

**Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Mária Gašpareková

Identifikace genů zodpovědných za indukci nádorů ptačími retroviry podskupiny J

Identification of genes responsible for tumor induction with avian retroviruses subgroup J

Diplomová práce

Vedoucí práce/Školitel: Ing. Vladimír Pečenka, Ph.D.

Praha, 2019

Prohlášení:

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

V Praze, 2.1.2019

Podpis

Pod'akovanie

Ďakujem môjmu školiteľovi Ing. Vladimírovi Pečenkovi, Ph.D. za všetky tie roky, ktoré mi bol školiteľom. Ďakujem za jeho trpezlivosť a ochotu, či už pri vypracovávaní a písaní tejto diplomovej práce, alebo pri akomkoľvek inom probléme, s ktorým som ho vyhľadala. Ďakujem za jeho priateľský prístup a samozrejme za všetky cenné rady, ktoré mi dal a za to, čo ma naučil.

Ďalej ďakujem RNDr. Vítovi Karafiátovi za enormnú pomoc pri in vivo pokusoch, ktoré sa týkali živých zvierat a ich zákonné zastrešenie, ale tiež za jeho pomoc pri spracovaní a analýze histologických vzoriek, za jeho ochotu, čas a energiu a za všetky vedomosti, ktoré sa mi snažil predať.

Tiež by som rada pod'akovala Mgr. Davidovi Přikrylovi za jeho všestrannú pomoc v laboratóriu a najmä pomoc pri „troubleshootingu“ všetkého druhu a Mgr. Kryštofovi Štaflovi najmä za jeho pomoc pri titracii vírusu a prietokovej cytometrii.

Veľká vďaka patrí takisto RNDr. Jiřímu Hejnarovi, Ph.D. a celému oddeleniu vírusovej a bunkovej genetiky za všetky krásne roky, ktoré som s nimi mohla stráviť, za nespočetné množstvo cenných rád a skúseností, za ochotu a ústretovosť každého jedného človeka, ale aj za ich ľudský a priateľský prístup a samozrejme za spoločné zážitky.

V neposlednej rade by som chcela pod'akovať svojej rodine a priateľom za ich nekonečnú podporu a obetavosť, za ich ochotu a chápanosť a tiež za ich pozitívny prístup.

Abstrakt

Retroviry patří mezi viry, které jsou schopné integrace do genomu hostitelské buňky. Nenáhodná integrace proviru do okolí, nebo dovnitř některých buněčných genů může mít za následek jejich deregulaci, aktivaci, nebo umlčení. To následně může vést k nádorové transformaci buňky a vzniku tumoru.

Tato práce se věnuje identifikaci míst integrace virů (VIS) a následnému určení obecných míst integrace (CIS) v nádorech různých orgánů (nejčastěji ledvin, plic a jater) s použitím hlavně ptačích retrovirů podskupiny J, konkrétně prvního přírodního izolátu HPRS-103 a laboratorně vytvořeného viru MAV-J, který vznikl výměnou genu envB za envJ. Infekce probíhala in ovo na kuřecích plemenech Brown Leghorn a White Leghorn a tumory byly izolovány 8 až 28 týdnů po infekci. Na molekulární analýzu byla využívána metoda inverzní PCR a následní sekvenace.

Ze 74 molekulárně analyzovaných tumorů bylo detegováno 373 VIS a 6 CIS se statistickou signifikancí nad $2 \cdot 10^{-2}$. Nejvíce zasáhnutým genem byl FRK (14 krát), dále TERT (5 krát), CTDSPL (5 krát), EGFR/ERBB1 (3 krát), MYB (3 krát) a MYC (3 krát). Kromě 6 CIS byly nalezeny také jiné geny s nižší statistickou signifikancí.

Klíčová slova: retrovirus, inzerční mutagenese, podskupina J, onkogeneze, onkogeny, MAV-J, HPRS-103, místa integrace proviru, tumory

Abstract

Retroviruses are viruses which are able to integrate to genome of host cell. Nonrandom integration of provirus near or inside some cellular genes may result in their deregulation, activation or silencing. This can later lead to cell transformation and tumor formation.

This thesis discusses identification of viral integration sites (VIS) and common integration sites (CIS) in tumors originating from different organs (mostly kidneys, lungs and liver) with using mostly avian retroviruses subgroup J, specifically first natural isolate HPRS-103 and laboratory made virus MAV-J, which was made by replacing gene envB by envJ. Infection was made in ovo using chicken breeds Brown Leghorn and White Leghorn and tumors were isolated from 8 to 28 weeks after infection. For molecular analyses was used inverse PCR method and sequencing.

From 74 molecularly analyzed tumors there was detected 373 VIS and 6 CIS with statistical significance over $2 \cdot 10^{-2}$. Gene with the highest number of hits was FRK (14 times), then TERT (5 times), CTDSPL (5 times), EGFR/ERBB1 (3 times), MYB (3 times) and MYC (3 times). Except 6 CIS there were other genes found, which had smaller statistical significance.

Keywords: retrovirus, insertional mutagenesis, subgroup J, oncogenesis, oncogenes, MAV-J, HPRS-103, proviral integration sites, tumors

Obsah

1 Úvod	12
2 Literárny prehľad	14
2.1 Retrovírusy	14
2.1.1 Onkogénne retrovírusy	14
2.1.1.1 Akútne transformujúce retrovírusy	15
2.1.1.2 Chronicky transformujúce retrovírusy	16
2.2 Vtáče retrovírusy	18
2.2.1 Podskupina A	19
2.2.2 Podskupina B	20
2.2.3 Podskupina J	20
3 Ciele	23
4 Materiály a metódy	25
4.1 Materiály	25
4.1.1 Preparácia plazmidovej DNA	25
4.1.2 Enzymatické reakcie	26
4.1.3 Gélová elektroforéza a izolácia fragmentov	27
4.1.4 PCR	28
4.1.5 Sekvenovanie	29
4.1.6 Zvieratá a bunkové kultúry	30
4.2 Metódy	31
4.2.1 Molekulárne klonovanie	31
4.2.2 Indukcia nádorov	33
4.2.3 Identifikácia miest integrácie	37
5 Výsledky	44
5.1 Klonovanie	44
5.2 Úspešnosť infekcie	47
5.3 Priebeh in vivo pokusov	49
5.3.1 Výskyt nádorov	52
5.3.2 Wasting disease	58
5.4 Klonalita nádorov	62
5.5 Určenie miest integrácie vírusu (VIS) a všeobecných miest integrácie (CIS) ...	65
5.5.1 Úspešnosť detekcie integračných miest vírusu (VIS)	67

6 Diskusia	72
7 Zhrnutie	78
8 Zoznam použitej literatúry	79
Príloha1	

Použité skratky

ALV	vtáčí leukóзовý vírus	avian leukosis virus
A-MuLV		Abelson murine leukemia virus
BF	Fabrióiova burza	Bursa of Fabricius
BL	Brown Leghorn outbredné plemeno	Brown Leghorn outbred breed
Bl	krv	blood
BM	kostná dreň	bone marrow
C	amplifikované fragmenty na oboch stranách provírusu	
cDNA	DNA kópia RNA	copy DNA
CEF	kuracie embryonálne fibroblasty	chicken embryonal fibroblasts
CIS	všeobecné miesto integrácie	common integration site
d.p.i.	dní po infekcii	days post infection
DF-1	kuracia fibroblastová línia	chicken fibroblast cell line
env	gen vírusového obalového glykoproteínu	envelope glycoprotein gene
FeNTA	nitrilotriacetát železa	ferric nitrilotriacetate
gag	gén pre kapsidový prekurzor retrovírusu	group-specific antigen
GFP	zelený fluorescenčný proteín	green fluorescence protein
HCC	hepatocelulárny karcinóm	hepatocellular carcinoma
He	srdce	heart
HHS	hepatický hemangiosarkóm	hepatic hemangiosarcoma
ICC	intrahepatický cholangiocelulárny karcinóm	intrahepatic cholangiocarcinoma
in ovo	vo vajci	
in vitro	v petriho miske	
in vivo	v živom organizme	
iPCR	inverzné PCR	inverse PCR
Ki	oblička	kidney

L	amplifikované fragmenty vľavo od provírusu	
LHS	pľúcný hemangiosarkóm	lung hemangiosarcoma
Li	pečeň	liver
LTR	dlhé koncové repetície	long terminal repeats
Lu	pľúca	lungs
MAV	helper vírus AMV	myeloblastosis-associated virus
M-MuLV		Moloney murine leukemia virus
mRNA	RNA slúžiaca ako predloha k translácii	messenger RNA
Ov	vaječníky	ovaries
Pa	pankreas	pankreas
PCR	polymerázová reťazová reakcia	polymerase chain reaction
pol	gén kódujúci retrovírusové enzýmy	polymerase
R	amplifikované fragmenty vpravo od provírusu	
RSV	vírus Rousovho sarkómu	Rous sarcoma virus
Sp	slezina	spleen
SPF	špeciálna línia bez patogénov	specific pathogen free
Te	semenníky	testes
Th	týmus	thymus
UTR	netranslatovaná oblasť	untranslated region
VIS	integračné miesto vírusu	viral integrational site
WLCB	White Leghorn inbredná línia CB	White Leghorn inbred CB line

1. Úvod

Retrovírusy sú obalené RNA vírusy, ktoré pri svojej replikácii využívajú enzým reverznú transkriptázu a sú schopné integrovať sa do DNA hostiteľskej bunky. Práve integrácia do niektorých génov alebo ich okolia je jedným zo spôsobov, ako dokážu retrovírusy spôsobiť nádorové bujnenie. Tento spôsob sa nazýva inzerčná mutagenéza, po ktorej nasleduje chronická transformácia bunky. Inzercia provírusu dovnútra alebo do okolia génu môže spôsobiť poškodenie tohto génu (napríklad poškodenie expresie nádorového supresoru), alebo naopak, môže viesť k zvýšeniu aktivity génu pomocou silného vírusového promotora v časti zvanej LTR (long terminal repeat). Takto sú deregulované protoonkogény (zvýšením ich expresie). Ak vďaka spôsobeným zmenám dochádza k nádorovej transformácii bunky, táto môže prerásť bunky ostatné a vytvoriť nádor.

Vtáacie leukózne vírusy (avian leukosis virus, ALV) patria do skupiny Alfaretrovírusov a svojmu hostiteľovi môžu spôsobovať celé spektrum nádorov, anémie, či spomaľovať rast zvierat a spôsobovať jeho chradnutie. Keďže infikujú hlavne hydinu, spôsobujú veľké hospodárske škody a ekonomické straty, najmä v dôsledku masívneho úhynu a eradikačných opatrení v hydinových chovoch a to hlavne v Číne a juhovýchodnej Ázii. Aktuálne sú najvýznamnejšie infekcie ALV podskupiny J (ALV-J), ktoré vyvolávajú hlavne myelómy a hemangiosarkómy.

Keďže ALV-J vírusy spôsobujú vznik nádorov pomocou inzerčnej mutagenézy bez potreby kódovania vlastného onkogénu, možno súdiť, že lokusy zasiahnuté vo viacerých nezávislých nádoroch sú zodpovedné za vznik daného nádoru. Tieto gény je možné detegovať pomocou mapovania okolia integrovaného provírusu. Medzi gény, ktoré boli identifikované ako zodpovedné za vznik nádoru patrí napríklad onkogén MYC, ktorý bol v kuracích B-lymfómoch opakovane aktivovaný integráciou provírusu ALV (W S Hayward, Neel, and Astrin 1981a). Ďalšie identifikované všeobecné miesta integrácie (CIS) v kuracích B-lymfómoch sú MYB, BIC, či TERT (Clurman and Hayward 1989, Yang et al. 2007).

Prvým prírodným izolátom podskupiny J je vírus HPRS-103, ktorý bol izolovaný v roku 1987-1988 vo Veľkej Británii z kurčaťa mäsového typu. Tento vírus vyvolával hlavne myelómy a renálne adenómy (L. N. Payne and Nair 2012a). Spolu s vírusom MAV-J, ktorý vznikol prenosom génu pre obalový glykoproteín z HPRS-103 do vírusu MAV, tvorí HPRS-

103 základ in vivo pokusov uvedených v tejto práci. Práca sa takisto venuje identifikácii všeobecných miest integrácie týchto vírusov vedúcich k vzniku rôznych typov nádorov a tým potvrdzuje a prehľbuje doterajšie vedomosti v tejto oblasti.

2. Literárny prehľad

2.1 Retrovírusy

Vírusy sú infekčné mikroskopické až submikroskopické nebunkové častice, ktoré v rôznej miere využívajú bunky organizmov na vlastné pomnoženie. Medzi sebou sa líšia v type hostiteľa, veľkosti genómu, spôsobe infekcie a mnohých ďalších aspektoch, ale všetky vírusy majú spoločné to, že nekódujú translačný aparát.

Retrovírusy patria medzi vírusy, ktorých genóm tvoria dve molekuly jednoreťazcovej RNA, ktorá má pozitívnu orientáciu. Vo virióne si okrem genetickej informácie nesú aj enzým reverznú transkriptázu, pomocou ktorého je jednoreťazcový RNA genóm prepisovaný do dvojreťazcovej cDNA podoby. Tá je integrovaná do DNA hostiteľskej bunky a nazýva sa provírus. Vírus je do genómu hostiteľskej bunky integrovaný v podobe časti DNA obsahujúcej gény (gag, pol, env, prípadne ďalšie) ohraničenej dvomi sekvenciami LTR (long terminal repeat). LTR sekvencie vznikajú pri reverznej transkripcii koncových častí genómu retrovírusov a majú úlohu v inzercii vírusu do genómu hostiteľskej bunky v podobe provírusu a slúži ako kontrolné centrum génovej expresie.

Genetická informácia retrovírusov nesie tri základné gény, ktorými sú gag, pol a env. Tie sú exprimované pomocou hostiteľského aparátu. Gén gag kóduje hlavý štruktúrny polyproteín nevyhnutný na poskladanie vírusových častíc, pol kóduje enzýmy reverznú transkriptázu, integrázu, proteázu a RNázu H a env kóduje obalové glykoproteíny, z ktorých povrchový proteín je zodpovedný za väzbu vírusu na receptor a teda aj tropizmus vírusu a transmembránový proteín zas za fúziu membrány vírusu s cytoplazmatickou membránou bunky. Vírusové častice obalené fosfolipidovou membránou, ktorú získavajú pri opúšťaní bunky pomocou pučania nie sú infekčné, kým proteáza nenaštepí prekursorov na funkčné proteíny. Toto sa nazýva maturácia a dochádza k nej z dôvodu predchádzania opätovnej infekcii buniek, ktoré už infikované sú.

2.1.1 Onkogénne retrovírusy

Podľa spôsobu, akým retrovírusy prispievajú k nádorovej transformácii hostiteľských buniek sa delia na akútne transformujúce a chronicky transformujúce. Rozdiel nie je len v samotnom

spôsobe, akým tieto dve skupiny indukujú nádory transformáciou hostiteľských buniek, ale aj v rýchlosti, akou sa to deje.

2.1.1.1 Akútne transformujúce retrovírusy

Akútne transformujúce retrovírusy sú vírusy, ktoré okrem základných génov nesú vo svojom genóme aj pôvodne bunkové protoonkogény. Tie sú do vírusového genómu zahrnuté pri replikácii vírusu. Keďže väčšinou je takýto protoonkogén poškodený, stáva sa z neho onkogén, ktorý po vírusovej infekcii bunky rýchlo transformuje. Akútne transformujúce retrovírusy vyvolávajú nádory veľmi rýchlo, väčšinou v priebehu dní až týždňov. Keďže vírus vo svojom genóme nesie onkogén, transformácia buniek býva veľmi účinná a vznikajú tak polyklonálne nádory.

Veľkosť genómu jednotlivých vírusov je limitovaná a väčšina akútne transformujúcich retrovírusov v dôsledku zisku onkogénu stráca časť svojho genómu, čím sa stávajú neschopné replikácia, teda replikačne defektné. Takéto vírusy potrebujú replikačne kompetentný (takzvaný helper) vírus, ktorý poskytne akútne transformujúcemu vírusu proteíny na vznik viriónu, do ktorého sa zbalí genetická informácia transformujúceho retrovírusu. Takto vzniknuté častice sa nazývajú pseudotypy.

Prvým objaveným onkogénnym retrovírusom bol vírus Rousovho sarkómu (RSV), ktorý podľa svojho názvu spôsoboval sarkómy kurčiat (Rous 1911). Neskôr bolo zistené, že gén, ktorý RSV nesie pravdepodobne nemá vírusový pôvod, pretože DNA normálnych kuracích buniek obsahuje nukleotidovú sekvenciu pripomínajúcu časť vírusového transformujúceho génu (Stehelin et al. 1976). Po identifikácii génu v-src bolo ďalej zistené, že za nádorovú transformáciu buniek a rýchly vznik nádorov (v priebehu mesiaca od aplikácie) môže práve v-src, nie vírus ako taký (Fung et al. 1983). Je nutné podotknúť, že tieto objavy boli možné aj preto, že na rozdiel od väčšiny akútne transformujúcich retrovírusov, RSV je replikačne kompetentný a nepotrebuje helper vírus.

Ďalším akútne transformujúcim retrovírusom nesúcim onkogén je A-MuLV (Abelson murine leukemia virus), ktorý u myši spôsobuje lymfosarkóm. Protoonkogén c-abl v tomto prípade vo vírusovom genóme vytvoril hybridný gén gag-abl (Reddy, Smith, and Srinivasan 1983). Toto veľmi výrazne ovplyvnilo konečný produkt, pretože na rozdiel od c-abl génu bežne vyskytujúceho sa v bunke v podobe jadrového proteínu, vznikol proteín lokalizovaný do plazmatickej membrány (Van Etten, Jackson, and Baltimore 1989; Rohrschneider and Najita

1984). Keďže A-MuLV v dôsledku inzercie abl génu väčšinu svojich génov stratil, tento vírus nie je replikačne kompetentný a teda potrebuje helper vírus, ktorým je M-MuLV (Moloney murine leukemia virus) (Reddy, Smith, and Srinivasan 1983).

2.1.1.2 Chronicky transformujúce retrovírusy

Chronicky transformujúce retrovírusy tvoria druhú skupinu onkogénnych retrovírusov. Tieto vírusy na rozdiel od akútne transformujúcich prispievajú k vzniku nádorov značne pomalšie (mesiace) a indukované nádory väčšinou nie sú polyklonálne ako tomu je u akútne transformujúcich retrovírusov. Dôvodom je nízka pravdepodobnosť nádorovej transformácie, čo znamená, že pozorované nádory sú tvorené jedným alebo niekoľko málo bunkovými klonmi. V prípadoch takýchto nádorov sa dajú zistiť takzvané integračné miesta provírusu. Keďže len malé percento z infikovaných buniek je nádorovo transformovaných, možno súdiť, že tá daná integrácia môže mať významný vplyv na bunkovú transformáciu, jej schopnosť prerásť okolité bunky a dať vznik nádoru. Tieto vírusy taktiež nenesú žiaden onkogén a nie sú schopné transformovať bunky in vitro. Bunky transformujú takzvanou inzerčnou mutagenézou.

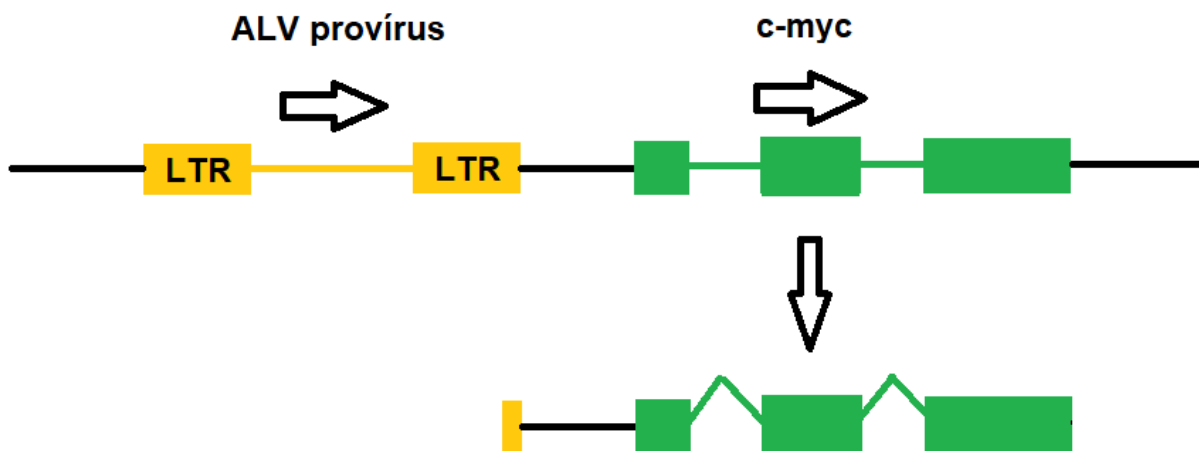
Inzerčná mutagenéza

Aktivácia bunkových (onko)génov inzerčnou mutagenézou bola pozorovaná u mnohých retrovírusov pri nachádzaní všeobecných miest integrácie týchto provírusov. Existuje niekoľko modelov, ako vysvetliť efekt integrácie provírusu do okolia bunkového génu, ktorý potenciálne prispieva k nádorovej transformácii bunky.

