sub></b>	500 µl 1M Tris – 8,5 500 µl 0,5M NaN <sub>3</sub> 100 µl 0,5M EDTA 49 ml H <sub>2</sub> O
<b>TE+RNase</b>	50 ml TE+ NaN <sub>3</sub> 500 µl denatur. RNaseA
<b>denatur. RNase</b>	1 ml TE+NaN <sub>3</sub> 10 mg RNase Reanal

rozpuštěno, krátce povařeno ve vodní lázni, vychladnutí,  
zamražení, rozmražení, stočení precipitovaných proteinů

◎ RNaseA

1g RNaseA

50 ml TE+NaN<sub>3</sub>

proteáza K

10 mg

1 ml TE+NaN<sub>3</sub>

5 mM CaCl<sub>2</sub>

10x TBE

108 g TRIS-baze

55 g Boric Acid

40 ml 0,5M EDTA

doplnit na 1000 ml

iPCR

digMix (na vzorek)

7 ul H<sub>2</sub>O

2 ul 10xNEB2

2 ul 10xBSA<sub>sp</sub>

ligMix (na vzorek)

320 ul H<sub>2</sub>O

40 ul 10xlig

40 ul 10xBSA

linMix (na vzorek)

9 ul H<sub>2</sub>O

1 ul 10xNEB X

1 ul 10x BSA<sub>sp</sub>

Práce s bakteriálními kulturami

TFBI

1,472 g KoAc

4,95 g MnCl<sub>2</sub>

6,05 g RbCl

0,735 g CaCl<sub>2</sub>

75 ml glycerol

doplnit na 250 ml

TFBII

1,046 g NaMOPS

5,513 g CaCl<sub>2</sub>

0,605 g RbCl

	75 ml glycerol doplnit na 250 ml
<b>LB médium</b>	10 g trypton 5 g yeast extract 10 g NaCl titrovat 0,3 ml 5M NaOH doplněno 1000 ml H <sub>2</sub> O sterilizovat
<b>Bohaté médium</b>	10 g trypton 10 g yeast extrakt 5 g casamino acids doplněno 1000 ml H <sub>2</sub> O sterilizovat
<b>Komplexní bohaté m.</b>	450 ml bohaté půdy 25 ml 10% glukózy 25 ml 2M NaHPO <sub>4</sub> 2,5 ml 2M KCl 2,5 ml 1M MgCl <sub>2</sub>
<b>2M NaHPO<sub>4</sub></b>	574 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O 63 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O doplněno 1000 ml H <sub>2</sub> O sterilizovat
<b>2M KCl</b>	149 g KCl Doplněno do 1000 ml H <sub>2</sub> O sterilizovat
<b>1M MgCl<sub>2</sub></b>	95 g MgCl <sub>2</sub> Doplněno do 1000 ml H <sub>2</sub> O sterilizovat

#### Práce s buněčnými kulturami

**DMEM** Dulbecco's Modified Eagle's Medium

<b>G/P/S</b>	1000 mg/l glykóza 2 mM glutamin 100 U/ml penicilin 0,1 mg/ml streptomycin
<b>Růstové médium</b>	500 ml DMEM 30 ml fetální bovinní sérum (Mycoplex) 10 ml kuřecí sérum 5 ml G/S/P
<b>Chudé růstové médium</b>	500 ml DMEM 15 ml fetální bovinní sérum (Mycoplex) 5 ml kuřecí sérum 5 ml G/S/P
<b>10× PBS</b>	8 g NaCl 0,2 g KCl 1,44 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,24 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Doplněno do 1000 ml H <sub>2</sub> O

### Seznam enzymů

BstYI	New England Biolabs
BclI	New England Biolabs
SphI	New England Biolabs
SacI	New England Biolabs
AleI	New England Biolabs
XhoI	Fermentas/Life technologies
T4 ligáza	New England Biolabs
GoTaq polymeráza	Promega
TDV polymeráza	98,75 ul Tag polymeráza (New England Biolabs) 1,25 ul DeepVent (New England Biolabs)

### Seznam přístrojů

PCR cycler	MJ research PTC-200
Stolní centrifuga	Eppendorf 5418

Stolní centrifuga chlazená	Eppendorf 5414 R
Stolní centrifuga	Multifuge 3 SR
Fluorescenční mikroskop	LEITZ DM IRB
Biologický inkubátor	Mitre 4000 series
Laminární box	Schoeller Clean Air

### **Seznam software**

NTI Vector (v.7)	Fermentas/Life technologies
OligoAnalyzer 3.1	Integrated DNA Technologies
FlowJo X	FlowJo, LLC.

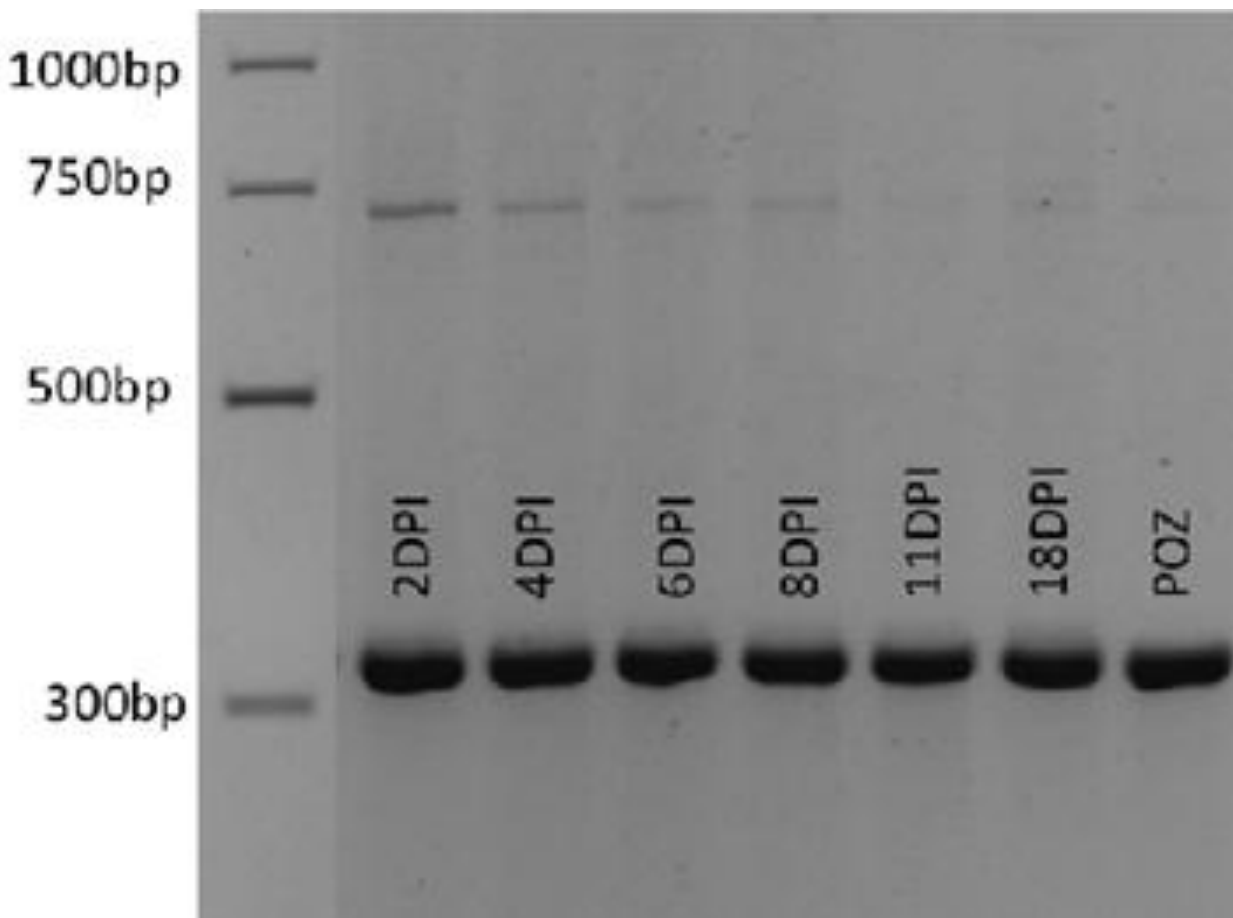
## Výsledky

### Biologická aktivita viru MAV-B nesoucího mutaci L154S v obalovém glykoproteinu

Efekt mutace L154S byl původně zkoumán na pozadí viru Pr-RSV-B (Rainey et al., 2003). Pro ověření, zda se efekt této mutace projevuje nezávisle na typu ASLV, jsme pomocí fúzního PCR vnesli tuto mutaci do jiného viru ze skupiny ALSV, do MAV-B. V získaném molekulárním klonu byla ověřena sekvence mutovaného genu pro obalový glykoprotein, klonem byla transfekována kultura kuřecích fibroblastů a produkován virus, pojmenovaný MAV-EHR (extended host range, rozšířený hostitelský rozsah), byl používán ve všech následujících experimentech.

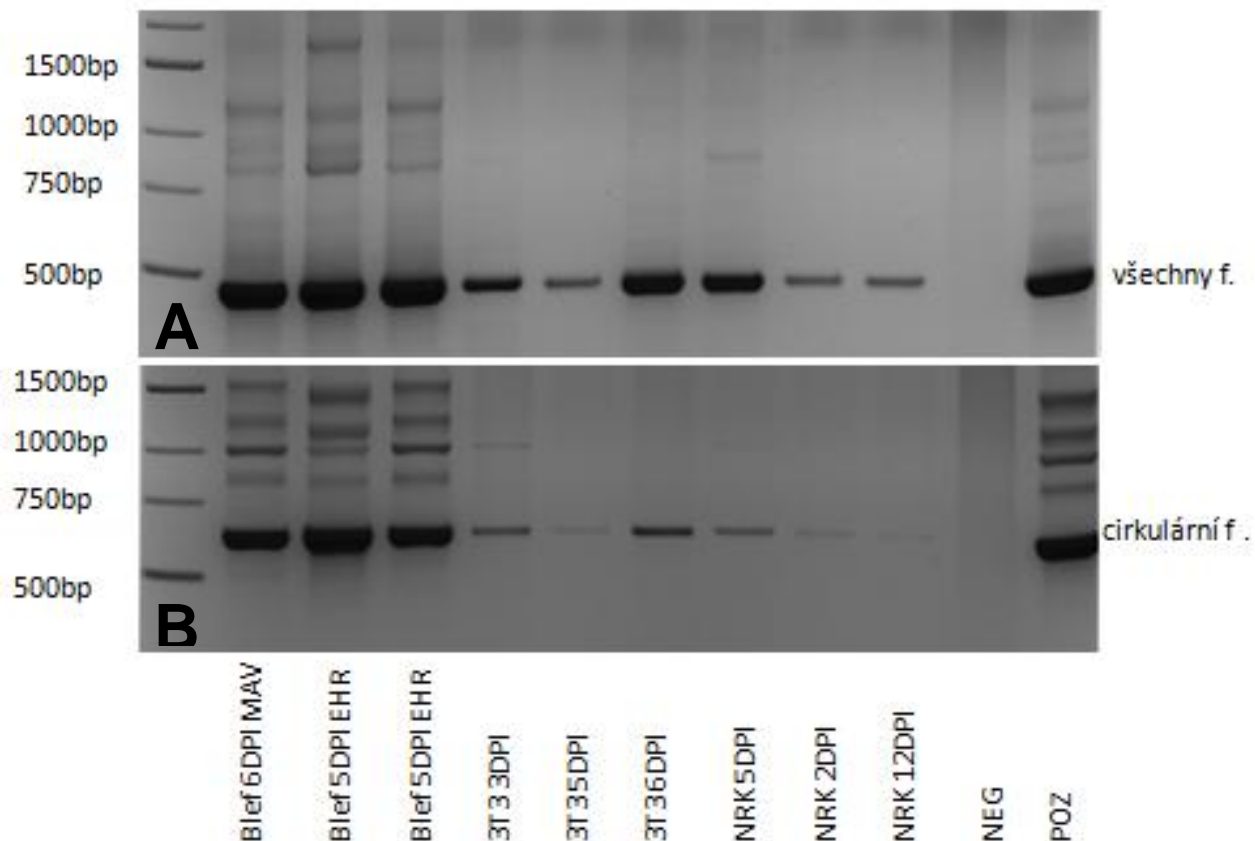
V prvním kroku jsme potvrdili schopnost viru infikovat kuřecí embryonální fibroblasty v kultuře a pomnožit se v nich (Obrázek 6). V dalším kroku jsme ověřovali, zda mutace L154S vede k rozšíření hostitelského rozsahu MAV-B podobně jako je tomu v případě Pr-RSV-B (Rainey et al., 2003). Jak ukazuje obrázek 7, MAV-EHR vstupuje a je reverzně transkribován i v myších a krysích buňkách. Množství virové DNA vzniklé v savčích buňkách je sice o ca 1 řád nižší než v ptačích buňkách, ale z tohoto experimentu nelze činit závěry srovnávající účinnost vstupu do ptačích versus savčích buněk, protože v ptačí buňky (na rozdíl od savčích) produkují infekční virus a dochází k opakované infekci kultury. Analogicky provedené kontrolní experimenty (Obrázek 8 C a D) potvrdily, že nemutovaný MAV-B do savčích buněk v měřitelném množství nevstupuje.





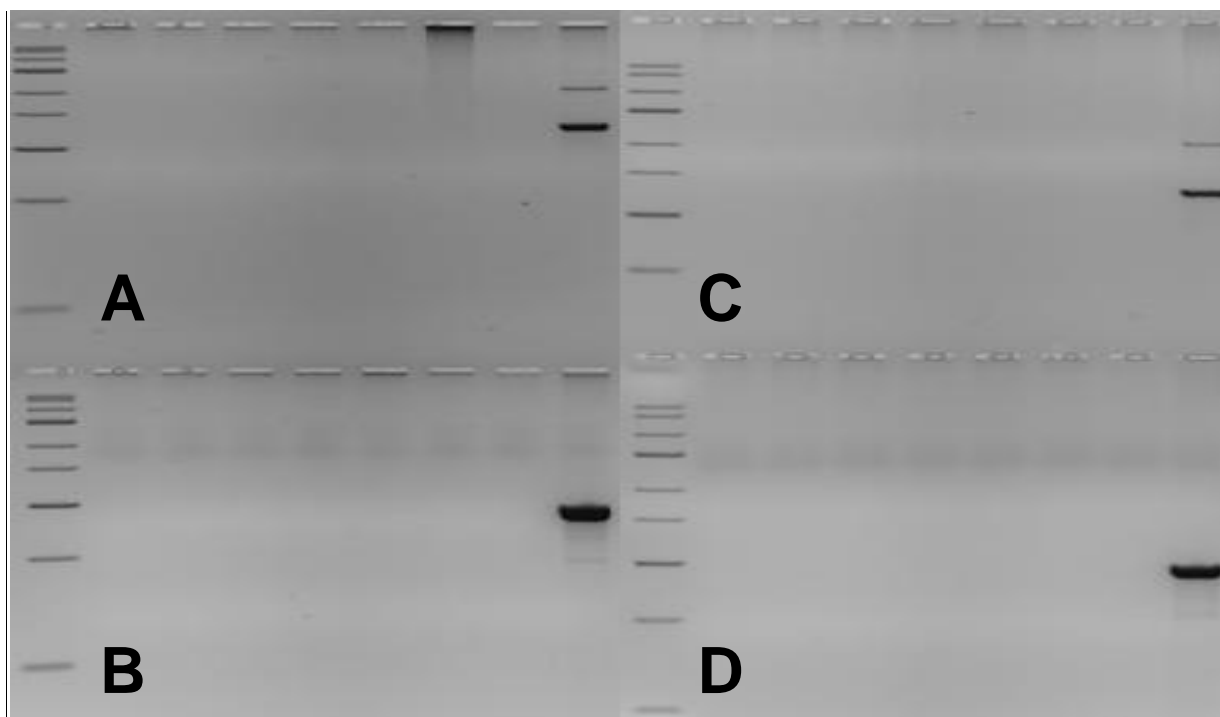
### Obrázek 6. Tvorba virové DNA v buňkách infikovaných MAV-EHR

DNA izolovaná z buněk BLEF v různých časech po infekci MAV-EHR byla analyzována PCR (24 cyklů) a elektroforézou v agarózovém gelu na přítomnost provirové DNA. Použité primery rozeznávaly MAV-specifické sekvence na koncích LTR. 320 bp fragment representuje sumu všech forem virové DNA. Neintegrovaná virová DNA se dvěma LTR poskytuje (se sníženou účinností) též 740 bp produkt překlenující obě LTR. Jako kontrola byla použita DNA z nádoru vyvolaného inzerční mutagenezí virem MAV-B (Pajer 2006). 2DPI (atd.) - 2 dny po infekci (atd.)



**Obrázek 7. Detekce DNA virů MAV-B a MAV-EHR v kulturách Blef, 3T3 a NRK**

DNA izolovaná z MAV-EHR infikovaných ptačích či savčích buněk byla analyzována PCR (30 cyklů) na přítomnost různých forem virové DNA. V části A je zobrazen 450 bp fragment představuje sumu všech forem virové DNA (použité primery amplifikují MAV specifické sekvence v 5' nekódujícím úseku); V části B je zobrazen fragment 630 bp reprezentující cirkulární virovou DNA s jedním LTR (použité primery překenují spojení 5' úseku s 3' úsekem v cirkulární DNA). Negativní kontrola je neinfikovaná kuřecí tkáň, pozitivní kontrola je infikovaná kuřecí tkáň.



3T3 2DPI	3T3 3DPI	3T3 4DPI	3T3 7DPI	3T3 9DPI	3T3 neinfikované	Balb/C	nádor	NRK 2DPI	NRK 3DPI	NRK 4DPI	NRK 7DPI	NRK 9DPI	NRK neinfikované	Balb/C	nádor
----------	----------	----------	----------	----------	------------------	--------	-------	----------	----------	----------	----------	----------	------------------	--------	-------

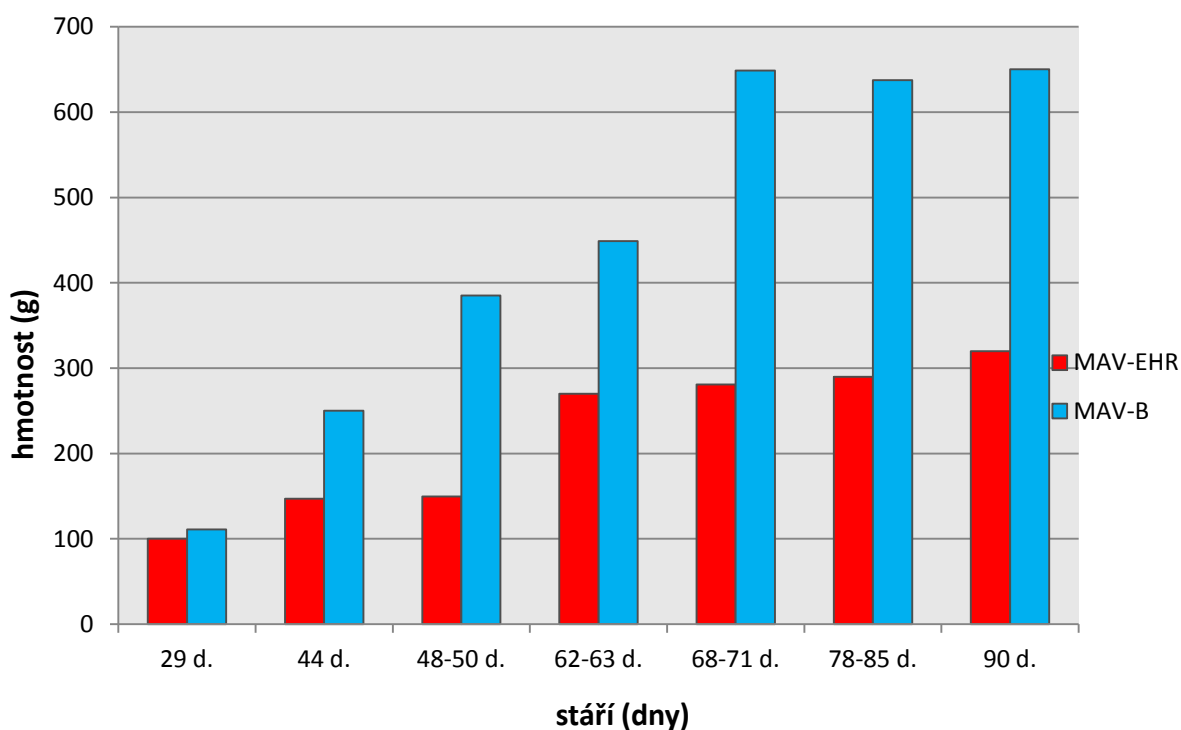
**Obrázek 8. Detekce DNA viru MAV-B v kulturách 3T3 a NRK**

Na elektroforetogramech jsme nedetkovali žádné amplifikované proužky DNA, ať už jsme se pokoušeli namnožit jen cirkulární formy provirů (A, C) nebo všechny formy (B, D). DNA pocházela z kultur 3T3 (A, B) a NRK (C, D) infikovaných kontrolním virem MAV-B. Pro amplifikaci bylo použito 30 cyklů PCR. Jako pozitivní kontrola byl použit nádor indukovaný inzerční mutagenezí viru MAV-B, jako negativní neinfikované kultury a DNA z myšího kmene Balb/C.

## Analýza patologie infikovaných kuřat

Efekt mutace L154S jsme se rozhodli ověřit i v systémech *in vivo*. Pro analýzu možné patogeneze jsme proto do vajec plemen hnědých a bílých leghornek 12. den po oplození injektovali viry či buňky produkující odpovídající viry a měřili hmotnost jedinců v čase stejně jako incidenci neoplázií.

Hmotnost infikovaných kuřat byla měřena v nepravidelných intervalech po vylíhnutí, jejich hodnota v jednotlivých dnech byla průměrována a vynesena do grafů na obrázku 9. Až do 4. týdne po vylíhnutí není patrný rozdíl ve hmotnosti, poté se však začal zvětšovat rozdíl ve prospěch jedinců infikovaných virem MAV-B. Tento rozdíl se po čase ustálil na poměru 1:2,5.



### Obrázek 9. Hmotnost hnědých leghornek

Na ose x jsou vyneseny časy měření hmotnosti, na ose y je vynesena samotná hmotnost měřených kuřat. Modré sloupce reprezentují průměrnou hmotnost kuřat hnědých leghornek infikované divokým kmenem MAV-B, červené reprezentují průměrnou hmotnost kuřat infikované mutantním kmenem EHR. Hmotnost jedinců infikovaných virem EHR se až do 4. týdne od vylíhnutí nelišila od jedinců infikovaných virem MAV-B. Od 4. týdne se však projevil rozdíl, který se v průběhu času ustálil na poměru 1:2,5 hmotnosti mezi těmito dvěma viry.

Jedinci infikovaní MAV-B a EHR byly u obou plemen vyfotografovány (obrázky 10 a 11). Nižší hmotnost se projevila na jejich menším vzrůstu a celkově nezdravém vzhledu. Toto chřadnutí se projevilo u všech kuřat infikovaných mutantním kmenem MAV-EHR, což na něj ukazuje jako na přímého původce tohoto onemocnění. Dle dřívějšího pozorování, infekce virem MAV-B nemá na růst a růstovou retardaci žádný vliv (V. Karafiát, nepublikováno).



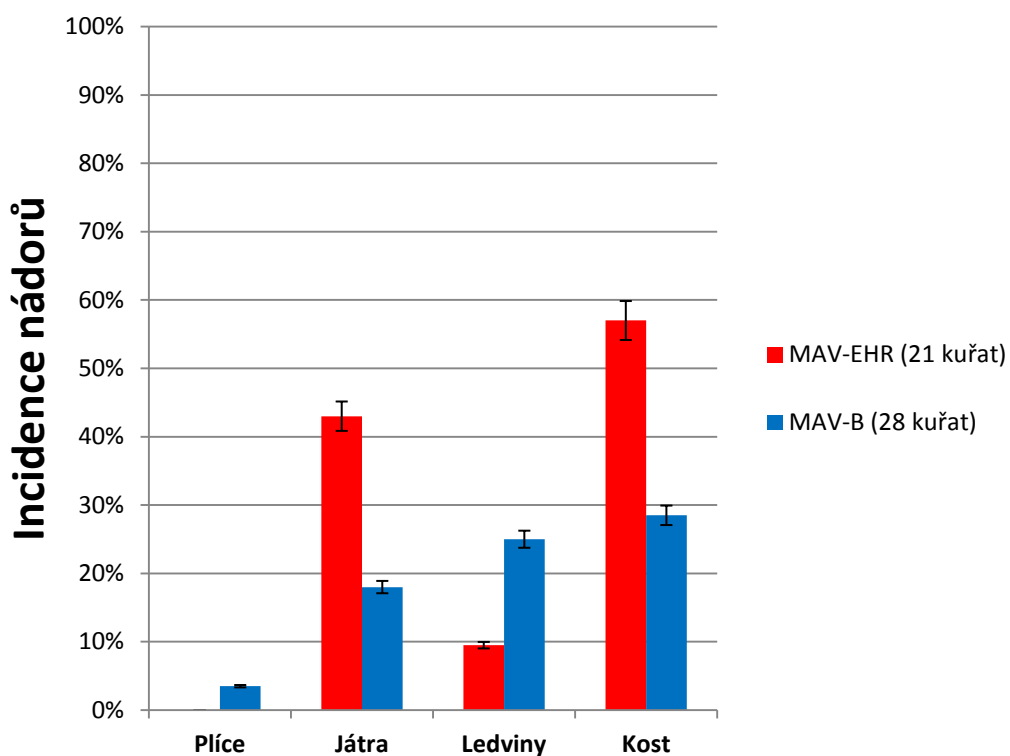
**Obrázek 10. Bílé leghornky**

Kromě hmotnosti kuřat byl sledován i celkový habitus infikovaných zvířat. Na fotografii jsou vedle sebe kuřata bílých leghornek stará 47 dní. Kuře nalevo je infikované virem MAV-B, zatímco kuře napravo je infikované virem MAV-EHR (EHR). U jedinců infikovaných mutantním kmenem se projevila zakrnělý vzrůst a celkově nezdravý vzhled.

