

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Štěpánka Vlachová

Mechanismy vyloučení superinfekce u živočišných virů

Mechanisms of superinfection exclusion by animal viruses

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Lenka Horníková, Ph.D.

Praha, 2018

Prohlášení:

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

V Praze, 7.5.2018

Podpis

Poděkování:

Tímto bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Lence Horníkové, Ph.D. za věnovaný čas, trpělivost a poskytnuté rady k vytváření této práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a blízkým za podporu a příjemné zázemí pro studium.

Abstrakt

Virová interference se objevuje u homologních i heterologních virů a může významně ovlivnit infekci. Takovým ovlivněním může být i vyloučení superinfekce, které je jakýmsi obranným mechanismem využívaným napříč celou škálou virů. Vyloučení superinfekce může nastat v různých krocích replikačního cyklu viru. Ačkoliv se jedná o poměrně běžně se vyskytující funkci viru, většina mechanismů vyloučení superinfekce zatím není zcela objasněná. Stejně tak i proteiny, které se na vyloučení superinfekce podílejí, nejsou většinou známé. Tato práce je shrnutím dosavadních poznatků z oblasti virové interference živočišných virů, se zaměřením především na homologní interferenci a mechanismy vyloučení superinfekce. Výzkum fenoménu vyloučení superinfekce má velký potenciál pro vývoj nové antivirové léčby, diagnostiky virů a také pochopení interakcí mezi viry.

Klíčová slova:

Virová infekce, živočišné viry, homologní interference, vyloučení superinfekce, mechanismy vyloučení

Abstract

Viral interference can be found in both homologous and heterologous viruses and may have significant impact on the infection. One of such impacts is superinfection exclusion, which is a defence mechanism used by a wide variety of viruses. The superinfection exclusion may occur in different steps of viral life cycle. Despite being a common viral function, most of the mechanisms of exclusion stay yet undefined, same as proteins, which are taking part in superinfection exclusion. This work is a summary of knowledge in the field of interference between animal viruses, with focus on homologous interference and mechanisms of superinfection exclusion. Research of this phenomenon can bring important information for the development of new antiviral treatment, virus diagnosis and understanding of interactions between viruses.

Key words:

Viral infection, animal viruses, homologous interference, superinfection exclusion, mechanisms of exclusion

Seznam použitých zkratek

zkratka	anglický název	český název
AP	Adaptor protein	adaptorový protein
BVDV	Bovine viral diarrhoea virus	bovinní virová diaree
C	Capsid protein	kapsidový protein
CCR5	C-C chemokine receptor type 5	C-C chemokinový receptor typu 5
CD4	Cluster of differentiation 4	diferenční skupina 4
CD81	Cluster of differentiation 81	diferenční skupina 81
CEV	Cell-associated enveloped virus	s buňkou spojený obalený virus
CXCR4	C-X-C chemokine receptor type 4	C-X-C chemokinový receptor typu 4
DHBV	Duck hepatitis B virus	virus kachní hepatitidy B
DNA	Deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
E	Envelope protein	obalový protein
EEV	Extracellular enveloped virus	extracelulární obalený virus
env	Envelope protein gene	gen pro obalový protein
F	Fusion protein	fúzní protein
gB	Glycoprotein B	glykoprotein B
gC	Glycoprotein C	glykoprotein C
gD	Glycoprotein D	glykoprotein D
GFP	Green fluorescent protein	zelený fluorescenční protein
gp160	Glycoprotein 160	glykoprotein 160
HA	Hemagglutinin	hemagglutinin
HBV	Hepatitis B virus	virus hepatitidy B
HCV	Hepatitis C virus	virus hepatitidy C
HHV-7	Human herpesvirus 7	lidský herpesvirus 7
HIV	Human immunodeficiency virus	virus lidské imunodeficiency
HN	Hemagglutinin-neuraminidase	hemagglutinin-neuraminidáza
HPIV-1	Human Parainfluenza virus Type 1	lidský virus parainfluenzy typ 1
HPIV-2	Human Parainfluenza virus Type 2	lidský virus parainfluenzy typ 2
HPIV-3	Human Parainfluenza virus Type 3	lidský virus parainfluenzy typ 3
HPIV-4	Human Parainfluenza virus Type 4	lidský virus parainfluenzy typ 4
HSV-1	Herpes simplex virus 1	Herpes simplex virus 1

HveC	Human herpesvirus entry mediator C	mediátor C pro lidský herpesvirus
IEV	Intracellular enveloped virus	intracelulární obalený virus
IMV	Intracellular mature virus	intracelulární zralý virus
IRES	Internal ribosome entry site	vnitřní místo pro vstup ribozómu
kb	Kilobases	kilobáze
kbp	Kilobase pairs	páry kilobazí
M	Matrix protein	matrixový protein
NA	Neuraminidase	neuraminidáza
NDV	Newcastle disease virus	virus Newcastelské choroby
Nef	Negative regulatory factor	negativní regulační faktor
NEP	Nuclear export protein	protein zajišťující jaderný export
NHUM	Nhumirim virus	Nhumirim virus
NP	Nucleoprotein	nukleoprotein
NS	Nonstructural protein	nestrukturní protein
nsP2	Nonstructural protease P2	nestrukturní proteáza P2
p7	Protein p7	protein p7
PA, PB1, PB2	Polymerase acidic protein, Polymerase basic protein 1, Polymerase basic protein 2	proteiny RNA polymerázového komplexu
PFU	Plaque forming units	jednotky formující plaky
prM	Premembrane protein	pre-membránový protein
PRV	Pseudorabies virus	Pseudorabies virus
RFP	Red fluorescent protein	červený fluorescenční protein
RNA	Ribonucleic acid	ribonukleová kyselina
RT	Reverse transcription	reverzní transkripce
SFV	Semliki forest virus	virus Semliki forest
SIV	Simian immunodeficiency virus	virus opičí imunodeficiencie
ssDNA	Single strand deoxyribonucleic acid	jednovláknová DNA
ssRNA	Single strand ribonucleic acid	jednovláknová RNA
SR-BI	Scavenger receptor BI	scavenger receptor BI
Vav	Protein Vav	protein Vav
Vpu	Viral protein U	virový protein U
WNV	West Nile virus	virus Západonilské horečky

Obsah

1. Úvod	1
2. Průběh virové infekce	1
2.1. Doprava viru k místu replikace	2
2.2. Replikace virového genomu	3
2.3. Složení a vypuštění nových virionů	3
3. Virová interference	4
3.1. Historie	4
3.2. Homologní interference (Vyloučení superinfekce).....	5
3.3. Heterologní interference	6
4. Mechanismy homologního vyloučení superinfekce	7
4.1. Vyloučení na úrovni vstupu viru do buňky	7
4.1.1. Ovlivnění povrchových receptorů.....	7
4.1.1.1. Influenza A	8
4.1.1.2. Parainfluenza typ 3	10
4.1.1.3. HIV	11
4.1.2. Zablokování vazebných míst receptorů.....	14
4.1.2.1. Herpesviry.....	14
4.1.3. Zablokování fúze s membránou.....	16
4.1.3.1. Vakcinie	16
4.2. Vyloučení na úrovni replikace.....	17
4.2.1. Togaviridae	17
4.2.1.1. Sindbis virus.....	17
4.2.1.2. Semliki forest virus	18
4.2.1.3. Rubella.....	19
4.2.2. Flaviviridae	20

4.2.2.1. Hepatitida C	20
4.2.2.2. West Nile virus.....	22
4.2.2.3. Bovine Viral Diarrhea Virus.....	24
4.2.3. Hepatitida B.....	25
4.2.4. Virus vezikulární stomatitidy	27
5. Závěr	29
6. Seznam použité literatury	31

1. Úvod

Viry jsou obligátní intracelulární parazité, kteří k přežití nutně potřebují buněčné komponenty. Pro své úspěšné množení a šíření využívají buněčné mechanismy, které za ně zpracovávají jejich genetickou informaci, především se jedná o translační aparát. Tato silná závislost na buňkách viry v průběhu evoluce neustále nutí k vytváření nových mechanismů, jak se do hostitelských buněk dostat a využívat je.

Právě i díky koevoluci s viry si člověk jako hostitel vyvinul obranný imunitní systém. Díky velkému množství virů a jejich rozmanitosti, navíc také značné schopnosti mutace, viry imunitnímu systému často zcela unikají, nebo minimálně snižují jeho účinnost. Avšak právě vysoká variabilita virů a jejich počet, vede u virů k velké konkurenci mezi sebou. Proto ani viry nezůstávají pozadu a vytvářejí si obranné mechanismy podporující jejich schopnost konkurence vůči ostatním virům. Jedním z takových mechanismů je i virová interference způsobující vyloučení superinfekce (superinfection exclusion).

Vyloučení superinfekce je virový obranný mechanismus, při kterém virus již déle ustálený v buňce zabraňuje další infekci stejného či blízce příbuzného viru v téže buňce. Takovéto vyloučení superinfekce nazýváme homologní virová interference. Podobně může dojít k vyloučení infekce i antigenně vzdálenějšího, nepříbuzného viru, což označujeme jako heterologní interferenci.

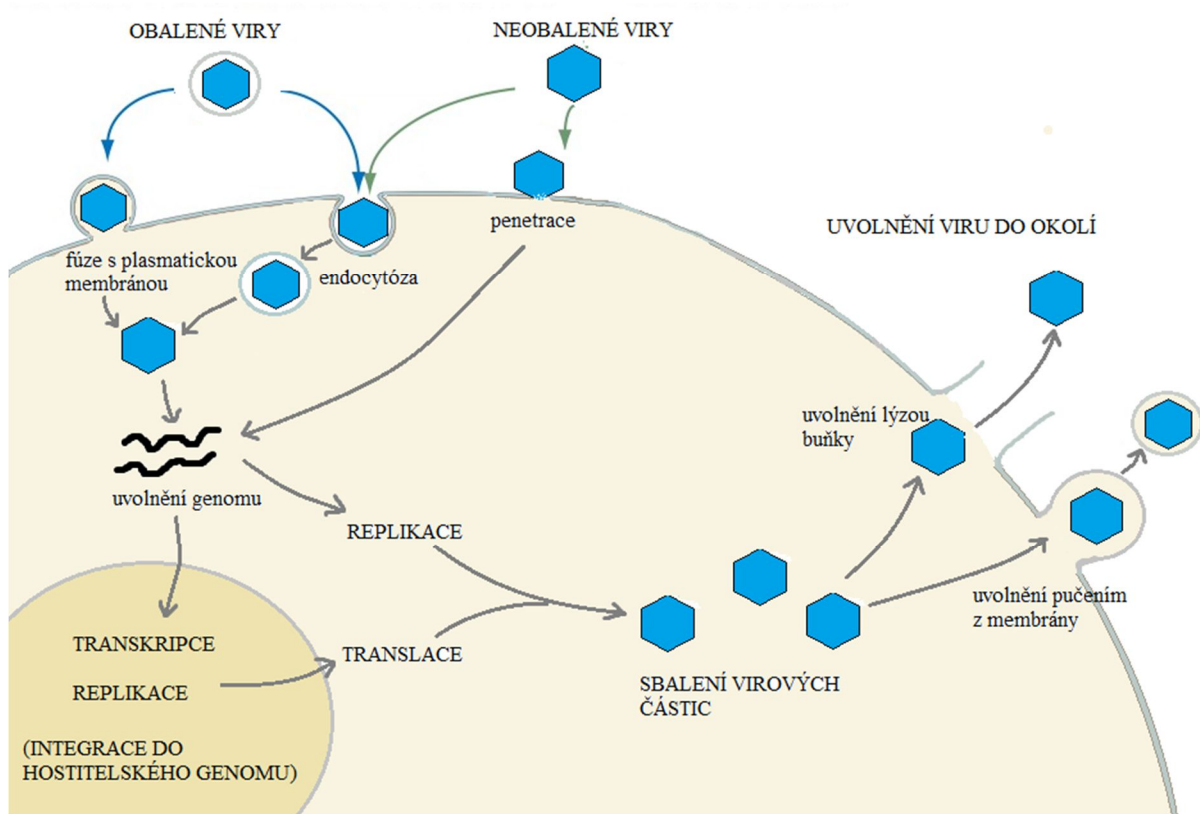
Vyloučení superinfekce jako virový mechanismus bylo poprvé popsáno u rostlinných virů. Dále bylo studováno vyloučení superinfekce u bakteriofágů, a následně došlo k pozorování vyloučení u široké škály živočišných virů, včetně patogenů napadajících člověka.

Cílem této bakalářské práce je shrnout zatím popsané poznatky o vyloučení superinfekce u živočišných virů. Nastínit mechanismy, jakými k vyloučení sekundárního viru dochází a shrnout, zda a případně proč je koinfekce jedné buňky více viry, anebo naopak vyloučení superinfekce, pro viry výhodné. Tato práce je zaměřena především na patogeny ohrožující člověka, jelikož pro tuto skupinu virů by mohlo být další studium vyloučení superinfekce zajímavé nejen z hlediska pozorování vzájemných virových interakcí, ale i pro potenciál jeho využití ve vývoji nových antivirotik a vakcín.

2. Průběh virové infekce

I když se průběh virové infekce liší u různých typů virů, a to jak posloupností jednotlivých kroků, tak dobou trvání replikačního cyklu, můžeme vysledovat společné rysy infekcí živočišnými viry (Obrázek 1). K vyloučení superinfekce může teoreticky dojít během jakéhokoliv kroku v replikačním cyklu viru. Replikační cyklus viru můžeme pro tyto účely

rozdělit do třech základních kroků: zaprvé, je to doprava viru k místu replikace, kam patří také přichycení viru k buněčnému povrchu („attachment“) a vstup viru do buněk. Zadruhé, je to replikace virového genomu a zatřetí tvorba kapsidy a uvolnění viru z buňky.



Obrázek 1: Obecný průběh virového replikačního cyklu

Infekce začíná přichycením na buněčný povrch. Virus vstupuje do buňky endocytózou, fúzí s buněčnou membránou, nebo vysílá penetrační pouze svůj genom. V cytoplasmě se uvolňuje virový genom, který je u RNA virů v cytoplasmě i replikován. Genom DNA virů je dopraven do jádra. Genom je transkribován, replikován a translatován. Vzniklé virové proteiny vytváří kapsidy, do kterých je zabalen virový genom. Virové partikule buňku opouští buď její lýzou nebo pučením z buněčné membrány, které buňku narozdíl od destrukce její membrány během lytického cyklu nepoškodí.

