

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

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Genetika, molekulární biologie a virologie

Virologie



Bc. Petr Daniel

Význam replikačně defektních prasečích endogenních retrovirů při xenotransplantaci
The significance of porcine endogenous retroviruses in xenotransplantation

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: Jiří Hejnar, PhD.

Praha, 2013

Prohlášení:

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

V Praze, 6. 5. 2013

Podpis

„Za svůj dlouhý život jsem pochopil jedno - ve srovnání s objektivní realitou je naše věda dětinská a prostá, ale přece je tím nejlepším co vůbec máme.“

Albert Einstein

Svému školiteli, Jiřímu Hejnarovi, PhD, bych velmi rád poděkoval zato, že mě vřele přijal do svého výzkumného týmu, tj. Oddělení virové a buněčné genetiky, která má bohatou a dlouhou historii. Také bych mu rád poděkoval za jeho ochotu se mnou konzultovat nejen o tématech bezprostředně se týkající retrovirů. V neposlední řadě bych mu chtěl poděkovat také za pomoc při bakalářské a diplomové práci.

Na druhém místě bych velmi rád poděkoval Magdě Matouškové, PhD – nejenom za pomoc při osvojení metod, ale také za dohled, trpělivost a výbornou pomoc při vypracovávání tématu diplomové práce. Chtěl bych poděkovat i ostatním členům laboratoře za cenné rady a připomínky k mé práci, zejména Kateřině Trejbalové, PhD, Filipu Šeniglovi, PhD a Josefu Gerykovi, PhD.

Děkuji i Všem, na které jsem ve své roztržitosti zapomněl.

Práce vznikla za finanční podpory Evropské komise, projektu Xenome 6. rámcového programu.

Abstract

The shortage of human tissues and organs for allotransplantation can be overcome by xenotransplantation. As a source of organs, the miniature pig is convenient. However, the presence of pathogens transmissible to the recipients, especially porcine endogenous retrovirus (PERV), represents a threat for successful xenotransplantation. Infectious PERVs contain three classes of envelope glycoprotein. Two classes, PERV-A and PERV-B are polytropic, they can infect human, pig and mink cells *in vitro*. PERV-C is evolutionary young, ecotropic isolate that can infect pig only.

We previously detected a new full-length, but replication-defective PERV-A isolate dubbed (MAMBA) with high transcriptional activity in Large-White pig from a Czech breed.

To support our results with PERV-MAMBA epigenetic regulation in pig tissues, *in vitro* DNA methylation assay was accomplished. Methylated or non-methylated reporter plasmids containing provirus 5' LTR were transfected into 293T cells and luciferase activity was measured. In both cases, methylated LTR decreased significantly expression of luciferase. Thus, PERV LTR-driven transcription is sensitive to DNA methylation. We also used PERV-A MAMBA provirus to study recombination between two pig endogenous retroviruses. We prepared 293T and BeWo cell clones harboring PERV-A MAMBA and PERV-C 1312 proviruses and used these cells for infection assay. Our data suggest that these viruses are capable of some recombinatory event (pseudotyping, complementation or recombination), because PERV-A *env* mRNA sequences were detected in naive 293T cells.

Key words: porcine endogenous retrovirus, provirus silencing, retrovirus recombination, miniature pig, xenotransplantation, antiviral restriction factors

Abstrakt

Nedostatek lidských tkání a orgánů pro transplantace může být vyřešen xenotransplantací. Jako zdroj orgánů je mimořádně vhodné miniaturní prase. Přítomnost patogenů, které mohou infikovat příjemce, zvláště prasečích endogenních retrovirů (PERV), představuje ovšem riziko úspěšné xenotransplantace. Infekční PERV se rozpadá na tři skupiny podle svých obalových glykoproteinů. PERV-A a PERV-B jsou polytropní viry, které infikují lidské, prasečí a norčí buňky *in vitro*. PERV-C je evolučně mladší ekotropní izolát.

V minulosti jsme popsali nový, replikačně defektní provirus PERV-A MAMBA, který se vysoce exprimoval v tkáních velkého bílého prasete z českého chovu.

V rámci projektu jsem se zabýval epigenetickou regulací transkripce PERV-A MAMBA v prasečích tkáních a orgánech. Abych podpořil získané výsledky, provedl jsem *in vitro* DNA methylační esej se dvěma PERV LTR. Methylované a nemethylované reportérové plazmidy, obsahující 5' LTR provirovou oblast, byly transfekovány do buněk a zároveň byla stanovena aktivita luciferázy sdružené s LTR. V obou případech methylace LTR snížila významně expresi reportérového genu. Transkripce z PERV proviru je tedy citlivá k methylaci. Také jsem použil PERV-A MAMBA ke studiu rekombinace PERV. Připravil jsem 293T a BeWo buňky, které produkovaly virovou RNA. Tyto buňky jsem použil k infekční esejí. Získaná data naznačují, že PERV jsou náchylné k některé z událostí (rekombinace, pseudotypizace, komplementace), jelikož PERV-A *env* mRNA sekvence byla detekována v infikovaných buňkách.

Klíčová slova: prasečí endogenní retrovirus, umlčení proviru, rekombinace retroviru, miniaturní prase, xenotransplantace, hostitelské restriční faktory

Obsah

1 ÚVOD	12
2 CÍLE PRÁCE	15
3 PŘEHLED LITERATURY	17
3.1 METHYLACE DNA.....	18
3.1.1 CpG ostrovy.....	18
3.1.2 Vznik a udržení methylace DNA.....	19
3.1.3 Mechanismy umlčování závislé na methylaci DNA.....	20
3.1.4 Represe transkripce retrovirů.....	21
3.2 REKOMBINACE RETROVIRŮ.....	23
3.2.1 Vynucená volba kopie (<i>forced copy choice</i>).....	23
3.2.2 Přesun vlákna řízený přerušením (<i>pause-driven strand transfer</i>).....	24
3.2.3 Výměna vlákna nezávislá na přerušení (<i>pause-independent strand transfer</i>).....	26
3.3 ENDOGENNÍ RETROVIRY	28
3.3.1 Objev prasečích endogenních retrovirů	29
3.3.2 Infekční studie PERV.....	29
3.3.3 Příbuznost PERV a počet kopií v genomu prasat.....	32
3.3.4 Struktura PERV proviru.....	34
3.3.4.1 LTR PERV.....	34
3.3.4.2 Obalový protein Env PERV.....	35
3.3.5 Receptory PERV.....	37
3.3.6 Rekombinantní izoláty PERV.....	40
3.3.7 Determinanty zvýšené replikační schopnosti PERV-A/C.....	43
3.4 RESTRIKČNÍ FAKTORY PŮSOBÍCÍ PROTI PRASEČÍM ENDOGENNÍM RETROVIRŮM.....	45
3.4.1 Rodina APOBEC3.....	45
3.4.2 Tetherin.....	48
3.4.3 TRIM5 α	48
4 MATERIÁLY A METODY	50
4.1 PRÁCE S BUNĚČNÝMI KULTURAMI	51
4.1.1 Buněčné linie.....	51
4.1.2 Kultivační média.....	52
4.1.3 Kultivace buněk, rozmrazování buněk.....	53
4.1.4 Pasážování buněk.....	53
4.1.5 Lipofekce a selekce buněk.....	53
4.1.6 Infekce buněk.....	56
4.1.7 Měření aktivity luciferázy a β -galaktosidázy.....	57
4.2 PRÁCE S NUKLEOVÝMI KYSELINAMI	58
4.2.1 Vektory.....	58
4.2.2 Izolace chromozomální DNA.....	60
4.2.3 Izolace celkové buněčné RNA.....	61
4.2.4 Štěpení plazmidové DNA.....	62
4.2.5 Izolace fragmentu DNA z agarózového gelu.....	62
4.2.6 Zatupení přesahujícího konce DNA.....	63
4.2.7 Ligace fragmentů.....	63
4.2.8 Transformace bakterií teplotním šokem.....	64
4.2.9 Elektroporace bakterií.....	64

4.2.10 Minipreparace plazmidové DNA	65
4.2.11 Midipreparace plazmidové DNA	65
4.2.12 Polymerázová řetězová reakce (PCR)	66
4.2.13 Reverzně-transkriptázová polymerázová řetězová reakce (RT-PCR)	68
4.2.14 Sekvenace DNA	69
4.2.15 In vitro methylace DNA	70
5 VÝSLEDKY	72
5.1 VLIV METHYLACE PERV LTR NA ÚROVEŇ EXPRESE LUCIFERÁZY	73
5.1.1 Příprava konstruktů pGL3_LTR_MAMBA a pGL3_LTR_60	73
5.1.2 Methylace konstruktů pGL3_LTR_MAMBA a pGL3_LTR_60	75
5.1.3 Stanovení aktivity luciferázy u methylovaných a nemethylovaných LTR	75
5.2 REKOMBINACE PERV	77
5.2.1 Příprava vektorů se sekvencemi PERV-A MAMBA a PERV-C 1312	77
5.2.1.1 Delece promotoru CMV v plazmidu pcDNA4/TO	78
5.2.1.2 Příprava vektoru pcDNA4/TO_dpCMV_PERVA-MAMBA	80
5.2.1.3 Příprava vektoru pNEBR-X1_Hygro_PERVC-1312	84
5.2.2 Ověření replikační kompetence proviru PERV-C 1312	89
5.2.3. Stabilní transfekce prasečích provirů do lidských buněk	92
5.2.4 Infekce buněk 293T rekombinantními viry	98
6 DISKUSE	105
7 SOUHRN	111
8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	113

Seznam použitých zkratek

AID	aktivací-indukovaná cytidin deamináza
APOBEC	apolipoprotein B mRNA-editující katalytický polypeptid
ASV	virus ptačího sarkomu
Aza-C	azacytidin
BaPAR	paviánní receptor PERV-A
CpG	dinukleotidová sekvence cytosin guanin
CTCF	CCCTC vazebný faktor
DNMT	DNA methyltransferáza
Env (<i>env</i>)	prekurzor obalového proteinu (gen pro Env)
Gag (<i>gag</i>)	prekurzor matrixového, kapsidového a nukleokapsidového proteinu (gen pro Gag)
GALV	virus leukémie gibona
GATA	transkripční faktor rozeznávající sekvenci GATA
GFP	zelený fluorescenční protein
HDAC	histon-deacetyláza
HTRC	lidské replikačně kompetentní PERV
HuPAR	lidský receptor PERV-A
HIV	virus lidské imunodeficiency
LTR	dlouhé koncové opakování
m ⁵ C	methylovaný cytosin
MLTF	transkripční faktor pozdního promotoru adenoviru
MBD	methyl-vazebná doména
MLV	virus myší leukémie
MMLV	Moloneyho virus myší leukémie
MPK	buňky ledvin miniaturního prasete
MuPAR	myší receptor PERV-A
NCoR	receptor jaderného korepresoru
Ncp7	nukleokapsidový protein p7
NF-Y	jaderný faktor Y
NIH	národní institut zdraví
PBMC	jednojaderné buňky z periferní krve
PERV	prasečí endogenní retrovirus
PHA	fytohemaglutinin

PMA	forbol-myristát-acetát
Pol (<i>pol</i>)	preprotein retrovirových enzymů (gen pro Pol)
PoPAR	prasečí receptor PERV-A
PRR	prolin bohatá oblast
R	opakování
RatPAR	potkaní receptor PERV-A
RBD	receptor vazebná doména
RT	reverzní transkriptáza
SAMHD1	protein obsahující domény sterilního alfa motivu a HD
SNV	virus nekrózy slinivky
SRA	doména asociovaná se SET a RING prstem
SU	povrchový glykoprotein
TM	transmembránový glykoprotein
TRIM5 α	protein 5 α obsahující tripartitní motiv
TRIM28	protein 28 obsahující tripartitní motiv
TRP1	fosforibozyl-antranilát izomeráza 1
TSA	trichostatin A
Ty	transponovatelné elementy kvasinek
U3, U5	unikátní oblast na 3' konci, unikátní oblast na 5' konci
UHRF1	E3 ubikvitin ligáza
Vif	virový infekční faktor
Vpu	virový protein U
VRA	variabilní oblast A
VRBV	variabilní oblast B
ZAP	antivirový protein zinkového prstu
ZBTB	zinkový prst a doména BTB

1 Úvod

Xenotransplantace, nebo též heterotransplantace, jsou diskutovaným řešením chronického nedostatku lidských orgánů pro alotransplantace. Termín xenotransplantace zavedl v roce 1961 britský patolog Petr Gorer. Xenotransplantace zahrnují jakýkoliv lékařský přístup transplantace, implantace nebo infúze živých zvířecích buněk, tkání a orgánů recipientovi. Xenotransplantace jsou také *ex vivo* kontaktem lidských tělních tekutin, buněk a orgánů se zvířecími buňkami tkáněmi a orgány.

Z imunologického hlediska by byl pro člověka nejvhodnějším dárcem orgánů pavián čakma (*Papio ursinus*). Nicméně z etických a ekonomických důvodů se řadí mezi vyřazené kandidáty. Uvažovaným druhem pro xenotransplantace se tak stalo miniaturní prase (*Sus scrofa*). Zatímco riziko hyperakutní rejekce je překonáváno šlechtěním transgenních prasat, které jsou postupy genového inženýrství deficientní v expresi α -galaktozyl transferázy, riziko přenosu patogenů, kteří nemohou být eliminováni chovem prasat za bezpatogenních podmínek, je otevřenou otázkou.

Významné postavení mají prasečí endogenní retroviry (PERV). Produkce retrovirových partikulí prasečími buněčnými liniemi byla pozorována v 70. letech minulého století, nicméně infekčnost partikulí pro člověka *in vitro* byla prokázána teprve nedávno. Infekční PERV tvoří sekvence podobné gammaretrovirům. Zatímco jiné gammaretroviry (GaLV, KoRV) vyvolávají u svých hostitelů leukémie, PERV nebyl doposud asociován s žádnou chorobou prasat. Pokud by došlo k mezidruhovému přenosu PERV na člověka, existuje riziko vzniku nové nemoci, která by se mezi lidmi přenášela. Riziko přenosu PERV z prasečích xenoštěpů je navíc zvýšeno imunosupresivní léčbou příjemce.

Charakteristickou vlastností PERV je inzerční polymorfismus mezi chovy zvířat, ale i mezi jednotlivými zvířaty v daném chovu. Z tohoto důvodu je obtížné eliminovat PERV z genomu prasete. Také neexistují vhodné modely pro studium infekce PERV. PERV se jen omezeně replikuje na primátech buňkách. Infekce malých hlodavců je bráněna na úrovni vstupu viru do buňky, buď přítomností nevhodného receptoru, nebo jeho nízkou expresí.

Miniaturní prasata produkují rekombinanty PERV-A/C, které se oproti ostatním PERV replikují v lidských buňkách efektivněji. Rekombinanty se skládají z PERV-A části kódující část obalového proteinu včetně receptor vazebné domény, zatímco zbytek sekvence pochází z PERV-C. Není jasné, zda rekombinanty vznikají kokultivací prasečích a lidských buněk, nebo zda jsou trvale integrovány v genomu prasete. Nicméně miniaturní pra-

sata můžeme rozdělit podle hlediska, zda PERV přenáší na lidské buňky (transmiteři), nebo jen na prasečí buňky (netransmiteři), nebo PERV nepřenáší vůbec (null fenotyp).

V naší laboratoři se dlouhodobě zabýváme epigenetickým umlčováním ptačích a savčích retrovirů. Zkušenosti máme i s lidskými endogenními retroviry, konkrétně ER-VW1, který kóduje protein syncytin-1. Naše laboratoř se stala součástí projektu Xenome, financovaného Evropskou Unií. V rámci projektu jsme se zabývali epigenetickou regulací PERV v tkáních prasete pocházející z českého chovu. Epigenetická regulace nebyla doposud studována a mohla by přinést důležité informace o chování PERV v genomu prasat. Spolupracovníci z laboratoře zjistili, že zatímco v prasečích tkáních jsou PERV hypermethylovány, v prasečích buněčných liniích existuje malé množství hypomethylovaných PERV. Mým spolupracovníkům se také podařilo izolovat nezkrácený PERV, který vykazoval vysokou transkripční aktivitu (PERV-A MAMBA). Detailní analýza ukázala, že PERV-A MAMBA je replikačně defektním provirem, neboť obsahuje krátkou delecii v oblasti genomu kódující RNázu-H.

V rámci projektu jsem se zabýval vlivem *in vitro* methylace promotorů PERV-A MAMBA a PERV-A/B 60 na transkripci proviru. Zjistil jsem, že transkripce PERV je výrazně citlivá k methylaci promotoru. Získaná data podporují názor, že methylace promotoru se významně podílí na umlčení transkripce PERV.

Společně se spolupracovníky z laboratoře a za pomoci Yasuhira Takeuchi (UCLA, London) jsem vytvořil systém, ve kterém se dala studovat rekombinace mezi PERV. Replikačně defektní PERV-A MAMBA a replikačně kompetentní, ale ekotropní PERV-C 1312 byly společně produkovány v lidských buňkách. Lidské buňky byly tímto způsobem infikovány, ale příčina infekce nebyla vyšetřena. Replikačně defektní PERV-A může sloužit k produkci virů, které jsou schopné infikovat lidské buňky *in vitro*.

2 Cíle práce

Prvním cílem práce je prokázat a kvantifikovat vliv methylace virového promotoru PERV na expresi z provirové DNA *in vitro*. Cíle je dosaženo:

- klonováním oblasti 5' LTR PERV-A MAMBA a PERV-A/B 60 před reportérový gen luciferázy
- *in vitro* methylování konstruktů pomocí prokaryotické methyltransferázy *SssI*
- kotransfekcí methylovaného (nemethylovaného) konstruktů s vektorem pCMV- β -gal do 293T a stanovením relativní aktivity luciferázy, která není ovlivněna účinností transfekce
- relativní aktivita luciferázy je poté porovnána s methylovacími vektory.

Druhým cílem této práce je prokázat rekombinaci, pseudotypování nebo komplementaci mezi replikačně kompetentním, ekotropním virem PERV-C 1312 a replikačně defektním polytropním PERV-A MAMBA. Případně mezi jedním z PERV virů a lidskými endogenními retroviry (HERV). Pro testování rekombinace byly stanoveny následující cíle:

- sestavit konstrukty PERV provirů, které nesou různé geny pro rezistenci
- stabilní transfekcí buněk 293T a BeWo připravenými vektory a ověřením exprese provirů
- infekcí buněk 293T a přenosem filtrovaných supernatantů z PERV produkujících buněčných linií
- detekcí infekce metodami PCR a RT-PCR s páry primerů, které jsou situované do různých částí virového genomu.

3 Přehled literatury

3.1 Methylace DNA

U rostlin a obratlovců se setkáváme s fenoménem DNA methylace. Uhlík na pozici 5 v pyrimidinovém kruhu cytosinu může být methylován, čímž vzniká 5-methylcytosin (m^5C) (přehledně GOLL a BESTOR, 2005). Zatímco u savců je methylován cytosin v symetrické sekvenci, u rostlin je methylován cytosin i v sekvencích nesymetrických (např. CpNpG).

Mezi významné organismy, u kterých nebyla detekována methylace cytosinu ani přítomnost methyltransferáz patří *Caenorhabditis elegans* a *Saccharomyces cerevisiae*. *Drosophila melanogaster* kóduje gen podobný DNA methyltransferáze, nicméně genom mouchy se vyznačuje nízkým obsahem methylcytosinu (1 cytozin z 1000-2000 cytosinů je označen methylovou skupinou) navíc není methylován v dinukleotidu CpG, ale CpT (HUNG *et al.*, 1999).

Enzymy, které jsou zodpovědné za navázání methylové skupiny na cytozin se označují jako DNA methyltransferázy (*DNA methyltransferase*, DNMT). V současnosti klasifikujeme známé DNA methyltransferázy do dvou skupin podle toho, jaký templát preferenčně modifikují. První skupina zahrnuje tzv. *de novo* DNA methyltransferázy (Dnmt3a a Dnmt3b), které zavádí methylovou značku do místa, které původně nebylo methylováno. Do druhé skupiny spadá udržovací DNA methyltransferáza (Dnmt1), která je nezbytná k zavedení methylové značky do nově syntetizovaného řetězce během replikace DNA na základě přítomnosti methylové skupiny v rodičovském vlákne. Protein Dnmt2 vykazuje slabou DNA methyltransferázovou aktivitu *in vitro* a delece DNMT2 genu u myši neovlivňuje výrazně globální methylační vzorec. Role Dnmt2 v buňce se zdá být zanedbatelná.

3.1.1 CpG ostrovy

Savčí genom se vyznačuje přítomností tzv. CpG ostrovů – oblastí DNA, které jsou bohaté na výskyt CpG dinukleotidů. CpG ostrov je definován třemi parametry – délkou, poměrem zastoupení G-C párů a frekvencí výskytu CpG dinukleotidů. V závislosti na použitém parametru získáváme různý počet CpG ostrovů v lidském genomu. Podle striktního měřítka se v lidském genomu nachází na 29000 samostatných CpG ostrovů (LANDER

et al., 2001). CpG ostrov je dlouhý 200 až 3000 nukleotidů, vyznačuje se vysokým poměrem guaninu a cytosinu (více než 55% zastoupení) a vysokou frekvencí CpG dinukleotidů (poměr mezi pozorovaným a očekávaným zastoupením CpG dinukleotidů je větší než 0,6).

CpG ostrovy jsou asociovány s promotorovými oblastmi 76% lidských genů (DAVULURI *et al.*, 2001). Většina CpG ostrovů je ve všech stádiích vývoje a ve všech tkáních hypometylována. CpG ostrovy jsou také asociovány s geny, které jsou tkáňově specificky exprimovány. Nicméně, malá frakce CpG ostrovů bývá během vývoje hypermetylována, a pakliže je metylována, asociovaný promotor bývá umlčen. Příklady kdy se uplatňuje hypermethylace CpG ostrovů jsou genomový imprinting a inaktivace chromozomu X.

3.1.2 Vznik a udržení methylace DNA

Idea vzniku methylačního vzorce v časném embryonálním vývoji a přenos methylačního vzorce mechanismem udržení jsou výtečným modelem, ale plně nevysvětlují perzistenci methylačního vzorce během buněčné proliferace (přehledně BIRD, 2002)

Proces udržení methylace (*maintenance methylation*) popisuje přenos methylačního vzorce mezi dvěma buněčnými generacemi. Kopírování methylačního vzorce je analogické k semikonzervativnímu mechanismu replikace buněčné DNA. Významnou roli v tomto modelu hraje Dnmt1, která methyluje CpG dinukleotid v novém řetězci na základě přítomnosti methylové značky u řetězce templátového. Experimenty s arteficiálně metylovanými DNA prokázaly malou přesnost v kopírování methylačního vzorce. Ačkoliv přesný methylační vzorec nemůže být udržen na úrovni jednoho CpG dinukleotidu, celková methylace DNA úseků se nemění (PFEIFER *et al.*, 1990). Ukázalo se, že CpG ostrovy udržují celkový stav methylace (nebo nemethylace) velmi stabilně. Tento stav je udržován i v nepřítomnosti Dnmt1 (RHEE *et al.*, 2000). Patrně další, dosud neznámý, mechanismus nezávislý na Dnmt1 se podílí na této stabilitě.

V časných embryonálních buňkách jsou vysoce exprimovány *de novo* methyltransferázy Dnmt3a a Dnmt3b (OKANO *et al.*, 1999). V této fázi vývoje je také pozorována programovaná *de novo* methylace. Jaká je determinanta místa, které bude *de novo* metylováno? Jednou z možností je, že methylace postihuje všechna místa genomu. Nicméně, některé oblasti DNA nejsou jistě srovnatelně přístupné pro DNA methyltransferázy. Bylo zjiště-

no, že myši a lidé s mutací v genu DNMT3B jsou deficientní v methylaci pericentromerickém regionu DNA bohatém na repetitivní sekvence a CpG ostrovů na inaktivovaném chromozomu X (HANSEN *et al.*, 2000), Dnmt3b se podílí na methylaci transkripčně neaktivního chromatinu.

Alternativní model *de novo* methylace je založen na přítomnosti míst, které preferenčně přitahují DNA methyltransferázy (TURKER, 1999). Z těchto center může být methylace rozšířena do okolí až po bariéry. Methylační centra mohou být repetitivními, které utváří sekundární struktury. Např. u houby *Neurospora crassa* je methylačním centrem sekvence bohatá na dinukleotid ApT (MIAO *et al.*, 2000).

3.1.3 Mechanismy umlčování závislé na methylaci DNA

Dva protichůdné způsoby umlčování transkripce se uplatňují v biologických systémech.

První mechanismus je založený na přímém stérickém bránění methylovou skupinou ve vazbě DNA vazebných proteinů na příslušný element. WATT a MOLLOY (1988) prokázali, že methylace určitého CpG dinukleotidu v pozdním adenovirovém promotoru zabránila navázání transkripčního faktoru (*major late transcription factor*, MLTF), přítomného v buňkách HeLa. Stérické bránění methylové skupiny se uplatňuje také ve vazbě CCCTC vazebného faktoru (*CCCTC binding factor*, CTCF) do promotoru genu *Igf2* (BELL a FELSENFELD, 2002).

Methylová skupina spíše hraje roli značky, která je rozpoznávána methyl-vazebnou doménou (*methyl binding domain*, MBD) přítomnou u tří rodin proteinů. Methyl-vazebné proteiny rekrutují transkripční korepresory, které umlčují expresi z methylované DNA a modifikují okolní chromatin.

Methyl-vazebnou doménu obsahují MBD proteiny (MeCP2, MBD1-MBD4), rodina Kaiso a Kaiso-podobných proteinů a proteiny obsahující doménu asociovanou se SET a RING prstem (*SET and RING finger associated domain*, SRA) (přehledně DEFOSSEZ a STANCHEVA, 2011).

Protein vážící se na methylované CpG dinukleotidy (*methylated-CpG binding protein 2*, MeCP2) posloužil při deleční analýze k nalezení oblasti MBD nezbytné pro vazbu

na methylovanou DNA a také k nalezení domény reprimující transkripci (*transcriptional repression domain*, TRD). Pouze MBD je společná rodině MBD proteinů. Člen MBD3 obsahuje v MBD doméně aminokyselinovou substituci, která znemožňuje vazbu MBD3 na methylovanou DNA.

Pomocí dvouhybridního kvasinkového systému byl objeven jaderný protein Kaiso coby interakční partner p120-kateninu (DANIEL *et al.*, 1999). Kaiso patří do rodiny transkripčních faktorů se zinkovým prstem a doménou BTB (*Broad-complex, Tramtrack, Bric-a-brac/Poxvirus and zinc fingers*, ZBTB). Na N-konci se nachází BTB/POZ doména, která zodpovídá za protein-proteinovou interakci (váže například korepresor NCoR) a na C-konci se opakuje třikrát motiv C₂H₂ zinkového prstu. Právě motiv zinkového prstu zprostředkovává vazbu na methylovanou DNA, ale také na sekvenci TCCTGCNA (DANIEL *et al.*, 2002).

Zástupcem třetí rodiny proteinů vážící methylované sekvence je protein podobný ubikvitinu a obsahující PHD a RING domény (*ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, protein 1*, UHRF1). Uhrf1 protein obsahuje SRA doménu prostřednictvím které se váže na methylovanou DNA. UHRF1 je esenciální pro vývoj myšího embrya (podrobně DEFOSSEZ a STANCHEVA, 2011).

3.1.4 Represe transkripce retrovirů

Represe transkripce řízené z provirové DNA je aktivní obranou buňky vůči retrovirové infekci. Methylace v oblasti dlouhých koncových opakování (*long terminal repeats*, LTR), které obsahují retrovirový promotor a enhancerové oblasti, je spojena s modifikacemi okolního chromatinu.

Souvislost mezi methylací provirové DNA a infekčností viru je zmiňována ve studii, kterou podali HARBERS a spolupracovníci (1981). Myší podkmen označovaný Mov-3 nesl v germinálních buňkách Moloneyho virus myší leukémie (*Moloney murine leukemia virus*, MMLV), k jehož propagaci docházelo v embryonální fázi vývoje. Narozené myši pak trpěli na leukémií. Provirová DNA izolovaná z hepatocytů Mov-3 myši byla rezistentní vůči aktivitě restriktázy *HhaI* restriktázy a nebyla infekční pro myší buňky NIH 3T3. Nicméně, pokud byl provirus zaklonován do plazmidu a namnožen v *E. coli*, izolovaný klon

nebyl rezistentní vůči restriktáze *HhaI* a vykazoval vysokou míru infekčnosti v transfekční eseji na buňkách NIH 3T3.

Oblast LTR obsahuje u MMLV represor vázající sekvenci (*repressor binding sequence*, RBS), která nezávisle na methyloaci promotoru navozuje represi transkripce. V další fázi je tato represe zesílená methyloaci promotoru (KEMPLER, 1993). Zatímco u embryonálních buněk je k reaktivaci transkripce potřebný inhibitor methyloace 5-azacytidin (Aza-C), později je nutný v kombinaci s trichostatinem A (TSA), což vypovídá o propojenosti methyloace cytozinu s deacetylací histonů (LORINCZ *et al.*, 2000). Dlouhodobé umlčení MMLV nelze narušit kombinací Aza-C s TSA, patrně se na tomto procesu účastní další neznámý mechanismus.

V HeLa buňkách, které jsou infikovány pseudotypovanými vektory ptačího sarkomového viru (*avian sarcoma virus*, ASV), nesoucími informaci pro zelený fluorescenční protein (*green fluorescent protein*, GFP), dochází k výraznému umlčení exprese provirů (KATZ *et al.*, 2007). Umlčení je vyvoláno methyloací CpG dinukleotidů v promotorových oblastech a následnou modifikací histonů, neboť exprese GFP mohla být aktivována působením inhibitorů Aza-C nebo TSA. Snížením množství HDAC1 a Daxx proteinů v buňkách HeLa pomocí siRNA technologie POLESHKO a spolupracovníci (2009) reaktivovali umlčený provirus ASV. Daxx protein se tedy podílí na udržení umlčování proviru. Navíc, role Daxx proteinu může být širší, neboť SHALGINSKIKH a spolupracovníci (2013) naměřili zvýšenou expresi GFP, pakliže upraveným ASV infikovali buňky se sníženou expresí Daxx proteinu. Jelikož je Daxx jaderným proteinem, preintegrační komplex rozpoznává prostřednictvím vazby na virovou integrázu a zároveň rekrutuje Dnmt a HDAC do míst případné integrace proviru. Při udržování umlčování proviru interaguje s provirovou DNA neznámým způsobem.

3.2 Rekombinace retrovirů

Homologní rekombinace retrovirů je velmi častým jevem provázejícím reverzní transkripci. Důsledek rekombinace je pro virovou evoluci drastický, neboť se zvyšuje diverzita virové populace, čímž se zvyšuje pravděpodobnost přežití viru v měnícím se prostředí. Rekombinací jsou například generovány reasortanty, které unikají hostitelskému obrannému systému nebo antiretrovirové terapii v případě viru lidské imunodeficiency (*human immunodeficiency virus 1*, HIV-1).

Za podmínek, kdy se v nukleokapsidě nachází dvě stejné kopie RNA, je fenomén rekombinace skrytý. Pokud jsou do virové partikule kopakázovány dva odlišné řetězce RNA, výsledná provirová DNA je mozaikou obou řetězců.

Frekvence rekombinace je překvapivě vysoká. Pokud byly do genomu viru nekrozy slinivky (*spleen necrosis virus*, SNV) vloženy dva rozdílné markery oddělené 1000 nukleotidů dlouhou sekvencí, při jednokolové replikaci viru bylo zjištěno, že poměr rekombinant činí 4,7% případů (ANDERSON *et al.*, 1998). Rekombinace ale nevykazují lineární charakter s délkou sekvence, neboť markery vzdálené 1900 nukleotidů od sebe měly poměr rekombinant 7,4% a markery vzdálené od sebe 7100 nukleotidů měly poměr rekombinant 8,4%. Tento poměr je různý mezi retroviry. U HIV-1 činí rekombinační poměr 42,8% mezi dvěma markery vzdálenými 1000 nukleotidů (RHODES *et al.*, 2003).

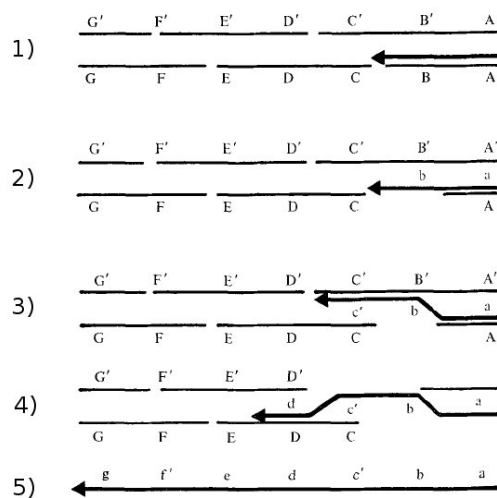
Dva modely rekombinace retrovirových genomů se uplatňují. První model „volby kopie“ (*copy choice model*) se uplatňuje během syntézy –DNA vlákna a bude zde rozebrán podrobněji. Druhý model „*strand-displacement assimilation model*“ se uplatňuje při syntéze + DNA řetězce, nicméně příkládá se mu menší podíl na celkové rekombinaci.

3.2.1 Vynucená volba kopie (forced copy choice)

Mechanismus rekombinace „vynucenou volbou kopie“ navrhl J. M. COFFIN (1979). Vycházel z několika předpokladů: (i) genomová RNA je uvnitř nukleokapsidy často fragmentována, (ii) ASV je méně citlivý vůči UV záření ve srovnání s jinými RNA viry, (iii) během jednoho infekčního cyklu dochází k jedné nebo více rekombinacím, (vi) pozorova-

ná rekombinace vyžaduje heterozygotní virovou partikuli, (v) reverzní transkriptáza je schopná „přeskoku“ mezi templáty a (vi) rychlost syntézy –DNA řetězce je pomalá.

Pakliže reverzní transkriptáza (*reverse transcriptase*, RT) dospěje ke zlomu v řetězci genomové RNA, chová se jako kdyby dosáhla konce RNA vlákna. Reverzně-transkriptázová aktivita enzymu se zastaví, zatímco aktivita RNázy-H degraduje RNA templát v RNA-DNA dvouřetězci. Dochází k obnažení DNA vlákna, které hybridizuje k druhému RNA řetězci, přítomným v nukleokapsidě. Pokud je i toto vlákno ve směru reverzní transkripce přerušeno, dojde k dalšímu přeskoku tímž způsobem (obr. 2).