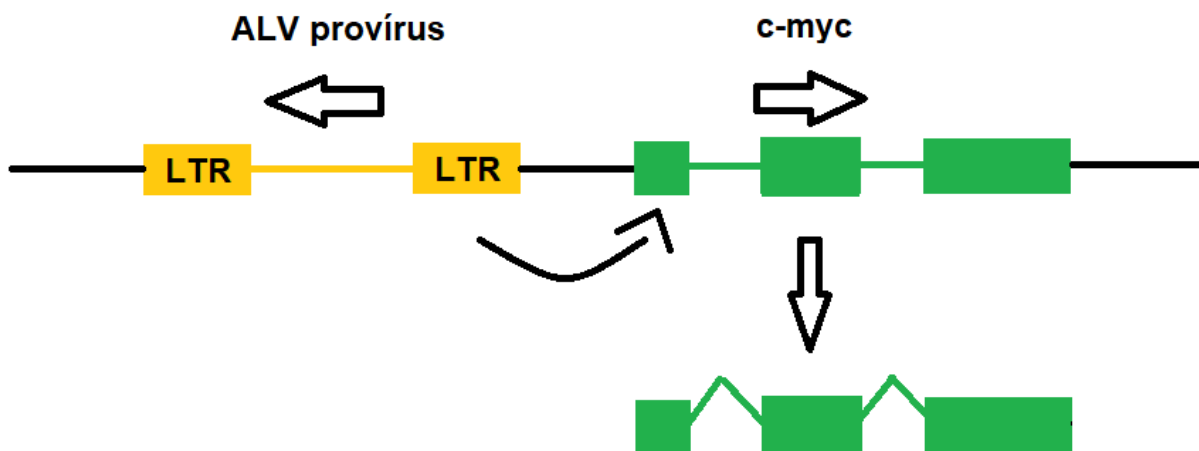
Model promótorovej inzercie

Pri štúdiu B-lymfómov indukovaných infekciou ALV (avian leukosis virus) u kurčiat bola detegovaná integrácia provírusu do veľmi podobných miest kuracieho genómu u viacerých nádorov. Bolo zistené, že toto miesto integrácie sa nachádza v okolí génu c-myc a integrácia provírusu vedie k nadexpresii tohto bunkového protoonkogénu, čo následne vedie k vzniku B-lymfómov (William S. Hayward, Neel, and Astrin 1981a). Toto vysvetľuje aj dlhú latenciu a malý výskyt nádorov, pretože pravdepodobnosť, že sa provírus integruje presne do tohto miesta (za predpokladu relatívne náhodného miesta integrácie ALV) je malá a na dosiahnutie optimálnych podmienok a deregulácie bunky je veľmi pravdepodobne potrebná viac než len jedna integrácia. Vzniknuté nádory sú preto väčšinou monoklonálne. Model promótorovej

inzercie je ukázaný aj na obrázku 1, kde provírus integrovaný upstream od protoonkogénu v rovnakej transkripčnej orientácii je schopný zosilniť expresiu daného génu pomocou LTR.



Obrázok 1: Model promótorovej inzercie. Provírus sa integruje bezprostredne pred protoonkogén, čím zosilní expresiu bunkového génu z LTR.



Obrázok 2 Obrázok 3: Model aktivácie enhanceru. Provírus využíva silný enhancer v LTR na aktiváciu promótoru génu, čo vedie k zvýšeniu jeho expresie.

Model aktivácie enhanceru

Ďalšia možnosť integrácie provírusu do okolia génu je napríklad integrácie upstream od začiatku génu, avšak v opačnej transkripčnej orientácii. Toto bolo pozorované znova pri B-lymfómoch indukovaných ALV, kedy bola znova pozorovaná integrácia do okolia génu c-myc. V tomto prípade sa však vyskytovali tri možné varianty. Prvá z nich bola promótorová inzercia, kedy sa provírus integroval upstream od génu v zhodnej orientácii. Druhá bola downstream od

génu, v rovnakej transkripčnej orientácii ako c-myc a tretia upstream od génu, avšak v opačnej orientácii. Keďže všetky tieto prípady viedli k vzniku nádoru, je pravdepodobné, že napriek opačnej orientácii, prípadne integrácii downstream od génu, má provírus stále možnosť nejako regulovať (resp. zvýšiť) transkripciu daného génu. Je súdené, že provírus využíva svoj silný enhancer v LTR oblasti na aktiváciu c-myc promótoru, čo má za následok zvýšenie expície c-myc (obr.2) (G. S. Payne, Bishop, and Varmus 1982).

2.2 Vtáče retrovírusy

Štúdium vtáčích retrovírusov nepochybne do veľkej miery prispelo k poznaniu mechanizmov nádorovej transformácie. Ved' prvým identifikovaným bunkovým protoonkogénom v súvislosti s vtáčimi retrovírusmi bol práve src, ktorý v zmenenej forme v-src obsahuje RSV, čím veľmi efektívne v časovom intervale niekoľkých dní až týždňov vyvoláva nádory u kurčiat (P Rous 1910; Peyton Rous 1911).

Vtáče retrovírusy sú skupina vírusov v dnešnej dobe postihujúcich hlavne kurence. U svojho hostiteľa vyvolávajú veľké spektrum nádorových ochorení a hoci sa vo väčšine zemí sveta podarilo obmedziť ich výskyt v priemyselných chovoch hydiny, v Číne a juhovýchodnej Ázii do dnešného dňa predstavujú problém spojený s vysokým úhynom zvierat a teda aj veľkými hospodárskymi a ekonomickými stratami. Napriek tomu, že vakcína proti vtáčim retrovírusom v dnešnej dobe nie je dostupná, v hydinárskech veľkochovoch prebehli a stále prebiehajú úspešné eradikačné programy založené na molekulárnej diagnostike a následných karanténnych opatreniach (L. N. Payne and Howes 1991; Dong et al. 2015).

Vtáče leukózoové vírusy (ALV) sú vírusy, ktoré spôsobujú najmä (ale nie len) leukózy u vtákov a patria medzi Alfaretrovírusy. Dôležitým génom vtáčích retrovírusov je gén kódujúci obalové glykoproteíny, env. Podľa toho, aký env gén daný vírus nesie, je zaradovaný do podskupín. Súčasné známe podskupiny vtáčích retrovírusov sú A-E, J a K, skupiny F-I patria medzi endogénne retrovírusy vyskytujúce sa hlavne u divoko žijúcich vtákov (bažanty, jarabice, prepelice) (Sandelini and Estola 1974 ; Cui et al. 2014). Toto radenie je veľmi dôležité, keďže obalové glykoproteíny (konkrétne povrchový proteín SU) sú zodpovedné za naviazanie vírusu

na receptor, a teda určujú vnímavosť bunky voči vírusu. Podskupina, do ktorej ten daný vírus patrí býva uvádzaná za jeho názvom.

2.2.1 Podskupina A

ALV-A (vtáčí leukóзовý vírus podskupiny A) je najrozšírenejšou podskupinou ASLV (vtáacie sarkómové a leukóзовé vírusy) v komerčných chovoch hydiny, no len u malého percenta zvierat indukuje vznik nádorového ochorenia. Medzi nádory, ktoré ALV-A spôsobuje patrí najmä B-lymfóm, ktorého pôvod začína v bunkách Fabriciovej burzy a neskôr tvorí metastázy, ktoré zasahujú pečeň a slezinu, zriedkavo aj iné orgány. ALV-A patrí medzi chronicky transformujúce vírusy a na transformáciu bunky využíva inzerčnú mutagenézu. Retrovírusy, ktoré prispievajú k vzniku nádorov metódou inzerčnej mutagenézy sú aktívne testované na výskyt všeobecných miest integrácie, pretože práve všeobecné miesta integrácie by mohli odhaliť potenciálne bunkové onkogény, alebo iné gény účastniace sa napríklad bunkovej replikácie, proliferácie, rastu alebo apoptózy. Deregulácia mnohých génov zasiahnutých inzerčnou mutagenézou bola potvrdená aj v ľudských nádoroch.

Integrations	Nearest Gene(s)	Density	Avg. BP
117	TNFRSF1A	9.47	2.40
43	MEF2C	0.33	1.74
33	ANKRD10 / ARHGEF7	0.21	1.21
30	CTDSPL	0.51	5.87
28	MYB	0.49	5.36
28	TAB2	0.45	4.29
27	RUNX1	0.16	1.30
26	TERT	3.63	19.19
25	MLL5	0.12	1.24
24	CXorf57	1.24	3.04
24	ADD1 / SH3BP2	0.20	1.21
24	BACH2	0.14	1.38
23	IKZF1	0.28	1.26
23	ELF1	0.27	1.04
23	MKL1	0.22	1.61
22	RHOH	0.62	2.09
22	FAM49B	0.20	1.36
21	CTDSPL2	0.41	2.95
21	ncRNA LOC101751559	0.13	1.67
20	SLC17A5 / EEF1A1	0.35	1.50
20	UBAC2	0.22	1.00
18	AP1AR / ncRNA LOC101747403	0.30	1.17
18	LOC101749148	0.22	1.17
18	ZEB1	0.18	2.06
17	LAS1L / MSN	0.18	1.24
17	CBLB	0.13	1.24

Integrations	Nearest Gene(s)	Density	Avg. BP
16	CCNA2	1.14	3.00
16	HMGB1	0.32	1.38
15	ELF2 / MGARP	0.22	1.00
15	SYNE3	0.21	1.07
14	CD72 / LOC768355	1.08	1.36
14	TAGAP	0.29	1.07
14	NDUFAF6 / PLEKHF2	0.25	1.00
14	PTPRC	0.18	2.07
14	APBB1IP	0.18	1.29
13	Mir-222 / Mir-221	0.51	1.31
13	TMEM64	0.25	2.62
13	MXD4	0.25	1.23
13	STIM2	0.22	1.46
12	Mir-155	1.73	3.67
12	NFKBIA	0.45	1.08
12	TMEM135 / FZD4	0.42	1.00
12	TUBGCP5	0.30	1.17
12	ENO2 / ATN1	0.29	1.33
12	ZCCHC10 / HSPA4	0.26	2.25
12	LIN54	0.25	2.25
12	TMEM123	0.23	1.25
12	AKT1	0.13	1.67
9	MYC	0.69	8.44
	All integrations	0.028	1.34

Obrázok 3: Obrázok 4: Prehľad 49 všeobecných miest integrácie ALV-A zoradených podľa počtu integrácií do uvedeného (najbližšieho) génu (prevzaté od J. F. Justice, Morgan, and Beemon 2015).

Rôzne vírusy A podskupiny ALV dokážu indukovať nádory rôzne rýchlo, ale väčšina vznikajúcich nádorov sú B-lymfómy. Pri hľadaní všeobecných miest integrácie vírusu zodpovedných za vznik B-lymfómov u kurčiat bolo identifikovaných hneď niekoľko génov (J. F. Justice, Morgan, and Beemon 2015). Prehľad týchto génov aj s počtom integrácií ukazuje obrázok 3.

2.2.2 Podskupina B

MAV-B (myeloblastosis-associated virus) je jeden z predstaviteľov B podskupiny vtáčích retrovírusov. MAV-B sa delí na dva základné typy v závislosti od toho, aký nádor najviac indukuje. MAV-B(O) je zodpovedný za vysoké percento výskytu osteopetrozy u kurčiat (Smith and Moscovici 1969) a s malou pravdepodobnosťou indukuje aj nefroblastómy, MAV-B(N) spôsobuje zas vo vysokom percente prípadov nefroblastómy (nádorové ochorenie obličiek) (Walter, Burmester, and Cunningham 1962). Tieto vírusy (MAV-B(O) a MAV-B(N)) je možné množiť na bunkových CEF (chicken embryonal fibroblast) kultúrach a takisto je možná ich titrácia plakovou esejou (Graf 1972).

Morfológia nádorov je u MAV-B nefroblastómov porovnateľná s ľudským nádorovým ochorením obličiek nazývaným Wilmsov tumor (Nicholson 1931), ale tiež s nefroblastómami nájdenými u iných zvierat (mačky, psy, ovce, zajace, dobytok...) (Bell and Henrici 1916 ; Jones 1952 ; Plummer 1951 ; Wattst and Smith 1980)

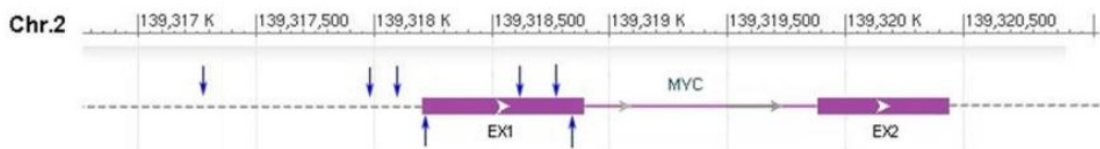
Aj v tomto prípade bolo zaujímavé zisťovať všeobecné miesta integrácie provírusov, ešte o to viac, keď išlo o nádory s takou veľkou podobnosťou medzi jednotlivými zvieratami a človekom. Ako všeobecné miesto integrácie bol identifikovaný gén twist. Funkcia génu twist v embryonálnych bunkách nie je zatiaľ objasnená. U vtáčích nefroblastómov indukovaných vírusom MAV-2 bola zisťovaná miera expície tohto génu. Bolo zistené, že mRNA génu twist izolovaná z nefroblastómov nenesie mutácie a gén je len nadexprimovaný. To viedlo k hypotéze, že sa jedná o protoonkogén.

2.2.3 Podskupina J

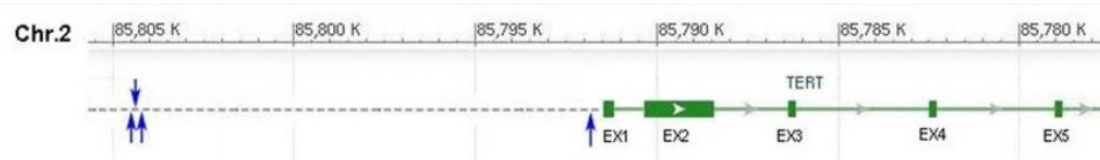
ALV-J bol objavený v 80. rokoch 20. storočia a prvýkrát izolovaný v roku 1987-1988 vo Veľkej Británii ako prvý prírodný izolát z kurčat'a mäsového typu nazvaný HPRS-103. Tento

vírus vyvolával najmä renálne adenómy a myelómy (L. N. Payne and Nair 2012 ; L. N. Payne, Gillespie, and Howes 1992). ALV-J predstavuje dodnes veľké problémy v hydinných chovoch, najmä v Číne a juhovýchodnej Ázii. Spektrum nádorov indukovaných infekciou ALV-J je tu výrazne väčšie. Medzi najviac pozorované nádory asociované s ALV-J tu patria hemangiómy (50 %) a myelocytómy (38,6 %), ale pozorovaný je tiež výskyt lymfómov, histiocytických sarkómov, fibrosarkómov a adenokarcinómov čreva (Cheng et al. 2010).

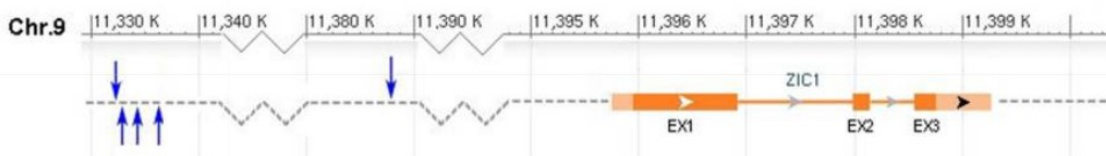
a. *MYC*



b. *TERT*



c. *ZIC1*



Obrázok 4: Všeobecné miesta integrácie ALV-J u myeloidnej leukózy. Šípky ukazujú miesto inzercie provírusu v kuracom genóme a transkripčnú orientáciu (hore – forward, dole – reverse) (prevzaté z Li et al. 2014).

ALV-J sa stal aj záujmom výskumu so zameraním na odhalenie všeobecných miest integrácie vedúcich k nádorovej transformácii. Bolo zistené, že tak, ako iné chronicky transformujúce retrovírusy, aj ALV-J využíva inzerčnú mutagenézu čo znamená, že všeobecné miesta jeho integrácie pozorované u rôznych typov nádorov zasahujú priamo gény patriace medzi protoonkogény, nádorové supresory, alebo iné gény vykonávajúce v bunke funkcie spojené s apoptózou, bunkovou proliferáciou, jej delením a podobne. U hemangiómov bol ako všeobecné miesto integrácie ALV-J identifikovaný gén MET, ktorého dôležitá úloha vo vzniku rakoviny je známa (Justice et al. 2015 ; Gherardi et al. 2012). Mutácia a nadexpresia génu MET boli pozorované aj u ľudských nádorov mozgu, karcinómov prsníkov a nádorov pankreasu spojených so zlou prognózou a malou pravdepodobnosťou vyliečenia (Abounader and Laterra

2005 ; Garcia et al. 2007 ; Peghini et al. 2002). U myeloidnej leukózy spôsobenej J podskupinou retrovírusov boli určené hneď tri všeobecné miesta integrácie a to MYC, TERT a ZIC1 (Y. Li et al. 2014). Rozloženie jednotlivých integrácií tak, ako boli identifikované je pre lepšiu predstavu ukázané na obrázku 4. Všetky tieto gény boli takisto bežne identifikované ako deregulované v ľudských nádoroch (Dang 2012 ; Armanios and Greider 2005 ; Brill et al. 2010).

Chronicky transformujúce retrovírusy využívajúce proces inzerčnej mutagenézy sa počas rokov ukazujú byť dobrým nástrojom na zisťovanie génov prispievajúcich k transformácii bunky. Gény nachádzané ako všeobecné miesta integrácie retrovírusov vedúce k vzniku nádorov sú často identifikované ako deregulované alebo mutované aj v ľudských nádoroch a nádoroch iných zvierat. Výskum v tejto oblasti môže prispieť k rozšíreniu obzorov nielen vtácej nádorovej biológie, ale môže slúžiť aj ako potenciálne vodítko pri hľadaní nových onkomarkerov ľudských nádorových ochorení.

3. Ciele práce

Vírusy vtácej leukózy (ALV) spôsobujú značné hospodárske škody v chovoch hydiny. U napadnutých vtákov spomaľujú rast, spôsobujú chradnutie a vyvolávajú chronické nádorové ochorenia. Priame straty aj náklady na eradikačné programy percentuálne znižujú výnosy hydínárstva. Aktuálne sú najvýznamnejšie infekcie ALV podskupiny J (ALV-J) a nimi vyvolávané myelómy a hemangiosarkómy v Číne a celej juhovýchodnej Ázii.

Preukázaným mechanizmom chronickej onkogenézie retrovírusmi, ktoré netransdukujú žiadny onkogén, je inzerčná mutagenéza, tzn. integrácia provírusu do hostiteľského genómu regulujúceho bunkové delenie. Poškodenie alebo naopak deregulácia takých génov, protoonkogénov alebo nádorových supresorov, vedie k transformácii bunky a iniciuje nádorové bujnenie. K deregulácii protoonkogénov obvykle stačí aj integrácia provírusu do ich blízkosti.