2.1. Doprava viru k místu replikace

Virová infekce začíná kontaktem virionu a buňky. Dochází k přichycení viru (attachment) na buněčnou membránu. To se děje pomocí vazby buněčných a virových povrchových receptorů. Viry nesou na svém povrchu povrchové proteiny, lišící se svou specifitou pro vazbu na buněčné receptory. Vazebné molekuly pro virus na buněčném povrchu mohou být například proteiny, glykoproteiny či lipidy, které buňce zajišťují běžné funkce (signalizace,

transport, udržování homeostázy). Viry se často váží nejprve na nescifický buněčný receptor a až poté na specifický povrchový protein, který slouží jako sekundární receptor.

Přímo dovnitř buňky se viry dostávají několika způsoby. Bakteriofágy a rostlinné viry pro vstup do buňky využívají penetraci – po přichycení na buněčný povrch dovnitř buňky vypustí pouze svůj genom. Ale u živočišných virů je typický spíše vstup celé virové partikule receptorem zprostředkovanou fúzí nebo receptorem zprostředkovanou endocytózou. Obalené živočišné viry využívají především receptorem zprostředkovanou fúzi virového lipidového obalu s buněčnou membránou a do buňky vysílají virovou kapsidu (HIV, vakcínie). V buňce musí poté dojít k rozbalení kapsidy a uvolnění virového genomu, který je připraven na další zpracování. Neobalené, ale i některé obalené viry (influenza, togaviry) využívají ke vstupu buněčné transportní mechanismy, především endocytózu. Virus je zabalen do váčku vytvořeného plasmatickou membránou buňky a transportován do cytoplasmy, kde je z váčku uvolněn. Uvolnění z váčků je provedeno buď rozložením endozómu prostřednictvím viroporinů neobalených virů, nebo fúzí obaleného viru a váčku.

2.2. Replikace virového genomu

Po vstupu viru do buňky, dojde k dopravení jeho genetické informace do místa určení, kterým je buď přímo cytoplasma, nebo buněčné jádro. To opět záleží na druhu viru. Podle příslušnosti viru ke skupině v klasickém Baltimorově systému, můžeme určit, k jakému kroku replikačního cyklu dochází nejdříve – zda transkripci (-ssRNA viry a DNA viry) či k integraci virového genomu do hostitelského genomu (retroviry), nebo dokončení reverzní transkripce (hepadnaviry), nebo přímo k translaci (+ssRNA viry, např. flaviviry). Prvním virovým produktem jsou časné proteiny zajišťující možnost replikace genomu, patří mezi ně především různé enzymy, jako například polymerázy. Jakmile je v buňce dostatečné množství kopií virového genomu, dochází k expresi pozdních virových proteinů. Pozdní proteiny jsou především strukturální proteiny, které mají na starost sbalení virového genomu a skládání kapsid.

2.3. Složení a vypuštění nových virionů

Po nasyntetizování dostatečného množství virových strukturálních proteinů dochází ke skládání virových částic. Tím vznikne nová generace infekčních virových partikulí, která je připravena k infekci nových buněk či hostitelů. Počet nově vzniklých virionů se může pohybovat od několika desítek po několik tisíc, podle příslušného viru a buňky. Z buňky jsou

uvolněny například její lýzou, většinou u neobalených virů, nebo v případě obalených virů pučením z plasmatické membrány.

3. Virová interference

3.1. Historie

Určitá konkurence mezi infekčními agens způsobujícími různá onemocnění byla pozorována ještě dávno před vznikem moderní biologie. Dobře známý je příklad lékaře Edwarda Jennera, který si všiml nápadně menšího výskytu pravých neštovic mezi dojičkami krav. Vyvodil z toho teorii, že prodělání infekce kravských neštovic by mohlo zabránit nakažení se pravými neštovicemi. Tuto svou hypotézu si ověřil, když v roce 1796 nakazil osmiletého chlapce Jamese Phippse virem kravských neštovic. Poté, co chlapec nemoc prodělal, se jej Jenner pokusil nakazit pravými neštovicemi, ale nemoc se u Jamese neprojevila. Ostatně to Jenner předpokládal. Své výsledky publikoval o 2 roky později. To, že člověk nakažený jednou nemocí, se stává jaksi odolnějším vůči jiným nemocem, nebo minimálně prodělání jedné infekce zmírňuje průběh další, publikoval ve své knize „An Account of the Native Africans in the Neighborhood of Sierra Leone: To which is Added an Account of the Present State of Medicine Among Them“ také například Thomas M. Winterbottom v roce 1803. Ten pozoroval u kmenů v oblasti Sierra Leone, že tamní lidé léčí chronické kožní onemocnění aplikováním materiálu z herpetické infekce do místa postižení (převzato z review Lennette, 1950). V tomto případě se však nejednalo o vyloučení infekce mezi dvěma viry, ale o konkurenční boj mezi herpetickým virem a houbou způsobující dermatofytózu.

Dnes již nejen víme, že existuje virová interference, ale od 20. let 20. století ji také mnoho vědců popsalo. Konkrétně prvními publikacemi na téma virové interference a vyloučení superinfekce byly články o interferenci mezi rostlinnými viry, dále se vědci začali zabývat i vyloučením superinfekce u bakteriofágů, kde jsou dnes již konkrétní mechanismy vyloučení dobře popsány. Nakonec přišly na řadu i viry živočišné. Právě dosud známými poznatky o interferenci mezi živočišnými viry, především různými mechanismy vyloučení superinfekce se zabývám i v této práci.

3.2. Homologní interference (Vyloučení superinfekce)

Za homologní interferenci označujeme proces, při kterém je stejná buňka infikována stejným nebo blízce příbuzným druhem viru, ale k pomnožení viru ze sekundární infekce nedochází díky vyloučení superinfekce. Primární virus totiž blokuje jisté buněčné procesy a sekundárnímu viru se nedaří vstoupit do buňky, nebo se mu nedostávají potřebné buněčné zdroje. Mohli bychom namítat, že blokace sekundární infekce může být zapříčiněna imunitním systémem, který se po primární infekci stihl aktivizovat. Avšak k vyloučení sekundární infekce dochází většinou již velmi brzy po infekci primární, řádově se jedná o několik hodin. Takto rychlý nástup specifické imunitní reakce je prakticky nemožný. Roli imunitního systému vyloučilo několik studií i fakt, že k interferenci dochází i u antigeně vzdálených (nepříbuzných) virů.

Vyloučení bylo popsáno jak u RNA, tak i u DNA virů. Takto široký rozptyl virů, u kterých dochází k rezistenci vůči superinfekci, naznačuje, že jedná o mechanismus důležitý pro virovou replikaci, patogenezi a evoluci (Laliberte and Moss, 2014). Významně ovlivňuje zdatnost primárního viru a jeho dynamiku *in vivo*. Během sekundární infekce, pokud se viru podaří dostat až k replikačnímu kroku, se totiž snižuje rychlost replikace v porovnání s primárním virem, což superinfikující virus uvádí do nevýhodné pozice oproti viru interferenci způsobujícímu (Webster *et al.*, 2013).

Vyloučení superinfekce může být u některých virů pouze dočasné a pasážírováním se může ztrácet (Lee *et al.*, 2005). U virů způsobujících latentní a chronické infekce naopak schopnost vyloučení superinfekce může přetrvávat dlouhou dobu.

Vyloučení superinfekce je pro virus výhodné, neboť chrání limitované buněčné zdroje a umožňuje hladký průběh replikace a šíření viru z primární infekce. Navíc je vyloučení superinfekce pro primární virus výhodné i z toho důvodu, že jím produkované virové potomstvo pravděpodobněji vstoupí do zdravých buněk, které mají oproti infikovaným buňkám dostupnější zdroje pro další replikaci (Lee *et al.*, 2005). Z určitého pohledu se jedná o evolučně výhodnou strategii pro zachování rozmanitosti virů (Criddle *et al.*, 2016). Na druhou stranu vyloučení superinfekce virům přináší i negativa, a sice snížení genetické plasticity kvůli omezení možnosti vzniku nových rekombinantů (Schaller *et al.*, 2007). Pokud by viry mohly neomezeně superinfikovat buňky, rapidně by vzrostla rekombinace mezi nimi, což by vedlo k zvýšení virové variability a tím pádem i k rezistenci vůči lékům a vakcínám.

3.3. Heterologní interference

Heterologní interference mezi nepříbuznými viry je oproti homologní interferenci mnohem méně prostudovaná, především kvůli složitému návrhu a vyhodnocení takových studií a náročnosti nalézt takové dva viry, které spolu opravdu během infekce pozorovatelně interagují, aniž by se jednalo pouze o omezení způsobené hostitelskou imunitní odpovědí. I přesto však existují studie zabývající se interferencí mezi nepříbuznými viry, zejména na domácích zvířatech (Costa-Hurtado *et al.*, 2014; Pantin-Jackwood *et al.*, 2015). Z nich vyplývá, že koinfekce jedné buňky více viry je sice poměrně běžná, ale zdá se, že je pro oba viry zpravidla nevýhodná. Ve většině případů jeden virus, zejména ten, který buňku infikoval o něco dříve, nebo ten s vyšší multiplicitou infekce, převládá nad druhým a využívá tak více buněčných zdrojů pro sebe. Avšak ani pro převládající virus není koinfekce výhodná, neboť má oproti individuální infekci kvůli omezeným buněčným zdrojům řádově nižší počty virového potomstva. Podobná omezení byla pozorována i u koinfekce HIV pozitivních pacientů HBV a HCV. HBV a HCV si v případě koinfekce taktéž konkurovali, opět především o zdroje nutné k replikaci (Yang *et al.*, 2011).

Oproti homologní interferenci není vyloučení superinfekce u heterologních virů tak snadné, neboť nepříbuzné viry zpravidla nesdílejí stejné buněčné receptory pro vstup do buňky. Proto zpravidla nedochází k zamezení vstupu heterologního viru jejich zablokováním, či snížením jejich exprese, jako je to u homologních virů běžné (Geraghty *et al.*, 2000; Laliberte and Moss, 2014; Bartosch *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 1997). Avšak i u heterologních virů byl mechanismus zablokování buněčných receptorů pozorován. Konkrétně se jednalo o interferenci mezi herpesvirem HHV-7 a retrovirem HIV. Oba tyto viry ke vstupu do buňky využívají stejný receptor CD4 a zdá se, že prvotní vystavení buněk HHV-7 snižuje účinnost infekce HIV (Crowley *et al.*, 1996). K heterologní virové interferenci však ve většině případů dochází až v dalších krocích po vstupu viru, kdy už se vzájemné omezení většinou odvíjí od konkurence o zdroje či toho, který virus má určitou převahu. Ať se již jedná o to, že infikoval buňku s vyšší multiplicitou, nebo vstoupil do buňky dříve a stihl si tak pro sebe „zabrat“ buněčné zdroje.

Jednou ze studií koinfekce nepříbuznými viry je ta zkoumající vliv koinfekce virem ptačí chřipky a viru Newcastlelské choroby (NDV) na průběh infekce (Pantin-Jackwood *et al.*, 2015). Z této práce vyplývá, že koinfekce dvěma viry u kachen nemá sice vliv na klinické příznaky nemoci, ale zato dočasně ovlivňuje množství nově produkováných virů šířených do okolí. Oba viry jsou sice schopny projít celým svým replikačním cyklem, ale kvůli soupeření

o buněčné zdroje je jejich replikace dočasně omezená. Na rozdíl od virů, které se množí v buňce infikované jen jedním virem, mají viry z koinfikovaných buněk nižší výtěžky virového potomstva. Koinfekce virem NDV a ptačí chřipky také vedla k oddálení času smrti, v důsledku omezení replikace ptačí chřipky konkurencí o zdroje s NDV. Avšak během několika málo dní (2-3 dny od infekce) se replikace NDV snížila a produkce potomstva viru ptačí chřipky vzrostla k hodnotám běžným při individuální infekci. Podobných výsledků svědčících o virové konkurenci o buněčné zdroje pro replikaci došla i studie koinfekce H7N2 ptačí chřipky a NDV (Costa-Hurtado *et al.*, 2014).

Heterologní interference byla pozorována i mezi virem chřipky a dalšími viry způsobujícími respirační onemocnění, mezi nimi například parainfluenza a adenoviry. Výsledky této studie naznačují, že k heterologní interferenci mezi influenzou a parainflouenzou dochází a pravděpodobně má vliv na sezónní načasování a průběh těchto infekcí (Zheng *et al.*, 2017).

4. Mechanismy homologního vyloučení superinfekce

Jak již bylo dříve zmíněno, vyloučení superinfekce je převážně studováno mezi stejnými viry, nebo alespoň viry blízké příbuznými. Proto i konkrétní mechanismy, jakými vyloučení probíhá, jsou detailněji charakterizovány zejména u homologní interference.

Bylo popsáno několik mechanismů vyloučení superinfekce v různých stádiích životního cyklu virů. Jedná se například o zablokování připojení viru na receptor, vstupu nukleokapsidy do buněk, či zablokování po vstupu superinfikujícího viru do buňky omezením, nebo úplným zastavením replikace (Garcia and Miller, 1991; Aiken *et al.*, 1994; Hrecka *et al.*, 2005; Michel *et al.*, 2005; Wildum *et al.*, 2006; Geraghty *et al.*, 2000; Criddle *et al.*, 2016; Horga *et al.*, 2000; Moscona and Peluso, 1992, 1991; Morrison and McGinnes, 1989; Huang *et al.*, 2008). Některé viry mají dokonce dva mechanismy vyloučení superinfekce – časný a pozdní, které superinfekci brání v různých krocích virového replikačního cyklu (Lee *et al.*, 2005).