**Obrázek 11. Hnědé leghornky**

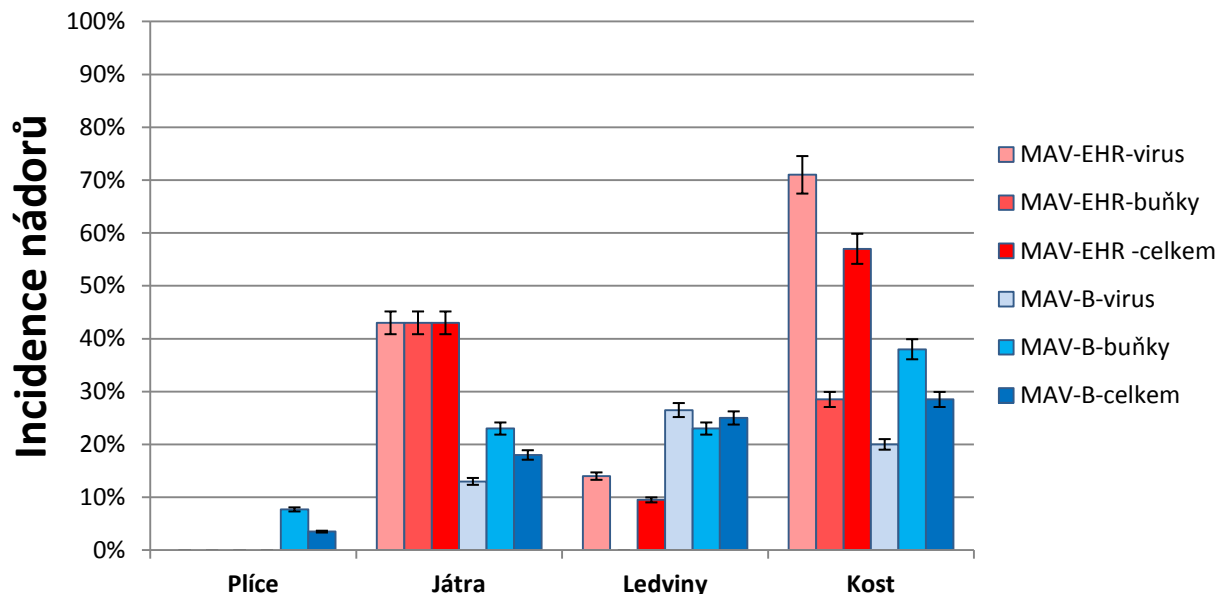
Kromě hmotnosti kuřat byl sledován i celkový habitus infikovaných zvířat. Na fotografii jsou vedle sebe kuřata hnědých leghornek stará 61 dní. Kuře nalevo je infikované virem MAV-B, zatímco kuře napravo je infikované virem MAV-EHR (EHR). U jedinců infikovaných mutantním kmenem se projevila zakrnělý vzrůst a celkově nezdravý vzhled.

Počty zachycených neoplázií byly vztaženy na počet kuřat jednotlivých plemen a injektovaného agens (obrázky 12 a 13). Na obrázku 14 je zobrazena incidence vzniku osteopetrózy u plemen hnědé a bílé leghornky infikované virem MAV-B, MAV-EHR a MAV-B(O), izolátem viru MAV-B indukující osteopetrózu s vysokou frekvencí.



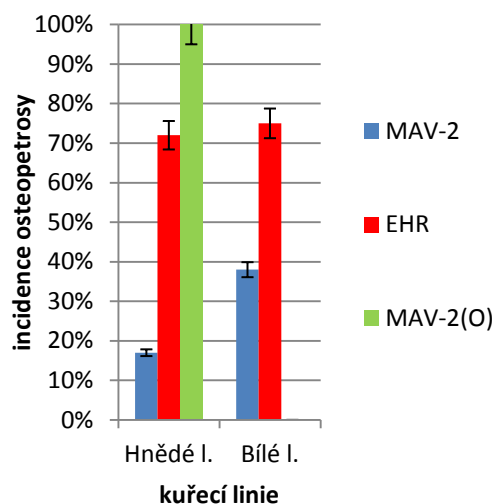
**Obrázek 12. Incidence nádorů hnědých a bílých leghornek**

Porovnání incidence nádorů u hnědých a bílých leghornek infikovaných virem MAV-B a EHR. Počet jednotlivých nádorů bez ohledu na jejich typ byl vztáhnut na počet jedinců ve skupině. Incidence osteopetrózy a nádorů jater je u kuřat infikovaných virem EHR nápadně zvýšená.



**Obrázek 13. Incidence nádorů hnědých a bílých leghornek indukovaných virem nebo buňkami produkující virus**

Porovnání incidence nádorů u hnědých a bílých leghornek infikovaných virem MAV-B a EHR a injektovanými buňkami produkujícími tyto viry. Počet jednotlivých nádorů ve tkáních bez ohledu na jejich typ byl vztáhnut na počet jedinců ve skupině. Kuřata injektovaná virem (nikoliv buňkami produkující virus) EHR vykazují zvýšenou incidenci osteopetrózy.



#### Obrázek 14. Incidence nádorů hnědých a bílých leghornek

Porovnání incidence nádorů u hnědých a bílých leghornek infikovaných virem MAV-B a EHR. Počet jednotlivých nádorů ve tkáních bez ohledu na jejich typ byl vztáhnut na počet jedinců ve skupině. Incidence osteopetrózy indukované virem EHR nebo MAV-B(O) převyšoval incidenci osteopetrózy vyvolané virem MAV-B.

Virus EHR je schopen indukovat v hnědých leghornkách osteopetrózu s vysokou frekvencí. Naopak nádory plic nebyly zaznamenány. U kuřat bílých leghornek nebyl pozorován zvýšený výskyt žádného nádoru, byla však pozorována absence nádorů plic a ledvin. Ani v jednom z případů nebyl pozorován rozdíl mezi indukci nádoru virem či buňkami produkující virus. Jediná výjimka byla osteopetróza, u níž se zdá, že indukce buňkami produkující virus EHR je srovnatelná s kontrolami, zatímco onemocnění indukované virem se vyskytuje ve zvýšené míře. Možnost klonálního původu jsme dále vyšetřili metodou iPCR.

#### Poškození imunitního systému a tvorby kostí virem MAV-EHR

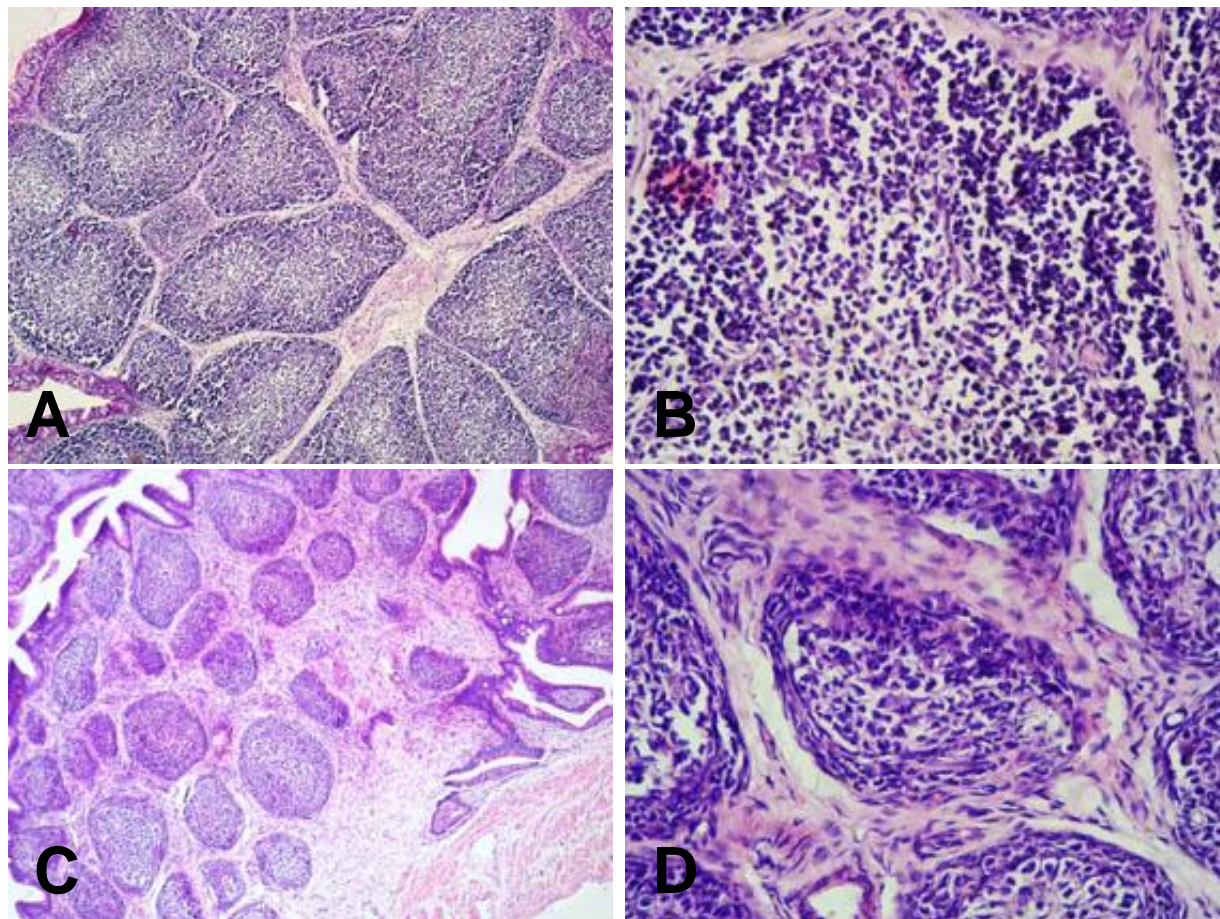
Nízká hmotnost a celkově nezdravý vzhled se dá souhrně nazvat jako chřadnutí. Chřadnutí bývá často spojováno s poškozením imunitního systému, rozhodli jsme se proto kromě vzorků kostí prozkoumat i thymus a fabriciovu burzu.

Dalším krokem analýzy patologie proto bylo histologické vyšetření, které odhalilo změny v imunologických tkáních kuřat infikovaných virem MAV-EHR. Viditelné poškození thymu a Fabriciovu burzy vedlo k úbytku T a B buněk. Obrázky 15 a 16 ukazují tyto orgány v různých rozlišeních. Na fotografiích je vidět atrofie folikulů a snížený počet lymfocytů u vzorků kuřat infikovaných virem EHR.

Analýza kostí odhalila zvýšenou incidenci zbytnění stehenních kostí (osteopetróza) u kuřat infikovaných MAV-EHR (obrázek 17). Toto onemocnění se

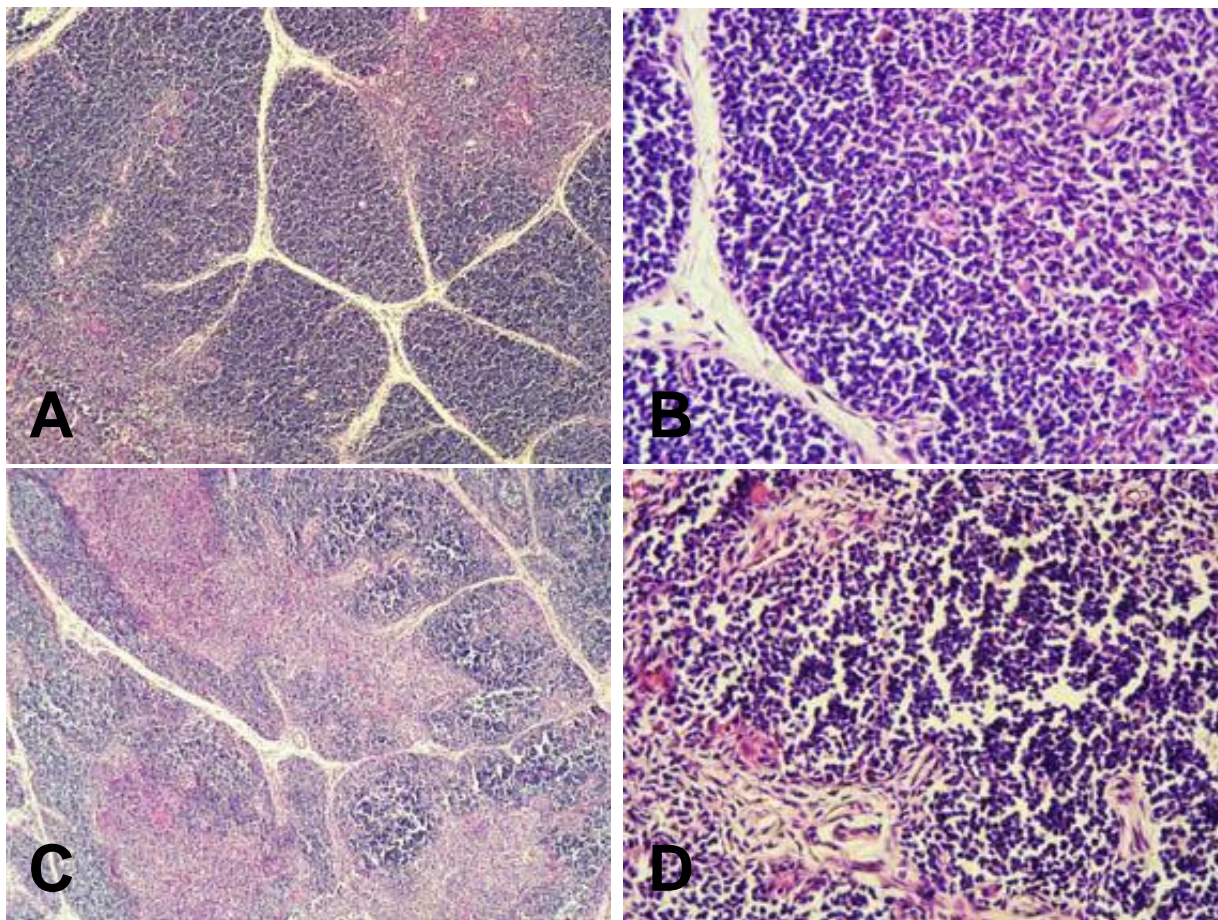


vyskytovalo u všech jedinců infikovaných virem MAV-2(O), ale jen asi u 70% kuřat infikovaných virem MAV-EHR. Nízké incidence se objevila i u divokého kmene.



**Obrázek 15. Fabriciova burza kuřete infikovaného virem MAV-EHR**

Na fotografiích jsou histologické řezy fabriciovou burzou ve zvětšení objektivy 12,5 (A) a 40 (B) infikované virem MAV-B a MAV-EHR (C a D) ve stejném rozlišení jako v předchozím. Vzorky byly odebrány z kuřete hnědých leghornek starého 78 dní s označením 7811, respektive 70 dní s označením 7121, která byla v 12. dnu po oplození infikována příslušným virem. Z obrázku (C, D) je patrná atrofie folikulů.



**Obrázek 16. Thymus kuřete infikovaného virem MAV-EHR**

Na fotografiích jsou histologické řezy thymem ve zvětšení objektivy 12,5 (A) a 40 (B) infikované virem MAV-B a MAV-EHR (C a D) ve stejném rozlišení jako v předchozím. Vzorky byly odebrány z kuřete hnědých leghornek starého 78 dní s označením 7811, respektive 70 dní s označením 7121, která byla v 12. dnu po oplození infikována příslušným virem. Z obrázku (C, D) je patrná atrofie folikulů.



**Obrázek 17. Stehenní kost i infikovaných kuřat**

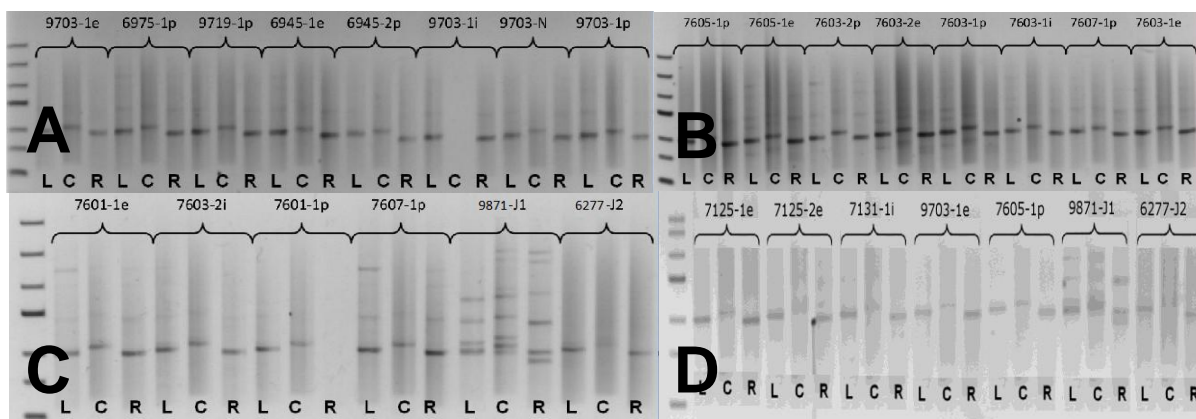
Na fotografiích je normální stehenní kost s měřítkem (A) a poté rozlomena (B) získaná z kuřete infikovaného virem MAV-B. Kost byla vypreparována z kuřete hnědých leghornek starého 64 dní s označením 7425. Kost na první pohled zbytnělá (C) patřila kuřeti s označením 7127 infikované virem MAV-EHR. Po rozřezání byla odhalena redukovaná kostní dřeň (D) a nadbytečná kostní hmota. Obě kuřata byla infikovaná 12. den po oplození vajíčka.

## **Polyklonální charakter osteopetrózy indukované viry**

Metoda iPCR byla vyvinuta pro analýzu okolí integrovaných provirů ve vzorcích monoklonálního původu, s jejíž pomocí je možné sledovat integritu provirů a integračních míst.

Tato metoda odhalila, že není rozdíl v indukci osteopetrózy u virů MAV-B, MAV-B(O) a MAV-EHR. Na obrázku 18A jsou vzorky osteopetrózy vyvolané virem MAV-B, na obrázku 18B jsou osteopetrózy vyvolané virem MAV-B(O), na obrázku 18C jsou první 4 vzorky (každý vzorek je v podstatě triplikát, proto se jedná o prvních 12 vzorků) osteopetrózy vyvolané virem MAV-B(O) další vzorek (triplikát) je pozitivní kontrola monoklonálního nádoru a poslední vzorek (triplikát) je negativní kontrola polyklonálního nádoru. Na posledním (18D) jsou 3 vzorky osteopetrózy indukované virem MAV-EHR a kontrolní vzorky MAV.2(O), MAV-B spolu s nádory mono- a poly- klonálního původu. V případě monoklonálního nádoru jsme identifikovali řadu proužků amplifikované DNA o různých délkách, zatímco u polyklonálního nádoru jsme identifikovali pouze fragmenty (1000 páru bazí) odpovídající neintegrováným formám proviru přítomným ve vzorcích. Žádný z analyzovaných vzorků svým uspořádáním nepřipomínal uspořádání analyzovaného monoklonálního nádoru, naopak všechny připomínaly uspořádání polyklonálního nádoru. V případě MAV-B(O) jsme v některých případech identifikovali i další proužky o velikosti zhruba 2,5 tisíce bazí, které se ale dají vysvětlit jako artefakty této metody.

Výsledky iPCR nepřipomínají typické uspořádání nádorů vzniklých například inserční mutagenézí mající tudíž monoklonální původ, ale spíše ukazují na polyklonální původ osteopetrózy, což je v souladu s již dříve publikovanými výsledky (Foster et al., 1994). Narušení interference může v buňce vést ke zvýšenému počtu provirů, rovněž však mohl mutovaný glykoprotein získat nové onkogenní vlastnosti.



### Obrázek 18. iPCR vzorků kostí s provirem MAV-B

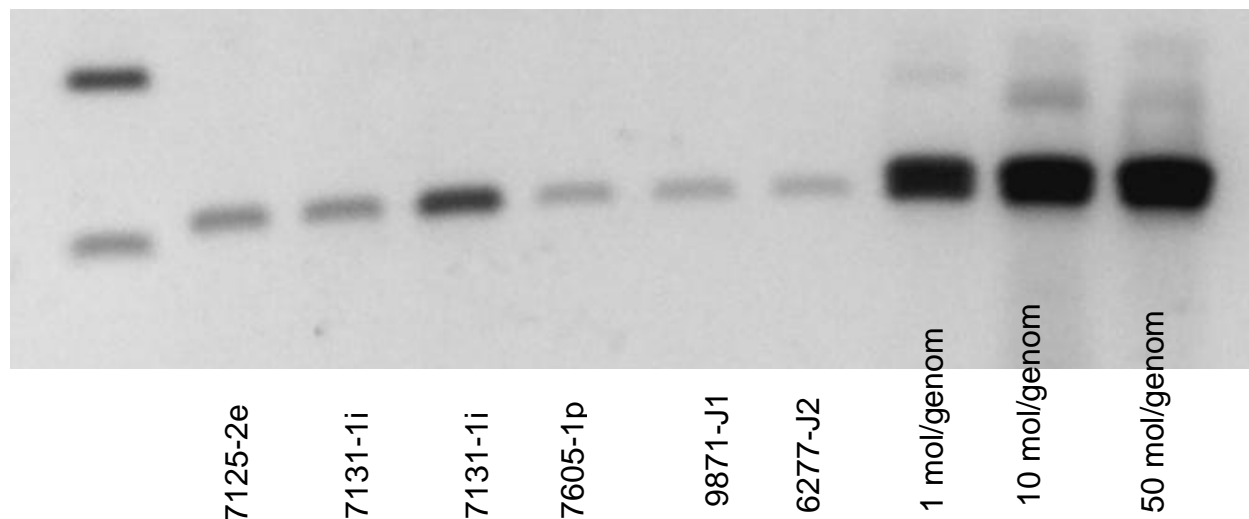
Elektroforetogram iPCR kostí infikovaných virem MAV-B (A), MAV-B(O) (B, C) a MAV-EHR (D), 1% agarózový gel, 5V/cm, 60 minut. L, C a R jsou názvy různých směsí primerů, kdy L amplifikuje levou část zbytku proviru, R pravou část a C obě propojuje. Zkratky p, e, i, N, J1 a J2 označují vzorky z periostu, kompaktní a porézní části osteopetrické kosti, kosti bez osteopetrózy, kontrolního monoklonálního nádoru jater a kontrolního polyklonálního nádoru jater. Všechny vzorky osteopetróz indukované virem MAV-B, MAV-2(O) a MAV-EHR vykazují stejné uspořádání jako kontrolní nádor polyklonálního původu.

## Zvýšený počet provirů v osteopetrických vzorcích

Popsané případy osteopetrózy byly charakterizovány velkým množstvím integrovaných i neintegrovaných provirů. Pro prozkoumání této možnosti i v našem případě jsme poměřili vzorky osteopetrických kostí indukovaných viry MAV-EHR, MAV-2(O) a MAV-B.

Pro tento účel jsme využili metody semikvantitativní PCR. Pro zpřesnění analýzy jsme si připravili také neinfikovanou kuřecí DNA s různými koncentracemi plazmidu pMCAS-B. Koncentrace byla vypočtena jako poměr mezi velikostí kuřecího genomu a genomu retroviru a nastavena na počet jedné, deseti a padesáti molekul na kuřecí genom.

Následná analýza odhalila malý počet retrovirových molekul DNA ze vzorků *in vivo* oproti vytvořeným standardům, ale počet molekul MAV-EHR byl vyšší než počet molekul MAV-B (obrázek 19). Nejvyšší počet molekul byl v případě vzorku MAV-2(O). Překvapivě všeobecný malý počet molekul se dá vysvětlit přítomností řady nepermissivních buněk, které snižují celkový podíl permissivních buněk ve zkoumaném vzorku.



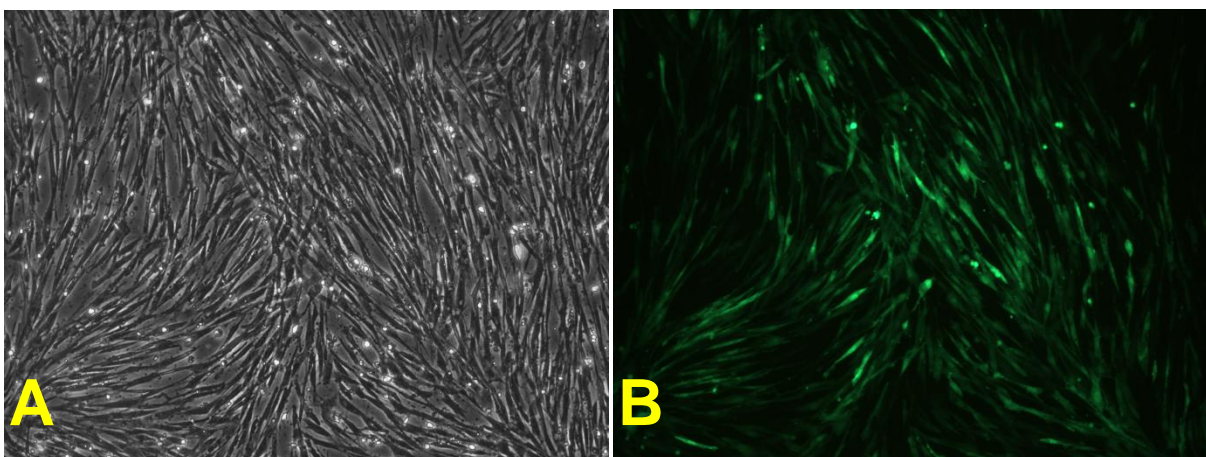
### Obrázek 19. Srovnání počtu molekul retrovirové DNA

Srovnání počtu molekul retrovirové DNA izolované z osteopetrických kostí, kontrol a standardů pomocí metody semikvantitativního PCR (15 cyklů). Intenzivnější fragment značí větší počet molekul. Standardy byly vytvořeny smícháním kuřecí genomové DNA a vypočítaným množstvím plazmidové DNA pMCAS-B pro simulování 1, 10 nebo 50 retrovirových molekul v genomu. Největší počet molekul obsahoval vzorek s MAV-2(O), 7131-1i. Zvýšený počet molekul byl zaznamenán i u vzorků s MAV-EHR.