Cieľom tejto práce je

- i. sledovať chronickú onkogenézu a spektrum nádorov vyvolaných prototypom ALV-J (kmeň HPRS-103) u outbredných kurčiat Brown Leghorn a inbrednej línie CB,
- ii. vytvoriť nový modelový rekombinantný vírus podskupiny J prenosom génu pre obalový glykoproteín z HPRS-103 do vírusu MAV, kde možno očakávať vyššiu účinnosť indukcie nádorov,
- iii. identifikovať miesta integrácie provírusov ALV-J pomocou metódy iPCR vo veľkom súbore takto experimentálne indukovaných nádorov. Okrem nami indukovaných nádorov boli do analýz zahrnuté aj vzorky nádorov získané v rámci spolupráce so skupinou Dr. Venugopala Naira (The Pirbright Institute, Veľká Británia).
- iv. Genomicky a štatisticky posúdiť, či sú niektoré integrácie v zhlukoch (common integration site, CIS) naznačujúcich asociáciu zasiahnutých okrskov genómu s indukciou nádorov,
- v. identifikovať v zistených CIS kuracie gény, ktorých inzerčná mutagenéza a/alebo deregulácia prispieva ku vzniku nádorov konkrétneho typu.

Naplnenie týchto cieľov môže predstavovať pokrok v poznaní patogenézy hospodársky významného vírusu ALV-J. Identifikácia potenciálnych onkogénov môže navyše poukázať na nové kandidátne gény doposiaľ opomínané pri štúdiu nádorov ľudských.

4. Materiály a metódy

4.1 Materiály

4.1.1 Preparácia plazmidovej DNA

Bohatá pôda: 950 ml H₂O
5 ml glycerol
0,5 ml [1M CaCl₂ + 1 M MgCl₂]
10 g trypton
20 g kvasinkový extrakt, rozpustiť, sterilizovať
+ 25 ml 2M KNaHPO₄-7,5 (---> 90 mM K, 5 mM Na, 50 mM PO₄)

2M KNaHPO₄-7,5: 314 g K₂HPO₄ (411 g K₂HPO₄·3H₂O) (→□1800 mM)
31.5 g NaH₂PO₄·2H₂O (24 g NaH₂PO₄) (→ 200 mM)
500 ml H₂O, rozpustiť počas zahrievania, ochladiť,
doplniť H₂O do 1000 ml. pH by malo byť asi 7,5. Sterilizovať.
Toto je veľmi stabilný nasýtený roztok, zatiaľ čo 1M NaHPO₄
pri poklese teploty kryštalizuje

1 M CaCl₂ + 1 M MgCl₂: 21,9 g CaCl₂·6 H₂O (14,7 g CaCl₂·2H₂O)
20,3 g MgCl₂·6 H₂O
rozpustiť v H₂O (→ 100 ml, ~ ca 75 ml H₂O), sterilizovať

10x TEG: 10x 25 mM TRIS-8,5 62,5 ml 1 M TRIS-8,5
10 mM EDTA 50 ml 0,5 M EDTA
100 mM glukóza 45 g glukóza
10 mM NaN₃ 5 ml 5 M NaN₃
110 ml H₂O

NaOH+SDS: 0,2 M NaOH 1 ml 10 M NaOH
1% SDS 46,5 ml H₂O
2,5 ml 20% SDS

10 M NH₄Ac: 1542 g NH₄Ac rozpustené v presne 680 ml H₂O (pri 50°C)

10x TE+NaN₃:	10x: 10 mM TrisCl – 8,5	49 ml H ₂ O
	1 mM EDTA	5 ml 1 M Tris – 8,5
	10 mM NaN ₃	1 ml 5 M NaN ₃
		1 ml 500 mM EDTA

TE+RNase: 50 ml TE+NaN₃
(100 µg/ml) 500 µl denatur. RNaseA

5M NaN₃: 16,5 g NaN₃
rozpustiť v H₂O, → 50 ml

denatur. RNase: 1 ml TE+NaN₃ + 10 mg RNase, rozpustiť,
(10 mg/ml) mikroskúmavku vložiť do kadičky s vriacou vodou, nechať všetko vychladnúť na stole, zamraziť, rozmraziť, stočiť vyzrážané proteíny;
→ 10 mg/ml; aktivita denaturáciou klesne na 20-50 %.

2x DNAPurif:	500 mM NaAc-7,0	38 ml H ₂ O
	15 mM EDTA-8,5	10 ml 2,5 M NaAc
	5 mM NaN ₃	1,5 ml 0,5 M EDTA
	0,2% SDS	50 ul 5 M NaN ₃
	200 ug/ml glykogen	500 ul 20% SDS
		500 ul glykogenu (20 mg/ml)

5x DNAPurif:	60 mM EDTA-8,5	12,5 ml H ₂ O
(používať	5 mM NaN ₃	1,8 ml 0,5 M EDTA
1/4 objemu +	0,5% SDS	15 ul 5 M NaN ₃
1/6 objemu	500 ug/ml glykogen	375 ul 20% SDS
2,5 M NaAc)		375 ul glykogenu (20 mg/ml)

4.1.2 Enzymatické reakcie

10x BSA: 10x	200 µg / ml BSA	100 mg BSA
		50 ml H ₂ O

10x BSAsp: 10x	200 µg / ml BSA 1 mM spermidin	10 ml 10xBSA 100 µl 1M spermidin
10x lig: 10x	50 mM TRIS-7,5 10 mM MgCl ₂ 5 mM DTT 100 µM ATP	25 ml 1 M TRIS-7,5 5 ml 1 M MgCl ₂ 2,5 ml 1 M DTT 0,5 ml 100 mM ATP 17 ml H ₂ O

100 mM ATP: 55,1 mg / ml TE+NaN₃

1 M DTT: 1,55 g + H₂O do 10 ml

4.1.3 Gélková elektroforéza a izolácia fragmentov

10x TBE: (1x TBE ~ 89 mM TRIS + 89 mM H₃BO₃ + 2 mM EDTA)
216 g TRIS-baze
110 g kyselina boritá
80 ml 0,5M EDTA
1700 ml H₂O

TBE+NaAc pufor: 100 ml 10x TBE
(50 mM NaAc) 20 ml 2,5 M NaAc
880 ml H₂O

2,5 M NaAc: 340 g NaAc.3H₂O rozpustiť a doplniť na 1 000 ml

0,5M EDTA: 187 g EDTA Na₂.2H₂O
840 ml H₂O
pH → 8 s použitím pH testovacieho prúžku (+ ca 60 ml 10M NaOH)

koncentr. DNALoad: 32 ml 25% Ficoll 400
14 ml glycerol
po 2 ml 1% XC a 1% BFB (v TBE+NaN₃)

5x loadEDTA: 22 ml konc. DNALoad + 3 ml 0,5 M EDTA
(60 mM EDTA)

2x loadEDTA: 17,5 ml konc. DNALoad + 1,5 ml 0,5 M EDTA + 100 ul 5M NaN₃
(15 mM EDTA) doplniť H₂O na 50 ml

1x loadEDTA: 8,8 ml konc. DNALoad + 0,5 ml 0,5 M EDTA + 100 ul 5M NaN₃
(5 mM EDTA) doplniť H₂O na 50 ml

5x PCR load: 8,8 ml konc.DNALoad
(15 mM EDTA) 0,9 ml H₂O
300 µl 0,5 M EDTA

2x PCR load: 3,5 ml konc.DNALoad
(5 mM EDTA) 6,4 ml H₂O
100 ul 0,5 M EDTA

2,5 M NaAc: 340 g NaAc.3H₂O rozpustené a doplnené na 1 000 ml

10M LiCl: 212 g LiCl (~ 302 g LiCl.H₂O)
H₂O do 500 ml
+ 1 ml 5M NaN₃

4.1.4 PCR

TDV mix: 965 µl H₂O
(na 100 vzoriek) 400 µl 5x LongAmp pufor
15 µl 100 mM MgSO₄
100 µl 10 mM dNTP
20 ul TDV polymerázy

TDV polymeráza: 100 ul Taq polymerázy (~ 500 U)
1,25 ul DeepVent polymerázy (~ 2,5 U)

EA mix: 9,92 ml H₂O
75 µl 500 mM EDTA
10 µl 5 M NaN₃

50mM (NH₄)₂SO₄+1mM EDTA: 49 ml H₂O
1,25 ml 2 M (NH₄)₂SO₄
100 ul 0,5 M EDTA

2M (NH₄)₂SO₄: 13,3 g (NH₄)₂SO₄
rozpustiť v 42,5 ml H₂O

Použité primery:

HPRS LTRrev	CTTCCACCAATCGACGTGTACAGTGC
HPRS UT5for	ATGGCTTCATTTGGTGACCCCGATG
MAV7344rev	TAAGACTACATTTCCCCCTCCCTATGCAAAAAGC
MAV323for	CCTGGGTTGATGGCCGGACCG
MAV97rev	TCCTTCGCCACCAATGGGATCATATAATACC
MAV382for	AAGGCTTCATTTGGTGACCCCGACG
envJfor	GAGAAGACACCCTTGCTGCCAT
envJrev	CGCCCCACCAGTCCCATTAAC
gMETj5for	CAGGTCTGATTGTGAACCGAATATCTTATTCAGAGC
gMETj61rev	CCCTGTCGTGGTTAGAGATAGGGAGC
MAV5226for	TGCTGGTCTGGGGACGAGGTTATGC
HPRS Bcl rev	CGCCTTATGAATGGACTCACTATGATCACTG
HPRS Bcl for	CAGTGATCATAGTGAGTCCATTCATAAGGCG
HPRS XbaIrev	CGTTCGGAATCTAGAGCTGCTCCC

4.1.5 Sekvenovanie

ExoSAPmix: 120 ul H₂O
(100 vzoriek) 20 ul 10xThermoPol
50 ul rSAP (~ 50 U definovaných na p-nitrofenylfosfát)
10 ul ExoI (~ 200 U)

primerMIX: 10 ul 10 mM EDTA
(100 vzoriek) 250 ul 10 uM primer
450 ul H₂O

4.1.6 Zvieratá a bunkové kultúry

Pokusné zvieratá:

Kura: outbredné plemeno Brown Leghorn
inbredná línia CB plemeno White Leghorn

Bunková línia:

DF-1 – kuracia fibroblastová línia bez endogénnych provírusov ALV

F12 médium: 235 ml TK H₂O
250 ml DMEM/F12
15 ml NaHCO₃
40 ml fetálne sérum
10 ml kuracie sérum
5 ml antibiotiká

Trypsin + EDTA 0,125%(w/v) trypsin + 0,01% EDTA v PBS

4.2 Metódy

4.2.1 Molekulárne klonovanie

Transformácia baktérií

50 µl kompetentných baktérií bolo rozmrazených v ľade, hneď po rozmrazení k nim bolo pridaných 2,5 µl ligačnej reakcie a boli krátko, jemne zvortexované. Po 30 minútovej inkubácii pri 0°C nasledoval tepelný šok (50 sekúnd 42°C) a znova inkubácia 5 minút pri 0°C. Následne boli baktérie rozotrené na bakteriálnu misku s priemerom 10 cm s ampicilínovým antibiotikom (100 µg/ml) a inkubované cez noc pri 37°C.

Preparácia plazmidovej DNA

V 10 ml mikrobiologickej skúmavke bolo zaočkovaných 2,2 ml bohatej pôdy transformovanou bakteriálnou kolóniou a ponechané narásť cez noc do stacionárnej fázy. 1,8 ml kultúry bolo následne prenesených do 2 ml centrifugačnej skúmavky a centrifugovaných 5 sekúnd 21 130 RCF pri izbovej teplote, vodná fáza bola odobratá a pelet resuspendovaný v 150 µl TEG intenzívnym vortexom, aby žiadny sediment neostal na dne. Následne bolo za vortexovania pridaných 300 µl NaOH+SDS, potom 450 µl 10M NH₄Ac a nakoniec 500 µl fenol-chloroformu (1:1). Obsah mikroskúmavky bol znovu intenzívne zvortexovaný a centrifugovaný 10 minút za chladenia (5°C). 800 µl vodnej fázy bolo odobraných do 1,5 ml mikroskúmavky a doplnených 500 µl izopropanolu. Po premiešaní bol obsah skúmavky inkubovaný pri izbovej teplote 1 minútu a centrifugovaný 10 minút za izbovej teploty. Vodná fáza bola odstránená a sediment opláchnutý 1 ml 80% etanolu a znovu centrifugovaný 5 minút za izbovej teploty. Sediment bol vysušený pri 50°C, rozpustený v 50 µl TE+RNAse a aspoň 30 minút inkubovaný v 50°C. Takto pripravená DNA mohla byť priamo použitá na transfekciu bunkových kultúr.

Izolácia DNA z low-melting agaróзовého gélu

Požadovaný fragment DNA bol a pod UV 360 nm cez sklenenú dosku vyrezaný a vložený do mikroskúmavky s 950 µl 2M LiCl + 100 µg/ml glykogénu. Nasledovala inkubácia aspoň 10 minút pri izbovej teplote, následne 5 minút pri 70°C, vortex a ochladenie na 40°C. DNA bola potom extrahovaná 400 µl fenolu, vortexovaná a centrifugovaná 10 minút pri 5°C. Vodná fáza bola odobratá do novej mikroskúmavky, doplnená 1 objemom izopropanolu, inkubovaná 10 minút pri izbovej teplote a centrifugovaná 20 minút pri izbovej teplote. Vodná fáza bola

odstránená a sediment opláchnutý 1 ml 80% etanolu bez akéhokoľvek miešania alebo vortexovania. Etanol bol odstránený a sediment sušený pri teplote 50°C. Následne bola DNA rozpustená v 10-50 µl TE+NaN₃.

Ligácia DNA fragmentov

Zloženie ligačných reakcií bolo nasledovné:

50 ng plazmidu

20 ng na každých 100bp dĺžky (inzert)

1 µl 10x lig pufor

1 µl 10 BSA

doplnené H₂O do 10 µl

0,5 µl T4 DNA ligázy (~ 200 NEB jednotiek)

Reakcie boli inkubované pri izbovej teplote po dobu 1 hodiny.

Fúzne PCR

PCR reakcia (prvý stupeň fúzneho PCR) mala takéto zloženie:

11 µl H₂O

4 µl 5x Phusion HF pufor

2,2 µl 10 mM MgCl₂

1 µl 10 mM dNTPs

1 µl 10 µM primer MAV5226for alebo HPRS Xba rev ("vonkajší" primer)

0,2 µl µM primer HPRS Bclrev alebo HPRS Bclfor ("vnútorný" primer)

1 µl plazmidu pHPRS103 linearizovaného enzýmom ApaLI alebo plazmidu pMAV-J

linearizovaného enzýmom EcoRI (oboje nariedené na 5 ng DNA/µl)

1 µl Phusion polymerázy (~ 2 U)

Na PCR reakciu bol použitý tento program:

90°C 10 sek.

98°C 60 sek.

(98°C 10 sek.

72°C 5 min.)_{12x}

72°C 20 min.

5°C

Fúzna reakcia (druhý stupeň fúzneho PCR) mala takéto zloženie:

27,5 µl H₂O

10 µl 5x Phusion HF pufor

5,5 µl 10 mM MgCl₂

2,5 µl 10 mM dNTPs

2,5 µl primer MAV5226for

2,5 µl primer HPRS XbaIrev

0,5 µl DNA PCR reakcie s fragmentom KpnI – BclI

0,5 µl DNA PCR reakcie s fragmentom BclI – XbaI

2,5 µl Phusion polymerázy (~ 5 U)

Na fúznu PCR reakciu bol použitý tento program:

90°C 10 sek.

98°C 60 sek.

(98°C 10 sek.

65°C 5 min.

72°C 5 min.)_{4x}

(98°C 10 sek.

72°C 10 min.)_{8x}

72°C 20 min.

5°C

4.2.2 Indukcia nádorov

Práca s tkanivovými kultúrami a pasážovanie buniek

Práca s tkanivovými kultúrami (transfekcia, infekcia, rozmrazovanie, zamrazovanie, titrácia, pasážovanie) bola vykonávaná za sterilných podmienok s použitím laminárneho boxu. Laminárny box bol pred aj po práci sterilizovaný UV-C žiarením aspoň po dobu 30 minút. Všetky pomôcky, ktoré prišli do kontaktu s tkanivovými kultúrami, boli sterilné a ostatné nástroje a priestory boli udržiavané v čistote a poriadku. Nepotrebné zvyšky organického materiálu, ako aj kontaminácie boli dezinfikované s použitím 10% roztoku chlórnanu sodného. Bunkové kultúry boli kultivované na miskách s adhezívnym povrchom v biologickom termostate pri 5% CO₂ a teplote 37°C. Pasážovanie prebiehalo tak, že z misiek bolo odstránené sérové médium a následne boli bunky opláchnuté PBS. Po odsatí PBS bol pridaný roztok trypsinu + EDTA tak, aby bol povrch buniek pokrytý roztokom a bunky neostali suché. Misky

s bunkami boli kultivované pri 37°C menej ako 5 minút, prípadne kým sa bunky viditeľne nepustili od dna kultivačnej misky. Následne bolo k bunkám pridané médium so sérom (1-2 ml média na P100, 0,5-1 ml média na P60) a bunky boli pomocou pipety stiahnuté z povrchu misky prúdom média, kým nevznikla bunková suspenzia. Potrebné množstvo buniek bolo následne odobraté zo suspenzie a prenesené na novú misku s kultivačným médiom. Bunky boli pasážované podľa potreby v rozmedzí od jednej polovice po jednu desatinu. Objem kultivačného média sa pohyboval v odporúčanom rozmedzí pre daný rozmer misky.

Transfekcia

Transfekcia prebiehala metódou s použitím PEI (polyetylénimin). Bunky boli vysiate na P60 misku tak, aby boli semikonfluentné až konfluentné. Na transfekciu boli pripravené 2 mikroskúmavky objemu 1,5 ml, pričom v jednej bolo zmiešaných 250 µl DMEM a 5 µg DNA a v druhej skúmavke bolo zmiešaných 240 µl DMEM a 10 µl PEI. Následne bol obsah oboch mikroskúmaviek zmiešaný spolu, zvortexovaný a inkubovaný pri izbovej teplote po dobu 1 hodiny. Následne bolo z buniek odsaté médium, bunky boli opláchnuté PBS a následne bola opatrne pridaná transfekčná zmes. Po 3-4 hodinách bol k bunkám pridaný 1 ml rastového média a bunky boli kultivované do druhého dňa za štandardných podmienok. Na druhý deň bolo médium vymenené za rastové médium s plným obsahom séra v objeme doporučenom pre danú veľkosť misky a bunky boli ďalej kultivované v štandardných podmienkach.

Titrácia vírusu

Vírus bol titrovaný pomocou metódy konečného riedenia. Na experiment boli použité bunky DF-1/GFP nesúce vírus RCAS, ktorý namiesto génu env obsahoval gén pre GFP. Tento vírus bol v dôsledku chýbajúceho env génu neinfekčný. Po pridaní retrovírusu obsahujúceho env gén (v tomto prípade HPRS-103 alebo MAV-J) došlo k „záchrane“ vírusu RCAS, ktorý sa stal infekčný vďaka získaniu obalového glykoproteínu, čím v kultúre vznikli dva typy vírusových častíc. Jedny obsahujúce nami pridaný vírus a druhé obsahujúce genóm vírusu RCAS s absenciou env génu, obsahujúce obalový glykoproteín z nami pridaného vírusu (HPRS-103 alebo MAV-J). Supernatant z týchto buniek bol následne použitý na infekciu čistých buniek DF-1 a bola pozorovaná schopnosť vírusov obsahujúcich GFP infikovať bunky, čo bolo detegované pomocou GFP signálu na prietokovom cytometri.

Titrácia pomocou metódy konečného riedenia prebiehala počas 10 dní.

Prvý deň boli bunky DF-1/GFP vysiate na 12 jamkovú doštičku po 5×10^4 na jamku.

Druhý deň bolo z buniek odsaté médium, bunky v každej jamke boli opláchnuté 1ml PBS

a následne infikované objemom 100 μ l média obsahujúceho vírus (HPRS-103 alebo MAV-J), ktorý bol riedený desiatkovou radou. Pozitívna kontrola bola infikovaná médiom s neriedeným vírusom, negatívna kontrola bola infikovaná médiom bez vírusu. Bunky boli premiestnené naspäť do termostatu a po 30 minútach bolo bunkám pridané rastové médium v objeme 1 ml na jamku.

Piaty deň boli bunky spasáňované na polovicu.

Siedmy deň boli vysiate bunky DF-1 (neobsahujúce GFP) a to 25×10^4 na jamku na 24 jamkovú doštičku (s použitím len dvanástich jamiek).