4.1. Vyloučení na úrovni vstupu viru do buňky

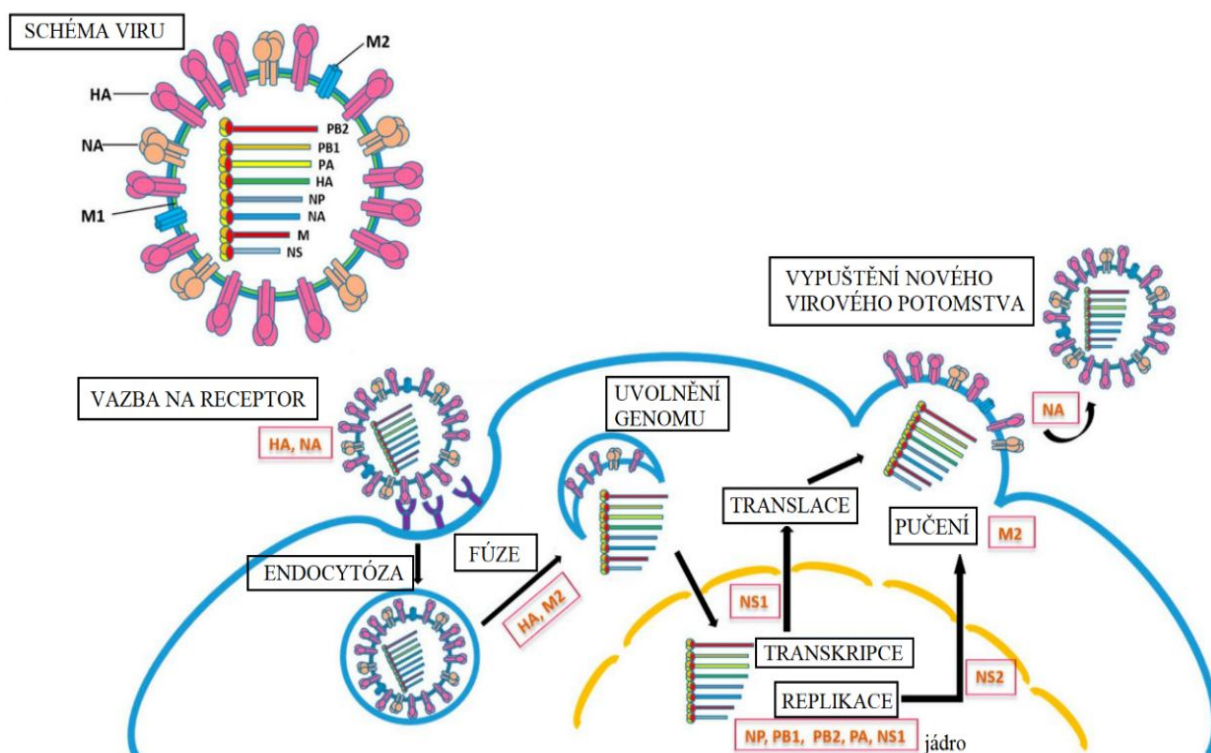
4.1.1. Ovlivnění povrchových receptorů

Vyloučení superinfekce prostřednictvím snížení množství receptoru je poměrně běžný mechanismus, který se vyskytuje u DNA i RNA virů. Viry mohou vyloučit superinfekci buď prostřednictvím destrukce buněčných receptorů a snížením jejich exprese (Bratt and Rubin, 1968b; Morrison and McGinnes, 1989; Moscona and Peluso, 1992; Horga *et al.*, 2000; Huang

et al., 2008; Wildum *et al.*, 2006), nebo mohou buněčné receptory obsadit svými produkty a zablokovat tak vazebná místa (Johnson and Spear, 1989; Geraghty *et al.*, 2000).

4.1.1.1. Influenza A

Influenza A je obalený virus s -ssRNA genomem z čeledi *Orthomyxoviridae*, který způsobuje celosvětové epidemie respiračního onemocnění, chřipky. Genom tvoří osm segmentů RNA, které kódují deset proteinů (PB1, PB2, PA, HA, NP, NA, M1, M2, NS1, NEP). Obal je odvozený od buněčné membrány a tvoří ho virem kódované glykoproteiny hemaglutinin (HA) a neuraminidáza (NA) a protein M2 (Obrázek 2). Rozlišujeme velké množství subtypů chřipky díky variabilitě povrchových glykoproteinů, kdy hemaglutinin tvoří šestnáct variant a neuraminidáza devět.



Obrázek 2: Schéma stavby virionu a replikačního cyklu influenza viru

Obal viru je tvořen hemaglutininem (HA), neuraminidázou (NA) a matrixovým proteinem (M2), uvnitř kapsidy je osm segmentů virového -ssRNA genomu, které kódují deset proteinů.

Virus do buňky vstupuje receptorem zprostředkovanou endocytózou. Z endozómu je virový genom uvolněn do cytoplasmy pomocí fúze s membránou váčku. Genom putuje do jádra, je transkribován a replikován. V cytoplasmě probíhá translace nově vytvořených virových proteinů. Skládají se nové virové partikule, které jsou uvolňovány pučením z buněčné membrány. Převzato a upraveno podle: Zhu *et al.*, 2017.

Virus se přichycuje na buněčnou membránu prostřednictvím vazby hemagglutininu na kyselinu sialovou. Lidské typy influenzy preferují kyselinu sialovou navázanou na galaktózu α -2,6 vazbou. Do buňky virus vstupuje endocytózou zprostředkovanou receptorem (Obrázek 2). Po uvolnění z kyselého prostředí endozómu je virová RNA dopravena do jádra pomocí jaderného lokalizačního signálu neseného NP. V jádře probíhá transkripce a replikace. Virové transkripty jsou poté opatřeny methylguanovinovou čepičkou, ale syntéza komplementárních +ssRNA pro replikaci je na čepičce nezávislá. Pomocí exportního signálu neseného komplexem M1/NEP se virové komponenty dostanou z jádra a mohou se skládat do nových virových kapsid. Přesný mechanismus balení všech osmi segmentů do jednoho virionu není známý. Virus poté pučí z plasmatické membrány, na kterou je navázán hemagglutininem. Vazbu mezi HA a kyselinou sialovou přestřihuje NA, viry jsou uvolněny z buňky a šíří se dál.

V roce 2008 byla provedena studie zkoumající, zda a jakým způsobem se u influenzy objevuje vyloučení superinfekce (Huang *et al.*, 2008). Pozornost vědci zaměřili především na tři výše zmíněné povrchové proteiny, aby ověřili tři hypotetické mechanismy vyloučení superinfekce. Role HA by měla spočívat v obsazení buněčných receptorů, NA by mohla svou enzymatickou aktivitou odštěpit kyselinu sialovou z buněčného povrchu, podobně jako bylo popsáno u hemagglutin-neuraminidázového proteinu HPIV-3 (Horga *et al.*, 2000). Oba tyto způsoby by zablokovaly superinfekci již v kroku vazby nově příchozích virionů na infikovanou buňku. Protein M2, který slouží jako iontový kanál by potencionálně mohl rozrušit kompartment v endozómu zodpovědný za fúzi membrán, takže by superinfekci blokoval až po vstupu viru do buňky.

Zatímco u HA a M2 nebyl prokázán žádný účinek na superinfekci buněk, virová neuraminidáza vyloučení superinfekce zprostředkovala. V buňkách, kde docházelo k expresi neuraminidázy, byly pozorovány výrazně nižší hladiny α -2,3 i α -2,6 vázané kyseliny sialové. Neuraminidáza odštěpuje virový receptor, kyselinu sialovou, z buněčného povrchu. Inhibuje hemagglutininem zprostředkovanou vazbu virů snížením exprese kyseliny sialové na buněčném povrchu a tím zabraňuje nově příchozím virům se na již infikované buňky navázat (Huang *et al.*, 2008).

Zabránění superinfekci je pro virus chřipky výhodné z pohledu nejvýhodnějších aktuálních podmínek pro průběh infekce, kdy se buňka znovu neinfikuje potomky viru, který se v ní ustálil jako první. Pokud by k zabránění superinfekce nedošlo, mělo by virové potomstvo omezené zdroje ke své vlastní replikaci. Zabránění superinfekce je důležité i z evolučního hlediska pro udržení stability aktuálního virového genomu. Pro vytváření

nových subtypů chřipky je totiž nutný vnik dvou virů do jedné buňky. Četnost, s jakou k takové kombinaci v buňkách dojde je dána právě i činností neuraminidázy omezující takovou koinfekci. Pro virus by totiž příliš častá rekombinace různých subtypů vedla k nestabilitě genomu (Huang *et al.*, 2008).

4.1.1.2. Parainfluenza typ 3

Parainfluenza viry patří do čeledi *Paramyxoviridae*, což jsou obalené viry s nesegmentovaným -ssRNA genomem. V rámci *Paramyxoviridae* se rozlišují 4 typy virů patřící do dvou rodů – *Respirovirus* (Parainfluenza typu 1 a 3 - HPIV-1, HPIV-3) a *Rubulavirus* (Parainfluenza typu 2 a 4 - HPIV-2, HPIV-4) (Afonso *et al.*, 2016). Parainfluenza typu 3 má ze všech 4 typů nejvyšší prevalenci v populaci. Parainfluenza je jednou z nejčastějších příčin respiračních onemocnění u dětí, způsobuje různé respirační problémy, včetně bronchitidy a pneumonie.

Obal HPIV3 obsahuje 2 glykoproteiny – hemaglutinin-neuraminidázový (HN) a fúzní protein (F), které zajišťují připojení a vstup viru do buňky. Infekce je iniciována připojením viru k hostitelské buňce interakcí HN s povrchovým receptorem obsahujícím kyselinu sialovou. (Moscona and Peluso, 1991). HN má díky své neuraminidázové aktivitě potenciál ničit receptor, což hraje roli při dalším šíření infekce (Horga *et al.*, 2000).

Vyloučení superinfekce u HPIV-3 je způsobeno enzymatickou aktivitou neuraminidázy. Neuraminidázová aktivita HN proteinu je nutná k zajištění vyloučení superinfekce, protože odštěpuje kyselinu sialovou z virových receptorů vystavených na povrchu buňky. Tím znemožňuje nově přichozím virům přichycení a následnou fúzi s membránou. Zabraňuje tedy sekundárnímu viru do buňky vstoupit. Kontinuální exprese HN proteinu s aktivní neuraminidázovou enzymatickou aktivitou vede k vyčerpání virových receptorů (Horga *et al.*, 2000). Roli neuraminidázy potvrzuje i fakt, že stupeň blokace superinfekce závisí na hladině exprese HN na povrchu buněk. Buňky, produkující nejvyšší hladiny HN a aktivní neuraminidázy na buněčném povrchu, byly nejvíce rezistentní vůči infekci HPIV3. Hypotézu podporuje i zjištění, že při využití klonů produkujících běžné hladiny HN proteinu, avšak s dvojitou bodovou mutací, zajišťující vymizení neuraminidázové enzymatické funkce, nedošlo k vyloučení superinfekce. Z toho vyplývá, že vyloučení superinfekce zajišťuje právě neuraminidázová aktivita, nikoliv vazebné funkce HN proteinu. Díky tomu lze fúzi a vstupu HPIV3 předejít exogenní léčbou buněk virovou neuraminidázou HPIV3, která způsobí destrukci receptorů.

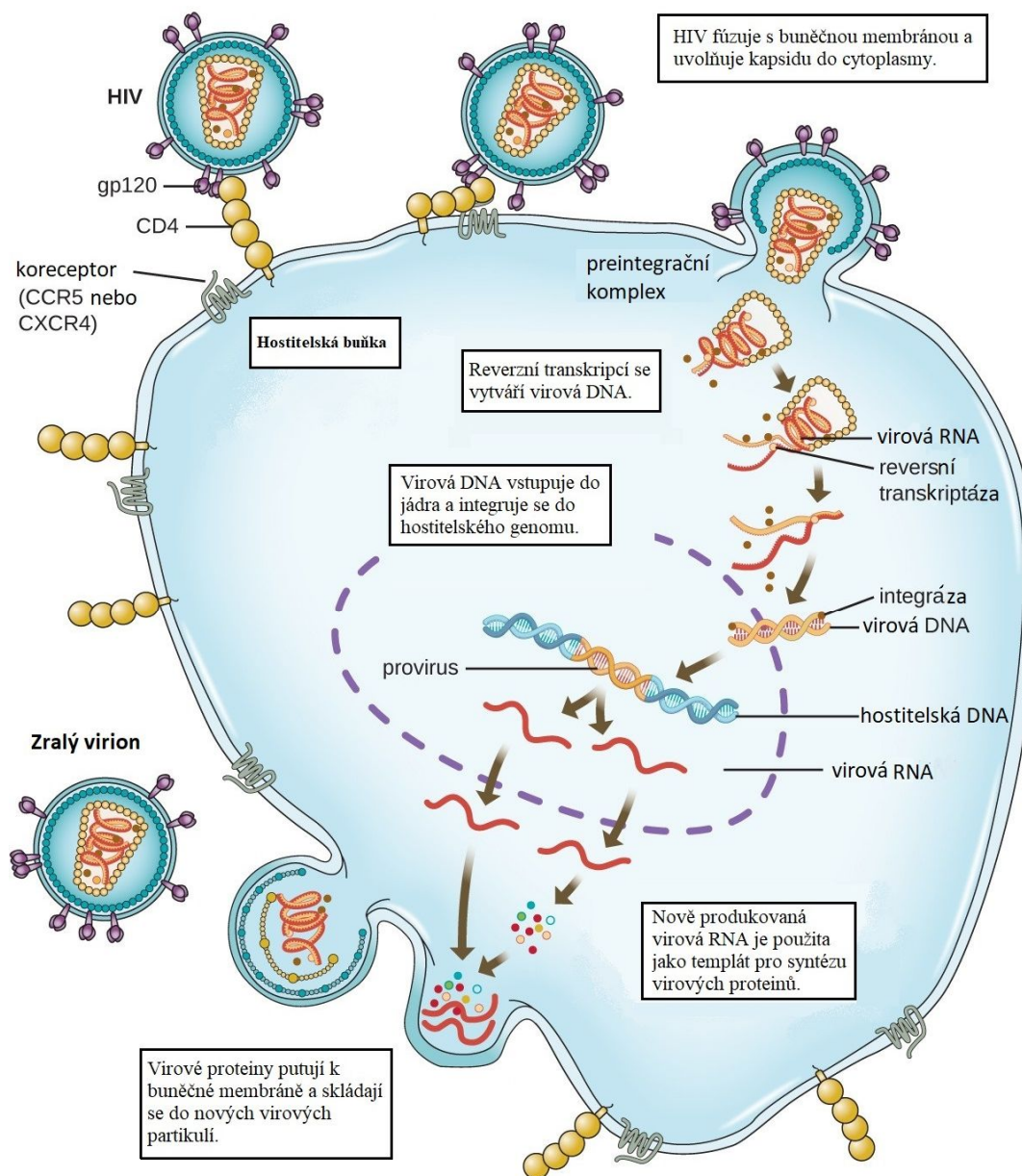
Vyloučení superinfekce bylo pozorováno jak u akutní, tak i u persistentní infekce. Do budoucna je ještě nutné objasnit, ve kterém místě dochází k desializaci buněčných receptorů, konkrétně zda se tak děje během jejich transportu na povrch a nebo až na buněčném povrchu (Horga *et al.*, 2000).