## Konstrukce vektorů třídy MCAS

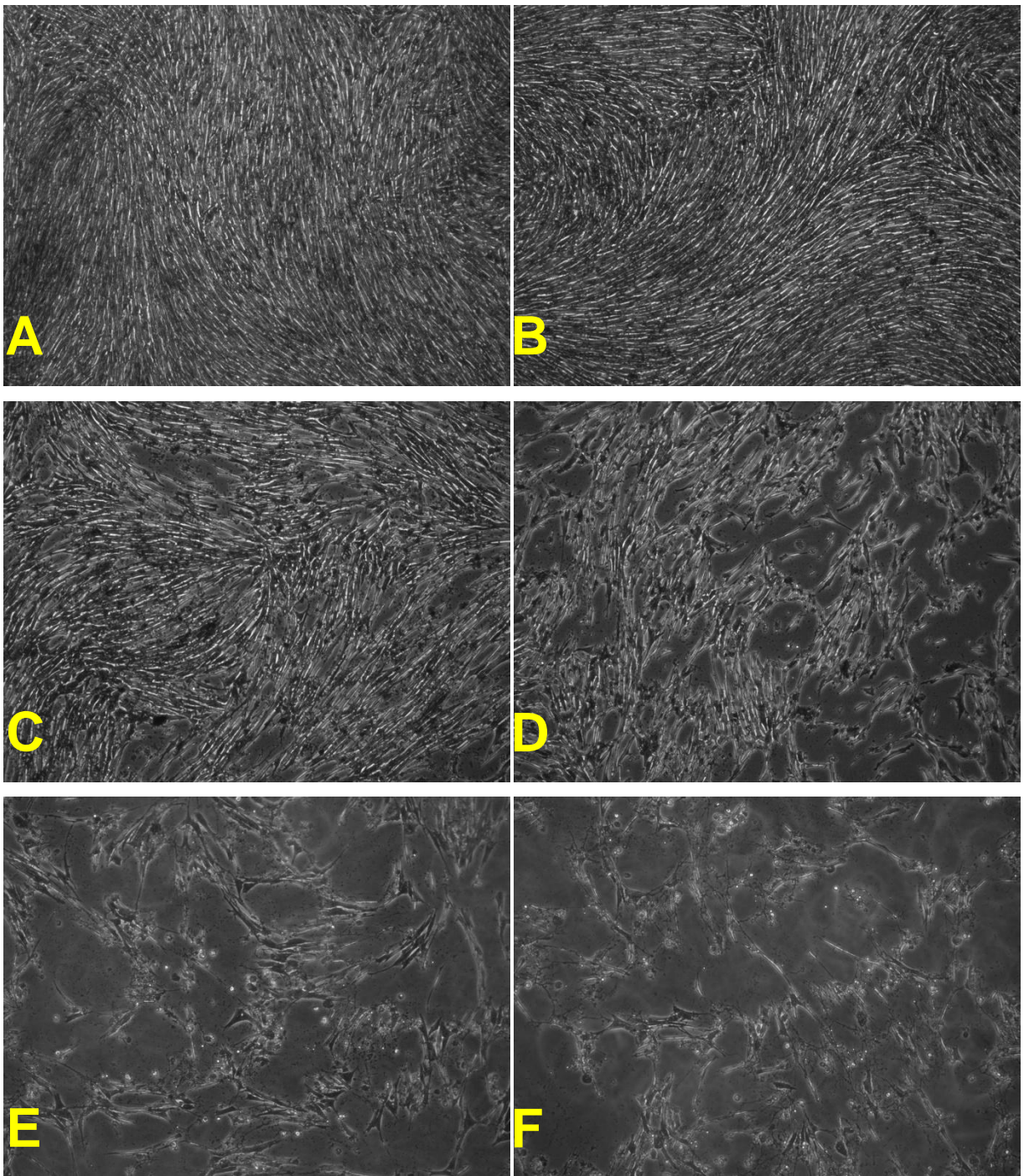
V mnoha případech je detekce mutančních kmenů virů snadno proveditelná pomocí metod PCR, sérologie a dalších díky rozsáhlým substitucím, delecím anebo adicím v genomu zkoumaného kmene. V případech bodových mutací je však práce znesnadněna. Z (nejen) tohoto důvodu jsme se rozhodli zkonstruovat nový vektor, MCAS záměnou odpovídajícího fragmentu pocházejícího z expresního systému RCAS obsahující cílové místo pro restriční endonukleázu Clal a splice acceptor. Takto vznikly vektory pMCAS-A, pMCAS-B a pMCAS-EHR (mapy 1, 4 a 7). Vložení reportérového genu *gfp* do cílového místa pro restriční endonukleázu Clal jsme vytvořili vektory pMCAS-A GFP, pMCAS-B GFP a pMCAS-EHR GFP (mapy 2, 5 a 8). Tyto vektory slouží k detekci a úrovně proinfikovanosti buněčných kultur. Analogicky byla sestrojena řada vektorů nesoucí gen *bsd* umožňující pozitivní selekci pojmenovaných pMCAS-A BSD, pMCAS-B BSD a pMCAS-EHR BSD (mapy 3, 6 a 9).

Úspěšnou konstrukci jsme si ověřili jak restričním mapováním, tak transfekcí kultur Blef. Pro analýzu infekce jsme využili fluorescenční mikroskopii (MCAS-B GFP, obrázek 26) a selekční tlak antibiotikem blasticidin (MCAS-X BSD, obrázky 27 a 28). Obě tyto metody prokázaly úspěšnou konstrukci plasmidů, integritu virů a expresi nově vnesených genů. Na následujících obrázcích jsou stručná schémata konstrukce plazmidů pMAV-B a plazmidů třídy MCAS, vektor pMCAS-B vybrán jako prototyp a „ukázka“ konstrukce, vektory pMCAS-A a pMCAS-EHR byly vytvořeny analogicky.



**Obrázek 20. Kontrola exprese GFP z proviru MCAS-B GFP**

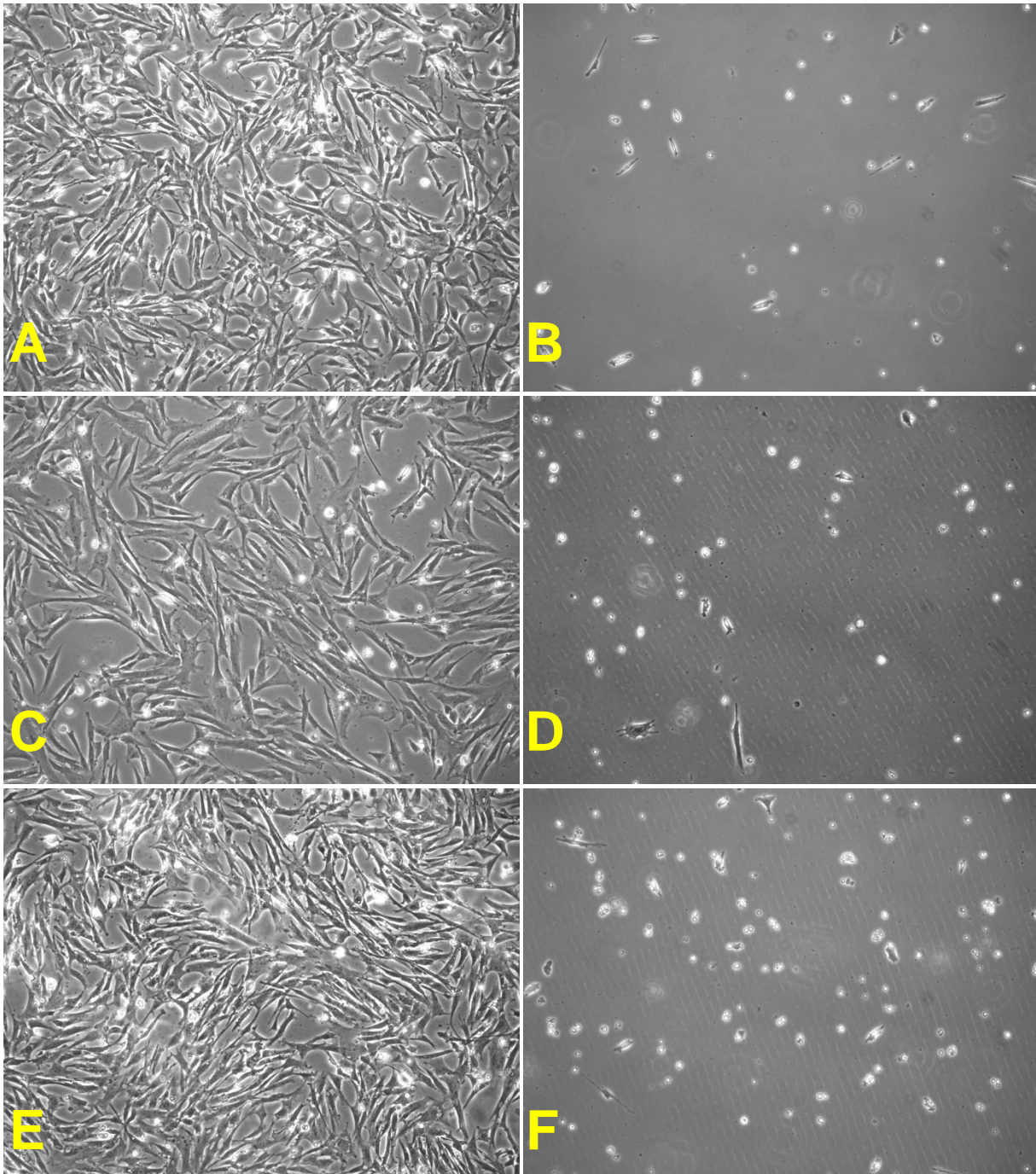
Fotografie buněčné kultury Blef infikované virem MCAS-B GFP ve viditelném spektru (A) a UV spektru (B). GFP exprese dokazuje infekci kultury. Zvětšení 40×.



### **Obrázek 21. Výběr koncentrace antibiotika**

Fotografie buněčných kultur Blef inkubovaných s různými koncentracemi antibiotika blasticidin. Z koncentrací 1 (A), 2 (B), 5 (C), 10 (D), 20 (E) a 50 (F) mg/ml byla pro selekci v dalších experimentech vybrána koncentrace 10 mg/ml. Selektce probíhala 4 dny. Zvětšení 40×.

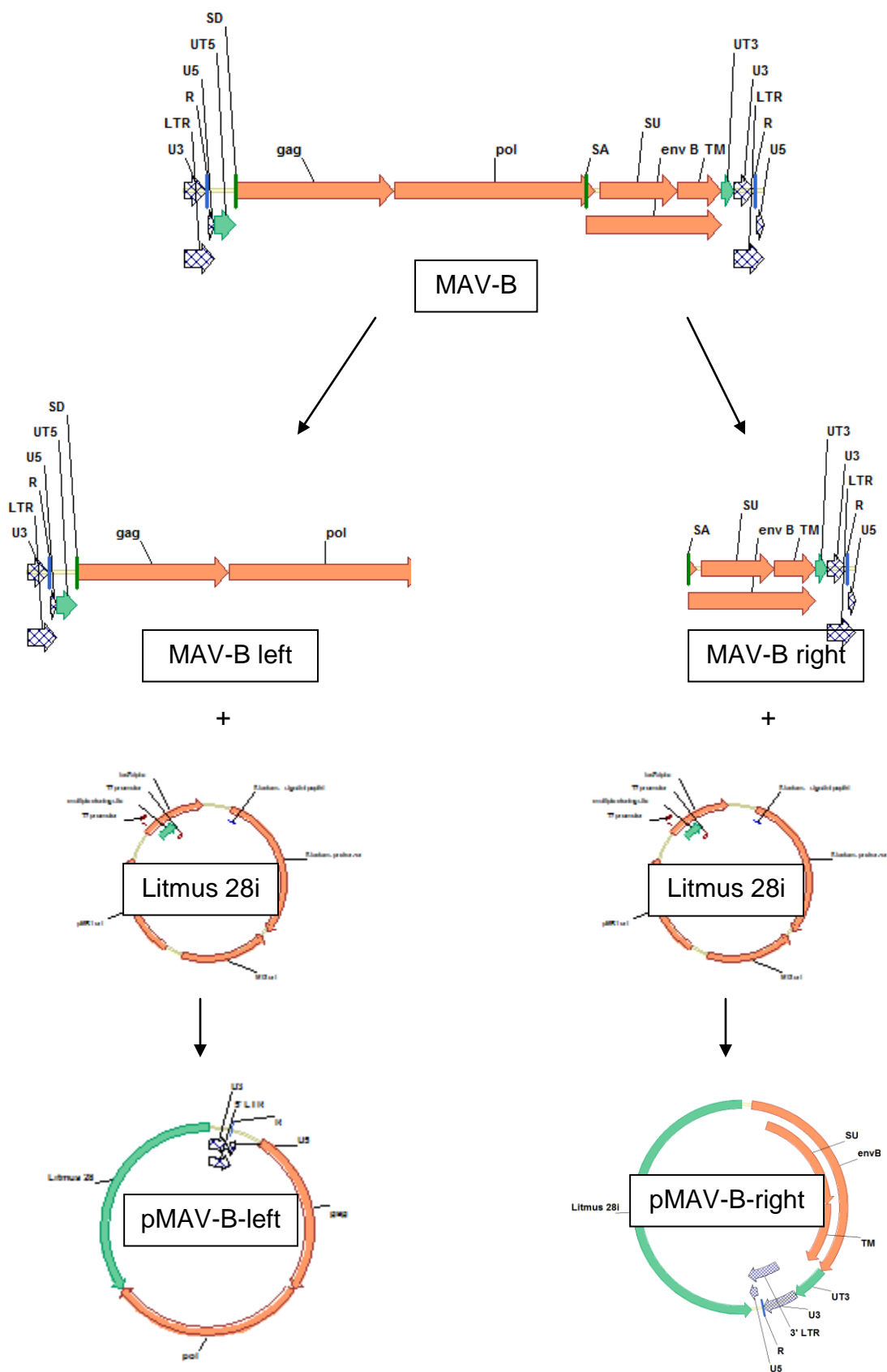




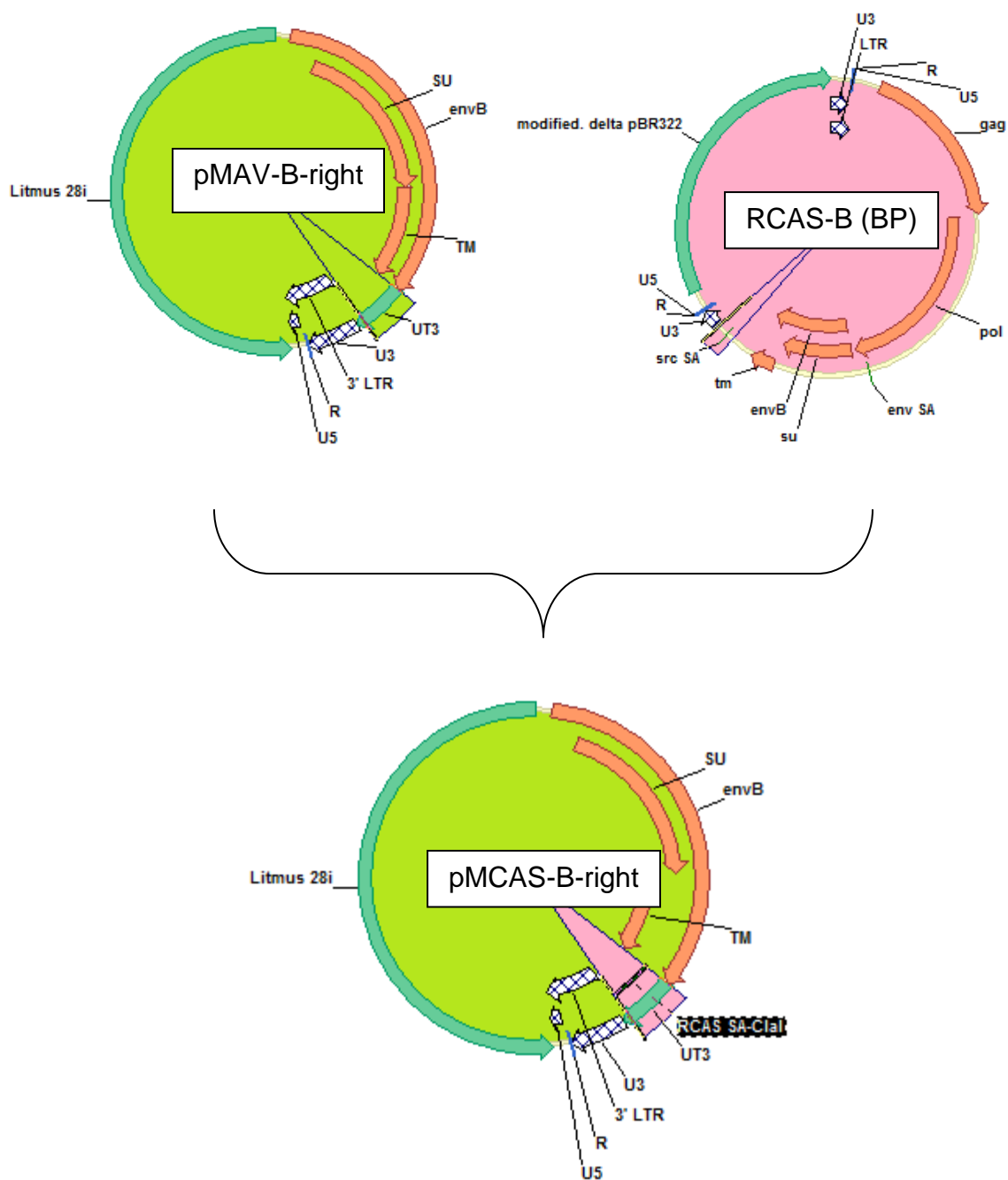
**Obrázek 22. Selekcce klonů s provirem MCAS-A/B/EHR BSD**

Fotografie buněčných kultur Blef infikovanými viry MCAS-A BSD (A) a GFP (B). MCAS-B BSD (C) a GFP (D) a MCAS-EHR (E) a GFP (F). Všechny kultury byly kultivovány za přítomnosti antibiotika blastidicinu v koncentraci 10 mg/ml. Pouze kultury infikované viry kódující gen *bsd* přežili selekci antibiotikem. Zvětšení 40×.

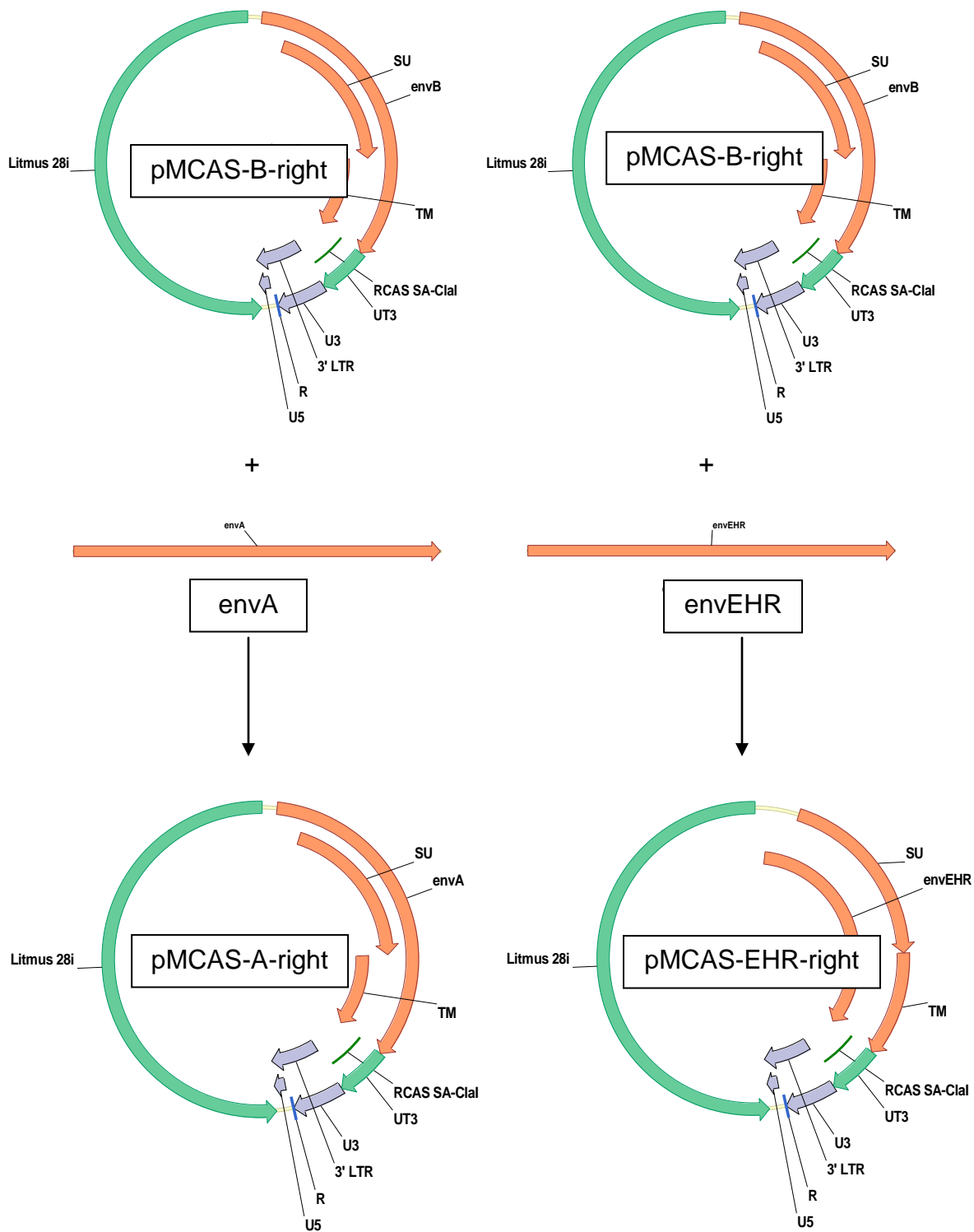
Obrázek 23. Schéma konstrukce pMAV-B-left a pMAV-B-right



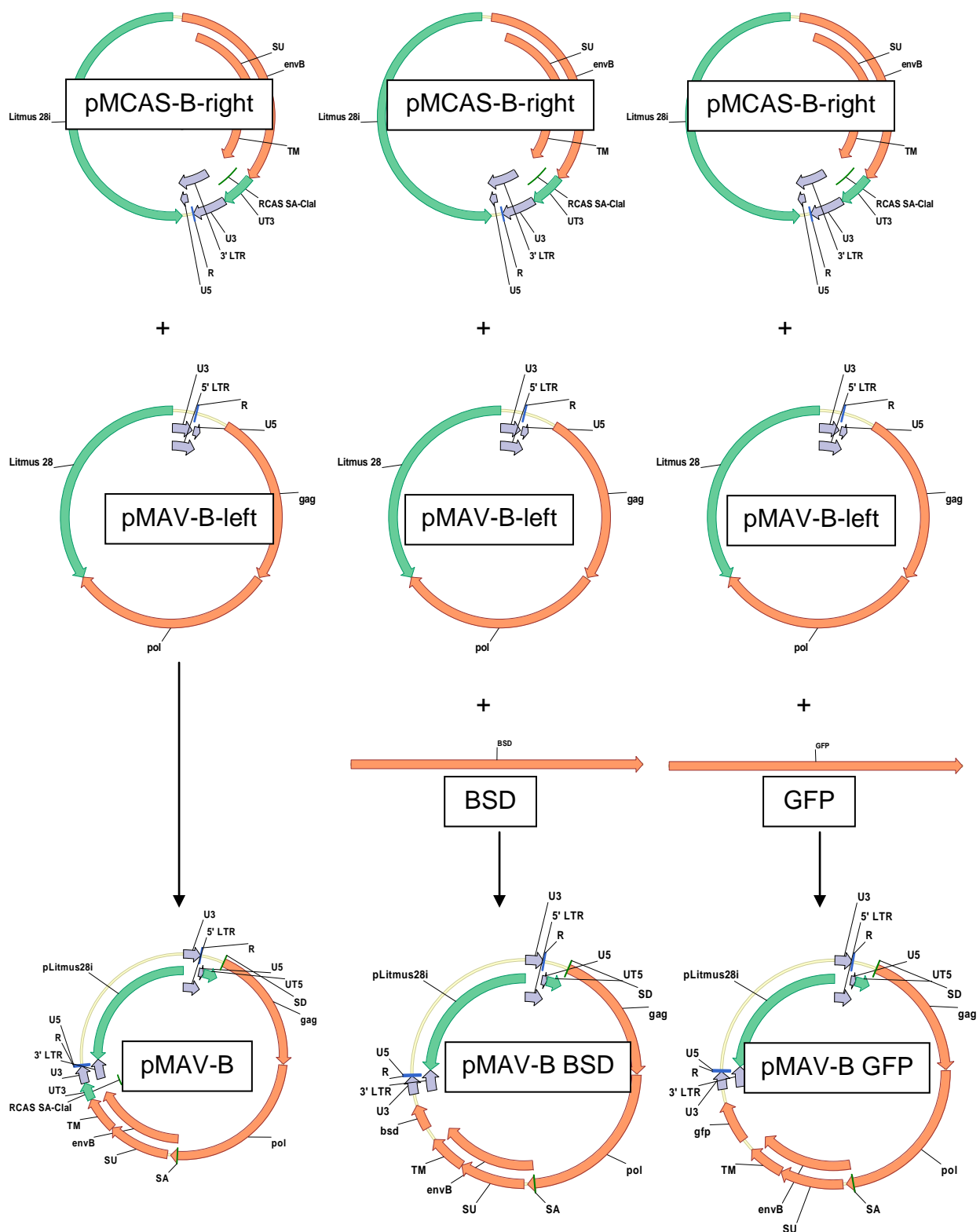
Obrázek 24. Schéma konstrukce pMCAS-B-right