Ôsmy deň boli čisté bunky DF-1 infikované médiom odobraným z DF1/GFP infikovaných buniek. Najprv bolo z infikovaných buniek odobratých 500 μ l média, ktoré bolo stočené po dobu 5 minút (1300 RCF) a následne z toho odobraných 250 μ l do novej skúmavky, z ktorých sa na infekciu používalo opäť 100 μ l. Pred infekciou boli DF-1 bunky opláchnuté 1 ml PBS. Infekcia prebiehala opäť 30 minút v termostate, po uplynutí ktorých bol bunkám doplnený 1 ml rastového média.

Desiaty deň boli bunky v objeme 200 μ l prenesené na 96 jamkovú doštičku s U profilom dna. Bunky boli následne centrifugované 5 minút pri 320 RCF a po dekantácii supernatantu od buniek boli bunky resuspendované v 150 μ l PBS s Hoechst 33258. Nasledovala analýza na prietokovom cytometri LSR II (BD Biosciences), ktorý je súčasťou Centra mikroskopie ÚMG. Výsledné hodnoty sú prienikom čelného a bočného rozptylu, GFP fluorescencie (488 nm) a Hoechst (406 nm) každej zaznamenatej udalosti.

Výsledky boli analyzované pomocou programu FlowJo 9, pričom do úvahy boli brané jednotlivé bunky určitej veľkosti a granularity, ktoré boli živé (a teda negatívne na Hoechst) a GFP pozitívne.

Infekcia embryí

12 denné kuracie embryá plemena Brown Leghorn a White Leghorn línie CB boli infikované 100 μ l vírusu (titer pre HPRS-103 zodpovedá 10^4 /ml, pre MAV-J 10^5 /ml), alebo 100 000 vírus produkujúcimi bunkami DF-1 (v 100 μ l média) . V tejto práci boli použité dva vtáacie retrovírusy podskupiny J – HPRS-103 a MAV-J. Infekcia bola vykonaná intravenózne do chorioalantoickej žily.

Test na preinfikovanosť

Na overenie rozšírenia vírusu v kurčatách boli odobrané vzorky z jednotlivých orgánov 3 a 36 dní po infekcii jedincov plemena Brown Leghorn. Tie boli následne analyzované pomocou semikvantitatívneho PCR na zistenie počtu provírusov v bunkách jednotlivých orgánov. DNA izolovaná z orgánov bola amplifikovaná paralelne s niekoľkými štandardami, pripravenými z DNA neinfikovaného kurča primiešaním klonovanej DNA vírusu MAV-J v množstve zodpovedajúcom 0, 0,5, 1,5, 5 a 15 provírusom na genóm. Na to boli použité dve sady primerov – jedna na amplifikovanie časti génu env J (časť špecifická pre provírus) a druhá na amplifikovanie časti génu MET (časť špecifická pre kuraciu DNA). Amplifikačná reakcia mala takéto zloženie na 1 reakciu:

17,8 µl TDV mix

0,2 µl TDV polymeráza

1 µl 10 µM primer envJfor

1 µl 10 µM primer envJrev

1 µl 10 µM primer gMETj5for

1 µl 10 µM primer gMETj61rev

1 µl DNA (~ 100 ng)

Amplifikácia prebiehala pomocou programu:

90°C 10 sek.

95°C 2 min.

(95°C 20 sek.

65°C 4 min.)_{21x}

95°C 20 sek.

65°C 10 min.

5°C

Vzorky boli následne nanosené na 2% Sigma agarózový gél a elektroforéza bola nastavená na 1 hodinu pri 70 V.

Odbery a spracovanie tkanivových vzoriek

Nádorové vzorky veľkosti približne 10 mm³ boli odoberané za účelom izolácie DNA a histologickej analýzy. Vzorky určené na izoláciu DNA a molekulárnu analýzu boli odoberané

z miest vnútri nádoru na rozdiel od histologických vzoriek, ktoré boli odoberané z rozhrania nádoru a okolitého tkaniva kvôli lepšiemu rozlíšeniu medzi nádorovou a nenádorovou časťou.

Vzorky nádorov získané z Veľkej Británie

Okrem vzoriek indukovaných v laboratóriu bunkovej a vírusovej genetiky boli v tejto práci spracovávané aj vzorky pochádzajúce z Veľkej Británie z pokusov skupiny Dr. Venugopala Naira (The Pirbright Institute, Veľká Británia). Ide o vzorky nádorov indukované u kureniec línie 21 mäsového typu a SPF (specific pathogen-free) línie 0 a 15 pomocou vírusov podskupiny J a A. Jedná sa o dva vírusy podskupiny J: HPRS-103 ako prírodný izolát a HPRS-103dXSR (HPRS-103 s deléciou časti genómu nazývanej XSR alebo tiež E-element) a dva vírusy podskupiny A: MQ-NCSU (podľa bunkovej línie MQ-NCSU, z ktorej pochádza) a HPRS(A), ktorý namiesto env génu podskupiny J obsahuje env gén podskupiny A. Kurenice boli v tomto pokuse infikované buď v jedenástom embryonálnom dni do chorioalantoickej žily, alebo v prvý deň po vyliahnutí intraperitoneálnou inokuláciou a to len vírusom. Jedince boli usmrčované podľa potreby v rozmedzí od 14. dňa života až po 168. deň.

4.2.3 Identifikácia miest integrácie

Izolácia genómovej DNA

Vzorky určené na molekulárne spracovanie boli okamžite po odbere vložené do 0,5 ml DNALysis roztoku a následne rozpúšťané aspoň cez noc pri teplote 50°C za pomalého prevracania skúmavky.

Rozpustené vzorky boli následne inkubované pri teplote 70°C po dobu dvoch hodín kvôli autolýze a deaktivácii proteínázy K. Nasledovalo pridanie 20 µl roztoku RNázyA, okamžitý vortex, inkubácia 30 minút pri teplote 25°C a 30 minút pri teplote 50°C, následná extrakcia 0,3 ml fenol-chloroformu, centrifugácia 10 minút 21 130 RCF za chladenia a odber vodnej fázy. K vodnej fáze boli pridané dva objemy 80% etanolu a prevracaním skúmavky došlo k zrazeniu vlákien DNA, ktorá bola následne namotávaná na sklenenú mikrotučinku a oplachovaná v 1 ml 80% etanolu. Nakoniec bola DNA niekoľko dní rozpúšťaná v 25-200 µl TE+NaN₃ v závislosti na jej množstve (subjektívny odhad).

Rozpustená DNA bola nariedená na koncentráciu (približne) 100 ng/µl. Koncentrácia bola meraná pomocou prístroja Qubit® fluorometer (Invitrogen) podľa priloženého návodu.

iPCR (HPRS-103)

Samotnej amplifikácii fragmentov chromozomálnej DNA predchádzajú kroky, kedy genómová DNA prechádza štiepením, ligáciou vzniknutých fragmentov za ich nízkej koncentrácie (cirkularizácia) a linearizáciou spôsobom, aby boli konečné fragmenty zložené z bunečnej DNA ohraničenej koncovými časťami provírusu.

Štiepenie

Na každú vzorku bola použitá štiepna reakcia objemu 22 μ l. Objem enzýmov bol prepočítaný na $\geq 4 U_{o/n}$ na reakciu (jednotky pre 15-hodinové štiepenie boli empiricky určené predchádzajúcim testovaním). Reakcia mala nasledujúce zloženie:

10 μ l DNA (zodpovedá 1 μ g DNA)

8 μ l H₂O

1 μ l 10xNEB3 pufor

1 μ l 10xBSA_{sp}

0,12 μ l PstI

0,04 μ l NsiI

Reakcie boli inkubované aspoň 15 hodín pri teplote 37°C a následne enzýmy inaktivované 15 minút pri teplote 80°C.

Ligácia

K štiepnej reakcii bol pridaný ligačný mix objemu 490 μ l na vzorku, s týmto zložením:

390 μ l H₂O

50 μ l 10xlig pufor

50 μ l 10xBSA

0,1 μ l ligázy (zodpovedá 40 NEB jednotkám)

Reakcie boli inkubované aspoň 15 hodín pri teplote 20-25°C. Následne bolo do každej reakcie pridaných 125 μ l roztoku 5xDNA_{purif} a 80 μ l 2,5M NaAc. DNA bola extrahovaná pridaním 500 μ l fenol-chloroformu, nasledoval vortex, stočenie 10 minút pri teplote 5°C, odber vodnej fázy, zrážanie 5 minút so 700 μ l izopropanolu a centrifugácia 20 minút pri izbovej teplote. Nasledoval oplach 1 ml 80% etanolu a centrifugácia pri izbovej teplote po dobu 5 minút.

Linearizácia

Vzorky boli náhodne rozdelené do skupín pre linearizáciu rôznymi enzýmami a to ApaLI, BclI a BstXI. Linearizácia prebiehala v objeme 12 μ l linearizačného roztoku s nasledujúcim zložením:

10 μ l H₂O

1 μ l 10x NEB X (2 alebo 3, podľa použitého enzýmu)

1 μ l 10x BSAsp

K tomuto roztoku boli pridané linearizačné enzýmy v množstve 4 U_{o/n} (určených testovaním) na reakciu.

DNA bola v linearizačnom roztoku rozpúšťaná približne 5 minút pri izbovej teplote, po čom nasledoval intenzívny vortex, ďalšia inkubácia 5 minút pri izbovej teplote a znova intenzívny vortex. Takto homogenizovaná zmes bola premiestnená do 37°C (pre ApaLI a BstXI) alebo 50°C (pre BclI) a inkubovaná aspoň 15 hodín. Následne bolo k linearizačným reakciám pridaných 40 μ l EAmixu a celý obsah bol prenesený do 600 μ l mikroskúmavky a zamrazený.

PCR

Zloženie reakcie bolo takéto:

15 μ l TDVmix

2 μ l mix primerov (L, C alebo R mix)

5 μ l reakčnej zmesi po linearizácii (~ 100 ng DNA)

Každá vzorka linearizovanej DNA bola amplifikovaná s použitím L, C a R mixu primerov v troch osobitných reakciách (výsledná koncentrácia primerov bola 0,5 μ M).

L-mix: HPRS LTR rev + HPRS UT5 for - amplifikácia DNA vľavo od provírusu

C-mix: HPRS LTR rev + MAV323for - amplifikácia DNA na oboch stranách provírusu

R-mix: MAV7344rev + MAV323for - amplifikácia DNA vpravo od provírusu

Na amplifikáciu DNA pomocou polymerázovej reťazovej reakcie bol použitý program

90°C 10 sek.

95°C 20 sek.

(95°C 20 sek.

65°C 12 min.)^{22x}

95°C 20 sek.

65°C 20 min.

95°C 20 sek.

65°C 30 min.

5°C

Analytický gél

2 µl PCR vzorky + 6 µl 1xloadEDTA bolo nanosených na 2% analytický gél pripravený s použitím Sigma agarózy a TBE pufru s etídium bromidom (v koncentrácii 1 µg/ml). Elektroforéza bola pustená najprv na 300 V po dobu 30 minút, následne bol gél odfotený na zistenie prítomnosti krátkych fragmentov a potom bola elektroforéza znova pustená tentokrát na 200V po dobu 90 - 120 minút. Z analytického gélu bola overená klonalita nádorov a boli vybraté PCR reakcie vhodné na ďalšiu analýzu a izoláciu jednotlivých PCR fragmentov. Z identických nádorových klonov, predstavujúcich metastázy, bol vybraný len jeden reprezentant a pre každú vzorku boli vybrané buď reakcie s L a R-mixom, alebo len reakcie s C-mixom.

Preparatívny gél

15 µl iPCR reakcie + 2 µl 5xPCRloadEDTA bolo nanosených na 3% preparatívny gél pripravený z NuSieveGTG agarózy a TBE+NaAc pufru. Elektroforéza bola pustená na 55 V po dobu 15 hodín s použitím recirkulácie pufru a externého chladenia. Gél bol následne farbený v etídium bromide (2 µg/ml) približne 1 hodinu. Gél bol odfotený z dôvodu vyznačenia a pomenovania jednotlivých fragmentov; následne boli tieto fragmenty pod UV (360 nm cez sklenenú dosku) vyrezané a prenesené do 600 µl mikroskúmaviek so 100 µl 50mM (NH₄)₂SO₄+1mM EDTA.

Reamplifikácia

Mikroskúmavky boli ohriate na 70°C po dobu 10 minút, následne boli zvortexované a ochladené na 45°C. Z jednotlivých vzoriek bolo použitých 0,3 µl, 0,5 µl alebo 1 µl DNA na reamplifikačnú reakciu (podľa intenzity fragmentu na preparatívnom géle). Reamplifikačná PCR reakcia mala zloženie

7,5 µl TDV mix

2,5 µl H₂O

1 µl mix primerov

0,3/0,5/1 µl DNA

Na reamplifikáciu bol použitý program

90°C 10 sek.

95°C 20 sek.

(95°C 20 sek.

65°C 12 min.)_{12x}

95°C 20 sek.

65°C 20 min.

95°C 20 sek.

65°C 30 min.

5°C

Po reamplifikácii boli niektoré náhodne vybrané vzorky nanosené na analytický gél na overenie správnosti reamplifikácie.

Sekvenácia

dNTP a primery v reamplifikačnej reakcii boli eliminované pôsobením exonukleázyI a SAP fosfatázy. 1 µl PCR produktu po reamplifikácii bolo zvortexovaných s 2 µl ExoSAPmix a následne inkubovaných 30 minút na 37°C a 30 minút na 80°C. Po tomto boli reakcie ochladené na izbovú teplotu a doplnené 8 µl primerMIXu (pre L a C fragmenty bol v PrimerMIXu používaný primer HPRS LTRrev, pre R a C fragmenty primer MAV323for). Takto pripravené vzorky boli odoslané na sekvenáciu Sangerovou metódou do firmy GATC Biotech (GenSeq s.r.o.).

iPCR (MAV-J)

Postup iPCR pre nádory indukované pomocou vírusu MAV-J mal nasledujúce obmeny oproti HPRS-103:

Štiepenie (MAV-J)

Na štiepenie genómovej DNA boli použité enzýmy BstYI a BclI. Inkubácia vzoriek teda prebiehala aspoň 15 hodín pri teplote 50°C. Keďže tieto enzýmy patria medzi termostabilné, ich následná eliminácia pri 80°C nebola možná. Vzorky teda museli byť purifikované pomocou pridania 100 µl H₂O a 100 µl 2xDNApurif a následne extrahované 150 µl fenol-chloroformu (vortex, centrifugácia 10 minút 21 130 RCF za chladenia, odber vodnej fázy do novej mikroskúmavky). Následne bolo k odobratej vodnej fáze pridaných 200 µl izopropanolu a vzorky boli 5 minút zrážané pri izbovej teplote a následne centrifugované 20 minút pri

izbovej teplote. Pelet usadený na dne mikroskúmavky bol následne opláchnutý 1 ml 80% etanolu bez vortexovania a centrifugovaný za izbovej teploty ďalších 5 minút.

Ligácia (MAV-J)

Po usušení bolo k peletu pridaných najprv 50 μ l ligačnej zmesi bez ligázy s týmto zložením:

400 μ l H₂O

50 μ l 10xlig pufor

50 μ l 10xBSA

Vzorky boli 5 minút inkubované pri izbovej teplote, následne intenzívne zvortexované a opäť inkubované 5 minút pri izbovej teplote a intenzívne zvortexované. Až následne bolo do každej vzorky pridaných 450 μ l ligačného roztoku doplneného 0,05 μ l ligázy (zodpovedá 20 U_{NEB}).

Linearizácia (MAV-J)

Vzorky boli linearizované len enzýmom ApaLI v množstve 4 U_{o/n} na reakciu.

PCR (MAV-J)

Na PCR reakciu boli v prípade vzoriek indukovaných pomocou vírusu MAV-J použité nasledujúce mixy primerov:

L-mix: MAV97rev + MAV382for

C-mix: MAV97rev + MAV323for

R-mix: MAV7344rev + MAV323for

Sekvenácia(MAV-J)

Pre sekvenáciu L a C fragmentov bol v PrimerMIXu používaný primer MAV97rev, pre R fragmenty primer MAV323for.

Štatistika

Štatistická významnosť prítomnosti provírusov integrovaných do rovnakého genomického lokusu v nezávislých tumoroch bola vypočítaná na základe predpokladu plne náhodnej integrácie. Keďže presný výpočet by bol príliš komplikovaný aj s týmto zjednodušením, boli vytvorené rovnice pre vrchné a spodné medze pravdepodobnosti pre každý CIS zhluk. Pre výpočet P_{spodné} bol kurací genóm dĺžky L= 1,3 x 10⁹ rozdelený do neprekrývajúcich sa úsekov dĺžky l (veľkosť zhluhu v bp) a bola vypočítaná pravdepodobnosť, s ktorou aspoň n (počet

zásahov v zhluku) z N (celkový počet provírusov) zasiahlo rovnaký úsek. Táto hodnota očividne podceňuje reálnu pravdepodobnosť náhodného vzniku zhluku, keďže ignoruje zhluky formované cez hranicu medzi príslušnými úsekmi. $P_{\text{vrchné}}$ bola kalkulovaná podobne, až na to, že boli sčítané pravdepodobnosti pre všetky možné úseky dĺžky l (teda každý náhodný zhluk bol započítaný veľakrát. Výsledné rovnice boli:

$$P_{\text{spodné}} = 1 - (1 - P_1)^{L/l}; \text{ pre } P_1 \text{ blízke nule } P_{\text{spodné}} \sim P_1 \cdot L/l$$

$$P_{\text{vrchné}} = 1 - (1 - P_1)^L; \text{ pre } P_1 \text{ blízke nule } P_{\text{vrchné}} \sim P_1 \cdot L$$

kde P_1 je pravdepodobnosť, že aspoň n provírusov z N sa nachádza v jednom konkrétnom úseku dĺžky l;

$$P_1 = \sum_{k=n}^N \binom{N}{k} \left(\frac{l}{L}\right)^k \left(1 - \frac{l}{L}\right)^{N-k}$$

Vzorec pre výpočet P bol vytvorený Dr. Michalem Kolářem, Oddelenie genomiky a informatiky, ÚMG AV ČR.