Vyloučení superinfekce bylo pozorováno i u dalších zástupců čeledi *Paramyxoviridae*, mezi nimi například u Newcastle disease viru (NDV) (Bratt and Rubin, 1968) a viru Sendai (Kimura *et al.*, 1976; Baluda, 1957). U NDV byla dokonce specifická homologní interference popsána jako jedna z prvních na živočišných virech a to ve třech publikacích Bratta a Rubina z šedesátých let, které shrnují projevy, mechanismy interference a jejich porovnání mezi aktivním a neaktivním virem (Bratt and Rubin, 1967, 1968b, 1968a). I u NDV a Sendai viru je vyloučení superinfekce připisováno roli neuraminidázy v odštěpování virových receptorů (Morrison and McGinnes, 1989; Moscona and Peluso, 1992).

4.1.1.3. HIV

Virus lidské imunodeficiency (HIV) je obalený virus z rodu *Lentivirus* čeledi *Retroviridae*, využívající ve svém replikačním cyklu reverzní transkripci. V ikosahedrální kapsidě má HIV tzv. pseudodiploidní genom tvořený dvěma identickými kopiemi +ssRNA. Virus se váže na buněčný receptor CD4 a chemokinové koreceptory. Do buňky vstupuje pomocí fúze s plasmatickou membránou (Obrázek 3). V cytoplasmě dochází v kapsidě k reverzní transkripci virového RNA genomu na provirovou DNA, která je uvolněna do cytoplasmy, následně dopravena do buněčného jádra a integrována do hostitelského genomu pomocí virové integrázy. Virový cyklus pokračuje dále transkripcí s využitím hostitelské DNA dependentní RNA polymerázy II.

U lidí rozlišujeme 2 kmeny HIV – HIV-1 a HIV-2. Právě u HIV-1 bylo popsáno vyloučení superinfekce, ačkoliv některé jeho mechanismy zatím zůstávají neobjasněné.



Obrázek 3: Schéma replikačního cyklu HIV

Virus se váže na buněčný receptor CD4 a koreceptory CXCR4 nebo CCR5, obal fúzuje s buněčnou membránou a vypouští nukleokapsidu do cytoplasmy. Virový genom se přepisuje reverzní transkripcí na dsDNA, která je uvolněna do cytoplasmy a putuje do buněčného jádra a integruje se do hostitelského genomu. V buňce jsou následně produkovány virové proteiny. Strukturální proteiny vytváří kapsidu, do které jsou nasoukány genom a nestrukturální proteiny. Nové viriony pučí z buněčné membrány a jsou uvolněny do okolí. Převzato a upraveno z Pau and George, 2014.

Vyloučení superinfekce probíhá již ve fázi vazby nového viru na buněčný receptor prostřednictvím snížení produkce buněčného receptoru CD4 v translační a posttranslační fázi.

Toto ovlivnění produkce receptoru a vazby na něj, mají na starosti virové proteiny gp160, Vpu a Nef. Membránový glykoprotein gp160 kódovaný genem env, zajišťuje HIV vazbu na buněčný receptor CD4 a koreceptor. Poté se podílí společně s proteinem Vpu na snížení produkce CD4 receptorů a jejich transportu na buněčný povrch. Protein Nef je regulační protein ovlivňující buňku na mnoha úrovních, například snížením exprese povrchových proteinů či přestavbou cytoskeletu.

Role gp160 a Vpu proteinu spočívá v inhibici buněčného transportu nových CD4 receptorů na povrch v pozdějších krocích virové infekce (Chen and Gandhi, 1996). Protein gp160 se váže na CD4 receptory, se kterými vytváří intracelulární komplex, který lze rozeznat značením protilátkami. Komplex byl detekován především v endoplasmatickém retikulu. Brání maturaci CD4 receptorů a taktéž vazba gp160 na CD4 blokuje transport virových receptorů na buněčný povrch (Jabbar and Nayak, 1990). Protein Vpu také snižuje expresi nových CD4 na povrchu buněk, ale jeho účinek je při normálních hladinách exprese virových proteinů v porovnání s Nef a gp160 zanedbatelný a nastupuje až v pozdějších hodinách po infekci (71 hod pi). Pokud se však testovaly účinky Vpu při vysoké expresi virových genů, byl efekt vyloučení superinfekce silnější a také nastoupil již v dřívější době. Zároveň je zde vhodné podotknout, že na rozdíl od Nef proteinu vysoce konzervovaného napříč celým rodem *Lentivirus*, Vpu se vyskytuje jen u HIV-1 a viru opičí imunodeficiency (SIV) (Wildum *et al.*, 2006).

Nef protein je exprimován ve vysokých dávkách již v časných fázích infekce a má na snížení exprese CD4 největší vliv, konkrétně až čtyřikrát větší než gp160 a Vpu (Wildum *et al.*, 2006). Produkce Nef je zásadní pro úspěšnou virovou infekci a progresi onemocnění (Kestler *et al.*, 1991). Jeho podpora vstupu CD4 z povrchu dovnitř buňky pomocí endocytózy v klatrinových váčcích a následná degradace v lysozomech byla důkladně prozkoumána v mnoha studiích již v devadesátých letech (Garcia and Miller, 1991; Aiken *et al.*, 1994). Za naváděcí signál CD4 do klatrinových váčků je zodpovědný dileucinový motiv v C-terminální sekvenci Nef proteinu, který se specificky váže na β -adaptinovou podjednotku klatrinových adaptorových komplexů AP-1 a AP-2 (Greenberg *et al.*, 1998). Další studie prokázaly, že Nef protein má vliv i na regulaci koreceptorů viru HIV, kterými jsou CCR5 a CXCR4 (Hrecka *et al.*, 2005; Michel *et al.*, 2005). Při použití virů s mutovaným genem pro Nef s nefunkční schopností ovlivňování CD4 a koreceptorů však stále docházelo k vyloučení superinfekce, i když je patrné, že stupeň vyloučení stále ještě se schopností snížení CD4 koreloval. Zdá se tedy, že hlavní mechanismus vyloučení superinfekce, není snížení CD4 v infikovaných

buňkách, ale jiná, zatím neznámá funkce Nef proteinu nezávislá na úpravách exprese CD4 nebo jiných koreceptorů pro vstup HIV (Wildum *et al.*, 2006).

Takovým mechanismem by například mohly být změny ve složení buněčné membrány indukované Nef, jako je zvýšení biosyntézy cholesterolu a jeho obsahu v buněčné membráně (Zheng *et al.*, 2003), které přispívají k vyšší infektivitě virionů HIV a virové replikaci (Swain and Schindler, 2005). Dalším způsobem ovlivnění vyloučení superinfekce by mohly být i změny v cytoskeletu indukované interakcí Nef s proteinem Vav (Fackler *et al.*, 1999) nebo schopnost Nef umožnit viru překonání kortikální aktinové bariéry, která v určitých místech membrány brání vstupu transportních váčků a tím i vstupu viru do buňky (Campbell *et al.*, 2004). Tyto potenciální možnosti je třeba prozkoumat v dalších studiích, do té doby přesný mechanismus rezistence k superinfekci u HIV-1 zůstává z velké části neobjasněný.

U retrovirů je nastolení vyloučení superinfekce výhodné, neboť může viru poskytovat prevenci proti násobnému vstupu provirů, které by omezovaly přežití buněk a trvalou patogenezí. Vyloučení superinfekce pomocí snížení povrchových receptorů zabraňuje vazbě a vstupu sekundárně infikujícího viru do buňky. Takto časné vyloučení je pro virus zvláště výhodné především z důvodu, že se v buňce vůbec neobjeví nová virová DNA, která by se jevila jako poškozená DNA a mohla by vést k aktivování T lymfocytů a následné smrti buňky. Konkrétně u buněk superinfikovaných HIV-1 typem byla apoptóza zhruba třikrát častější než u buněk vylučujících superinfekci. Virus se tedy při využití vyloučení superinfekce může déle účinně množit (Wildum *et al.*, 2006).

4.1.2. Zablokování vazebných míst receptorů

4.1.2.1. Herpesviry

Alphaherpesvirus je rod z čeledi *Herpesviridae*, což jsou obalené dsDNA viry. Mezi Alphaherpesviry patří například Herpes simplex virus 1 (HSV1) a virus způsobující u zvířat Aujeszkyho chorobu neboli pseudorabies virus (PRV). Uvádí se, že lidskými herpesviry je nakaženo 80-100 % populace. Herpesviry vstupují do hostitele přes sliznice, odkud se dostávají do periferního nervového systému, kde následně v sensorických neuronech ustalují latentní infekci. V některých případech mohou herpesviry způsobit i onemocnění centrálního nervového systému.

Vazba virů je zprostředkována virovými proteiny gC a gB vázícími heparan sulfátové řetězce proteoglykanů na buněčném povrchu. Po takovéto vazbě, nastupuje obalový glykoprotein gD, který je přítomný u všech členů rodu *Alphaherpesvirus*, kromě varicella zoster viru. Zprostředkovává vstup nukleokapsidy do buňky. Váže se na buněčné povrchové receptory,

mezi nimiž je například nectin-1 či HveC, a zprostředkovává fúzi virového obalu s buněčnou membránou (Geraghty *et al.*, 2000).

U alfaherpesvirů je běžná koinfekce i vyloučení superinfekce a jedno či druhé je upřednostněno v závislosti na časovém rozestupu jednotlivých infekcí. Pokud jsou buňky infikovány dvěma viry v krátkém časovém období (kolem 4 hodin), pak dochází téměř ve všech případech ke koinfekci a replikaci obou virů současně. Zatímco pokud dojde k infekci po delším rozestupu, dochází v 99 % případů k vyloučení superinfikujícího viru (Jarosinski, 2012).

Pro ustálení vyloučení superinfekce je nutná produkce nových virových proteinů. U alfaherpesvirů (HSV1 a PRV) vyloučení superinfekce zajišťuje právě membránově vázaný glykoprotein gD (Johnson and Spear, 1989), který je produkován mezi časnými až pozdními proteiny během infekce. Protein gD, který je nově syntetizován během replikačního cyklu primárního viru v buňkách, využívá stejné vazby na buněčné receptory, jako když buňku infikoval, ale tentokrát, aby buněčné receptory zablokoval (Criddle *et al.*, 2016). Interferenci protein gD zprostředkovává blokováním přístupu ligandů k vazebným místům na receptorech pro protein gD (Geraghty *et al.*, 2000). Protein gD také indukuje endocytózu a tím snížení hladiny buněčného povrchového receptoru nectinu-1, čímž také znemožňuje sekundárnímu viru vazbu na buňku (Stiles *et al.*, 2008).

Vyloučení infekce ihned v kroku vstupu viru do infikované buňky chrání limitované buněčné zdroje a podporuje tak replikaci a šíření původního viru. Objevuje se již 4-8 hodin po primární infekci. Ale již ve 2 hodinách po infekci se projevuje gD independentní blok superinfekce, kdy jsou viriony zablokovány až v některém z kroků po vstupu do buňky. K tomuto vyloučení postačuje exprese časných virových produktů. Pravděpodobně jsou za toto vyloučení zodpovědné geny ICP0, ICP4, ICP22 a ICP27. Přesný mechanismus však nebyl dosud popsán (Criddle *et al.*, 2016).

U HSV1 byla pozorována i interference, při které gD protein produkováný HSV1 bránil vstupu dalších alfaherpesvirů – například PRV, bovinního herpesviru a koňského herpesviru (Geraghty *et al.*, 2000). Takovýto blok je umožněn díky vazbě gD na buněčný receptor HveC, který je společný více zástupcům herpesvirů, proto produkce gD proteinu jedním členem rodu, zablokuje vstupní receptory i příbuzným virům.

4.1.3. Zablokování fúze s membránou

4.1.3.1. Vakcínie

Virus vakcínie je velký obalený virus patřící do čeledi *Poxviridae*, rod *Orthopoxvirus*. Genom tvoří dsDNA dlouhá 190 kbp (Goebel *et al.*, 1990). Replikuje se v cytoplazmě. S ostatními členy rodu *Orthopoxvirus*, kterými jsou například Variola virus, Ectromelia virus a Cowpox virus, si je virus vakcínie morfologicky a antigenně velmi podobný. Tato podobnost způsobuje po infekci jedním orthopoxvirem určitou ochranu vůči dalším členům rodu, proto má také virus vakcínie velké využití v sestavování vakcín.

Na viru vakcínie je zajímavé, že tvoří více typů virionů, buď s jednoduchým obalem, nebo dvojitým obalem. V průběhu životního cyklu vakcínie rozeznáváme celkově čtyři typy virionů – infekční „intracellular mature virus“ (IMV), „intracellular enveloped virus“ (IEV), „cell-associated enveloped virus“ (CEV) a „extracellular enveloped virus“ (EEV) (shrnutí v review *Smith et al.*, 2002). CEV a EEV mají dvojitý obal a IEV a IMV jednoduchý (Doceul *et al.*, 2010).

Pro vyloučení superinfekce u viru vakcínie byly zkoumány dva mechanismy, z nichž jeden probíhá již na úrovni fúze virové a buněčné membrány a druhý až po vstupu nových virionů do buňky (Laliberte and Moss, 2014).

Bylo zjištěno, že pro vyloučení superinfekce je dostatečná exprese časných virových proteinů. Indukce resistance proti superinfekci závisí na virové RNA a syntéze proteinů primárním virem, nevyžaduje však replikaci DNA. Zavedení vyloučení nastává do 3 hodin po infekci, což je relativně krátká doba. Po 4 hodinách od infekce je vyloučení 90% a po 6 hodinách je účinnost blokace sekundárních virů dokonce 99% (Christen *et al.*, 1990). Pro virus je výhodné zavést vyloučení superinfekce tak brzy, protože si tím pojistí buněčné zdroje a uplatní tak jakousi strategii „první bere vše“. Další výhodou časného zavedení resistance na superinfekci je selekce virionů schopných rychlé infekce od defektních částic.

Bylo vyloučeno, že by za blokování superinfekce mohly transmembránové proteiny indukované buněčným interferonem, které brání fúzi s membránou u jiných virů (Laliberte and Moss, 2014). Superinfekci na úrovni vstupu tedy pravděpodobně brání proteiny A56 a K2, které tvoří na buněčné membráně heterodimer a interagují s komplexem odpovědným za fúzi virové membrány s membránou buněčnou a následný vstup do buňky.