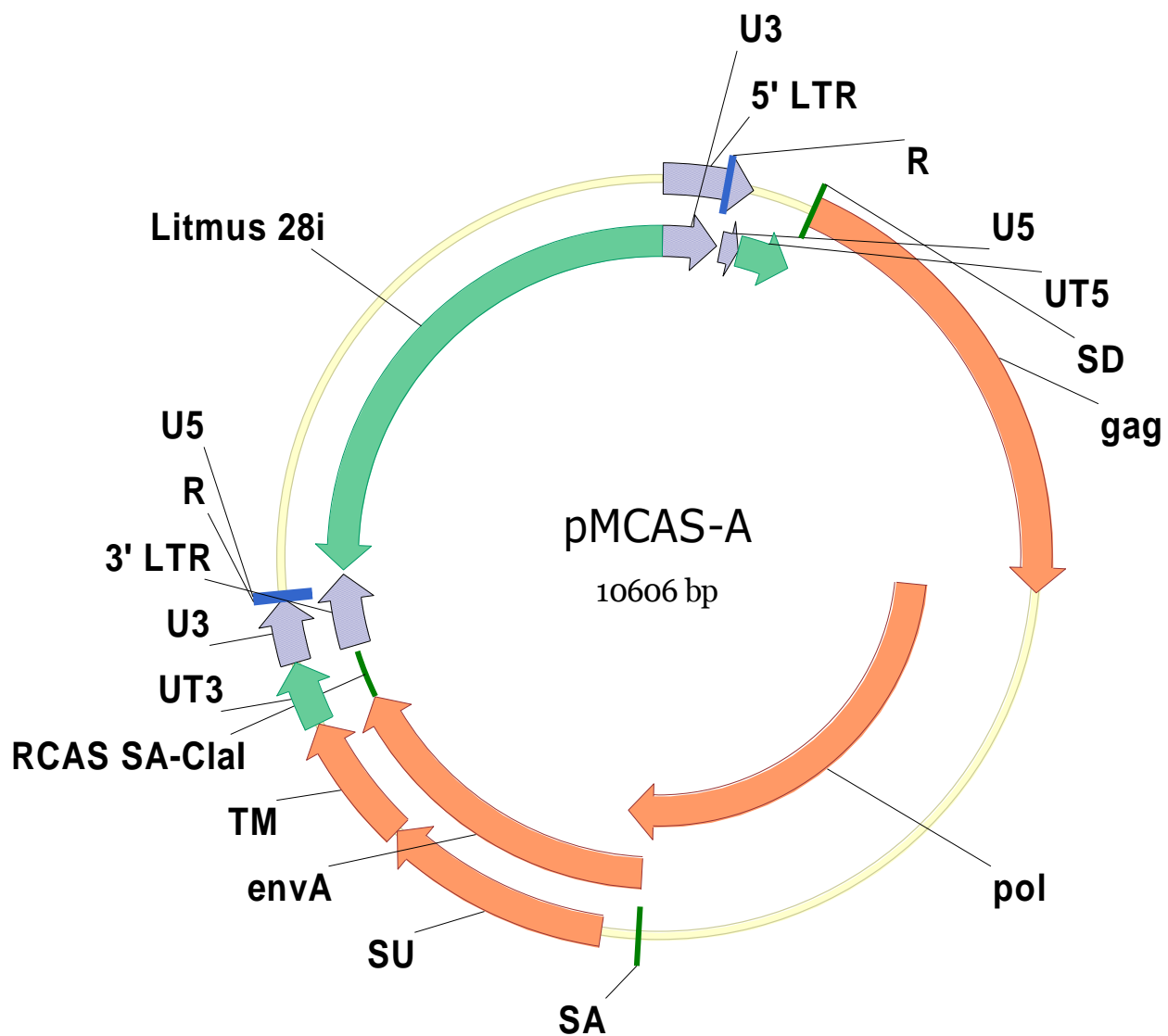
Obrázek 25. Schéma konstrukce pMCAS-A-right a pMCAS-EHR-right



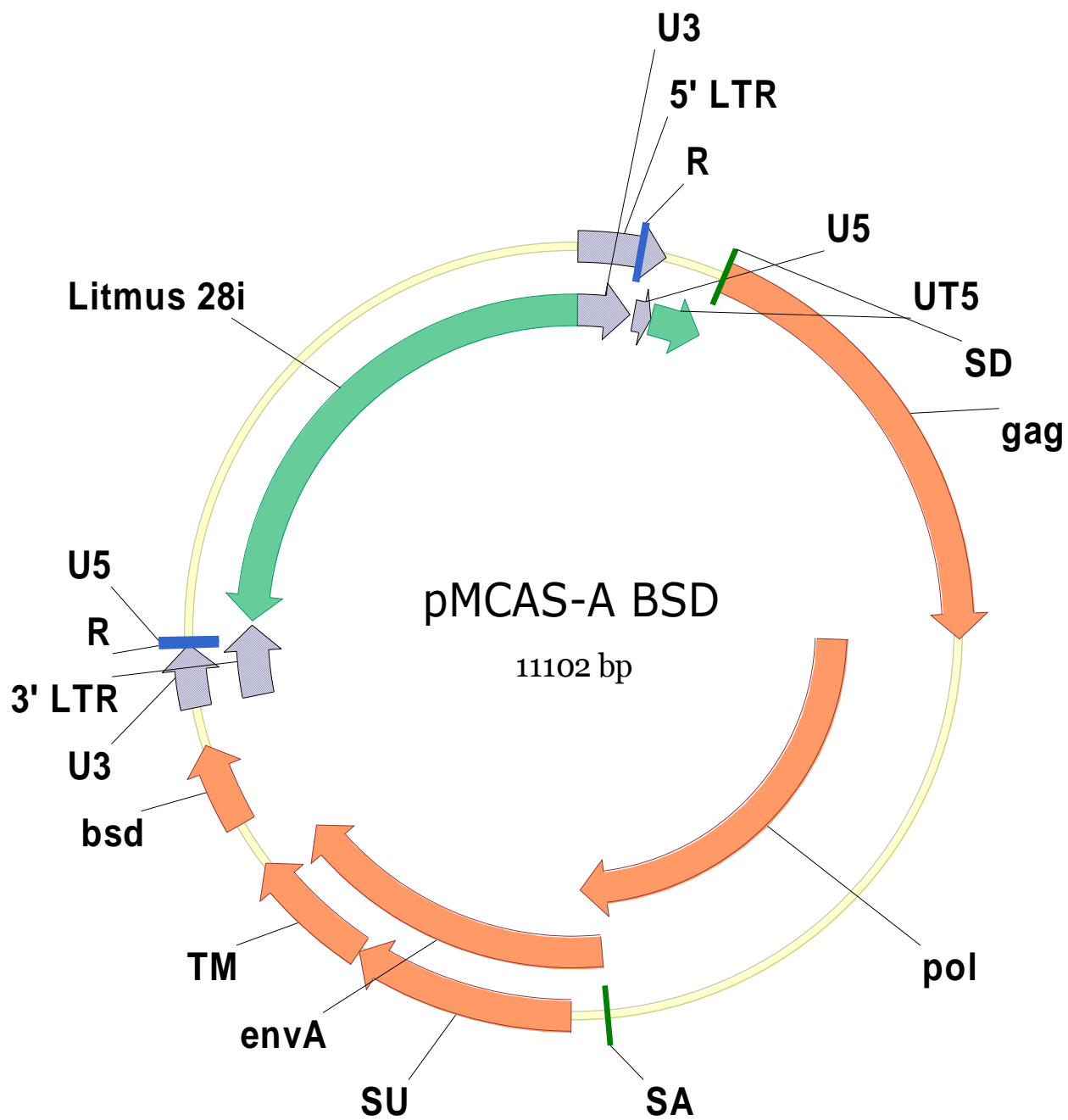
Obrázek 26. Schéma konstrukce pMCAS-B(/A/EHR), pMCAS-B(/A/EHR) GFP, pMCAS-B(/A/EHR) BSD