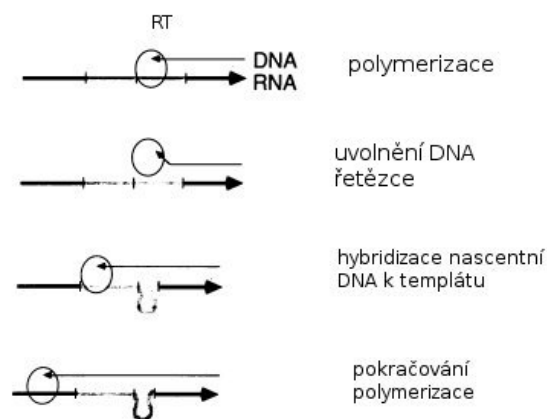
Obr. 2: **Model volby vynucené kopie.** 1) RT přepisuje templátovou RNA než narazí na přerušení. 2) Aktivita RNázy-H štěpí RNA v RNA-DNA duplexu, čímž se uvolňuje DNA konec pro hybridizaci ke druhému vláknu, které je v daném místě nepoškozené. 3) Syntéza –DNA řetězce pokračuje podle druhého vlákna dokud není vlákno přerušeno. 4) Další přeskok vyvolaný přerušením. 5) Výsledná –DNA je mozaikou dvou RNA vláken. Upraveno a převzato podle COFFIN (1979).

3.2.2 Přesun vlákna řízený přerušením (pause-driven strand transfer)

Tento model rekombinace byl navržen XU a BOEKE (1987) na základě experimentů s Ty elementy (*transposons of yeast*, Ty) *Saccharomyces cerevisiae*. Ty elementy jsou blízce podobné retrovirům v uspořádání genomu a také v replikačním cyklu (reverzní tran-

skripce probíhá ve virům podobných partikulích). Až 90% konstruktů vykazovalo po reverzní transkripci a inzerci do genomu *S. cerevisiae* delecí jedné z tandemově uspořádaných sekvencí markeru *neo* (gen pro neomycinovou rezistenci). K delecí došlo i pokud byly *neo* markery odděleny cizorodou sekvencí *TRP1* genu (kódující fosforibozyl-antranilát izomerázu 1). Obdobně se chovala sekvence *TRP1* genu mezi dvěma sekvencemi *neo*. Autoři navrhli model založený na pozastavení reverzní transkriptázy a hledání komplementární sekvence ke krátkému úseku nascentního DNA vlákna na témže nebo sousedním řetězci RNA. V případě tandemově uspořádaných sekvencí uvolněná část nascentní DNA s vysokou četností hybridizuje s distální sekvencí téhož vlákna, tj. provede přeskok na templátovém RNA řetězci ve směru pohybu polymerázy (5'→3').

Přeskoku opačným směrem je zabráněno buď stericly nebo je dán nárokem volného RNA konce pro reverzní transkriptázu (obr. 3).



Obr. 3: **Model přerušitím řízeného přesunu vlákna.** RT je znázorněna kolečkem. RT v průběhu polymerizační aktivity „pauzuje“ na templátě v prominentních místech. RNázová aktivita štěpí RNA v heteroduplexu DNA-RNA, obnažený konec DNA hybridizuje k homologní sekvenci genomové RNA ve směru downstream od RT. Převzato a upraveno podle XU a BOEKE (1987).

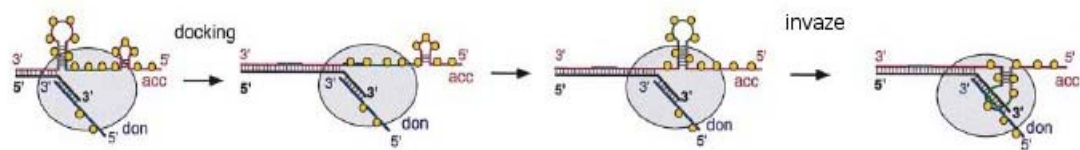
In vitro byly procesy pauzování reverzní transkripce a s tím spojený přeskok reverzní transkripce zaznamenány skupinou DESTEFANO a spolupracovníků (1994) na templátě RNA homologním v 27 nukleotidů dlouhé sekvenci s akceptorovým řetězcem DNA. Vý-

sledný radioaktivně značený produkt odpovídal svou délkou sekvenci, která byla amplifikována v důsledku přeskočků. Také byl pozorován meziproduct vzniklý pauzováním reverzní transkriptázy na donorovém templátě. Autoři popsali, že snížení koncentrace prekurzorů dNTP zvýšila signál produktu generovaného rekombinací.

3.2.3 Výměna vlákna nezávislá na přerušení (pause-independent strand transfer)

Oproti předchozím dvěma modelům není v tomto modelu signálem pro přeskok reverzní transkripce překážka na donorové RNA.

NEGRONI a BUC (2000) prováděli *in vitro* reverzní transkripci na templátu RNA a zjistili, že frekvence rekombinace řádově kolísá v závislosti na místě, kde k rekombinaci dochází (vypočítaná frekvence rekombinace fluktuovala v rozmezí 1×10^{-5} až $3,7 \times 10^{-4}$). Místa, kde docházelo k nejčastějším rekombinacím, hot-spots, byly stejné pro RT z HIV-1 a MoMLV. Obalení templátu nukleokapsidovým proteinem z HIV-1 (*nucleocapsid protein p7*, NCp7) zvýšilo celkovou frekvenci rekombinace beze změny signálu pauzování RT, což svědčí o účasti nukleokapsidového proteinu na procesu rekombinace. Autoři navrhli model, ve kterém akceptorová RNA s nascentní DNA vytváří dlouhý heteroduplex. Procesu „docking“ napomáhá nukleokapsidový protein, který funguje jako RNA chaperon, destabilizuje struktury na nascentní DNA a templátové RNA a podílí se na odstranění úseků RNA odolných vůči aktivitě RNázy-H. Procesu dockingu zvyšuje účinnost rekombinace, jelikož se z intermolekulárního přeskočků najednou stává situace intramolekulárního přeskočků (obr 4).



Obr. 4.: **Model výměny vlákna nezávislého na přerušení.** Šedé kolečko znázorňuje RT. Nejprve dochází k hybridizaci dlouhého úseku nascentní DNA k akceptorové RNA (docking) za pomoci nukleokapsidového proteinu. Nukleokapsidový protein se podílí i na procesu hledání komplementární sekvence k narůstajícímu 3' konce nascentní DNA a invazi a vytěsnění templátové RNA druhého řetězce RNA. Převzato a upraveno podle NEGRONI a BUC (2000).

3.3 Endogenní retroviry

Definujícím znakem retrovirů je proces reverzní transkripce. Výsledkem této reakce je reverzně přepsaná genomová RNA v podobě dvouvláknové DNA. Jelikož enzymu reverzní transkriptáze chybí proofreadingová aktivita, obsahuje přepsaná DNA časté chyby, které pokud neovlivňují proces integrace do hostitelské jaderné DNA, jsou zaneseny v sekvenci proviru. Defektní i nepoškozené proviry se integrují do buněk germinální linie a pokud výrazně hostitele nepoškozují, jsou na jeho potomstvo přenášeny na základě Mendelových zákonů. Aktivita funkčních provirů je v průběhu evolučního času postupně eliminována získanými mutacemi. Procesem endogenizace se tak vytváří endogenní retroviry, parazitické sekvence, které jsou blízké příbuzné sekvencím exogenních retrovirů.

Zajímavou vlastností retrovirů je výrazný stupeň homologie v oblasti kódující reverzní transkriptázu (*polymerase*, gen *pol*), zatímco v ostatních oblastech virového genomu se retroviry mezi sebou značně odlišují. Na základě porovnání sekvencí genu *pol* je tak možné sestavit fylogenetické stromy pro různé retroviry. Pomocí degenerovaných primerů namířených do oblasti genu *pol* byly obdrženy sekvence endogenních retrovirů u obratlovčích skupin s výjimkou kruhoústých (*Cyclostomata*) (HERNIOU *et al.*, 1998), napovídajíc o širokém rozšíření těchto elementů.

Sekvence endogenních retrovirů v daném hostitelském organismu můžeme zpravidla rozdělit do několika skupin podle homologie, ačkoliv tyto sekvence jsou rozprostřeny na různých místech genomu. V rámci skupiny může diverzita jednotlivých sekvencí nabýt větších rozdílů než ve srovnání s exogenním předchůdcem. Počet sekvencí se pohybuje od jednotek až po tisíce. Ač to na první pohled nemusí být zřejmé, endogenní retroviry vykazují jiné vlastnosti než jejich exogenní formy. Dlouhou koevolucí se svým hostitelem se endogenní retroviry postupně adaptovaly, takže ztrácí pathogenicitu a často se replikují méně účinně než exogenní viry (přehledně BOEKE a STOYE, 1997). Bývají také často defektní. Endogenní retroviry jsou zpravidla transkripčně umlčeny, na čemž se podílí hostitelský epigenetický mechanismus.

Ve svých přirozených hostitelích, endogenní retroviry zřídka vyvolávají onemocnění z důvodu adaptace, ačkoliv zvýšená exprese bývá často nacházena u nádorových buněk. Někdy jsou naopak endogenní retroviry pro hostitelský organismus účinné. Dokladem toho obalový protein zkráceného provirového lokusu ERVW1 HERV-W, známého pod

synonymem syncytin, jehož exprese je nezbytná pro normální vývoj placenty (MI *et al.*, 2000).

3.3.1 Objev prasečích endogenních retrovirů

První zmínka o elektronmikroskopickém pozorování virových partikulí produkovaných prasečími buněčnými liniemi se připisuje BREESE Jr. (1970, citováno podle ARMSTRONG *et al.*, 1971). Rok poté, ARMSTRONG a spolupracovníci (1971) hledali buněčnou linii, vhodnou pro studium arbovirů, avšak u všech studovaných prasečích buněčných linií odvozených z ledvin (*porcine kidney 15*, PK-15; *swine kidney 6*, SK6) narazili na přítomnost retrovirových partikulí C-typu. Nicméně, buňky primární a sekundární kultury odvozené z ledvin prasete tyto partikule neprodukovaly. Zda došlo ke kontaminaci buněčných linií viry během kultivace, či jsou tyto viry endogenního původu, nebylo v té době jasné, ačkoliv autorům byla známa skutečnost, že myší buněčné linie také produkují virové partikule a obsahují endogenní retroviry.

Další prasečí buněčná linie, Shimosuma-1, odvozená z maligního lymfomu, produkuje retrovirové partikule morfologie typu C. SUZUKA a spolupracovníci (1985) prokázali, že partikule jsou retrovirového původu, neboť vykazují enzymovou aktivitu charakteristickou pro reverzní transkriptázu. Role Tsukuba-1 retroviru na maligním fenotypu nebyla autory vyšetřována.

3.3.2 Infekční studie PERV

Infekční studie buněčných linií vypovídají o tropismu viru. Znalosti o schopnosti infekci jiných druhů než člověka mají svůj význam, protože umožňují nalézt vhodný organismus ke studiu xenozoonóz *in vivo*. Mnoha studii bylo prokázáno přenos prasečích endogenních retrovirů (*porcine endogenous retrovirus*, PERV) na lidské buňky *in vitro*.

PATIENCE a spolupracovníci (1997) se snažili přenesením supernatantu z prasečích buněčných linií miniaturního prasete (*minipig kidney*, MPK) a PK-15 infikovat lidské i zvířecí buňky. Zjistili, že supernatant z buněk PK-15 produktivně infikoval prasečí buňky var-

lete (*swine testes-IOWA*, ST-IOWA), buňky norčí (*Mustela vison*) plíce (*mustela vision lung*, Mv-1-lu) a buňky lidské ledvinné linie (293, 293T). Kokultivací lidských buněčných linií fibrosarkomu (HT1080) nebo jednojaderných buněk z periferní krve (*peripheral blood mononuclear cell*, PBMC) s ozářenými buňkami PK-15, byly tyto buňky také infikovány. Supernatant z linie MPK infikoval pouze prasečí linii ST-IOWA. Z infekční studie provedené PATIENCE se spolupracovníky (1997) vyplynulo, že buněčná linie PK-15 pravděpodobně produkuje buď amfotropní virus nebo směs ekotropních a xenotropních virů, zatímco linie MPK produkuje pouze ekotropní virus. Také se ukázalo, že buněčná linie ST-IOWA neprodukuje žádné retrovirové partikule.

LE TISSIER a spolupracovníci (1997) zjistili, že buňky 293 vystavené supernatantu z buněk PK15 jsou produktivně infikovány pouze PERV-B. Tato data by napovídala, že PERV-B je jedinou skupinou endogenních retrovirů prasat, která je schopna infikovat lidské buňky. Nicméně, TAKEUCHI a spolupracovníci (1998) přenesli kokultivovací buněk PK15 nebo prasečích endoteliálních buněk aorty (*pig aortic endothelial cells*, PAE) s lidskými 293 buňkami PERV-A a PERV-B.

TAKEUCHI a spolupracovníci (1998) detekovali aktivitu reverzní transkriptázy v supernatantu z buněk MPK, PK15 a PAE, zatímco supernatant z buněk ST-IOWA a 293T byl negativní na aktivitu reverzní transkriptázy. Dále RT-PCR metodou detekovali v supernatantu z buněk PK15 a ST-IOWA jen PERV-A a PERV-B *env*, zatímco v případě buněk MPK a PAE detekovali kromě PERV-A a PERV-B také i PERV-C *env*. TAKEUCHI a spolupracovníci (1998) také detekovali PERV-C *env* během kokultivací 293 buněk s PAE buňkami, autoři se přikláněli k názoru, že detekce PERV-C *env* byla způsobena fenotypovým míšením PERV-C s ostatními PERV.

TAKEUCHI a spolupracovníci (1998) také infikovali buňky fibrosarkomu (HT1080) PERV-C. Nicméně, OLDMIXON a spolupracovníkům (2002) se nepodařilo infikovat buňky HT1080 PERV-C virem, ačkoliv týmž virem se jim podařilo infikovat buňky ST-IOWA. Dále, TAKEUCHI prokázal, že buňky HT1080 mohou být infikovány i PERV, které ve svém obalu postrádají Env protein (nepublikováno). K infekci PERV u buněk HT1080 tak zřejmě dochází nescifickým mechanismem (OLDMIXON *et al.*, 2002).

Za nejvhodnějšími modely pro studium zoonóz při xenotransplantaci se považovali primáti, jelikož jsou nejbližší příbuzní člověku. Nicméně výsledky *in vitro* infekce primátích buněk PERV byly rozporuplné. WILSON a spolupracovníci (2000) se snažili infikovat

PERV NIH-2° virem zvířecí buněčné linie včetně linie ledvinných buněk makaka rhesus (*fetal rhesus monkey kidney*, FrhK-4). Titr pseudotypizovaného viru byl relativizován na titr obdrženy při infekci buněk 293T. Buňky ze psa (*Canis lupus f. familiaris*), králíka (*Oryctolagus cuniculus f. domesticus*), potkana (*Rattus norvegicus*), tura (*Bos primigenius f. taurus*) a makaka rhesus (*Macaca rhesus*) neprodukovaly virus, zatímco buněčné linie z norka amerického (*Mustela vison*) a kočky (*Felis silvestris f. catus*) byly produktivně infikovány, nicméně titr viru byl nižší než u buněk 293T.

BLUSCH a spolupracovníci (2000) se věnovali schopnosti PERV infikovat primátí buněčné linie kokultivací s rentgenově ozářenými buňkami PK-15 nebo PAE. V primárních fibroblastech z člověka, šimpanze učenlivého (*Pan troglodytes*), paviána pláštikového (*Papio hamadryas*) a gorily horské (*Gorilla beringei beringei*) byly detekovány pouze PERV-A *env* sekvence PCR technikou. U kočkodana zeleného (*Cercopithecus aethiops*), makaků (*Macacca nigra*, *M. fascicularis*, *M. nemestrina*), guerézy pláštikové (*Colobus guerezza*), langura duk (*Pygathrix nemaeus*), kotula amazonského (*Saimiri boliviensis*) a vřešťana rezavého (*Alouatta seniculus*) nebyly detekovány žádné PERV specifické sekvence. Mimo fibroblasty autoři také úspěšně infikovaly paviánní lymfocyty. V infikovaných buňkách paviána detekovali expresi PERV mRNA, z čehož usuzují na možnou produktivní infekci PERV a použití paviána jako modelového organismu.

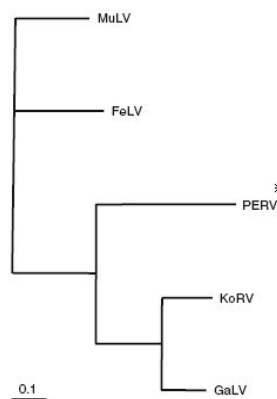
RITZHAUPT a spolupracovníci (2002) ale oponují, že primáty coby modelové organismy infekce PERV není možné využít. Vědci využili renální buněčné linie kočkodana zeleného (*Cercopithecus aethiops*) (BSC-1) a makaka rhesus (FRhK-4, RF/6A), které infikovali VSV-G pseudotypovanými partikulami PERV-NIH3°. Linie byly sice infikovány, nicméně infekční titr produkovaný těmito buňkami byl 1000 až 10000 krát menší než u kontrolních buněk 293T. Dále, primární buněčné kultury z makaka rhesus vystavené supernatantu z buněk PK-15 nebo 293T/NIH nebyly infikovány s výjimkou RF/6A linie neproduktivně infikovanou PERV-NIH.

Linie buněk u kočkodana zeleného, makaka rhesus vystavené PERV-NIH3° viru byly sice pozitivní na PERV *pol* DNA, ale negativní na aktivitu reverzní transkriptázy. Po více než 4 pasážích byly všechny buněčné linie negativní na PERV *pol* DNA. Paviání T a B-lymfocyty vystavené PERV-NIH3° viru nebyly infikovány vůbec. Supernatant z primátích linií vystavených PERV-NIH3° byl přenesen na buňky 293T. Pouze buňky 293T buňky vystavené supernatantu z buněk BSC-1 (kočkodana zeleného) a FRh12 (makaka rhesus)

byly infikovány. Z těchto infekcí vyplývá, že v primátech liniích je významně blokována infekce PERV na úrovni po vstupu viru do buňky. Přesto uvolňování PERV virových partikulí je možné detekovat. Dlouhodobě je ale infekce inhibována. Předchozí dosažená data podporující využití primátů pro studium PERV byla interpretována nesprávně, neboť nebylo využito všech dostupných esejí ke studiu přenosu PERV.

3.3.3 Příbuznost PERV a počet kopií v genomu prasat

Porovnáním nukleotidové sekvence *pol* genu je PERV nejbližší příbuzný leukemickým virům, konkrétně viru leukemie gibbonů (*gibbon ape leukemia virus*, GALV), 70% homologie) a myším leukemickým virům (*murine leukemia virus*, MLV) včetně MoMLV (60-70% homologie) (AKIYOSHI *et al.*, 1998; TAKEUCHI *et al.*, 1998). Infekční viry v rámci PERV γ 1 skupiny sdílí 95% nukleotidovou homologii v *gag* a *pol* genech, zatímco v *env* genu je jejich homologie pouhých 70%.



Obr. 5: **Fylogenetický strom PERV a nejbližších endogenních retrovirů.** PERV zvýrazněn hvězdičkou. Převzato a upraveno podle DENNER (2008).

Jak prokazují níže uvedená data, počet PERV provirů v genomu prasete je nízký (do 100 kopií/genom). Ještě nižší je pak počet nezkrácených provirů a nejnižší je počet replikačně kompetentních provirů (do 10). Různé skupiny se v odhadu počtu kopií PERV od sebe mírně odlišují.

První odhad počtu kopií PERV provedli LE TISSIER a spolupracovníci (1997), kteří metodou Southernova přenosu stanovili počet kopií v plemenech prasat Landrace×Duroc, Meishan, Pietrain a u MPK buněčné linie na 10 až 23 kopií PERV-A a 7 až 12 kopií PERV-B provirů. Použitím próby hybridizující k sekvenci virové proteázy PERV-PK, PATIENCE a spolupracovníci (1997) stanovili počet PERV kopií v prasečích liniích PK15, MPK a ST-IOWA přibližně na 50. Podobný hybridizační profil vykazovaly také vzorky pocházející ze srdeční tkáně normálních chovů prasat.

Chromozomální DNA různých kmenů inbredních miniaturních prasat byla štěpena *XbaI* restriktázou a hybridizována s próbou odvozenou ze sekvence genu *env* proviru PERV-MSL. Na základě tohoto experimentu určili AKIYOSHI a spolupracovníci (1998) počet nezkrácených provirů na 8 až 15 kopií PERV, přičemž počet kopií vykazoval variabilitu mezi jednotlivými chovy inbredních prasat. Stejný počet kopií byl stanoven i u outbredních Yucatánských miniaturních prasat. 10-20 kopií nezkrácených provirů je integrovaných v chromozomální DNA pocházející z buněk PK-15 (AKIYOSHI *et al.*, 1998).

PCR titrací Landrace×Duroc F1 kříženců PATIENCE a spolupracovníci (2001) zjistili, že největší zastoupení provirů v prasečí DNA náleží $\gamma 1$ skupině (tedy skupině, kam spadají všechny produkční PERV-A, B, C). Počet všech PERV gammaretrovirových sekvencí byla odhadnuta mezi 58 až 116. V domestikovaném praseti se také nachází sekvence příbuzné betaretrovirům, které podle sekvence *pol* vytváří 4 skupiny ($\beta 1$ - $\beta 4$). Zatímco $\beta 1$, $\beta 2$ a $\beta 4$ skupiny jsou sekvencí bližší viru způsobující *nádor* mléčné žlázy u myši (mouse mammary tumor virus, MMTV) a opičím endogenním retrovirům (*simian endogenous retrovirus*, SERV), $\beta 3$ skupina je bližší lidským endogenním retrovirům skupiny K (*human endogenous retrovirus K*, HERV-K). Zda mezi prasečími endogenními betaretroviry jsou neporušené sekvence není známo, přesto sekvence $\beta 4$ skupiny jsou exprimovány. Počet betaretrovirů byl PCR titrací odhadnut na 30-60 s největším zastoupením sekvencí ze skupiny $\beta 3$.

PERV jsou relativně mladé viry. Vstup PERV do genomu prasete je odhadován na 7,6 milionu let, což koreluje s dobou divergence prasete od jeho nejbližšího příbuzného pekari, který je negativní na přítomnost PERV-A, B a C (NIEBERT a TÖNJES, 2005). PERV-C je evolučně nejmladší virus, do genomu prasete se integroval před 1,5-3,5 miliony lety pravděpodobně rekombinací s neznámým předchůdcem.

3.3.4 Struktura PERV proviru

PERV se strukturou genomu neodlišují od ostatních gammaretrovirů. Oblasti, ve kterých se PERV izoláty mezi sebou výrazně odlišují (tj. LTR a sekvence *env*) jsou detailněji rozebrány níže.

3.3.4.1 LTR PERV

Dlouhá koncová opakování (*long terminal repeat*, LTR) jsou svou organizací podobná LTR jiných endogenních retrovirů. Délka PERV LTR kolísá v rozmezí 600-800 bp (WILSON *et al.*, 2003), ačkoliv u PERV pasážovaných na lidských buňkách může dosahovat délky až 1200 bp (DENNER *et al.*, 2003).

LTR se skládá ze tří oblastí (U3, R, U5), ani PERV nejsou výjimkou. Před unikátní oblastí na 3' konci (*unique 3' region*, U3) a za unikátní oblastí na 5' konci (*unique 5' region*, U5) každé LTR se nachází invertovaná repetice (*inverted repeat*, IR) dlouhá 9 bp. V U3 oblasti se nachází přímá opakování dlouhá 39 bp. Tato opakování jsou složena ze dvou subjednotek dlouhých 21 bp a 18 bp (SCHEEF *et al.*, 2001). Součástí přímého opakování je enhancerová sekvence rozpoznávaná jaderným transkripčním faktorem ypsilon (*nuclear factor Y*, NF-Y) u PERV-A, PERV-B nebo NF-Y a faktorem rozpoznávající sekvenci GATA (*transcriptional factor GATA*) u PERV-C, PERV-A/C. U5 oblast je dlouhá 73-77 bp.

	NF-Y	GATA	NF-Y
A	[TATTTTAAAATGATTTGGTCCACGGAGCGCGGGCTCTCGA]	[TATTTTAAAATGATTTGGTCCACGGAGCGCGGGCTCTCGA]	
B	[.....]	[.....]	
C	[-.A.....T.A.....A.....]	[AG.....T...C...TTGT.....]	
NIH	[-.A.....T.A.....A.....]	[AG.....T...C...TTGT.....]	

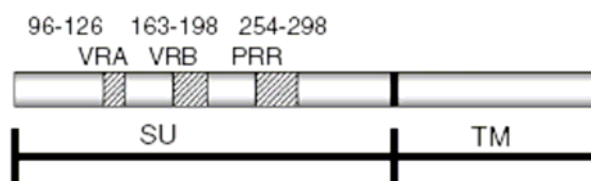
	GATA	NF-Y	GATA
A	[TATTTTAAAATGATTTGGTCCATGGAGCGCGGGCTCTCGA]	[TATTTTAAAATGATTTGGT]	TGTGACGCACAGGCTTGG
B	[.....]	[.....]
C	[.....]	[.....]	[.....G.....].....A.A..G.G.....
NIH	[.....]	[.....]	[.....G.....].....A.A..G.G.....

Obr. 6: Srovnání sekvencí přímého opakování (39 bp element) PERV tříd včetně rekombinanty PERV-NIH. Sekvence pro vazbu transkripčních faktorů (NF-Y, GATA) jsou podtrženy. Tečky značí shodné sekvence, pomlčky značí delecii. Převzato a upraveno podle WILSON *et al.* (2003).

3.3.4.2 Obalový protein Env PERV

Mediátorová RNA pro virový obalový protein Env z PERV vzniká sestřihem kompletně přepsané virové RNA (genomové RNA). Sekvence *env* mRNA je buněčnou mašínou přeložena do polyproteinu, který na N-konci nese signální sekvenci rozpoznávanou SRP a do plasmatické membrány putuje přes sekreční dráhu, během níž je ko- a postranlačně upravován. V endoplazmatickém retikulu je odstřižena vedoucí sekvence (*leader*) signální peptidázou, mezi polyproteinovými řetězci formují disulfidické můstky, dále se zde připojují cukerné zbytky a polyprotein zaujímá vyšší strukturní stav za vydatné pomoci chaperonů calnexinu a calreticulínu. Na C-konci Env proteinu se nachází kotevní sekvence kterou zůstává polyprotein připojen do membrány ER a posléze tak i cytoplazmatické membrány. V Golgiho aparátu je polyproteinový dimer rozstřížen buněčnými proteázami (*furin*) na dvě základní podjednotky – povrchový glykoprotein (*surface*, SU) a transmembránový protein (*transmembrane*, TM). Tyto podjednotky jsou spojeny disulfidickými můstky a vytváří heterodimerní strukturu. Trojice heterodimerů vytváří základní jednotku v rámci obalu viru, derivovaného z cytoplazmatické membrány hostitelské buňky.

U retrovirů se receptor vazebná doména (*receptor binding domain*, RBD) nachází na N-konci SU podjednotky. Na základě studia Env obalového proteinu myších leukémických virů definujeme RBD jako oblast nezbytnou pro vazbu na receptor a obsahující dva strukturní motivy označované jako variabilní oblast A (*variable region A*, VRA) a variabilní oblast B (*variable region B*, VRB) (obr. 7). TM podjednotka je nezbytná pro fúzi virového obalu s cílovou membránou, neboť její N-konec obsahuje tzv. fúzní peptid. a také je jejím prostřednictvím obalový protein zanořen do membrány virové partikule.



Obr.7: **Znázornění sekvence pro obalový protein PERV.** N-konec tvoří SU podjednotka obsahující oblasti VRA, VRB a prolin bohatou oblast (*proline rich region*, PRR). Upraveno a převzato podle DENNER *et al.* (2008).

LE TISSIER a spolupracovníci (1997) zjistili, že endogenní retroviry buněčné linie PK-15 se odlišují v genu *env* pro obalový protein a na základě této odlišnosti rozdělily PERV do dvou skupin – PERV-A a PERV-B. Ačkoliv počet izolovaných sekvencí PERV-A převažoval v buňkách PK-15, lidské buňky 293 vystavené supernatantu z buněk PK-15 byly produktivně infikovány pouze PERV-B. Tato data by napovídala, že PERV-B je jedinou skupinou endogenních retrovirů prasat, která je schopna infikovat lidské buňky. Následně AKIYOSHI a spolupracovníci (1998) identifikovali třetí typ obalového proteinu (Env C) u PERV z leukocytů miniaturního prasete (*miniswine leukocyte*, PERV-MSL). Zajímavostí jistě je, že PERV-MSL se ukázal být sekvencí téměř identický s provirem Tsukuba-1. PERV klony, exprimované buňkami PK-15, se daly rozdělit do dvou skupin na základě rozdílů v Env obalovém proteinu (LE TISSIER *et al.*, 1997). Tyto dvě třídy proteinů z PERV, označované jako Env-A a Env-B, jsou dlouhé 660, respektive 657 aminokyselin. U typického polyproteinu PERV Env náleží prvních 460 aminokyselin SU podjednotce a zbylých 200 C-koncových aminokyselin připadá na TM podjednotku. Na základě srovnání s Env obalovým proteinem z MLV bylo zjištěno, že největší rozdíly mezi Env-A a Env-B třídami je dosahováno v predikovaných VRA, VRB a PRR regionech SU podjednotky (LE TISSIER *et al.*, 1997), tj. v oblastech, které jsou zodpovědné za rozpoznání receptoru. TM podjednotky Env-A a Env-B sdílejí vůči sobě 92% aminokyselinovou homologii, zatímco s jinými gammaretroviry GalV a Friend MLV sdílejí pouze 63-66% homologii.

TAKEUCHI a spolupracovníci (1998) poté potvrdili existenci tří typů obalového proteinu PERV. RT-PCR detekcí *env* specifické mRNA prokázali, že prasečí buněčné linie PK-15, MPK, ST-IOWA a PAE exprimují viry PERV-A a PERV-B, zatímco PERV-C nebyl exprimován buňkami PK-15 a ST-IOWA.

Experimenty s SU-IgG fúzními proteiny obsahující různě dlouhé části SU podjednotky z PERV-A nebo PERV-C prokázaly, že v případě PERV je pro navázání na receptor kritická nejen oblast definovaná jako RBD, ale také i PRR (GEMENIANO *et al.*, 2006). Stejná skupina prokázala, že rekombinantní PERV-A/C Env protein obsahující 167 aminokyselin na C-konci SU podjednotky z PERV-C se účinněji vázal na receptor přítomný na povrchu buněk ST-IOWA než u králičích buněk rohovky stabilně transfekovaných receptorem pro PERV-A (*rabbit corneal cell line*, SIRC/PAR linie). Zmíněná C-koncová oblast SU podjednotky se mezi Env A a Env C proteiny lišila v 9 aminokyselinách.

3.3.5 Receptory PERV

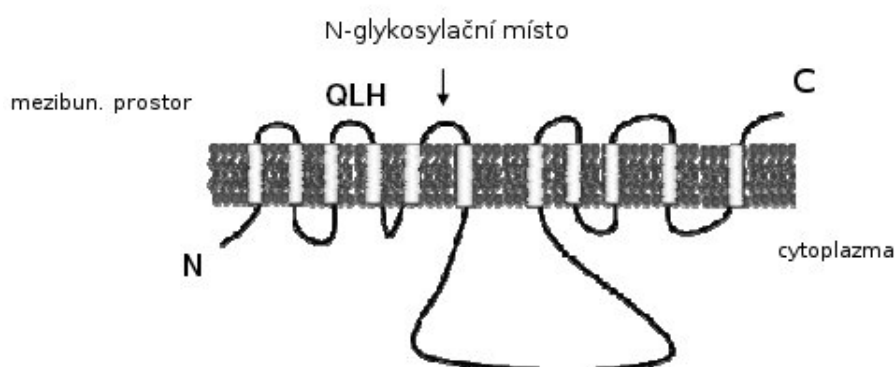
Receptory jsou v retrovirologii významným tématem. Ze znalosti receptorů, které daný endogenní retrovirus využívá k navázání a vstupu do buňky, můžeme dedukovat, které buňky, tkáně nebo orgány budou infikovány a které nikoliv.

ERICSSON a spolupracovníci (2003) ohlásili objev dvou lidských receptorů pro PERV. cDNA knihovna z buněk HeLa, které jsou permissivní pro PERV-A, byla zavedena do původně nepermissivních buněk SIRC. Linie buněk SIRC byly následně vystaveny pseudotypovaným PERV-A 14/220/Neo partikulím a selektovány antibiotikem G418. Rezistentní klony buněk byly podrobeny nezávislému screeningu za využití PERV-A 14/220/LacZ. Jediný dvojitě pozitivní klon SIRC buněk obsahoval cDNA knihovnu, jejíž sekvence odpovídala lokusu 75981 na chromosomu 8. Tento gen byl pojmenován jako lidský receptor 1 pro PERV A (*human PERV-A receptor 1*, HuPAR-1). V GenBank databázi byly dále nalezeny geny příbuzné k HuPAR-1 – lidský HuPAR-2 a myší ortholog AK008081 (*murine PERV-A receptor*, MuPAR). Analýzou předešle zmiňovaných tří sekvencí byla vybrána konzervovaná oblast, která posloužila k RT-PCR identifikaci podobných molekul v prasečích buňkách ST-IOWA (prasečí receptor pro PERV-A; *porcine PERV-A receptor*, PoPAR) a paviánních buňkách varlat (paviánní receptor 2 pro PERV-A; *baboon PERV-A receptor 2*, BaPAR-2). Překvapivě, BaPAR-2 se na základě aminokyselinové homologie ukázal být více podobný k HuPAR-2, než samotný HuPAR-2 k HuPAR-1 (z téhož důvodu byl označen jako BaPAR-2). Zatímco receptory HuPAR-1, HuPAR-2, PoPAR a BaPAR-2 jsou rozpoznávány PERV-A, myší homolog MuPAR se ukázal být ne-

funkční (ERICSSON *et al.*, 2003). Nicméně žádný receptor neumožnil infekci buněk PERV-B a PERV-C viry, které tak patrně pro vstup do buňky využívají jiných receptorů, v případě PERV-C pak i mechanismů (OLDMIXON *et al.*, 2002).

Oba lidské receptory HuPAR jsou přítomny na povrchu téměř všech tkání včetně PBMC (ERICSSON *et al.*, 2003). Exprese nebyla Northernem přenosem detekována jen v tkáni z močového měchýře, naopak nejvíce receptory HuPAR exprimují buňky germinální linie.