U viru vakcínie byly také v souvislosti s vyloučením superinfekce pozorovány virem indukované změny v buněčném cytoskeletu, které korelovaly s mírou vyloučení. Konkrétně se jednalo o zakulacení buněk a ztrátu aktinových napěťových vláken. Cytoskeletální změny

však vyloučení superinfekce pouze doprovází, ale nejsou pro její zavedení výhradně nutné (Laliberte and Moss, 2014).

Doceul *et al.*, (2010) popsali ještě další mechanismus vyloučení superinfekce, při které dochází k blokaci dvojité obaleného EEV, pravděpodobně účinkem virových proteinů A33 a A36 (Doceul *et al.*, 2010). Z toho vyplývá, že u poxvirů bude pravděpodobně několik různých drah blokujících superinfekci, ale jejich přesný mechanismus musí být ještě objasněn.

Virus vakcínie je také schopný interference i s dalšími členy čeledi *Poxviridae*, vyloučení však neplatí obecně v rámci celé čeledi, ale je spíše typické pro rod *Orthopoxvirus*.

4.2. Vyloučení na úrovni replikace

4.2.1. Togaviridae

Viry z čeledi *Togaviridae* jsou obalené viry s pozitivně orientovaným ssRNA genomem. V této čeledi rozlišujeme rody *Alphavirus* a *Rubivirus*. Do rodu *Alphavirus* patří například Semliki forest virus (SFV) nebo Sindbis virus. Jediným členem rodu *Rubivirus* je Rubella, způsobující převážně dětské onemocnění, zarděnky. V této čeledi bylo vyloučení superinfekce popsáno u několika virů, včetně Sindbis viru, Toga viru, Semliki forest viru a viru zarděnek. U všech těchto virů je nástup bloku superinfekce velmi rychlý, do 15 minut po infekci. Vyloučení superinfekce u Sindbis a Toga viru probíhá na úrovni RNA replikace, zatímco u SFV během rozbalování nukleokapsid (Singh *et al.*, 1997).

4.2.1.1. Sindbis virus

U viru Sindbis vyloučení superinfekce probíhá až po vstupu viru do cytoplasmy infikované buňky. První blok v superinfekci nastává již v intervalu 15 minut mezi infekcí primárním virem a přidáním sekundárního viru do buněčné kultury (Adams and Brown, 1985). Pro ustálení homologní interference je nutná translace nestrukturních proteinů primárního viru. Schopnost účinně interferovat se superinfikujícím virem nastává zhruba hodinu po infekci buněčné kultury primárním virem (Johnston *et al.*, 1974). Johnstonova studie také prokázala, že pro navození schopnosti vyloučit superinfekci stačí, když je buňka infikována 1 PFU interferujícího viru (Johnston *et al.*, 1974). Jeden z produkovaných proteinů se kromě syntézy RNA podílí i na vyloučení superinfekce. Blok v replikačním cyklu sekundárního viru nastává po translaci virového genomu, ale před expresí strukturních proteinů a replikací genomu. Uvnitř cytoplazmy nastává rozdíl mezi translací 42S RNA interferujícího viru a viru superinfekčního, kdy původní virus pravděpodobně vyčerpá limitované buněčné zdroje, jakým je například polymeráza ve svůj prospěch a proto

superinfekční virus nemá dostatečné prostředky pro svou replikaci. Primární virus po translaci svého genomu vytváří komplex se svými proteiny, který se váže na omezené hostitelské faktory zajišťujícími replikaci (Adams and Brown, 1985).

U buněčných kultur komára *Aedes albopictus* persistentně infikovaných Sindbis virem bylo pozorováno nejen vyloučení superinfikujícího Sindbis viru, ale také dalších členů rodu *Alphavirus*. To bylo potvrzeno testováním vyloučení superinfekce na nejvzdáleněji příbuzných zástupcích tohoto rodu – Semliki forest viru, Ross River viru a Aura viru (Karpf *et al.*, 1997). V liniích persistentně infikovaných virem Sindbis byla produkce virových partikulí superinfikujícího Sindbis viru o 5 řádů nižší než u infikování zdravých buněčných linií stejnou virovou dávkou. U testování vyloučení superinfekce na ostatních členech rodu byla produkce superinfekčních virů také snižena, tentokrát byly výtěžky nižší o 2 až 5 řádů, což značí téměř stejnou míru vyloučení jako u superinfekce Sindbis virem. Co se týče mechanismu vyloučení superinfekce, studie provedená Karpfem *et al.* (1997) potvrzuje výsledky předchozích prací. A sice, že vyloučení superinfekce probíhá pomocí omezení v replikačním kroku superinfekce.

Pravděpodobně se toto vyloučení děje pomocí nestrukturní virové proteázy nsP2, která štěpí nestrukturní prekurzor P123 nutný pro replikaci -ssRNA, která slouží jako templát potřebný pro další replikaci virových genomů. Po ustálení primární infekce, kdy je nasyntetizována -ssRNA, dochází k produkci proteázy nsP2 štěpící prekurzor P123. Tato proteáza tedy jakoukoliv další syntézu minus řetězců primárním virem, ale i virem superinfikujícím, v buňce znemožňuje. Mimo zabránění replikaci je tento štěpící mechanismus pravděpodobně zodpovědný i za snížení množství produkovaných virových partikulí primárního viru po ustálení superinfekce. Proč k vyloučení superinfekce u buněk infikovaných Sindbis virem dochází napříč celým rodem *Alphavirus* se dá vysvětlit velkou shodou aminokyselinových sekvencí v nestrukturních proteinech všech zástupců, konkrétně Sindbis a Aura virus mají 73% shodu v aminokyselinové sekvenci nestrukturních proteinů a mezi Sindbis virem a Semliki forest virem je tato shoda 63% (Karpf *et al.*, 1997).

4.2.1.2. Semliki forest virus

U Semliki forest viru (SFV) bylo popsáno více způsobů vyloučení superinfekce (Lee *et al.*, 2005). U SFV se jedná také o časný mechanismus vyloučení superinfekce, který nastupuje již 15 minut po infekci jako například u viru Sindbis (Adams and Brown, 1985; Johnston *et al.*, 1974). Navíc se objevují i pozdní mechanismy ustalující se po 3 a 6 hodinách od primární infekce. Prvně se objevující blok v superinfekci je na úrovni zabránění replikace

superinfikujícího viru a může být překonán, pokud je přidán sekundární virus s vysokou multiplicitou infekce.

S postupnou progresí primární infekce se objevují i další mechanismy, které brání superinfekci. Tentokrát už bez možnosti superinfikujícího viru je překonat jeho vysokými dávkami. Jedná se o zablokování superinfekce v kroku vazby viru na buňku (3 hodiny po infekci), penetrace nukleokapsid do cytoplasmy a také rozbalování nukleokapsid (6 hodin po infekci) (Singh *et al.*, 1997).

Snížená schopnost vazby superinfikujícího viru na buněčné receptory je dána jejich obsazením nově produkovanými povrchovými glykoproteiny primárního viru. Ale podobného poklesu vazby superinfikujícího viru na receptory bylo dosaženo i přidáním povrchových proteinů viru vezikulární stomatitidy, což naznačuje, že tento mechanismus není specifický pouze pro proteiny SFV (Singh *et al.*, 1997).

Další blokování superinfekčního viru bylo popsáno v kroku penetrace virových nukleokapsid z endozómu do cytoplasmy. SFV může fúzovat pouze s membránou časného endozómu a zdá se, že nukleokapsidy nemohly být z váčku uvolněny právě kvůli jeho vyššímu pH, než je v časných endozómech zdravých buněk. Pro konformační změny povrchových glykoproteinů SFV umožňující fúzi membrán je totiž nutné pH nižší než 6,2. Nakonec bylo pozorováno i selhání rozbalení virových kapsid superinfikujícího viru, které však nebylo doposud vysvětleno (Singh *et al.*, 1997).

4.2.1.3. Rubella

U viru zarděnek bylo vyloučení superinfekce také pozorováno, avšak zatím nejsou jasné jeho mechanismy. K dnešnímu dni existují jen teorie, jak by potenciálně k vyloučení mohlo docházet. Přesný mechanismus je třeba prozkoumat.

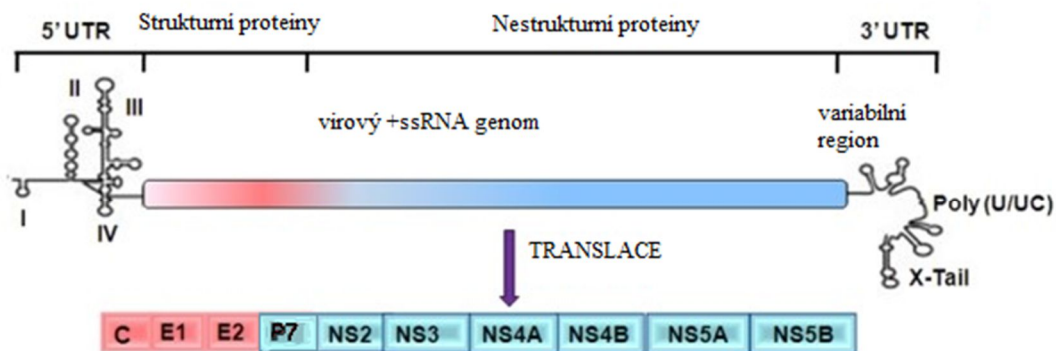
Bylo popsáno, že k vyloučení dochází až po vstupu superinfikujícího viru do buňky a je pro něj nutná replikace genomu primárního viru. Vyloučení superinfekce je zprostředkováno pravděpodobně nestrukturními proteiny. V infikované buňce ještě dochází k translaci genomu superinfekčního viru, ale k expresi strukturních proteinů již nedojde stejně jako u viru Sindbis (Adams and Brown, 1985). Pro vyloučení superinfekce u viru zarděnek je stejně jako pro Sindbis virus možná hypotéza, že k bloku vyloučení dochází působením nestrukturního proteinu PS2 proteázy ustáleného viru, která štěpí prekurzory nestrukturních proteinů superinfikujícího viru. Neproběhne tedy syntéza komplementárního -ssRNA řetězce superinfikujícího viru (Karpf *et al.*, 1997). Hypotézu se však doposud nepodařilo ověřit (Claus *et al.*, 2007).

4.2.2. Flaviviridae

Viry z čeledi *Flaviviridae* jsou obalené viry s +ssRNA genomem. Dělíme je do čtyř rodů. Rod *Flavivirus* zahrnuje například virus žluté zimnice, West Nile virus a virus horečky Dengue, obecně se jedná o viry způsobující řadu lidských onemocnění. Do rodu *Hepacivirus* řadíme další lidský patogen, virus hepatitidy C. Rody *Pestivirus* a *Pegivirus* napadají především zvířata, přičemž rod *Pegivirus* zatím nebyl spojen s žádným onemocněním (Simmonds *et al.*, 2017).

4.2.2.1. Hepatitida C

Virus hepatitidy C (HCV) je obalený virus s nesegmentovaným pozitivně orientovaným ssRNA genomem, patří mezi rod *Hepacivirus* z čeledi *Flaviviridae* (Simmonds *et al.*, 2017). HCV je lidský patogen, který vyvolává persistentní infekce a způsobuje chronické onemocnění jater, následně může vyústit až v hepatocelulární karcinom. Rozlišujeme 6 přirozeně se vyskytujících genotypů HCV. Velikost genomu je 8,6 kb, jeho translace je iniciována v IRES na 5'konci genomu (Wang *et al.*, 2003) a vede k produkci zhruba 3000 aminokyselin dlouhého polyproteinu, který je následně virovými a hostitelskými proteázami rozstříhán na jednotlivé strukturální a nestrukturální proteiny (Obrázek 4). Mezi strukturální proteiny patří C, E1 a E2 protein. Nestrukturální proteiny jsou p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B (Grakoui *et al.*, 1993).



Obrázek 4: Schéma polyproteinu viru hepatitidy C

Genom HCV je tvořen 3 strukturálními proteiny (C, E1 a E2) a sedmi nestrukturálními (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B). Převzato a upraveno podle Banerjee *et al.*, 2010.

Pro umožnění superinfekce v buněčných kulturách infikovaných HCV jsou důležité mutace v E1, p7, NS5A a polyU 3'konci netranslatované RNA, které nejen že umožňují HCV překonat vyloučení superinfekce, ale zároveň i výrazně zvyšují infekčnost viru při primární

infekci (Schaller *et al.*, 2007). Virus vstupuje do buňky díky interakci E2 proteinu s buněčným povrchovým receptorem CD81 (Pileri *et al.*, 1998) a se scavenger receptorem BI (Bartosch *et al.*, 2003). Díky tomu, že je virový genom v podobě + ssRNA, může rovnou po vstupu do buňky začít translaci genomu a exprese virových proteinů.

U viru hepatitidy C byla pozorována schopnost vyloučení superinfekce napříč různými genotypy tohoto viru – u akutní infekce řetězci J6/JFH odvozenými od HCV genotypu 2a, i v buňkách obsahujících celogenomové a subgenomické replikony odvozené od 1a,1b a 2a genomu (Tscherne *et al.*, 2007). Pro snadné rozlišení virů pocházejících z primární a sekundární infekce se do kódující sekvence proteinu NS5A viru vkládají sekvence kódující fluorescenční proteiny, například GFP nebo RFP (Tscherne *et al.* 2007; Webster *et al.* 2013).

V buňkách koinfikovaných dvěma různě označenými viry hepatitidy C současně, je sice možné sledovat replikaci obou virů u zhruba 18 % všech buněk, ale i tak většinou v buňce převládají produkty jednoho viru nad druhým. Avšak když jsou infekce danými typy viru prováděny po 24 hodinách, je sekundární infekce silně oslabena, takže k výskytu dvou virů v jedné buňce prakticky nedochází, pozitivní jsou pouze 2 % buněk (Schaller *et al.*, 2007). To naznačuje, že k procesům zajišťujícím vyloučení superinfekce dochází již do 24 hodin po primární infekci. Pravděpodobně však tato schopnost nastává ještě dříve – kolem 4 hodin po infekci. Z velmi nízkého zastoupení dvojitě infikovaných buněk lze také vyvodit, že vyloučení superinfekce je velmi silný mechanismus, ale blokáce není absolutní (Schaller *et al.*, 2007). Vyloučení superinfekce u HCV by teoreticky bylo možné na několika úrovních, a to jak na úrovni vstupu viru do buňky, translace a replikace RNA, tak i ve fázi skládání nových virových partikulí. Proto se při experimentech zaměřených na popsání mechanismů vyloučení superinfekce musí prozkoumávat a případně vyloučit každá z těchto cest.