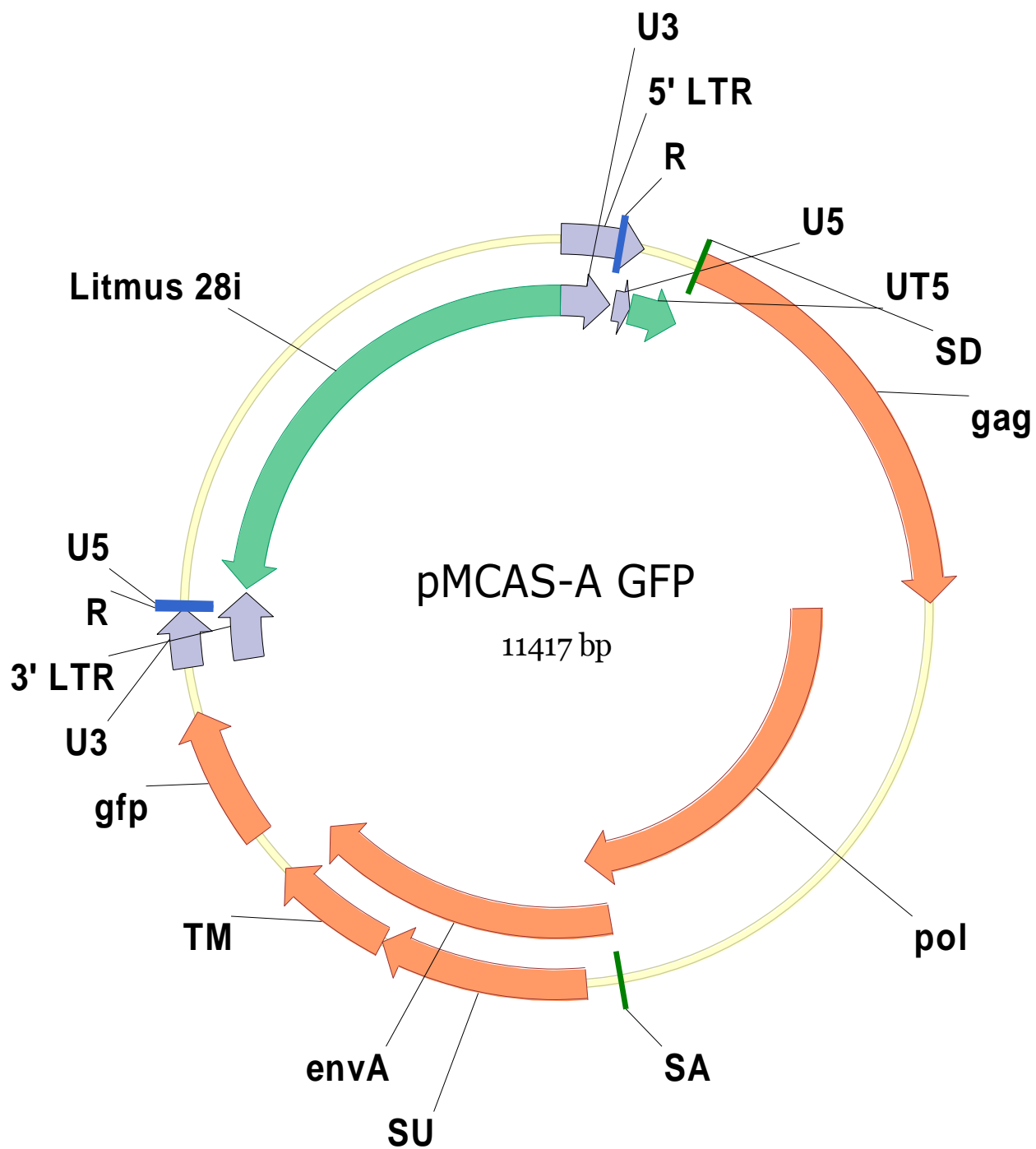
Obrázek 27. Schéma plasmidu pMCAS-A



Obrázek 28. Schéma plasmidu pMCAS-A BSD

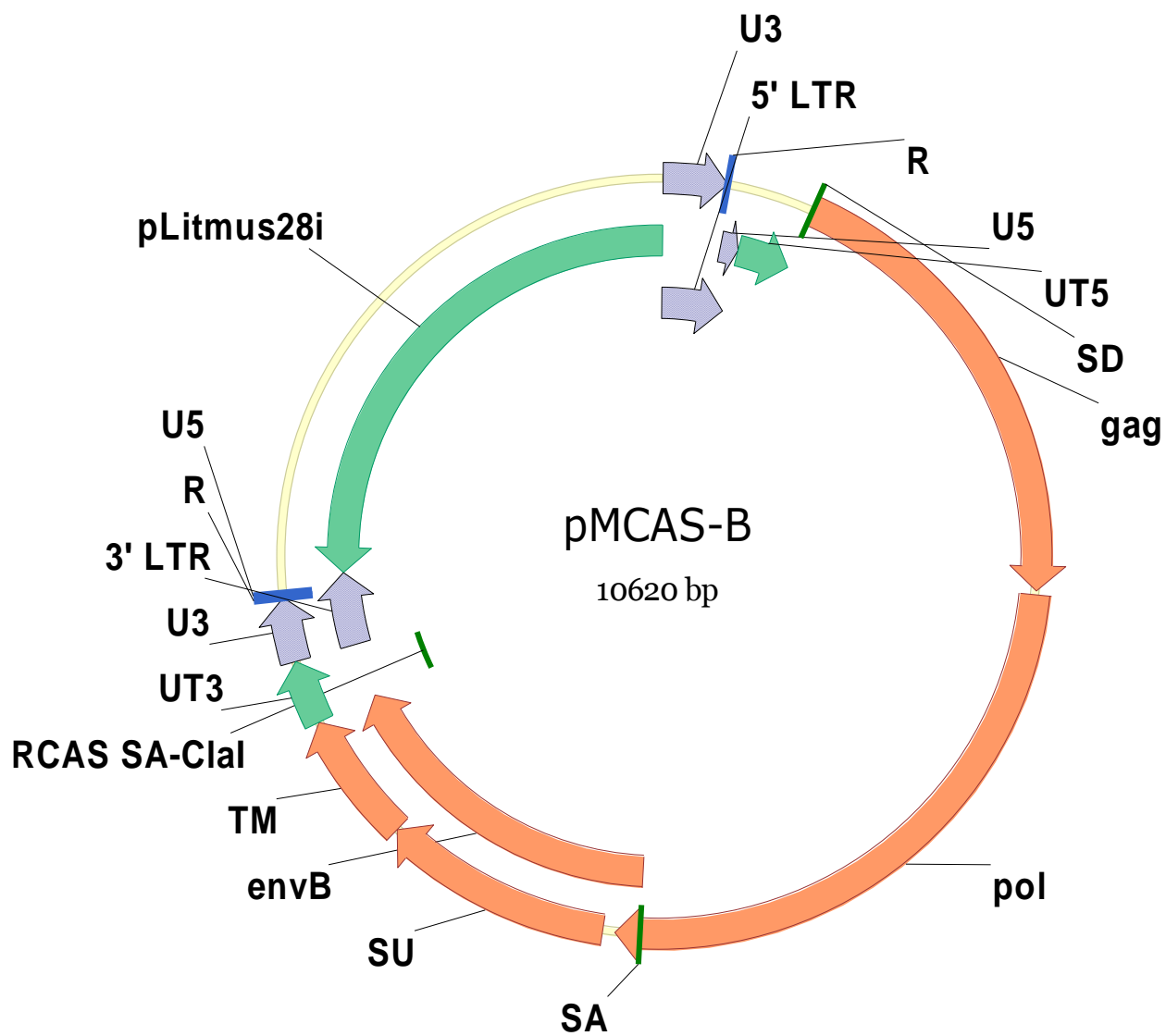


Obrázek 29. Schéma plasmidu pMCAS-A GFP

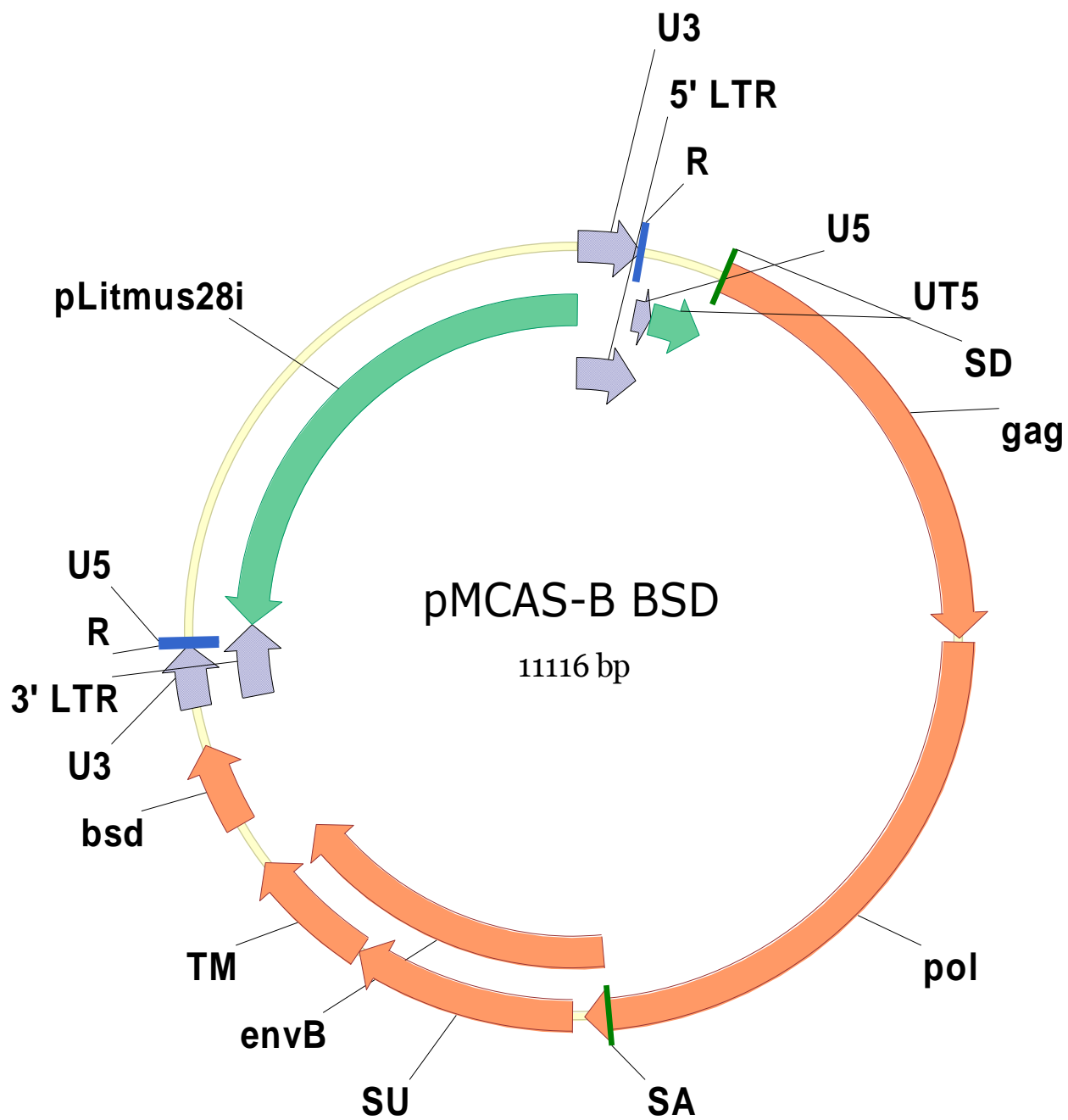




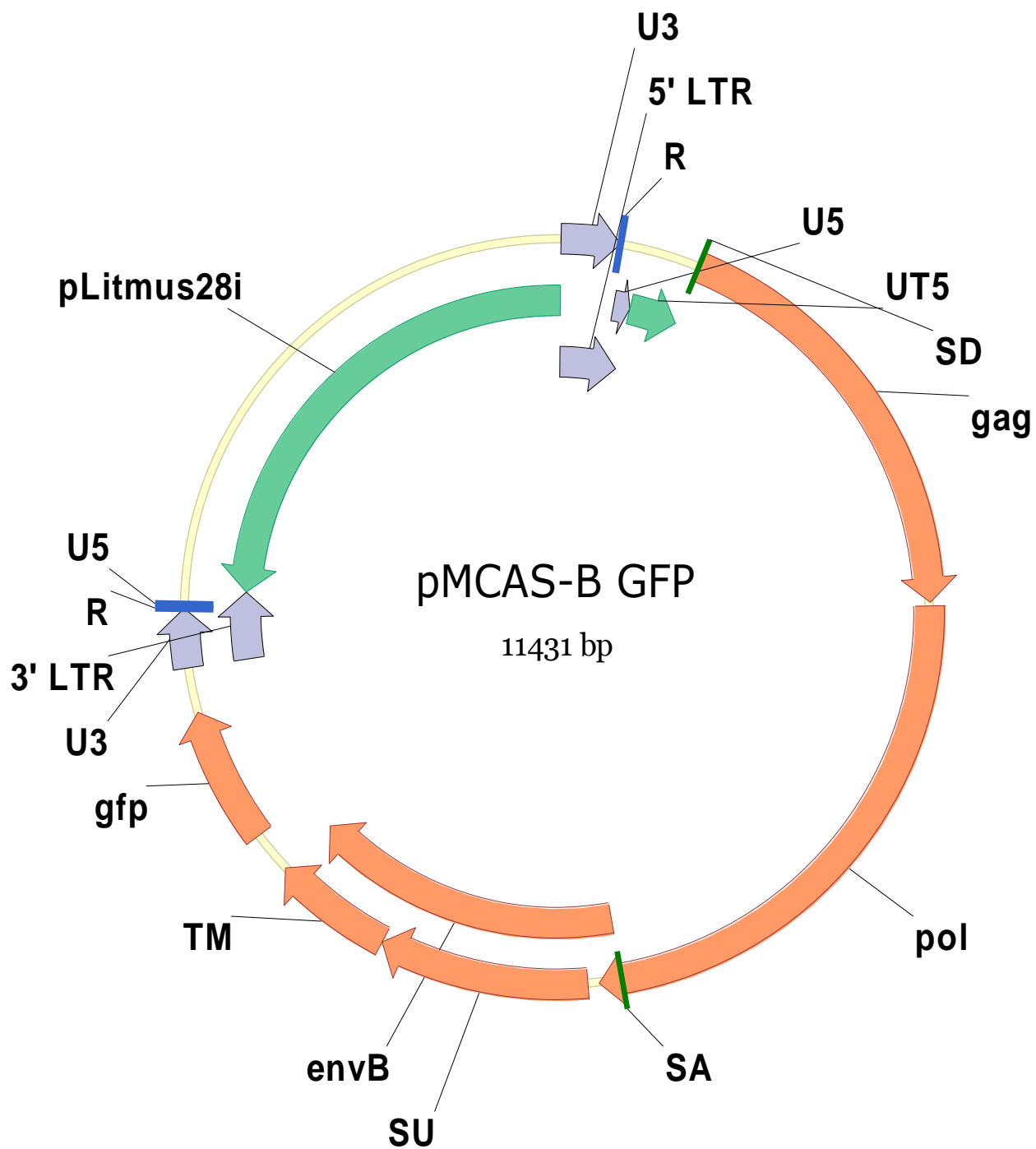
Obrázek 30. Schéma plasmidu pMCAS-B



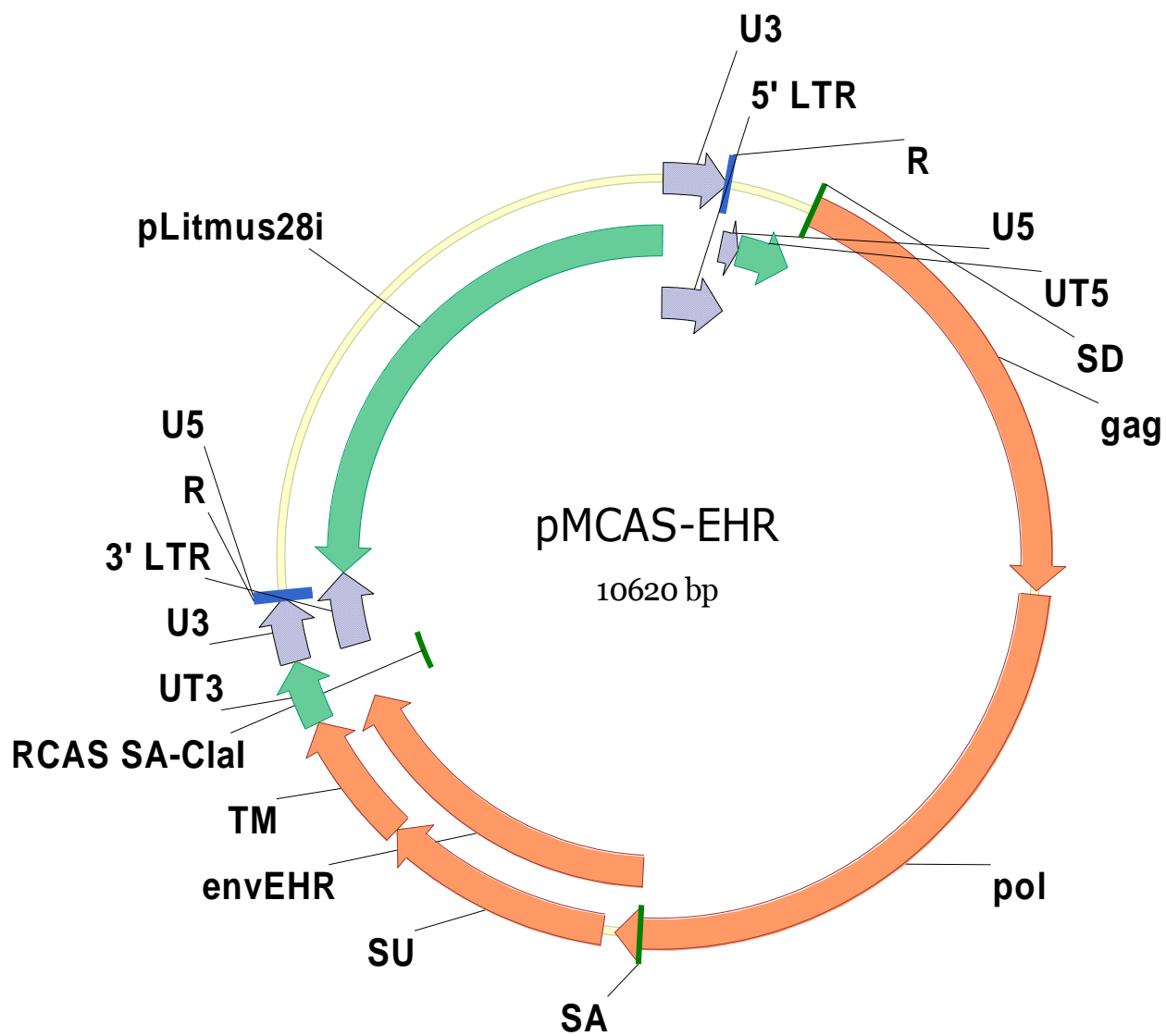
Obrázek 31. Schéma plasmidu pMCAS-B BSD



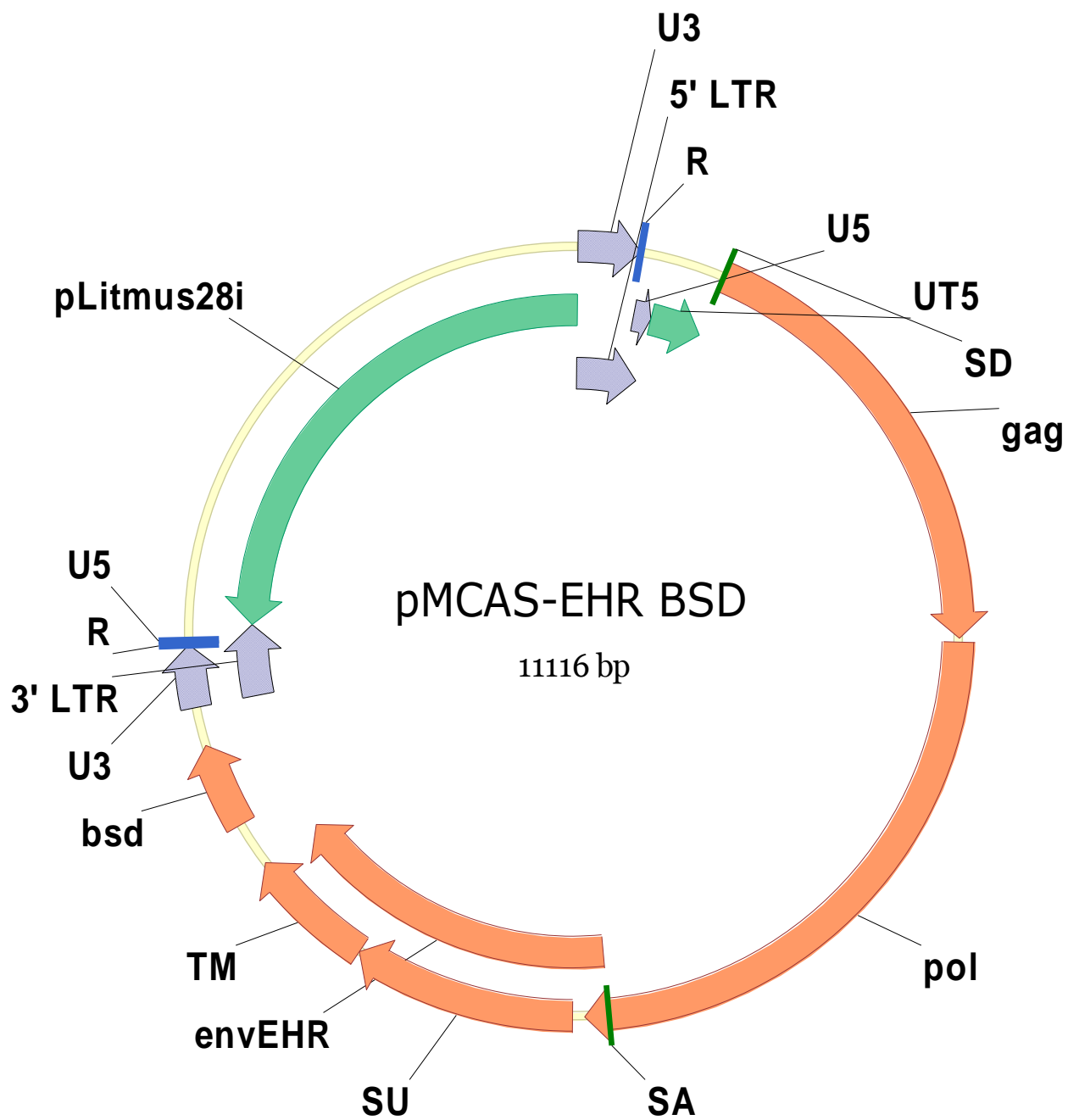
Obrázek 32. Schéma plasmidu pMCAS-B GFP



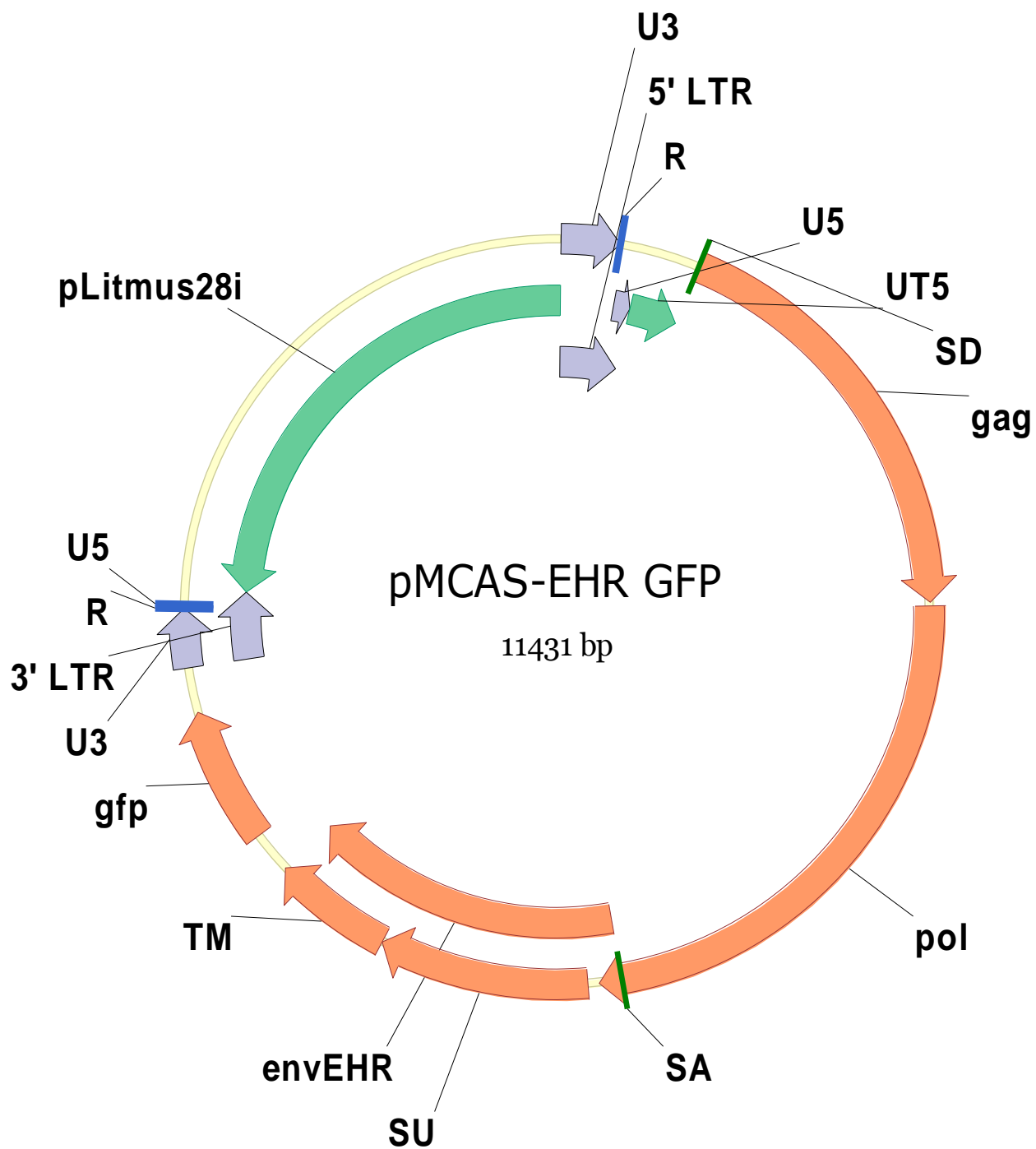
Obrázek 33. Schéma plasmidu pMCAS-EHR



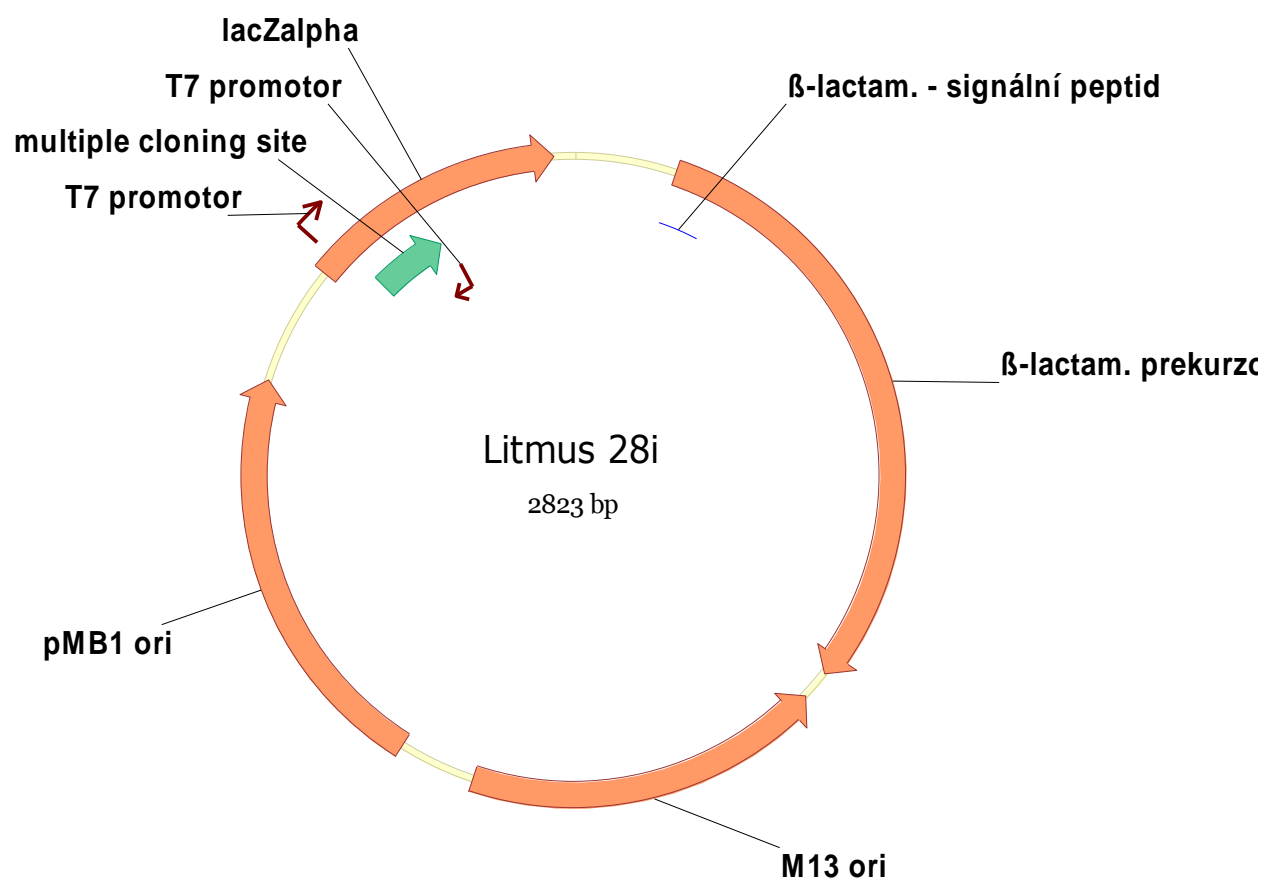
Obrázek 34. Schéma plasmidu pMCAS-EHR BSD



Obrázek 35. Schéma plasmidu pMCAS-EHR GFP



Obrázek 36. Schéma plasmidu Litmus 28i



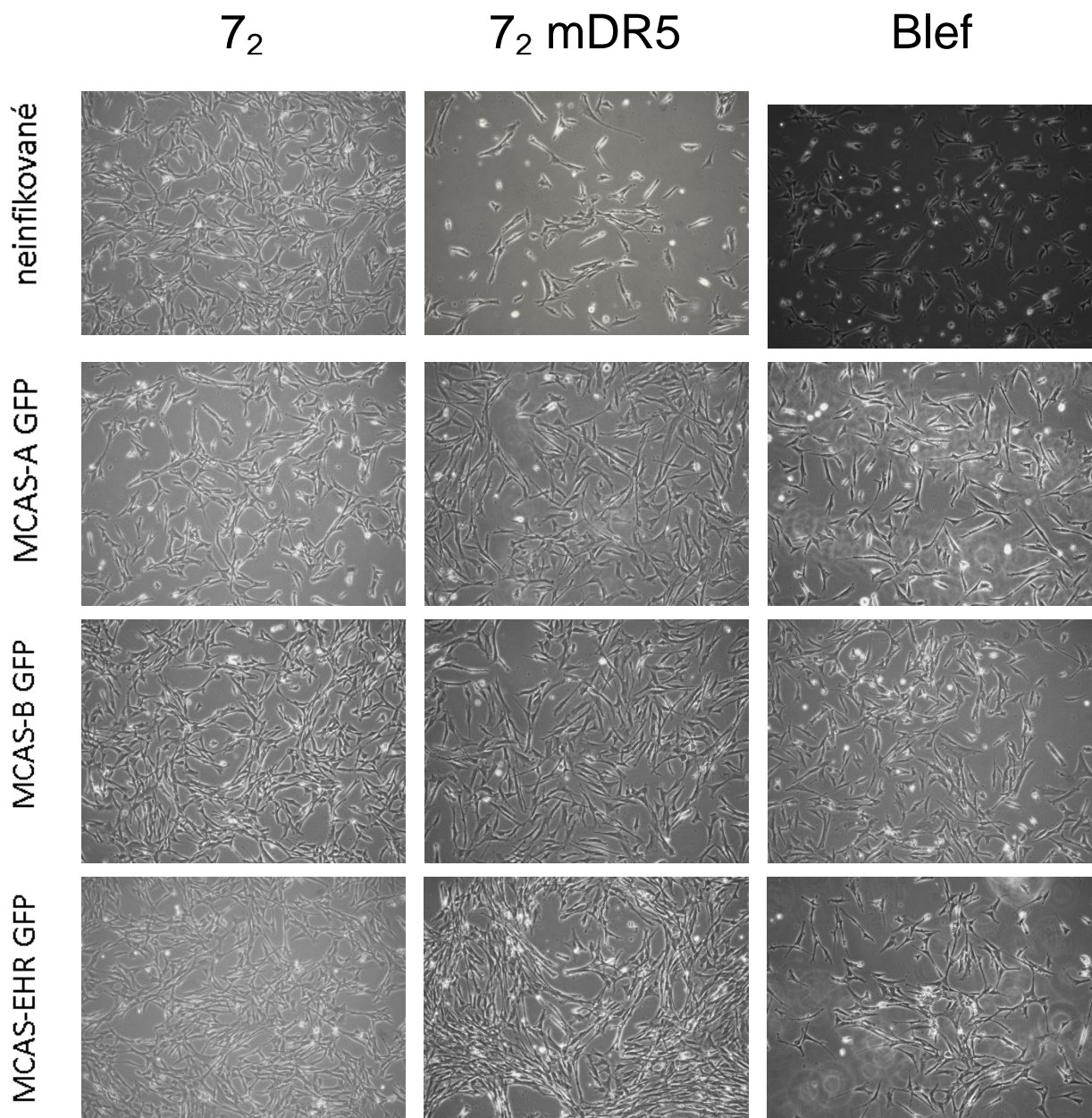
## Infekce kuřecí linie 7<sub>2</sub> vektory třídy MCAS

Ve svém článku doktor Rainey a spol. (2003) diskutoval možnosti pronikání viru kódující obalový glykoprotein s mutací L154S do hostitelských buněk. Jedna z nich byl neznámý mechanismus nezávislý na receptoru, další pak předpokládá interakci s neznámým receptorem. Rozhodli jsme se proto otestovat tyto možnosti infekcí buněčné kultury, jejíž gen *tva* nese inzerci narušující čtecí rámec, a jejíž *tvb* gen obsahuje mutaci vytvářející předčasný stop kodon, což vede k absenci produktu tohoto genu na buněčném povrchu a infekcí téže kultury kódující exogenní Tvb analog. Jedním z těchto evolučních příbuzných je myší TRAILR2 (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor, receptor ligandu indukujícího apoptózu příbuzný nádor nekrotizujícího faktoru).

Buněčnou kulturu 7<sub>2</sub> mDR5 (mDR5 je alternativní název pro TRAILR2 pocházejícího z myší, death receptor 5, receptor smrti 5) vytvořenou transfekcí expresního plazmidu s tímto genem jsme začlenili do infekční matice vytvořenou společně s kulturami 7<sub>2</sub> a Blef a viry MCAS-A GFP, MCAS-B GFP a MCAS-EHR GFP. Matice je k nahlédnutí na obrázku 37, vizualizace GFP je pak na obrázku 38.

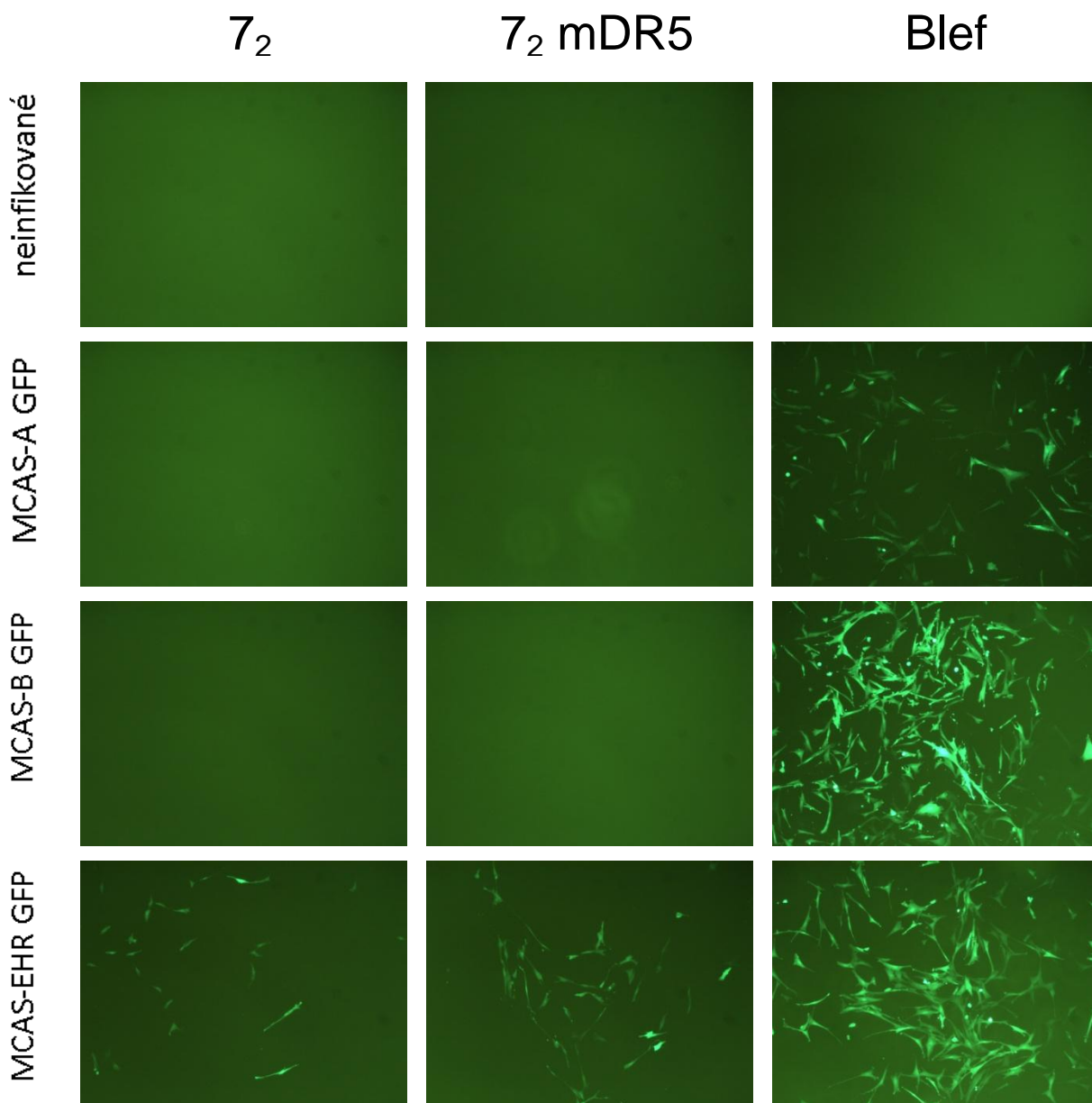
Zatímco viry MCAS-A GFP a MCAS-B GFP dokázaly produktivně infikovat pouze buněčné kultury Blef nesoucí endogenní receptory Tva a Tvb, virus MCAS-EHR GFP dokázal infikovat všechny tři kultury, byť s rozdílnou účinností, kdy exprese GFP je v kulturách 7<sub>2</sub> a 7<sub>2</sub> mDR5 nižší než v kulturách Blef. Zdá se proto, že blízce příbuzný mDR5 gen nemá na infekci buněk žádný vliv, tudíž virus využívá buďto naprosto odlišný receptor anebo vstupuje do buněk nezávisle na receptoru.





**Obrázek 37. Buněčné kultury – test infekitivity**

Infekční matice, sloupce znázorňují použité buněčné kultury, řádky pak použité virové druhy. V prvním řádku jsou neinfikované buněčné kultury jako negativní kontroly. Zvětšení 40×.



**Obrázek 38. Expresse GFP z integrovaných provirů**

Infekční matice, sloupce znázorňují použité buněčné kultury, řádky pak použité virové druhy. V prvním řádku jsou neinfikované buněčné kultury jako negativní kontroly. Detekce infekce pomocí exprese GFP a vizualizace fluorescenčním mikroskopem, expozice 6 sekund. Zatímco v kulturách Blef došlo k úspěšné infekci všech tří kmenů virů, pouze mutantní kmen EHR dokázal infikovat, byť s nižší účinností i kultury  $7_2$  a  $7_2$  mDR5. Přítomnost mDR5 neměla na infekci vliv. Zvětšení 40×.

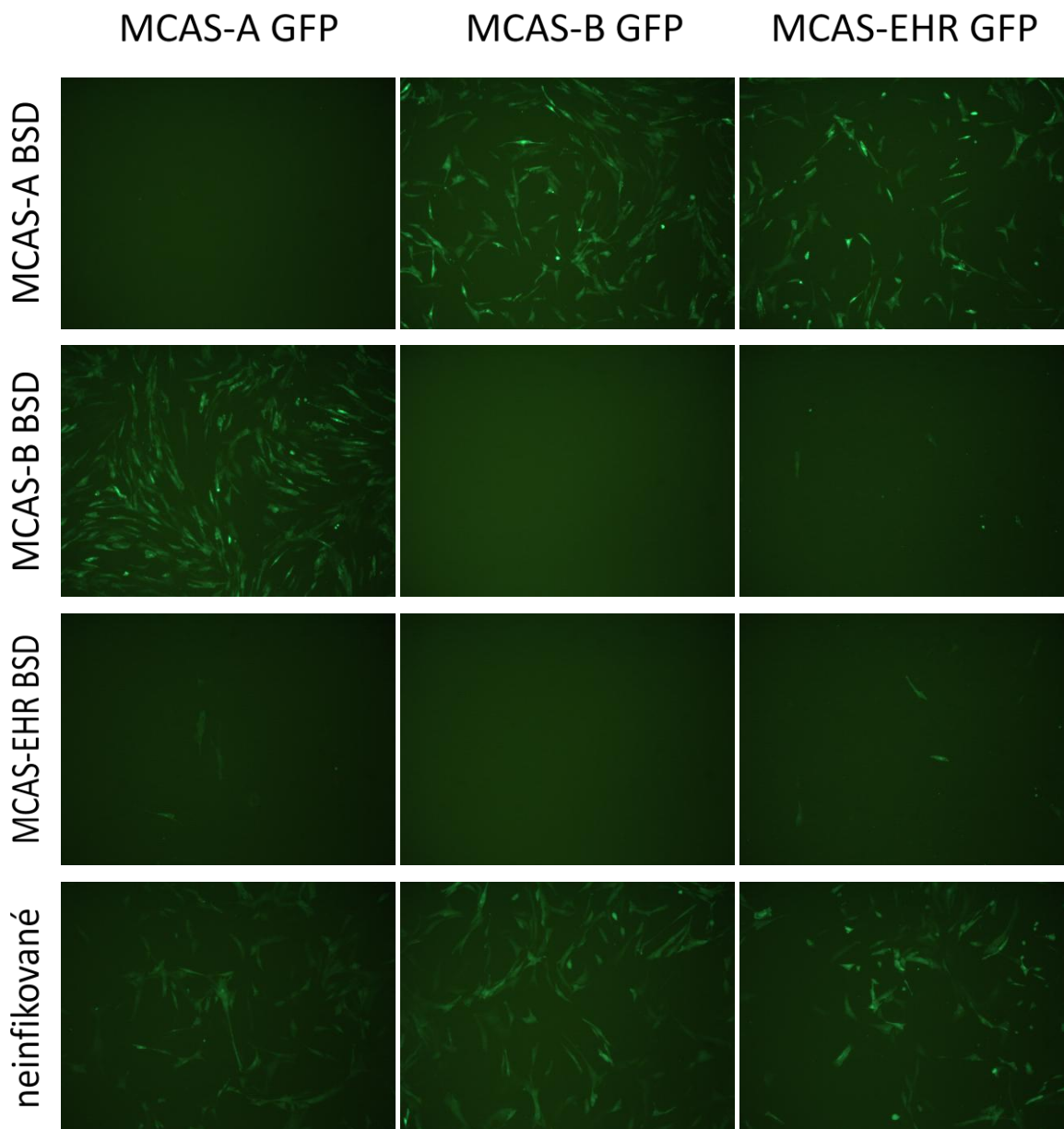
## Test receptorové interference

Jedna z popisovaných vlastností mutovaného glykoproteinu bylo snižování účinnosti receptorové interference. Ta nastává v infikované buňce vlivem produkce nového glykoproteinu, který interaguje s receptorem a zabraňuje tak vstupu nových partikulí viru do buňky. Právě tuto schopnost jsme se rozhodli ověřit pro námi zavedenou mutaci do viru MAV-B.

