**Univerzita Karlova**

**Přírodovědecká fakulta**

Autoreferát dizertační práce

# Replikační bloky viru Rousova sarkomu v savčích buňkách

**Ing. Anna Koslová**

Praha, 2017

**Doktorské studijní programy v biomedicíně**

Univerzita Karlova

a

Akademie věd České republiky

Program: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

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

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

Autor: Ing Anna Koslová

Školitel: prof. RNDr. Jan Svoboda, DrSc., RNDr. Jiří Hejnar, CSc.

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

## Obsah

Abstrakt……..….4
Úvod…….……..5
Cíle…….……..…6
Materiál a metody…….……...6
Výsledky a Diskuze……...….…7
Závěry……..……..11
Použitá literatura……..……..12
Životopis……..……..14
Seznam publikací…….……..15

## Zkratky

| | |
|---|---|
| ASLV | ptačí sarkomové a leukózové viry |
| DF-1 | linie kuřecích fibroblastů |
| DR | přímé repetice |
| Env | obalový glykoprotein |
| H-20 | křeččí nádorová linie |
| HEK293 | lidské embryonální ledvinné buňky |
| NIL | křeččí embryonální buňky |
| PCR | polymerázová řetězová reakce |
| PMB | PEG-maleimid-biotin |
| PR-RSV-C | Pražský kmen RSV podskupina C |
| qPCR | kvantitativní PCR |
| RPE1-hTERT | linie epitelových buněk retiny imortalizovaných lidskou telomerázou |
| RSCh | křeččí buňky trasnformované SR-RSV-D |
| RSV | virus Rousova sarkomu |
| SR-RSV-D | Schmidt Ruppinův kmen RSV podskupina D |
| SU | povrchová podjednotka |
| TM | transmembránová podjednotka |
| XC | potkanní nádorová linie |

**Abstrakt**

Jedním z důležitých úkolů virologie i imunologie je odhalit mezidruhové a buněčné bariéry bránící horizontálnímu přenosu virů a určit, jakým způsobem mohou viry překonat tyto překážky a adaptovat se na jiný živočišný druh. Tato práce je založena na dobře zavedeném retrovirovém modelu – ptačím viru Rousova sarkomu (RSV), a zkoumá, jakým způsobem je blokována replikace tohoto viru v savčích buňkách.

Vstup viru do buňky je zprostředkován vazbou virového obalového glykoproteinu (Env) na specifický buněčný receptor. Ačkoliv savčí orthology popsaných ptačích receptorů neumožňují vstup RSV do buňky, u některých kmenů RSV byl pozorován tropismus pro savčí buňky a byly popsány různé savčí linie transformované RSV. Analýza proviru H20-RSV v jedné z těchto linií (křeččí nádorová linie H-20) odhalila několik mutací včetně dvou zásadních aminokyselinových záměn v rozdílných částech Env. Záměny D32G a L378S umožnily virový přenos na křeččí, lidské i kuřecí buňky postrádající příslušný receptor. Pozměněná konformace Env H20-RSV byla podobná jako v případě aktivovaného stavu Env po interakci s receptorem. Toto pozorování ukazuje, že viry mohou infikovat buňky i nezávisle na původním receptoru díky spontánní aktivaci Env, pro kterou je dostatečná záměna jedné aminokyseliny.

Ačkoliv je v některých případech RSV schopen vstupovat do savčích buněk a transformovat je, nedochází k tvorbě infekčních virových částic. Nicméně virová produkce může být v savčích transformovaných buňkách obnovena fúzí s permisivními kuřecími buňkami. Tento jev byl analyzován v druhé části této práce. Křeččí buňky transformované RSV produkovaly pouze velmi malé množství *env* mRNA a žádný obalový glykoprotein. Virová genomová RNA byla lokalizována převážně v jádře a buňky tvořily jen malé množství neprocesovaného proteinu Gag. Fúze s permisivními kuřecími buňkami vedla ke zvýšení hladiny *env* mRNA, jadernému exportu genomové RNA, stejně jako k tvorbě příslušných virových proteinů. Tyto výsledky naznačují, že savčí buňky postrádají některé kuřecí faktory potřebné pro správnou úpravu *env* mRNA a jaderný export genomové RNA.

## Úvod

Virus Rousova sarkomu slouží už více než jedno století ke studiu retrovirové replikace a stal se jedním ze základních virových modelů. RSV patří mezi ptačí sarkomové a leukózové viry (ASLV), které jsou součástí *Alpharetroviridae*. Již před mnoha lety bylo zjištěno, že tyto ptačí viry dokáží v experimentálních podmínkách infikovat i některé druhy hlodavců (Svoboda, 1960). Bylo pozorováno, že schopnost vstupovat do savčích buněk souvisí s obalovým glykoproteinem a je typická především pro podskupinu D. Ptačí receptory pro jednotlivé podskupiny ASLV (A-E, J) byly popsány, ale savčí orthology těchto receptorů neumožňují vstup RSV do buňky. Proto nebylo dosud jasné, jak tyto viry do savčích buněk vstupují.

Savčí buňky transformované RSV přispěly k odhalení retrovirové integrace, studiu epigenetického umlčování retrovirů a buněčné transformace. Přestože RSV do savčích buněk vstupuje a integruje svojí virovou DNA do hostitelského genomu, nedochází k plné replikaci viru a v těchto buňkách se netvoří infekční virové částice (Svoboda et al., 1963). Virová produkce může být ale obnovena fúzí s kuřecími fibroblasty (Svoboda and Dourmashkin, 1969). Molekulární analýza změn, ke kterým po fúzi dochází, dosud nebyla provedena.

## Cíle

1. Prvním cílem této práce bylo objasnit, jakým způsobem může RSV vstupovat do savčích buněk. Pro studium této problematiky byly použity potkaní (XC) a křeččí (H-20) nádorové linie, které vznikly transformací Pražským kmenem RSV (podskupina C). Jelikož u tohoto virového kmene nebyl původně pozorován tropismus pro savčí buňky, byly analyzovány provirové sekvence RSV v těchto nádorových liniích za účelem nalezení změn zodpovědných za vstup viru do savčích buněk.
2. Druhým cílem bylo zjistit, které kroky virové replikace jsou v křeččích buňkách transformovaných RSV narušeny, a popsat hlavní změny ve virovém replikačním cyklu při obnovení virové produkce fúzí s permisivními kuřecími fibroblasty. Ke splnění tohoto cíle byla

použita křeččí linie RSCh, která byla transformována kmenem Schmidt Ruppin RSV (podskupina D). Za účelem odhalení defektů virové replikace byla analyzována exprese virových genů v RSCh a byly zkoumány změny po fúzi s kuřecími fibroblasty.