Jedná se o multimembránové proteiny, které obsahují 10 až 11 transmembránových domén. N-konec receptoru se nachází v cytoplasmě, zatímco C-konec vyčnívá do mezibuněčného prostoru. Ukázalo se, že receptor HuPAR-2 je efektivnějším receptorem pro PERV-A, neboť nepermissivní buňky SIRC, transfekované receptorem HuPAR-2, byly účinněji infikovány PERV-A než v případě receptoru HuPAR-1 (ERICSSON *et al.*, 2003; MARCUCCI *et al.*, 2009). Receptor HuPAR-2 obsahuje jedno glykosylační místo na pozici 178 (MATTIUZZO *et al.*, 2007).



Obr. 8: **Znázornění HuPAR-2 receptoru v cytoplazmatické membráně.** Místo glykosylace a leucin, který je nezbytný pro vazbu PERV-A jsou vyznačeny. Převzato a upraveno podle MATTIUZZO *et al.* (2007).

Buněčné funkce receptorů HuPAR-1 a HuPAR-2 nebyly známy. Nicméně, protein stejné sekvence byl nedávno popsán jako riboflavinový receptor 1 (*human riboflavine receptor 1*, hRFT1) (YONEZAWA *et al.*, 2008). Nově objevená funkce HuPAR dobře koreluje se znalostí, že gammaretrovirové receptory fungují jako přenašeče pro malé molekuly.

Jelikož po vstupu PERV-A viru do buňky dochází ke snížení přítomnosti receptoru na membráně (ERICSSON *et al.*, 2000), je možné podle funkce receptoru usuzovat také na patogenní účinky infekce PERV.

Přítomnost přirozených receptorů rozpoznávaných PERV u jiných savců je preferovaným znakem pro výběr organismu ke studii PERV infekce při xenotransplantaci. Nicméně, myši a potkaní buňky jsou nepermissivní pro PERV (TAKEUCHI *et al.*, 1998; WILSON *et al.*, 2000), ačkoliv nesou na svých površích odpovídající receptor. Ukázalo se, že myší receptor MuPAR není schopen vázat PERV partikule (ERICSSON *et al.*, 2003). Původně se předpokládalo, že blízkce příbuzný potkaní receptor (*rat PERV-A receptor*, RatPAR), jehož cDNA byla izolována z potkaních ledvinných buněk (*Rattus norvegicus kidney*, NRK) nepermissivních pro PERV, není funkčním receptorem podobně jako MuPAR. Avšak, řada PERV nepermissivních buněk (například křepelčí Q6T buňky, myší NIH 3T3 buňky, potkaní NRK buňky) transfekovaných plazmidem kódujícím RatPAR, byly PERV infikovány (MATTIUZZO *et al.*, 2007). Příčina neschopnosti viru infikovat buněčnou linii NRK pravděpodobně spočívá v nízké expresi RatPAR mRNA.

Buňky Q6T byly transdukovány chimérickými receptory, sestavenými z části myšího nefunkčního MuPAR a zbytku lidského HuPAR-2. Buňky byly následně infikovány (eGFP)PERV-A a exprese eGFP byla stanovena a analyzována. Byla tak nalezena mutace L109P v MuPAR, která koreluje se schopností PERV infikovat buňky (MATTIUZZO *et al.*, 2007). Leucin na pozici 109, klíčový pro vazbu PERV partikule na receptor, se nachází ve druhé extracelulární smyčce multimembránového u lidského proteinu HuPAR-2. Tento výsledek byl nezávisle potvrzen studií, kterou provedli MARCUCCI a spolupracovníci (2009). I zde byly použity chimérické proteiny myšího MuPAR a lidského HuPAR-2 receptoru. Nicméně MARCUCCI a spolupracovníci poukazují, že pro vstup viru do buňky je také kritická 135 aminokyselin dlouhá N-koncová sekvence HuPAR-2 která obsahuje 7 dalších aminokyselinových zbytků ovlivňujících vazbu viru na receptor.

Uplatnit laboratorní myš jako organismus pro studium infekce PERV během xenotransplantace není možné z důvodu nepřítomnosti funkčního receptoru. Proto se MARTINA a spolupracovníci (2006) pokusili připravit transgenní FVB/Nj myši, heterozygotní pro lidský HuPAR-2 receptor, jehož exprese byla pod kontrolou silného CMV promotoru. Největší exprese dosáhl HuPAR-2 v ledvinách, mozku a slezině myši. Rekombinantní PERV-A 14/220 virus produktivně infikoval *in vitro* primární buňky transgenních myši

a všechny testované myši byly taktéž *in vivo* produktivně infikovány. Transgenní myš lze tedy využít pro studium rizik xenotransplantací.

3.3.6 Rekombinantní izoláty PERV

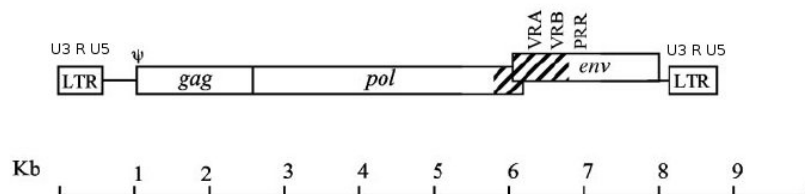
WILSON a spolupracovníci (1998) dokázali pomocí kombinace mitogenů forbolmyristátu-acetátu (*phorbol myristate acetate*, PMA) a fytohemagglutininu (*phytohemagglutinin*, PHA) aktivovat expresi replikačně kompetentních PERV u PBMC dvou plemen miniaturních prasat. Buňky 293T produktivně infikovaly viry přenesené kokultivací s PBMC z NIH-miniaturního prasete (*national institutes of health*, NIH), které byly označeny jako NIH-1°. Autoři provedli pasáž NIH-1° viru na dalších buňkách 293T a získaný virus nazvali NIH-2° (WILSON *et al.*, 2000). Pseudotypizací NIH-1° a NIH-2° částic WILSON a spolupracovníci (2000) změřili infekční titr obou virů a zjistili, že NIH-2° viry byly 4 až 5 krát více infekční než NIH-1°. Ve snaze vysvětlit rozdíl v infekčnosti NIH-1 a NIH-2 virů, detekce exprese PERV tříd byla provedena. Pomocí RT-PCR s primery specifickými na *env* jednotlivých PERV tříd a sondami pro jednotlivé třídy bylo zjištěno, že viry produkováné jak aktivovanými tak neaktivovanými PBMC z NIH miniaturního prasete byly pozitivní na všechny tři třídy PERV. PERV-A a PERV-C specifické sekvence byly detekovány u NIH-1° virů, zatímco u NIH-2° virů byl detekován jen PERV-A. Nicméně, sekvenací klonů NIH-1° a NIH-2° virů bylo prokázáno, že v obou případech dominují PERV-A/C rekombinantní viry. Typovou sekvencí rekombinant se stal klon 1.15, který obsahoval celou sekvenci SU podjednotky a N-koncovou část TM podjednotky obalového proteinu z PERV-A. Devadesát C-koncových aminokyselin TM podjednotky, podobně jako LTR, *gag* a *pol* oblast byly odvozeny z PERV-C.

PBMC z miniaturních prasat všech haplotypů pro hlavní antigen leukocytů (haplotypy a/a, c/c, d/d) a jejich rekombinant (g/g, h/h, k/k) během kokultivace přenášely PERV na lidské buňky 293. Tyto endogenní retroviry jsou souhrně označovány jako lidské replikačně kompetentní PERV (*human tropic replication-competent*, HTRC). Nicméně, rozdíly mezi jednotlivými haplotypy prasat ve frekvenci přenosu HTRC PERV byly nalezeny (OLDMIXON *et al.*, 2002). Rozdíly v expresi jsou také zaznamenány mezi prasaty v rámci haplotypu. Autoři studie tak rozlišili uvnitř inbredních kmenů miniaturní prasata netrans-

mitující (tj. jejichž PBMC přenáší PERV pouze na buňky ST-IOWA) a transmitující (jejichž PBMC přenáší PERV také na lidské buňky 293T, tedy produkující HTRC PERV). OLDMIXON a spolupracovníci (2002) v kokultivační eseji dále zjistili, že všechny HTRC PERV představovaly PERV-A/C rekombinanty, které se daly rozdělit do tří podskupin. Nicméně, rekombinanty vždy obsahovaly *gag*, *pol* a část *env* transmembránové sekvence pocházející z PERV-C, zatímco sekvence *env* odpovídající RBD pocházela z PERV-A.

BARTOSCH a spolupracovníci (2004) molekulárně charakterizovali jeden rekombinantní klon PERV-A/C (PERV-A 14/220 klon), který představoval HTRC přenesený kokultivací z PBMC miniaturního prasete haplotypu c/c na lidské buňky 293 (OLDMIXON *et al.*, 2002). Provirová sekvence PERV-A 14/220 činí 8188 párů bazí. Porovnání sekvence PERV A14/220 s PERV-C (Cmsl) odhalilo vysokou homologii s výjimkou 850 bp dlouhého úseku, který zahrnoval přechod mezi *pol* a *env* oblastmi (včetně RBD). Tento úsek byl vysoce homologní k provirům PERV-A Ap60 a PERV-A (A130), což vypovídá o jediné rekombinační události, jímž vznikla vysoce infekční rekombinanta. BARTOSCH a spolupracovníci (2004) také zjistili, že překvapivě PERV-A (Ap60) je pravděpodobně rekombinanta PERV-B, která získala *env* gen od PERV-A.

BARTOSCH a spolupracovníci (2004) obdrželi celkem sedm rekombinant (včetně PERV-A 14/220. Sekvence *env* genu rekombinant osekvenovali a prodrobili srovnávací analýze za účelem identifikace míst rekombinace. Autoři nenalezli žádné preferované místo pro rekombinaci, k rekombinaci tak může docházet kdekoliv v *env* a jedinou podmínkou je, aby se generovala rekombinanta, která bude sdílet nepoškozený gen s oblastmi determinujícími tropismus pro lidské buňky.



Obr. 9: **Mapa rekombinantního proviru PERV-A 14/220.** Šrafovaná část proviru odpovídá sekvenci příbuzné PERV-A. Zbylá část proviru je odvozená z PERV-C. Převzato a upraveno podle HARISSON *et al.* (2004).

Přítomnost HTRC PERV v genomu miniaturního prasete se stala předmětem rozsáhlé diskuse. BARTOSCH a spolupracovníci (2004) našli v genomové DNA miniaturních prasat provirové sekvence rekombinant odlišných od HTRC a nezkrácený PERV-A provirus, narušený v sekvenci kódující transmembránovou podjednotku. To značí, že rekombinantní HTRC PERV vznikaly během kokultivace buněk právě z těchto sekvencí. Genomové knihovny z PBMC pocházejících z inbredních miniaturních prasat d/d haplotypu s transmitujícím nebo netransmitujícím fenotypem posloužily k prošetření přítomnosti PERV-A/C rekombinant (SCOBIE *et al.*, 2004).

Nicméně, v této studii se screeningem nepodařilo nalézt žádnou rekombinantu PERV-A/C v genomové DNA. Také WOOD a spolupracovníci (2004) nedetekovali rekombinantní PERV-A/C virus v genomu PBMC transmitujícího prasete, ačkoliv RNA izolovaná ze stejných buněk byla na rekombinantní PERV-A/C pozitivní. Ujal se tak názor, že vysoce infekční rekombinantní PERV vzniká v průběhu kokultivační eseje.

Nicméně, opačného výsledku dosáhli MARTIN a spolupracovníci (2006). Detekovali dvě PERV-A/C rekombinanty v genomové DNA pocházející z různých orgánů (ledviny, srdce, játra, slezina, lymfatické uzliny, PBMC) čtyř transmitujících prasat. Tyto rekombinanty jsou ale odlišné od PERV-A 14/220.

WOOD a spolupracovníci (2004) rozlišili další skupinu miniaturních prasat, když zkoumali dědičnost transmitujícího fenotypu. Kromě prasat s transmitujícím nebo netransmitujícím fenotypem, objevili tzv. null fenotyp, tj. takové miniaturní prase, jehož PBMC nepřenášely PERV na lidské ani prasečí buňky během *in vitro* kokultivace. Null fenotyp se objevil u potomků vzniklých křížením transmitujícího prasete s netransmitujícím. Bylo zjištěno, že PBMC z prasat s null fenotypem vykazují velmi nízkou až žádnou produkci PERV partikulí, a to i přes snahu zvýšit expresi PERV stimulací PBMC různými mitogeny. Oproti tomu, PBMC z transmitujících i netransmitujících prasat produkovala ekvivalentní množství viru. Null fenotyp u prasat byl sledován až do třetího roku od jejich narození, přesto zbývá vyřešit otázku, zda transmitující, netransmitující a null fenotypy u prasat přetrvávají v průběhu jejich života a jakým způsobem jsou udržovány.

3.3.7 Determinanty zvýšené replikační schopnosti PERV-A/C

DENNER a spolupracovníci (2003) pasážovali NIH-virus na buňkách 293T. Po každé pasáži se infekční titr zvýšil. Virus se tak velmi rychle adaptoval na prostředí lidských buněk. DENNER a spolupracovníci (2003) vyšetřovali změny v LTR oblasti, kterými virus, replikující se v lidských buňkách, procházel. Délka LTR se v průběhu pasážování na lidských buňkách prodlužovala – zatímco u třetí pasáže viru činila délka LTR 1093 nukleotidů, při páté pasáži dosahoval LTR velikosti až 1253 nukleotidů. Rozdíl v délce LTR byl dán duplikací oblasti přímého opakování. Tato sekvence je odlišná u PERV tříd; oblast přímého opakování LTR PERV-C je dlouhá 37 nukleotidů a obsahuje vazebné místo pro NF-Y faktor. U třetí pasáže viru (virus NIH-3) LTR obsahoval jedno přímé opakování, zatímco u čtvrté pasáže (virus NIH-4) to byly dvě kopie a u páté pasáže (virus NIH-5) obsahoval LTR čtyři až pět kopií přímého opakování. Vzrůstající počet přímých opakování pozitivně koreloval se vzrůstající expresí kontrolního genu pro luciferázu, pokud byl pod kontrolou jednotlivých LTR. Počet přímých opakování v LTR oblasti tak souvisí s lepší schopností replikace PERV na lidských buňkách.

WOOD a spolupracovníci (2009) vyšetřovali příčiny rozdílu infekčního titru mezi PERV-A PK a PERV-A 14/220 u VSV-G pseudotypovaných partikulí. Zkonstruovali PERV A14/220 viry, které obsahovaly sekvence kódující proteázu, integrázu a reverzní transkriptázu z PERV-A PK. Rekombinanta PERV-A 14/220 s vloženou proteázovou a integrázovou sekvencí z PERV-A PK nevykazovala rozdíl v infekčním titru, zatímco rekombinanta PERV-A 14/220 s vloženou sekvencí pro reverzní transkriptázu z PERV-A PK měla titr snížený na úroveň PERV-A PK. Autoři usuzují, že reverzní transkriptáza pocházející z PERV-C je aktivnější než z PERV-A pravděpodobně z důvodu, že je evolučně mladší molekulou.

HARRISON a spolupracovníci (2004) zjistili, že buňky 293T transfekované rekombinantou PERV-A 14/220 produkovaly 500-krát více infekčních virových partikulí než buňky transfekované prototypy PERV-A (PERV-A Ap60) a PERV-B (PERV-B Bp17). Pokud vědci nahradili gen pro obalový protein za IRES-GFP u PERV-A 14/220 a PERV-A

Ap60, pak na VSV-G pseudotypizovaných partikulích naměřili jen nepatrný rozdíl v infekčnosti. Pokud ale srovnali PERV obalové proteiny, rozdíl v infekčnosti byl více než 1000-krát vyšší, což podporovalo názor, že determinanta zodpovídající za vyšší infekčnost viru se nachází v rekombinantním obalovém proteinu. Nahrazením sekvence *env* kódující rekombinantní obalový protein PERV-A 14/220 oblastmi *env* z PERV-A Ap60 a stanovením infekčních titerů pro viry nesoucí chimérické obalové proteiny bylo překvapivě zjištěno, že determinanty zodpovědné za rozdíl v infekčnosti viru se nachází v PERV-C i PERV-A odvozených částí rekombinantního proteinu.

Porovnáním aminokyselinové sekvence prototypu PERV-A s N-koncovými 216 aminokyselinami z rekombinantního PERV-A 14/220 byly nalezeny rozdíly ve 2 aminokyselinách. Cíleně-řízenou mutagenezí obou zbytků bylo zjištěno, že nahrazení izoleucinu na pozici 140 za valin (I140V) v PERV-A 14/220 chimérickém proteinu obnovilo infekčnost viru na původní úroveň. Valin na pozici 140 se nachází jak u PERV-A 14/220, tak i u PERV-NIH, zatímco u PERV-A provirů se na stejném místě nachází izoleucin. Ačkoli se valin na pozici 140 nachází v receptor-vazebné doméně podjednotky SU, strukturně se nachází na opačné straně od oblastí VRA a VRB, které přímo interagují s receptorem na buněčném povrchu. Způsob, jakým záměna I140V ovlivňuje vazbu na receptor tak není vyřešen.

Determinanta v PERV-C odvozené oblasti PERV-A 14/220 byla zmapována do oblasti PRR a podílela se rovným dílem na zvýšení infekčnosti rekombinantního PERV-A 14/220 izolátu při srovnání s mutací I140V. PRR je flexibilní oblast, která umožňuje pohyb podjednotky SU směrem k receptoru.

3.4 Restrikční faktory působící proti prasečím endogenním retrovirům

V boji proti infekci PERV může významnou roli hrát skupina buněčných proteinů tzv. antiretrovirových faktorů (přehledně MEIJE *et al.*, 2010). Restrikční faktory účinkují na různých stupních replikačních cyklů virů. Ukázaly se být účinné zejména proti obalovým virům (retroviry, filoviry). Restrikční faktory jsou druhově specifické, tzn. že restrikční faktor daného druhu působí proti spektru virů, zatímco u jiného druhu může též restrikční faktor působit na viry jiné.

Doposud byly objeveny apolipoprotein B mRNA-editující katalytický polypeptid (*apolipoprotein B mRNA-editing catalytic polypeptide*, APOBEC), protein 5 α obsahující tripartitní motiv (*tripartite motif-containing protein 5*, TRIM5 α), protein 28 obsahující tripartitní motiv (*tripartite motif-containing protein 28*, TRIM28), antivirový protein zinkového prstu (*zinc-finger antiviral protein*, ZAP), tetherin a protein obsahující domény sterilního alfa motivu a HD (*sterile alpha motif domain- and HD domain-containing protein 1*, SAMHD1). APOBEC je cytidin-deaminázou, která zavádí při reverzní transkripci mutace do nově vznikajícího řetězce minus DNA. TRIM5 α asociuje s virovou kapsidou a směřuje ji k degradaci proteazomovou mašinérií. TRIM28 se podílí na umlčování transkripce proviru. ZAP degraduje virovou RNA. Tetherin působí na buněčné membráně a brání v pučení virionů. SAMHD1 je hydroláza, která degraduje nukleotidy v infikované buňce.

Studie účinku restrikčních faktorů vůči PERV jsou teprve na začátku, přesto přináší zajímavé výsledky (viz dále). Doposud byla studována aktivita tetherinu, TRIM5 α a APOBEC3G vůči PERV.

3.4.1 Rodina APOBEC3

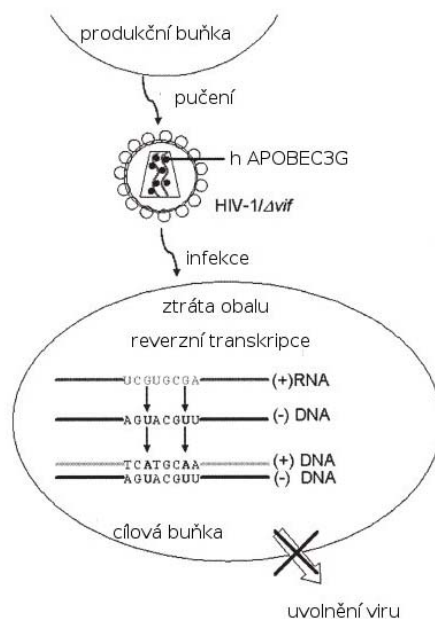
V genomu savců (například u myši) se nachází jen jeden člen rodiny APOBEC3. Výjimku tvoří primáti, u nichž zřejmě v nedávné minulosti došlo k duplikaci, neboť na syntením místě genomu se nachází až 7 genů APOBEC3 v jediném clusteru (JARMUZ *et al.*, 2002), které jsou navíc pod silným selekčním tlakem. Členové rodiny APOBEC3 dostali název z důvodu vysoké homologie ke genům APOBEC1, APOBEC2 a AID. APOBEC1 má svůj název odvozený od funkce, tj. edituje C na U na dvou místech v mRNA pro poli-

poprotein B. Editace na cytozinu na pozici 6666 zavádí předčasný stop kodón, role zkrácené verze apoB proteinu není známa (WEDEKIND *et al.*, 2003).

Funkce APOBEC3 byla objevena na základě série prací s mutantním virem HIV, který postrádal funkční virový infekční faktor (*viral infection factor*, Vif). Mutantní HIV se nereplikoval v primárních CD4⁺ T-lymfocytech stejně jako v makrofázích a stejný výsledek byl dosažen i u leukémické buněčné linie CEM (GABUZDA *et al.*, 1992). Blízce příbuzná linie CEM-SS byla pro HIV postrádající Vif permissivní a rozdíl mezi těmito dvěma liniemi využili SHEEHY a spolupracovníci (2002) k nalezení cDNA kódující CEM15 gen, který byl posléze přejmenován na APOBEC3G.

APOBEC3G je cytidin deamináza, která provádí deaminaci cytosinu na uracil v mínus řetězci replikující se virové RNA. Deaminace cytosinu v mínus řetězci se projeví záměnou guaninu za adenin v provirové dvouvláknové DNA. Hypermutovaná provirová DNA není kódující a replikace viru je terminována (obr. 9). Viry se ale působení APOBEC3G brání. Například protein Vif viru HIV ubikvitinuje APOBEC3G a tím jej směřuje k degradaci proteazomovou mašinérií.

APOBEC3F o velikosti 373 aminokyselin byl nalezen u zástupců sudokopytníků. Prasečí, ovčí a kraví APOBEC3F obsahují dvě deaminázové domény, nicméně prasečí APOBEC3F je unikátní ve výskytu na serin bohatou C-koncovou extenzi. Všechny APOBEC3F mají funkční deaminázovou aktivitu a vyskytují se predominantně v cytoplazmě (JÓNSSON *et al.*, 2006).



Obr. 9: **Působení lidského APOBEC3G na virus HIV-1/Δvif.** Během reverzní transkripce jsou zaváděny mutace prostřednictvím molekuly APOBEC3G přítomné ve virové nukleokapsidě. Převzato a upraveno podle SHEEHY *et al.* (2002).

Buňky PK-15 stabilně transfekované konstruktem kódující lidský APOBEC3G účinně brání v přenosu PERV-B na buňky 293T (JÓNSSON *et al.*, 2007). JÓNSSON a spolupracovníci (2007) se obávali, že exprese lidského APOBEC3G bude podobně jako v jiných heterologních systémech vyvolávat hypermutace v hostitelské genomové DNA. Nicméně, v prasečích buňkách je lidský APOBEC3G lokalizován v cytoplasmě, a proto nehrozí poškození genomu a vyvolání nádorů v hostitelských buňkách. Buněčná linie PK-15 také exprimuje prasečí APOBEC3F. Avšak overexprese prasečího APOBEC3F neovlivnila přenos PERV, z čehož vědci usuzují, že PERV je odolný vůči působení prasečího APOBEC3F. Informace v tomto odstavci jsou v souladu s obecným tvrzením, že virus který se neadaptoval na daný druh savce, je citlivý vůči jeho APOBEC. APOBEC je tedy silným nástrojem v boji proti zoonózám. Nicméně v rozporu s tím, DÖRRSCHUCK a spolupracovníci (2008) prokázali, že prasečí APOBEC3F účinně brání v propagaci PERV-B. Buňky 293T exprimující lidský APOBEC3G nebo prasečí APOBEC3F nebyly infikovány PERV-B.

Přestože se data o účinnosti prasečího APOBEC3F vůči PERV odlišují, je prokázáno, že lidský APOBEC3G účinně brání v infekci PERV. Zajímavostí je, že linie buněk

293T, široce používaná pro infekce PERV, neexprimuje lidský APOBEC3G (SHEEHY *et al.*, 2002). Zavedení lidského APOBEC3G do prasete bez ovlivnění fenotypu hostitele by mohlo výrazně snížit riziko přenosu PERV, v této oblasti však nebyly publikovány žádné výsledky.

3.4.2 Tetherin

Tetherin (též BST-2, CD317, HM1.24) je multifunkční membránový protein typu II s GPI kotvou na C konci. I. Exprese tetherinu je indukovatelná IFN α . Funkce tetherinu byla objevena při charakterizaci virového proteinu U (*viral protein U*, Vpu) viru HIV-1. V případě, že protein Vpu nebyl exprimován, HIV-1 partikule byly zachyceny na povrchu infikované buňky (NEIL *et al.*, 2008). Tetherin brání v pučení retrovirových partikulí. Tetherin působí kromě retrovirů, také proti filovirům a arenavirům.

Expresa tetherinu je různorodá mezi lidskými buněčnými liniemi. MATTIUZZO a spolupracovníci (2010) porovnávali expresi prasečího a lidského tetherinu. Zjistili, že prasečí buněčné linie MPK, ST-IOWA a PK-15 se v úrovni exprese tetherinu neodlišují. Prasečí tetherin byl exprimován v 35 násobném množství ve srovnání s linií 293T, ale 5x nižší oproti buňkám HeLa. Jinými slovy, úroveň exprese lidského tetherinu v buňkách 293T je velmi nízká. Autoři dále kotransfekovali plazmid obsahující PERV s plazmidem obsahujícím sekvencí lidského nebo prasečího tetherin do buněk 293T. Tento experiment prokázal, že lidský i prasečí tetherin snižovaly množství maturovaných PERV partikulí v buněčném supernatantu. Některé lidské buňky (například 293T) tak mohou infikovány, neboť v nízkém množství exprimují účinný tetherin. V návaznosti na infekci a interferonové odpovědi může být tetherin overexprimován. Exogenní zavedení overprodukce tetherinu v xenotransplantátech tak může zvýšit úroveň bezpečnosti během xenotransplantace.

3.4.3 TRIM5 α

TRIM5 α působí v časně fázi infekce buňky retrovirem, pravděpodobně před reverzní transkripcí. ANDERSON a spolupracovníci (2006) navrhli model působení TRIM5 α . TRIM5 α interaguje s virovou kapsidou rozpoznáním kapsidového proteinu. Obalené viro-

vé kapsidy jsou degradovány proteazomovou mašinérií nebo jsou odděleny za pomoci TRIM5 α do obalených kompartmentů a nemohou vstoupit do jádra.

WOOD a spolupracovníci (2009) testovali citlivost PERV vůči faktorům TRIM5 α z různých druhů organismů. PERV-A 14/220 a PERV-PK gag-pol sekvence byly pakážovány s GFP-kódujícím genomem MLV a pseudotypovány VSV-G. Víry byly následně titrovány na linii kočičích ledvinných buněk (*feline kidney cell line*, CRFK) exprimujících TRIM5 α z člověka (*Homo sapiens*), makaka rhesus (*Macaca rhesus*), kočkodana (*Chlorocebus sabaeus*), kotula (*Saimiri sciureus*), králíka (*Oryctolagus cuniculus*) a tura domácího (*Bos primigenius* f. *taurus*). Žádný z faktorů výrazně nesnížil titr viru. Nejúčinnější TRIM5 α faktor pocházel z člověka, ačkoliv zde titr viru byl jen 3x snížen oproti kontrole. PERV se považují za insenzitivní vůči TRIM5 α podobně jako ostatní gammaretroviry. TRIM5 α je naopak velmi účinný proti lentivirům, například TRIM5 α makaka rhesus účinně brání v infekci HIV-2 (YLINEN *et al.*, 2005).

4 Materiály a metody

4.1 Práce s buněčnými kulturami

4.1.1 Buněčné linie

293T buněčná linie (lidská embryonální ledvinná linie, HEK) je 293 linie transformovaná T antigenem z viru SV40. Buňky 293T se snadno transfekují, ale nesou neomycinovou rezistenci. Tyto buňky jsou permisivní pro PERV-A.

BeWo buněčná linie byla zakoupená z Evropské kolekce buněčných kultur (ECACC, Salisbury, UK), pod katalogovým číslem 86082803. Buňky lidského choriokarcinomu se vyznačují vysokou expresí mnoha HERV (lidských endogenních retrovirů) včetně lokusu ERVWE-1, který kóduje funkční protein – Syncytin-1.

ST-IOWA buněčná linie je prasečí linie buněk varlat pocházejících z miniaturního prasete z IOWY. Neprodukuje mRNA specifickou pro PERV-C, lze ji tak využít k ověření replikační schopnosti PERV-C.

MAX Efficiency® Stbl2 kompetentní buňky (Invitrogen). Tyto buňky jsou derivátem kmene JM109. Jsou vhodné pro klonování nestabilních inzertů, zvláště retrovirového původu, nebo přímých opakování. Nejsou vhodné pro α -komplementaci. Kultivují se v SOC nebo LB médiu při teplotě pod 30°C.

Genotyp: *F' mcrA* $\Delta(mcrBC-hsdRMS-mrr)$ *recA1 endA1lon gyrA96 thi supE44 relA1* λ - $\Delta(lac-proAB)$.

XL1-Blue MRF' superkompetentní buňky (Stratagene). Jsou derivátem XL1-Blue buněk. Buňky umožňují barevné odlišení transformant, je-li jejich genetická informace komplementována vhodným plazmidem (α -komplementace). Nesou kanamycinovou rezistenci. Kultivují se v SOC nebo LB médiu při teplotě 37°C.

Genotyp: $\Delta(mcrA)183$ $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$ *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac* [*F' proAB lacI^qZAM15 Tn10 (Tet^r)*].

4.1.2 Kultivační média

Každé kultivační médium se skládá ze dvou částí, z báze a přísad. Báze je pro všechna média stejná a skládá se z vody a Dulbecco's eagle medium (D-MEM) které míchám v poměru 1:1. 5,6% roztok NaHCO₃ jsem přidal do finální koncentrace 1%.

V případě buněk **293T** a **ST-IOWA** jsem bázi obohatil o:

10% fetální telecí sérum (Sigma)

antibiotika, tj. Streptomycin sulfát 0,1 mg/ml (Sigma) a Penicilin G draselná sůl 100 i.u./ml (Sigma), rozpuštěné v PBS

roztok fungicidu, tj. Amphotericin B (Sigma) 2.5mg/ml rozpuštěný ve vodě

V případě buněk **BeWo** jsem bázi obohatil o:

10% fetální telecí sérum (Sigma)

5% telecí sérum (Sigma)

roztokem glutaminu ve vodě, 100x koncentrované (30 mg/ml)

roztokem antibiotik a fungicidinu (viz. médium pro 293T a ST-IOWA buňky)

Ke kultivaci bakterií jsem používal Luria-Bertani (LB) tekuté médium, LB agar a optimální růstové médium s katabolickou represí (*super optimal broth with catabolite-repression*, SOC médium).

Médium LB jsem připravil smícháním 10 g tryptonu, 5 g extraktu z kvasinek a 10 g NaCl v 1 l destilované H₂O. Médium jsem následně autoklávoval.

Médium SOC jsem připravil smícháním 10 ml 2 M glukózy s 990 ml optimálního růstového média (*super optimal broth medium*, SOB) a médium jsem následně filtroval přes filtr s velikostí pórů 0,45 µm. Médium SOB obsahuje 2% trypton, 0,5% extrakt z kvasinek, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂ a 10 mM MgSO₄. Během přípravy jsem neúplné médium sterilizoval autoklávováním a teprve poté jsem do něj přidal soli o výsledné koncentraci 10 mM MgCl₂ a 10 mM MgSO₄. Následně jsem SOB médium filtroval přes filtr s velikostí pórů 0,45 µm.

4.1.3 Kultivace buněk, rozmrazování buněk

Ampule se zmraženými 293T, ST-IOWA a BeWo buňkami jsem nechal rozmrazit v 37 °C lázni. Buňky jsem smíchal s 1 ml růstového média a stočil 10 minut při 200 g. Supernatant, který obsahoval toxické DMSO, jsem vylil do odpadu a buňky jsem resuspendoval ve 3 ml komplexního média a vysel na P35 misku. Všechny buňky jsem kultivoval při 37 °C a v prostředí 5% CO₂.

4.1.4 Pasážování buněk

Buňky byly pasážovány 1-2× týdně. Nejprve jsem se zbavil média a buňky opláchl 1× PBS roztokem o pokojové teplotě. Následně jsem na buňky aplikoval směs 0,5% trypsinu s 0,002% EDTA v poměru 1:1 (na P60 misku (500ul) nebo P35 misku (250 μl) a nechal působit 2-5 minut při 37°C). Uvolněné buňky jsem resuspendoval v kultivačním médiu a část z nich jsem vysel zpět na P60 misku ($1,0 \cdot 10^6$) nebo P35 misku ($4,0 \cdot 10^5$ buněk).

4.1.5 Lipofekce a selekce buněk

Buňky jsem transfekoval cizorodou DNA metodou lipofekce pomocí FuGENE HD (Roche).

24 hodin před lipofekcí jsem do jamky 6-jamkového plata vysel 150 000 buněk. V případě buněk 293T bylo dno jamek minimálně hodinu předem polylyzováno. Buňky jsem kultivoval ve 2 ml komplexního média. Hodinu před lipofekcí jsem vyměnil médium obohacené o antibiotika a fungicidin za 1,9 ml média bez těchto látek. 1 až 3 μg linearizované a purifikované plazmidové DNA jsem smíchal s bezsérovým médiem OPTI-MEM®. Poté jsem do transfekční směsi opatrně přikapával různá množství FuGENE HD do finálního objemu 100 μl na jamku. Připravenou transfekční směs jsem promíchal krátkým vortexováním a nechal odležet na 15 minut. Poté jsme směs opatrně nakapal na buňky. Negativní kontrolou byly buňky netransfekované a vystavené selekčnímu tlaku.

Pro transfekci jsem zkoušel různé poměry DNA ku transfekčními činidlu a dále i různý začátek selekce (v případě stabilní transfekce). Všechny připravené transfekční směsi jsou zahrnuty v níže uvedených tabulkách.