Buňky B1e a B1e chronicky infikované viry MCAS-A BSD, MCAS-B BSD a MCAS-EHR BSD selektovaných blastocidinem jsme infikovali viry MCAS-A GFP, MCAS-B GFP a MCAS-EHR GFP. Úroveň infekce jsme detekovali fluorescenčním mikroskopem (obrázek 39).

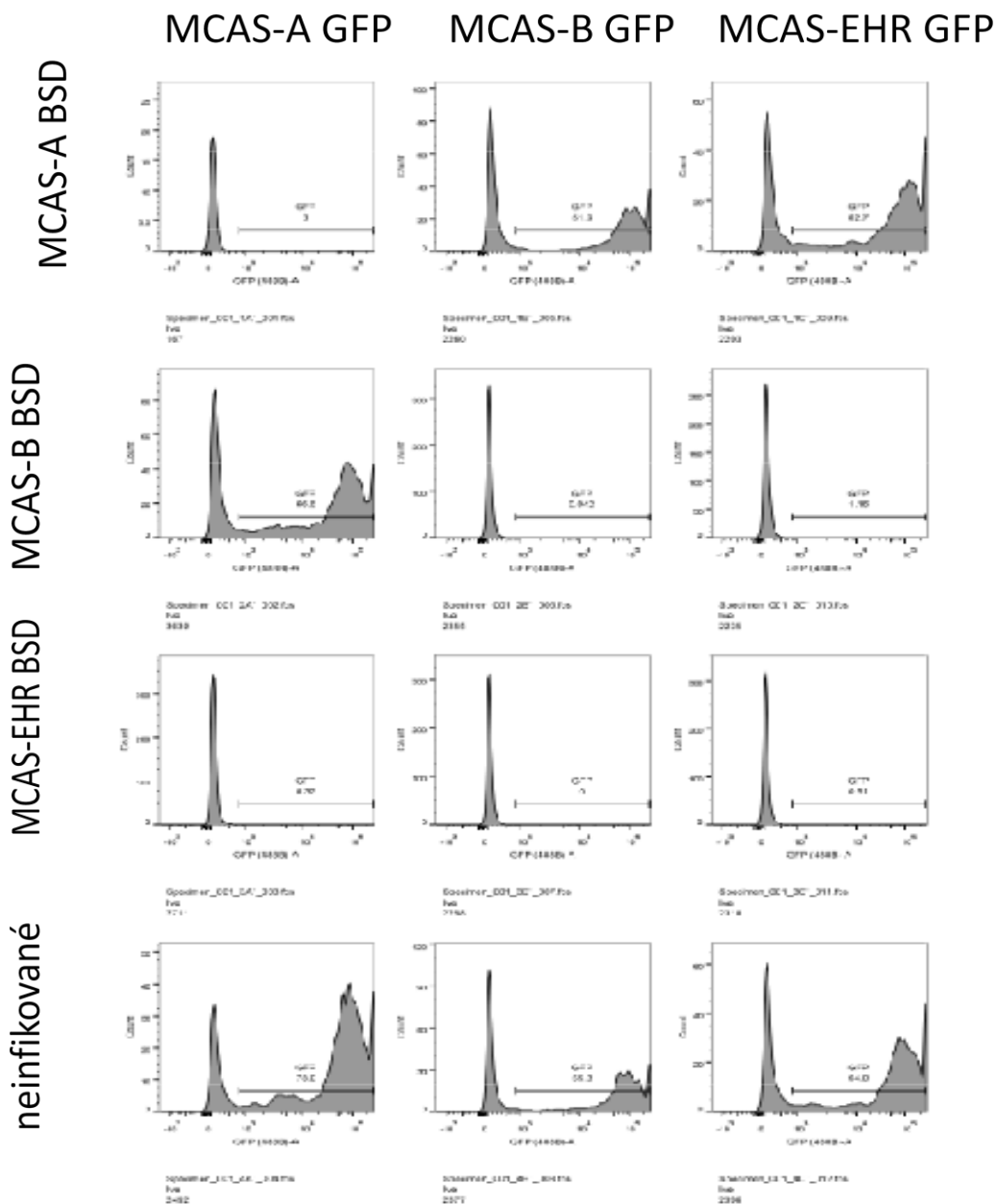
Zatímco MCAS-A GFP není schopen superinfikovat buňky chronicky infikované MCAS-A BSD a MCAS-B GFP není schopen superinfikovat buňky chronicky infikované MCAS-B BSD anebo MCAS-EHR BSD, MCAS-EHR GFP je schopen infikovat všechny kultury, byť s rozdílnou účinností. Po dvou dnech bylo v některých kulturách detekováno pouze několik buněk. Kontrola infekcí neinfikovaných buněk ukázala replikační kompetenci všech tří kmenů virů a úroveň infekce. Překvapivě, MCAS-A GFP superinfikoval kulturu B1e preinfikované virem MCAS-EHR BSD s velmi nízkou účinností. Nejpravděpodobnější vysvětlení tohoto jevu je kontaminace v průběhu preinfekce a selekce antibiotikem.

Výsledky vyšetření fluorescenčním mikroskopem byly ověřeny metodou FACS (obrázek 40). I ta odhalila slabou schopnost viru MCAS-EHR GFP pronikat do preinfikovaných buněk a tím je superinfikovat. U viru MCAS-B GFP tento jev nebyl pozorován, respektive oba viry dokázaly preinfekcí zabránit superinfekci podskupiny B, ne však EHR a kontrolní podskupině A. MCAS-A GFP nebyl schopen superinfikovat pouze buňky preinfikované virem MCAS-A BSD. Anomálie neschopnosti tohoto viru superinfikovat buňky preinfikované virem MCAS-EHR BSD se, jak již bylo řečeno, dá nejspíše vysvětlit kontaminací během experimentu.



### Obrázek 39. Superinfekce preinfikovaných buněk

Infekční matice, sloupce znázorňují superinfikující, řádky pak preinfikující viry. V posledním řádku jsou nepreinfikované buněčné kultury jako negativní kontroly. Detekce infekce pomocí exprese GFP a vizualizace fluorescenčním mikroskopem, expozice 6 sekund. Zatímco virus MCAS-EHR GFP dokázal s různou účinností překonat receptorovou interferenci, viry MCAS-B GFP a MCAS-A GFP toho nebyly schopny. MCAS-A GFP navíc vykazuje potíže superinfikovat kultury preinfikované virem MCAS-EHR BSD. Zvětšení 40×.



**Obrázek 40. Ověření receptorové interference metodou FACS**

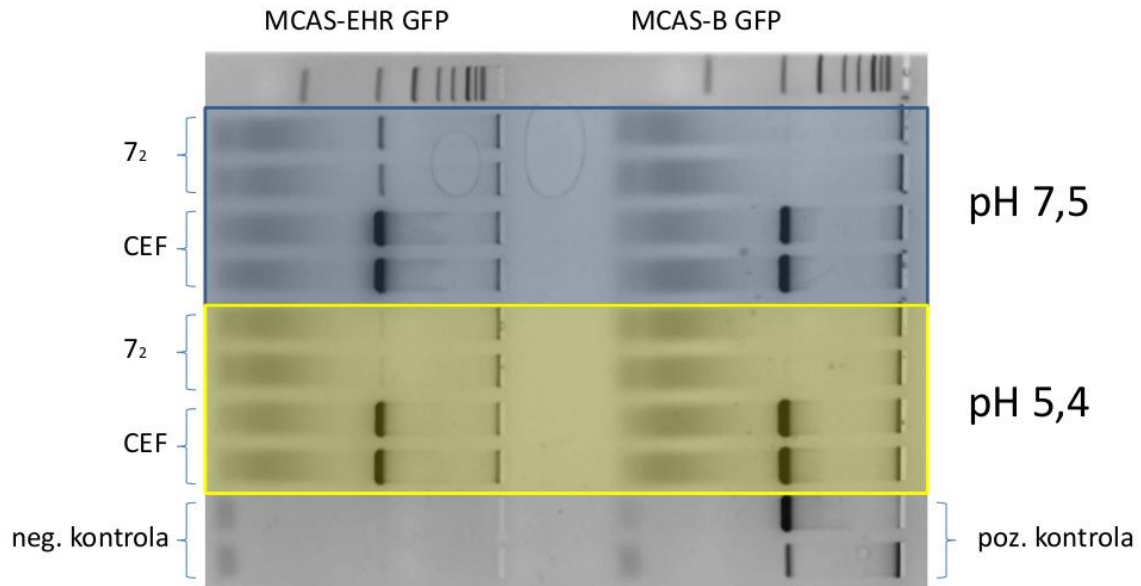
Infekční matice, sloupce znázorňují superinfikující, řádky pak preinfikující viry. V posledním řádku jsou nepreinfikované buněčné kultury jako negativní kontroly. Detekce infekce pomocí exprese GFP proběhla metodou FACS. Pro analýzu byly zacíleny pouze živé jednotlivé buňky. V histogramech jsou znázorněny intenzity exprese GFP.

## Vliv pH na vstup viru do buňky

V předchozích experimentech jsme prokázali schopnost mutantního kmene EHR infikovat buněčné kultury  $7_2$  postrádající receptor tvb a neschopnost myšího orthologu fungovat jako receptor pro MAV-EHR. Toto zjištění nás přivedlo k hypotéze o alternativním mechanismu vstupu MAV-EHR do buňky. Samovolná aktivace virového glykoproteinu a odhalení fúzního peptidu vede k citlivosti viru na nízké pH (kvůli indukci dalších konformačních změn). Tyto změny vedou normální k fúzi membrán, u volného virionu však vedou k jeho anaktivaci. Tuto hypotézu jsme podrobili kritickému zkoumání přechodnou změnou pH.

Za tímto účelem jsme buněčné kultury Blef a  $7_2$  jsme infikovali virem MCAS-B GFP a MCAS-EHR GFP, které předtím byly/nebyly krátkodobě vystavené nízkému pH. Po 14-ti hodinách jsme buňky lyzovali, izolovali DNA a analyzovali pomocí metody semikvantitativního PCR (obrázek 41).

V případě viru MCAS-B GFP byly odpovídající fragmenty pozorovatelné pouze v kulturách Blef, a to jak v případě neutrálního pH, tak v případě krátkodobého snížení pH se srovnatelnou intenzitou. Naproti tomu intenzita fragmentů MCAS-EHR GFP je variabilní. V případě kultur Blef je maximální v kontrolní kultuře bez změny pH, avšak v kultuře infikované virem vystavenému krátkodobému snížení pH je intenzita fragmentů snížena. V případě kultur  $7_2$  je intenzita fragmentů v kontrolní kultuře bez změny pH vyšší než intenzita fragmentů v kultuře infikované virem vystavenému krátkodobému snížení pH. Tyto výsledky nás vedou k přesvědčení, že mutovaný glykoprotein je citlivý na přechodné snížení pH, které způsobí jeho neutralizaci.



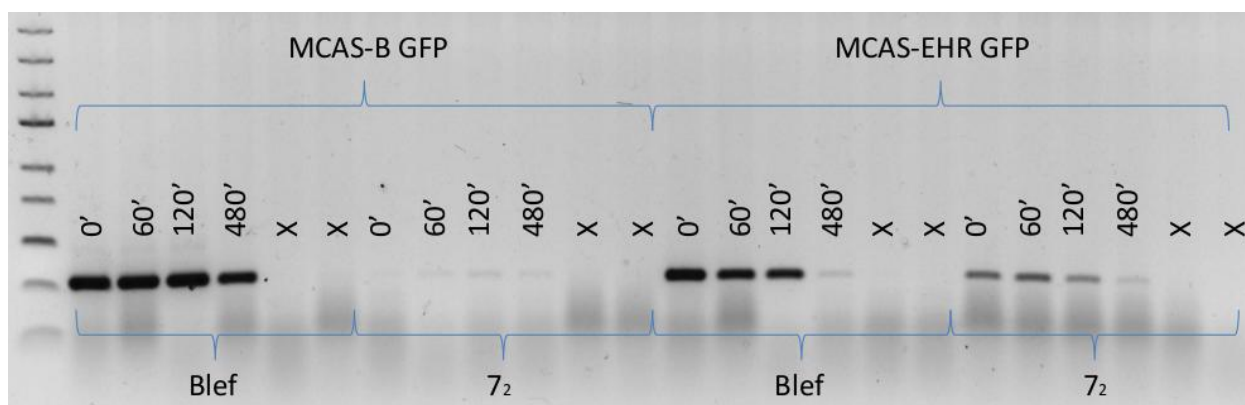
#### **Obrázek 41. Vliv pH na vstup viru do buněk**

Výsledek gelové elektroforézy (60 minut, 5V/cm, 1% koncentrace). Fragment (300bp) reprezentuje úspěšný vstup, rozbalení a reverzní transkripci virových partikulí. Tento fragment byl pro virus MCAS-B GFP detekován pouze v kulturách CEF (jiné označení pro B1ef) pro obě hodnoty pH (barevně odlišené). MCAS-EHR GFP je schopen infikovat obě buňkové kultury, avšak přechodně snížené pH vede ke snížení intenzity fragmentů ve všech případech.

## Teplotní stabilita viru

Stejně jako různé hodnoty pH, i rozdílné teploty mohou sehrát svoji roli v konformačních přechodech obalového glykoproteinu. Rozhodli jsme se proto otestovat stabilitu virů v 44°C po různě dlouhou dobu ve vodní lázni. Po inkubaci jsme infikovali příslušné buněčné kultury a po 14-ti hodinách je lyzovali, izolovali DNA a analyzovali (obrázek 42).

S rostoucím časem inkubace při 44°C je u viru MCAS-B GFP vidět pozvolný pokles infekivity kultur Blef pouze při osmihodinové inkubaci. Tento virus je v malé míře detekovatelný i v kulturách 7<sub>2</sub>, ale pouze po předchozí inkubaci ve 44°C. Naproti tomu počet kopií DNA MCAS-EHR GFP klesá jak v kulturách Blef, tak v kulturách 7<sub>2</sub>. V případě kultur Blef je toto snížení viditelné již po 60-ti minutách, u kultur 7<sub>2</sub> až po 120-ti minutách, po 60-ti minutách je vidět lehké zvýšení. U obou kultur je po 480 minutách počet kopií DNA již dramaticky snížen. I tyto výsledky ukazují na citlivost mutovaného glykoproteinu a jeho rychlou neutralizaci.



### Obrázek 42. Teplotní labilita virů

Výsledek gelové elektroforézy (60 minut, 5V/cm, 1% koncentrace). Fragment o délce 300 bp představuje úspěšný vstup, rozbalení a reverzní transkripci virových partikul. Čísla označují různé časy inkubace viru v 44°C v minutách, x označují neinfikované kontrolní kultury. Počet provirů v kulturách Blef s časem inkubace klesal pouze pozvolna, po inkubaci minimálně 1 hodinu jsme detekovali proviry i v kulturách 7<sub>2</sub>.



## Diskuze

Přírodní výběr a koevoluce patogenu s hostitelem vedla k velkému množství mutací. Mutace v genomu hostitele vedly k zabránění efektivnímu dokončení životního cyklu patogenu, naopak mutace v genomu patogenu byly selektovány na překonání těchto bariér. V případě virů a buněk se jedná o restrikce na úrovni vstupu viru, transkripce, translace, replikace a maturace nové generace virionů. Vysoká specifita viru ke konkrétnímu receptoru, která je dána potřebou selekce permissivních buněk zajišťujících efektivní pomnožení, však vedla také k mezidruhovému boji různých kmenů virů. Je to zvaný receptorová interference, která vede k zabránění vstupu viru stejného kmene do preinfikované buňky, totiž znevýhodňuje viry mající afinitu ke stejnému receptoru. Tento silný selekční tlak vedl k hromadění mutací v obalových proteinech vrcholícím úplnou změnou využívaného receptoru. V tomto důsledku proto rozlišujeme kmeny virů, jejichž obalové proteiny nejsou identické, ale mají srovnatelnou afinitu ke konkrétnímu receptoru.

Na počátku naší práce jsme si položili tři okruhy otázek. Za prvé, zda-li popsaná bodová mutace má stejné projevy i v glykoproteinu odlišného kmene podskupiny B ptačích retrovirů. Za druhé, jakým mechanismem mutace L154S ve virovém obalovém glykoproteinu vyvolává dříve popsané fenomény: obcházení superinfekční resistance a schopnost infikovat buňky nepermissivní pro nemutovaný virus. A za třetí, jak tyto schopnosti ovlivní patogenezí v infikovaných kuřatech.

### **Funkčnost mutace L154S v kontextu glykoproteinu MAV-B**

Pro možnost ověřit vliv bodové mutace původně popsané na pozadí Pr-RSV-B (Taplitz and Coffin, 1997) v novém kontextu obalového glykoproteinu viru MAV-B (Pečenka, nepublikované) jsme do něj tuto mutaci (L154S) zavedli pomocí fúzního PCR. Takto konstruovaný virus jsme nazvali MAV-B-EHR (dále MAV-EHR nebo jen EHR).

Dále jsme viry MAV-B i EHR infikovali tři typy buněčných kultur (Blef – primární kuřecí embryonální fibroblasty, 3T3 - stabilní linie myších fibroblastů a NRK – stabilní buněčná linie z krysích ledvin). Kultivace těchto kultur a následná analýza pomocí semikvantitativního PCR potvrdilo přísný kuřecí tropismus MAV-B a rozšíření tropismu na savčí buňky v případě viru EHR, i když úroveň infekce savčích buněk byla výrazně

nižší než infekce buněk kuřecích. Zároveň bylo v kuřecích buňkách infikovaných virem EHR (ne však MAV-B) pozorováno dlouhodobé přetrvávání neintegrováných cirkulárních forem provirů. Cirkulární formy viru vznikají aberantně a v malém množství z lineárních provirů před jejich integrací, které již nejsou schopné další replikace. Při opakovaném dělení buněk se proto jejich počet snižuje, neboť po prvním kole infekce je superinfekce vlivem receptorové interference inhibována. Přetrvávání cirkulárních provirů několik týdnů po infekci tak může indikovat pokračující infekci a tedy snížení receptorové interference. V savčích buňkách cirkulární formy virové DNA nepřetrvávaly, a to z prostého důvodu. Tyto buňky jsou sice schopné podporovat reverzní transkripci a integraci ptačích retrovirů, ne však produkci virových partikulí a jejich další infekce tak ustane i v případě viru obcházejícího receptorovou interferenci.

Dalšímu ověření čelilo oslabení interference, díky kterému je schopen virus Pr-RSV-B nesoucí mutaci L154S superinfikovat buněčné kultury preinfikované divokým ale i mutovaným kmenem. Zatímco v našem experimentu preinfekce podskupinou A vedla k inhibici superinfekce podskupiny A a preinfekce podskupinou B vedla k inhibici superinfekce podskupiny B, preinfekce mutovaným kmenem EHR k žádné inhibici superinfekce kmenem EHR nevedla. Kmen EHR byl navíc schopen inhibovat superinfekci podskupiny B, opačný jev však nebyl pozorován. Kmen EHR tak očividně neztratil schopnost interakce s původním receptorem a zároveň dokáže obcházet receptorovou interferenci. Příklad inhibice superinfekce podskupinou A v buňkách preinfikovaných kmenem EHR může být nejlépe vysvětlen případnou kontaminací. K vyloučení této možnosti by bylo třeba experiment několikrát zopakovat. V případě opakování této situace by se nejspíš přikročilo k sekvenování provirů další analýze.

I přes drobné anomálie lze tedy uzavřít, že projevy mutace L154S ve viru Pr-RSV-B byly zachovány i na pozadí viru MAV-B.

## **Molekulární mechanizmy**




Pro další pokusy směřující k nalezení mechanismů obcházení receptorové interference a rozšíření hostitelské specifity jsme zkonstruovali serii virových vektorů. Nejprve jsme vytvořili MCAS-B, analogii běžně používaného expresního systému RCAS, založenou však na viru MAV-B namísto RSV. MCAS-B vznikl vložením úseku RCAS(BP)-B, obsahujícího SA (splice acceptor, přijímač stříhu) a unikátní místo pro

restrikční endonukleázu ClaI, na odpovídající pozici ve viru MAV-B. Poté jsme inzercí reportérových genů gfp (fluorescenční protein) nebo bsd (rezistence k antibiotiku blastidinu) do ClaI místa a záměnou úseku kódujícího obalový glykoprotein vytvořili klony MCAS-A GFP, MCAS-B GFP, MCAS-EHR GFP, MCAS-A BSD, MCAS-B BSD, MCAS-EHR BSD a z nich transfekcí Blef připravili infekční viry.

Publikované výsledky a naše pozorování nás přivedly k formulování hypotézy: mutace L154S v obalovém glykoproteinu snižuje aktivační energii nutnou k přechodu glykoproteinu do druhého stádia hybridního fúzního systému ("priming"). To vede k vytvoření minoritní populace virionů se samovolně aktivovaným glykoproteinem vystavujícím obnažený fúzní peptid. Ten se pak může zanořit do membrány nezávisle na receptoru, což této subpopulaci virionů dovoluje pronikat do původně nepermissivních buněk i obcházet interferenci. Alternativní hypotéza by předpokládala, že mutace vybavila glykoprotein schopností interagovat s novým receptorem, v nejpravděpodobnějším a nejsnáze představitelném případě se savčími ortology kuřecího tvb, které přes svou blízkou příbuznost zjevně nejsou nemutovaným glykoproteinem rozeznávány. Tuto možnost jsme se pokusili vyloučit experimentem založeným na buňkách z kuřecí linie 7<sub>2</sub>, která neprodukuje (v důsledku vzniku stop kodonu v příslušných genech) tva ani tvb a je proto nepermissivní pro podskupiny A i B. Jejich transfekcí expresním vektorem nesoucím myší ortolog tvb (TRAILR2/mDR5) jsme vytvořili kuřecí buňky exprimující myší TRAILR2 namísto kuřecího. Výchozí i TRAILR2/mDR5 nesoucí 7<sub>2</sub> buňky byly infikovány viry MCAS-A GFP, MCAS-B GFP a MCAS-EHR GFP. Následné sledování exprese GFP ukázalo, že pouze EHR dokáže infikovat 7<sub>2</sub> buňky, přičemž přítomnost myšího TRAILR2 nemá na infekci žádný vliv. Množství GFP pozitivních 7<sub>2</sub> i 7<sub>2</sub> mDR5 buněk však bylo výrazně menší než v případě Blef buněk, podobně jako tomu bylo při infekci savčích buněk, což naznačuje sníženou efektivitu infekce v nepřítomnosti vhodného receptoru.