## Materiál a metody

Pro studium vstupu RSV do savčích buněk byly analyzovány provirové sekvence RSV v krysí nádorové linii XC a křeččí nádorové linii H-20. Defekty v pozdní fázi replikačního cyklu RSV byly studovány v křeččí transformované linii RSCh. Jako permisivní buňky byly ve většině případů použity kuřecí fibroblasty DF-1. Dále byly použity křeččí buňky NIL a buňky NIL exprimující receptor Tvc (NIL-Tvc). Jako zástupci lidských buněk byly vybrány linie lidských embryonálních ledvinných buněk (HEK293) a linie epitelových buněk retiny imortalizovaných lidskou telomerázou (RPE1-hTERT).

Připravené virové konstrukty byly odvozeny od retrovirového vektoru RCAS (replication-competent ASLV long terminal repeat with a splice acceptor) (Hughes, 2004). Tyto konstrukty se lišily genem *env*, který pocházel buď z původního PR-RSV-C (EnvC), nebo z H20-RSV (EnvH20). Dalé byly připraveny RCAS nesoucí chiméry EnvC a EnvH20 (EnvC-H20Part1-4) a RCAS nesoucí EnvC s danými mutacemi (L378S, G464S, L503V). Také byly připraveny konstrukty nesoucí povrchovou podjednotku (SU) podskupiny A nebo B společně s transmembránovou podjednotkou (TM) z H20-RSV.

Viry byly amplifikovány na buňkách DF-1 a virové titry byly určeny pomocí fokálního testu nebo průtokové cytometrie. Buněčné fúze byly provedeny pomocí 50% polyethylenglykolu.

RNA byla izolována z celých buněk nebo jaderné a cytoplazmatické frakce. Tato RNA byla použita na přípravu cDNA a následnou analýzu pomocí PCR nebo qPCR. Množství virové DNA v infikovaných buňkách bylo stanoveno pomocí qPCR.

Virová stabilita byla měřena při zvýšené teplotě nebo sníženém pH. Aktivace obalového proteinu byla určena pomocí následujících metod: inhibice virového vstupu alkylačním činidlem

PEG-maleimid-biotin (PMB), testování vazby na lipozomy, analýza oligomerizačních vlastností TM.

Exprese virových proteinů byla stanovena pomocí imunofluorescenční mikroskopie nebo pomocí Western blottingu.

Aktivita reverzní transkriptázy byla měřena pomocí testu PERT (product-enhanced reverse transcriptase).

## Výsledky a diskuze

*Vstup RSV do savčích buněk*

Tato část práce se věnuje Pražskému kmenu C (PR-RSV-C), u kterého původně nebyl pozorován tropismus pro savčí buňky. Přesto se již dříve v naší laboratoři podařilo pomocí tohoto kmene infikovat potkana a pomocí viru získaného z potkaního nádoru byl následně infikován i křeček (Svoboda, 1960; Svoboda et al., 1983). Abych určila mechanizmus umožňující mezidruhový přenos RSV, byly analyzovány genetické změny u viru H20-RSV, který opakovaně dokázal vstupovat do savčích buněk. V obalovém glykoproteinu EnvH20 bylo nalezeno osm aminokyselinových záměn oproti původnímu EnvC (Env z PR-RSV-C). Za vstup do křeččích buněk byly zodpovědné dvě mutace, a to záměna nacházející se na začátku povrchové podjednotky SU (D32G) a mutace ve fúzním peptidu v transmembránové podjednotce TM (L378S). Tyto aminokyselinové záměny umožnily virový přenos i na lidské a kuřecí buňky postrádající příslušný receptor. K savčímu tropismu obecně více přispívala mutace nalezená ve fúzním peptidu, ale citlivost k jednotlivým mutantům se mezi buněčnými liniemi (především lidskými) lišila.

Mutace přítomné v EnvH20 snižovaly jeho stabilitu. Zatímco virus s původním EnvC byl stabilní jak při zvýšené teplotě, tak při sníženém pH, virus obsahující EnvH20 byl citlivý k oběma testovaným vlivům. Jelikož inaktivace nízkým pH je jedním ze znaků Env aktivovaného receptorem (Mothes et al., 2000), byly následně analyzovány další vlastnosti aktivovaného Env.

Mechanismus vstupu ASLV do buňky byl detailně popsán pomocí experimentů využívajících solubilního receptoru, který se

váže na virový Env a tím ho aktivuje. Takto aktivovaný Env dokázal díky uvolnění fúzního peptidu vázat lipozomy (Damico et al., 1998) a obsahoval reaktivní thiolát, který mohl být blokován pomocí alkylačního činidla PMB (Smith and Cunningham, 2007). Jestliže byl Env aktivový receptorem ovlivněn kyselým pH, došlo k tvorbě oligomerů rezistentních na SDS, které odpovídají formaci šestihelikálního svazku (Smith et al., 2004). Výše zmíněných experimentů bylo využito k ověření naší hypotézy, že se EnvH20 nachází v podobné konformaci jako Env po vazbě na receptor. Výsledky shodně ukázaly, že se EnvH20 chová podobně jako aktivovaný Env. Na rozdíl od viru s původním EnvC, virus obsahující EnvH20 dokázal vázat lipozomy, byl inhibován PMB a nízké pH spustilo tvorbu oligomerů TM.

Dále bylo pozorováno, že čím účinnější je vstup do savčích buněk, tím je větší citlivost k nízkému pH a inhibici PMB. Z toho vyplývá, že úroveň aktivace Env koreluje s účinností vstupu do buněk postrádajících receptor.

Tyto i předešlé výsledky ukázaly, že mutace způsobující savčí tropismus mohou být v různých částech obalového glykoproteinu včetně TM. Jelikož retrovirový Env interaguje s příslušným receptorem především pomocí oblastí v podjednotce SU, není pravděpodobné, že by tyto mutace způsobovaly interakci s určitým neznámým receptorem. To je také podpořeno naším pozorováním, že mutace v H20-TM je schopná umožnit infekci lidských buněk i ve spojení s podjednotkou SU-B, která rozeznává jiný ptačí receptor než SU-C.