CD81 a SR-BI jsou buněčné povrchové molekuly, které prokazatelně hrají roli při vstupu HCV do buněk (Koutsoudakis *et al.*, 2007). Vstup sekundárního viru do buňky je primární infekcí neovlivněn, neboť nebyl pozorován signifikantní pokles exprese CD81, ani scavenger receptoru SR-BI na povrchu HCV infikovaných buněk, ani jejich zablokování virovými produkty. Po infekci buněk HCV nebyly pozorovány žádné změny v povrchové hustotě těchto molekul, což vylučuje vyloučení superinfekce na úrovni vstupu, alespoň po dobu 120 h po infekci (Schaller *et al.*, 2007). Pokud se děje vyloučení superinfekce později než po 120 hodinách, děje se tak nejspíše kvůli postupné selekci buněk odolávajících cytopatickému efektu HCV. Ani role koreceptorů v dalších krocích vstupu viru do buňky nebyla prokázána.

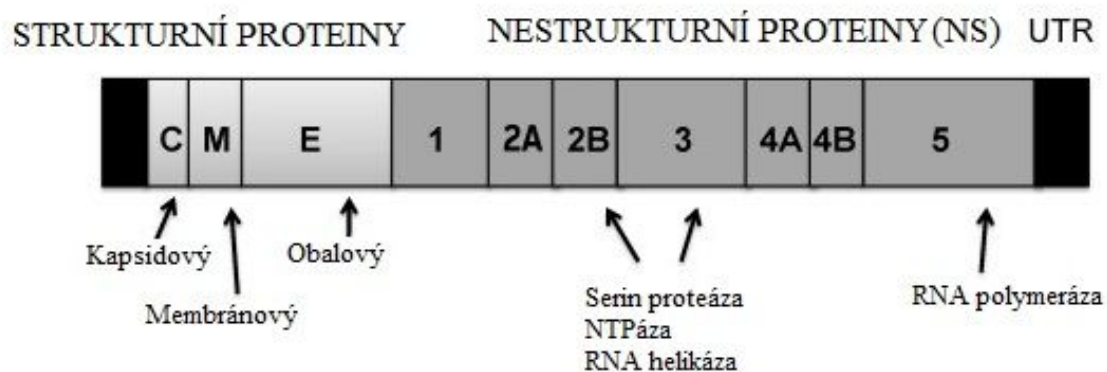
K vyloučení superinfekce u HCV tedy dochází až za úrovní vstupu do buňky a uvolnění genomu z kapsidy. Pro studium interference na úrovni translace a replikace se použily luciferázou značené buňky, na kterých bylo možné sledovat RNA replikaci a expresi proteinů. U infikovaných buněk byla po 24 hodinách pozorována desetkrát slabší luciferázová aktivita než u buněk kontrolních. Z toho se usuzuje, že primární krok blokace superinfekčního viru nastává na úrovni translace, a to díky interferenci primárních virů s přicházející RNA viru sekundárního. Primární replikon má oproti nově přichozímu výhodu v kompetenci o limitované buněčné zdroje umožňující replikaci. Vyloučení superinfekce probíhá tedy částečně již na úrovni RNA translace, ale předpokládá se, že další roli hraje i vyloučení superinfekce během replikace. Podobně i bovinní virová diarea (BVDV) má blok superinfekce popsáný na úrovni replikace (Lee *et al.*, 2005). Jisté však již je, že k vyloučení superinfekce jsou důležité oblasti genomu kódující protein NS5A. Schopnost vyloučení superinfekce v buňkách infikovaných HCV vymizela, pokud byla provedena bodová mutace C2274R v NS5A a delece v poly (U/UC) místě netranslatované oblasti (3'UTR) (Webster *et al.*, 2013). Z doposud publikovaných prací vyplývá, že vyloučení superinfekce sekundárním virem je pravděpodobně způsobené omezenými buněčnými zdroji potřebnými k replikaci a virovou kompetencí o ně. Ačkoliv přesný mechanismus působení vyloučení superinfekce nebyl dostatečně detailně prostudován, už jen znalost, že k blokaci sekundární infekce dochází někde na úrovni translace a replikace je zcela zásadní. Objevení a popsání limitujícího buněčného faktoru podílejícího se na vyloučení superinfekce, by mohlo vést k pochopení regulačních mechanismů replikace HCV, následné možnosti snížení replikační rychlosti v životním cyklu HCV (Webster *et al.*, 2013) a mohlo by být využito jako vhodný cíl v terapii HCV (Schaller *et al.*, 2007).

4.2.2.2. West Nile virus

West Nile virus (WNV) je členem rodu *Flavivirus*, z čeledi *Flaviviridae*. Virus je přenášen moskyty a hostitelem jsou ptáci, ale může se přenášet i na lidi. Přenos na člověka byl zaznamenán především u komárů rodu *Culex*. Ačkoliv je průběh infekce WNV v 80% případů asymptomatický, může dojít i k symptomatickému onemocnění tzv. Západonilské horečky a zhruba u jednoho ze 150 infikovaných virus přechází do nervového systému. Od svého prvního objevení v Ugandě roku 1936 způsobil několik epidemií v Evropě, Asii a Austrálii. V roce 1999 se dostal poprvé do Severní Ameriky, kde vyvolal epidemii v New Yorku. Od té doby způsobil ve Spojených státech Amerických 3 největší epidemie

neuroinvasivních onemocnění a stal se nejčastějším původcem meningoencefalitidy v Severní Americe (shrnutí v review Petersen *et al.*, 2013).

Virus do buněk vstupuje endocytózou zprostředkovanou receptorem. Z endozómu se virus dostane díky pH indukovaným změnám E proteinu a fúzí s membránou vaku. Do cytoplasmy se uvolní genomová RNA. Ta slouží jako mRNA pro translaci a templát pro transkripci komplementárního minus RNA řetězce pro syntézu nových virových genomů. K replikaci dochází v cytoplasmě. Virová RNA je translatována do jednoho polyproteinu, který je následně rozstříhán hostitelskými proteázami na deset proteinů (Obrázek 5). Jedná se o tři strukturální (C, prM, E) a sedm nestrukturních (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b a NS5) (shrnutí v review Colpitts *et al.*, 2012).



Obrázek 5: Schéma polyproteinu West Nile Viru

Polyprotein je tvořen třemi strukturálními proteiny (C, M a E) a sedmi nestrukturními (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b a NS5). Převzato a upraveno podle Filette *et al.*, 2012.

Nestrukturní proteiny mají mnoho různých funkcí a jednou z nich by mohlo být i vyloučení superinfekce. Jelikož pro WNV zatím existuje jen symptomatická léčba, je důležité pochopit konkrétní dráhy v průběhu infekce a zda mechanismy vyloučení superinfekce mohou být potenciálním cílem antivirotik.

Pro West Nile virus, stejně jako HCV, byl vyloučen jakýkoliv mechanismus nastolení rezistence k superinfekci v kroku vstupu viru do buňky. K vyloučení superinfekce dochází až v kroku syntézy RNA a to pravděpodobně z důvodu virové kompetence o buněčné zdroje, podobně jako u HCV (Webster *et al.*, 2013). Pro vyloučení superinfekce u WNV je důležitá produkce několika proteinů. Jedná se jak o strukturální (E a prM), tak i o nestrukturní (NS4 a 2K) proteiny. Mutace v genech kódujících tyto proteiny vedly ke ztrátě schopnosti vylučovat superinfekci. Konkrétně se jednalo o substituci z E na K na aminokyselinové pozici 138 E proteinu, změnu v oblasti S90R prM proteinu, dále mutaci K124R v NS4 a mutaci V9M 2K

peptidu (Zou *et al.*, 2009). Vyloučení superinfekce lze u WNV zvrátit použitím replikonů s antivirovou složkou, což také znovu potvrzuje, že se opravdu jedná o virový mechanismus vyloučení superinfekce, nikoliv o buněčnou reakci (Zou *et al.*, 2009). Pro WNV byla také navržena další možnost vylučování superinfekce, ke které by docházelo až v kroku skládání nových virových partikulí, avšak zatím nebyla dostatečně prostudována.

Při infekci WNV dochází k vyloučení superinfekce, nejen tím samým virem, ale také superinfekce způsobené ostatními členy čeledi *Flaviviridae*. Vyloučení je nejvýraznější u blízce příbuzných členů rodu *Flavivirus*, jako například u viru St. Louis encephalitis. U viru horečky Dengue a viru žluté zimnice, které jsou vzdáleněji příbuzné, je vyloučení také patrné, nicméně je o něco slabší než u viru St. Louis encephalitis (Zou *et al.*, 2009).

Vyloučení superinfekce by mohlo být potenciální nepřímou ochranou proti infekci členy rodu *Flavivirus* způsobujícími onemocnění u člověka, včetně výše zmiňovaného WNV. Tato ochrana by probíhala přes virový vektor, kterým jsou komáři rodu *Culex*. Bylo totiž zjištěno, že u komárů *Culex quinquefasciatus* a *Culex pipens* infikovaných Nhumirim virem (NHUM), což je výhradně virus bezobratlých živočichů, je zhruba desetitisíckrát snižena šance následné infekce WNV. V 9 dnech po infekci byla u virů z buněk koinfikovaných NHUM a WNV navíc pozorována 40% redukce schopnosti přenášet nové viriony na další buňky (Goenaga *et al.*, 2015). Takové vyloučení superinfekce pomocí infekce komárů výhradně hmyzími příslušníky rodu *Flavivirus* je nyní široce studováno a do budoucna přináší velký potenciál prevence přenosu WNV, ale i jiných virů napadajících člověka.

4.2.2.3. Bovine Viral Diarrhea Virus

Virus bovinní diarey (BVDV) patří do čeledi *Flaviviridae*, stejně jako WNV a HCV. Konkrétně řadíme BVDV do rodu *Pestivirus*, u kterého byl popsán dvojitý mechanismus vyloučení superinfekce (Lee *et al.*, 2005). Jeden mechanismus vyloučení je na úrovni vstupu viru do buňky, respektive v nějakém z kroků předcházející translaci, a druhý během replikace virového genomu.

Vyloučení superinfekce nastává u BVDV během 30 až 60 minut po infekci primárním virem, ale postupným pasážírováním persistentně infikovaných buněk má tendenci se ztrácet, pravděpodobně vlivem adaptace buněk na infekci. K úplné ztrátě schopnosti vyloučení superinfekce však nedochází, jeho zbytky se objevují i ve 20 pasáží, ale mnohonásobně slabší než na počátku.

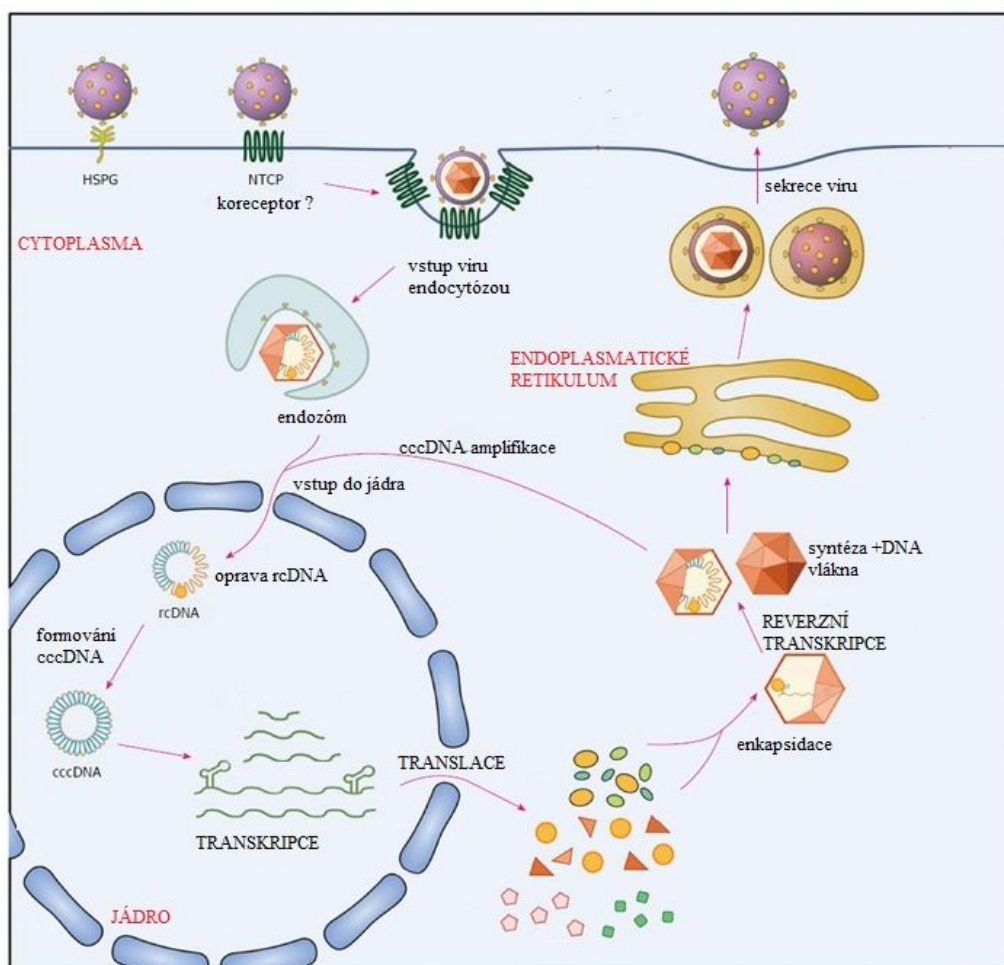
Superinfikující virus selhává v běžných podmínkách ihned ve fázi dopravení svého genomu do infikované buňky, tedy během vstupu viru, než dojde k translaci jeho genomu. Za

vyloučení ihned v úrovni vstupu viru do buňky je zodpovědný obalový strukturní glykoprotein E2. Avšak ani když byl glykoprotein E2 vyřazen, nedocházelo k amplifikaci genomu superinfikujícího viru. Když byl blok v E2 uměle překročen transfekcí virovou RNA do infikovaných buněk, byl objeven i další mechanismus vyloučení superinfekce na úrovni replikace genomu superinfikujícího viru. Při tomto zablokování superinfekce bylo zjištěno, že čím více RNA primárního viru bylo replikováno, tím menší byla replikace sekundárního viru (Lee *et al.*, 2005).