5 Výsledky

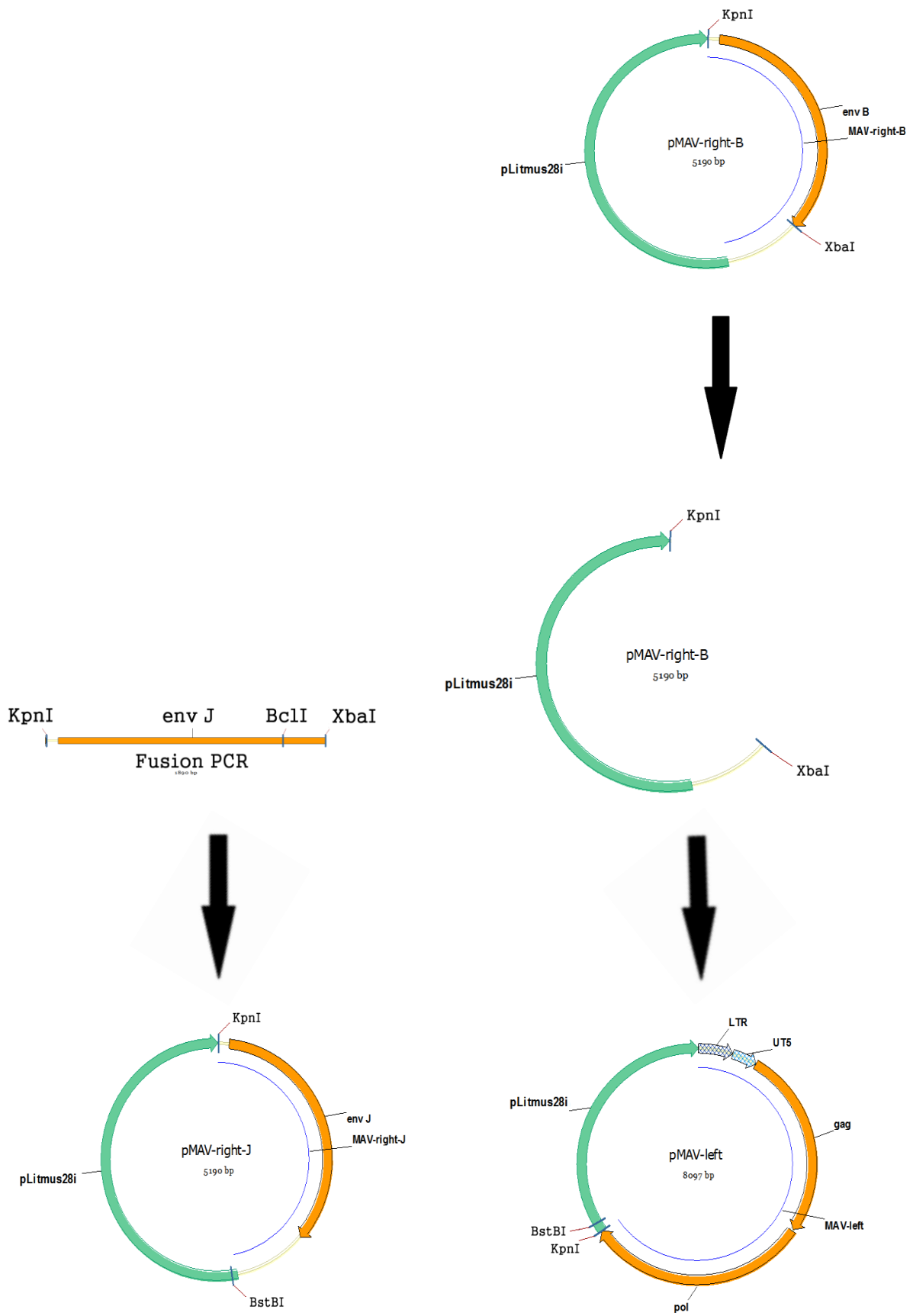
5.1 Klonovanie

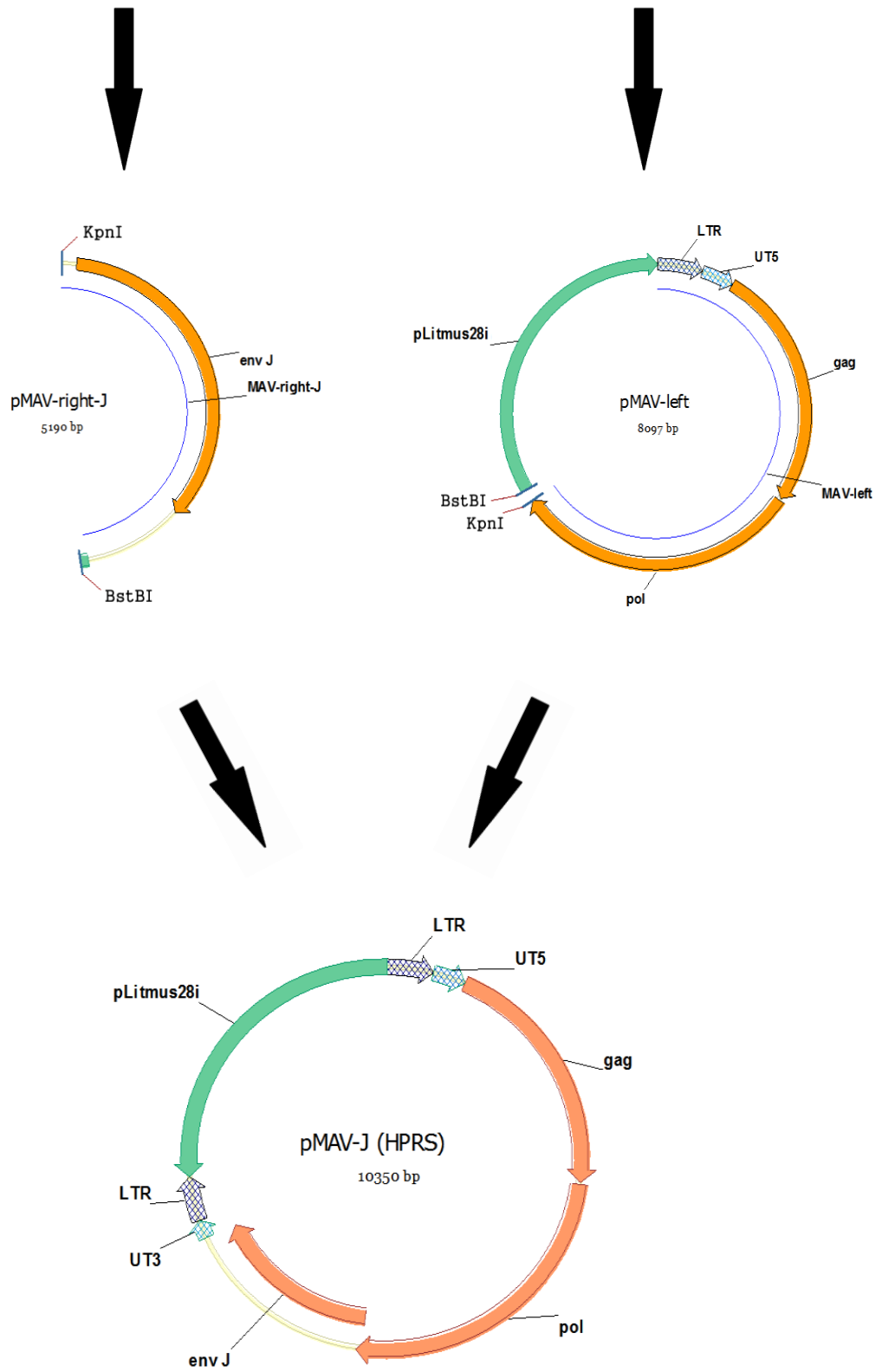
Cieľom klonovania v tejto práci bolo vytvorenie vírusu MAV-J pomocou výmeny génu env podskupiny B z pôvodného MAV-B, za env podskupiny J z prírodného izolátu vírusu HPRS-103. Vymenený bol úsek od KpnI miesta na konci génu pol až po XbaI miesto na konci génu env. Keďže XbaI miesto sa vo víruse HPRS-103 na konci génu env nenachádza, bolo potrebné toto miesto vytvoriť a takisto bolo vytvorené aj BclI miesto, ktoré bolo neskôr využité pri iPCR. Obe miesta boli vytvorené zavedením tichej bodovej mutácie. Pomocou PCR boli pripravené dva úseky DNA – jeden od KpnI miesta po novovytvorené BclI pomocou primerov MAV5226for a HPRS Bcl rev, druhý od BclI po XbaI pomocou primerov HPRS Bcl for a HPRS Xba rev.

Takto získané úseky DNA boli následne spojené pomocou fúzneho PCR, kde si oba úseky boli navzájom primermi aj templátmi, čím vznikla časť DNA od KpnI miesta po XbaI miesto obsahujúca celý env-J.

Takto pripravený env-J bol vymenený za pôvodný env B. Pracovalo sa s dvomi plazmidmi, ktorých základ tvoril Litmus 28-i a časť vírusu MAV-B. Jeden plazmid bol pMAV-left obsahujúci „ľavú“ stranu vírusu s ľavým LTR, celým génom gag a väčšinou génu pol (až po miesto KpnI), druhý bol pMAV-right-B obsahujúci „pravú“ časť vírusu MAV-B s koncom génu pol (od miesta KpnI), celým génom env B a pravým LTR.

Poskladanie konečného vírusu MAV-J prebiehalo v niekoľkých krokoch. V prvom kroku bol v plazmide pMAV-right-B vymenený úsek od KpnI na konci génu pol až po XbaI miesto na konci génu env-B za nami vytvorený env-J. Takto vznikol pMAV-right-J, ktorého správnosť bola overená sekvenovaním. V druhom kroku bol pMAV-right-J rozštiepený enzýmami KpnI a BstBI a fragment zodpovedajúci env-J+UT3+LTR bol izolovaný z agarózového gélu. Tento fragment bol potom vložený do vektoru pMAV-left linearizovaného taktiež enzýmami KpnI a BstBI, čím vznikol pMAV-J - kompletný vírus vo vektore Litmus 28-i.





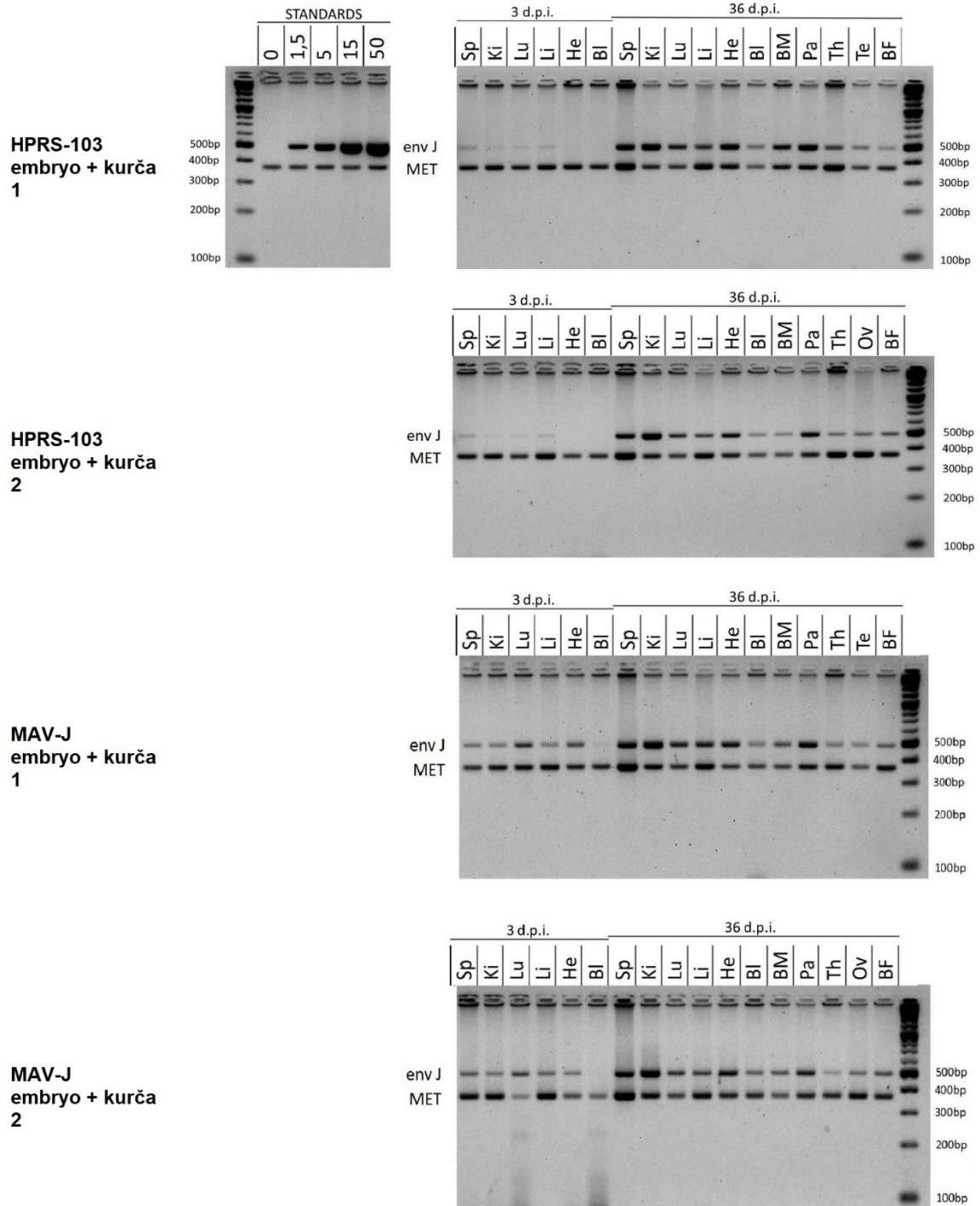
5.2 Úspešnosť infekcie

Na zistenie toho, či sa vírus po infekcii embrya rozšíril z krvného riečiska do orgánov a jednotlivých tkanív kurat'a bol vykonaný jednoduchý test na preinfikovanosť. 3 alebo 36 dní po infekcii (d.p.i.) boli odobrané vzorky tkaniva z väčšiny orgánov. Súbor odobraný 36 d.p.i. je väčší, nakoľko 3 d.p.i. (15. embryonálny deň) nebol odber niektorých orgánov možný. Ide o vzorky kostnej drene, pankreasu, týmusu, pohlavných orgánov (ováriá/semenníky) a Fabriciovej burzy. Vzorky boli spracované a vyhodnotené semi-kvantitatívne s použitím metódy PCR. Išlo o amplifikáciu dvoch úsekov DNA, pričom jeden úsek zodpovedal prítomnosti provírusového génu env J a bol 494 bp dlhý, a druhý úsek zodpovedal prítomnosti génu vyskytujúceho v jednej kópii v kuracom genóme a bol dlhý 370 bp. Týmto genóm bol MET (MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase). Zároveň boli amplifikované umelo pripravené štandardy, do ktorých bolo vnesené známe množstvo provírusov na kurací genóm. Tieto štandardy spolu s internou kontrolou (MET genóm) slúžili na semi-kvantitatívne porovnanie a určenie približného počtu provírusov v odobraných vzorkách na základe intenzity bandu na agarózovom géle po elektroforéze. Takto testovaných bolo 8 laboratórnych zvierat (2 vzorky 3 d.p.i. HPRS-103, 2 vzorky 36 d.p.i. HPRS-103, 2 vzorky 3 d.p.i. MAV-J, 2 vzorky 36 d.p.i. MAV-J), ktoré boli porovnávané s 5 štandardami zodpovedajúcimi počtu 0; 1,5; 5; 15 a 50 provírusov na genóm.

3 dni po infekcii vírusom HPRS-103 bolo pokusné zviera preinfikované len mierne. V prípade vzoriek krvi (Bl) a srdca (He) neboli provírusy vôbec detegovateľné, v prípade ostatných odobraných vzoriek boli provírusy prítomné v množstve rádovo menšom než 1 provírus na genóm.

36 d.p.i. vírusom HPRS-103 boli provírusy prítomné vo všetkých odobraných vzorkách tkanív vrátane krvi a srdca,. Podľa subjektívneho semi-kvantitatívneho hodnotenia sa najviac provírusov vyskytovalo vo vzorkách odobraných z obličiek (Ki) - okolo 5 provírusov na genóm. 3 dni po infekcii vírusom MAV-J boli provírusy detegovateľné vo všetkých odobraných tkanivách okrem krvi a to v úrovniach menších ako 1 provírus na genóm. 36 d.p.i. vírusom MAV-J boli všetky odobrané tkanivá preinfikované a množstvo provírusov bolo prakticky totožné ako po infekcii vírusom HPRS-103 vrátane najvyššej úrovne približne 5 provírusov na genóm v obličkách.

Z výsledkov možno uzavrieť, že oba vírusy sú schopné preinfikovať všetky tkanivá. Infekcia vírusom MAV-J prebiehala rýchlejšie ako vírusom HPRS-103, no najneskôr do 36. dňa po infekcii sa úroveň preinfikovanosti u oboch vírusov vyrovnala.



Obrázok 5: Semikvantitatívna detekcia prítomnosti provírusov v jednotlivých orgánoch 3 a 36 d.p.i. . Pomenovanie vzoriek jednotlivých orgánov vychádza z anglických názvov a zodpovedá jednotlivým orgánom takto: Sp – slezina, Ki – obličky, Lu – pľúca, Li – pečeň, He – srdce, Bl – krv, BM – kostná dreň, Pa – pankreas, Th – týmus, Te – semenníky, Ov – ovárium, BF – Fabriciova burza.

5.3 Priebeh in vivo pokusov

Keďže in vivo pokusy boli závislé od niekoľkých faktorov (počet a kvalita vajec v závislosti od ročného obdobia a vyťaženia dodávateľa, čistota a kvalita práce pri infekcii embryí, prežívanie pri liahnutí a v prvých dňoch života), bol počiatočný počet jedincov v pokuse vždy iný. Priebeh pokusov je prehľadne znázornený grafom časového vývoja počtu ostávajúcich kurčiat a výskytu nádorov v jednotlivých skupinách (tabuľky a grafy). Každý graf je súhrnom viacerých sérií pokusov. Nejedná sa o krivku prežívania, keďže pokusné zvieratá boli usmrtené ako v prípade vykazovania zlého zdravotného stavu, tak na základe náhodného výberu. Ukazujú ale dĺžku latencie, po ktorej sa u zvierat objavili nádory.

Na grafoch skupín infikovaných HPRS-103 je možné pozorovať veľký počiatočný úhyn jedincov. To je spôsobené tým, že časti kurčiat bol peritoneálne aplikovaný nitrilotriacetát železa (Fe-NTA), ktorý u hlodavcov silno promotuje renálne tumory (Athar and Iqbal 1998). Cieľom bolo získať pre molekulárnu analýzu aj súbor renálnych adenómov, ktoré (len s nízkou frekvenciou) vznikajú po infekcii kurčiat vírusom HPRS-103 (L. N. Payne, Gillespie, and Howes 1992). Orientačné krátkodobé pokusy (tu neuvádzané) ukázali značnú toxicitu FeNTA pre kurčatá a žiaden výrazný tumor promočný efekt. Pre ďalšie pokusy boli preto zvolené dávky FeNTA na hrane toxicity, po ktorých dochádzalo k čiastočnému úhynu kurčiat. Ani za takých podmienok neboli pozorované ani renálne adenómy, ani žiaden promočný efekt na ostatné typy nádorov. Z tohto dôvodu Fe-NTA nebol v nasledujúcich pokusoch používaný.

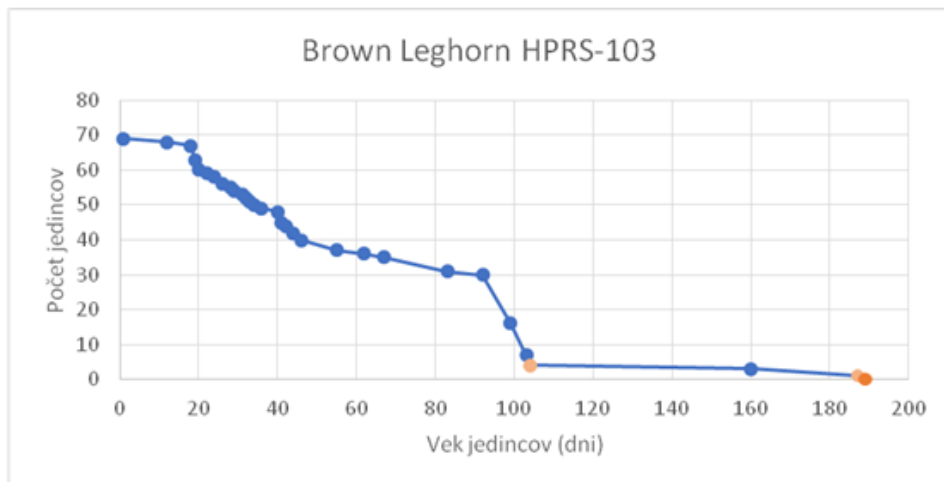
Z grafu možno vyvodit' nasledujúce pozorovanie:

1. Latencia vzniku nádorov je v prípade vírusu MAV-J výrazne kratšia, než v prípade vírusu HPRS-103 (> 50 dní versus > 100 dní v prípade outbreďných Brown Leghorn, > 50 dní versus > 75 dní v prípade inbreďných White Leghorn). Rovnako tak penetrácia nádormi je po infekcii MAV-J väčšia, než po infekcii HPRS-103 (vid' aj nasledujúca kapitola). To je v súlade s očakávaním a vyplýva to z väčšej sily promotóru a enhanceru u MAV vírusov (nepublikované dáta Oddelenia vírusovej a bunkovej genetiky AV ČR).
2. White leghorn sú k indukcii nádorov náchylnejšie, než Brown leghorn, čo sa prejavuje ako kratšou latenciou, tak väčším počtom nádorov (vid' aj nasledujúca kapitola).