Domnívám se, že mutace D32G a L378S ovlivňují konformaci Env takovým způsobem, že dochází ke snížení aktivační energie, a tudíž může Env spontánně přecházet do aktivovaného stavu, který je podobný jako stav Env po vazbě na receptor. Virový vstup může být proto zprostředkován pomocí nízko-afinitních interakcí Env s neznámými molekulami, které jsou běžně přítomny na buněčném povrchu. Tímto způsobem virus obchází potřebu původního receptoru, který byl nutný pro aktivaci Env, a je proto schopný vstupovat do různých buněk postrádajících receptor.

*Obnovení virové replikace RSV v savčích buňkách po fúzi s permisivními kuřecími buňkami*

Ačkoliv savčí buňky transformované virem Rousova sarkomu neprodukují žádný infekční virus, virová produkce může být obnovena fúzí těchto buněk s permisivními kuřecími fibroblasty (Svoboda a Dourmashkin, 1969). V této práci jsem se zaměřila na charakterizaci změn, ke kterým došlo po fúzi křeččích buněk transformovaných RSV (RSCh) s kuřecími fibroblasty (DF-1).

Buněčná linie RSCh byla v naší laboratoři již dříve charakterizována a studována, což bylo doplněno mým zjištěním, že tato linie nese ve svém genomu pouze jednu provirovou kopii. Výsledky této práce ukazují, že buňky RSCh produkují pouze zanedbatelné množství *env* mRNA. Toto pozorování je v souladu s předešlými studiemi zaměřenými na defekty replikace RSV v savčích buňkách (Berberich et al., 1990; Svoboda et al., 1983). Jestliže jsou ale buňky RSCh fúzovány s ptačími fibroblasty, dochází k výraznému zvýšení produkce *env* mRNA i obalového glykoproteinu, který je touto mRNA kódován. Jelikož DF-1 neobsahují žádné endogenní alfaretrovirové sekvence, detekovaná *env* mRNA musí být exprimována z proviru RSV v buňkách RSCh. Zvýšená tvorba *env* mRNA i obalového glykoproteinu byla pozorována již 48 hodin po fúzi.

Dále bylo po fúzi pozorováno více virové gRNA v cytoplazmě, což naznačuje, že dochází k účinnějšímu jadernému exportu gRNA. gRNA kóduje polyprotein Gag, jehož množství po fúzi vzrostlo a v médiu byly detekovány VLP částice obsahující maturovaný Gag.

Je pravděpodobné, že tyto změny jsou zodpovědné za obnovenou virovou produkci, i když není vyloučeno, že v savčích buňkách může být replikace RSV blokována i na nějaké další úrovni. Předpokládám, že pozorované změny v tvorbě virových proteinů Env a Gag byly umožněny díky komplementaci kuřecími faktory. Tato hypotéza byla podpořena zjištěním, že inhibitory proteosyntézy blokují nárůst *env* mRNA, jestliže byly použity na kuřecí buňky před fúzí s buňkami RSCh. Naopak zastavení proteosyntézy v buňkách RSCh před fúzí s DF-1 nevedlo k žádným výrazným změnám v produkci *env* mRNA.

Jedním z faktorů zodpovědných za nízkou tvorbu *env* mRNA může být přítomnost anomálního sestřihu virové mRNA v savčích buňkách. Bylo zjištěno, že v buňkách RSCh tvoří anomálně sestřižená mRNA 5,6 %, ale překvapivě tato RNA byla nalezena i v infikovaných ptačích buňkách, kde dosahovala 1,3 % všech virovým mRNA. Tyto anomálně sestřižené virové mRNA vznikají využitím různých kryptických 5' sestřihových míst spolu se *src* 3' sestřihovým místem. Většinou zároveň dochází k sestřihu typickému pro *env* mRNA a tvoří se tak dvojitě sestřižené mRNA. Sestřižené varianty, které jsou v této práci nazvány Dbl1 a Cryptic1, byly již dříve pozorovány při sestřihu PR-RSV-A v myších buňkách (Berberich et al., 1990). Ostatní varianty (Dbl2, Cryptic2 a 3) jsou pravděpodobně charakteristické pro SR-RSV-D, kde se nacházejí nukleotidové záměny vytvářející nová kryptická místa. Zajímavé je, že po fúzi s kuřecími fibroblasty nedochází k výraznějším změnám v hladině anomálně sestřižených virových mRNA, a proto se domnívám, že přítomnost těchto mRNA není hlavní příčinou chybějící *env* mRNA. Využití kryptického sestřihového místa bylo navíc pozorováno také při zvýšené tvorbě *src* mRNA v ptačích buňkách vlivem optimalizace *src* 3' sestřihového místa (Zhang a Stoltzfus, 1995). Jelikož v savčích buňkách také dochází k vysoké tvorbě *src* mRNA, může být anomální sestřih mRNA pouze vedlejším jevem častého využití *src* 3' sestřihového místa.

Jelikož není přesně známo, které kuřecí faktory regulují sestřih RSV mRNA, je těžké určit, jaký kuřecí protein savčím buňkám chybí. V genomu RSV se nacházejí tři hlavní *cis* elementy ovlivňující sestřih mRNA – negativní regulátor sestřihu (NRS), enhancer sestřihu env (ESE) a supresor sestřihu src (SSS). Elementy NRS a ESE vážou SR proteiny a jejich vliv na sestřih byl pozorován i v reportérových konstruktech v savčích buňkách (McNally a McNally, 1996). Jestli ale ovlivňují sestřih v ptačích a savčích buňkách stejně účinně, nebylo ukázáno. Který faktor se váže na element SSS, zatím nebylo určeno.