Kotransfekce buněk 293T s dvojicí plazmidů pGL3 – CMV- β -gal byla provedena v poměru 3:2 (poměr FuGENE vůči množství transfekované) ve všech případech (tab. 4.1).

poměr činidla	3:2
DNA (pGL3_LTR)	1 μ g
DNA (CMV-β-gal)	1 μ g
OPTI-MEM®	do 100 μ l
FuGENE HD	3 μ l

Tabulka č. 4.1: **Složení kotransfekční směsi s methylovaným (nemethylovaným) pGL3_LTR plazmidem.**

Stabilní transfekce plazmidů s nezkrácenými provirovými sekvencemi byly provedeny. Předpisy pro všechny použité transfekční směsi jsou zahrnuty v níže uvedených tabulkách (tab 4.2 až 4.). Schémata transfekcí jsou uvedena ve výsledcích (obr. 5.22, 5.23 a 5.26)

Selektované subklony buněk jsem značil např. H5623M. Toto značení v sobě zahrnuje zahrnuje informaci o druhu buněk, poměru činidla, doby selekce od transfekce, individuálním čísle klonu a typ transfekovaného viru. Označení klonu H5623M tak znamená, že buňky HEK (H5623M) byly selektovány pátý den od transfekce (H5623M), transfekovány v poměru 6:2 (H5623M), jednalo se o třetí klon z dané jamky (H5623M) a transfekován byl provirem MAMBA (H5623M). Po druhé transfekci by zavedené označení bylo příliš dlouhé (např. H5623M-H5622C). Navíc, subklony byly vždy pozitivní pouze na jeden typ proviru. Proto jsem 11 dvojité selektovaných subklonů buněk označil čísly 10-21. Z těchto subklonů jsem vybral buňky (č. 10, 11, 13 a 16) pro transientní transfekci v poměrech 3:2 a 5:2.

Klony buněk BeWo B4312M a B4611M byly transfekovány pouze tranzientně PERV-C.

poměr činidla	6:2	8:2
DNA PERV-A MAMBA	2 µg	2 µg
OPTI-MEM®	do 100 µl	do 100 µl
FuGENE HD	6 µl	8 µl

Tabulka č. 4.2: **Složení transfekční směsi pro lipofekci buněk 293T provirem PERV-A MAMBA.** Dva poměry FuGENE HD a plazmidové DNA byly použity (6:2 a 8:2).

poměr činidla	3:1	6:1
DNA PERV-A MAMBA	1 µg	1 µg
OPTI-MEM®	do 100 µl	do 100 µl
FuGENE HD	3 µl	6 µl

Tabulka č. 4.3: **Složení transfekční směsi pro lipofekci buněk BeWo provirem PERV-A MAMBA.** Dva poměry FuGENE HD a plazmidové DNA byly použity (3:1 a 6:1).

poměr činidla	6:2	5:2	6:1
DNA PERV-C 1312	2 µg	2 µg	1 µg
OPTI-MEM®	do 100 µl	do 100 µl	do 100 µl
FuGENE HD	6 µl	5 µl	6 µl

Tabulka č. 4.4: Složení transfekční směsi pro **lipofekci buněk 293T-MAMBA provirem PERV-C 1312** (druhá lipofekce 293T). Stejná lipofekce byla provedena pro každý subklon buněk (subklony H8622M, H5621M, H5623M, H5624M).

poměr činidla	9:3	6:1	4:1
DNA PERV-C 1312	3 µg	1 µg	1 µg
OPTI-MEM®	do 100 µl	do 100 µl	do 100 µl
FuGENE HD	9 µl	6 µl	4 µl

Tabulka č. 4.5: **Složení transfekční směsi pro lipofekci buněk BeWo-MAMBA provirem PERV-C 1312.** Prováděno s klony B4611M, B4612M, B4613M a B4312M.

poměr činidla	3:2	5:2
DNA PERV-C 1312	2 µg	2 µg
OPTI-MEM®	do 100 µl	do 100 µl
FuGENE HD	3 µl	5 µl

Tabulka č. 4.6: **Složení transfekční směsi pro lipofekci (transientní transfekci).** 293T-MAMBA subklony (č. 10, 11, 13 a 16) a BeWO-MAMBA subklony (B4312M, B4611M) byly transfekovány PERV-C 1312.

Buňky byly selektovány ZeocinemTM (Invitrogen) nebo Hygromycinem B (Invitrogen). Použité koncentrace antibiotik byly 200 µg/ml (zeocin) nebo 300 µg/ml (Hygromycin B).

4.1.6 Infekce buněk

Supernatant z transfekovaných buněk (případně infikovaných buněk), tj. buněk pozitivních na expresi PERV RNA, jsem pipetoval a filtroval přes 0,45 µm filtr. Celkem 3 ml supernatantu bylo získáno z každé kultivace. Supernatant jsem smíchal s čerstvým médiem v poměru 1:1 a do směsi jsem přidal polybren (výsledná koncentrace 8 µg/ml). Směs jsem aplikoval na nové buňky. Po 24 hodinách jsem médium vyměnil za nové.

4.1.7 Měření aktivity luciferázy a β -galaktosidázy

Buňky 293T jsem lyzoval 48 hodin po transfekci. Nejprve jsem buňky opláchl ledovým PBS a přidal 600 μ l lyzačního pufru z kitu pro CAT analýzu (Promega). Poté jsem vzniklou směs nechal třepat po dobu 20 minut při pokojové teplotě. Lyzát jsem centrifugoval (10 min, 16000 g, 4°C).

Pro stanovení aktivity β -galaktosidázy jsem připravil následující směs:

supernatant z buněčného lyzátu	30 μ l
fosfátový pufr 0,1 M.....	200 μ l
(pH 7,5; 41 ml 0,2 M Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O, 9 ml 0,2 M NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O, 50 ml H ₂ O)	
hořečnatý pufr 100 \times	3 μ l
(1,15 ml H ₂ O, 200 μ l 1 M MgCl ₂ , 650 μ l β -merkaptoethanol)	
roztok ortho-nitrofenyl-D-galaktopyranozidu (ONPG)	66 μ l
(pH 7,5; 80 mg ONPG, 20 ml 0,1 M NaP)	

Směs jsem inkuboval 20 až 30 minut ve vodní lázni o teplotě 37°C. Reakci jsem zastavil přidáním 500 μ l 1 M Na₂CO₃. Aktivitu β -galaktosidázy jsem měřil při vlnové délce 420 nm na spektrofotometru Beckman DU 640.

Aktivitu luciferázy jsem měřil na přístroji DLReady™ (Promega, detekční systém Berthold). Hodnota luciferázové aktivity je vztažena na aktivitu β -galaktosidázy, aby se zamezilo vlivu účinnosti transfekce na výsledek.

4.2 Práce s nukleovými kyselinami

4.2.1 Vektory

pCMV- β -gal vector (Stratagene) je savčí vysokokopiový expresní vektor, tvořený dvouvláknovou kruhovou DNA o velikosti 7164 bp (obr. 4.1). Obsahuje gen kódující β -galaktosidázu. Nese rezistenci k ampicilinu, počátek replikace (pUC), SV40 polyA signál, promotor CMV a polylinkerovou sekvenci.

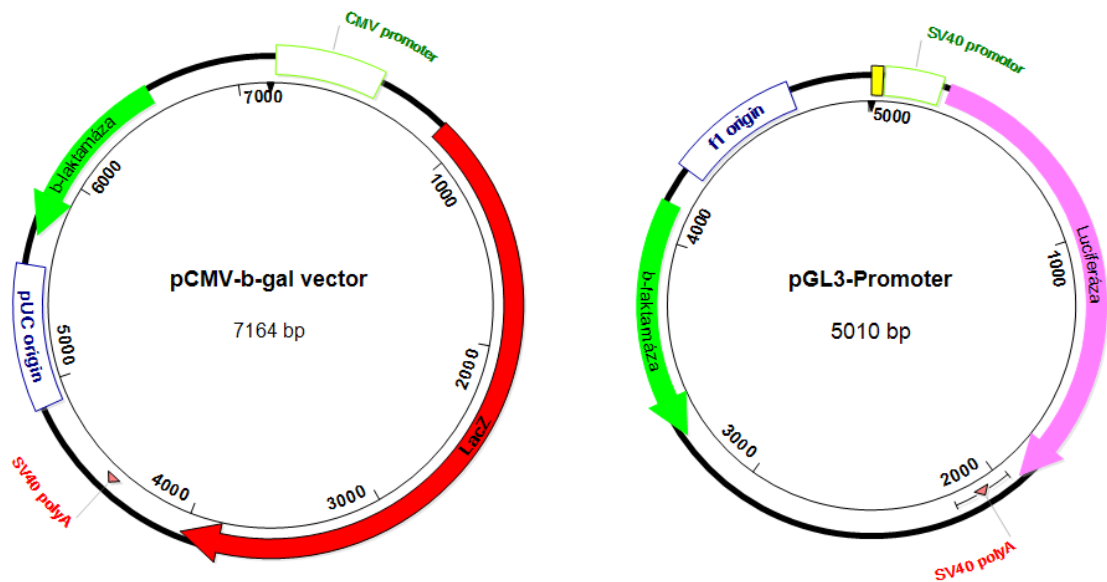
pGL3-Promoter vector (Promega) je vektor uzpůsobený ke studiu sekvencí, které regulují genovou expresi (obr. 4.1). Sekvence je vložena do polylinkeru před oblast kódující luciferázu a promotor SV40. Dále obsahuje SV40 polyA signál, gen kódující β -laktamázu a fl origin (počátek replikace). Je tvořen kruhovou dvouvláknovou DNA o velikosti 5010 bp.

pGEM®-T Easy vektor (Promega) je malý vektor charakteru dvouvláknové kruhové DNA o velikosti 3015 bp (obr. 4.2). Obsahuje fl origin a gen kódující β -laktamázu. V lacZ operonu se nachází polylinkerová sekvence, která byla v místě EcoRV linearizována a na obou stranách byly vytvořeny 1-nukleotidové T-přesahy pro AT klonování. Vektor umožňuje barevnou selekci klonů.

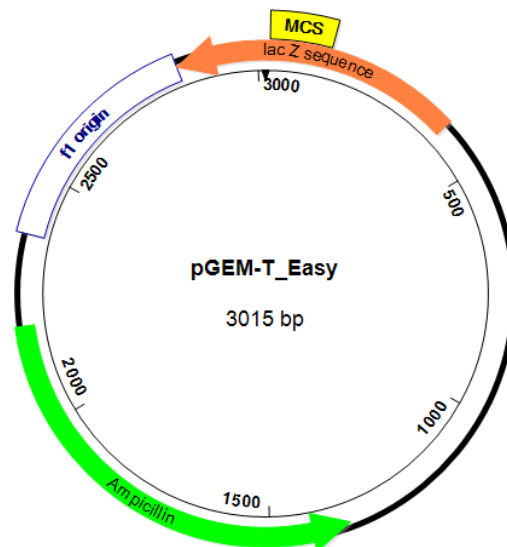
pcDNA4/TO (Invitrogen) je savčí expresní vektor tvořený dvouvláknovou kruhovou DNA o velikosti 5028 bp (obr. 4.3). Umožňuje selekci v eukaryotických buňkách, neboť obsahuje gen pro rezistenci k zeocinu. Dále nese rezistenci k ampicilinu (β -laktamáza). Polylinkerová sekvence se nachází ve směru 3' od cytomegalovirového promotoru.

pNEBR-X1 Hygro (NEB) je savčí expresní vektor tvořený dvouvláknovou kruhovou DNA o velikosti 6268 bp (obr. 4.3). Obsahuje gen *hpt* (hygromycin fosfotransferáza) pro rezistenci k hygromycinu B a gen *bla* kódující β -laktamázu (rezistence k ampicilinu). Ve směru 5' od sekvence polylinkeru se nalézá pětkrát opakující se sekvence Gal4 regulač-

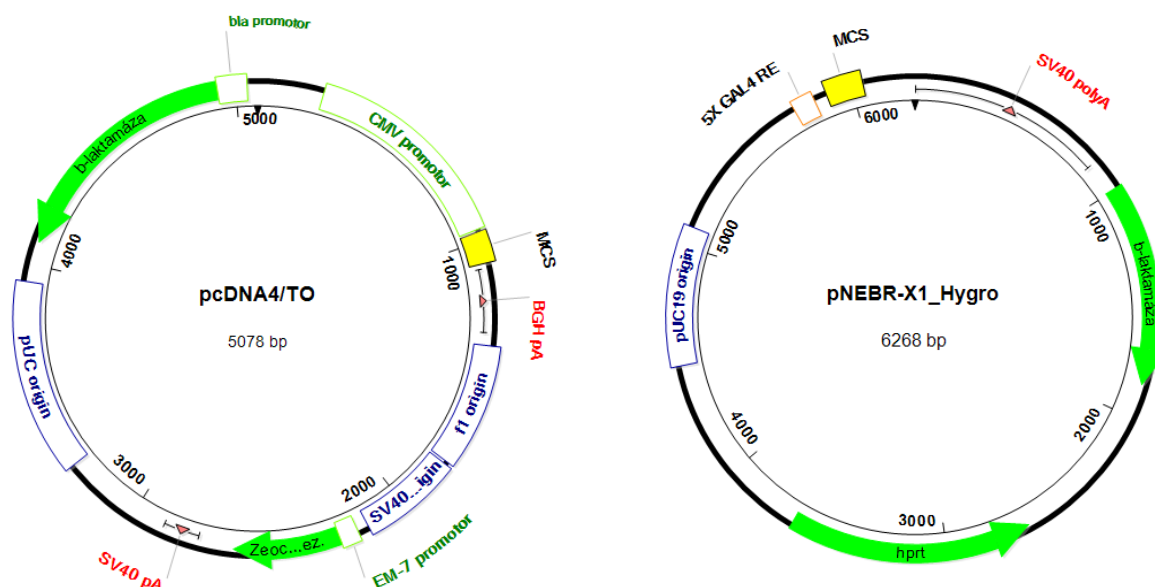
ní elementu, který umožňuje indukovanou expresi insertu. Ve směru 3' od polylinkeru je situováno SV40 polyA místo. Vektor ještě obsahuje pUC origin (počátek replikace).



Obr. 4.1 : Mapy vektorů pCMV- β -gal (vlevo) a pGL3-Promoter (vpravo).



Obr. 4.2: Mapa vektoru pGEM-T_Easy.



Obr. 4.3: Mapy vektorů pcDNA4/TO a pNEBR-X1_Hygro.

4.2.2 Izolace chromozomální DNA

Buňky rostoucí na P35 misce (1 až 4 milióny buněk) jsem zbavil kultivačního média a třikrát opláchl PBS roztokem. Poté jsem na buňky aplikoval 1 ml lyzačního roztoku (SDS 1%, EDTA 250 mM, proteináza K 1 mg/ml). Misky s buňkami jsem přenesl do třepačky na 10 minut (140 rpm, 37 °C). Vzniklý lyzát jsem z misek přepipetoval do 1,5 ml mikrozkušavky, kterou jsem za stálého otáčení inkuboval při 55 °C po dobu 2-12 hodin v hybridizační peci. Poté jsem do směsi dodal RNázu A (200 µg/ml) a mikrozkušavku jsem v hybridizační peci inkuboval další hodinu.

Když byly buňky zcela zlyzovány, přidal jsem do mikrozkušavky 500 µl fenol-chloroformového roztoku (1:1) a prudce jsem zkumavkou třepal více než 30 vteřin. Zkušavku jsem nechal odležet 3 minuty a následně směs centrifugoval (20 minut, 20000 g, 4°C). Ve zkumavce se utvořily dvě fáze – dolní chloroformová fáze obsahovala lipidy a horní vodná fáze chromozomální DNA s ionty. Na rozhraní fází se objevil bílý prsteneček z vysrážených proteinů. Část viskózní vodní fáze (300 až 500 µl) jsem opatrně přepipetoval pomocí špiček s odstříženými konci do nové 1,5 ml zkumavky. Poté jsem DNA vysrážel přidáním 0,7 objemu (tj. 210 až 350 µl) 96% ethanolu. Vysráženou DNA jsem zcentrifugoval (10 minut, 20000 g, 4 °C) a nechal oschnout na vzduchu. Přidáním 50-150 µl TE pufru (podle velikosti peletu) jsem DNA rozpouštěl 1 hodinu při teplotě 55 °C. Takto při-

pravený roztok DNA byl zpravidla velmi viskózní a buď neumožňoval nabrat objem 1 μ l nutný pro stanovení koncentrace na přístroji NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) anebo výsledky měření jednoho vzorku se od sebe velmi odlišovaly a hodnoty absorbancí při vlnových délkách 230, 260 a 280 nm byly nesmyslné. Proto jsem 10 μ l od každého vzorku rozředil v 90 μ l TE pufru a inkuboval alespoň hodinu při 55°C. Při nižší koncentraci chromozomální DNA jsem daleko lépe určil její koncentraci a čistotu.

4.2.3 Izolace celkové buněčné RNA

Na začátku práce s RNA jsem si pracovní plochu včetně pipet otřel RNaseZAP (Sigma), abych omezil degradaci RNA během manipulace se vzorky. Množství 1-4 miliónu buněk, narostlých na P35 misce, jsem třikrát opláchl roztokem PBS. Do každé misky jsem přidal 1 ml TRIzol Reagent (Invitrogen) a buňky jsem nechal lyzovat na ledu po dobu 5 minut. Poté jsem lyzát přepipetoval do 2 ml mikrozkušavky. K lyzátu jsem přidal 200 μ l chloroformu a vzorek jsem po dobu 30 vteřin vortexoval. Následně jsem vzorek ponechal na 10 minut při pokojové teplotě. Vzorek jsem přenesl do vychlazené centrifugy a centrifugoval (15 minut, 18000 g, 4 °C). Během centrifugace se směs ve zkumavce rozdělila na spodní, růžově zbarvenou vrstvu obsahující lipidy, pevnou střední vrstvu tvořenou vysráženými proteiny a svrchní vrstvu obsahující buněčnou RNA. 500 μ l vodné fáze jsem přepipetoval do nové mikrozkušavky a RNA jsem vysrážel přidáním 500 μ l izopropanolu. Vysráženou RNA jsem ponechal 2 minuty za pokojové teploty a poté jsem ji zcentrifugoval (10 minut, 18 000g, 4 °C). Poloprůhledný pelet RNA jsem opláchl v 500 μ l 70% ethanolu a zcentrifugoval (5 minut, 18000 g, 4 °C). Bílý pelet RNA jsem osušil na vzduchu a rozpustil v 40 μ l diethylpyrokarbonátem ošetřené H₂O při 55 °C. Kvalitu a koncentraci vyizolované RNA jsem stanovil na přístroji NanoDrop 1000 (Thermo Scientific).

4.2.4 Štěpení plazmidové DNA

Ke klonování jsem využíval komerčně dostupné restriční endonukleázy. Vzhledem k velkému počtu reakcí uvádím velmi obecné složení reakční směsi. Standardně byl objem reakce 20 μ l.

Reakční směs

Plazmidová DNA	100 – 1000 ng
Pufr (10 \times)	2 μ l
Aditivum (BSA, 10 \times)	2 μ l
restriční endonukleáz	0,5-5 U
H ₂ O	doplnit do 20 μ l

Reakce probíhala obvykle při 37 °C (teplota závisela na druhu použité restriktázy) po dobu 1 až 2 hodin. Reakce byla zastavená buď teplotní inaktivací enzymu, nebo přidáním nanášecího pufru s EDTA. Produkty reakce byly analyzovány obvykle na 1% agarózovém gelu.

4.2.5 Izolace fragmentu DNA z agarózového gelu

Po rozdělení fragmentů agarózovou elektroforézou na 1% ultračistém gelu (ultraPURE agarose, GibcoURL) a v prostředí ethidium bromidu jsem kousek agarózového gelu obsahující příslušný fragment vyřízl skalpelem pod UV lampou ($\lambda = 366$ nm). DNA z gelu jsem poté izoloval pomocí QIAEX II Gel Extraction kit podle pokynů výrobce. Přečištěnou DNA jsem eluloval ve 20 μ l elučního pufru.

4.2.6 Zatupení přesahujícího konce DNA

V případě klonování 5' LTR PERV-60 do pGL3-Promoter vektoru jsem potřeboval 3' přesahující konec, vzniklý působením *PvuI* na pGEM-T_Easy_7-5MAMBA plazmidovou DNA, spojit s nekompatibilním tupým koncem pGL3-Promoter vektoru, vzniklého působením restriktázy *SmaI*. Aby došlo k efektivnímu spojení konců, potřeboval jsem *PvuI* konec zatupit. Pro tento účel jsem využil aktivity T4 polymerázy, která v přítomnosti dNTP doplňuje nukleotidy podle templátové předlohy. Ve stejné reakci jsem mohl použít polynukleotid kinázu, která doplňuje fosfátovou skupinu na 5' konec z molekuly ATP.

Reakční směs

DNA	500 – 1000 ng
ATP (1 mM)	2 μ l
BSA (10 \times)	2 μ l
NEB2 pufr (10 \times)	2 μ l
dNTP (10 mM)	0,4 μ l
T4 polymeráza (NEB, 7 U/ μ l)	0,5 μ l
Polynukleotid kináza (NEB, 10 U/ μ l)	0,1 μ l
H ₂ O	doplnit do 20 μ l

4.2.7 Ligace fragmentů

Přečištěné fragmenty DNA jsem spojoval pomocí T4-DNA ligázy. Dodržoval jsem molární poměr 3:1 (inzert ku vektoru).

Reakční směs

DNA (vektorová kostra)	50 ng
DNA (inzert)	poměr 3:1
ligační pufr (10 \times)	2 μ l
T4-DNA ligáza (NEB, 10 U)	1 μ l

H₂Odoplnit do 20 µl

Ligace probíhala buď 2 hodiny při pokojové teplotě, nebo přes noc při teplotě 14 °C. Poté jsem ligační směsí transformoval kompetentní bakterie.

4.2.8 Transformace bakterií teplotním šokem

Jelikož provirová DNA obsahuje na svých koncích LTR, v běžně používaných kmelech bakterií (např. DH5 α , XL1 blue) se konstrukt chová nestabilně a provirová sekvence je z vektoru vyštěpena mechanismem rekombinace. Za účelem transformace nestabilních DNA konstruktů používám MAX Efficiency® Stb12TM chemokompetentní bakterie (Invitrogen). Pro stabilní konstrukty jsem používal XL1 blue MRF' kmen bakterií (Stratagene).

K 50 µl alikvótu bakterií jsem přidal 1 µl ligační směsi (odpovídající 1 až 10 ng DNA) naředěné v TE pufru (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA) a bakterie jsem ponechal 30 minut na ledu. Poté jsem bakterie přenesl do vodní lázně o teplotě 42 °C na dobu 25 sekund (v případě XL1 blue MRF' doba činila 45 s). Bakterie jsem poté pomenchal 2 minuty na ledu. Přidal jsem 500 µl SOC média bez selekčního antibiotika a bakterie jsem kultivoval 90 minut v třepačce při teplotě 30 °C (v případě XL1 blue MRF' při 37 °C) a při intenzivním třepáním (225 rpm). Na LB-agarové misky obsahující selekční činidlo jsem rozetřel 10 µl a 100 µl narostlé kultury. Bakterie jsem přenesl do inkubátoru, kde rostly při teplotě 30 °C (v případě XL1 blue MRF' při 37 °C) po dobu 16 až 24 hodin.

4.2.9 Elektroporace bakterií

Množství 20 až 40 µl MAX Efficiency® Stb12TM elektrokompetentních buněk (Invitrogen) jsem spolu s DNA (1-2 µl) přidal do 1-2 mm elektroporační kyvety. Kyvetu s buňkami jsem promptně přenesl do elektroporátoru (Bio-Rad). Bakterie jsem elektroporoval podle výrobcem přednastaveného protokolu pro elektroporaci *E. coli*. Podmínky elektroporace byly 2500 F a 2,5 Ω . Po elektroporaci jsem přidal ke kultuře bakterií 1 ml SOC média. Následně jsem buňky kultivoval 45 minut v třepačce při teplotě 30 °C.

Na LB-agarové misky obsahující selekční činidlo jsem rozetřel 10 až 100 μ l narostlé kultury.

4.2.10 Minipreparace plazmidové DNA

Za účelem získání malého množství plazmidové DNA z bakterií (maximálně 10 μ g) jsem použil komerčně dostupný QIAprep Spin Miniprep Kit (50) (Qiagen, Hilden, Germany). Kolonii bakteriálních buněk, která narostla na selekční LB-agarové misce, jsem očkoval do 3 ml čerstvého LB média, které obsahovalo požadovanou dávku selekčního činidla. Tato startovací kultura byla množena po dobu 8 hodin za vydatného třepání (250 rpm) v třepačce při teplotě 30 °C (Stb12 bakterie) nebo 37 °C (DH5 α). Poté jsem přeočkoval 3 μ l narostlé kultury do zkumavky s 3 ml LB a obsahující stejné selekčním antibiotikum a nechal kultivovat přes noc (12-16 hodin) při intenzivním třepání (230 rpm) a teplotě 30 °C (v případě XL1 blue MRF' při 37 °C). Na druhý den jsem kulturu ve zkumavkách stočil (10 minut, 5000 g, 4 °C) a resuspendoval ve 250 μ l vychlazeného resuspenzačního roztoku P1 obsahujícího RNázu A (50 mM TrisHCl, pH 8; 10 mM EDTA; 100 μ g/ml RNáza A). Bakterie jsem zlyzoval přidáním 250 μ l P2 roztoku (200 mM NaOH; 1% SDS). Směs jsem promíchal několikanásobným převrácením zkumavky. Když byly bakterie kompletně zlyzovány, přidal jsem 350 μ l N3 pufru (4,2 M guanidin-HCl; 0,9 M acetát draselný, pH 4,8) a směs jsem promíchal znovu převrácením mikrozkušavky. Lyzát jsem centrifugoval po dobu 10 minut (17000 g) při 4 °C a vzniklý supernatant jsem přenesl na QIAprep spin kolonku a krátce centrifugoval (17000 g). Na kolonku jsem poté aplikoval 750 μ l pufru PE (10 mM Tris-HCl, 80% ethanol) a krátce centrifugoval (17000 g). Zbytek ethanolu jsem z kolonky odstranil dodatečnou centrifugací (17000 g) po dobu 1 minuty. Přečištěnou DNA jsem eluloval 50 μ l pufru EB (10 mM Tris-HCl, pH 8,5). Kvalitu a koncentraci plazmidové DNA jsem určil přístrojem NanoDrop 1000 (Thermo Scientific).

4.2.11 Midipreparace plazmidové DNA

Větší množství plazmidové DNA jsem z bakterií izoloval pomocí kitu QIAGEN Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Nejprve jsem zaočkoval startovací kulturu

E. coli do 3 ml čerstvého LB média, které obsahovalo příslušné selekční antibiotikum (ampicilin). Po 8 hodinách kultivace (230 rpm, 30 nebo 37 °C) jsem z narostlé kultury přeočkoval množství 100 µl do baňky obsahující 100 ml čerstvého média s antibiotikem, a kultury v baňkách jsem umístil do třepačky na dobu 12-16 hodin (230 rpm, 30 až 37 °C).

Narostlou kulturu jsem přenesl do dvou 50 ml falkonek, v nichž jsem buňky stočil (15 minut, 5 000 g) při 4 °C. Pelet bakterií jsem v každé falkonce resuspenzoval ve 2 ml vychlazeného resuspenzačního roztoku (50 mM TrisHCl, pH 8; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNáza A) a suspenze ze dvou falkonek jsem spojil do jediné o objemu 4 ml. Následně jsem přidal 4 ml lyzačního roztoku (200 mM NaOH; 1% SDS) a suspenzi jsem opatrně promíchal a nechal při pokojové teplotě na 5 minut. Poté jsem přidal 4 ml neutralizačního roztoku P3 (3 M acetát draselný, pH 5,5) a suspenzi jsem znova promíchal, čímž se ve falkonce vytvořil bílý precipitát. Falkonku s precipitátem jsem odložil na led na dobu 15 minut. Po centrifugaci (20 minut, 20000 g, 4 °C) vytvořil precipitát pelet a supernatant, obsahující plazmidovou DNA, jsem přepipetoval do aktivované QIAGEN-tip 100 kolonky. Kolonku jsem aktivoval 4 ml ekvilibračního QBT pufru (750 nM NaCl; 50mM MOPS pH 7,0; 15% izopropanol; 0,15% Triton X-100). Po prokapání supernatantu jsem kolonku promyl dvakrát 10 ml promývacího QC pufru (1M NaCl; 50mM MOPS, pH 7,0; 15% izopropanol). DNA jsem z kolonky eluloval 5 ml QF roztokem (1,25 M NaCl; 50 mM Tris, TrisHCl, pH 8,5; 15% izopropanol) tak, že do pěti zkumavek jsem nechal přetéct vždy po 1 ml elulátu.

Plazmidovou DNA jsem vysrážel přidáním 700 µl izopropanolu o pokojové teplotě. Zkumavky jsem stočil (15 minut, 20 000g, 4 °C) a poloprůhledné pelety jsem promyl 400 µl 70% ethanolu o pokojové teplotě. Následně jsem pelety sloučil do jedné 2 ml zkumavky a vzorek jsem centrifugoval (10 minut, 20 000g, 20 °C), čímž jsem získal jeden velký bílý pelet plazmidové DNA. Pelet jsem nechal oschnout a podle velikosti jsem jej rozpustil v 70 - 150 µl TE pufru (10mM Tris-HCl, pH 8,0; 1mM EDTA). Kvalitu a koncentraci plazmidové DNA jsem určil přístrojem NanoDrop 1000 (Thermo Scientific).

4.2.12 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázovou řetězovou reakci jsem použil za účelem detekce sekvence ohraničené párem primerů (tabulka č. 4.7), případně byla využita pro sekvenaci konstruktů.

Jako kontroly byly vybrány sekvence provozního genu pro lidskou RNA polymerázu II (primery *hRPII*, u buněk 293T a BeWo), případně prasečí aktin (primery *pig actin*, u ST-IOWA buněk).

Název primeru	Sekvence primeru (5'→3')	Délka amplifikované sekvence
(fw) LTR PERV	AAGCGCGGGCTCTCGAAGTTT	218 bp
(rv) LTR PERV	ACTCACGAGAAGCGGTCTTGATGC	
(fw) gag PERV	TGAAAATCTATCGCCAGGCTCTG	332 bp
(rv) gag PERV	TCCCTTTCTTCTTCTGTCTCCCT	
(fw) pol PERV	GTGTTGACCCTCCAATTAGATGACG	297 bp
(rv) pol PERV	CAGGGGAGTATTCCAGGGAGA	
(fw) env MAMBA	AAGATTGGCAACAGCGGGTAC	329 bp
(rv) env MAMBA	AAGATTGGCAACAGCGGGTAC	
(fw) env 1312	CTGACCTGGATTAGAACTGG	281 bp
(rv) env 1312	ATGTTAGAGGATGGTCTCTGG	
(fw) hRPII	GCACCACGTCCAATGACAT	632 bp (DNA)
(rv) hRPII	GTGCGGCTGCTTCCATAA	224 bp (RNA)
(fw) pig actin	GTCATGGTGGGTATGGGTCAG	272 bp
(rv) pig actin	TACATGGCGGGCACGTTGAAG	

Tab. 4.7: Seznam používaných primerů.

Amplifikace probíhala v termocykleru C1000 TouchTM Thermal Cycler (BIORAD) za následujících podmínek (tab. 4.8):

Krok	Teplota	Doba trvání	Počet cyklů
Úvodní denaturace	95 °C	5 min	1×
Denaturace	95 °C	1 min	29×
Nasednutí primerů	libovolná	40 s	
DNA polymerace	72 °C	libovolná	
Závěrečná polymerace	72 °C	5 min	1×

Tab. 4.8: Podmínky amplifikace.

Primery se lišily v teplotě nasedání a době polymerace:

LTR PERV primery – teplota nasednutí 55 °C ; doba polymerace 30 s

gag PERV primery – teplota nasednutí 59 °C; doba polymerace 35 s

pol PERV primery – teplota nasednutí 54 °C; doba polymerace 35 s

env MAMBA – teplota nasednutí 52 °C; doba polymerace 45 s

env 1312 – teplota nasednutí 53 °C; doba polymerace 35 s

hRPII – teplota nasednutí 56 °C; doba polymerace 50 s

pig actin – teplota nasednutí 52 °C; doba polymerace 35 s

4.2.13 Reverzně-transkriptázová polymerázová řetězová reakce (RT-PCR)

Je polymerázová řetězová reakce, která jako templát využívá jednovláknovou DNA vzniklou reverzní transkripcí izolované RNA. V této kapitole je popsána příprava templátu (cDNA) z buněčné RNA, neboli syntéza prvního řetězce.

Od každého vzorku RNA jsem si připravil dvě směsi – jedna sloužila jako RNA pro konverzi na cDNA a jedna sloužila jako kontrola. Příprava kontrolní směsi probíhala identicky s výjimkou závěrečného přidání reverzní transkriptázy.

Do reakce jsem použil 1000 ng celkové buněčné RNA. Nejprve jsem se zbavil případné DNA kontaminace smícháním 1000 ng templátu s DNázouI, reakce probíhala 1 hodinu při 37°C v prostředí MLV 5x pufru (250 mM Tris-HCl, pH 8,3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂; 50 mM DTT). Do 0,5 ml mikrozkušavky jsem pipetoval:

Reakční směs

Templát	1000 ng RNA
M-MLV 5x pufr (Promega)	2,5 µl
DNázaI (NEB) 2J	1 µl
H ₂ O	doplnit do 12,5 µl

DNázaI se inaktivovala inkubováním směsi při 75 °C po dobu 10 minut. Poté jsem směs přenesl na led a přidal 1 µl náhodných hexanukleotidových primerů (Promega, konc. 0,5 µg/µl). K rozrušení sekundárních struktur RNA a napojení primerů na templát došlo

při 5 minutové inkubaci v 70 °C. Mikrozkušavky se směsí jsem vrátil zpět na led, poté stočil a přidal komponenty nutné zahájené syntézy prvního řetězce:

Reakční směs

Výchozí směs	13,5 µl
M-MLV 5x pufr (Promega)	2,5 µl
dNTP (10 mM, Promega)	5 µl
RNasin® ribonuclease inhibitor (Promega)	25 U
M-MLV reverzní transkriptáza	200 U (mimo kontroly)
H ₂ O	doplnit do 25 µl

Syntéza prvního řetězce probíhala 1 hodinu při 37 °C. V případě kontrolních vzorků reverzní transkripce neproběhla a následná PCR reakce vyšla negativně, pokud byla kontaminace DNA řádně potlačena. 2,5 µl (tj. 1/10 objemu reakce) směsí jsem použil jako výchozí množství templátové DNA do polymerázové řetězové reakce.