Brown Leghorn HPRS-103

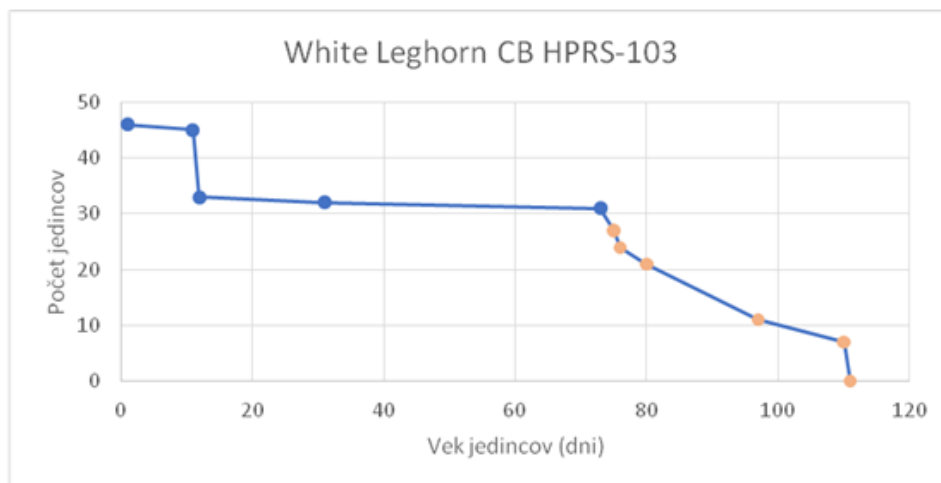
vek jedincov	1	12	18	19	20	22	24	26	28	29	31	32	33	34	36
počet jedincov	69	68	67	63	60	59	58	56	55	54	53	52	51	50	49

40	41	42	44	46	55	62	67	83	92	99	103	104	160	187	189
48	45	44	42	40	37	36	35	31	30	16	7	4	3	1	0



White Leghorn CB HPRS-103

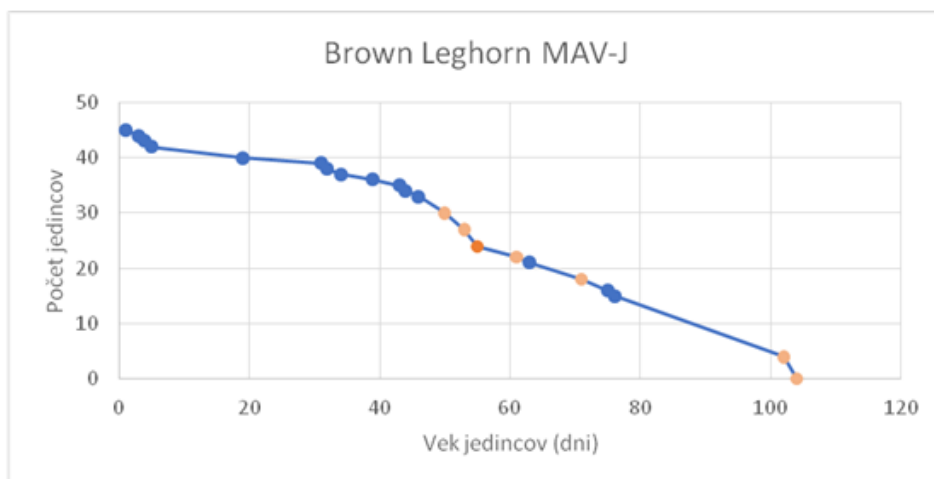
vek jedincov	1	11	12	31	73	75	76	80	97	110	111
počet jedincov	46	45	33	32	31	27	24	21	11	7	0



Brown Leghorn MAV-J

vek jedincov	1	3	4	5	19	31	32	34	39	43	44	46
počet jedincov	45	44	43	42	40	39	38	37	36	35	34	33

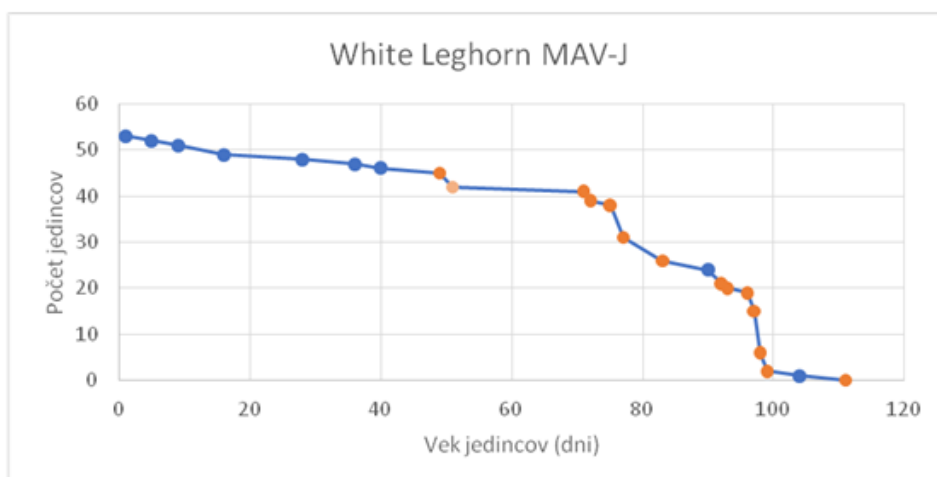
50	53	55	61	63	71	75	76	102	104
30	27	24	22	21	18	16	15	4	0



White Leghorn CB MAV-J

vek jedincov	1	5	9	16	28	36	40	49	51	71	72	75
počet jedincov	53	52	51	49	48	47	46	45	42	41	39	38

77	83	90	92	93	96	97	98	99	104	111
31	26	24	21	20	19	15	6	2	1	0



Tabuľky a grafy 1: V grafoch sú modrou farbou vyznačené body, ktoré reprezentujú skupiny jedincov bez akéhokoľvek nádoru, bledočervenou farbou sú vyznačené skupiny jedincov, kde niektoré (avšak nie všetky) zvieratá boli pozitívne na prítomnosť nádoru a tmavočervené body reprezentujú skupiny jedincov 100% pozitívne na prítomnosť nádorov. Ku grafom sú uvedené aj tabuľky hodnôt, ktoré boli použité na vytvorenie grafu. Počet jedincov značí počet kurčiat, ktoré po danom dni ostali, preto je v poslednom stĺpci vždy uvedené 0

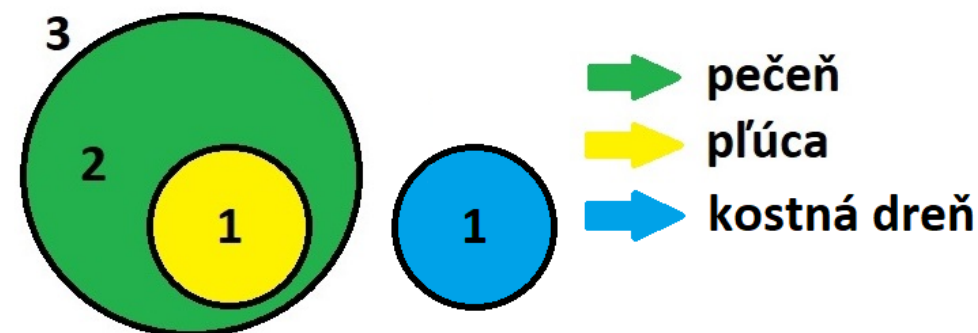
5.3.1 Výskyt nádorov

Počet jedincov, u ktorých vznikol nádor určitého orgánu je vyjadrený pomocou Vennovho diagramu (obr.6-9). Každý kruh diagramu predstavuje jeden konkrétny orgán, u ktorého bol detegovaný výskyt nádorového ochorenia a čísla predstavujú počet jedincov, u ktorých sa nádorové ochorenie našlo a potvrdilo (histologicky alebo molekulárne pomocou iPCR). Dáta boli rozdelené do štyroch skupín podľa vírusu a podľa typu kurčaťa na BL infikované HPRS-103, WLCB infikované HPRS-103, BL infikované MAV-J a WLCB infikované MAV-J. Veľkosť kruhov a plôch v diagramoch presne neodpovedá ich hodnote (počtu kurčiat), ale je len orientačná, pretože niektoré skupiny nádorov a počtu jedincov sú príliš malé na presné namodelovanie. Počty sú vyjadrené ako počet jedincov nesúcich určitý nádor, a nie počet nádorov ako takých preto, lebo v mnohých prípadoch (najmä u pľúcnych nádorov, ale aj nádorov obličiek a pečene) nebolo možné určiť a overiť presný počet. Vennov diagram tiež prehľadne vyjadruje, že v mnohých prípadoch malo jedno laboratórne zviera nádory viacerých orgánov naraz.

Ako ukazujú diagramy, výsledky všetkých štyroch skupín sú pomerne rozdielne. Pri použití vírusu HPRS-103 sme dostali tri základné typy nádorov (typ v zmysle zasiahnutého orgánu), ktoré tvorili základ aj u infekcie vírusom MAV-J a to nádory pečene, pľúc a obličiek. Rozdiel medzi BL a WLCB bol v tomto prípade v tom, že u BL HPRS-103 vytvoril navyše nádorové ochorenie kostnej drene v podobe erytroblastózy, avšak nemal zastúpenie medzi nádormi obličiek, ako tomu bolo u WLCB infikovaných HPRS-103.

Čo sa použitia vírusu MAV-J týka, tam boli výsledky o niečo rozmanitejšie. Vírus MAV-J indukoval väčšie spektrum nádorov u väčšieho počtu jedincov oboch typov kurčiat, ktoré sa dokonca od seba jemne odlišovalo. Napriek tomu, že počet neobvyklých typov nádorov bol nízky, u BL vznikali nádory kosti v podobe miernej formy osteopetrózy a objavili sa tiež tri prípady nádorového ochorenia kostnej drene v podobe myeloidnej leukózy. V prípade WLCB boli zachytené prípady nádorov ovária, pankreasu, či sleziny. U WLCB MAV-J je tiež vidno, že diagram má veľký prienik medzi jedincami s nádormi obličiek a pľúc. Jedná sa až o 30 jedincov, ktorí obsahovali nádory oboch týchto typov (a v niektorých prípadoch aj ďalšie). Čo majú vírusy HPRS-103 a MAV-J spoločné je, že oba indukovali 3 základné typy nádorov – nádory pľúc, pečene a obličiek. Ďalej majú spoločné to, že indukcia nádorov bola úspešnejšia u inbredných WLCB, než u outbredných BL.

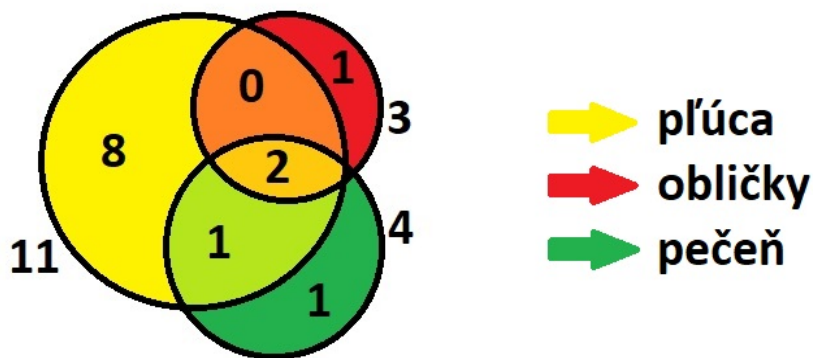
Brown Leghorn HPRS-103



celkový počet jedincov 69
počet jedincov s nádorom 4

Obrázok 6 : Vennov diagram vyjadrujúci počet kurčiat Brown Leghorn infikovaných vírusom HPRS-103, u ktorých bol identifikovaný nádor konkrétneho orgánu. Každý kruh diagramu zodpovedá jednému orgánu, ktorý bol nádorovo zasiahnutý. Čísla predstavujú počty jedincov, u ktorých bol konkrétny nádor identifikovaný.

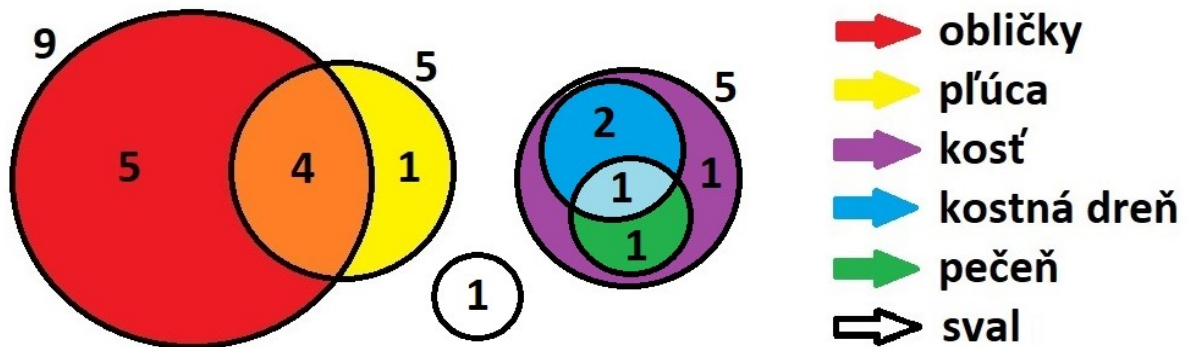
White Leghorn CB HPRS-103



celkový počet jedincov 46
počet jedincov s nádorom 13

Obrázok 7: Vennov diagram vyjadrujúci počet kurčiat White Leghorn CB infikovaných vírusom HPRS-103, u ktorých bol identifikovaný nádor konkrétneho orgánu. Každý kruh diagramu zodpovedá jednému orgánu, ktorý bol nádorovo zasiahnutý. Čísla predstavujú počty jedincov, u ktorých bol konkrétny nádor identifikovaný.

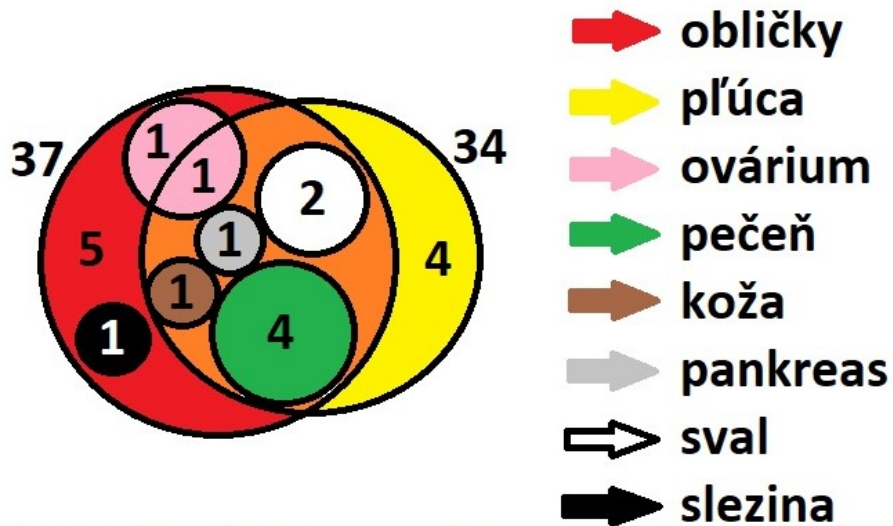
Brown Leghorn MAV-J



celkový počet jedincov 45
počet jedincov s nádorom 16

Obrázok 8: Vennov diagram vyjadrujúci počet kurčiat Brown Leghorn infikovaných vírusom MAV-J, u ktorých bol identifikovaný nádor konkrétneho orgánu. Každý kruh diagramu zodpovedá jednému orgánu, ktorý bol nádorovo zasiahnutý. Čísla predstavujú počty jedincov, u ktorých bol konkrétny nádor identifikovaný.

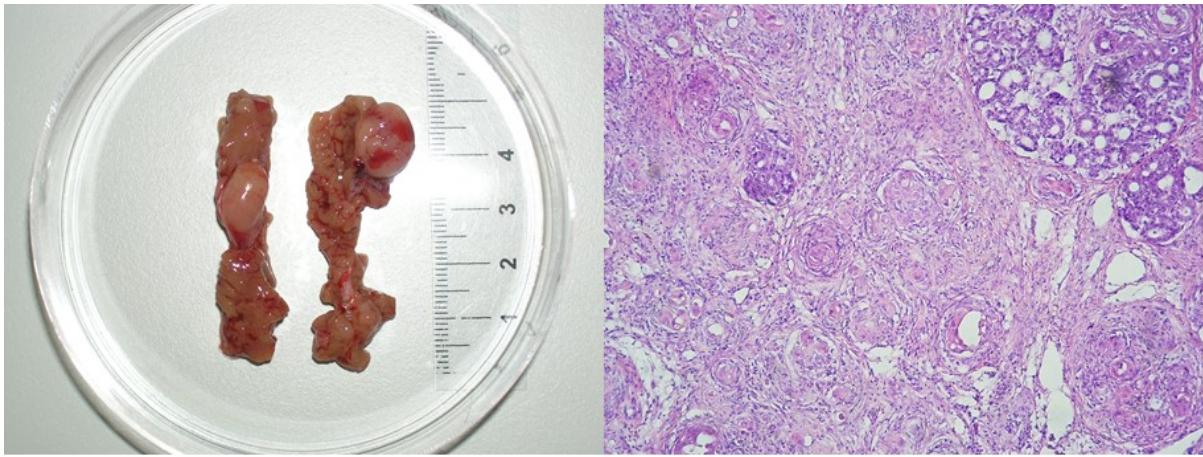
White Leghorn MAV-J



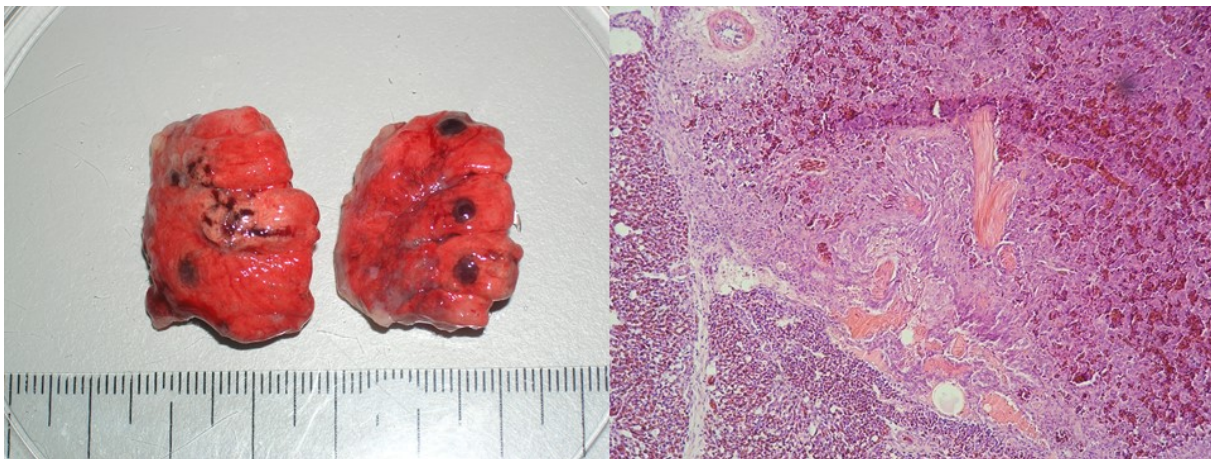
celkový počet jedincov 53
počet jedincov s nádorom 41

Obrázok 9: Vennov diagram vyjadrujúci počet kurčiat White Leghorn CB infikovaných vírusom MAV-J, u ktorých bol identifikovaný nádor konkrétneho orgánu. Každý kruh diagramu zodpovedá jednému orgánu, ktorý bol nádorovo zasiahnutý. Čísla predstavujú počty jedincov, u ktorých bol konkrétny nádor identifikovaný.

Počas in vivo pokusov teda bolo získaných mnoho vzoriek nádorov z rôznych tkanív. Medzi najčastejšie sa vyskytujúci nádor patrilo nefroblastóm (obr.10). Vtáčí nefroblastóm je renálny nádor embryonálneho typu, jeho morfológia je porovnateľná s nefroblastómami u iných zvierat (napr. psov, mačiek, oviec...), ale aj človeka (Wilmsov nádor). V súlade s embryonálnym charakterom sú nefroblastómy tvorené štruktúrami napodobujúcimi vyvíjajúcu sa obličku, ale morfológicky abnormálnymi a nefunkčnými. Navzdory klonálnemu charakteru sú tvorené zmesou rôznych diferenciačných typov buniek epiteliálneho aj mezenchymálneho charakteru.