Další důležitou sekvencí virové RNA jsou tzv. přímé repetice (DR), které ovlivňují především export nesestřižené gRNA z jádra, ale byl pozorován i inhibiční efekt na sestřih *src* mRNA (Guo et al.,

2000). Také v případě tohoto elementu není znám interakční protein. RSV obsahuje dva DR elementy, které obklopují gen *src* a jsou si strukturně velmi podobné (Ogert et al., 1996). Virus postrádající oba DR elementy vykazuje pokles ve stabilitě gRNA a akumulaci této RNA v jádře. Studie buněk RSCh odhalila několik podobností s chováním viru postrádajícím DR repetice. Bylo pozorováno, že gRNA není stabilní, je neúčinně exportována z jádra a protein Gag se tvoří ve velmi malém množství, což naznačuje, že by v savčích buňkách mohl chybět protein, který se váže na DR a zprostředkovává export gRNA z jádra.

Ačkoliv tedy v buňkách RSCh jasně pozorujeme špatnou regulaci v sestřihu virové mRNA a exportu gRNA, nelze s určitostí říci, které faktory jsou za pozorované rozdíly zodpovědné. Kromě nepřítomnosti buněčných proteinů rozeznávajících virové RNA elementy by úpravy virové RNA mohly být také ovlivněny samotným proteinem Gag, který vstupuje do jádra (Garbitt-Hirst et al., 2009).

Dále bylo testováno, jaký vliv na obnovenou virovou produkci má exprese genů *gag* a *env* v ptačích buňkách použitých pro buněčnou fúzi. Jestliže ptačí buňky obsahovaly obalový glykoprotein, virová produkce po fúzi s buňkami RSCh byla jasně zvýšená. V případě proteinu Gag byl pozitivní efekt na tvorbu viru po fúzi pozorován pouze při vysoké produkci tohoto proteinu. Nejlepšího výsledku bylo dosaženo, jestliže ptačí buňky byly před fúzí preinfikovány pomocným virem. K obnovení virové produkce v savčích buňkách byla ale vždy potřeba fúze s ptačími permisivními buňkami. Komplementace genem *en*v v buňkách RSCh nestačila k virové replikaci. Exprese genu *gag* byla z použitého konstruktu v buňkách RSCh bohužel příliš nízká, aby bylo možné udělat jasný závěr. Jestli by tedy samotná produkce virových proteinů v savčí buňce stačila k tvorbě virových částic, není úplně jasné.

## 7. Závěry

1. Pražský kmen viru Rousova sarkomu podskupiny C dokázal infikovat potkana a křečka díky dvěma mutacím (D32G a L378S) nalezeným v různých částech Env. Tyto aminokyselinové záměny

umožňují virový přenos na křeččí, lidské i kuřecí buňky postrádající příslušný receptor. Nalezené mutace snižují stabilitu obalového glykoproteinu. Přítomnost reaktivního thiolátu, vazba na lipozomy a tvorba oligomerů TM při sníženém pH ukazují, že konformace mutovaného Env je velmi podobná jako konformace aktivovaného Env po vazbě na receptor. Proto je pravděpodobné, že mutovaný virus je schopen infikovat buňky nezávisle na původním receptoru díky spontánní aktivaci Env. Tento nový mechanizmus virového vstupu by mohl řídit evoluci ASLV i dalších virů.

2. Replikace RSV v savčích buňkách je blokována na úrovni sestřihu a exportu virových mRNA. V savčích transformovaných buňkách se tvoří velmi malé množství *env* mRNA a nesestřižená genomová RNA je lokalizována převážně v jádře. Virové proteiny translatované z těchto mRNA nebyly téměř detekovány. Po fúzi s permisivními kuřecími buňkami dochází k obnovení virové replikace. Při tomto procesu je pozorován nárůst v hladině *env* mRNA i odpovídajícího proteinu. Genomová RNA je účinněji exportována do cytoplazmy a dochází k tvorbě polyproteinu Gag. Tyto výsledky ukazují, že v savčích buňkách chybí kuřecí faktory potřebné pro sestřih *env* mRNA a export genomové RNA. Získané poznatky by mohly dále přispět k odhalení těchto kuřecích faktorů.

## Použitá literatura:


Berberich, S.L., Macias, M., Zhang, L., Turek, L.P., Stoltzfus, C.M., 1990. Comparison of Rous sarcoma virus RNA processing in chicken and mouse fibroblasts: evidence for double-spliced RNA in nonpermissive mouse cells. J Virol 64, 4313-4320.

Damico, R.L., Crane, J., Bates, P., 1998. Receptor-triggered membrane association of a model retroviral glycoprotein. Proc Natl Acad Sci U S A 95, 2580-2585.

Garbitt-Hirst, R., Kenney, S.P., Parent, L.J., 2009. Genetic evidence for a connection between Rous sarcoma virus gag nuclear trafficking and genomic RNA packaging. J Virol 83, 6790-6797.

Guo, W., Winistorfer, S.C., Stoltzfus, C.M., 2000. Selective inhibition of splicing at the avian sarcoma virus src 3' splice site by direct-repeat posttranscriptional cis elements. J Virol 74, 8513-8523.

Hughes, S.H., 2004. The RCAS vector system. Folia biologica 50, 107-119.

McNally, L.M., McNally, M.T., 1996. SR protein splicing factors interact with the Rous sarcoma virus negative regulator of splicing element. J Virol 70, 1163-1172.

Mothes, W., Boerger, A.L., Narayan, S., Cunningham, J.M., Young, J.A., 2000. Retroviral entry mediated by receptor priming and low pH triggering of an envelope glycoprotein. Cell 103, 679-689.

Ogert, R.A., Lee, L.H., Beemon, K.L., 1996. Avian retroviral RNA element promotes unspliced RNA accumulation in the cytoplasm. J Virol 70, 3834-3843.

Smith, J.G., Cunningham, J.M., 2007. Receptor-induced thiolate couples Env activation to retrovirus fusion and infection. PLoS pathogens 3, e198.

Smith, J.G., Mothes, W., Blacklow, S.C., Cunningham, J.M., 2004. The mature avian leukosis virus subgroup A envelope glycoprotein is metastable, and refolding induced by the synergistic effects of receptor binding and low pH is coupled to infection. J Virol 78, 1403-1410.

Svoboda, J., 1960. Presence of chicken tumour virus in the sarcoma of the adult rat inoculated after birth with Rous sarcoma tissue. Nature 186, 980-981.

Svoboda, J., Dourmashkin, R., 1969. Rescue of Rous sarcoma virus from virogenic mammalian cells associated with chicken cells and treated with Sendai virus. J Gen Virol 4, 523-529.