4.2.14 Sekvenace DNA

Plazmidovou DNA jsem sekvenoval pomocí komerčního kitu AmpliTaq®FS L'Big Dye Terminator obsahující terminální dideoxynukleotidy značené různou fluorescenční značkou, pufr a DNA polymerázu (PREMIX).

Pro sekvenaci konstruktů pGL3_LTR_MAMBA a pGL3_LTR_60 jsem použil následující primery (tab. 4.9).

Název primeru	Sekvence primeru (5'→3')
LucGL2	CTTTATGTTTTTGGCGTCTTCCA
LucRV3	CTAGCAAAATAGGCTGTCCC

Tab. 4.9. Sekvenační primery.

Složení sekvenační směsi:

DNA templát1-2 µg
 Primer (10 µM)1 µl
 Premix2 µl
 H₂Odoplnit do 10 µl

Amplifikace probíhala v termocykleru MJ Research DNA Engine DYAD za následujících podmínek (tab. 4.10):

	Teplota	Doba trvání	Počet cyklů
Úvodní denaturace	96°C	30 s	1×
Denaturace	96°C	10 s	25×
Nasednutí primerů	58°C	5 s	
DNA polymerace	60°C	4 min	

Tab. 4.10: **Podmínky sekvenační reakce.**

Produkt reakce jsem naředil 80 µl H₂O a 10 µl 3M NaAc (pH 5,2) a precipitoval přidáním 80 µl izopropanolu. Vzorek jsem centrifugoval (30 minut, 18000 g) a pelet DNA opláchl 250 µl 70% ethanolu a znovu centrifugoval (5 minut, 18000g). Vysušený pelet jsem rozpustil v 25 µl Template Supression Reagent (TSR, Applied Biosystems). Po 2 minutové denaturaci v 90 °C proběhla sekvenace pomocí kapilárního sekvenátoru ABI PRISM.

4.2.15 *In vitro* methylace DNA

Plazmidovou DNA jsem *in vitro* methyloval pomocí CpG methyltransferázy *SssI* (NEB). Reakční směs jsem inkuboval po dobu 2 hodin při 37°C.

Reakční směs

DNA (pGL3_LTR_MAMBA, pGL3_LTR_60)4 µg
SssI methyltransferáza 2U/µl (NEB)4 U
 S-adenosylmethionin (NEB)640 µM

pufř NEB2 (10×)2 μl
H₂Odoplnit do 20 μl

Část methylované a nemethylované DNA jsem ověřil štěpením methyl-senzitivní restriktázou *HpaII*. Pokud byla plazmidová DNA plně methylována, restriktáza *HpaII* nerozeznala restrikční místo (tetranukleotid) a plazmid se nenaštěpil.

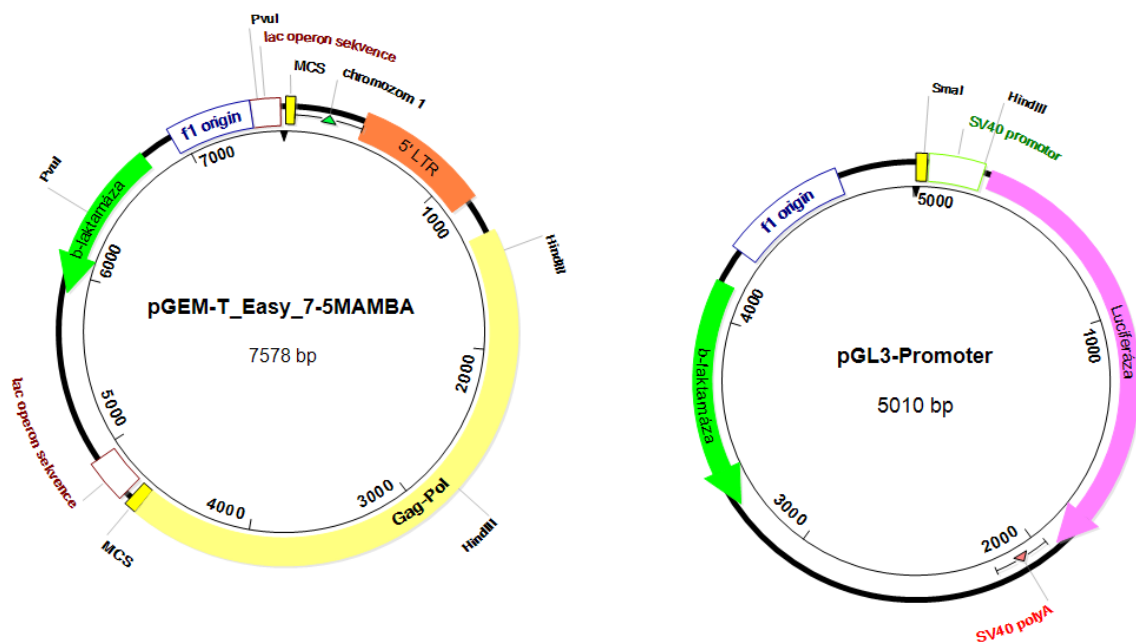
5 Výsledky

5.1 Vliv methylace PERV LTR na úroveň exprese luciferázy

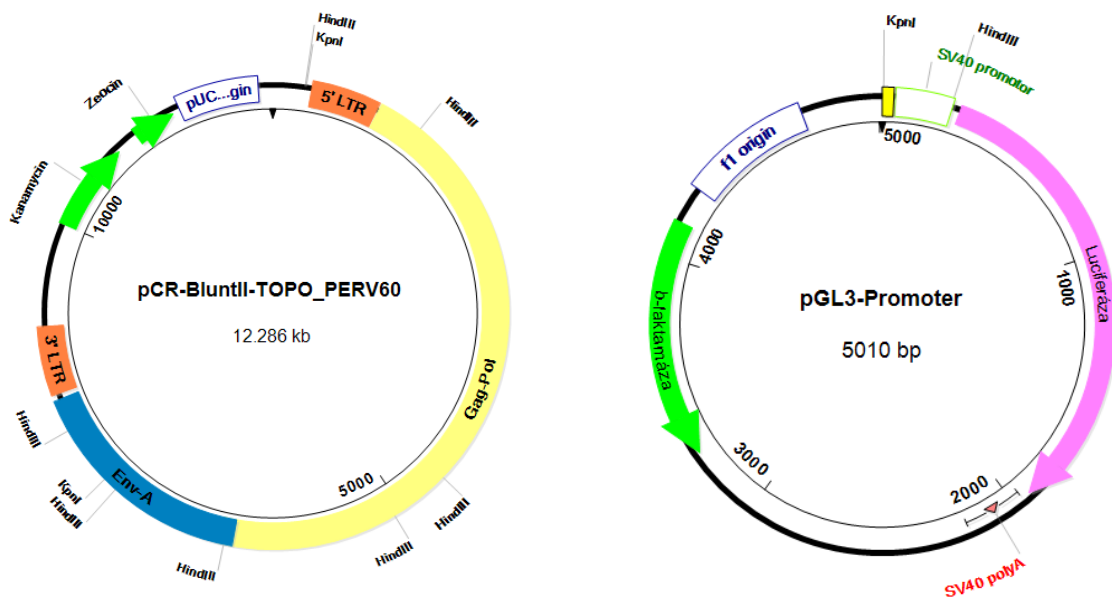
5.1.1 Příprava konstruktů pGL3_LTR_MAMBA a pGL3_LTR_60

Za účelem změření luciferázové aktivity řízenou retrovirovým promotorem, nahradil jsem v plazmidu pGL3-Promoter sekvenci promotoru SV40 za sekvenci 5' LTR. Sekvenci 5' LTR jsem získal štěpením konstruktů pGEM-T_Easy_7-5MAMBA (obr. 5.1) restriktázami *PvuI* a *HindIII*. Fragment, který měl zatupený konec *PvuI*, jsem ligoval do pGL3-Promoter vektoru štěpeného restriktázami *SmaI* a *HindIII* (obr. 5.1). Tímto způsobem jsem vytvořil pGL3_LTR_MAMBA (obr. 5.3).

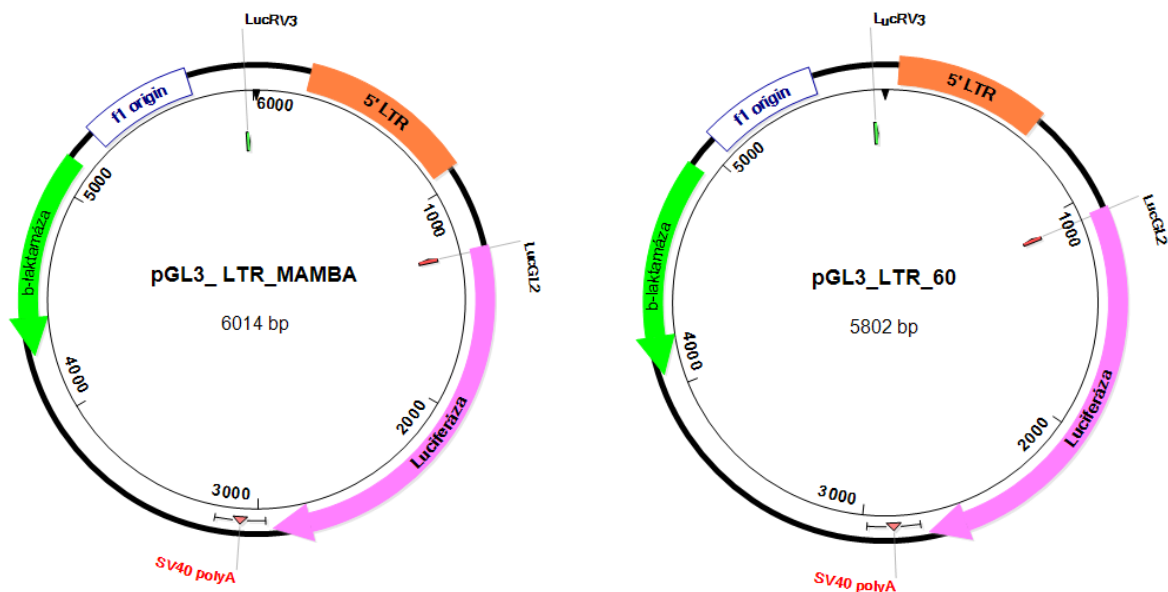
Z vektoru pCR-BluntII-TOPO nesoucího PERV-60 (obr. 5.2) jsem 5' LTR sekvenci vyštěpil restriktázami *KpnI* a *HindIII*. Inzert jsem vložil do pGL3-Promoter vektoru štěpeného taktéž restriktázami *KpnI* a *HindIII* (obr. 5.2). Vytvořený konstrukt jsem nazval pGL3_LTR_60 (obr. 5.3).



Obr. 5.1: Mapy konstruktů pGEM-T_Easy_7-5MAMBA a pGL3-Promoter. Restrikční místa *HindIII*, *PvuI* nebo *SmaI* a *HindIII* znázorněna.



Obr. 5.2: Mapy konstruktů pCR-BluntII-TOPO_PERV60 a pGL3-Promoter. Restrikční místa *KpnI* a *HindIII* znázorněna.

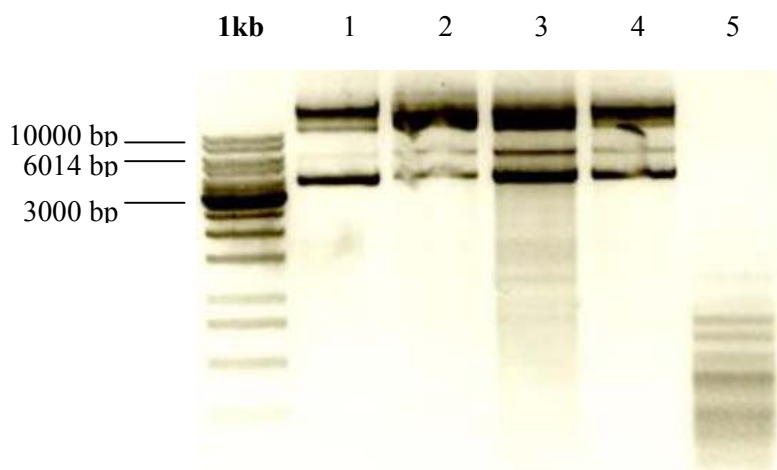


Obr. 5.3: Mapy konstruktů pGL3_LTR_MAMBA a pGL3_LTR_60. Vyznačeny jsou pozice primerů LucGL2 a LucRV3.

Vytvořené konstrukty pGL3_LTR_MAMBA a pGL3_LTR_60 jsem ověřil sekvenací pomocí primerů LucGL2 a LucRV3 (umístění primerů, viz. obr. 5.3).

5.1.2 Methylace konstruktů pGL3_LTR_MAMBA a pGL3_LTR_60

Vytvořené konstrukty jsem methyloval prokaryotickou *SssI* methyltransferázou, která připojuje methylovou skupinu na cytozin ve všech dinukleotidech CpG. Účinnost methylace jsem ověřil štěpením plazmidové DNA methylsensitivní restriktázou *HpaII* (rozeznává tetranukleotid CCGG). Na obr. 5.4 je ukázána kontrola methylace plazmidu pGL3_LTR_MAMBA restriktázou *HpaII*. Obdobně byla kontrola provedena i pro druhý konstrukt pGL3_LTR_60 (data neuvedena).



Obr. 5.4: Ověření methylace konstruktů pGL3_LTR_MAMBA štěpením *HpaII*.

Sloupec 1 – pGL3_LTR_MAMBA bez restriktázy *HpaII*.

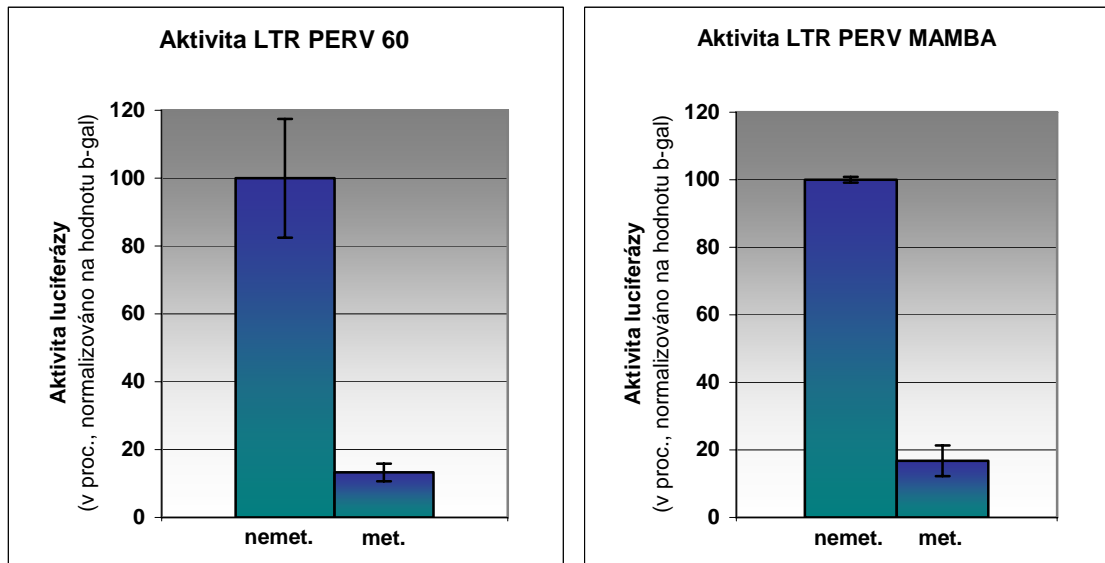
Sloupce 2 až 4 – methylovaný pGL3_LTR_MAMBA s restriktázou *HpaII* (různá množství SAM pro methylaci použita – 160 μ M, 320 μ M a 640 μ M).

Sloupec 5 – kontrola, nemethylovaný pGL3_LTR_MAMBA s restriktázou *HpaII*.

5.1.3. Stanovení aktivity luciferázy u methylovaných a nemethylovaných LTR

Methylovaná a nemethylovaný konstrukt jsem kotransfekoval společně s pCMV- β -gal vektorem do buněk 293T, abych mohl normalizovat účinnost transfekce na aktivitu luciferázy. Transfekce byly provedeny v triplicátech. Aktivitu luciferázy a

β -galaktosidázy jsem změřil 48 hodin po transfekci. Aktivitu luciferázy jsem normalizoval na aktivitu β -galaktosidázy. Hodnoty jsem přenesl do grafu (graf 5.1, graf 5.2).



Graf 5.1 a 5.2: **Závislost relativní aktivity luciferázy na methylaci plazmidu.**

nemet. – nemetylovaný plazmid

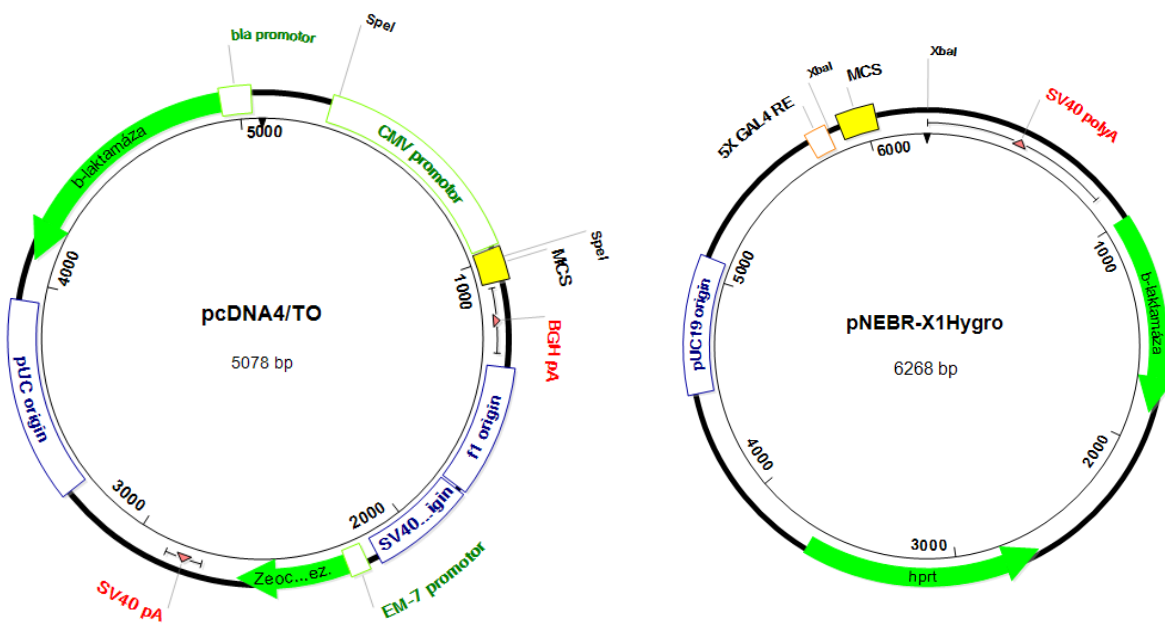
met. – methylovaný plazmid

Expresa kontrolního genu luciferázy byla snížena v obou případech methylovaných plazmidů (pGL3_LTR_PERV60 a pGL3_LTR_MAMBA). Ve srovnání s nemethylovanými plazmidy, exprese luciferázy byla potlačena 5 až 10 násobně. Methylace retrovirového promotoru přítomného v LTR účinně brání v transkripci proviru PERV-A MAMBA a PERV-A/B 60 *in vitro*.

5.2 Rekombinace PERV

5.2.1 Příprava vektorů se sekvencemi PERV-A MAMBA a PERV-C 1312

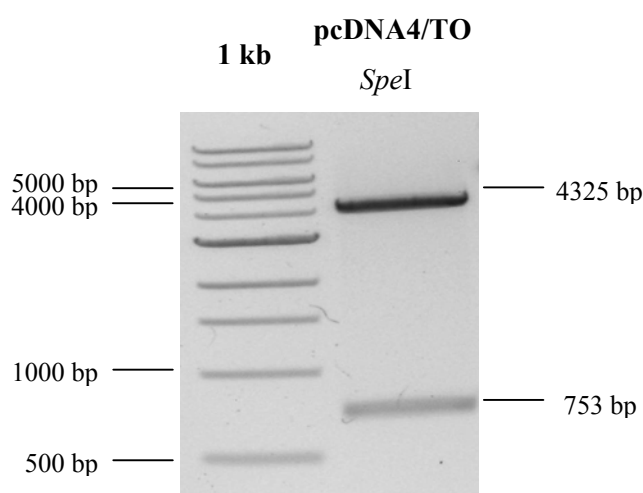
Jelikož byly sekvence provirů obdrženy ve vektorech nevhodných pro následující práci, PERV-A MAMBA a PERV-C 1312 jsem klonoval do vektorů, které umožňují jejich expresi a zároveň nezávislou selekci v eukaryotických buňkách. Protože buňky 293T jsou rezistentní k neomycinu, zvolil jsem vektory pcDNA4/TO (nesoucí gen pro rezistenci k zeocinu, obr. 5.5) a pNEBR-X1_Hygro (nesoucí gen pro rezistenci k hygromycinu, obr. 5.5).



Obr. 5.5: Mapy vektorů pcDNA4/TO a pNEBR-X1Hygro. Do vektorů jsem klonoval provirové sekvence PERV-A MAMBA a PERV-C 1312. V případě pcDNA4/TO jsem vektor upravil vyštěpením P-CMV promotoru před vložení PERV-A MAMBA. Restriční místa pro klonování jsou vyznačena.

5.2.1.1 Delece promotoru CMV v plazmidu pcDNA4/TO

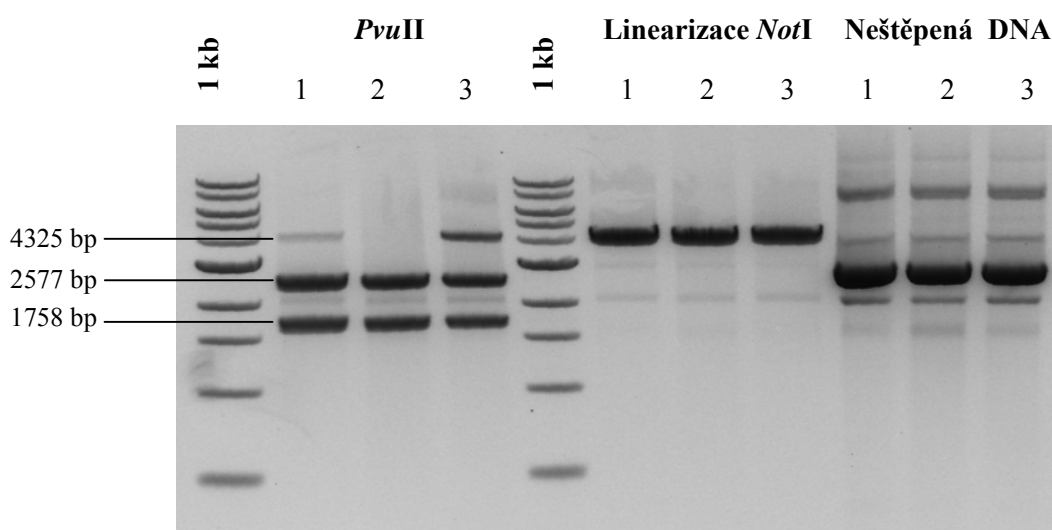
Plazmid pcDNA4/TO (5078 bp) (obr. 5.5) je uzpůsobený k expresi sekvence vnesené do polylinkeru. Před polylinkerem se nalézá silný promotor z lidského cytomegaloviru (P-CMV). Po zaklonování proviru do polylinkeru (*multiple cloning site*, MCS) by mohlo dojít k interferenci virových promotorů. Proto jsem se rozhodl z plazmidu cytomegalovirový promotor odstranit vyštěpením přes *SpeI* místa (obr. 5.5, 5.6).



Obr. 5.6: Vyštěpení P-CMV sekvence z plazmidu pcDNA4/TO restriktázou *SpeI*.

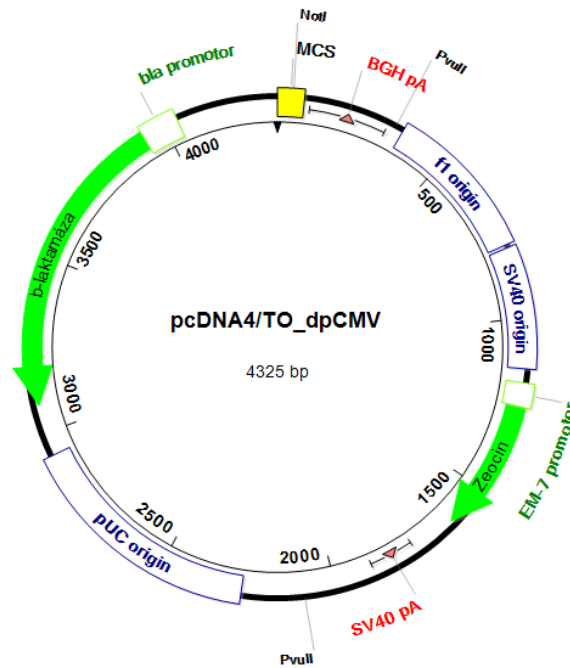
Působením restriktázy *SpeI* na plazmid pcDNA4/TO jsem získal dva fragmenty, které jsem od sebe separoval elektroforézou na agarózovém gelu. Fragment o velikosti 753 bp obsahoval většinu sekvence P-CMV. Větší fragment (4325 bp) představoval zbylou sekvenci plazmidu bez P-CMV. Tento fragment jsem vyřizl z gelu, následně přečistil a kohezní konce plazmidu jsem spojil působením T4-DNA ligázy. Reakční směsí jsem transformoval bakterie.

Ze tří náhodně vybraných kolonií, které vyrostly na agarové misce s ampicilinem, jsem izoloval plazmidovou DNA. Výsledek klonování jsem ověřil restriktčním štěpením (obr. 5.7).



Obr. 5.7: **Ověření plazmidové DNA upraveného plazmidu pcDNA4/TO štěpením *PvuII*, linearizace *NotI*.** Vzorky 1, 2, 3 představují nativní formy izolované plazmidové DNA. Velikosti proužků na gelu jsou vyznačeny.

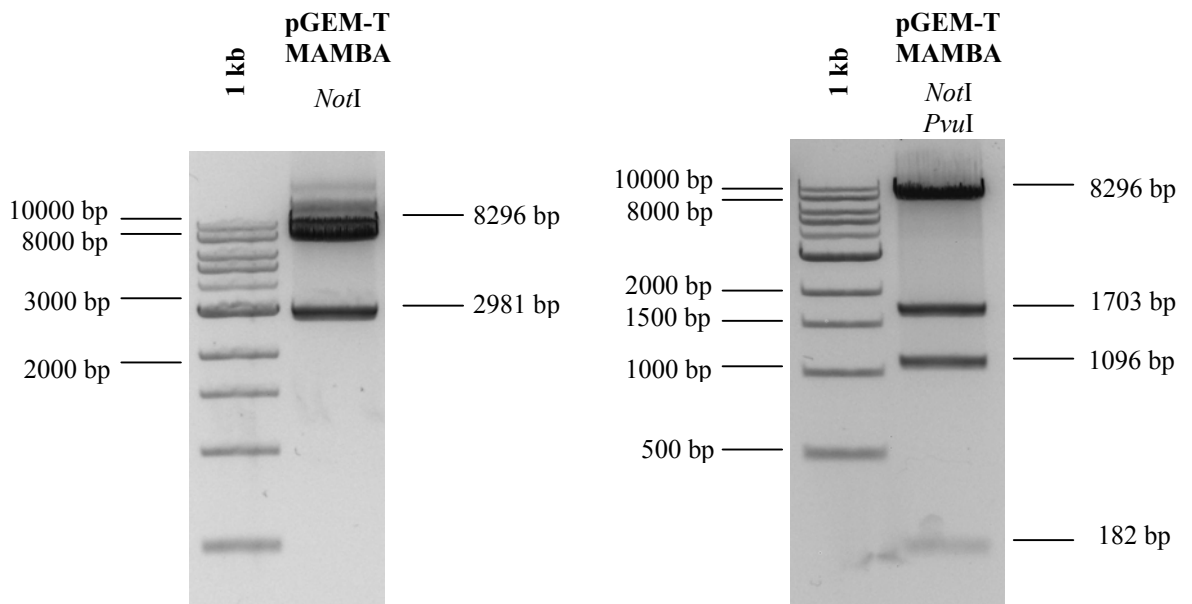
Působením *PvuII* se plazmidová DNA naštěpila na 2 fragmenty (2577 bp, 1758 bp). Pouze v případě druhého klonu došlo k úplnému naštěpení plazmidu. Linearizace potvrdila očekávanou velikost plazmidu 4325 bp u všech klonů. Poslední tři sloupce na gelu znázorňují různé konformační formy neštěpené plazmidové DNA. Z výsledků jsem usoudil, že všechny tři kolonie obsahují upravenou plazmidovou DNA schopnou replikace. Pro další práci jsem vy-užil plazmidovou DNA z klonu 2. Upravený a restrikcí ověřený plazmid jsem nazval pcDNA4/TO_dpCMV (obr. 5.8).



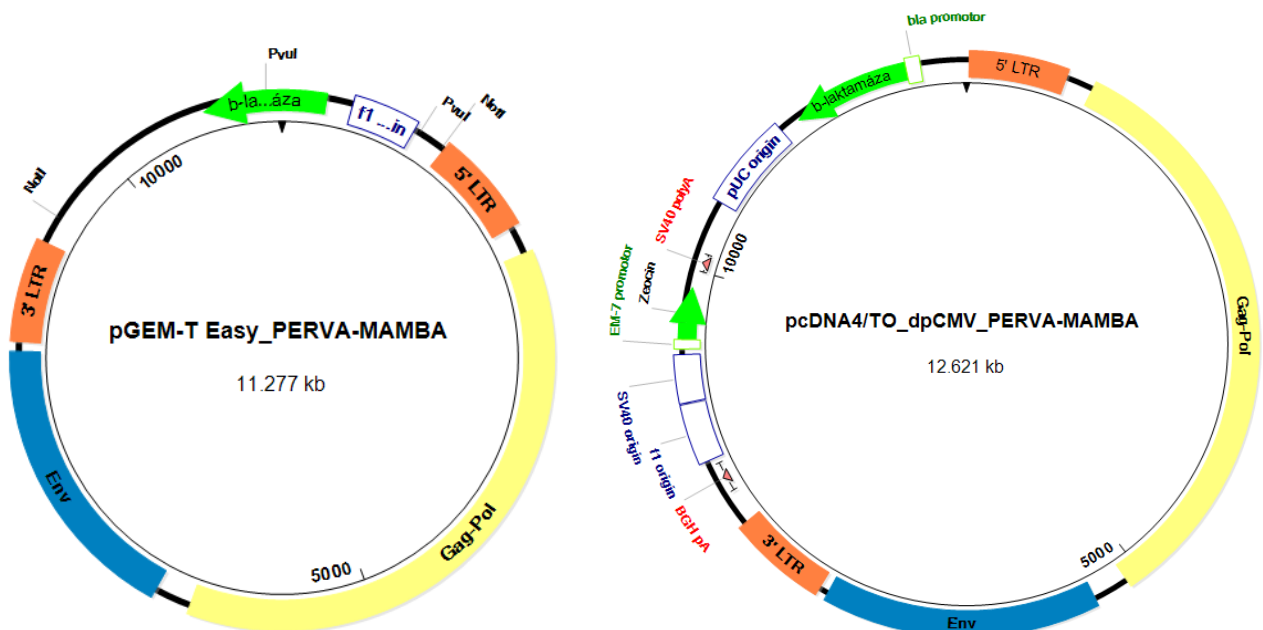
Obr. 5.8: Mapa vektoru **pcDNA4/TO_dpCMV**. Vyznačena jsou místa *NotI* a *PvuII* pro ověření restrikčním štěpením.

5.2.1.2 Příprava vektoru **pcDNA4/TO_dpCMV_PERVA-MAMBA**

Pro klonování PERV-A MAMBA do vytvořeného vektoru **pcDNA4/TO_dpCMV** jsem využil sekvenci PERV-A MAMBA, kterou jsem předtím klonoval do vektoru **pGEM-T_Easy** (obr. 5.9, konstrukt **pGEM-T_Easy_PERVA-MAMBA**). Provirovou sekvenci jsem vyštěpil restriktaázou *NotI*. Do reakce jsem také přidal restriktaázu *PvuI*, neboť samotným působením restriktaázy *NotI* se plazmid nenaštěpil úplně (obr. 5.9).

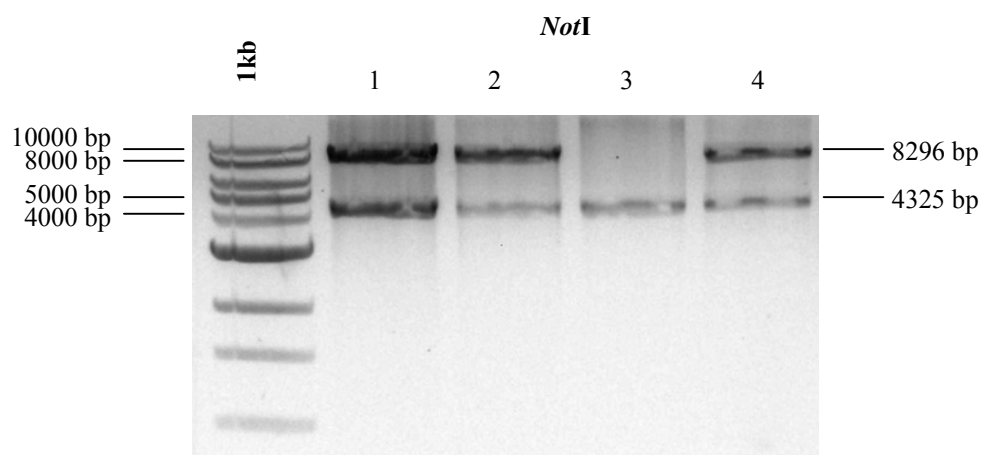


Obr. 5.9: Vyštěpení PERV-A MAMBA z pGEM-T Easy_PERVA-MAMBA. Vlevo: pomocí *NotI*; vpravo: kombinací *NotI* a *PvuII*.



Obr. 5.10: Mapy vektorů pGEM-T Easy_PERVA-MAMBA a pcDNA4/TO_dpCMV_PERVA-MAMBA. Restrikční místa *PvuII* a *NotI* vyznačena.