Obrázok 10: Nefroblastóm (MAV-J)



Obrázok 11 : Lung hemangiosarcoma (HPRS-103)

Ďalším veľmi častým typom nádoru bol pľúcny nádor označovaný ako lung hemangiosarcoma (LHS) (obr.11). Hemangiosarkómy sú nádory vznikajúce z cievneho endotelu, ktoré sú makroskopicky rozoznateľné podľa prítomnosti krvavých škvŕn. LHS sa skladá z masy

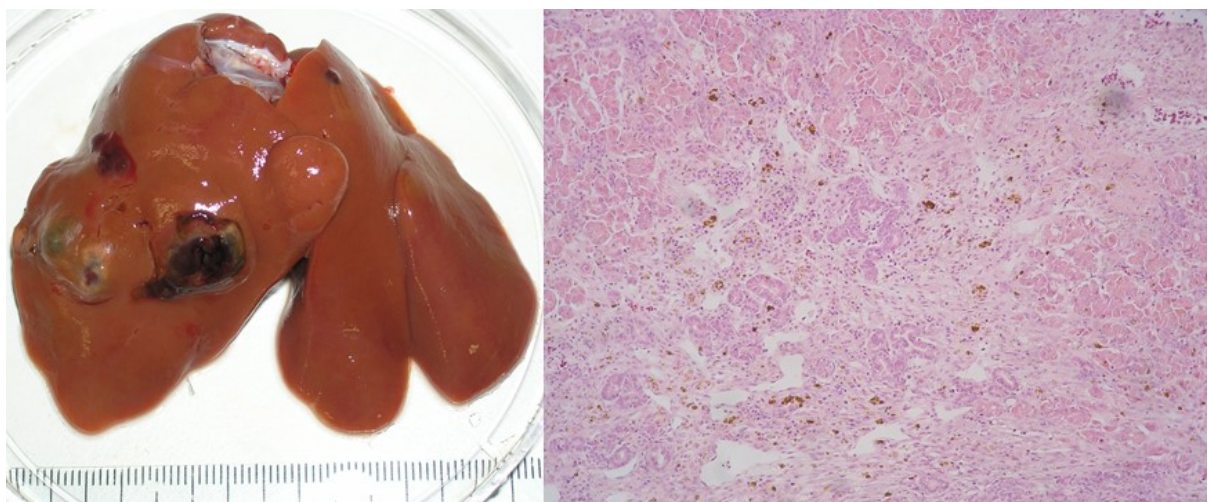
neorganizovaných, málo diferencovaných endoteliálnych buniek prakticky bez vmedzereného stroma a pripomína pokročilé štádiá ľudských a zvieracích hemangiosar-kómov.

Čo sa nádorov pečene týka, bol pozorovaný intrahepatický cholangiocelulárny karcinóm (ICC) (obr12), nazývaný tiež karcinóm žľových ciest (bile duct carcinoma), ďalej hepatocelulárny karcinóm (HCC) a v jednom prípade aj hepatický hemangiosarkóm (HHS) (obr.13).

ICC sa skladali z pomerne diferencovaných ale morfoloicky aberantných štruktúr žľových kanálikov pečene s anomálnym mnohvrstevným epitelom a veľkým množstvom fibrózneho stroma; pripomínali ľudský "mass-forming ductular" subtyp ICC.

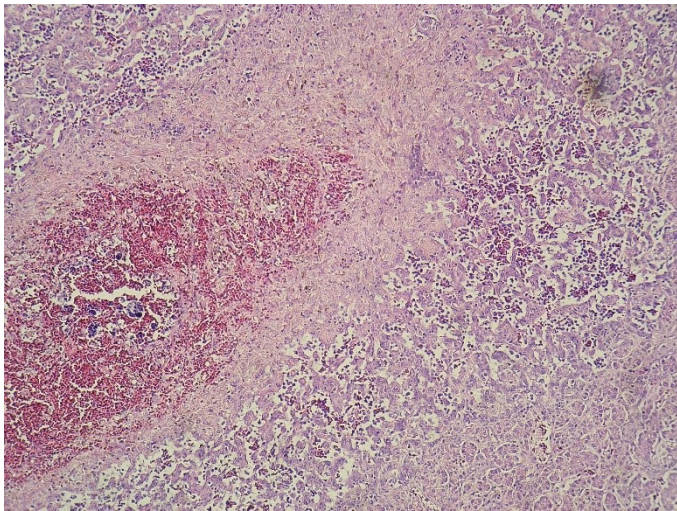
HCC bol zložený zo zhlukov stredne až málo diferencovaných hepatocytov s nízkou mitotickou aktivitou. Obsah stroma bol minimálny. Podobali sa neskorým "high-grade" displastickým nodulom (preneoplastické štádium tesne predchádzajúce karcinóm) a časným HCC u človeka.

HHS sa histologicky neodlišoval od iných hemangiosarkómov, ale nádory boli tuhšie s malým množstvom cievnych kanálikov obklopených masou neorganizovaných málo diferencovaných endoteliálnych buniek.

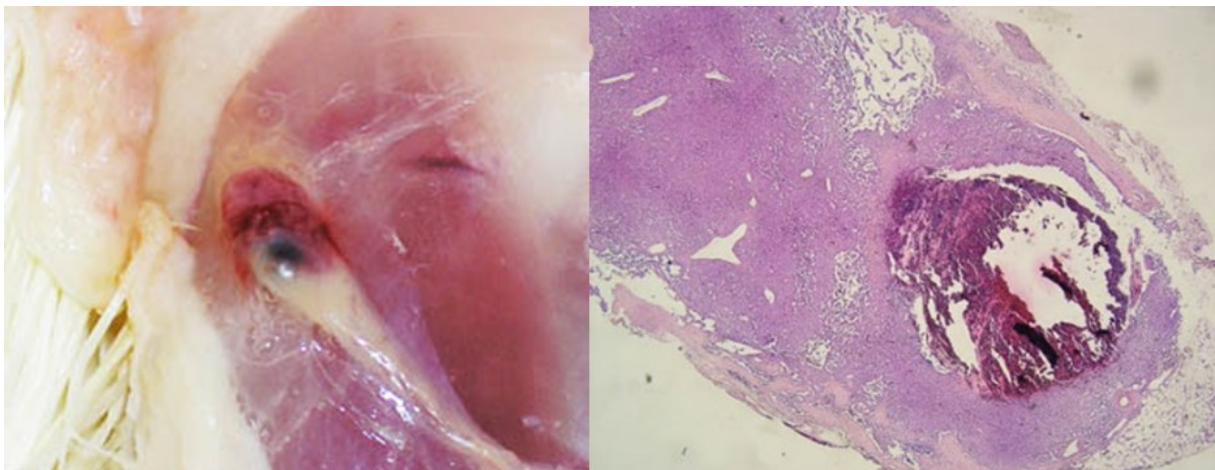


Obrázok 12: Intrahepatický cholangiocelulárny karcinóm nazývaný tiež karcinóm žľových ciest (HPRS-103)

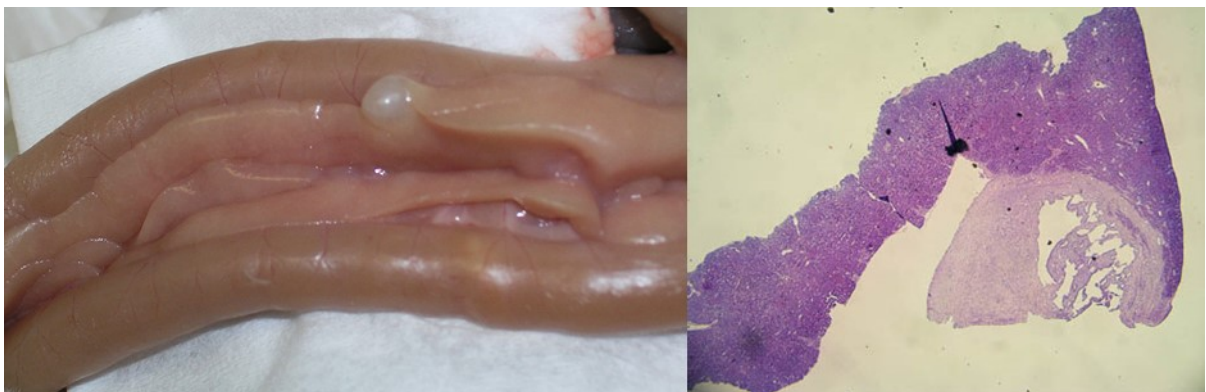
Už z Vennovho diagramu je zrejmé, že počas tohto projektu bolo získaných mnoho vzácne sa vyskytujúcich, ale zaujímavých nádorov. Medzi ne patrí napríklad kožný hemangiom (obr14), karcinóm s dezmozpláziou (pankreas) (obr15), fibrosarkóm (obr16), alebo nádor ovária (obr17).



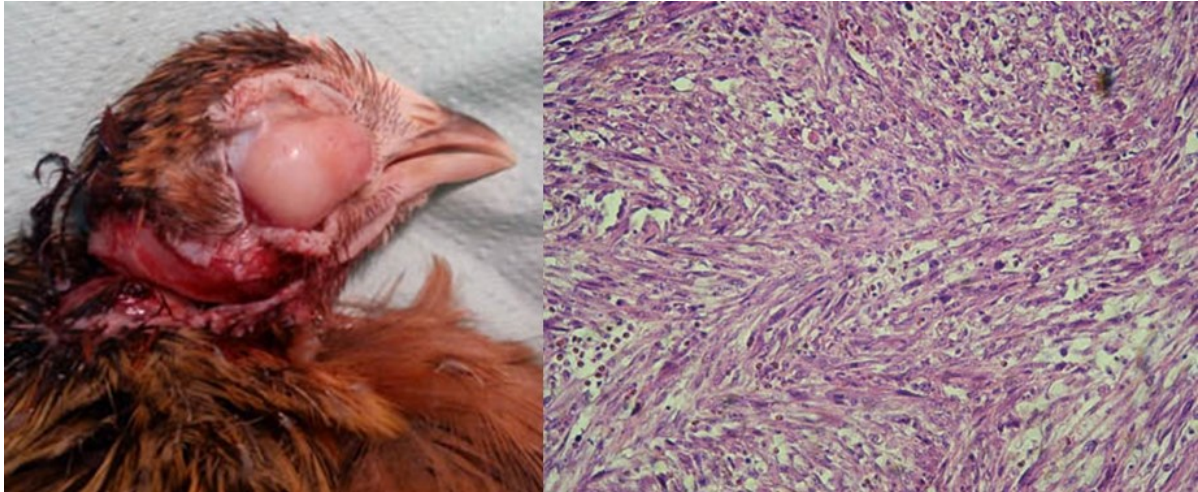
Obrázok 13: Hepatický hemangiosarkóm (MAV-J)



Obrázok 14 : Kožný hemangiom (MAV-J)



Obrázok 15: Karcinóm s dezmozpláziou, pankreas (MAV-J)



Obrázok 16: Fibrosarkóm (MAV-J)



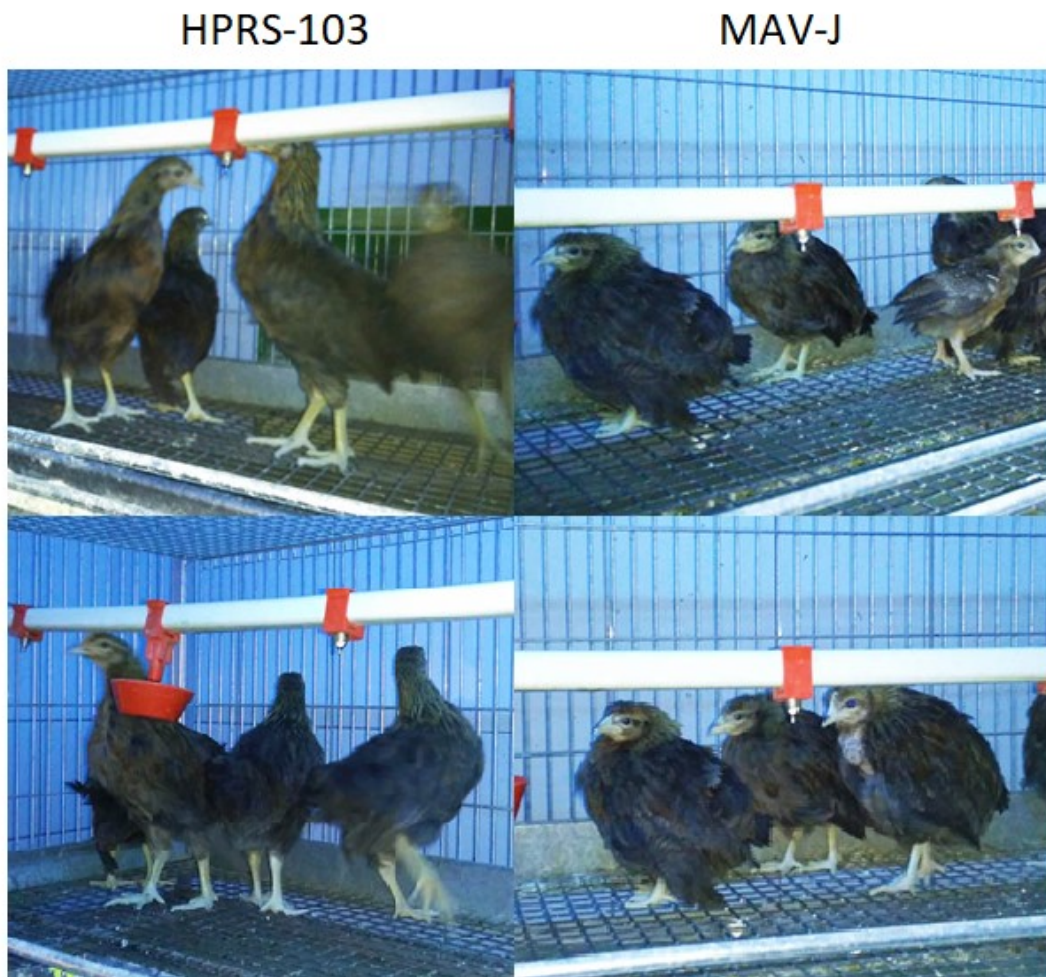
Obrázok 17 : Nádor ovária (MAV-J)

5.3.2 Wasting disease

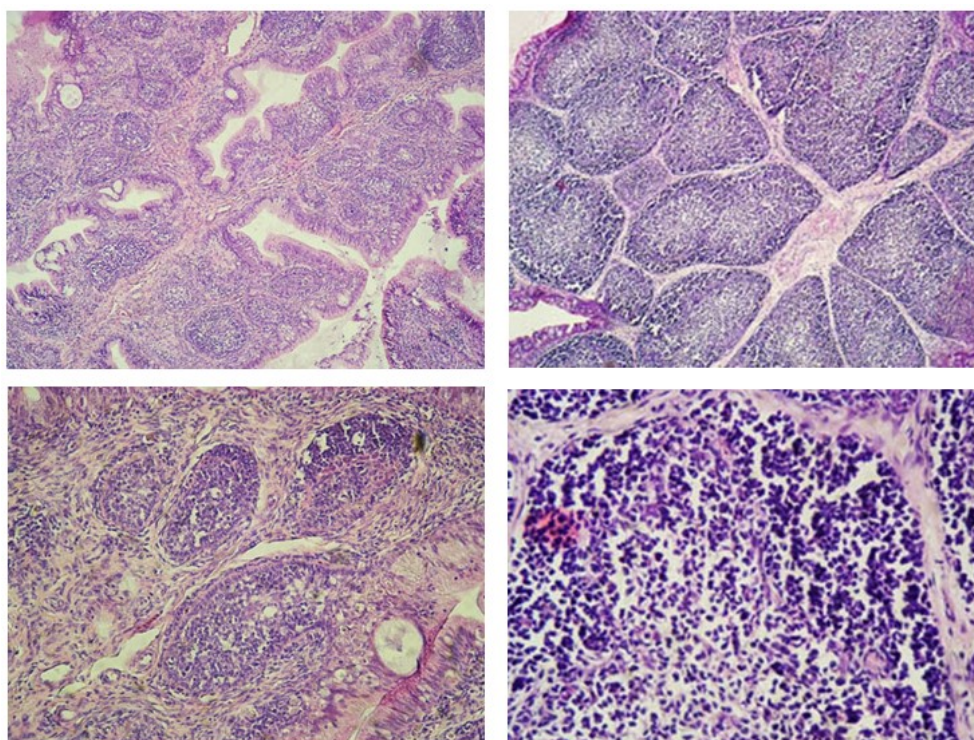
Počas in vivo pokusov boli u kurčiat Brown Leghorn infikovaných vírusom MAV-J pozorované znaky takzvanej wasting disease. Wasting disease sa prejavuje menšou veľkosťou a hmotnosťou vtákov, zvieratá sú zhrbené a anemické, čo sa prejavuje najmä na farbe ich hrebienkov. Medzi patologické prejavy patrí poškodenie lymfatických orgánov, nedostatok lymfocytov a iné poškodenia imunitného systému. U našich vtákov bola pozorovaná menšia priemerná hmotnosť (50 dňové jedince BL infikované vírusom HPRS-103 vážili priemerne 355 g zatiaľ čo BL jedince infikované MAV-J vykazujúce wasting disease vážili priemerne 270g)

a zvieratá boli prihrbené (obr.18). U niektorých týchto jedincov tiež bola pozorovaná kostná dreň bledej farby, ktorá histologicky vykazovala známky myeloidnej leukózy a nameraná bola ťažká anémia (hematokrit 4-12).

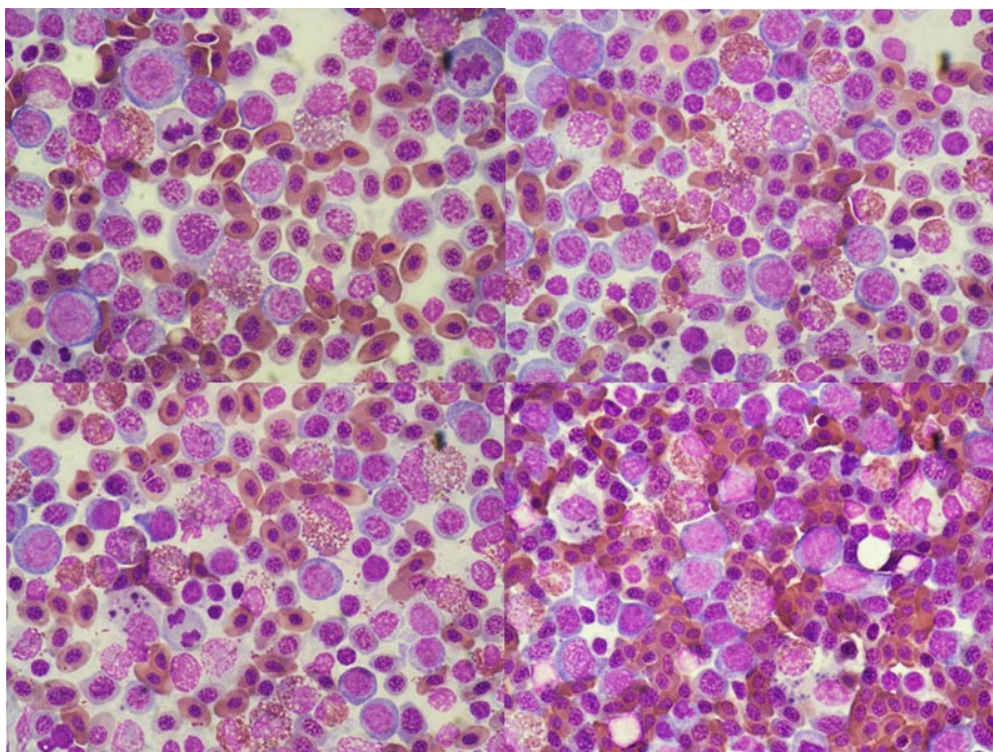
Makroskopické poškodenie ani nádorová transformácia týmusu a sleziny neboli pozorované, Fabriciova burza však bola atrofovaná, s menším množstvom lymfocytov a s lymfocytárnymi folikulami, ktoré neboli jasne štrukturované na kôrovú a dreňovú oblasť a veľkú časť ich tvorilo väzivové tkanivo (obr.19). U tejto skupiny kurčiat (Brown Leghorn infikovaný MAV-J) bola tiež u piatich jedincov pozorovaná ľahšia forma osteopetrózy na stehenných kostiach, kedy nešlo o typické vonkajšie poškodenie kosti a vznik buľvy, ale o poškodenie smerom dovnútra kosti. V takto poškodenej kosti nebola kostná dreň takmer vôbec prítomná.