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

Svoboda, J., Lhotak, V., Geryk, J., Saule, S., Raes, M.B., Stehelin, D., 1983. Characterization of exogenous proviral sequences in hamster tumor cell lines transformed by Rous sarcoma virus rescued from XC cells. Virology 128, 195-209.

Zhang, L., Stoltzfus, C.M., 1995. A suboptimal src 3' splice site is necessary for efficient replication of Rous sarcoma virus. Virology 206, 1099-1107.

**Životopis**

***Jméno:*** **Anna Koslová (Lounková)**
***email:*** **anna.lounkova@img.cas.cz**

***Vzdělání:***

| | |
|---|---|
| 2009-současnost | doktorské studium na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy v Praze, specializace Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie |
| 2007-2009 | magisterské studium na Vysoké škole chemicko-technologické v Praze, specializace Obecná biochemie |
| 2005-2007 | bakalářské studium na Vysoké škole chemicko-technologické v Praze, specializace Obecná biochemie<br>(absolvováno s vyznamenáním) |

***Vědecká praxe**:*

| | |
|---|---|
| 2009-současnost | Ústav molekulární genetiky Akademie věd České republiky (ÚMG AVČR), v.v.i.,<br>Oddělení virové a buněčné genetiky |
| 2014, 2015, 2016 | tři měsíční stáže v laboratoři Prof. Benjamina Schussera, Technical university of Munich (Německo) |
| 2007-2009 | Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, FPBT<br>Oddělení biochemie a mikrobiologie |

***Metodologické zkušenosti:***

Molekulární biologie – izolace RNA, DNA, PCR (qPCR, ddPCR), klonování, sekvenování, Western blotting, CRISPR/Cas9

Tkáňové kultury – transfekce, infekce, příprava viru, fokální test, průtoková cytometrie

***Účast na konferencích:***

Retroviral Pathogenesis 2017, Liblice (ČR) - poster
Retroviruses 2017, CSHL, New York (USA) - přednáška
Retroviral Pathogenesis 2016, New Orleans (USA) - poster
13th Transgenic Technology meeting 2016, Praha (ČR) - poster
Retroviral Pathogenesis 2012, Philadelphia (USA) - poster
Biochemický sjezd 2012, Brno (ČR) – přednáška (3. cena)
PhD conference IMG 2012, Praha (ČR) - přednáška
RNA Club 2011, Praha (ČR) - poster
RNA Meeting 2011, Kyoto (Japonsko) - poster
RNA Club 2010, České Budějovice (ČR) – přednáška (1-2. cena)

**Seznam publikací:**

**Lounková A**, Kosla J, Přikryl D, Štafl K, Kučerová D, Svoboda J.
Retroviral host range extension is coupled with Env-activating mutations resulting in receptor-independent entry.
*Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017 Jun;114(26):E5148-E5157. IF 9,6

**Lounková A**, Dráberová E, Šenigl F, Trejbalová K, Geryk J, Hejnar J, Svoboda J.
Molecular events accompanying rous sarcoma virus rescue from rodent cells and the role of viral gene complementation.
*J Virol.* 2014 Mar;88(6):3505-15. IF 4,7

Trefil P, Aumann D, **Koslová A**, Mucksová J, Benešová B, Kalina J., Wurmser Ch., Fries R., Elleder D., Schusser B., Hejnar J.
Male fertility restored by transplanting primordial germ cells into testes: a new way towards efficient transgenesis in chicken.
*Sci Rep.* (podaný rukopis) IF 4,3

**Charles University**

**Faculty of Science**

PhD thesis summary

# Rous sarcoma virus replication blocks in mammalian cells

**Ing. Anna Koslová**

Prague, 2017

**Biomedicine Ph.D. Study Programs**

Charles University

and

Academy of Sciences of the Czech Republic

Program: Molecular and Cellular Biology, Genetics and Virology

Chairman of the board: prof. RNDr. Stanislav Zadražil, DrSc.

Place of elaboration: Institute of Molecular Genetics, ASCR
Laboratory of Viral and Cellular Genetics

Author: Ing Anna Koslová

Supervisor: prof. RNDr. Jan Svoboda, DrSc., RNDr. Jiří Hejnar, CSc.

Doctoral thesis is available in libraries of Faculty of Science of Charles University in Prague.

**Contents**

Abstract ……..……..4
Introduction ……..5
Aims ……5
Material and methods ……...6
Results and discussion ……..…7
Conclusions ……12
References ……..12
Curriculum Vitae ……14
List of publications ……15

**Abbreviations**

| | |
|---|---|
| ASLV | avian sarcoma and leukosis viruses |
| DF-1 | chicken fibroblast cell line |
| Env | envelope glycoprotein |
| H-20 | Syrian hamster tumor cell line |
| HEK293 | human embryonic kidney cells |
| NIL | hamster embryo cell line NIL-2 |
| PCR | polymerase chain reaction |
| PMB | PEG-maleimide-biotin |
| PR-RSV | Prague strain of RSV |
| qPCR | quantitative PCR |
| RPE1-hTERT | human telomerase reverse transcriptase-immortalized retinal pigment epithelial cells |
| RSCh | Chinese hamster tumor cell line |
| RSV | Rous sarcoma virus |
| SA | splice acceptor |
| SD | splice donor |
| SR-RSV | Schmidt-Ruppin strain of RSV |
| SU | surface subunit |
| TM | transmembrane subunit |
| XC | rat cell line transformed by PR-RSV-C |

**Abstract**

One of the important tasks of virology and immunology is to explore the species- and cell-barriers preventing virus horizontal transmission and reveal the ways how viruses overcome these barriers and "adapt" to different species. This work is based on a well-established retroviral model – avian Rous sarcoma virus (RSV) and studies virus replication blocks in mammalian cells at both pre- and post-integration level.

Interaction of the viral envelope glycoprotein (Env) with a specific cellular receptor mediates virus entry into cells. Although mammalian orthologues of specific chicken receptors do not support RSV entry, it was observed that some RSV strains are able to enter mammalian cells. Several RSV-transformed rodent cells lines were described and analysis of provirus H20-RSV in one these cells lines (hamster H-20 tumor cell line) showed multiple mutations including two crucial amino acid substitutions in different regions of Env. Substitutions D32G and L378S confer virus transmission to hamster, human and also chicken cells lacking the appropriate receptor. Altered conformation of H20-RSV Env is similar to a receptor-primed (activated) state of Env. This observation indicates that virus can circumvent the need of original cell receptor because of spontaneous Env activation caused by single amino acid substitution.