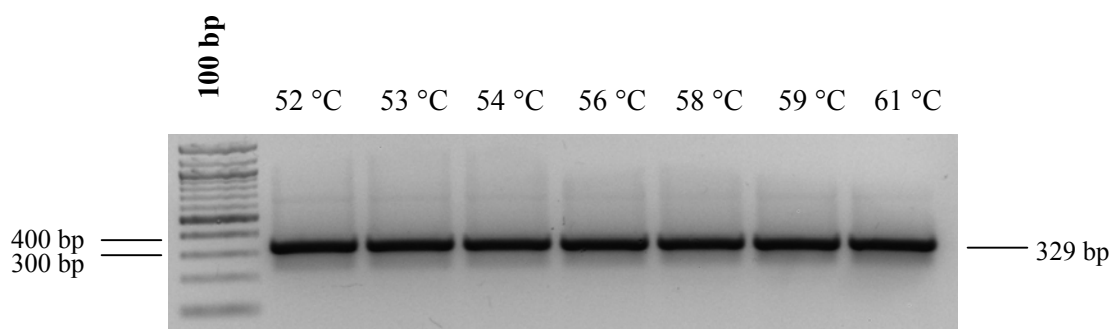
Sekvenci proviru PERV-A MAMBA (8296 bp), ohraničenou *NotI* místy, jsem ligoval do *NotI* linearizovaného a defosforylovaného pcDNA4/TO_dpCMV plazmidu (4325 bp, obr. 5.10). Ligační směsí jsem transformoval *Stbl2* bakterie. Náhodně jsem vybral 4 kolonie, z nichž jsem izoloval plazmidovou DNA a nový konstrukt pcDNA4/TO_dpCMV_PERVA-MAMBA (obr. 5.10) jsem ověřil štěpením *NotI* (obr. 5.11).



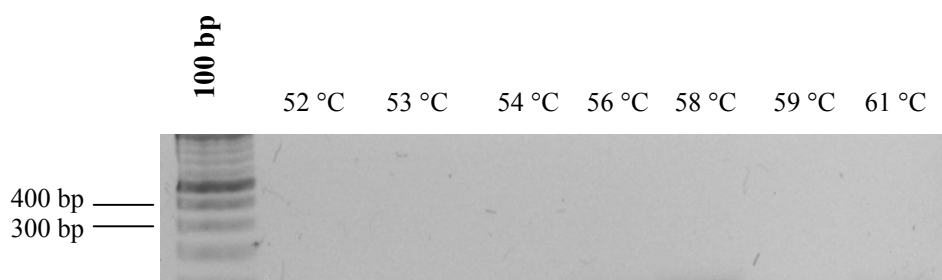
Obr. 5.11: **Ověření konstruktů pcDNA4/TO_dpCMV_PERVA-MAMBA štěpením restriktázou *NotI*.** U klonů 1, 2 a 4 jsou viditelné očekávané produkty reakce (velikost proužků 8296 bp a 4325 bp) a proto obsahují sekvenci PERV-A MAMBA.

DNA z klonů č. 1, 2 a 4 se naštěpily na požadovaný 8296 bp fragment PERV-A MAMBA a 4325 bp fragment představující plazmid pcDNA4/TO_dpCMV. Klon č. 3 obsahoval plazmidovou sekvenci bez inzertu, ačkoliv jeho konce byly defosforylované. K další práci jsem používal první klon.

Konstrukt jsem využil pro testování primerů specifických na sekvenci *env* MAMBA. Stejným párem primerů jsem testoval i provirus PERV-C 1312 (obr. 5.12a,b).



Obr. 5.12a: **Gradientová PCR *env* MAMBA u pcDNA4/TO_dpCMV_PERVA-MAMBA.** Produkt reakce (329 bp) vznikal při všech testovaných teplotách nasedání primerů.



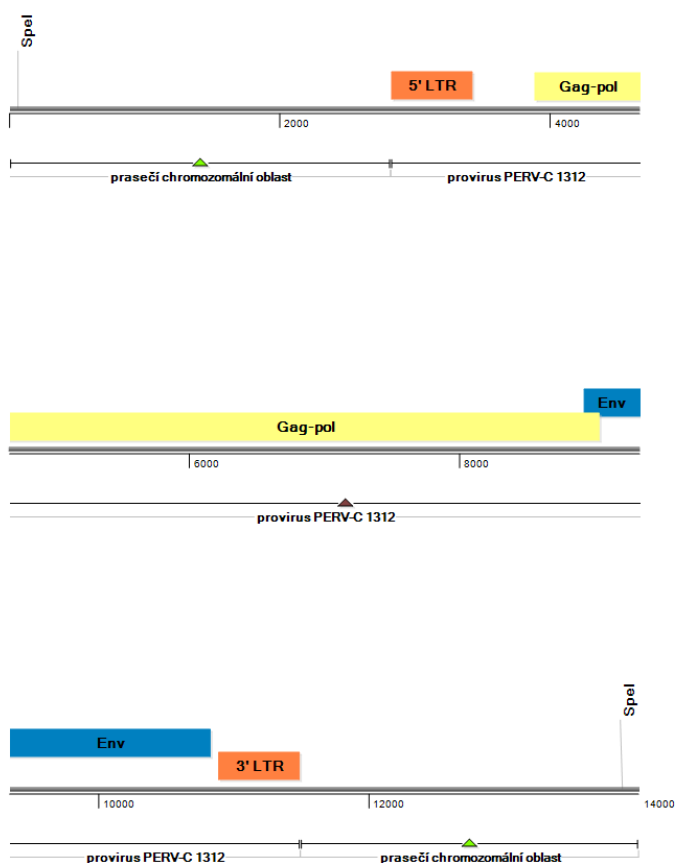
Obr. 5.12b: **Gradientová PCR *env* MAMBA u pNEBR-X1_Hygro_PERVC-1312.** Produkt reakce (mezi 329 bp) nevznikal v důsledku nenednutí použitého páru primerů na rozpoznávanou sekvenci.

Při všech testovaných teplotách nasedání primerů jsem byl úspěšný v amplifikaci *env* PERV-A MAMBA (velikost produktu 329 bp), zatímco k amplifikaci PERV-C 1312 *env* nedošlo. Tento pár primerů je tedy specifický pro PERV-A MAMBA a lze jej použít k odlišení PERV-A MAMBA *env* sekvence od PERV-C 1312 *env* sekvence.

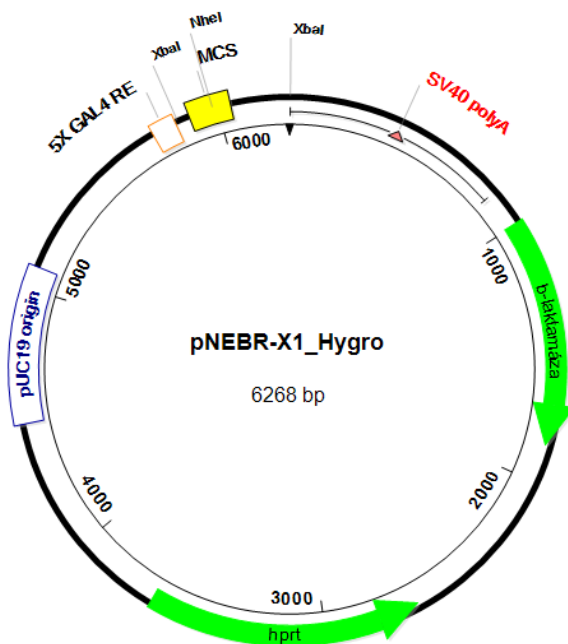
5.1.1.3 Příprava vektoru pNEBR-X1_Hygro_PERVC-1312

Provirus PERV-C 1312, klonovaný v plazmidu pBS (PREUSS *et al.*, 2006), byl darem Ralfa Tönjese z Paul-Ehrlich Institutu (Langen, Německo). Poskytnutý konstrukt (PERVC-1312_pBS) jsem štěpil restriktázou *SpeI*, čímž jsem získal 13816 bp fragment odpovídající sekvenci PERV-C 1312 s přilehlou prasečí chromozomální oblastí (obr. 5.13).

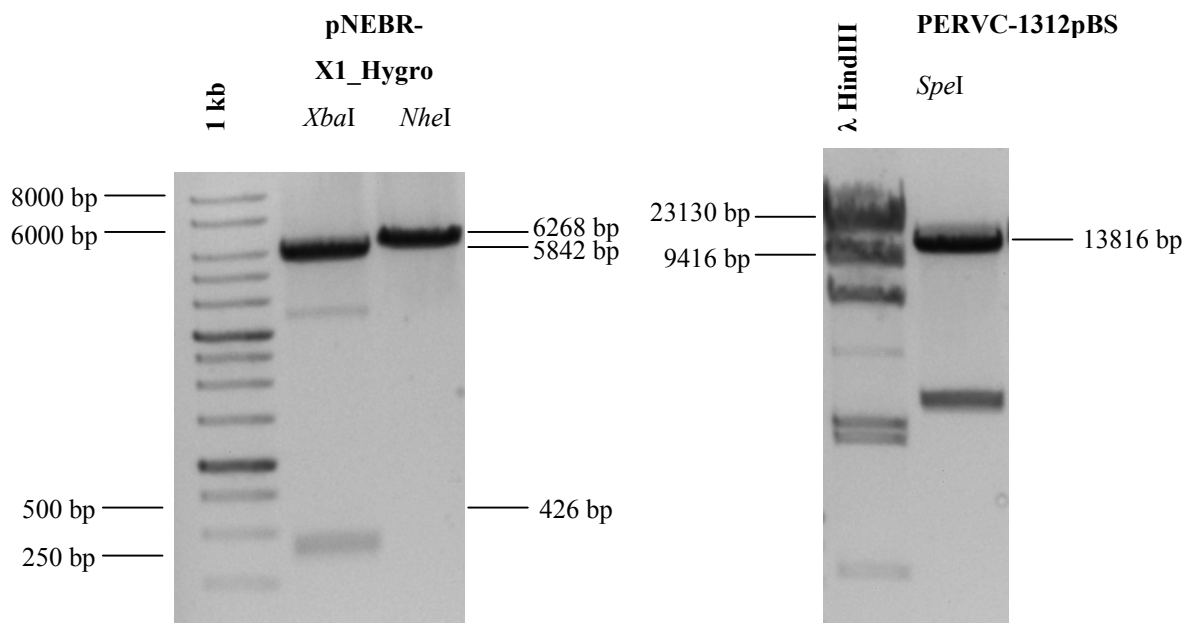
Cílový plazmid pNEBR-X1_Hygro jsem štěpil restriktázou *XbaI*, která generuje konce kompatibilní s *SpeI*. Působením restriktázy *XbaI* se z plazmidu vyštěpila sekvence zahrnující polylinker (426 bp) a zbytek plazmidu vytvořil na agarózovém gelu proužek o velikosti 5842 bp. Pro kontrolu jsem navíc linearizoval pNEBR-X1_Hygro (6268 bp) restriktázou *NheI*, abych mohl porovnat velikost linearizovaného plazmidu s plazmidem zkráceným o polylinker (obr. 5.13).



Obr. 5.13: Lineární mapa sekvence PERV-C 1312 s přilehlou prasečí chromozomální oblastí (sekvence AM229312). *SpeI* místa použita pro klonování jsou vyznačena.

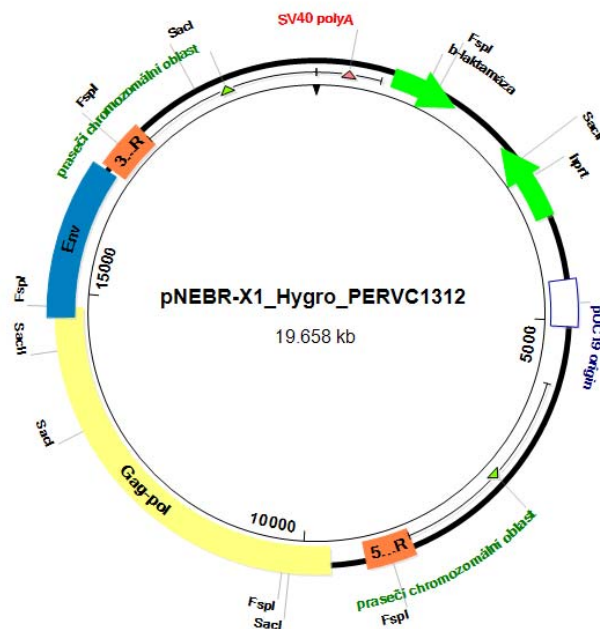


Obr. 5.14: Mapa vektoru pNEBR-X1Hygro (6268 bp). Vyznačena jsou restriční místa *NheI* a *XbaI*.



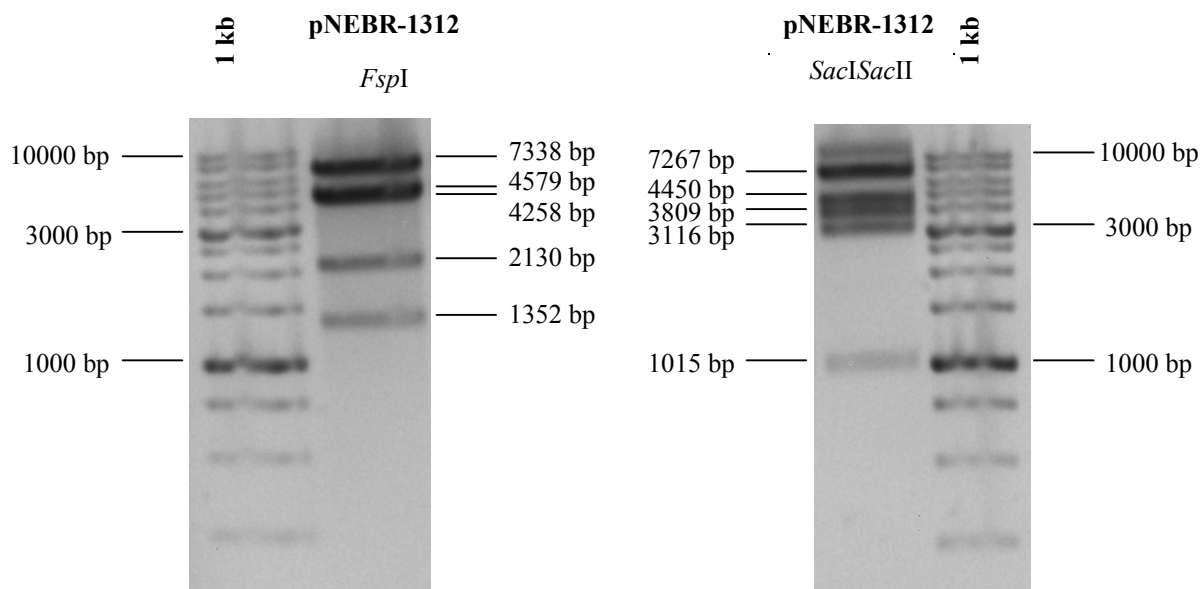
Obr. 5.15: Štěpení pNEBR-X1_Hygro a PERV-C 1312. Vlevo štěpení plazmidu pNEBR-X1_Hygro pomocí *XbaI* a linearizace pomocí *NheI*. Vpravo vyštěpení sekvence včetně PERV-C 1312 z neznámého konstruktů.

Odpovídající fragmenty (13816 bp PERV-C 1312 fragment, 5842 bp pNEBR-X1_Hygro fragment) jsem izoloval z agarózového gelu a po přečištění ligoval. Ligací vznikl konstrukt pNEBR-X1_Hygro_PERVC-1312 (obr. 5.16). Ligační směsí jsem transformoval bakterie *Stbl2* metodou teplotního šoku.



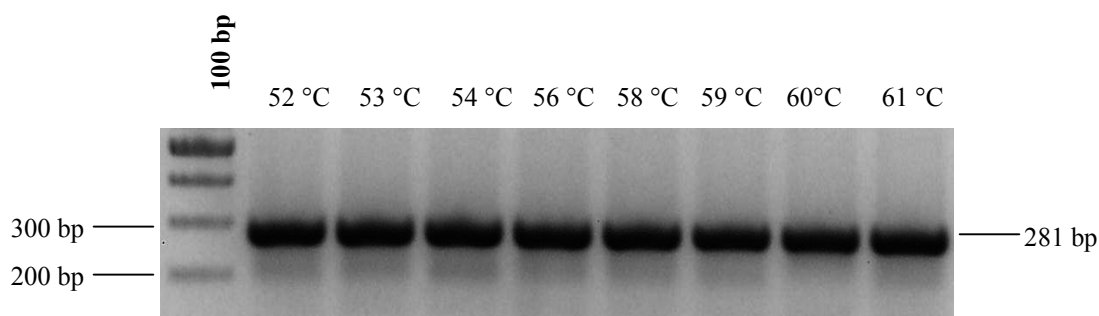
Obr. 5.16: **Mapa vektoru pNEBR-X1_Hygro_PERVC1312.** Restrikční místa *FspI*, *SacI* a *SacII* jsou vyznačena.

Plazmid pNEBR-X1_Hygro_PERVC-1312 jsem ověřil štěpením restriktaázou *FspI* (5 proužků) a kombinací restriktaáz *SacI*, *SacII* (5 proužků). V obou případech jsem detekoval očekávané velikosti produktů (obr. 5.17).

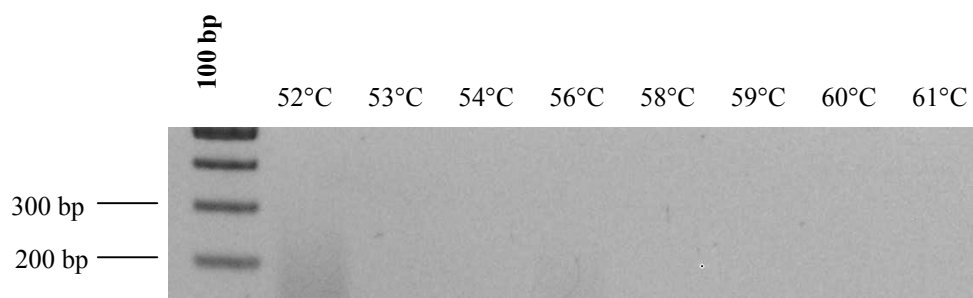


Obr. 5.17 Restrikční analýza konstruktů pNEBR-X1_Hygro_PERVC-1312. Vlevo: výsledek působení restriktázy *FspI* restriktázy. Vpravo: výsledek působení restriktáz *SacI* a *SacII*.

Konstrukt jsem také testoval pomocí gradientové PCR s primery specifickými na *env* PERV-C 1312 (obr. 5.18a). Výchozí konstrukt (10 ng) jsem amplifikoval v rozmezí teplot 52 °C až 61 °C pro nasedání primerů. Zároveň jsem ověřil specifčnost primerů *env* PERV-C 1312 amplifikací konstruktů pcDNA4/TO_dpCMV_MAMBA (obr. 5.18b).



Obr. 5.18a: Gradientová PCR *env* 1312 u pNEBR-X1_Hygro_PERVC-1312. Produkt reakce (281 bp) vznikl při všech testovaných teplotách nasedání primerů.



Obr. 5.18b: **Gradientová PCR *env* 1312 u pcDNA4/TO_dpCMV_PERVA-MAMBA.** Produkt reakce (281 bp) nevznikal v důsledku nerozpoznání sekvence párem primerů.

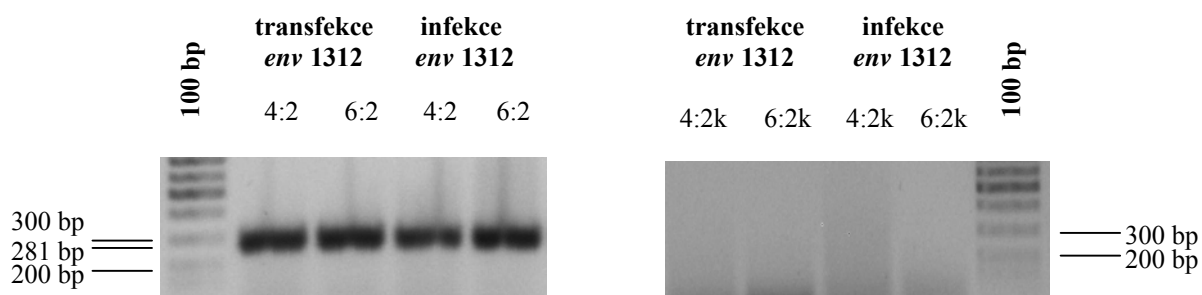
Podářilo se mi klonovat sekvenci proviru PERV-C 1312 do pNEBR-X1_Hygro plazmidu. Zároveň jsem zjistil, že primery navržené na PERV-C 1312 jsou vhodné k detekci PERV-C 1312 *env* a mají i výbornou specificitu, neboť neamplifikují sekvenci PERV-A MAMBA *env*.

5.2.2 Ověření replikační kompetence proviru PERV-C 1312

Schopnost replikace proviru PERV-C jsem zjišťoval infekcí prasečích buněk ST-IOWA. V ST-IOWA buňkách nebyla detekována PERV-C *env* mRNA, na rozdíl od PERV-A a PERV-B *env* mRNA. Zároveň je známo, že PERV-C infikuje pouze prasečí buňky. Pokud je provirus PERV-C 1312 replikačně kompetentní, bude infikovat prasečí ST-IOWA buňky a infekci jsem schopen prokázat detekcí specifické PERV-C *env* mRNA.

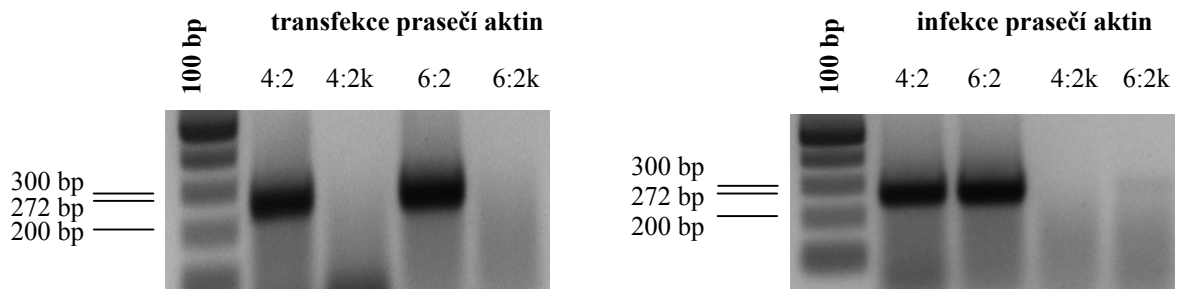
ST-IOWA buňky jsem transfekoval 2 µg konstruktu pNEBR-X1_Hygro_PERVC-1312. Vyzkoušel jsem dva poměry FuGENE HD k vnášené DNA (4:2 a 6:2). Po 7 dnech od transfekce jsem supernatant z transfekovaných buněk filtroval přes 0,45 µm filtr a použil k infekci nových ST-IOWA buněk. Zároveň jsem z transfekovaných buněk izoloval celkovou RNA a expresi transfekovaného PERV-C 1312 jsem detekoval technikou RT-PCR s primery specifickými na PERVC-1312 *env* mRNA (obr. 5.19).

16 dní po infekci ST-IOWA buněk jsem z infikovaných buněk izoloval RNA a provedl detekci PERV-C 1312 *env* mRNA (obr. 5.19) pro poměry lipofekce 4:2 a 6:2. Negativní kontrolou je nepřepsaná RNA ze vzorků (označení 4:2k, 6:2k).



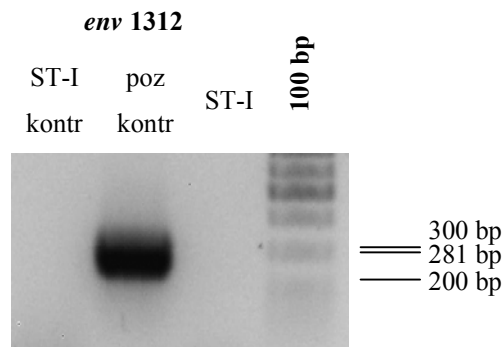
Obr. 5.19: **RT-PCR detekce *env* 1312.** Vlevo: transfekované a infikované ST-IOWA buňky jsou pozitivní na *env* 1312 mRNA, použijeme-li poměry lipofekčního činidla 4:2, 6:2 při transfekci. Vpravo: negativní kontroly jsou negativní na *env* PERV-C 1312 mRNA u obou poměrů lipofekce.

Jako pozitivní kontrolu izolované RNA jsem použil pár primerů specifických na prasečí aktin. U obou transfekovaných a infikovaných ST-IOWA buněk byla sekvence mRNA prasečího aktinu amplifikována. Negativní kontroly (4:2k a 6:2k) na prasečí aktin byly negativní.



Obr. 5.20: **RT-PCR detekce sekvence prasečího aktinu.** Vlevo: RT-PCR na prasečí aktin z transfekovaných buněk (poměry lipofekce 4:2, 6:2, kontroly 4:2k a 6:2k). Vpravo: RT-PCR na prasečí aktin u infikovaných ST-IOWA buněk (poměry lipofekce 4:2, 6:2, kontroly 4:2k a 6:2k).

Také jsem prokázal, že ST-IOWA buňky neexprimují PERV-C 1312 (obr. 5.21).



Obr. 5.21: **RT-PCR detekce env 1312 v ST-IOWA buňkách.** ST-I kontr je negativní kontrola exprese env C 1312. Pozitivní kontrola env 1312 pochází z pNEBR-X1_PERVC-1312 konstrukt. ST-I je detekce env C 1312 v buňkách ST-IOWA.

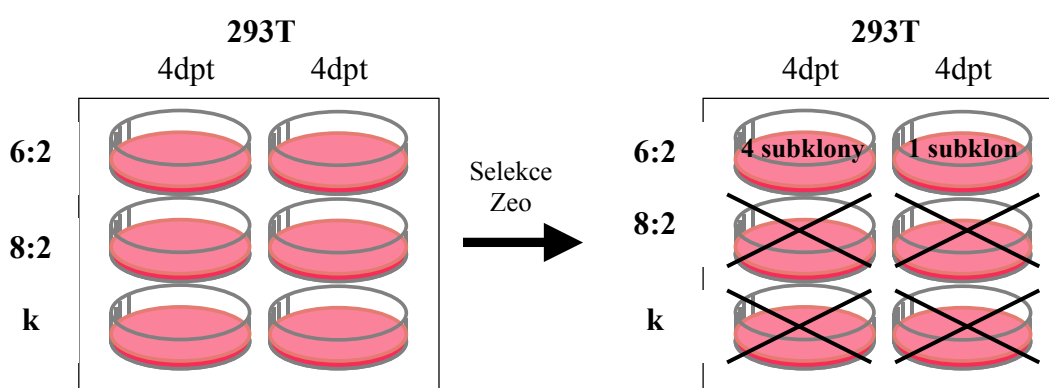
Předešlá data ukazují, že ST-IOWA buňky jsou samy o sobě negativní na expresi PERV-C 1312. Když byly transfekovány konstruktem pNEBR-X1_Hygro_PERVC-1312, obsahujícím PERV-C 1312, exprese PERV-C 1312 byla detekována 7 dní po transfekci. Supernatant z ST-IOWA buněk, které exprimovaly PERV-C 1312, byl infekční pro další ST-IOWA buňky. Infekce se projevila expresí PERV-C 1312 *env* mRNA 30 dní po přenosu filtrovaného supernatantu z transfekovaných buněk. Experimenty s ST-IOWA buňkami ukázaly, že připravený konstrukt pNEBR-X1_Hygro_PERVC-1312 obsahuje replikačně kompetentní provirus.

5.2.3. Stabilní transfekce prasečích provirů do lidských buněk

Připravenými plazmidy (pcDNA4/TO_dpCMV_PERVA-MAMBA a pNEBR-X1_Hygro_PERVC-1312) jsem se pokusil postupně stabilně transfekovat lidské buněčné linie 293T a BeWo. S ohledem na expresi transfekovaného PERV-C 1312 u buněk ST-IOWA, jsem začal se selekcí v rozmezí po čtyřech až osmi dnech od transfekce.

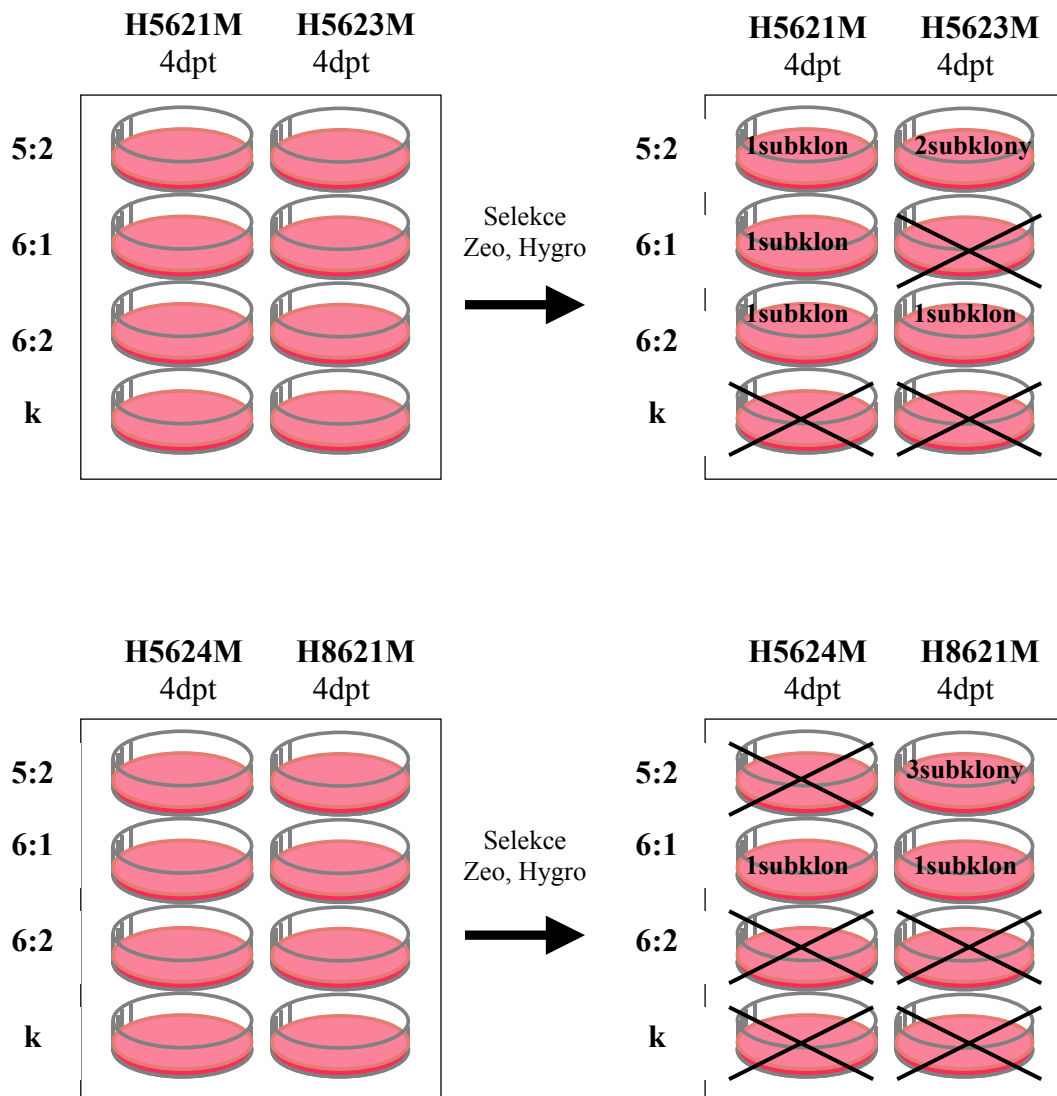
Za 4 až 6 týdnů od začátku selekce se na kultivačních miskách P60 zformovaly kolonie buněk 293T a BeWo, které jsem opatrně přenesl na nové kultivační misky.

V případě buněk 293T jsem se nejprve pokusil o stabilní transfekci linearizovaným konstruktem pcDNA4/TO_pCMV_MAMBA v různých poměrech lipofekčního činidla. Z časových důvodů jsem 5 vyselektovaných subklonů (H5621M, H5622M, H5623M, H5624M a H8621M) ihned podrobil další stabilní transfekci, tentokrát pNEBR-X1 Hygro_PERVC-1312, bez případné detekce přítomnosti virové DNA a RNA (obr. 5.23). Po druhé stabilní transfekci jsem získal 11 subklonů rezistentních k zeocinu a hygromycinu B. Tyto subklony jsem popsal čísly od 10 do 21. Postup transfekce je znázorněn na obr. 5.22. Pro účely další analýzy jsem vybral buňky 4 subklonů (konkrétně subklony 10, 11, 13 a 16), z nichž jsem izoloval DNA a k detekci provirů jsem použil primery specifické na *env* 1312 a *env* MAMBA (obr. 5.24).

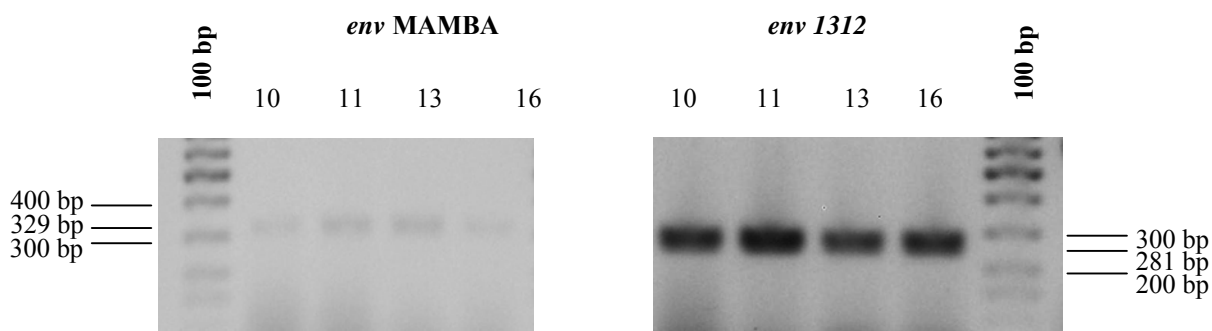


Obr. 5.22: **Postup transfekce a selekce buněk 293T provirem PERV-A MAMBA.** Čtyři subklony buněk 293T-MAMBA transfekovaných v poměru činidla ku DNA 6:2 a selektovaných pátý den po transfekci (subklony H5621M-H5624M) a jeden subklon buněk 293T-MAMBA transfekovaných v poměru činidla ku DNA 6:2 a selektovaných osmý den

po transfekci (subklon H8621M) byly získány. Negativní kontrolou byly netransfekované buňky.