4.2.3. Hepatitida B

Virus hepatitidy B patří mezi *Hepadnaviridae*, což je čeleď obalených virů s dsDNA genomem uchovaným v ikosahedrální kapsidě. Tento virus využívá pro svou replikaci reverzní transkripci. Viry z této čeledi napadají hostitele jak z řad savců, tak také ptáků. Virus hepatitidy B je u člověka nejčastějším původcem virové žloutenky. Podobně jako u HCV i zde může docházet při chronickém onemocnění k cirhóze jater a rozvoji hepatocelulárního karcinomu.

Infekce začíná přichycením viru k receptoru na buněčném povrchu. Receptorem pro vstup viru do buňky je karboxypeptidáza D (Tong *et al.*, 1999). Virus do buňky vstupuje prostřednictvím endocytózy. Poté dochází k uvolnění nukleokapsid, které jsou transportovány do blízkosti jaderné membrány. Transport je zprostředkován jaderným lokalizačním signálem přítomným na kapsidovém proteinu (Eckhardt *et al.*, 1991). Do buněčného jádra je dále uvolněna virová DNA, která je transkribována hostitelskou polymerázou. Transkripty jsou transportovány do cytoplasmy, kde dochází k translaci virových proteinů. Zároveň je virová DNA transkribována do podoby pregenomové RNA, která slouží jako templát pro reverzní transkripci. Pregenomová RNA je spolu s virovou polymerázou zabalena do nových virových kapsid, kde dochází k reverzní transkripci (shrnutí v review Seeger and Mason, 2000) (Obrázek 6).



Obrázek 6: Replikační cyklus HBV

Virus vstupuje do buňky receptorem zprostředkovanou endocytózou. Virový rcDNA genom vstupuje do jádra, kde je opraven na cccDNA formu, která slouží jako templát pro transkripci virové mRNA. mRNA je dále translatována a v cytoplasmě se vytváří nové virové kapsidy. V nich je reverzní transkripcí genom přepsán na dsDNA. Obalené kapsidy jsou uvolněny z buňky. Převzato a upraveno podle Kim *et al.*, 2016.

Ke studiu vyloučení superinfekce je využíván blízce příbuzný kachní virus DHBV. K vyloučení superinfikujícího viru nedochází u DHBV ihned po inokulaci, ale až po delší době od přidání virového inokula k buněčným kulturám. Řádově se jedná o dny (5 dní). Při infekci dvěma typy viru totiž docházelo ke koinfekci. Pomalý nástup obranného mechanismu nasvědčuje, že virus není schopen vyvolat v buňce rychlé změny ihned po vstupu, ale pro vyloučení vyžaduje určitou hladinu exprese virových genů, soudě dle času nástupu bloku v superinfekci, především pozdních proteinů (Walters *et al.*, 2004).

Vyloučení superinfekce je tedy závislé na genové expresi virových proteinů. K tomuto zjištění přispívá to, že při použití UV ozářeného viru nedošlo k vyloučení superinfekce

sekundárním virem. Vystavení viru UV záření, vede totiž ke „cross-linking“ DNA, který brání translaci (Walters *et al.*, 2004).

Konkrétně bylo vyloučení superinfekce připsáno velkému povrchovému antigenu (L antigen), který je exprimován právě v době jejího nástupu. Tento protein může snižovat koncentraci virového receptoru karboxypeptidázy D na buněčném povrchu, proto se jako možný mechanismus vyloučení nejprve jevílo snížení hladiny receptoru nutného pro vazbu viru na buňku (Breiner *et al.*, 2001). Avšak při použití viru s mutací v sekvenci L antigenu, který nereguloval hladinu karboxypeptidázy D, stále docházelo k vyloučení superinfekce. Z toho se usuzuje, že snížení hladiny karboxypeptidázy D není nutné pro vyloučení superinfekce. Navíc pro mechanismus vylučující superinfekci již v kroku vazby viru na receptor nenasvědčuje ani fakt, že vyloučení superinfekce nekoreluje s hladinou karboxypeptidázy D. Pravděpodobně tedy k vyloučení superinfekce dochází až po vazbě a vstupu sekundárního viru do buňky, což bylo podpořeno i výsledky studie prováděné Waltersem *et al.* (2004). Z jejich experimentů používajících lamivudin pro inhibici virové replikace vyplývá, že pro vyloučení není replikace nutná, stačí pouze genová exprese ze zásob jaderné cccDNA. V časných fázích po vstupu viru do buňky se totiž uvolňuje z nukleokapsid virová cccDNA, která slouží jako zásobárna („pool“) pro amplifikaci L antigenu, kterým jsou zásoby cccDNA negativně regulovány. Když je hladina L antigenu dostatečně vysoká, dojde ke sbalování nových infekčních partikulí a zároveň hladina L antigenu brání ve vytvoření cccDNA zásobárny sekundárního viru.

Vyloučení superinfekce u HBV má dopady na využití HBV jako vektoru pro antivirovou terapii, kdy rekombinantní virus nemusí být schopen úspěšně exprimovat terapeutický gen v důsledku výše zmíněného mechanismu vyloučení (Walters *et al.*, 2004).

4.2.4. Virus vezikulární stomatitidy

Virus vezikulární stomatitidy (VSV) je obalený -ssRNA virus z čeledi *Rhabdoviridae*, rod *Vesiculovirus*. Jedná se o virus způsobující zoonózy. Je přenosný na člověka, u kterého se projevuje příznaky lehkého nachlazení. I u tohoto viru bylo pozorováno vyloučení superinfekce, avšak jeho přesný mechanismus zůstává neobjasněn.

Bylo ukázáno, že vyloučení superinfekce u VSV probíhá po vstupu superinfikujícího viru do buňky. Konkrétně primární ustálená virová infekce zabraňuje replikaci sekundárního viru. Byla navržena hypotéza, že k replikaci genomu sekundárního viru nedochází díky tomu, že buněčný aparát upřednostňuje kratší virové RNA, které jsou obsaženy v defektních partikulích primárního viru vznikajícími jako vedlejší produkt probíhající infekce (Prevec and

Kang, 1970). Vyloučení by se tedy dělo díky konkurenci virových genomů o buněčné zdroje nutné k replikaci, přičemž primární, již ustálený virus by měl nad superinfikujícím výhodou. Díky produkování kratších neinfekčních genomových RNA primárního viru, by docházelo k vyčerpání buněčných zdrojů pro replikaci (převzato z Johnston *et al.*, 1974). Zda je vyloučení superinfekce u VSV vážně způsobeno konkurencí o buněčné zdroje k replikaci, však musí být ještě dále objasněno.

5. Závěr

Z široké škály virů, na kterých bylo vyloučení superinfekce doposud popsáno, je patrné, že se jedná o důležitý virový mechanismus, který zajišťuje virům vhodné podmínky pro replikaci a co největší počet virového potomstva. Zároveň vyloučení superinfekce poskytuje virům ochranu stability jejich genomu a zabraňuje příliš časté rekombinaci mezi viry.

Častým způsobem vyloučení superinfekce je regulace syntézy a dopravování buněčných povrchových receptorů (Garcia and Miller, 1991; Aiken *et al.*, 1994; Hrecka *et al.*, 2005; Michel *et al.*, 2005; Wildum *et al.*, 2006). Dále viry zabraňují přichycení svých konkurentů na buňku obsazením vazebných míst na buněčných receptorech (Criddle *et al.*, 2016; Geraghty *et al.*, 2000), nebo jejich degradací (Horga *et al.*, 2000; Morrison and McGinnes, 1989; Moscona and Peluso, 1991; Huang *et al.*, 2008). Po vstupu superinfekčního viru do buňky existují zábrany na mnoha dalších úrovních. Ať již se jedná o znemožnění fúze viru s membránou endozómů, zablokování rozbalování nukleokapsid, blok v translaci (Walters *et al.*, 2004) či replikaci (Lee *et al.*, 2005; Schaller *et al.*, 2007; Zou *et al.*, 2009; Webster *et al.*, 2013). Přehled mechanismů vyloučení superinfekce a virů, u kterých byl popsán je uveden v tabulce číslo 1.

Zkrátka řečeno, mechanismů, kterými dochází k vyloučení superinfekce, je celá škála a pravděpodobně existují i další, které nebyly dodnes objeveny a popsány. Důkladnější studium by bylo vhodné zejména u heterologní interference, kde jsou zatím poznatky znatelně slabší, i když by mohly pomoci v řadě odvětví. Ať již se jedná o předpovídání virových epidemií, díky korelacím mezi sezónními epidemiemi respiračních onemocnění, nebo například diagnostiku. Dnes se například vyloučení superinfekce běžně využívá při diagnostice viru zarděnek.

Další zkoumání fenoménu virových interferencí a vyloučení superinfekce se jeví jako zajímavé, nejen z důvodu objasnění, jak fungují dodnes málo prozkoumané interakce mezi viry, ale také pro svůj potenciál využití poznatků o konkrétních mechanismech vyloučení superinfekce a účasti jednotlivých virových proteinů na nich k vývoji nových antivirotik. Vyloučení superinfekce se tedy jeví jako vhodná oblast budoucího studia, nejen pro virology, ale také epidemiology, diagnostiky a farmakology.

Tabulka 1: Shrnutí mechanismů vyloučení superinfekce u jednotlivých virů

NDV – virus Newcastleké choroby, HSV-1 – herpes simplex virus 1, PRV – pseudorabies virus, SFV – Semliki forest virus, BVDV – virus bovinní diarey, VSV – virus vezikulární stomatitidy.

krok zablokování	genom	čeleď	virus	mechanismus	protein
Vazba na receptor	-ssRNA	<i>Paramyxoviridae</i>	Parainfluenza typ 3	Destrukce receptoru	NA
			Sendai		
			NDV		
		<i>Orthomyxoviridae</i>	Influenza A	HN	
	ssRNA s reverzní transkripcí	<i>Retroviridae</i>	Virus lidské imunodeficiency	snížení exprese receptoru	gp160 Nef Vpu
dsDNA	<i>Herpesviridae</i>	HSV-1	zablokování vazebných míst receptoru	gD	
		Pseudorabies			
+ssRNA	<i>Togaviridae</i>	Semliki forest virus		povrchové glykoproteiny	
Fúze s buněčnou membránou	dsDNA	<i>Poxviridae</i>	Vakcinie	zablokování fúzního komplexu	A33 A36 A56 K2
Replikace	+ssRNA	<i>Togaviridae</i>	Aura virus	obsazení většiny buněčných zdrojů pro replikaci	nsP2
			Ross River virus		
			Sindbis virus		
			SFV		
			Rubella virus		
			Hepatitida C	kompetice o buněčné zdroje	gen NS5A
		<i>Flaviviridae</i>	Virus Západonilské horečky		E prM NS4 2K
		BVDV	E2		
-ssRNA	<i>Rhabdoviridae</i>	VSV			

6. Seznam použité literatury

- Adams, R. H. and Brown, D. T. 1985. "BHK Cells Expressing Sindbis Virus-Induced Homologous Interference Allow the Translation of Nonstructural Genes of Superinfecting Virus." *Journal of Virology* 54 (2): 351–57.
- Afonso, C. L., Amarasinghe, G. K., Bányai, K., Bào, Y., Basler, Ch. F., Bavari, S., Bejerman, N., Blasdel, K. R., Briand, F.-X., Briese, T., Bukreyev, A., Calisher, Ch. H., Chandran, K., Chéng, J., Clawson, A. N., Collins, P. L., Dietzgen, R. G., Dolnik, O., Domier, L. L. et al. 2016. "Taxonomy of the Order Mononegavirales: Update 2016." *Archives of Virology* 161 (8): 2351–60.
- Aiken, C., Konner, J., Landau, N. R., Lenburg, M. E. and Trono, D. 1994. "Nef Induces CD4 Endocytosis: Requirement for a Critical Dileucine Motif in the Membrane-Proximal CD4 Cytoplasmic Domain." *Cell* 76 (5): 853–64.
- Baluda, M. A. 1957. "Homologous Interference by Ultraviolet-Inactivated Newcastle Disease Virus." *Virology* 4 (1): 72–96.
- Banerjee, A., Ray, R. B. and Ray, R. 2010. "Oncogenic Potential of Hepatitis C Virus Proteins." *Viruses* 2 (9): 2108–33.
- Bartosch, B., Vitelli, A., Granier, Ch., Goujon, C., Dubuisson, J., Pascale, S., Scarselli, E., Cortese, R., Nicosia, A. and Cosset, F. 2003. "Cell Entry of Hepatitis C Virus Requires a Set of Co-Receptors That Include the CD81 Tetraspanin and the SR-B1 Scavenger Receptor." *The Journal of Biological Chemistry* 278 (43): 41624–30.
- Bratt, M. A. and Rubin, H. 1967. "Specific Interference among Strains of Newcastle Disease Virus: I. Demonstration and Measurement of the Interference." *Virology* 33 (4): 598–608.
- Bratt, M. A. and Rubin, H. 1968a. "Specific Interference among Strains of Newcastle Disease Virus: III. Mechanisms of Interference." *Virology* 35 (3): 395–407.
- Bratt, M. A. and Rubin, H. 1968b. "Specific Interference among Strains of Newcastle Disease Virus. II. Comparison of Interference by Active and Inactive Virus." *Virology* 35 (3): 381–94.