Uvedené experimenty tak nepodporují hypotézu, podle které glykoprotein podskupiny B získal mutací L154S schopnost rozeznávat savčí TRAILR2 jako svůj receptor a ponechávají jako nejpravděpodobnější hypotézu o spontánní, bezreceptorové aktivaci glykoproteinu. K tomu směřovaly i další pokusy. První z nich, sledování stability při sníženém pH, vycházel ze znalosti hybridního fúzního systému

ASLV. Glykoproteiny ptačích retrovirů jsou totiž až do okamžiku spojení se svým receptorem stabilní i v nízkém pH. Jak ukázaly experimenty s rozpustnou formou receptoru schopnou aktivovat virový glykoprotein (Damico and Bates, 2000; Damico et al., 1998; Gilbert et al., 1995; Mothes et al., 2000), teprve po aktivaci vazbou na receptor, která vede ke konformačním změnám a obnažení fúzního peptidu, se glykoproteiny stávají citlivé vůči nízkému pH; je to právě nízké pH v endozomech, které vyvolává další konformační změny, sblížení fúzního peptidu s transmembránovou kotvou a fúzi membrán (krátké schéma na obrázku43). Vystavení aktivovaného glykoproteinu nízkému pH dříve než dojde k ukotvení fúzního peptidu do hostitelské membrány přitom vede k předčasným konformačním změnám, které glykoprotein nevratně inaktivují, neboť vzniklá forma se už s hostitelskou membránou propojit nedokáže. Vystavili jsme proto MAV-B a EHR viriony krátkodobému působení pH 5,4 při 4°C (podmínky dostačující pro zmíněnou inaktivaci viru), takto ošetřeným virem jsme infikovali kultury buněk 7<sub>2</sub> a Blef a po 14 hodinách (doba nezbytná pro vstup částic do buněk a reverzní transkripci) semikvantitativním PCR určili úroveň infekce cílových buněk. Jak jsme očekávali, titer viru MAV-B nebyl nízkým pH nijak ovlivněn a zůstal stejně vysoký při infekci Blef a nulový při infekci buněk 7<sub>2</sub>. Zato virus EHR byl ovlivněn zásadním způsobem: působením nízkého pH titer poklesl mírně na buňkách Blef a velmi výrazně, na sotva detekovatelnou hodnotu, na buňkách 7<sub>2</sub>. To je v naprostém souhlase s naší hypotézou, podle které nízké pH eliminovalo subpopulaci viru EHR s vysunutým fúzním peptidem. Ta je jedinou populací schopnou infikovat buňky 7<sub>2</sub>, ale jen minoritním podílem virionů schopných infikovat Blef. Skutečnost, že titer na buňkách 7<sub>2</sub> neklesl na

	Citlivost na pH	Fuzogenicita	Infektivita
 A	-	-	+
	+	+	+
 C	-	-	-

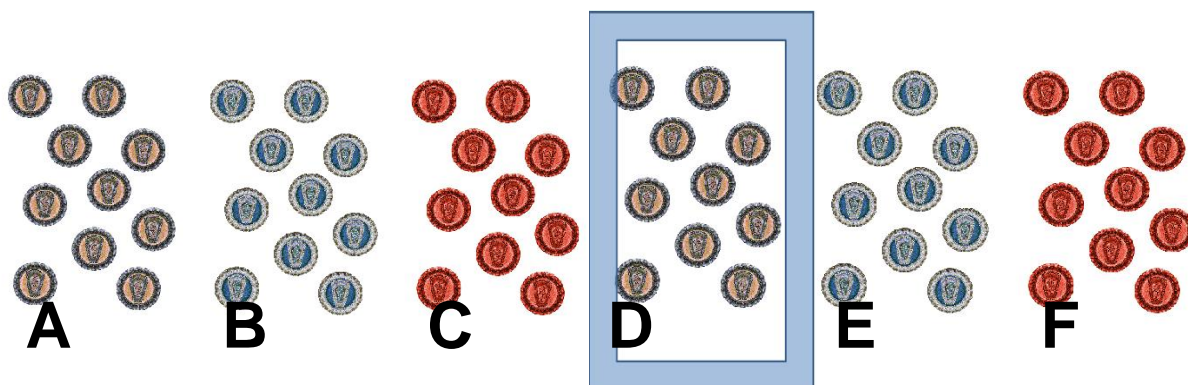
**Obrázek 43. Schéma**

Na schématu jsou shrnuty 3 formy glykoproteinu a jejich vlastnosti: volná partikule (A), partikule s aktivovaným glykoproteinem (B) a partikule s „fúzovaným“ glykoproteinem (C).

úplnou nulu lze vysvětlit jak neúplnou deaktivací příslušných virionů během krátkého působení nízkého pH, tak opětovnou spontánní tvorbou aktivovaných virionů poté, co se přidáním viru do růstového média zvýšilo pH.

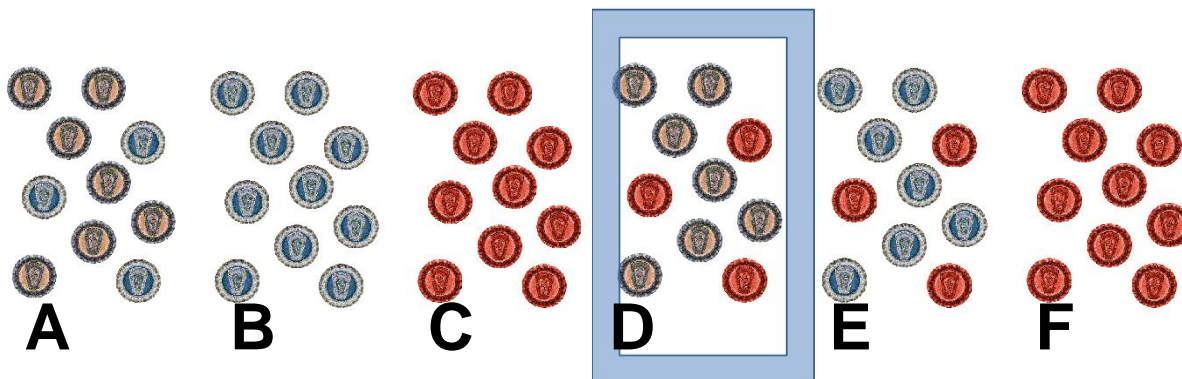
Další experimenty byly založeny na následující úvaze. Pokud mutace L154S funguje prostřednictvím snížení aktivační energie nutné pro konformační změnu vedoucí k vysunutí fúzního peptidu, měla by tato konformační změna být dále urychlena zvýšením teploty. Vedeni touto představou jsme inkubovali viry MAV-B a EHR po různou dobu při teplotě 44°C a infikovali jimi kultury Blef a 7<sub>2</sub>. Výsledky měření množství vytvořených provirů byly nečekané. Především, inkubací při 44°C nečekaně získal schopnost infikovat 7<sub>2</sub> buňky (byť na velmi nízké hladině / úrovni) i MAV-B; zvýšená teplota tedy vyvolává měřitelnou aktivaci i u nemutovaného viru. Dále se ukázala značná teplotní nestabilita viru EHR - jeho inkubace při zvýšené teplotě postupně snižovala titr viru, a to na obou typech buněk. Možným vysvětlením je, že zvýšená teplota sice urychluje samovolné první kolo konformačních změn (aktivaci, vysunutí fúzního peptidu), ale současně podporuje i druhé kolo přestaveb (vzájemné přiložení HR domén), což znamená inaktivaci. Nestabilita viru EHR se zřejmě projevuje i při 37°C (teplota, při níž byl produkován infekční virus pro naše pokusy); to by vysvětlovalo, proč titry produkovaného MAV-B byly vždy výrazně vyšší než titry jedinou bodovou mutací se odlišujícího viru EHR. Podmínky produkce obou virů byly stejné, tudíž byl jejich titr srovnatelný. Literatura toto pozorování podporuje, neboť i jedna z podskupin ptačích retrovirů, D, vykazuje zvýšenou nestabilitu při teplotě 44°C (Bova-Hill et al., 1991).

V souvislosti s našimi daty navrhuje následující model: glykoprotein divokého kmenu se nachází v hemistabilní konformaci, která je ale necitlivá na nízké pH a vyšší teploty. Tato konformace se po interakci s receptorem změní a fúzní peptid, do té doby ukrytý v nitru proteinu, je vystaven na povrchu proteinu a může se tak zanořit do cílové membrány. Další konformační změny zprostředkované sníženým pH a protonací proteinu vedou k propletení dvou k sobě komplementárních domén v transmembránové podjednotce. Toto propletení k sobě přiblíží i transmembránovou kotvu ve virové membráně a fúzní peptid v membráně cílové a následně vede k mechanickému vynucení fúze obou membrán. Virus je proto v prvních fázích fúze chráněn před neutralizací nízkým pH (obrázek 44). V případě mutantního kmenu je však aktivační



**Obrázek 44. Citlivost divokého kmene na snížené pH**

Na obrázku je naznačeno schéma indukované infekivity partikulí divokého kmenu MAV-B. Virové částice (A) jsou po interakci s receptorem aktivovány (B) a sníženým pH v endozomech fúzoval s buněčnými membránami (C). Stejný průběh je pozorován i při opůsobení viru nízkým pH (modrý rámeček) před jeho infekcí buněčných kultur (D), následné aktivaci partikulí (E) a jejich fúze v endozomech (F).

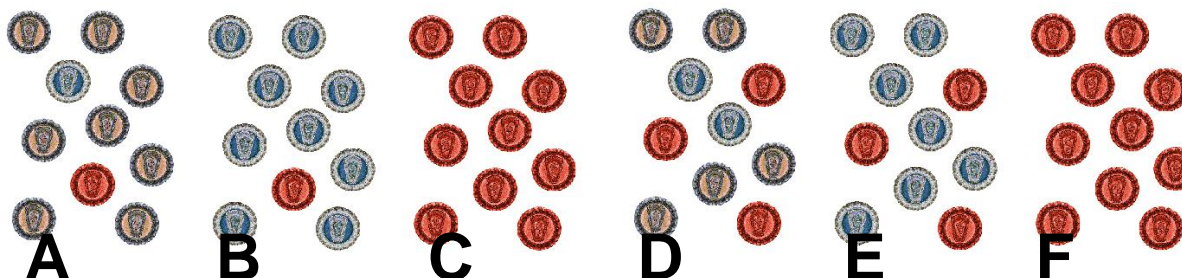


**Obrázek 45. Citlivost mutantního kmene na snížené pH**

Na obrázku je naznačeno schéma indukované infekivity partikulí mutovaného viru MAV-EHR. Některé virové částice jsou samovolně aktivovány ještě před interakcí s receptorem (A), zatímco zbytek populace byl aktivován až po navázání receptoru (B) a snížením pH v endozomech fúzoval s buněčnými membránami (C). Rozdílný průběh je pozorován při opůsobení viru nízkým pH (modrý rámeček) před jeho infekcí buněčných kultur (D), kdy dojde k předčasným konformačním změnám způsobující neutralizaci (A). Následná aktivace partikulí navázáním receptoru způsobí aktivaci zbytku populace, částice inaktivované přechodně sníženým pH však nadále zůstanou neutralizovány (E). Nízké pH v endozomech indukuje fúzi zbytku populace (F).

energie nutná pro obnažení fúzního peptidu snížena a může tak docházet k samovolnému přechodu z pH necitlivé fáze do fáze citlivosti (obrázek 45).

Pravděpodobnost samovolné aktivace v nepřítomnosti receptoru roste se zvětšující se teplotou, a to jak v případě mutovaného kmene, tak v případě divokého kmene. V případě mutanty EHR je však tento přechod masivnější právě kvůli snížení aktivační energie k tomu potřebné. Odhalení fúzního peptidu v takových podmínkách vede k rychlé inaktivaci fúzního peptidu a tím k neutralizaci viru (obrázek 46).



#### **Obrázek 46. Teplotní citlivost divokého a mutantního kmene**

Na obrázcích je naznačeno schéma indukované infekivity partikulí divokého (MAV-B) a mutovaného (MAV-EHR) viru. Některé virové částice MAV-B jsou samovolně aktivovány a inaktivovány ještě před interakcí s receptorem (A), zatímco zbytek populace byl aktivován až po navázání receptoru (B) a sníženým pH v endozomech fúzoval s buněčnými membránami (C). Tento efekt je daleko silnější u MAV-EHR (D). Následná aktivace partikulí navázáním receptoru způsobí aktivaci zbytku populace, částice inaktivované přechodně sníženým pH však nadále zůstanou neutralizovány (E). Nízké pH v endozomech indukuje fúzi zbytku populace (F).

### **Patogeneze**

Pro studium patogeneze jsme oběma viry infikovali 12-denní kuřecí embrya, po vylíhnutí sledovali jejich vývoj a po dosažení věku 2-3 měsíců provedli jejich pitvu. Vzhledem k popsanému cytotoxickému efektu in vitro (Rainey and Coffin, 2005) jsme očekávali vysokou letalitu embryí. K našemu překvapení se drtivá většina kuřat vylíhla a kuřata infikovaná MAV-B a EHR se ničím neodlišovala navzájem ani od neinfikovaných kuřat. Teprve po několika týdnech se začaly ukazovat rozdíly. Zatímco infekce MAV-B byla stále bezpříznaková, kuřata infikovaná EHR vykazovala velmi výraznou inhibici růstu - 7 týdnů po vylíhnutí byla hmotnost kuřat infikovaných EHR jen ca 40% hmotnosti kontrolních kuřat. Inhibice růstu byla doprovázena nápadně nezdravým vzhledem, zejména svalovou atrofií. Tento jev, zvaný wasting disease (chřadnutí) po působení některých ptačích retrovirů je známý již několik desítek let (Pruková et al., 2007), byť ne v tak extrémní podobě jako v našem případě. Přesto není jeho příčina dosud známa. Bývá spojován s atrofií imunitního systému; to je však natolik komplikovaný a komplexní systém, že se dodnes nepodařilo identifikovat kritické cílové buňky pro vyvolání chřadnutí.

Naše výsledky jsou v souladu s hypotézou poškození imunitního systému jako příčinou chřadnutí: infekce EHR vede k atrofii thymu a burzy i k poklesu počtu B a T lymfocytů v těchto lymfatických orgánech. Postižení imunitního systému lze vysvětlit superinfekcí a následným cytopatickým efektem na buňky imunitního systému či na buňky kontrolujících jeho vývoj. V souvislosti s otázkou superinfekce virem EHR in vivo



je poučné sledování časového vývoje infekce v různých orgánech. Semikvantitativní měření počtu provirů (V. Pečenka, nepublikováno) totiž ukázalo, že téměř všechny orgány jsou plně proinfikovány již tři dny po infekci embryí a průměrný počet provirů na buňku se dál nemění; tyto analýzy zahrnovaly i s imunitou související orgány - burzu, thymus, slezinu a kostní dřeň. Úroveň infekce virem EHR se přitom nijak neliší od MAV-B. Jediným orgánem, který se odlišoval a kde byla nalezena trvale probíhající superinfekce virem EHR, byl překvapivě srdeční sval, v němž počet provirů s věkem rostl a 3 měsíce po infekci dosahoval hodnot o ca jeden řád vyšších než v jiných orgánech, zatímco v kuřatech infikovaných MAV-B se proinfikovanost srdce vůbec neměnila. Superinfekce probíhá i v osteopetrotické kosti, ale toho je schopen i nemutovaný virus, viz níže. Je tedy zřejmé, že superinfekce in vivo je velmi selektivní, omezená na určité typy buněk, takže se v celkovém obrazu orgánu nemusí neprojevit nebo příslušné postižené buňky nepřežívají, což je zřejmě případ B- a T-lymfocytů v burze a thymu. Klíčová otázka, tj. jakým mechanismem vede poškození imunitního systému k inhibici růstu, zůstává nadále nezodpovězena. Může jít např. o poruchu při vývoji tolerance, takže i zbytku atrofovaného imunitního systému mohou způsobovat devastující projevy autoimunity, může jít i o dosud nepopsanou úlohu imunitního systému v regulaci růstu. Získání odpovědi leží mimo dosažitelné cíle této práce. Nabízí se však několik možných vysvětlení, mezi které patří například odpověď na poškozenou DNA mimikována volnými konci neintegrováných lineárních forem virů hromadících se v buňce ve vysokých počtech. Další možností je signalizace přes receptor, ke kterému virus mohl vlivem mutace získat afinitu, přestože není potřeba k produktivní infekci.

V rámci srovnání MAV-B a EHR jsme také analyzovali nádory indukované těmito viry na kuřatech plemen bílé a hnědé leghornky. V našich experimentech jsme nezakládali skupiny neinfikovaných kuřat, z předchozích studií bylo získáno množství dat dokazující standardní chování (žádné neoplázie, normální vzrůst) těchto plemen. Zatímco v hnědých leghornkách jediným typem neplasie, ve kterém byla onkogenní aktivita EHR zvýšená oproti MAV-B, byla takzvaná osteopetroza, zbytnění kostí. U bílých leghornek došlo naopak ke snížení incidence tohoto onemocnění u jedinců infikovaných virem EHR, stejně jako frekvence nádorů ledvin. Naproti tomu došlo ke zvýšené incidenci jaterních nádorů. Rozdílnou odpověď outbredů (hnědé leghornky) a inbredů

(bílé legnhorky) nelze bez bližšího zkoumání dobře vysvětlit. Nabízí se však možnost statistické chyby kvůli velikosti souborů anebo rozdílné genetické pozadí, které k indukci neoplázií ve velké míře přispívá. Na statistickou chybu poukazuje i fakt, že výsledky z dalšího pokusu, porovnání indukce osteopetrózy kmeny MAV-B, EHR a MAV-B(O), ukazuje na zvýšenou četnost tohoto onemocnění u obou plemen. MAV-B(O) je izolát získaný plakovou purifikací charakteristický vysokou schopností indukovat osteopetrózu (Smith and Morgan, 1984). Ta je známá i u savců, kde bylo prokázáno, že je způsobená poruchou aktivity kost-odbourávajících osteoklastů (Coudert et al., 2014). Naopak u kuřat je charakterizováno zvýšenou proliferací osteoblastů a má tak charakter skutečné neoplasie (Schmidt and Smith, 1982). O vysvětlení mechanismu vzniku ptačí osteopetrózy se v podstatě neúspěšně pokoušela už řada skupin (pro přehled viz Foster et al., 1994). Jedna z přijatelných hypotéz vychází z faktu, že osteopetrózu efektivně vyvolávají jen podskupiny B a E, které obě používají receptor patřící do rodiny TRAIL receptorů. O těchto receptorech je známo, že jejich aktivace za jistých okolností nespouští buněčnou smrt, ale aktivací NF- $\kappa$ B naopak podporuje buněčnou proliferaci (Secchiero et al., 2003, 2004). Nelze tak vyloučit, že zatímco ve většině buněk interakce glykoproteinu s receptorem přispívá k cytopatickému efektu (Budd, 2002), v osteoblastech má naopak stimulační efekt. V případě kmene MAV-B(O) průběh onemocnění ale ukazuje na akutně transformující mechanismus infekce.

Protože nešlo o hlavní cíl této práce, omezili jsme se při analýze osteopetrózy na ověření, že náš model má stejné charakteristické rysy jako dosud popsané modely ptačí osteopetrózy: polyklonální charakter nádoru a velmi vysoký obsah neintegrováných provirů. Klonalita osteopetrotických vzorků byla sledována pomocí iPCR navrženého tak, aby se specificky amplifikovaly spojení provirus-hostitelský genom. Nebyly detekovány žádné klonálně umístěné proviry, pouze fragment totožný ve všech vzorcích osteopetrózy a představující spojení 5'LTR s 3'LTR v neintegrováných cirkulárních provirech, což ukazovalo na vysoký počet neintegrováných provirů (cirkulární formy představují jen ca 10% všech neintegrováných provirů, Munir et al., 2013). Osteopetróza vyvolaná virem EHR tak má stejné rysy jako osteopetróza vyvolaná jinými ptačími retroviry

## Shrnutí

Naše výsledky naznačují, že bodová mutace L154S si zachovává svoji funkci i v novém kontextu glykoproteinu MAV-B a vykazuje podobné vlastnosti. Možný mechanismus obcházení retrovirové receptorové interference a rozšířeného hostitelského rozsahu se dá vysvětlit předčasnou aktivací obalového glykoproteinu, která je jinak přísně regulována, snížením potřebné aktivační energie potřebné k tomuto konformačnímu přechodu. V případě divokého kmene musí dojít k navázání povrchové SU jednotky s příslušným receptorem, aby došlo přestavbě transmembránové TM podjednotky vedoucí až k obnažení fúzního peptidu. V tomto stádiu je virus citlivý na pH, protože TM obsahuje dvě k sobě navzájem komplementární oblasti, které se k sobě po protonaci přiblíží a tím přiblíží i fúzní peptid zanořený do hostitelské membrány a TM podjednotku zakotvenou ve virové membráně, čímž dojde k fúzi membrán. V případě předčasně aktivovaného glykoproteinu však nejspíš dochází s nízkou frekvencí k samovolnému obnažení fúzního peptidu bez přítomnosti příslušného receptoru. Náš model tak předpokládá vznik subpopulace s předčasně aktivovaným glykoproteinem, která vede k superinfekci a tím k patologii tím spojené. Tato subpopulace je citlivá na nízké pH, stejně jako na zvýšenou teplotu, která navíc vede k rychlé neutralizaci viru.

Patogeneze viru MAV-EHR se projevuje nízkou hmotností, malým vzrůstem a nezdravým vzhledem kuřat. Histologickým vyšetřením jsme odhalili destrukci imunitního systému v podobě atrofie thymu a fabricovy burzy. Se zvýšenou incidencí se však objevuje i onemocnění kostí, osteopetróza. To je u ptačích druhů charakteristická hyperproliferační osteoblastů, buněk tvořících hmotu kosti. Literatura popisuje jeho vznik vlivem retroviru jako reakce na velké množství reverzně transkribovaných genomů, které se v buňkách akumulují nejspíš z nejrůznějších důvodů, ať už díky snížené receptorové interference nebo masivní dávce virů v prvním kole infekce. Obecně se však jedná o polyklonně indukovanou neoplázi. Toto tvrzení jsme potvrdili, jak pro virus MAV-B(O), tak pro virus MAV-EHR.

## Závěr

Mechanika případné destabilizace glykoproteinu ještě není plně objasněna. Bylo ale objeveno množství mutací zaměňující hydrofobní aminokyseliny za jiné. Ptačí sarkoma leukózní viry obsahují hr1, která je mezi jednotlivými podskupinami vysoce variabilní, ale i přesto obsahuje několik konzervovaných míst. Jedno z těchto míst je například mutace leucinu za serin v mutantním kmenu EHR. Právě tato jediná bodová mutace nejspíš vede k destabilizaci glykoproteinu a rozšíření hostitelské specifity. Otázkou, kterou bychom rádi v budoucnu prozkoumali je dopad cílené mutagenese na další podskupiny ptačích retrovirů a další konzervované oblasti glykoproteinu. Dále bychom se chtěli zabývat otázkou původu zvýšené patogenicity kmene EHR a MAV-B(O), hledat nové interakční partnery mutovaného glykoproteinu a „limity“ rozšířeného hostitelského rozsahu.

## Použitá literatura

Adkins, H.B., Brojatsch, J., Naughton, J., Rolls, M.M., Pesola, J.M., and Young, J.A.T. (1997). Identification of a cellular receptor for subgroup E avian leukosis virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11617–11622.

Adkins, H.B., Brojatsch, J., and Young, J.A.T. (2000). Identification and Characterization of a Shared TNFR-Related Receptor for Subgroup B, D, and E Avian Leukosis Viruses Reveal Cysteine Residues Required Specifically for Subgroup E Viral Entry. *J Virol* 74, 3572–3578.

Adkins, H.B., Blacklow, S.C., and Young, J.A.T. (2001). Two Functionally Distinct Forms of a Retroviral Receptor Explain the Nonreciprocal Receptor Interference among Subgroups B, D, and E Avian Leukosis Viruses. *J Virol* 75, 3520–3526.

Amberg, S.M., Netter, R.C., Simmons, G., and Bates, P. (2006). Expanded Tropism and Altered Activation of a Retroviral Glycoprotein Resistant to an Entry Inhibitor Peptide. *J Virol* 80, 353–359.

Anderson, M.M., Lauring, A.S., Burns, C.C., and Overbaugh, J. (2000). Identification of a Cellular Cofactor Required for Infection by Feline Leukemia Virus. *Science* 287, 1828–1830.

Arnett, H.A., and Viney, J.L. (2014). Immune modulation by butyrophilins. *Nature Reviews Immunology* 14, 559–569.

Aurigemma, R.E., Torgersen, J.L., and Smith, R.E. (1991). Sequences from myeloblastosis-associated virus MAV-2(O) and UR2AV involved in the formation of plaques and the induction of osteopetrosis, anemia, and ataxia. *J. Virol.* 65, 23–30.

Babel, A.R., Bruce, J., and Young, J.A.T. (2007). The hr1 and Fusion Peptide Regions of the Subgroup B Avian Sarcoma and Leukosis Virus Envelope Glycoprotein Influence Low pH-Dependent Membrane Fusion. *PLoS ONE* 2, e171.

Backovic, M., Leser, G.P., Lamb, R.A., Longnecker, R., and Jardetzky, T.S. (2007). Characterization of EBV gB indicates properties of both class I and class II viral fusion proteins. *Virology* 368, 102–113.

Bahrami, S., Pagh, K., Ejegod, D., Duch, M., Tolstrup, M., and Pedersen, F.S. (2012). Construction of a Gammaretrovirus with a Novel Tropism and Wild-Type Replication Kinetics Capable of Using Human APJ as Entry Receptor. *J. Virol.* 86, 10621–10627.

Barsov, E.V., Payne, W.S., and Hughes, S.H. (2001). Adaptation of Chimeric Retroviruses In Vitro and In Vivo: Isolation of Avian Retroviral Vectors with Extended Host Range. *J Virol* 75, 4973–4983.

Bates, P., Young, J.A.T., and Varmus, H.E. (1993). A receptor for subgroup A Rous sarcoma virus is related to the low density lipoprotein receptor. *Cell* 74, 1043–1059.

Batra, S.K., Castelino-Prabhu, S., Wikstrand, C.J., Zhu, X., Humphrey, P.A., Friedmann, H.S., and Bigner, D.D. (1995). Epidermal growth factor ligand-independent, unregulated, cell-transforming potential of a naturally occurring human mutant EGFRvIII gene. *Cell Growth Differ* 6, 1251–1259.

Benson, S.J., Ruis, B.L., Fadly, A.M., and Conklin, K.F. (1998). The Unique Envelope Gene of the Subgroup J Avian Leukosis Virus Derives from ev/J Proviruses, a Novel Family of Avian Endogenous Viruses. *J. Virol.* 72, 10157–10164.

Boerger, A.L., Snitkovsky, S., and Young, J.A.T. (1999). Retroviral vectors preloaded with a viral receptor-ligand bridge protein are targeted to specific cell types. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9867–9872.

Bova-Hill, C., Olsen, J.C., and Swanstrom, R. (1991). Genetic analysis of the Rous sarcoma virus subgroup D env gene: mammal tropism correlates with temperature sensitivity of gp85. *J Virol* 65, 2073–2080.

Brojatsch, J., Naughton, J., Rolls, M.M., Zingler, K., and Young, J.A.T. (1996). CAR1, a TNFR-Related Protein, Is a Cellular Receptor for Cytopathic Avian Leukosis-Sarcoma Viruses and Mediates Apoptosis. *Cell* 87, 845–855.

Brown, D.W., and Robinson, H.L. (1988). Influence of env and long terminal repeat sequences on the tissue tropism of avian leukosis viruses. *J Virol* 62, 4828–4831.

Budd, R.C. (2002). Death receptors couple to both cell proliferation and apoptosis. *Journal of Clinical Investigation* 109, 437–442.

Capobianchi, M.R., Fais, S., Castilletti, C., Gentile, M., Ameglio, F., and Dianzani, F. (1994). A Simple and Reliable Method to Detect Cell Membrane Proteins on Infectious Human Immunodeficiency Virus Type 1 Particles. *J Infect Dis.* 169, 886–889.