Although RSV is occasionally able to enter and transform mammalian cells, no virus particle formation is observed. However, virus production in RSV-transformed mammalian cells can be rescued by fusion with permissive chicken cells. Analysis of this phenomenon is brought in the second part of this thesis. The RSV-transformed hamster cells produce only a marginal amount of *env* mRNA and no envelope glycoprotein. Viral genomic RNA is kept in the nucleus and cells produce only a small amount of unprocessed Gag protein. Cell fusion with chicken cells leads to an increase in *env* mRNA levels, nuclear export of genomic RNA, as well as synthesis of respective viral proteins. These results suggest that rodent cells

lack some chicken-specific factor(s) required for proper processing of *env* mRNA and nuclear export of genomic RNA.

## Introduction

This study is based on a well-established retroviral model Rous sarcoma virus. RSV belongs to Avian Sarcoma and Leukosis viruses (ASLV) which are part of the *alpharetrovirus* genus. ASLV naturally infects only avian species; however, experimental RSV infection was achieved in hamsters and rats (Svoboda, 1960). Interaction of the viral envelope glycoprotein (Env) with a specific cellular receptor mediates virus entry into cells. Avian receptors specific for individual ASLV subgroups (A-E, J) have been well described, however mammalian orthologues of these receptors do not support RSV cell entry. Therefore it has not been clear until now, how these viruses enter mammalian cells.

RSV-transformed mammalian cells have contributed to discovery of retroviral integration, studies of epigenetic silencing of retroviruses and cell transformation. Although RSV can enter mammalian cells and integrate its viral DNA into host genome, the viral genome is not fully expressed and infectious virus production is not detectable (Svoboda et al., 1963). However, virus replication can be rescued by cell fusion with permissive chicken fibroblasts (Svoboda and Dourmashkin, 1969). Despite the cytological parameters of virus rescue have been clearly established, the molecular insight into this process has been missing.

## Aims:

1. The first aim of this thesis was to reveal a mechanism, how RSV can enter mammalian cells. Rodent tumor cell lines transformed with Prague RSV strain (subgroup C) were used to study this mechanism. Due to the fact that Prague RSV viral strain C was

originally not mammalian-tropic, I analyzed RSV proviral sequences in this tumor cell lines in order to find changes responsible for virus entry in mammalian cells.

2. The second aim was to find out which steps of viral replication are in mammalian cells hampered and to describe main molecular changes accompanying fusion of RSV-transformed mammalian cells with avian cells leading to virus rescue. For this analysis hamster cell line transformed with Schmidt Ruppin RSV strain (subgroup D) was used.

## Material and methods

For this study were used several RSV-transformed mammalian cells lines. XC and H-20 are rodent tumor cell lines transformed with the PR-RSV-C. RSCh is a hamster cell line transformed with SR-RSV-D. As permissive cells we employed chicken fibroblast cell line DF-1. We used also hamster embryo cell line NIL and NIL cells producing Tvc (NIL-Tvc) and two human cell lines: Human Embryonic Kidney cells (HEK293) and hTERT-immortalized retinal pigment epithelial cells (RPE-1-hTERT).

Viral constructs were derived from retroviral vector RCAS (replication-competent ASLV long terminal repeat with a splice acceptor) (Hughes, 2004). The prepared constructs differ in *env* gene that originates either from PR-RSV-C (EnvC) or H20-RSV (EnvH20). Next we prepared RCAS vectors harboring chimeras EnvC and EnvH20 (EnvC-H20Part1-4) and RCAS containing EnvC with particular mutations (L378S, G464S, L503V). We also prepared constructs harboring surface subunit (SU) of subgroup A or B together with transmembrane subunit (TM) from H20-RSV.

All viruses were propagated in DF-1 cell line and viral titers were determined either by focal assay or fluorescent microscopy. Cell fusion was performed with 50% polyethylenglycol.

RNA was isolated from complete cells or nuclear and cytoplasmic fraction. RNA was used for cDNA preparation and

followed by analysis with PCR or qPCR. The amount of viral DNA in infected cells was measured by qPCR.

Viral stability was measured at higher temperature (44 °C) or low pH (pH 5). Activation of envelope glycoprotein was detected by following methods: virus entry inhibition by alkylating reagent PEG-maleimide-biotin (PMB), liposome binding assay and TM oligomerization assay.

Viral protein expression was determined by immunofluorescence microscopy or Western blotting.

Activity of reverse transcriptase was measured by an assay called PERT (product-enhanced reverse transcriptase).

## Results and discussion

*RSV entry in mammalian cells*

To elucidate the mechanisms enabling cross-species virus transmission, we analyzed genetic changes in the PR-RSV-C variant that repeatedly infected and transformed mammalian cells (Svoboda, 1960; Svoboda et al., 1983). It is generally known that the retroviral Env is responsible for virus entry into the cell, enabling, as the first step, its interaction with a specific cell surface receptor. We therefore analyzed the *env* gene structure and identified a total of eight amino acid substitutions in rodent-passaged RSV (H20-RSV). We found the same changes in XC cell-harbored proviruses representing the first mammalian passage. The same pattern of amino acid substitutions remained during the second cycle of rodent cell infection; therefore, we assumed that the amino acid changes identified played a role in the virus ability to infect receptor-deficient cells. We therefore proceeded to assess the contribution of each individual substitution by testing their effect in the NIL hamster cell line infection. Two of them were found to be of decisive importance, namely, a substitution (D32G) upstream of the vr1 region and another substitution (L378S) at the end of the fusion peptide. We found that a greater role was played by the amino acid substitution in the fusion peptide; however,

cell lines (especially human) varied as to their sensitivity. Some of these differences can be explained by low affinity Env interactions with adhesion receptors. These interactions alone do not trigger Env conformational changes required for entry; however, they are important for virus attachment and significantly increase infectivity.