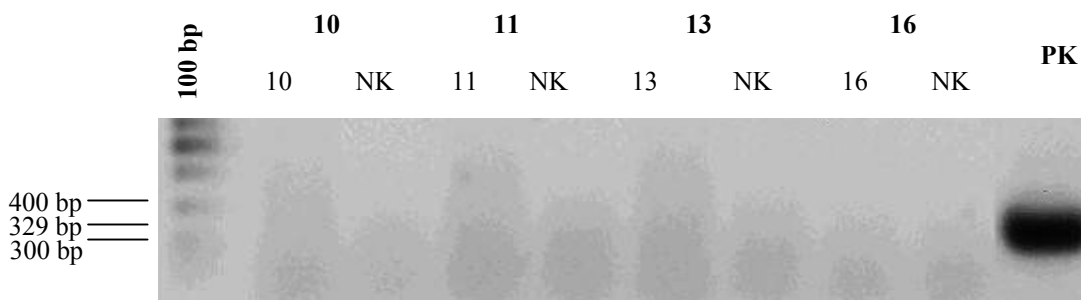


Obr. 5.23: Postup transfekce a selekce buněk 293T-MAMBA provirem PERV-C 1312. Subklony H5621M, H5623M, H5624M a H8621M byly transfekovány plazmidem PERV-C 1312 v poměru činidla ku DNA 6:2, 5:2 a 6:1. Selekcí hygromycinem B jsem získal 11 subklonů buněk MAMBA-1312. Subklony dostaly označení 10-21. Negativní kontrolou byly buňky netransfekované.



Obr. 5.24: **Detekce PERV-A MAMBA a PERV-C 1312 v chromozomální DNA buněk 293T** (subklony č. 10, 11, 13 a 16).

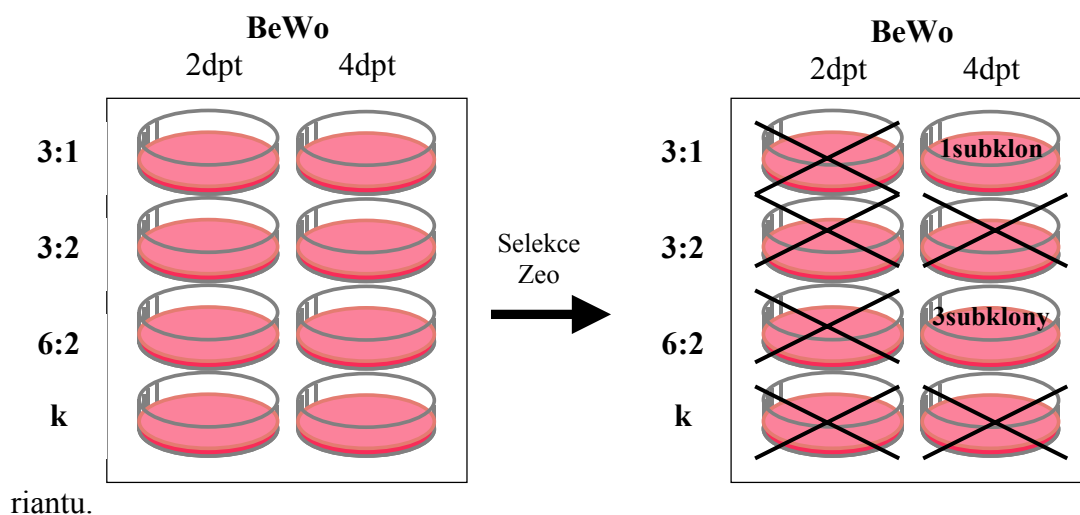
Detekce PERV-A MAMBA *env* v izolované DNA byla slabá, pokusil jsem se tedy detekovat expresi *env* PERV-A MAMBA mRNA. *Env* specifická mRNA nebyla detekována (obr. 5.25).



Obr. 5.25: **Detekce PERV-A MAMBA specifické *env* sekvence v celkové RNA z buněk 293T.**

Selektované subklony buněk obsahovaly v DNA oba proviry (PERV-A MAMBA, PERV-C 1312). PERV-A MAMBA nebyl transkripčně aktivní.

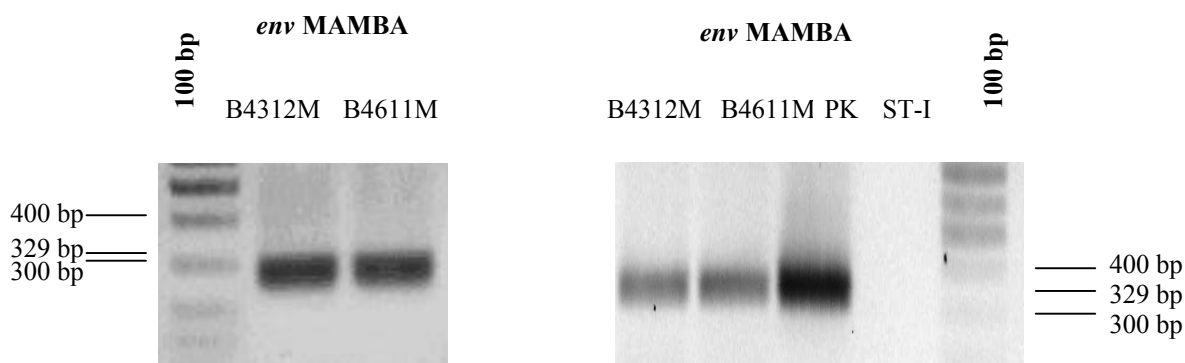
Buňky BeWo jsem také nejprve stabilně transfekoval linearizovaným konstruktem pCDNA4/TO_dpCMV_MAMBA (obr. 5.26). Po selekci zeocinem jsem obdržel 4 subklony (označení B4611M, B4612M, B4613M a B4312M). Buňky subklonu B4312M se dělily pomaleji ve srovnání s buňkami ostatních subklonů. Zda byl tento fenotypový projev důsledkem vyšší exprese PERV-A MAMBA, či infekcí nově vzniklou rekombinací mezi lidským a prasečím virem, nebylo vyšetřováno. Nejspíše se jednalo o klonální va-



Obr. 5.26: **Postup transfekce a selekce buněk BeWo provirem PERV-A MAMBA.** Jeden subklon buněk BeWo-MAMBA transfekovaných v poměru činidla ku DNA 3:1 a selektovaný 4 dny po transfekci (subklon B4312M) a tři subklony buněk BeWo-MAMBA transfekovaných v poměru činidla ku DNA 6:2 a selektovaných čtvrtý den po transfekce (subklony B4621M-B4624M) byly získány.

Ze subklonů buněk BeWo jsem izoloval pouze buněčnou DNA, která byla pozitivní na přítomnost PERV-A MAMBA (obr. 5.27, uvedena data pro subklon B4312M a B4611M).

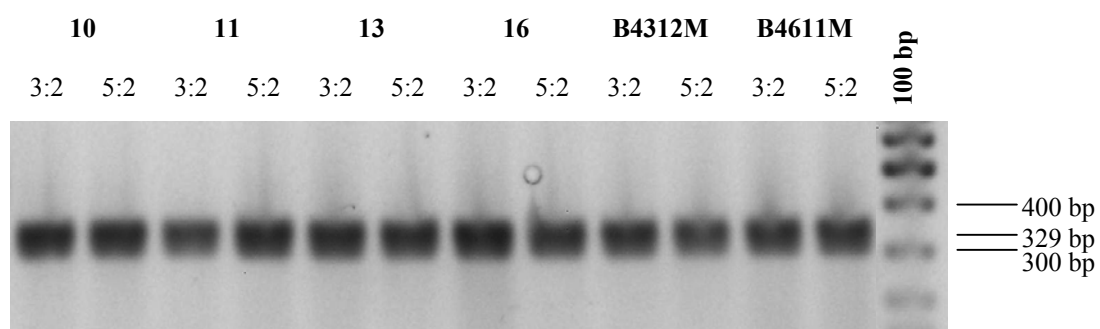
Subklony jsem se pokusil stabilně transfekovat i druhým konstruktem pNEBR-X1_Hygro_PERVC-1312, nicméně dvojí selekci žádné buňky BeWo nepřežily (schéma neuvedeno).



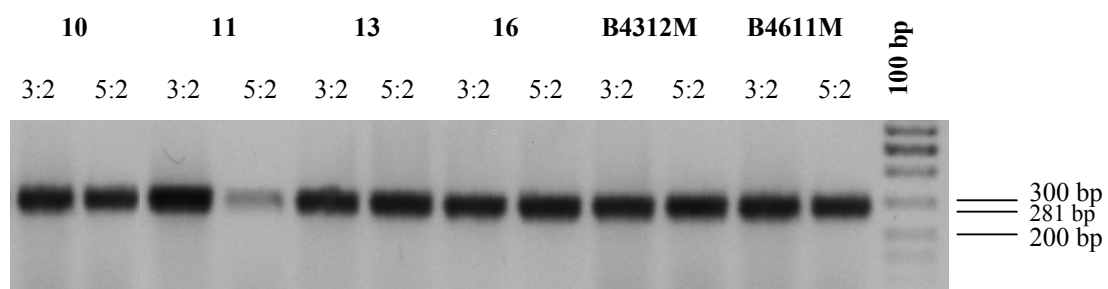
Obr. 5.27: **Detekce PERV-A MAMBA specifické *env* sekvence z chromozomální DNA (vlevo) nebo z RNA (vpravo) u subklonů buněk BeWo.** Negativní kontrola byla pro všechny vzorky negativní (data neuvedena).

Slabá detekce PERV-A MAMBA u subklonů 293T (subklony 10, 11, 13 a 16), žádná detekce PERV-C 1312 u subklonů BeWo (B4312M a B4611M) a negativní výsledky infekce lidských buněk 293T supernatanty z těchto subklonů (data nepřiložena) mě vedly k opětovné transfekci těchto klonů podle následujícího schématu. Jediným rozdílem byl způsob transfekce, nyní transientní.

Subklony buněk 293T (10, 11, 13 a 16) a buněk BeWo (B43112M, B4611M) jsem transfekoval ve dvou poměrech lipofekčního činidla vůči DNA – 3:2 a 5:2. Buňky 293T jsem transfekoval konstruktem pCDNA4/TO_dpCMV_MAMBA a buňky BeWo jsem transfekoval konstruktem pNEBR-X1_Hygro_PERVC-1312. Úspěšnost transfekce, tj. zda dochází k expresi virové RNA, jsem prokazoval RT-PCR z celkové buněčné RNA. Užitím primerů specifických na *env* MAMBA a *env* 1312 jsem odlišil expresi dvou konstruktů.



Obr 5.28: **Expresa PERVA-MAMBA *env* pátý den po transfekci.** Negativní kontrola byla pro všechny vzorky negativní (data neuvedena).

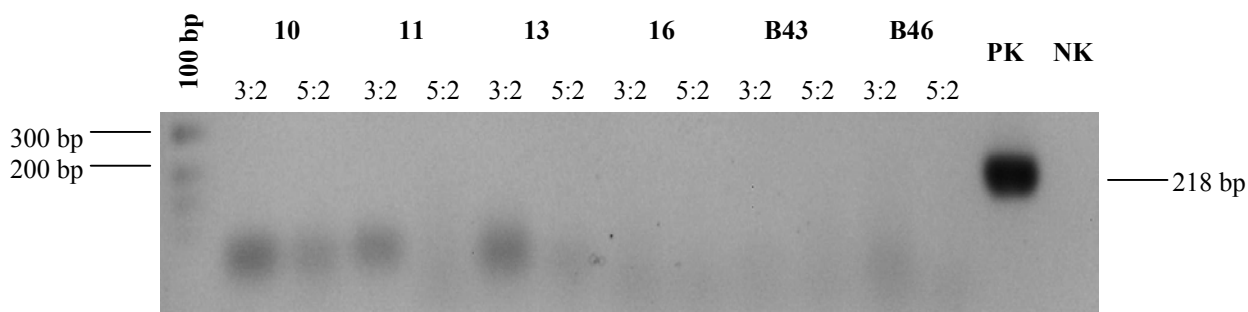


Obr. 5.29: **Expresa PERV-C 1312 *env* mRNA pátý den po transfekci.** Negativní kontrola byla pro všechny vzorky negativní (data neuvedena).

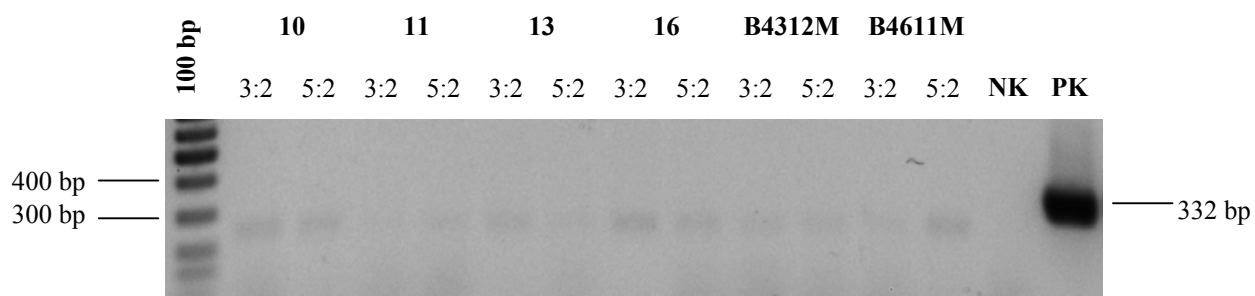
Po transienční transfekci druhých provirů jsem již byl schopen zajistit expresi PERV-A MAMBA a PERV-C 1312 ve všech subklonech buněk 293T a BeWo.

5.2.4 Infekce buněk 293T rekombinantními viry

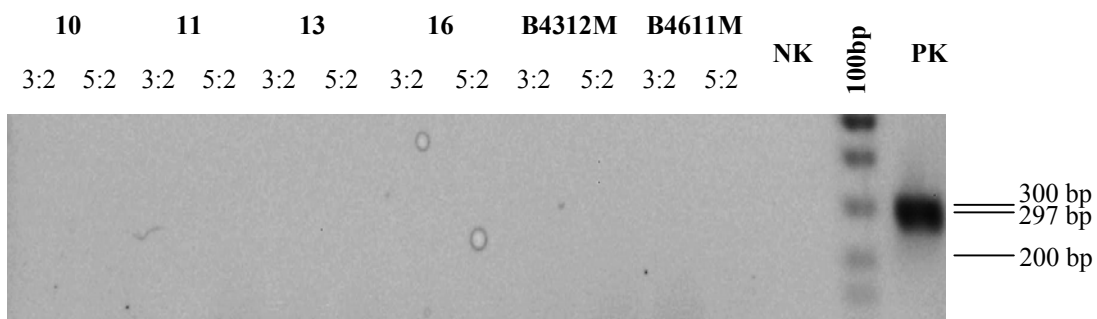
Pět dní po transientní transfekci jsem z 6 subklonů (2 vzorky od každého subklonu, tj. 12 vzorků) odebral médium, které jsem filtroval přes 0,45 μm filtr. Filtrát obohacený o polybren jsem smíchal s čerstvým médiem v poměru 1:1 a tuto směs jsem použil k infekci čerstvě narostlých buněk 293T. 30. den od infekce jsem z buněk izoloval DNA a RNA a detekoval virus metodou PCR s využitím pěti párů primerů specifických na LTR (délka amplifikované sekvence 218 nukleotidů), *gag* (délka amplifikované sekvence 332 nukleotidů), *pol* (délka amplifikované sekvence 297 nukleotidů), *env* MAMBA (délka amplifikované sekvence 329 nukleotidů) a *env* 1312 PERV (délka amplifikované sekvence 281 nukleotidů). Jako pozitivní kontrola posloužila plazmidová DNA (konstrukty nesoucí PERV-A MAMBA, PERV-C 1312), nebo izolovaná ověřená buněčná DNA (kontrola exprese lidské RNA polymerázy II). V případě negativní kontroly obsahoval vzorek vodu namísto nukleové kyseliny. Izolované nukleové kyseliny jsem také využil pro kontrolní amplifikaci lidské RNA polymerázy II.



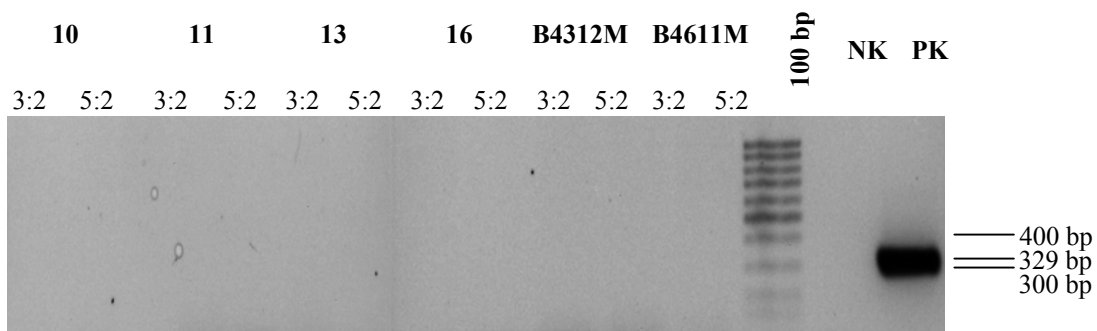
Obr. 5.30: Detekce LTR PERV DNA u infikovaných buněk 293T.



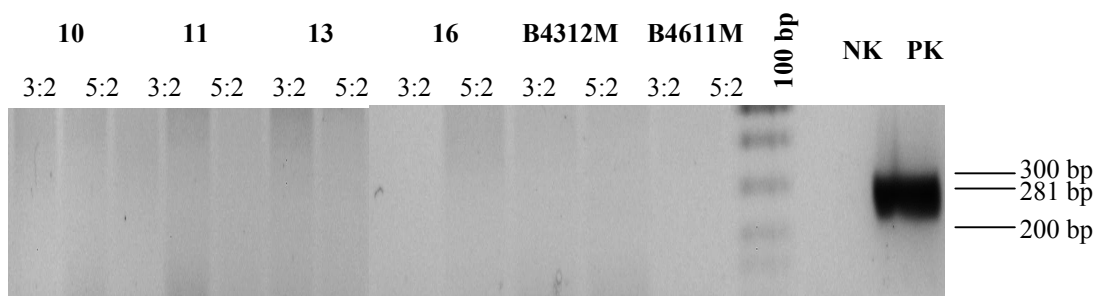
Obr. 5.31: Detekce *gag* PERV DNA u infikovaných buněk 293T.



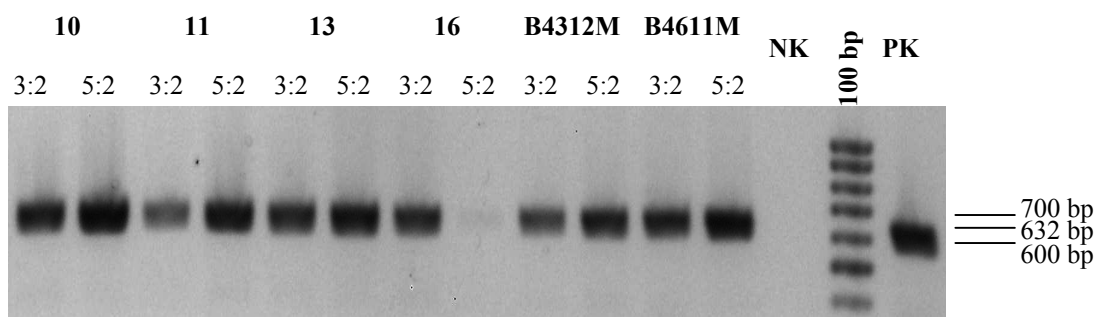
Obr. 5.32: Detekce *pol* PERV DNA u infikovaných buněk 293T.



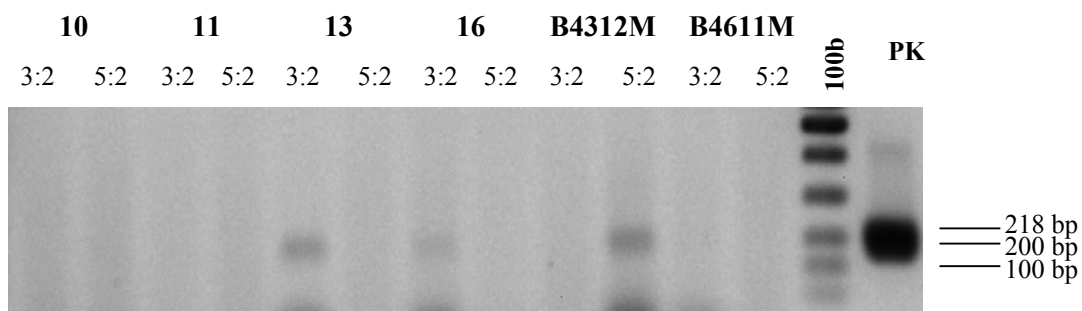
Obr. 5.33: Detekce *env* MAMBA PERV DNA u infikovaných buněk 293T.



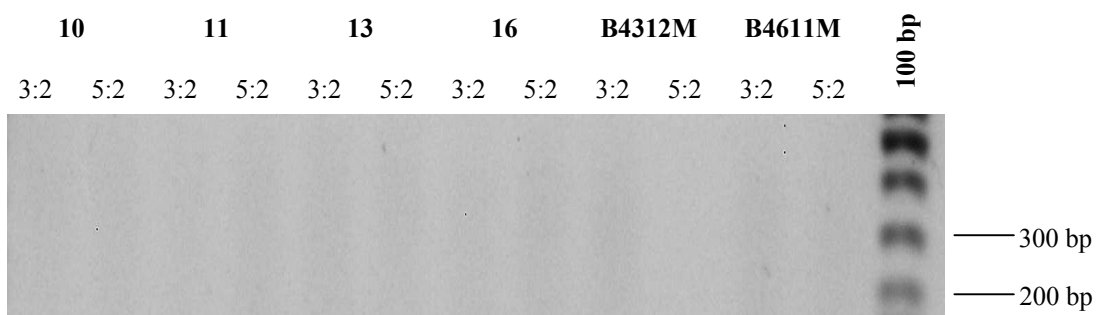
Obr. 5.34: Detekce env 1312 DNA u 293T infikovaných buněk 293T.



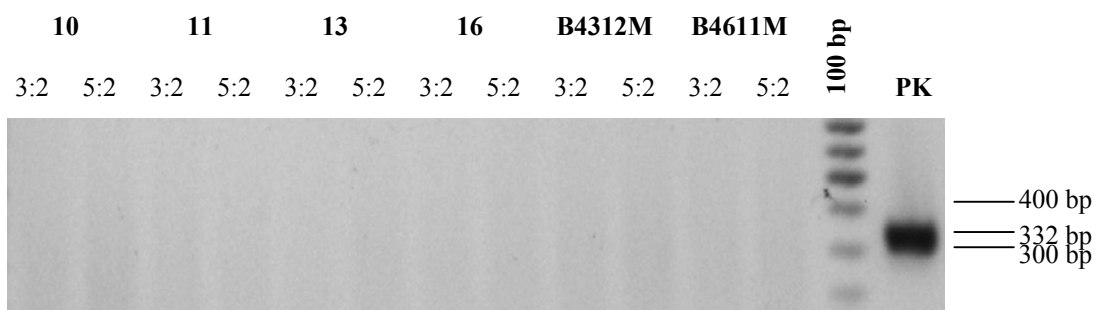
Obr. 5.35: Detekce hRPII DNA u 293T infikovaných buněk 293T.



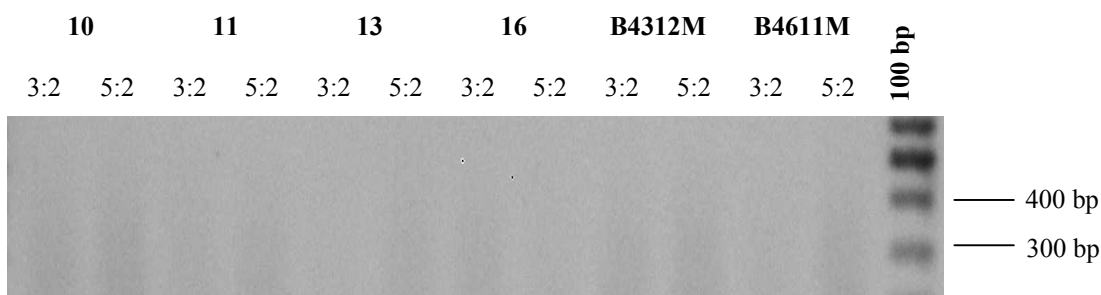
Obr 5.36a: Detekce LTR PERV mRNA u infikovaných buněk 293T.



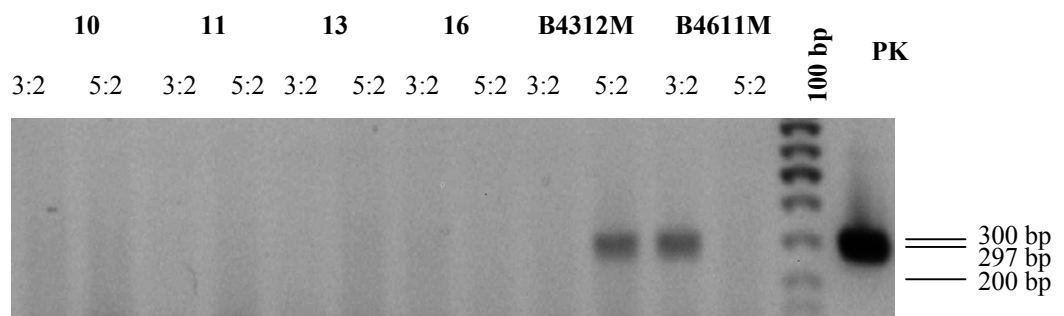
Obr. 5.36b: Negativní kontrola LTR PERV mRNA u infikovaných buněk 293T.



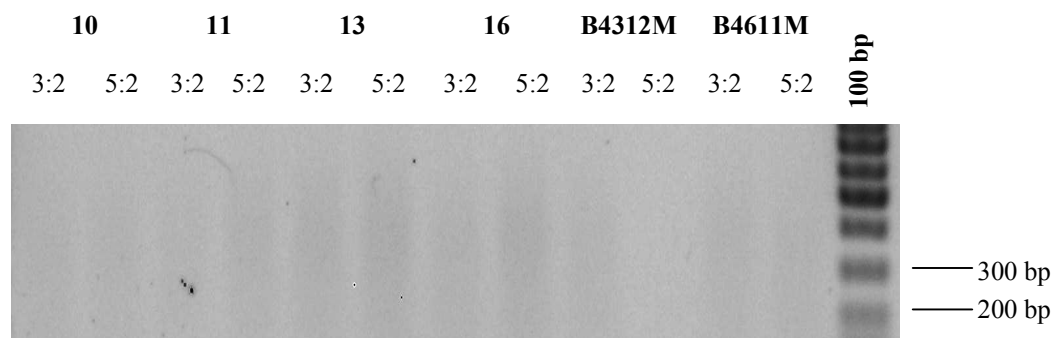
Obr. 5.37a: Detekce *gag* PERV mRNA u infikovaných buněk 293T.



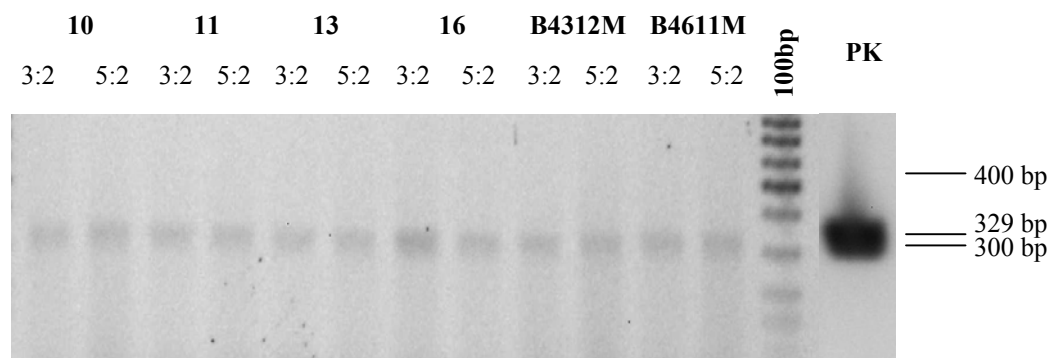
Obr. 5.37b: Negativní kontrola *gag* PERV mRNA u infikovaných buněk 293T.



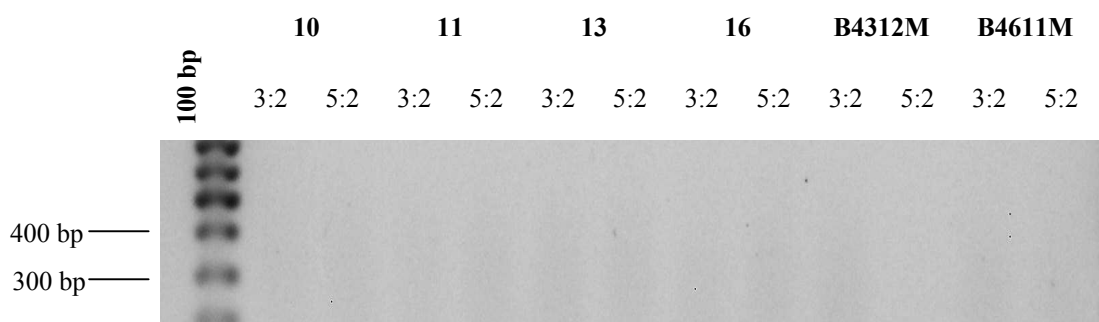
Obr. 5.38a: Detekce *pol* PERV mRNA u infikovaných buněk 293T.



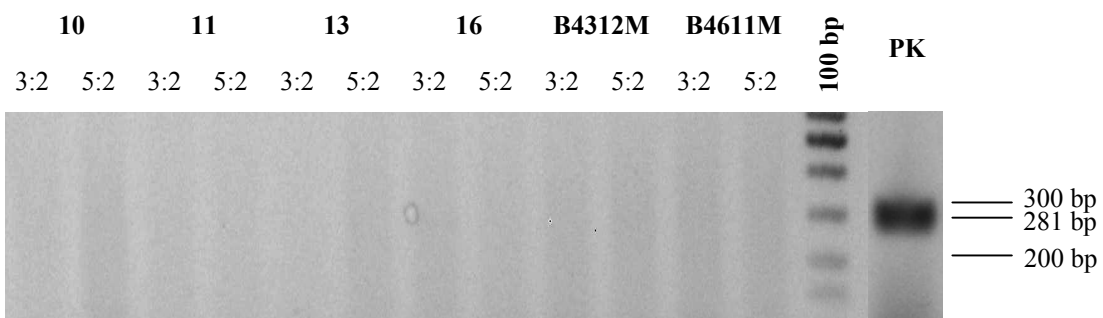
Obr. 5.38b: Negativní kontrola *pol* PERV mRNA u infikovaných buněk 293T.



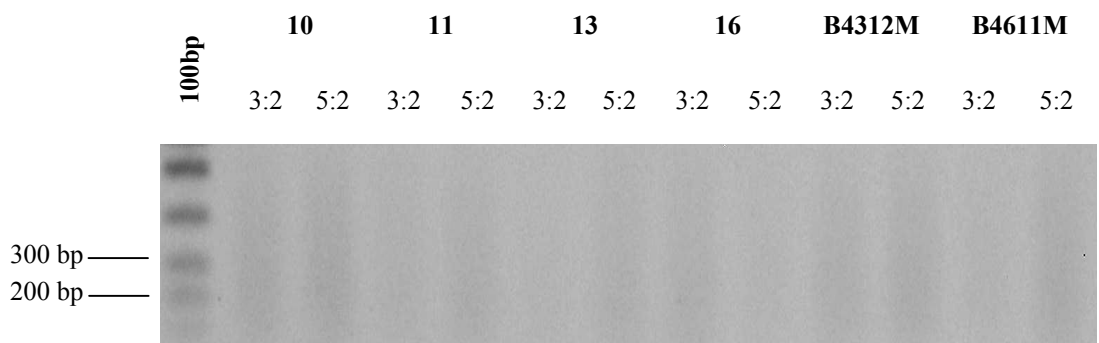
Obr. 5.39a: Detekce *env* MAMBA specifické mRNA u infikovaných buněk 293T.



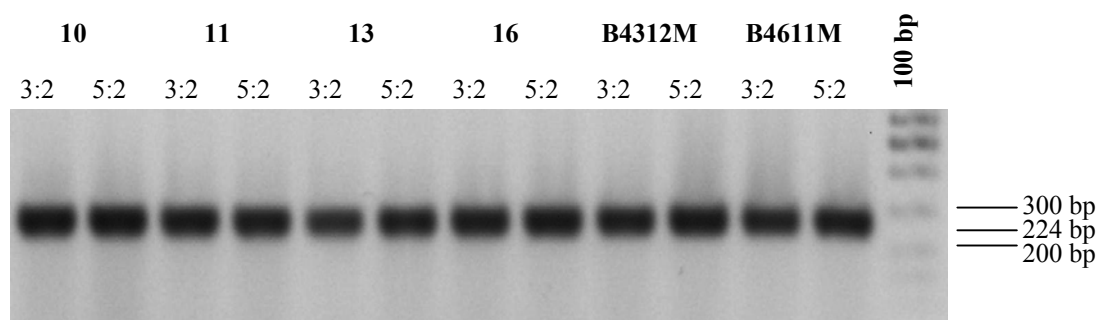
Obr. 5.39b: Negativní kontrola *env* MAMBA specifické mRNA u infikovaných buněk 293T.



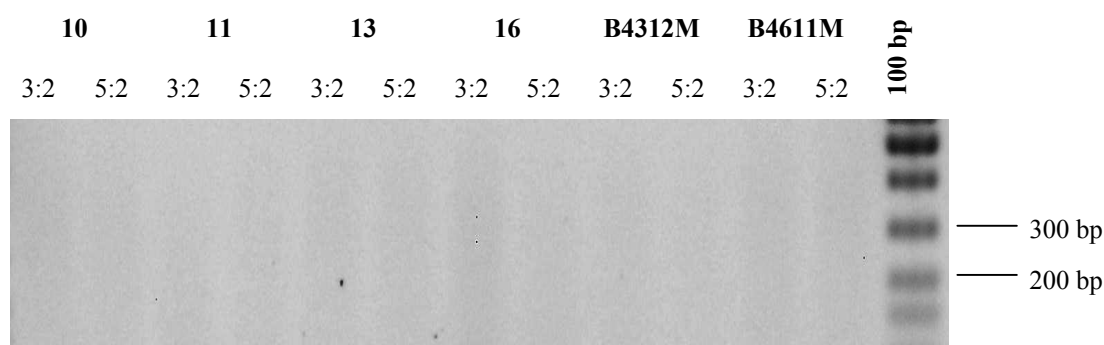
Obr.5.40a: Detekce *env* 1312 mRNA u infikovaných buněk 293T.



Obr. 5.40b: Negativní kontrola *env* 1312 mRNA u infikovaných buněk 293T.



Obr. 5.41a: Detekce hRPII mRNA u infikovaných buněk 293T.



Obr. 5.42b: Negativní kontrola hRPII mRNA u infikovaných buněk 293T.