Caporale, M., Cousens, C., Centorame, P., Pinoni, C., Heras, M.D. las, and Palmarini, M. (2006). Expression of the Jaagsiekte Sheep Retrovirus Envelope Glycoprotein Is Sufficient To Induce Lung Tumors in Sheep. *J Virol* 80, 8030–8037.

Colman, P.M., and Lawrence, M.C. (2003). The structural biology of type I viral membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 309–319.

Cosset, F.L., Morling, F.J., Takeuchi, Y., Weiss, R.A., Collins, M.K., and Russell, S.J. (1995). Retroviral retargeting by envelopes expressing an N-terminal binding domain. *J Virol* 69, 6314–6322.

Coudert, A.E., Del Fattore, A., Baulard, C., Olasso, R., Schiltz, C., Collet, C., Teti, A., and De Vernejoul, M.-C. (2014). Differentially expressed genes in autosomal dominant osteopetrosis type II osteoclasts reveal known and novel pathways for osteoclast biology. *Laboratory Investigation* 94, 275–285.

- Damico, R., and Bates, P. (2000). Soluble Receptor-Induced Retroviral Infection of Receptor-Deficient Cells. *J Virol* 74, 6469–6475.
- Damico, R.L., Crane, J., and Bates, P. (1998). Receptor-triggered membrane association of a model retroviral glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2580–2585.
- Davis, H.E., Morgan, J.R., and Yarmush, M.L. (2002). Polybrene increases retrovirus gene transfer efficiency by enhancing receptor-independent virus adsorption on target cell membranes. *Biophys Chem* 97, 159–172.
- Diaz-Griffero, F., Hoschander, S.A., and Brojatsch, J. (2003). Bystander Killing during Avian Leukosis Virus Subgroup B Infection Requires TVBS3 Signaling. *J Virol* 77, 12552–12561.
- Dorner, A.J., and Coffin, J.M. (1986). Determinants for receptor interaction and cell killing on the avian retrovirus glycoprotein gp85. *Cell* 45, 365–374.
- Dorner, A.J., Stoye, J.P., and Coffin, J.M. (1985). Molecular basis of host range variation in avian retroviruses. *J Virol* 53, 32–39.
- Dvořáková, M., Karafiát, V., Pajer, P., Kluzáková, E., Jarkovská, K., Peková, S., Krutílková, L., and Dvořák, M. (2013). DNA released by leukemic cells contributes to the disruption of the bone marrow microenvironment. *Oncogene* 32, 5201–5209.
- Earp, L.J., Delos, S.E., Netter, R.C., Bates, P., and White, J.M. (2003). The Avian Retrovirus Avian Sarcoma/Leukosis Virus Subtype A Reaches the Lipid Mixing Stage of Fusion at Neutral pH. *J Virol* 77, 3058–3066.
- Einfeld, D., and Hunter, E. (1988). Oligomeric structure of a prototype retrovirus glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 8688–8692.
- Elleder, D., Plachý, J., Hejnar, J., Geryk, J., and Svoboda, J. (2004a). Close linkage of genes encoding receptors for subgroups A and C of avian sarcoma/leukosis virus on chicken chromosome 28. *Anim Genet* 35, 176–181.
- Elleder, D., Melder, D.C., Trejbalova, K., Svoboda, J., and Federspiel, M.J. (2004b). Two Different Molecular Defects in the Tva Receptor Gene Explain the Resistance of Two tvar Lines of Chickens to Infection by Subgroup A Avian Sarcoma and Leukosis Viruses. *J Virol* 78, 13489–13500.
- Elleder, D., Stepanets, V., Melder, D.C., Šenigl, F., Geryk, J., Pajer, P., Plachý, J., Hejnar, J., Svoboda, J., and Federspiel, M.J. (2005). The Receptor for the Subgroup C Avian Sarcoma and Leukosis Viruses, Tvc, Is Related to Mammalian Butyrophilins, Members of the Immunoglobulin Superfamily. *J Virol* 79, 10408–10419.
- England, J.M., Bolognesi, D.P., Dietzschold, B., and Halpern, M.S. (1977). Evidence That a Precursor Glycoprotein Is Cleaved to Yield the Major Glycoprotein of Avian Tumor Virus. *J Virol* 21, 810–814.

- Fisher, G.H., Orsulic, S., Holland, E., Hively, W.P., Li, Y., Lewis, B.C., Williams, B.O., and Varmus, H.E. (1999). Development of a flexible and specific gene delivery system for production of murine tumor models. *Oncogene* 18, 5253–5260.
- Forestell, S.P., Dando, J.S., Böhnlein, E., and Rigg, R.J. (1996). Improved detection of replication-competent retrovirus. *J Virol Methods* 60, 171–178.
- Foster, R.G., Lian, J.B., Stein, G., and Robinson, H.L. (1994). Replication of an Osteopetrosis-Inducing Avian Leukosis Virus in Fibroblasts, Osteoblasts, and Osteopetrotic Bone. *Virology* 205, 179–187.
- Geijtenbeek, T.B., Torensma, R., Van Vliet, S.J., Van Duijnhoven, G.C., Adema, G.J., Van Kooyk, Y., and Figdor, C.G. (2000). Identification of DC-SIGN, a Novel Dendritic Cell-Specific ICAM-3 Receptor that Supports Primary Immune Responses. *Cell* 100, 575–585.
- Gilbert, J.M., Hernandez, L.D., Balliet, J.W., Bates, P., and White, J.M. (1995). Receptor-induced conformational changes in the subgroup A avian leukosis and sarcoma virus envelope glycoprotein. *J Virol* 69, 7410–7415.
- Gray, E.R., Illingworth, C.J., Coffin, J.M., and Stoye, J.P. (2011). Binding of more than one Tva800 molecule is required for ASLV-A entry. *Retrovirology* 8, 96–107.
- Guibinga, G.H., Miyanohara, A., Esko, J.D., and Friedmann, T. (2002). Cell Surface Heparan Sulfate Is a Receptor for Attachment of Envelope Protein-Free Retrovirus-like Particles and VSV-G Pseudotyped MLV-Derived Retrovirus Vectors to Target Cells. *Mol Ther* 5, 538–546.
- Guo, J., Wang, W., Yu, D., and Wu, Y. (2011). Spinoculation Triggers Dynamic Actin and Cofilin Activity That Facilitates HIV-1 Infection of Transformed and Resting CD4 T Cells. *J Virol* 85, 9824–9833.
- Hayward, W.S., Neel, B.G., and Astrin, S.M. (1981). Activation of a cellular onc gene by promoter insertion in ALV-induced lymphoid leukemia. 475–480.
- Heldwein, E.E., Lou, H., Bender, F.C., Cohen, G.H., Eisenberg, R.J., and Harrison, S.C. (2006). Crystal Structure of Glycoprotein B from Herpes Simplex Virus 1. *Science* 313, 217–220.
- Holmen, S.L., and Federspiel, M.J. (2000). Selection of a Subgroup A Avian Leukosis Virus [ALV(A)] Envelope Resistant to Soluble ALV(A) Surface Glycoprotein. *Virology* 273, 364–373.
- Chai, N., and Bates, P. (2006). Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger type 1 is a receptor for pathogenic subgroup J avian leukosis virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 5531–5536.



Chu, T.H., and Dornburg, R. (1995). Retroviral vector particles displaying the antigen-binding site of an antibody enable cell-type-specific gene transfer. *J Virol* 69, 2659–2663.

Jang, J., Lee, J., Kim, S.-T., Lee, K.-Y., Cho, J.Y., Kweon, D.-H., Kwon, S.-T., Koh, Y.H., Kim, S., and Yoon, K. (2012). Polycation-mediated enhancement of retroviral transduction efficiency depends on target cell types and pseudotyped Env proteins: Implication for gene transfer into neural stem cells. *Neurochem Int* 60, 846–851.

Jha, N.K., Latinovic, O., Martin, E., Novitskiy, G., Marin, M., Miyauchi, K., Naughton, J., Young, J.A.T., and Melikyan, G.B. (2011). Imaging Single Retrovirus Entry through Alternative Receptor Isoforms and Intermediates of Virus-Endosome Fusion. *PLoS Pathog* 7, e1001260.

Jinno-Oue, A., Oue, M., and Ruscetti, S.K. (2001). A Unique Heparin-Binding Domain in the Envelope Protein of the Neuropathogenic PVC-211 Murine Leukemia Virus May Contribute to Its Brain Capillary Endothelial Cell Tropism. *J. Virol.* 75, 12439–12445.

Joliot, V., Boroughs, K., Lasserre, F., Crochet, J., Dambine, G., Smith, R.E., and Perbal, B. (1993). Pathogenic Potential of Myeloblastosis-Associated Virus: Implication of ENV Proteins for Osteopetrosis Induction. *Virology* 195, 812–819.

Jurgens, E.M., Mathieu, C., Palermo, L.M., Hardie, D., Horvat, B., Moscona, A., and Porotto, M. (2015). Measles Fusion Machinery Is Dysregulated in Neuropathogenic Variants. *mBio* 6, e02528–14.

Katane, M., Takao, E., and Amanuma, H. (2002). Factors affecting the direct targeting of murine leukemia virus vectors containing peptide ligands in the envelope protein. *EMBO Rep* 3, 899–904.

Klucking, S., Adkins, H.B., and Young, J.A.T. (2002). Resistance to Infection by Subgroups B, D, and E Avian Sarcoma and Leukosis Viruses Is Explained by a Premature Stop Codon within a Resistance Allele of the tvb Receptor Gene. *J. Virol.* 76, 7918–7921.

Klucking, S., Collins, A.S., and Young, J.A.T. (2005). Avian Sarcoma and Leukosis Virus Cytopathic Effect in the Absence of TVB Death Domain Signaling. *J Virol* 79, 8243–8248.

Knauss, D.J., and Young, J.A.T. (2002). A Fifteen-Amino-Acid TVB Peptide Serves as a Minimal Soluble Receptor for Subgroup B Avian Leukosis and Sarcoma Viruses. *J Virol* 76, 5404–5410.

Kosla, J., Dvorakova, M., Dvorak, M., and Cermak, V. (2013). Effective myofibroblast dedifferentiation by concomitant inhibition of TGF- $\beta$  signaling and perturbation of MAPK signaling. *European Journal of Cell Biology* 92, 363–373.

- Lavillette, D., and Kabat, D. (2004). Porcine Endogenous Retroviruses Infect Cells Lacking Cognate Receptors by an Alternative Pathway: Implications for Retrovirus Evolution and Xenotransplantation. *J Virol* 78, 8868–8877.
- Leamson, R.N., and Halpern, M.S. (1976). Subunit structure of the glycoprotein complex of avian tumor virus. *J Virol* 18, 956–968.
- Liu, M., and Eiden, M.V. (2011). The receptors for gibbon ape leukemia virus and amphotropic murine leukemia virus are not downregulated in productively infected cells. *Retrovirology* 8, 53.
- Logg, C.R., Baranick, B.T., Lemp, N.A., and Kasahara, N. (2007). Adaptive Evolution of a Tagged Chimeric Gammaretrovirus: Identification of Novel cis-Acting Elements that Modulate Splicing. *J Mol Biol* 369, 1214–1229.
- Lounková, A., Dráberová, E., Šenigl, F., Trejbalová, K., Geryk, J., Hejnar, J., and Svoboda, J. (2014). Molecular Events Accompanying Rous Sarcoma Virus Rescue from Rodent Cells and the Role of Viral Gene Complementation. *J. Virol.* 88, 3505–3515.
- Markosyan, R.M., Bates, P., Cohen, F.S., and Melikyan, G.B. (2004). A Study of Low pH-Induced Refolding of Env of Avian Sarcoma and Leukosis Virus into a Six-Helix Bundle. *Biophys J* 87, 3291–3298.
- Matsuyama, S., Delos, S.E., and White, J.M. (2004). Sequential Roles of Receptor Binding and Low pH in Forming Prehairpin and Hairpin Conformations of a Retroviral Envelope Glycoprotein. *J Virol* 78, 8201–8209.
- Melder, D.C., Pankratz, V.S., and Federspiel, M.J. (2003). Evolutionary Pressure of a Receptor Competitor Selects Different Subgroup A Avian Leukosis Virus Escape Variants with Altered Receptor Interactions. *J Virol* 77, 10504–10514.
- Melder, D.C., Pike, G.M., VanBrocklin, M.W., and Federspiel, M.J. (2015). Model of the TVA Receptor Determinants Required for Efficient Infection by Subgroup A Avian Sarcoma and Leukosis Viruses. *J. Virol.* 89, 2136–2148.
- Melikyan, G.B., Barnard, R.J.O., Markosyan, R.M., Young, J. a. T., and Cohen, F.S. (2004). Low pH Is Required for Avian Sarcoma and Leukosis Virus Env-Induced Hemifusion and Fusion Pore Formation but Not for Pore Growth. *J Virol* 78, 3753–3762.
- Melikyan, G.B., Barnard, R.J.O., Abrahamyan, L.G., Mothes, W., and Young, J.A.T. (2005). Imaging individual retroviral fusion events: From hemifusion to pore formation and growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 8728–8733.
- Miller, A.D. (1996). Cell-surface receptors for retroviruses and implications for gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11407–11413.

- Miller, A.D., and Chen, F. (1996). Retrovirus packaging cells based on 10A1 murine leukemia virus for production of vectors that use multiple receptors for cell entry. *J Virol* 70, 5564–5571.
- Miller, D.G., and 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, 78–84.
- Miyakawa, K., Fujita, R., Katane, M., Kubo, Y., and Amanuma, H. (2008). Effects of the ligand sequence modifications on the retargeted transduction by the retroviral vector having a ligand-chimeric Env protein. *J Gen Virol* 89, 3137–3143.
- Moelling, K., and Hayami, M. (1977). Analysis of precursors to the envelope glycoproteins of avian RNA tumor viruses in chicken and quail cells. *J Virol* 22, 598–607.
- Moller-Tank, S., and Maury, W. (2014). Phosphatidylserine receptors: Enhancers of enveloped virus entry and infection. *Virology* 468-470, 565–580.
- Moore, J.P., McKeating, J.A., Weiss, R.A., and Sattentau, Q.J. (1990). Dissociation of gp120 from HIV-1 virions induced by soluble CD4. *Science* 250, 1139–1142.
- Moscatello, D.K., Holgado-Madruga, M., Godwin, A.K., Ramirez, G., Gunn, G., Zoltick, P.W., Biegel, J.A., Hayes, R.L., and Wong, A.J. (1995). Frequent Expression of a Mutant Epidermal Growth Factor Receptor in Multiple Human Tumors. *Cancer Res* 55, 5536–5539.
- Mothes, W., Boerger, A.L., Narayan, S., Cunningham, J.M., and Young, J.A.T. (2000). Retroviral Entry Mediated by Receptor Priming and Low pH Triggering of an Envelope Glycoprotein. *Cell* 103, 679–689.
- Munir, S., Thierry, S., Subra, F., Deprez, E., and Delelis, O. (2013). Quantitative analysis of the time-course of viral DNA forms during the HIV-1 life cycle. *Retrovirology* 10, 87.
- Narayan, S., Barnard, R.J.O., and Young, J.A.T. (2003). Two Retroviral Entry Pathways Distinguished by Lipid Raft Association of the Viral Receptor and Differences in Viral Infectivity. *J Virol* 77, 1977–1983.
- Neel, B.G., Hayward, W.S., Robinson, H.L., Fang, J., and Astrin, S.M. (1981). Avian leukosis virus-induced tumors have common proviral integration sites and synthesize discrete new RNAs: oncogenesis by promoter insertion. *Cell* 23, 323–334.
- Netter, R.C., Amberg, S.M., Balliet, J.W., Biscone, M.J., Vermeulen, A., Earp, L.J., White, J.M., and Bates, P. (2004). Heptad Repeat 2-Based Peptides Inhibit Avian Sarcoma and Leukosis Virus Subgroup A Infection and Identify a Fusion Intermediate. *J Virol* 78, 13430–13439.

- O'Doherty, U., Swiggard, W.J., and Malim, M.H. (2000). Human Immunodeficiency Virus Type 1 Spinoculation Enhances Infection through Virus Binding. *J Virol* 74, 10074–10080.
- Padilla-Parra, S., Matos, P.M., Kondo, N., Marin, M., Santos, N.C., and Melikyan, G.B. (2012). Quantitative imaging of endosome acidification and single retrovirus fusion with distinct pools of early endosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 17627–17632.
- Pečenka, V., Dvořák, M., Karafiát, V., Sloncová, E., Hložánek, I., Trávníček, M., and Říman, J. (1988). Avian nephroblastomas induced by a retrovirus (MAV-2) lacking oncogene. II. Search for common sites of proviral integration in tumour DNA. *Folia Biol (Praha)* 3, 147–169.
- Pizzato, M., Marlow, S.A., Blair, E.D., and Takeuchi, Y. (1999). Initial Binding of Murine Leukemia Virus Particles to Cells Does Not Require Specific Env-Receptor Interaction. *J Virol* 73, 8599–8611.
- Pizzato, M., Blair, E.D., Fling, M.E., Kopf, J., Tomassetti, A., Weiss, R.A., and Takeuchi, Y. (2001). Evidence for nonspecific adsorption of targeted retrovirus vector particles to cells. *Gene Ther* 8, 1088–1096.
- Pruková, D., Vernerová, Z., Pilcík, T., Stepanets, V., Indrová, M., Geryk, J., Plachý, J., Hejnar, J., and Svoboda, J. (2007). Differences in pathogenicity among strains of the same or different avian leukosis virus subgroups. *Avian Pathology* 36, 15–27.
- Rainey, G.J.A., and Coffin, J.M. (2005). Evolution of Broad Host Range in Retroviruses Leads to Cell Death Mediated by Highly Cytopathic Variants. *J Virol* 80, 562–570.
- Rainey, G.J.A., Natanson, A., Maxfield, L.F., and Coffin, J.M. (2003). Mechanisms of Avian Retroviral Host Range Extension. *J Virol* 77, 6709–6719.
- Reinišová, M., Šenigl, F., Yin, X., Plachý, J., Geryk, J., Elleder, D., Svoboda, J., Federspiel, M.J., and Hejnar, J. (2008). A Single-Amino-Acid Substitution in the Tvbs1 Receptor Results in Decreased Susceptibility to Infection by Avian Sarcoma and Leukosis Virus Subgroups B and D and Resistance to Infection by Subgroup E In Vitro and In Vivo. *J Virol* 82, 2097–2105.
- Roan, N.R., Müller, J.A., Liu, H., Chu, S., Arnold, F., Stürzel, C.M., Walther, P., Dong, M., Witkowska, H.E., Kirchhoff, F., et al. (2011). Peptides Released by Physiological Cleavage of Semen Coagulum Proteins Form Amyloids that Enhance HIV Infection. *Cell Host Microbe* 10, 541–550.
- Robinson, H.L., Astrin, S.M., Senior, A.M., and Salazar, F.H. (1981). Host Susceptibility to endogenous viruses: defective, glycoprotein-expressing proviruses interfere with infections. *J Virol* 40, 745–751.
- Rohrschneider, L.R. (1980). Adhesion plaques of Rous sarcoma virus-transformed cells contain the src gene product. *PNAS* 77, 3514–3518.

- Roche, S., Bressanelli, S., Rey, F.A., and Gaudin, Y. (2006). Crystal Structure of the Low-pH Form of the Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein G. *Science* 313, 187–191.
- Rong, L., Edinger, A., and Bates, P. (1997). Role of basic residues in the subgroup-determining region of the subgroup A avian sarcoma and leukosis virus envelope in receptor binding and infection. *J Virol* 71, 3458–3465.
- Rous, P. (1910). A Transmissible Avian Neoplasm. (sarcoma of the Common Fowl.). *J Exp Med* 12, 696–705.
- Rous, P. (1911). A Sarcoma of the Fowl Transmissible by an Agent Separable from the Tumor Cells. *J Exp Med* 13, 397–411.
- Sacco, M.A., Flannery, D.M.J., Howes, K., and Venugopal, K. (2000). Avian Endogenous Retrovirus EAV-HP Shares Regions of Identity with Avian Leukosis Virus Subgroup J and the Avian Retrotransposon ART-CH. *J. Virol.* 74, 1296–1306.
- Sattentau, Q.J., and Moore, J.P. (1991). Conformational changes induced in the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein by soluble CD4 binding. *J Exp Med* 174, 407–415.
- Secchiero, P., Milani, D., Gonelli, A., Melloni, E., Campioni, D., Gibellini, D., Capitani, S., and Zauli, G. (2003). Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and TNF- $\alpha$  promote the NF- $\kappa$ B-dependent maturation of normal and leukemic myeloid cells. *J Leukoc Biol* 74, 223–232.
- Secchiero, P., Melloni, E., Heikinheimo, M., Mannisto, S., Pietro, R.D., Iacone, A., and Zauli, G. (2004). TRAIL regulates normal erythroid maturation through an ERK-dependent pathway. *Blood* 103, 517–522.
- Sherer, N.M., Jin, J., and Mothes, W. (2010). Directional Spread of Surface-Associated Retroviruses Regulated by Differential Virus-Cell Interactions. *J Virol* 84, 3248–3258.
- Schmidt, E.V., and Smith, R.E. (1982). Animal model of human disease. Skeletal hyperostoses: viral induction of avian osteopetrosis. *The American Journal of Pathology* 106, 297.
- Smith, R., and Morgan, J. (1984). Pathogenesis of osteopetrosis induced by rapid and slow onset plaque isolates of an avian osteopetrosis virus. *Metab Bone Dis Relat Res* 5, 289–298.
- Smith, E.J., Brojatsch, J., Naughton, J., and Young, J.A.T. (1998). The CAR1 Gene Encoding a Cellular Receptor Specific for Subgroup B and D Avian Leukosis Viruses Maps to the Chickentvb Locus. *J Virol* 72, 3501–3503.
- Snitkovsky, S., and Young, J.A.T. (1998). Cell-specific viral targeting mediated by a soluble retroviral receptor-ligand fusion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7063–7068.

Snitkovsky, S., and Young, J.A.T. (2002). Targeting Retroviral Vector Infection to Cells That Express Heregulin Receptors Using a TVA–Heregulin Bridge Protein. *Virology* 292, 150–155.

Snitkovsky, S., Niederman, T.M.J., Carter, B.S., Mulligan, R.C., and Young, J.A.T. (2000). A TVA–Single-Chain Antibody Fusion Protein Mediates Specific Targeting of a Subgroup A Avian Leukosis Virus Vector to Cells Expressing a Tumor-Specific Form of Epidermal Growth Factor Receptor. *J Virol* 74, 9540–9545.

Snitkovsky, S., Niederman, T.M.J., Mulligan, R.C., and Young, J.A.T. (2001). Targeting Avian Leukosis Virus Subgroup A Vectors by Using a TVA-VEGF Bridge Protein. *J Virol* 75, 1571–1575.

Somia, N.V., Zoppé, M., and Verma, I.M. (1995). Generation of targeted retroviral vectors by using single-chain variable fragment: an approach to in vivo gene delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7570–7574.

Starostová, M., Čermák, V., Dvořáková, M., Karafiát, V., Kosla, J., and Dvořák, M. (2014). The oncoprotein v-Myb activates transcription of Gremlin 2 during in vitro differentiation of the chicken neural crest to melanoblasts. *Gene* 540, 122–129.

Svoboda, J., and Dourmashkin, R. (1969). Rescue of Rous Sarcoma Virus from Virogenic Mammalian Cells Associated with Chicken Cells and Treated with Sendai Virus. *J Gen Virol* 4, 523–529.

Svoboda, J., Chyle, P., Simkovic, D., and Hilgert, I. (1963). Demonstration of the absence of infectious Rous virus in rat tumour XC, whose structurally intact cells produce Rous sarcoma when transferred to chicks. *Folia Biol (Praha)* 9, 77–81.

Taplitz, R.A., and Coffin, J.M. (1997). Selection of an avian retrovirus mutant with extended receptor usage. *J Virol* 71, 7814–7819.

Temin, H.M. (1976). The DNA provirus hypothesis. 1075–1080.

Toyoshima, K., and Vogt, P.K. (1969). Enhancement and inhibition of avian sarcoma viruses by polycations and polyanions. *Virology* 38, 414–426.

Tsichlis, P.N., Conklin, K.F., and Coffin, J.M. (1980). Mutant and recombinant avian retroviruses with extended host range. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 536–540.

Van Valen, L. (1973). A new evolutionary law. *Evolutionary Theory* 1973, 1 – 30.

Valsesia-Wittmann, S., Drynda, A., Deléage, G., Aumailley, M., Heard, J.M., Danos, O., Verdier, G., and Cosset, F.L. (1994). Modifications in the binding domain of avian retrovirus envelope protein to redirect the host range of retroviral vectors. *J Virol* 68, 4609–4619.

Vaney, M.-C., and Rey, F.A. (2011). Class II enveloped viruses. *Cell Microbiol* 13, 1451–1459.

Vogt, P.K., and Ishizaki, R. (1966). Patterns of viral interference in the avian leukosis and sarcoma complex. *Virology* 30, 368–374.

Weiss, R.A. (1993). Cellular Receptors and Viral Glycoproteins Involved in Retrovirus Entry. In *The Retroviridae*, (New York, USA: Plenum Press), pp. 1–108.

Weiss, R.A., and Vogt, P.K. (2011). 100 years of Rous sarcoma virus. *J Exp Med* 208, 2351–2355.

Weller, S.K., Joy, A.E., and Temin, H.M. (1980). Correlation between cell killing and massive second-round superinfection by members of some subgroups of avian leukosis virus. *J Virol* 33, 494–506.

Wong, A.J., Ruppert, J.M., Bigner, S.H., Grzeschik, C.H., Humphrey, P.A., Bigner, D.S., and Vogelstein, B. (1992). Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 2965–2969.

Young, J.A., Bates, P., and Varmus, H.E. (1993). Isolation of a chicken gene that confers susceptibility to infection by subgroup A avian leukosis and sarcoma viruses. *J Virol* 67, 1811–1816.