ASLV entry has been studied in detail and it has been shown that ASLV Env utilizes a two-step fusion activation mechanism. Particular events occurring after receptor priming have been described by assays based on the incubation of the virus with a soluble receptor. The receptor-primed virus becomes highly unstable at low pH (Mothes et al., 2000) and Env conformation changes. Consequently, the virus can bind liposomes via the fusion peptide insertion (Damico et al., 1998) and Cys-38 reactive thiolate is formed (Smith and Cunningham, 2007). Subsequent low pH-triggering of the receptor-primed ASLV Env results in the formation of SDS-resistant 6HB oligomers (Smith et al., 2004).

It was tempting to speculate that the virus mutants which were able to enter receptor-deficient mammalian cells had Env glycoprotein conformational changes normally triggered by the Env-receptor interaction. The study of the thermostability of PR-RSV-C gave us the first hint. The virus harboring PR-RSV-C Env (EnvC) was thermostable but the infectivity of the virus with H20-RSV Env decreased with time of exposure to 44°C. Next, we tested whether EnvH20 had similar characteristics to a receptor-primed Env. We showed that the virus with EnvH20, in contrast to the virus with EnvC, can be inactivated by low pH and is efficiently inhibited with PMB which blocks reactive thiolates. Furthermore, EnvH20, in contrast to EnvC, is able to bind liposomes, and its TM subunit oligomerization is triggered by low-pH treatment. All these observations show that EnvH20 behaves as a receptor-primed Env.

To identify the contribution of particular mutations to Env activation, we tested how efficiently EnvC-H20 chimeras are inactivated by low pH and inhibited by PMB. We determined that the

greater their efficiency in mammalian cell infection, the greater their sensitivity to low pH and PMB inhibition. Therefore, the level of Env activation correlates with the efficiency of receptor-independent entry.

Our and previously published data show that the mammalian-tropic ASLV mutations span the entire *env* region and target different Env domains (upstream from vr1; hr1; fusion peptide; HR1). In contrast, ASLV interacts with the corresponding avian receptors mainly through two host range (hr) regions. The extent of the *env* mutations contributing to mammalian tropism does not support the involvement of a specific unknown receptor. This is also corroborated by our finding that the mutations residing in H20-TM can facilitate human cell entry mediated by SU-B which recognizes an avian receptor different from the one recognized by SU-C.

Taken together, we detected two mutations (D32G, L378S) in different regions of Env which contribute to its activation. We propose that these mutations change the Env conformation in such a way that the Env activation barrier is decreased and Env can be spontaneously activated in a way similar to activation caused by receptor binding. We hypothesize that due to the spontaneous Env activation, low-affinity Env interactions with currently unknown molecules commonly present on cell surface are sufficient to mediate the virus entry. Because the virus circumvents the need for a specific receptor required for Env priming, it is also able to enter the cells of various receptor-deficient species.

*RSV rescue from mammalian cells*

Although RSV-transformed mammalian cells do not produce any infectious virus, virus production can be rescued by fusion with permissive chicken fibroblasts (Svoboda and Dourmashkin, 1969). In the second part of my thesis I focused on the molecular characterization of RSV-transformed rodent cell line RSCh and the

consequences of RSCh cell fusion with avian cells leading to infectious RSV rescue.

In order to extend and update the model of SR-RSV-transformed rodent cells we selected the original well-characterized RSCh cell line which had been described before. Our present data document that this tumor cell line produces very low amounts of *env* mRNA, confirming our previous Northern blot analysis of three rodent tumor cell lines (Svoboda et al., 1983). However, when fused with DF-1 chicken cells lacking endogenous alpharetroviral loci, both *env* mRNA and glycoprotein synthesis is initiated soon. Similarly, Gag protein synthesis is increased, its regular cleavage takes place, and in the tissue culture supernatant fraction corresponding to virus-like particles the processed Gag is present. In such a way, the main molecular steps required for virus rescue are accomplished thanks to rodent cell complementation with chicken cell factor(s). The complementation hypothesis is supported by the finding that protein synthesis inhibitors block increase of the *env* mRNA level when applied to DF-1 cells and not to RSCh cells before the fusion.

One of the factors responsible for the *env* mRNA threshold synthesis might be related to aberrant splicing. We found that quantified aberrant splicing of the *env* gene represents only 5.6 % of total viral RNAs in non-permissive cells but is also detectable in permissive cells, where it reaches 1.3 %. Aberrantly spliced RNAs utilized different cryptic splice donor (SD) sites and the same regular splice acceptor (SA) site. The splice variants designated as Dbl1 and Cryptic1 have already been described in PR-RSV (Berberich et al., 1990) but the new ones – Dbl2, Cryptic2 and Cryptic3 – are characteristic for SR-RSV, where a single nucleotide substitution created a new cryptic SD site. However, it seems highly unlikely that aberrant splicing alone might play any decisive role in diminishing the pool of full-length *env* transcripts. Rather, the *env* gene represents most recent innovation in the retrovirus evolution, and therefore we can expect its variability.

Quite a lot of attention has been paid to the molecular mechanisms playing a role in RSV gRNA export from the cell nucleus to the cytoplasm. Unique elements called direct repeats (DRs) constituting the 3' end of the viral genome were shown to represent a genomic "mark" licensing gRNA export and stability. RSV contains two DRs which are structurally highly similar. A series of following papers using various upstream or downstream DR modifications provided data indicating their role in the virus life cycle. The most convincing are observations obtained in viruses lacking both DRs that provided evidence for the drop in gRNA stability, egress, and possibly also in the Gag product synthesis (Ogert et al., 1996). Our study of RSCh cells revealed some similarity to viruses lacking DR. This concerns gRNA instability, decreased export from the nucleus and low efficiency of Gag product synthesis.

Interesting results were obtained by studying consequences of partner cell complementation with *gag* and *env* gene products or helper virus infection. So far it is known that RSV-transformed rodent cells are not complemented when different independently obtained cell lines are fused one with the other. Similarly it was revealed that infection of transformed cells with rodent retroviruses does not lead to RSV rescue in spite of the fact that rodent retroviruses complete their replication cycle. Here we utilized a different strategy in which we did not complement non-permissive rodent but permissive avian partner cells with *gag*, *env,* or both gene products. Under such conditions a clear increase in RSV yield after cell fusion occurred; however, it was dependent on the degree of complementing gene expression. This supports our conclusion that the deficiency of rodent cells lies in part in their inability to synthesize or process *gag* or *env* gene products. This deficiency can be diminished by supplying these products in *trans*. However this trans-complementation needs to be supported by fusion with permissive cells. *Gag* or *env* gene products are probably not sufficient to ensure virus rescue in non-permissive rodent cells by

themselves but they can increase RSV rescue efficiency after fusion with chicken cells.