V chromozomální DNA jsem nedetekoval žádnou část provirové sekvence PERV-A MAMBA nebo PERV-C 1312. Slabý signál jsem získal pro *gag* sekvenci PERV u všech vzorků, ale velikost amplifikované sekvence neodpovídá. Kontrola pro lidskou polymerázu byla pozitivní mimo jeden vzorek buněk 293T (klon 16, poměr 5:2 transientní transfekce PERV-C 1312), DNA z tohoto vzorku byla nevyhovující, takže data získaná pro tento klon nemohou být interpretována.

V izolované celkové RNA se mi slabě podařilo detekovat u všech vzorků *env* sekvenci z PERV-A MAMBA. Nicméně, sekvence *pol* byly detekovány jen u buněk infikovaných supernatanty z buněk BeWo. Další pozitivní výsledek jsem dostal pro LTR oblast u buněk infikovaných supernatanty ze subklonů 293T 13 (3:2), 16 (3:2) a BeWo B43 (5:2).

6 Diskuse

Ve všech prasečích tkáních je exprimována PERV mRNA v různém množství a velikosti transkriptů (AKIYOSHI *et al.*, 1998). Identifikace provirů, které dávají vzniku těmto transkriptům je ztížena jejich sekvenčním a inzerčním polymorfismem. Způsob řízení exprese PERV nebylo vyšetřováno, což by s ohledem na výše uváděné skutečnosti, přineslo významné informace pro detekci aktivních provirů.

Mými spolupracovníky bylo zjištěno, že v prasečích tkáních jsou 5' LTR oblasti, které obsahují virový promotor a cis-působící sekvence, PERV silně hypometylovány (MATOUSKOVA *et al.*, připraveno k publikaci). Abych podpořil tyto výsledky, zabýval jsem vlivem methylace na expresi řízenou z promotoru dvou tříd PERV (PERV-A MAMBA a PERV-A/B 60) *in vitro*. Zjistil jsem, že exprese luciferázy je výrazně snížena (5 až 10krát), pakliže je řízena z methylovaného promotoru v obou případech PERV-A MAMBA a PERV-A/B 60 oproti expresi, která byla řízena z promotoru nemetylovaného. *In vitro* data dokazují, že exprese PERV je ovlivňována methylací promotoru.

V prasečích tkáních je tak exprese PERV řízena z malého počtu lokusů, zatímco většina provirů je umlčených (MATOUSKOVA *et al.*, připraveno k publikaci). Eliminace aktivních lokusů PERV v miniaturním praseti by tak mohla postačit k celkové eliminaci přenosných PERV.

Rekombinace a vysoká nepřesnost replikace virové RNA, odehrávající se při unikátním kroku reverzní transkripce, jsou dvěma zásadními mechanismy pro evoluci retrovirů. Bylo pozorováno mnoha skupinami, že PBMC miniaturních prasat přenášejí endogenní retroviry na člověka, zvláště rekombinantní formy PERV-A/C (WILSON *et al.*, 1998, 2000, OLDMIXON *et al.*, 2002, BARTOSCH *et al.*, 2004, WOOD *et al.*, 2004). Tyto rekombinanty pokaždé obsahovaly část PERV-A, která je nezbytná pro vazbu a vstup viru do buňky, zatímco zbylá sekvence přenesených virů odpovídala PERV-C. Rekombinantní PERV-A/C virus vykazoval vyšší schopnost replikace v lidských buňkách, než virus PERV-A (WILSON *et al.*, 2000). Použití miniaturních prasat jako vhodného dárce xenotrasplantátů proto vyžaduje detailní prošetření schopnosti rekombinace mezi PERV. Většina sekvencí prasečích endogenních retrovirů jsou zkrácené, tj. buď zcela nekódující, nebo kódující jeden z retrovirových genů (*gag*, *pol* nebo *env*). Ačkoliv sami o sobě nemohou být defektní retroviry přenášeny, rekombinací mezi nimi mohou vznikat replikačně kompetentní viry.

Rekombinací míníme výměnu genetického materiálu mezi dvěma retroviry. Virus, který není původně infekční pro buňky daného hostitele, může být přenesen také dalšími

dvěma mechanismy – komplementací, příp. pseudotypizací. Komplementace je využití cizorodé molekuly kódované příbuzným virem pro replikační cyklus jiného viru. Pseudotypizace je zařazení obalového proteinu příbuzného viru do obalu jiného viru, jedná se o speciálním případ komplementace.

V této práci jsem se pokusil vyšetřit schopnost rekombinace mezi replikačně defektním PERV-A a replikačně kompetentním PERV-C. Pro studium rekombinace mezi PERV-A a PERV-C jsem použil replikačně defektní provirus PERV-A MAMBA (sekvence EU789636.1), který byl izolován kolegy naší laboratoře z tkání prasete z českého chovu (MATOUŠKOVÁ *et al.*, připraveno k publikaci). Replikačně kompetentní provirus PERV-C 1312 byl vřele poskytnut Ralfem Tönjesem (PREUSS *et al.*, 2006).

Jelikož PERV-C infikuje pouze prasečí buňky a ST-IOWA buněčná linie neexprimuje PERV-C mRNA (TAKEUCHI *et al.*, 1998), pokusil jsem se nejprve replikační schopnost PERV-C 1312 ověřit infekcí ST-IOWA buněk. Transfekované ST-IOWA buňky byly po 7 dnech po transfekci pozitivní na PERV-C 1312 specifickou *env* RNA. Naopak, netransfekované buňky byly negativní na expresi PERV-C 1312 specifickou *env* RNA. Přenesením supernatantu z ST-IOWA, pozitivních na PERV-C 1312, na nové ST-IOWA buňky bych v případě replikačně kompetentního viru získal signál, pokud byly infikovány. Skutečně, 16 dní od přenesení supernatantu jsem byl schopen detekovat PERV-C 1312 *env* specifickou RNA metodou RT-PCR. Systém ST-IOWA buněk je možné použít k ověření replikační schopnosti PERV-C.

Za účelem stabilní transfekce jsem potřeboval PERV-C 1312 překlonoval do plazmidu nesoucího selekční marker pro eukaryotické buňky. Poté co byla sekvence PERV-C zaklonována do nového plazmidu, jsem opět ověřil replikační schopnosti PERV-C 1312 na buňkách ST-IOWA, protože v průběhu klonování mohl PERV-C 1312 ztratit replikační schopnost v důsledku zanesené mutace. Podařilo se mi ověřit, že i překlonovaný PERV-C je infekční pro prasečí buňky.

Systém pro studium rekombinace *in vitro* byl navržen tak, že do lidských buněčných linií 293T a BeWo jsem postupně stabilně transfekoval oba proviry nesoucí různé selekční geny a transfekované buňky jsem následně selektoval příslušnými selekčními antibiotiky (Magda MATOUŠKOVÁ, Yasuhiro TAKEUCHI, osobní sdělení). Bylo by možné provést transientní transfekci linií oběma viry zároveň (kotransfekce), nicméně plazmidové DNA

by mohly spolu rekombinovat v buňce již během transfekce, což by podstatně zkreslilo výsledky rekombinace.

Buňky 293T jsem zvolil z důvodu velmi dobré účinnosti transfekční. Navíc bylo prokázáno, že jsou produktivně infikovány PERV (PATIENCE *et al.*, 1997; TAKEUCHI *et al.*, 1998). Nicméně linie 293T neexprimuje restriční faktor APOBEC3G (SHEEHY *et al.*, 2002), který se ukázal být funkční vůči PERV. Nesimuluje se tak přirozená situace, kdy jsou infikovány lidské buňky produkující restriční faktor působící vůči PERV. Je zde však větší šance na záchyt rekombinace.

Buněčná linie BeWo byla zvolena z důvodu velké exprese lidských endogenních retrovirů (TREJBALOVÁ *et al.*, 2011), která může být zvýšena působením forskolinu. Nicméně nedávno bylo zjištěno, že exprese receptoru HuPAR-2 je jak u buněk 293T tak u BeWo nízká (NAKAYA *et al.*, 2012), faktor který například u potkaních buněk limituje infekci PERV (MATTIUZZO *et al.*, 2007).

Předpokládané výsledky tohoto pokusu byly dva. Buď nebudeme detekovat na úrovni RNA ani DNA žádnou událost nasvědčující rekombinaci, pseudotypizaci nebo komplementaci retrovirů, nebo obdržíme nečetné množství pozitivních výsledků pro PERV-A a PERV-C, které si budeme jen s obtížemi vykládat. Získanými výsledky se dostáváme mezi tyto dva extrémy.

Fenotyp transfekovaných a selektovaných subklonů buněk byl rozdílný od buněk netransfekovaných v případě buněk 293T i BeWo. Buňky 293T byly protáhlé s dlouhými výběžky, fenotyp pozorovaný u buněk, které jsou poškozené zeocinem nebo hygromycinem B. Nicméně tyto buňky se množily dál a přetrvávaly v kultuře. Také se stávalo, že buňky, které odpovídaly na selekci zeocinem a hygromycinem B během několika dní zcela odumřely (cca 10% vzorků). Supernatant z těchto buněk jsem přenesl na nové buňky 293T, ale ani v jednom případě nebyl detekován přenos PERV (data nezveřejněna). Jeden subklon buněk BeWo (subklon B4312M), byl tvořen buňkami, které se velmi pomalu množily ve srovnání s ostatními transfekovanými buňkami BeWo. Je možné, že šlo o projev infekce PERV. Zda byl růst buněk zpomalen vyšší replikací transfekovaných PERV nebylo vyšetřováno. Subklon B4312M jsem vybral do infekčních experimentů a porovnal jej s rychleji rostoucím subklonem B4611M.

Přesto, že některé linie buněk po transfekci vykazovaly mírně odlišný fenotyp, PERV-A a PERV-C transfekce nevyústila v buněčnou apoptózu. Zajímavé je, že i přes dvojí transfekci jsme neobdrželi buňky, které by stabilně produkovaly oba dva PERV.

Přenosem supernatantů ze 4 subklonů buněk 293T a 2 subklonů buněk BeWo, dodatečně transfekovaných PERV, na nové 293T buňky, jsme simulovali jejich infekci. Klony buněk 293T byly dodatečně transfekovány PERV-C a klony buněk BeWo byly transfekovány PERV-A v různých poměrech činidla ku DNA (poměr vyjádřený v závorce vyjadřuje poměr transfekčního činidla u dodatečné transfekce). Všechny buňky, které byly vystaveny supernatantu z transfekovaných klonů buněk, byly slabě pozitivní na PERV-A MAMBA *env* specifickou RNA. Buňky infikované supernatanty z klonů 13(3:2) a 16(3:2) stejně jako z B4312M (3:2), byly pozitivní na LTR. Klony infikované supernatanty z B4312M (5:2) a B4611M (3:2) byly pozitivní na *pol* sekvenci PERV. Nicméně, v genomové DNA všech infikovaných buněk nebyly detekovány žádné sekvence PERV. Signál sekvence *gag* získaný amplifikací genomové DNA nedpovídal velikostí kontrolnímu vzorku, pravděpodobně se jednalo o artefakt produkovaný nespecifickým nasedáním *gag* primerů.

PERV-C 1312 *env* specifická RNA a DNA nebyla ani v jednom vzorku infikovaných buněk detekována, což není překvapivé, protože buňky 293T nemají na svém povrchu receptor rozpoznávaný PERV-C obalovým glykoproteinem. Nicméně, pokud by byla detekována PERV-C 1312 *env* specifická nukleová kyselina, jednalo by se o pseudotypizaci PERV-C genomu Env A proteinem, jak již bylo publikováno, případně by se mohlo jednat o nespecifický mechanismus vstupu PERV-C do buňky, který ale u linie 293T nebyl pozorován (OLDMIXON *et al.*, 2002).

Naopak, přítomnost PERV-A *env* RNA ve všech vzorcích naznačuje, že mohlo dojít k jedné z událostí (rekombinaci, pseudotypizaci nebo komplementaci).

Rozdíly v *pol* a LTR oblastech mezi PERV-A MAMBA a PERV-C 1312 byly natolik malé, že nemohly posloužit k návrhu primerů specificky rozlišujících PERV-A od PERV-C sekvence. Detekované signály nemůžeme s jistotou přisoudit PERV-A MAMBA nebo PERV-C. Jedinou možností je pokusit se klonovat produkty amplifikace do plazmidu a sekvenci porovnat se sekvencemi PERV-A MAMBA a PERV-C 1312. Pokud bychom našli PERV-C homologní sekvence mimo *env* A, jistě by se jednalo o rekombinantu. Z časových důvodů nebyla tato navazující práce vykonána.

Důvod, proč byla detekována u všech vzorků mRNA pro obalový protein Env a nikoliv ostatní části virové RNA, může spočívat v počtu kopií *env* specifické mRNA. V buňce infikované retrovirem vzniká kromě genomové RNA také sestřižená forma kódující informace pro obalový protein Env. Počet molekul *env* mRNA značně převyšuje počet molekul genomové RNA. Množství *env* specifické RNA tak mohlo být vyšší než je kritická mez pro úspěšnou amplifikaci. Ostatní transkripty, vznikající přepisem genomové RNA, byly v menším počtu kopií a amplifikací nebyly detekovány. Tento názor by mohl být například ověřen kvantitativní RT-PCR na vzorcích RNA pozitivních pro LTR a *pol* PERV.

Ani v jednom vzorku nebyla detekována část provirové DNA. Tento rozdíl může být dán několika příčinami. První příčinou může být kvalita izolované chromozomální DNA. Nicméně, poměry absorbancí při vlnových délkách 260/280 a 260/230 pro izolovanou DNA se nacházely v přijatelných mezích 1,8-2,0. Také úspěšná detekce exprese kontrolního genu pro lidskou RNA-polymerázu II nenasvědčuje o problému s kvalitou izolované chromozomální DNA. Rozdíly v detekci RNA a DNA endogenních retrovirů tak mohou spočívat v tom, že nedošlo k integraci provirové DNA do genomu a tato DNA přetrvávala v neintegrované kovalentně uzavřené kruhové formě. Tato tzv. Hirtova frakce DNA není získána běžným postupem izolace chromozomální DNA, který jsem v této práci využíval. Také je možné, že integrovaný rekombinantní provirus byl přítomen jen v jedné nebo mála kopiích na genom a PCR nebyla dostatečně citlivá k jeho amplifikaci. Tato možnost se nedá vyloučit, neboť citlivost PCR metody s danými sety primerů nebyla stanovována na DNA, ale na plazmidové DNA. Mohlo dojít i k nesprávně zvoleným podmínkám pro amplifikaci z genomové DNA, neboť plazmidová DNA je oproti genomové DNA daleko lepším templátem a podmínky pro amplifikaci se mezi použitým typem templátu odlišují. Teplota nasedání primerů, kterou jsem stanovil testováním na plazmidové DNA, nemusí odpovídat DNA genomové. Nicméně, primery specifické na PERV-C 1312 a PERV-A MAMBA *env* jsem úspěšně využil pro detekci transfekce lidských buněk za stejných podmínek amplifikace.

Ačkoliv jsem v několika případech detekoval části sekvencí PERV, nemohu tvrdit, že jsem prokázal rekombinaci, ani jinou událost (komplementace, pseudotypizace) vedoucí k přenosu PERV na lidské buňky. Definitivním průkazem rekombinace by byla identifikace integrovaného proviru, tj. detekce provirové DNA spolu s místem integrace v chromozomální DNA infikovaných buněk. V sekvenci proviru by se musely kombinovat sekvence obou originálních virů použitých ke koinfekci.

7 Souhrn

Methylační esej

- sestrojil jsem vektory, které nesou před reportérovým genem luciferázy 5' LTR oblast z PERV-A MAMBA nebo PERV-A/B 60
- *in vitro* methylací a ověřením methyl-senzitivní restriktázou *HpaII* jsem získal plně methylované vektory
- 293T buňky jsem kotransfekoval plně methylovaným (nebo nemethylovaným) vektorem společně s pCMV- β -gal vektorem
- porovnáním naměřených aktivit β -galaktosidázy a luciferázy jsem získal relativní luciferázovou aktivitu pro oba proviry
- v obou případech (PERV-A MAMBA, PERV-A/B 60) jsem zjistil, že relativní luciferázová aktivita je významně (5 až 10 \times) snížena u methylovaných vektorů
- exprese PERV je citlivá na methylaci virového promotoru *in vitro*

Rekombinace PERV

- sestrojil jsem vektory nesoucí nezkrácené provirové sekvence replikačně defektního PERV-A MAMBA a replikačně kompetentního PERV-C 1312
- zjistil jsem, že ST-IOWA prasečí buňky nevytváří transkript PERV-C 1312
- infekcí ST-IOWA buněk jsem ověřil, že PERV-C 1312 je replikačně kompetentní provirus
- stabilní transfekcí a selekcí jsem získal 4 subklony buněk BeWo nesoucí PERV-A MAMBA provirus a 11 subklonů buněk 293T nesoucích PERV-C 1312 provirus
- stabilní transfekce a selekce buněk 293T a BeWo, nesoucí oba proviry, se nezdařila
- supernatant z transientně transfekovaných buněk 293T a BeWo jsem použil k infekční esejí
- infikované 293T buňky byly negativní na přítomnost PERV DNA, ale pozitivní k některým sekvencím PERV v izolované buněčné RNA
- přes dílčí náznaky infekce buněk 293T nelze uzavřít, že je to důsledek rekombinace, bude třeba detekované produkty PCR klonovat a analyzovat jejich sekvenci

8 Seznam použité literatury

Akiyoshi, D.E., Denaro, M., Zhu, H., Greenstein, J.L., Banerjee, P., Fishman, J.A. (1998): Identification of a full-length cDNA for an endogenous retrovirus of miniature swine. *J. Virol.* 72(5): 4503-4507.

Anderson, J.A., Bowman, E.H., Hu, W.S. (1998): Retroviral recombination rates do not increase linearly with marker distance and are limited by the size of the recombining sub-population. *J. Virol.* 72(2): 1195-1202.

Anderson, J.L., Campbell, E.M., Vandegraaff, N., Engelman, A., Hope, T.J. (2006): Proteasome inhibition reveals that a functional preintegration complex intermediate can be generated during restriction by diverse TRIM5 proteins. *J. Virol.* 80(19): 9754-9760.

Armstrong, J.A., Porterfield, J.S., De Madrid, A.T. (1971): C-type virus particles in pig kidney cell lines. *J. Gen. Virol.* 10(2): 195-198.

Bartosch, B., Stefanidis D., Myers R., Weiss R., Patience C., Takeuchi Y. (2004): Evidence and consequence of porcine endogenous retrovirus recombination. *J. Virol.* 78(24): 13880-13890.

Bell, A.C., Felsenfeld, G. (2000): Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the *Igf2* gene. *Nature.* 405(6785): 482-485.

Bird, A. (2002): DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes. Dev.* 16: 6-21.

Blusch, J.H., Patience, C., Takeuchi, Y., Templin, C., Roos, C., Von Der Helm, K., Steinhoff, G., Martin, U. (2000): Infection of nonhuman primate cells by pig endogenous retrovirus. *J. Virol.* 74(16): 7687-7690.

Boeke, J.D., Stoye, J.P. (1997): Retrotransposons, endogenous retroviruses, and the evolution of retroelements. In: Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE (eds.): *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY), 343-435.

Coffin, J.M. (1979): Structure, replication, and recombination of retrovirus genomes: some unifying hypotheses. *J. Virol.* 42(1): 1-26.

Daniel, J.M., Reynolds, A.B. (1999): The catenin p120(ctn) interacts with Kaiso, a novel BTB/POZ domain zinc finger transcription factor. *Mol. Cell. Biol.* 19(5): 3614-3623.

Daniel, J.M., Spring, C.M., Crawford, H.C., Reynolds, A.B., Baig, A. (2002): The p120(ctn)-binding partner Kaiso is a bi-modal DNA-binding protein that recognizes both a sequence-specific consensus and methylated CpG dinucleotides. *Nucleic Acids Res.* 30(13): 2911-2919.

Davuluri, R.V., Grosse, I., Zhang, M.Q. (2001): Computational identification of promoters and first exons in the human genome. *Nat. Genet.* 29(4): 412-417.

Defossez, P.A., Stancheva, I. (2011): Biological functions of methyl-CpG-binding proteins. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 101: 377-398.

Denner, J., Specke, V., Thiesen, U., Karlas, A., Kurth, R. (2003): Genetics alterations of the long terminal repeat of an ecotropic porcine endogenous retrovirus during passage in human cells. *Virology.* 314(1): 125-133.

Denner, J. (2008): Recombinant porcine endogenous retroviruses (PERV-A/C): a new risk for xenotransplantation? *Arch. Virol.* 153(8): 1421-1426.

DeStefano, J.J., Bambara, R.A., Fay, P.J. (1994): The mechanism of human immunodeficiency virus reverse transcriptase-catalyzed strand transfer from internal regions of heteropolymeric RNA templates. *J. Biol. Chem.* 269(1): 161-168.

Dörrschuck, E., Münk, C., Tönjes, R.R. (2008): APOBEC3 proteins and porcine endogenous retroviruses. *Transplant. Proc.* 40(4): 959-961.

Ericsson, T.A., Takeuchi, Y., Templin, C., Quinn, G., Farhadian, S.F., Wood, J.C., Oldmixon, B.A., Suling, K.M., Ishii, J.K., Kitagawa, Y., Miyazawa, T., Salomon, D.R.,

Weiss, R.A., Patience, C. (2003): Identification of receptors for pig endogenous retrovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100(11): 6759-6764.

Gabuzda, D.H., Lawrence, K., Langhoff, E., Terwilliger, E., Dorfman, T., Haseltine, W.A., Sodroski, J. (1992): Role of vif in replication of human immunodeficiency virus type 1 in CD4⁺ T lymphocytes. *J. Virol.* 66(11): 6489-6495.

Gemeniano, M., Mpanju, O., Salomon, D.R., Eiden, M.V., Wilson, C.A. (2006): The infectivity and host range of the ecotropic porcine endogenous retrovirus, PERV-C, is modulated by residues in the C-terminal region of its surface envelope protein. *Virology.* 346(1): 108-117.

Goll, M.G., Bestor, T.H. (2005): Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.* 74: 481-514.

Hansen, R.S., Stoger, R., Wijmenga, C., Stanek, A.M., Canfield, T.K., Luo, P., Matarazzo, M.R., D'Esposito, M., Feil, R., Gimeli, G., Weemaes, C.M., Laird, C.D., Gartler, S.M. (2000): Escape from gene silencing in ICF syndrome: evidence for advanced replication time as a major determinant. *Hum. Mol. Genet.* 9(18): 2575-2587.

Harbers, K., Schnieke, A., Stuhlmann, H., Jähner, D., Jaenisch, R. (1981): DNA methylation and gene expression: endogenous retroviral genome becomes infectious after molecular cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78(12): 7609-7613.

Harrison, I., Takeuchi, Y., Bartosch, B., Stoye, J.P. (2004): Determinants of high titer in recombinant porcine endogenous retroviruses. *J. Virol.* 78(24): 13871-13879.

Herniou, E., Martin, J., Miller, K., Cook, J., Wilkinson, M., Tristem, M. (1998): Retroviral diversity and distribution in vertebrates. *J. Virol.* 72(7): 5955-5966.

Hung, M.S., Karthikeyan, N., Huang, B., Koo, H.C., Kiger, J., Shen, C.J. (1999): *Drosophila* proteins related to vertebrate DNA (5-cytosine) methyltransferases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96(21): 11940-11945.

Jarmuz, A., Chester, A., Bayliss, J., Gisbourne, Dunham, I., J., Scott, J., Navaratnam, N. (2002): An anthropoid-specific locus of orphan C to U RNA-editing enzymes on chromosome 22. *Genomics*. 79(3): 285-296.

Jónsson, S.R., Haché, G., Stenglein, M.D., Fahrenkrug, S.C., Andrésdóttir, V., Harris, R.S. (2006): Evolutionarily conserved and non-conserved retrovirus restriction activities of artiodactyla APOBEC3F proteins. *Nucleic Acids Res.* 34(19): 5683-5694.

Jónsson, S.R., LaRue, R.S., Stenglein, M.D., Fahrenkrug, S.C., Andrésdóttir, V., Harris, R.S. (2007): The restriction of zoonotic PERV transmission by human APOBEC3G. *PLoS. One.* 2(9):e893.

Katz, R.A., Jack-Scott, E., Narezkina, A., Palagin, I., Boimel, P., Kulkosky, J., Nicolas, E., Greger, J.G., Skalka, A.M. (2007): High-frequency epigenetic repression and silencing of retroviruses can be antagonized by histone deacetylase inhibitors and transcriptional activators, but uniform reactivation in cell clones is restricted by additional mechanisms. *J. Virol.* 81(6): 2592-2604.

Kempler, G., Freitag, B., Berwin, B., Nanassy, O., Barklis, E. (1993): Characterization of the Moloney murine leukemia virus stem cell-specific repressor binding site. *Virology.* 193(2): 690-699.

Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., *et al.* (2001): Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 409(6822): 860-921.

Le Tissier, P., Stoye, J.P., Takeuchi, Y., Patience, C., Weiss, R.A. (1997): Two sets of human-tropic pig retrovirus. *Nature.* 389(6652): 681-682.

Lorincz, M.C., Schubeler, D., Goeke, S.C., Walters, M., Groudine, M., Martin, D.I. (2000): Dynamic analysis of proviral induction and De novo methylation: implications for

a histone deacetylase-independent, methylation density-dependent mechanism of transcriptional repression. *Mol Cell Biol.* 20(3): 842-850.

Marcucci, K.T., Argaw, T., Wilson, C.A., Salomon, D.R. (2009): Identification of two distinct structural regions in human porcine endogenous retrovirus receptor, HuPAR2, contributing to function for viral entry. *Retrovirology.* 6:3.

Martin, S.I., Wilkinson, R., Fishman, J.A. (2006): Genomic presence of recombinant porcine endogenous retrovirus in transmitting miniature swine. *Virol. J.* 3:91.

Martina, Y., Marcucci, K.T., Cherqui, S., Szabo, A., Drysdale, T., Srinivisan, U., Wilson, C.A., Patience, C., Salomon, D.R. (2006): Mice transgenic for a human porcine endogenous retro-virus receptor are susceptible to productive viral infection. *J. Virol.* 80(7): 3135-3146.

Mi, S., Lee, X., Veldman, G.M., Finnerty, H., Racie, L., LaVallie, E., Tang, X.Y., Edouard, P., Howes, S., Keith, J.C. Jr., McCoy, J.M. (2000): Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature.* 403(6771): 785-789.

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

Mattiuzzo, G., Ivol, S., Takeuchi, Y. (2010): Regulation of porcine endogenous retrovirus release by porcine and human tetherins. *J. Virol.* 84(5): 2618-2622.

Meije, Y., Tönjes, R.R., Fishman, J.A. (2010): Retroviral restriction factors and infectious risk in xenotransplantation. *Am. J. Transplant.* 10(7): 1511-1516.

Miao, V.P., Freitag, M., Selker, E.U. (2000): Short TpA-rich segments of the zeta-eta region induce DNA methylation in *Neurospora crassa*. *J. Mol. Biol.* 300(2): 249-273.

Nakaya, Y., Shimode, S., Kobayashi, T., Imakawa, K., Miyzawa, T. (2012): Binding of transcription factor activating protein 2 γ on the 5'-proximal promoter region of human porcine endogenous retrovirus subgroup A receptor 2/GPR172B. *Xenotransplantation*. 19(3): 177-185.

Negroni, M., Buc, H. (2000): Copy-choice recombination by reverse transcriptases: Reshuffling of genetic markers mediated by RNA chaperones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97(12): 6385-6390.

Neil, S.J., Zang, T., Bieniasz, P.D. (2008): Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature*. 451(7177): 425-430.

Niebert, M., Tönjes, R.R. (2005): Evolutionary spread and recombination of porcine endogenous retroviruses in the suiformes. *J. Virol*. 79(1): 649-654.

Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A., Li, E. (1999): DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*. 99(3): 247-257.

Oldmixon, B.A., Wood, J.C., Ericsson, T.A., Wilson, C.A., White-Scharf, M.E., Andersson, G., Greenstein, J.L., Schuurman, H.J., Patience, C. (2002): Porcine endogenous retrovirus transmission characteristics of an inbred herd of miniature swine. *J. Virol*. 76(6): 3045-3048.

Patience, C., Takeuchi, Y., Weiss, R.A. (1997): Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nat. Med*. 3(3): 282-286.

Patience, C., Switzer, W.M., Takeuchi, Y., Griffiths, D.J., Goward, M.E., Heneine, W., Stoye, J.P., Weiss, R.A. (2001): Multiple groups of novel retroviral genomes in pigs and related species. *J. Virol*. 75(6): 2771-2775.

Pfeifer, G.P., Steigerwald, S.D., Hansen, R.S., Gartler, S.M., Riggs, A.D. (1990): Polymerase chain reaction-aided genomic sequencing of an X chromosome-linked CpG is-

land: methylation patterns suggest clonal inheritance, CpG site autonomy, and an explanation of activity state stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87(21): 8252-8256.

Poleshko, A., Palagin, I., Zhang, R., Boimel, P., Castagna, C., Adams, P.D., Skalka, A.M., Katz, R.A. (2008): Identification of cellular proteins that maintain retroviral epigenetic silencing: evidence for an antiviral response. *J. Virol.* 82(5): 2313-2123.

Preuss, T., Fischer, N., Boller, K., Tönjes, R.R. (2006): Isolation and characterization of an infectious replication-competent molecular clone of ecotropic porcine endogenous retrovirus class C. *J. Virol.* 80(20): 10258-10261.

Ritzhaupt, A., Van Der Laan, L.J., Salomon, D.R., Wilson, C.A. (2002): Porcine endogenous retrovirus infects but does not replicate in nonhuman primate primary cells and cell lines. *J. Virol.* 76(22): 11312-11320.

Rhee, I., Jair, K.W., Yen, R.W., Lengauer, C., Herman, J.G., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Baylin, S.B., Schuebel, K.E. (2000): CpG methylation is maintained in human cancer cells lacking DNMT1. *Nature.* 404(6781): 1003-1007.

Rhodes, T., Wargo, H., Hu, W.S. (2003): High rates of human immunodeficiency virus type 1 recombination: near-random segregation of markers one kilobase apart in one round of viral replication. *J. Virol.* 77(20): 11193-11200.

Scheef, G., Fischer, N., Krach, U., Tönjes, R.R. (2001): The number of a U3 repeat box acting as an enhancer in long terminal repeats of polytropic replication-competent porcine endogenous retroviruses dynamically fluctuates during serial passages in human cells. *J. Virol.* 75(15): 6933-6940.

Scobie, L., Taylor, S., Wood, J.C., Suling, K.M., Quinn, G., Meikle, S., Patience, C., Schuurman, H.J., Onions, D.E. (2004): Absence of replication-competent human-tropic porcine endogenous retroviruses in the germ line DNA of inbred miniature swine. *J. Virol.* 78: 2502-2509.

Shalginskikh, N., Poleshko, A., Skalka, A.M., Katz, R.A. (2013): Retroviral DNA methylation and epigenetic repression are mediated by the antiviral host protein Daxx. *J. Virol.* 87(4): 2137-2150.

Sheehy, A.M., Gaddis, N.C., Choi, J.D., Malim, M.H. (2002): Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature.* 418(6898) 646-650.

Suzuka, I., Sekiguchi, K., Kodama, M. (1985): Some characteristics of a porcine retrovirus from a cell line derived from swine malignant lymphomas. *FEBS. Lett.* 183(1): 124-128.

Takeuchi, Y., Patience, C., Magre, S., Weiss, R.A., Banerjee, P.T., Le Tissier, P., Stoye, J.P. (1998): Host range and interference studies of three classes of pig endogenous retrovirus. *J. Virol.* 72(12): 9986-9991.

Trejbalová, K., Blazková, J., Matoušková, M., Kucerová, D., Pecnová, L., Vernerová, Z., Heráček, J., Hirsch, I., Hejnar, J. (2011): Epigenetic regulation of transcription and splicing of syncytins, fusogenic glycoproteins of retroviral origin. *Nucleic Acids Res.* 39(20): 8728-8739.

Turker, M.S. (1999): The establishment and maintenance of DNA methylation patterns in mouse somatic cells. *Semin. Cancer Biol.* 9(5): 329-337.

Watt, F., Molloy, P.L. (1988): Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes. Dev.* 2(9): 1136-1143.

Wedekind, J.E., Dance, G.S., Sowden, M.P., Smith, H.C. (2003): Messenger RNA editing in mammals: new members of the APOBEC family seeking roles in the family business. *Trends Genet.* 19(4): 207-216.

Wilson, C.A., Wong, S., Muller, J., Davidson, C.E., Rose, T.M., Burd, P. (1998): Type C retrovirus released from porcine primary peripheral blood mononuclear cells infects human cells. *J. Virol.* 72(4): 3082-3087.

Wilson, C.A., Wong, S., VanBrocklin, M., Federspiel, M.J. (2000): Extended analysis of the in vitro tropism of porcine endogenous retrovirus. *J. Virol.* 74(1): 49-56.

Wilson, C.A., Laeeq, S., Ritzhaupt, A., Colon-Moran, W., Yoshimura, F.K. (2003): Sequence analysis of porcine endogenous retrovirus lung terminal repeats and identification of transcriptional regulatory regions. *J. Virol.* 77(1): 142-149.

Wood, J.C., Quinn, G., Suling, K.M., Oldmixon, B.A., Van Tine, B.A., Cina, R., Arn, S., Huang, C.A., Scobie, L., Onions, D.E., Sachs, D.H., Schuurman, H.J., Fishman, J.A., Patience, C. (2004): Identification of exogenous forms of human-tropic porcine endogenous retrovirus in miniature swine. *J. Virol.* 78(5): 2494-2501.

Wood, J.C., Webb, B.L.J., Bartosch, B., Schaller, T., Takeuchi, Y., Towers, G.J. (2009): Porcine endogenous retroviruses PERV A and A/C recombinant are insensitive to a range of divergent mammalian TRIM5 α proteins including human TRIM5 α . *J. Gen. Virol.* 90(Pt 3): 702-709.

Xu, H., Boeke, J.D. (1987): High-frequency deletion between homologous sequences during retrotransposition of Ty elements in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84(23): 8553-8557.

Ylinen, L.M.J., Keckesova, Z., Wilson, S.J., Ranasinghe, S., Towers, G.J. (2005): Differential restriction of human immunodeficiency virus type 2 and simian immunodeficiency virus SIVmac by TRIM5 α alleles. *J. Virol.* 79(18): 11580-11587.

Yonezawa, A., Masuda, S., Katsura, T., Inui, K. (2008): Identification and functional characterization of a novel human and rat riboflavin transporter, RFT1. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 295(3): C632-41.