- Breiner, K. M., Urban, S., Glass, B. and Schaller, H. 2001. "Envelope Protein-Mediated down-Regulation of Hepatitis B Virus Receptor in Infected Hepatocytes." *Journal of Virology* 75 (1): 143–50.
- Campbell, E. M., Nunez, R. and Hope, T. J. 2004. "Disruption of the Actin Cytoskeleton Can Complement the Ability of Nef To Enhance Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infectivity" *Journal of Virology* 78 (11): 5745–55.
- Claus, C., Tzeng, W. P., Liebert, U. G. and Frey, T. K. 2007. "Rubella Virus-Induced Superinfection Exclusion Studied in Cells with Persisting Replicons." *Journal of General Virology* 88 (10): 2769–73.
- Colpitts, T. M., Conway, M. J., Montgomery, R. R. and Fikrig, E. 2012. "West Nile Virus: Biology, Transmission, and Human Infection." *Clinical Microbiology Reviews* 25 (4): 635–48.
- Costa-Hurtado, M., Afonso, C. L., Miller, P. J., Spackman, E., Kapczynski, D. R., Swayne, D. E., Shepherd, E., Smith, D., Zsak, A. and Pantin-Jackwood, M. 2014. "Virus Interference between H7N2 Low Pathogenic Avian Influenza Virus and Lentogenic Newcastle Disease Virus in Experimental Co-Infections in Chickens and Turkeys." *Veterinary Research* 45 (1): 1–11.
- Criddle, A., Thornburg, T., Kochetkova, I., DePartee, M. and Taylor, M. P. 2016. "gD-Independent Superinfection Exclusion of Alpha herpesviruses." *Journal of Virology* 90 (8): 4049–58.
- Crowley, R. W., Secchiero, P., Zella, D., Cara, A., Gallo, R. C. and Lusso, P. 1996. "Interference between Human Herpesvirus 7 and HIV-1 in Mononuclear Phagocytes." *J Immunol* 156 (5): 2004–8.
- Doceul, V., Hollinshead, M., Linden, L. Van Der and Smith, G. L. 2010. "Repulsion of Superinfecting Virions: A Mechanism for Rapid Virus Spread." *Science* 327 (5967): 873–76.
- Eckhardt, S. G., Milich, D. R. and McLachlan, A. 1991. "Hepatitis B Virus Core Antigen Has Two Nuclear Localization Sequences in the Arginine-Rich Carboxyl Terminus." *Journal*

of Virology 65 (2): 575–82.

Fackler, O. T., Luo, W., Geyer, M., Alberts, A. S. and Peterlin, B. M. 1999. “Activation of Vav by Nef Induces Cytoskeletal Rearrangements and Downstream Effector Functions.” *Molecular Cell* 3 (6): 729–39.

Filette, M. De, Ulbert, S., Diamond, M. and Sanders, N. N. 2012. “Recent Progress in West Nile Virus Diagnosis and Vaccination.” *Veterinary Research* 43 (1): 16.

Garcia, J. V. and Miller, A. D. 1991. “Serine Phosphorylation-Independent Downregulation of Cell-Surface CD4 by Nef.” *Nature* 350 (5): 508.

Geraghty, R. J., Jogger, Ch. R. and Spear, P. G. 2000. “Cellular Expression of Alphaherpesvirus gD Interferes with Entry of Homologous and Heterologous Alphaherpesviruses by Blocking Access to a Shared gD Receptor.” *Virology* 268 (1): 147–58.

Goebel S. J., Johnson G. P., Perkus M.E., Davis S. W., Winslow J. P., Paoletti E. 1990. “The complete DNA sequence of vaccinia virus.” *Virology* 179 (1): 247-66.

Goenaga, S., Kenney, J. L., Duggal, N. K., Delorey, M., Ebel, G. D., Zhang, B., Levis, S. C., Enria, D. A. and Brault, A. C. 2015. “Potential for Co-Infection of a Mosquito-Specific Flavivirus, Nhumirim Virus, to Block West Nile Virus Transmission in Mosquitoes.” *Viruses* 7 (11): 5801–12.

Grakoui, A., Wychowski, C., Lin, C., Feinstone, S. M. and Rice, C. M. 1993. “Expression and Identification of Hepatitis C Virus Polyprotein Cleavage Products.” *Journal of Virology* 67 (3): 1385–95.

Greenberg, M., DeTulleo, L., Rapoport, I., Skowronski, J. and Kirchhausen, T. 1998. “A Dileucine Motif in HIV-1 Nef Is Essential for Sorting into Clathrin-Coated Pits and for Downregulation of CD4.” *Current Biology* 8 (22): 1239-S3.

Horga, M. A., Gusella, G. L., Greengard, O., Poltoratskaia, N., Porotto, M. and Moscona, A. 2000. “Mechanism of Interference Mediated by Human Parainfluenza Virus Type 3 Infection.” *Journal of Virology* 74 (24): 11792–99.

- Hrecka, K., Swigut, T., Schindler, M., Kirchhoff, F. and Skowronski, J. 2005. "Nef Proteins from Diverse Groups of Primate Lentiviruses Downmodulate CXCR4 to Inhibit Migration to the Chemokine Stromal Derived Factor 1." *Journal of Virology* 79 (16): 10650–59.
- Huang, I-C., Li, W., Sui, J., Marasco, W., Choe, H. and Farzan, M. 2008. "Influenza A Virus Neuraminidase Limits Viral Superinfection." *Journal of Virology* 82 (10): 4834–43.
- Chen, B. K. and Gandhi, R. T. 1996. "CD4 down-Modulation during Infection of Human T Cells with Human Immunodeficiency Virus Type 1 Involves Independent Activities of CD4." *Journal of Virology* 70 (9): 6044–53.
- Christen, L., Seto, J. and Niles, E. G. 1990. "Superinfection Exclusion of Vaccinia Virus in Virus-Infected Cell Cultures." *Virology* 174 (1): 35–42.
- Jabbar, M. A. and Nayak, D. P. 1990. "Intracellular Interaction of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (ARV-2) Envelope Glycoprotein gp160 with CD4 Blocks the Movement and Maturation of CD4 to the Plasma Membrane." *Journal of Virology* 64 (12): 6297–6304.
- Jarosinski, K. W. 2012. "Dual Infection and Superinfection Inhibition of Epithelial Skin Cells by Two Alphaherpesviruses Co-Occur in the Natural Host." *PLoS ONE* 7 (5): 37428.
- Johnson, R M and Spear, P G. 1989. "Herpes Simplex Virus Glycoprotein D Mediates Interference with Herpes Simplex Virus Infection." *Journal of Virology* 63 (2): 819–27.
- Johnston, R E, Wan, K and Bose, H R. 1974. "Homologous Interference Induced by Sindbis Virus." *Journal of Virology* 14 (5): 1076–82.
- Karpf, R., Lenches, E., Strauss, E. G., Strauss, J. H. and Brown, D. T. 1997. "Superinfection Exclusion of Alphaviruses in Three Mosquito Cell Lines Persistently Infected with Sindbis Virus." *Journal of Virology* 71 (9): 7119–23.
- Kestler, H. W., Ringler, D. J., Mori, K., Panicali, D. L., Sehgal, P. K., Daniel, M. D. and Desrosiers, R. C. 1991. "Importance of the Nef Gene for Maintenance of High Virus Loads and for Development of AIDS." *Cell* 65 (4): 651–62.

- Kim, D. H., Kang, H. S. and Kim, K-H. 2016. “Roles of Hepatocyte Nuclear Factors in Hepatitis B Virus Infection.” *World Journal of Gastroenterology* 22 (31): 7017–29.
- Kimura, Y., Norrby, E., Nagata, I., Ito, Y. and Shimokata, K. 1976. “Homologous Interference Induced by a Temperature Sensitive Mutant Derived from an HVJ (Sendai Virus) Carrier Culture.” *Journal of General Virology* 33 (2): 333–43.
- Koutsoudakis, G., Herrmann, E., Kallis, S., Bartenschlager, R. and Pietschmann, T. 2007. “The Level of CD81 Cell Surface Expression Is a Key Determinant for Productive Entry of Hepatitis C Virus into Host Cells.” *Journal of Virology* 81 (2): 588–98.
- Laliberte, J. P. and Moss, B. 2014. “A Novel Mode of Poxvirus Superinfection Exclusion That Prevents Fusion of the Lipid Bilayers of Viral and Cellular Membranes.” *Journal of Virology* 88 (17): 9751–68.
- Lee, Y., Tscherne, D. M., Yun, S., Rice, Ch. M. and Frolov, I. 2005. “Dual Mechanisms of Pestiviral Superinfection Exclusion at Entry and RNA Replication.” *Journal of Virology* 79 (6): 3231–42.
- Lennette, E. H. 1951. “Interference between Animal Viruses.” *Annual Review of Microbiology* 5 (2): 277–94.
- Michel, N., Allespach, I., Venzke, S., Fackler, O. T. and Keppler, O. T. 2005. “The Nef Protein of Human Immunodeficiency Virus Establishes Superinfection Immunity by a Dual Strategy to Downregulate Cell-Surface CCR5 and CD4.” *Current Biology : CB* 15 (8): 714–23.
- Morrison, T. G. and McGinnes, L. W. 1989. “Avian Cells Expressing the Newcastle Disease Virus Hemagglutinin-Neuraminidase Protein Are Resistant to Newcastle Disease Virus Infection.” *Virology* 171 (1): 10–17.
- Moscona, A. and Peluso, R. W. 1991. “Fusion Properties of Cells Persistently Infected with Human Parainfluenza Virus Type 3: Participation of Hemagglutinin-Neuraminidase in Membrane Fusion.” *Journal of Virology* 65 (6): 2773–77.
- Moscona, A. and Peluso, R. W. 1992. “Fusion Properties of Cells Infected with Human

- Parainfluenza Virus Type 3: Receptor Requirements for Viral Spread and Virus-Mediated Membrane Fusion.” *Journal of Virology* 66 (11): 6280–87.
- Pantin-Jackwood, M. J., Costa-Hurtado, M., Miller, P. J., Afonso, C. L., Spackman, E., Kapczynski, D. R., Shepherd, E., Smith, D. and Swayne, D. E. 2015. “Experimental Co-Infections of Domestic Ducks with a Virulent Newcastle Disease Virus and Low or Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses.” *Veterinary Microbiology* 177 (1–2): 7–17.
- Pau, A. K. and George, J. M. 2014. “Antiretroviral Therapy: Current Drugs.” *Infectious Disease Clinics of North America* 28 (3): 371–402.
- Petersen, L. R., Brault, A. C. and Nasci, R. S. 2013. “West Nile Virus: Review of the Literature.” *JAMA* 310 (3): 308–15.
- Pileri, P., Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., Weiner, A. J., Houghton, M., Rosa, D., Grandi, G. and Abrignani, S. 1998. “Binding of Hepatitis C Virus to CD81.” *Science* 282 (5390): 938–41.
- Prevec, L. and Kang, C.Y. 1970. “Homotypic and Heterotypic Interference by Defective Particles of Vesicular Stomatitis Virus.” *Nature* 227: 520–21.
- Seeger, Ch. and Mason, W. S. 2000. “Hepatitis B Virus Biology.” *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64 (1): 51–68.
- Schaller, T., Appel, N., Koutsoudakis, G., Kallis, S., Lohmann, V., Pietschmann, T. and Bartenschlager, R. 2007. “Analysis of Hepatitis C Virus Superinfection Exclusion by Using Novel Fluorochrome Gene-Tagged Viral Genomes.” *Journal of Virology* 81 (9): 4591–4603.
- Simmonds, P., Becher, P., Bukh, J., Gould, E. A., Meyers, G., Monath, T., Muerhoff, S., Pletnev, A., Rico-Hesse, R., Smith, D. B. and Stapleton, J.T. 2017. “ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae.” *The Journal of General Virology* 98 (1): 2–3.
- Singh, I. R., Suomalainen, M., Varadarajan, S., Garoff, H. and Helenius, A. 1997. “Multiple Mechanisms for the Inhibition of Entry and Uncoating of Superinfecting Semliki Forest Virus.” *Virology* 231 (1): 59–71.

- Smith, G. L., Vanderplassen, A. and Law, M. 2002. "The Formation and Function of Extracellular Enveloped Vaccinia Virus." *Journal of General Virology* 83 (12): 2915–31.
- Stiles, K. M., Milne, R. S. B., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J. and Krummenacher, C. 2008. "The Herpes Simplex Virus Receptor Nectin-1 Is down-Regulated after Trans-Interaction with Glycoprotein D." *Virology* 373 (1): 98–111.
- Swain, J.V. and Schindler, M. 2005. "Nef Induces Multiple Genes Involved in Cholesterol Synthesis and Uptake in Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected T Cells." *Journal of Virology* 79 (15): 10053–58.
- Tong, S., Li, J. and Wands, J. R. 1999. "Carboxypeptidase D Is an Avian Hepatitis B Virus Receptor." *Journal of Virology* 73 (10): 8696–8702.
- Tscherne, D. M., Evans, M. J., Hahn, T. von, Jones, C. T., Stamatakis, Z., McKeating, J. A., Lindenbach, B. D. and Rice, C. M. 2007. "Superinfection Exclusion in Cells Infected with Hepatitis C Virus." *Journal of Virology* 81 (8): 3693–3703.
- Walters, K-A., Joyce, M. A., Addison, W. R., Fischer, K. P., Tyrrell, D. L. J. and Irol, J. V. 2004. "Superinfection Exclusion in Duck Hepatitis B Virus Infection Is Mediated by the Large Surface Antigen." *Society* 78 (15): 7925–37.
- Wang, C., Pflugheber, J., Sumpter, R., Sodora, D. L., Hui, D., Sen, G. C. and Gale, M. 2003. "Alpha Interferon Induces Distinct Translational Control Programs to Suppress Hepatitis C Virus RNA Replication." *Journal of Virology* 77 (7): 3898–3912.
- Webster, B., Ott, M. and Greene, W. C. 2013. "Evasion of Superinfection Exclusion and Elimination of Primary Viral RNA by an Adapted Strain of Hepatitis C Virus." *Journal of Virology* 87 (24): 13354–69.
- Wildum, S., Schindler, M., Munch, J. and Kirchhoff, F. 2006. "Contribution of Vpu, Env, and Nef to CD4 Down-Modulation and Resistance of Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected T Cells to Superinfection." *Journal of Virology* 80 (16): 8047–59.
- Yang, R-R., Gui, X., Chen, X-Y. and Zhu, Y. 2011. "Interference of Replication between Hepatitis B and C Viruses in Patients Infected with HIV." *Journal of Medical Virology*

83 (7): 1159–64.

Zheng, X., Song, Z., Li, Y., Zhang, J. and Wang, X-L. 2017. “Possible Interference between Seasonal Epidemics of Influenza and Other Respiratory Viruses in Hong Kong, 2014–2017.” *BMC Infectious Diseases* 17 (1): 772.

Zheng, Y-H., Plemenitas, A., Fielding, Ch. J. and Peterlin, B. M. 2003. “Nef Increases the Synthesis of and Transports Cholesterol to Lipid Rafts and HIV-1 Progeny Virions.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (14): 8460–65.

Zhu, W., Wang, C. and Wang, B.-Z. 2017. “From Variation of Influenza Viral Proteins to Vaccine Development.” *International Journal of Molecular Sciences* 18 (7): 1554.

Zou, G., Zhang, B., Lim, P.-Y., Yuan, Z., Bernard, K. A. and Shi, P.-Y. 2009. “Exclusion of West Nile Virus Superinfection through RNA Replication.” *Journal of Virology* 83 (22): 11765–76.