## 7. Conclusions

1. Prague strain of RSV subgroup C was able to infect rat and hamster due to amino acid substitutions (D32G a L378S) found in different part of Env. These substitutions confer virus transmission to hamster, human and also chicken cells lacking the appropriate receptor. The stability of mutated Env was decreased in higher temperature and low pH. Presence of reactive thiolate, liposome binding and ability to form TM oligomers in low pH showed that Env has similar conformation as receptor-primed Env. Therefore I conclude that virus circumvents the need of original cell receptor because of spontaneous Env activation. This new mechanism of virus entry can have an impact on the evolution of ASLV and other viruses.

2. RSV replication in mammalian cells is blocked on level of viral mRNA splicing and export. RSV-transformed cell produce small amount of *env* mRNA and gRNA is kept in nucleus. Viral proteins translated from these mRNAs were almost not detected. Fusion with permissive chicken cells led to virus rescue. This process was accompanied by increase in *env* mRNA level and corresponding protein. gRNA was exported to cytoplasm and polyprotein Gag was produced. These results show that rodent cells lack some chicken factors needed for *env* mRNA splicing and gRNA nuclear export.

## References:

Berberich, S.L., Macias, M., Zhang, L., Turek, L.P., Stoltzfus, C.M., 1990. Comparison of Rous sarcoma virus RNA processing in chicken and mouse fibroblasts: evidence for double-spliced RNA in nonpermissive mouse cells. J Virol 64, 4313-4320.

Damico, R.L., Crane, J., Bates, P., 1998. Receptor-triggered membrane association of a model retroviral glycoprotein. Proc Natl Acad Sci U S A 95, 2580-2585.

Hughes, S.H., 2004. The RCAS vector system. Folia biologica 50, 107-119.

Mothes, W., Boerger, A.L., Narayan, S., Cunningham, J.M., Young, J.A., 2000. Retroviral entry mediated by receptor priming and low pH triggering of an envelope glycoprotein. Cell 103, 679-689.

Ogert, R.A., Lee, L.H., Beemon, K.L., 1996. Avian retroviral RNA element promotes unspliced RNA accumulation in the cytoplasm. J Virol 70, 3834-3843.

Smith, J.G., Cunningham, J.M., 2007. Receptor-induced thiolate couples Env activation to retrovirus fusion and infection. PLoS pathogens 3, e198.

Smith, J.G., Mothes, W., Blacklow, S.C., Cunningham, J.M., 2004. The mature avian leukosis virus subgroup A envelope glycoprotein is metastable, and refolding induced by the synergistic effects of receptor binding and low pH is coupled to infection. J Virol 78, 1403-1410.

Svoboda, J., 1960. Presence of chicken tumour virus in the sarcoma of the adult rat inoculated after birth with Rous sarcoma tissue. Nature 186, 980-981.

Svoboda, J., Dourmashkin, R., 1969. Rescue of Rous sarcoma virus from virogenic mammalian cells associated with chicken cells and treated with Sendai virus. J Gen Virol 4, 523-529.

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

Svoboda, J., Lhotak, V., Geryk, J., Saule, S., Raes, M.B., Stehelin, D., 1983. Characterization of exogenous proviral sequences in hamster tumor cell lines transformed by Rous sarcoma virus rescued from XC cells. Virology 128, 195-209.

**Curriculum Vitae**

***Name:*** **Anna Koslová (Lounková)**
***email:*** **anna.lounkova@img.cas.cz**

***Education:***

| | |
|---|---|
| 2009-present | PhD degree, Charles University), Field of study: Molecular and Cellular Biology, Genetics and Virology |
| 2007-2009 | Master degree, Institute of Chemical Technology in Prague, Field of study: General Biochemistry |
| 2005-2007 | Bachelor degree, Institute of Chemical Technology in Prague, Field of study: General Biochemistry (Graduated with honor) |

***Research experience:***

| | |
|---|---|
| 2009-present | Institute of Molecular Genetics, ASCR, Laboratory of Viral and Cellular Genetics |
| 2014, 2015, 2016 | Technical University of Munich, Germany Group of Prof. Dr. Benjamin Schusser, three one-month stays |
| 2007-2009 | Institute of Chemical Technology in Prague, Department of Biochemistry and Microbiology |

***Laboratory skills:***

Molecular biology – RNA and DNA isolation, PCR (qPCR, ddPCR), cloning, Western blotting, CRISPR/Cas9

Cell cultures – transfection, infection, virus preparation, focal assay, flow cytometry

***Conference attendance:***

Retroviral Pathogenesis 2017, Liblice (CZ) - poster
Retroviruses 2017, CSHL, New York (USA) - talk
Retroviral Pathogenesis 2016, New Orleans (USA) - poster
13th Transgenic Technology meeting 2016, Praha (CZ) - poster
Retroviral Pathogenesis 2012, Philadelphia (USA) - poster
Biochemical meeting 2012, Brno (CZ) – talk (3. prize)
PhD conference IMG 2012, Praha (CZ). - talk
RNA Club 2011, Praha (CZ) - poster
RNA Meeting 2011, Kyoto (Japan) - poster
RNA Club 2010, České Budějovice (CZ) – talk (1-2. prize)

***List of publications:***

**Lounková A**, Kosla J, Přikryl D, Štafl K, Kučerová D, Svoboda J.
Retroviral host range extension is coupled with Env-activating mutations resulting in receptor-independent entry.
*Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017 Jun;114(26):E5148-E5157. IF 9,6

**Lounková A**, Dráberová E, Šenigl F, Trejbalová K, Geryk J, Hejnar J, Svoboda J.
Molecular events accompanying rous sarcoma virus rescue from rodent cells and the role of viral gene complementation.
*J Virol.* 2014 Mar;88(6):3505-15. IF 4,7

Trefil P, Aumann D, **Koslová A**, Mucksová J, Benešová B, Kalina J., Wurmser Ch., Fries R., Elleder D., Schusser B., Hejnar J.
Male fertility restored by transplanting primordial germ cells into testes: a new way towards efficient transgenesis in chicken.
*Sci Rep.* (submitted manuscript) IF 4,3