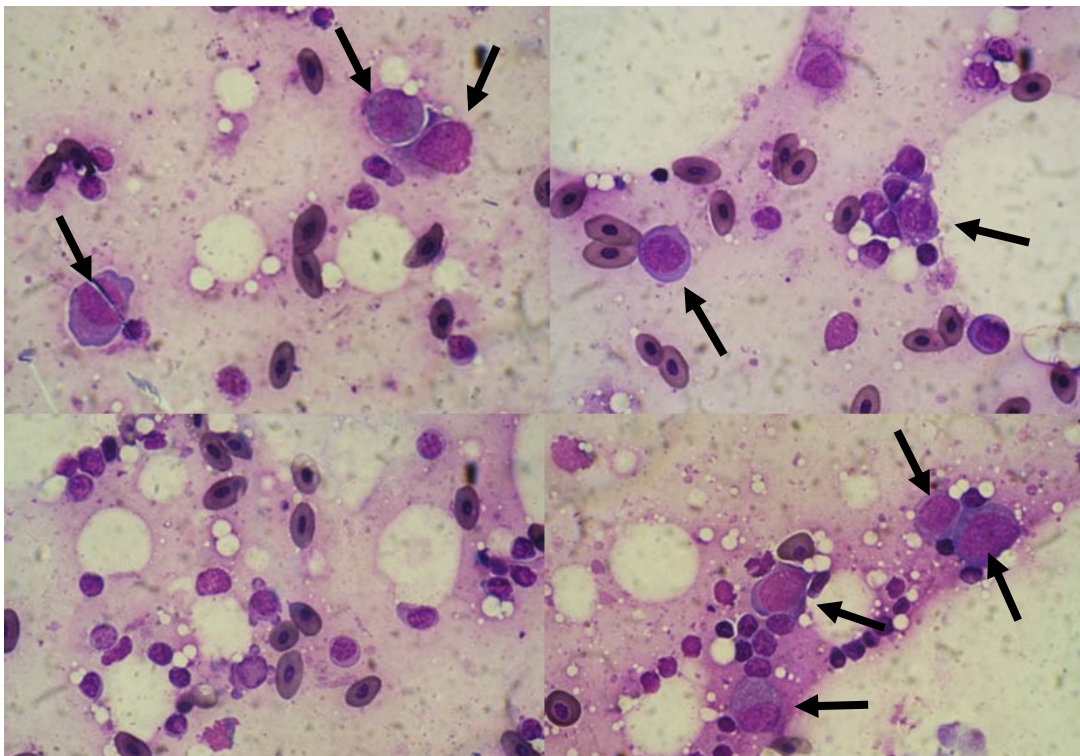
Obrázok 18: Jeden z prejavov wasting disease na jedincoch Brown Leghorn. Na fotkách vľavo sú jedince infikované vírusom HPRS-103, u ktorých neboli pozorované žiadne prejavy wasting disease, na fotkách vpravo sú jedince infikované vírusom MAV-J, ktoré sú viditeľne menšie a prihrbené.



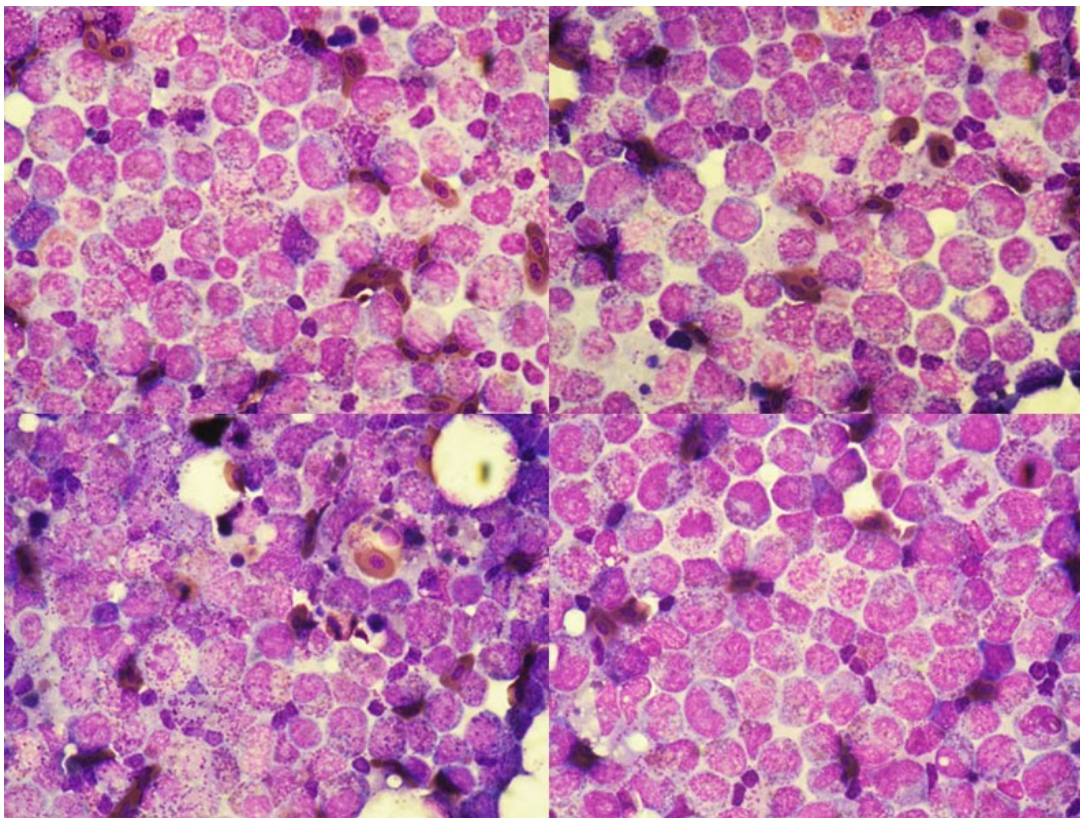
Obrázok 19: Histologické porovnanie Fabriciovej burzy kuraťa trpiaceho wasting disease (vľavo) a zdravého kuraťa (vpravo). Fabriciova burza zdravého jedinca je tvorená folikulmi, ktoré sú vyplnené lymfocytmi. Štruktúra folikulov je viditeľne rozdelená na vonkajšie (kôrové) a vnútorné (dreňové) oblasti. Fabriciova burza naľavo je prevažne tvorená väzivovým tkanivom a obsahuje menej lymfocytárnych folikulov s menším množstvom lymfocytov. Folikuly nie sú jasne štrukturované na kôrovú a dreňovú oblasť.



Obrázok 20: Morfoloicky normálne vyzerajúca kostná dreň. Na obrázku histologického preparátu sú viditeľné všetky vývojové štádiá diferenciácie erytroidnej aj myeloidnej rady.



Obrázok 21: Kostná dreň zasiahnutá myeloidnou leukóziou. Dreň je silne zničená, stukovatená s len malým množstvom buniek, ktoré väčšinou tvoria atypické myeloblasty (šípky).

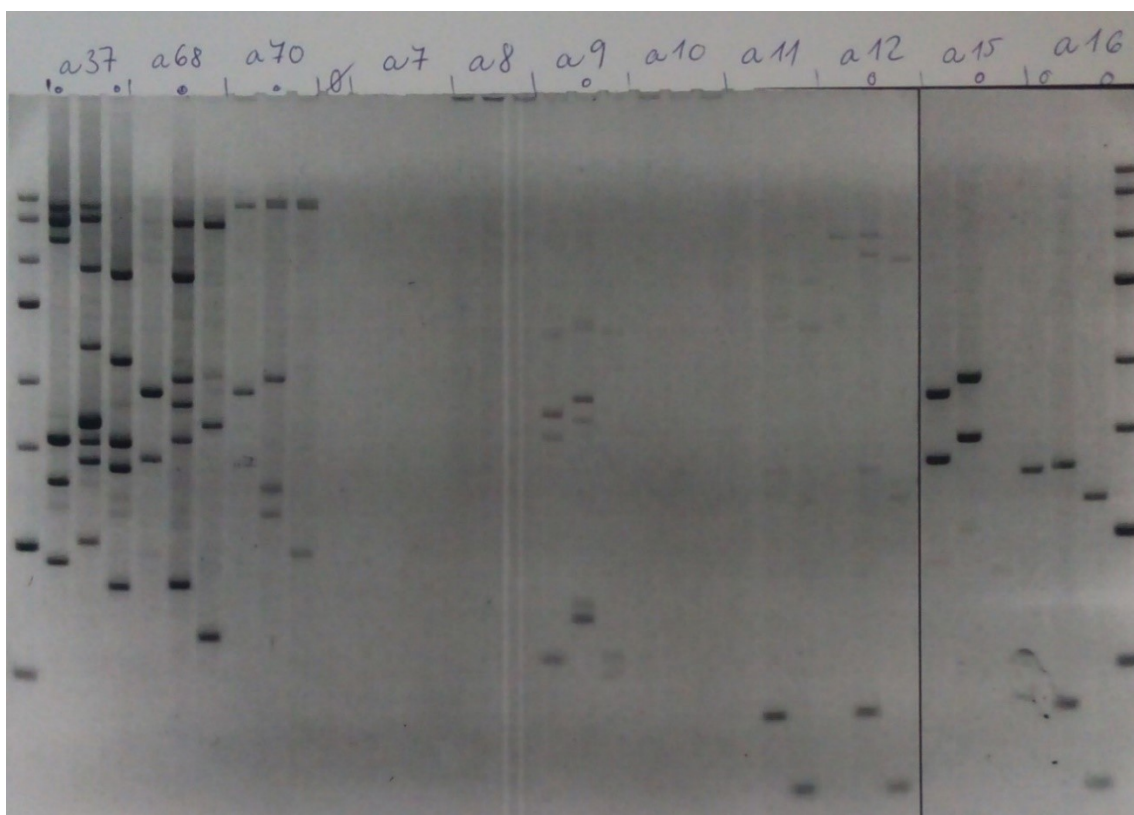


Obrázok 22: Kostná dreň zasiahnutá myeloidnou leukóziou môže vyzerat' aj takto. Dreň je takmer úplne zaplnená nezrelými myeloidnými bunkami granulocytárnej rady.

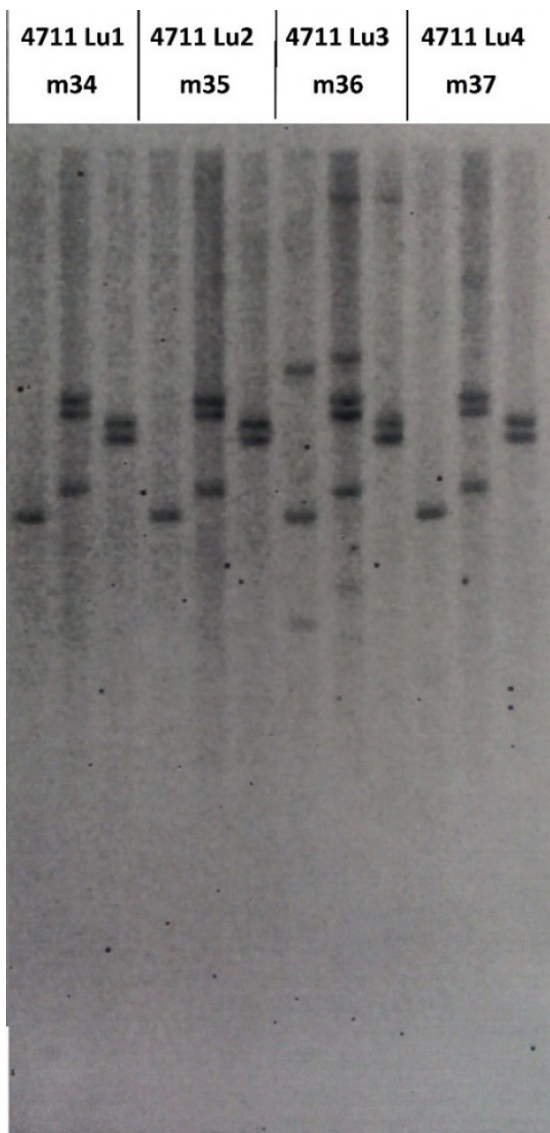
5.4 Klonalita nádorov

Na identifikáciu VIS bola v tejto práci použitá metóda iPCR, ktorá umožňuje amplifikáciu väčšiny integrovaných provírusov v jednej reakcii, čoho výsledkom je na agarózovom géle viditeľný vzor pruhov, kde každý pruh predstavuje konkrétny amplifikovaný úsek časti provírusu a hostiteľskej DNA v mieste, kde sa vírus integroval. Vďaka takémuto spracovaniu vzoriek bolo možné z gélu vydedukovať mnoho dôležitých skutočností.

Jednou z nich bolo určenie, či analyzovaná vzorka bola klonálna. Za klonálnu bola pre účely tejto práce považovaná vzorka tkaniva, v ktorom prinajmenšom veľká časť buniek bola potomkom jednej bunky prítomnej v dobe infekcie kuracieho embrya. Taká vzorka poskytla jasne viditeľný vzor pruhov na géle po iPCR. Klonalita vzorky bola považovaná za dôkaz, že sa skutočne jedná o nádor. Neklonálne vzorky (ako napríklad vzorky a7, a8 a a10 na obr.23) boli vyradené z ďalšej analýzy. Histologický obrázok nebol pre určenie nádorového charakteru tkaniva vždy úplne spoľahlivý, keďže občas bolo abnormálne tkanivo príliš malé a jedna z dvoch odoberaných vzoriek (na histológiu a na iPCR analýzu) minula nádorové tkanivo.



Obrázok 23: Určenie klonality vzoriek. Z fotografie gélu po iPCR je viditeľné, že niektoré vzorky obsahujú variabilný počet rôzne intenzívnych bandov (nádorové vzorky), zatiaľ čo iné vzorky (a7, a8, a10) neobsahujú bandy žiadne, z čoho vyplýva, že sa v týchto prípadoch nejedná o nádorové tkanivo.

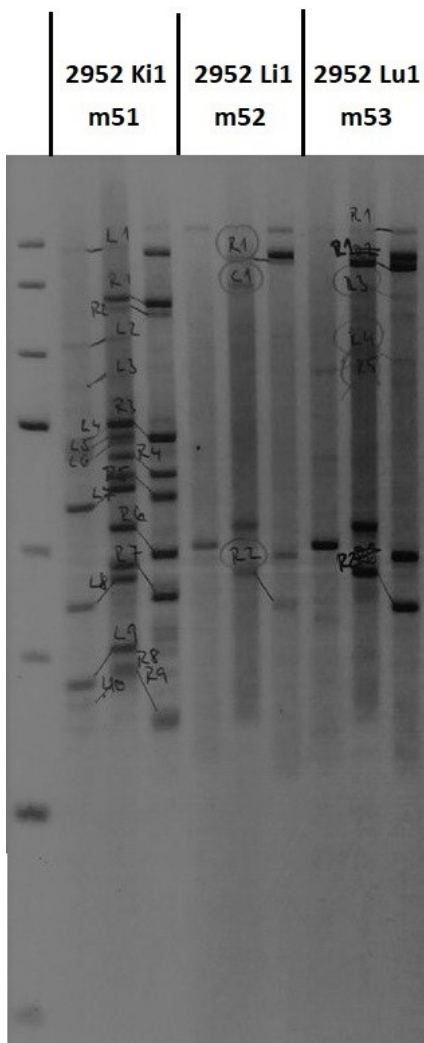


Obrázok 24: Príklad intraorgánových metastáz prítomných u pľúcneho nádoru LHS zvierat'a číslo 4711. U všetkých štyroch vzoriek sú prítomné 3 základné integrácie provírusov vytvárajúce 3 PCR fragmenty viditeľné na obrázku z gélu. Vzorka m36 obsahuje niektoré DNA fragmenty navyše, predstavujúce nové integrované provírusy, ktoré však pravdepodobne nehrajú zásadnú úlohu pri vzniku nádoru ako takom, keďže u zvyšných troch nádorových vzoriek chýbajú.

Ďalej mohli byť podľa zhodnosti rozloženia bandov medzi rôznymi vzorkami z jedného zvierat'a identifikované metastázy - priestorovo oddelené nádorové noduly pochádzajúce z rovnakého bunkového klonu. Metastázy boli pravidelne nachádzané u pľúcnych hemangiosarkómov (LHS). Vždy však šlo o intraorgánové, nikdy medziorgánové metastázy (nádory izolované z rôznych orgánov zvierat'a nikdy nepatrili ku rovnakému bunkovému klonu obr.25). Príklad intraorgánových metastáz možno vidieť na obr.24), kde štyri rôzne hemangiosarkómové noduly zvierat'a č. 4711 vykazujú totožný vzor pásov, obsahujú teda inzercie provírusov v rovnakých miestach a vznikli z jednej originálnej transformovanej bunky. Medzi nodulmi LHS nebolo nikdy možné jednoznačne rozoznať jeden, ktorý by predstavoval pravdepodobný primárny nádor. Je preto pravdepodobné, že tieto nádorové bunky majú vysokú metastatickú aktivitu už od okamihu svojho vzniku, čo môže súvisieť s faktom, že transformované endoteliálne bunky nemusia pri svojom šírení prekonávať žiadne bariéry.

Na základe rovnakej logiky sa dala porovnaním intenzity jednotlivých bandov odhaliť prítomnosť prípadných subklonov. Väčšina vzoriek bola vyhodnotená ako monoklonálny nádor, no v niektorých bola viditeľná skupina pásov výrazne slabších než ostatné (napr. obr.23. vz. a68), čo bolo možné vysvetliť prítomnosťou subklonov (v nich došlo behom rastu nádoru k získaniu ďalších provírusov), alebo prítomnosťou minoritných nezávislých klonov. Vznik subklonov bol často pozorovaný v prípade metastáz (napr. vzorka Lu3 zo skupiny metastáz v zvierati 4711 obsahoval 3 provírusy navyše oproti ostatným metastázam). Tieto aditívne inzercie sa ale zjavne

nezúčastňovali indukcie nádoru. Podobne sa dalo usúdiť, aký veľký podiel stromálnych buniek je prítomný v nádore. iPCR pásy boli vždy intenzívne u nefroblastómov a hepatokarcinómov, ktoré prakticky neobsahovali stroma. Naopak iPCR pásy u angiosarkómov a cholangiokarcinómov boli vždy slabé vďaka väčšinovej prítomnosti nenádorových (teda neklonálnych) buniek - erytrocytov resp. myofibroblastov.



Obrázok 25: Analytický gél obsahujúci 3 vzorky 3 rôznych nádorov (m51, m52, m53) pochádzajúcich z rôznych orgánov toho istého zvierťa (2952). m51 pochádza z obličky a obsahuje veľké množstvo integrovaných provírusov, m52 je z pečene a obsahuje len tri pomerne dobre viditeľné fragmenty DNA a vzorka m53 pochádzajúca z pľúc obsahuje okrem troch dobre viditeľných fragmentov DNA ešte množstvo fragmentov vytvárajúcich slabšie bandy v agarózovom géle.

5.5 Určenie miest integrácie vírusu (VIS) a všeobecných miest integrácie (CIS)

Na určenie všeobecných miest integrácie provírusov (CIS) v nádoroch bolo spracovaných 31 nádorov pochádzajúcich z in vivo pokusov na Oddelení vírusovej a bunkovej genetiky AV ČR a 27 nádorov získaných v rámci spolupráce so skupinou Dr. Venugopala Naira (The Pirbright Institute, Veľká Británia). Tieto nádory boli indukované za použitia niekoľkých vtáčích retrovírusov podskupiny A a J.

VIS boli určené s použitím inverzného PCR, izoláciou PCR produktov z agarózového gélu, ich reamplifikáciou, sekvenáciou a následným priradením sekvencie ku konkrétnemu miestu v kuracom génóme. Celkom bolo sekvenovaných 431 PCR produktov, z čoho 92 bola zmes dvoch komigrujúcich PCR fragmentov (ktoré bolo všetky možné rozlúštiť) a 13 bola zmes viac ako dvoch komigrujúcich DNA fragmentov (ktoré nebolo možné rozlúštiť), čo dokopy predstavovalo 510 unikátnych sekvencií. Z týchto bolo k 455 možné priradiť pozíciu v kuracom génóme, lebo 50 z nich boli len sekvencie prestavených defektných provírusov. 2 sekvencie boli príliš krátke a 3 boli repetitívne sekvencie prítomné na mnohých pozíciách v kuracom génóme. 455 priradených sekvencií predstavovalo 321 integračných miest - VIS (u 134 integračných miest boli identifikované iPCR fragmenty z oboch koncov provírusu).

Medzi 321 VIS bolo možné identifikovať 13 všeobecných miest integrácie (CIS) – Tab1., definovaných ako VIS, ktoré sa opakovali vo viacerých nezávislých nádoroch, pričom za rovnaké miesta boli považované VIS vzdialené menej ako 50 kb. 11 z týchto VIS sa vyznačovalo dostatočne vysokou štatistickou signifikanciou (hodnota spodného odhadu signifikancie menšia ako $1 \cdot 10^{-2}$), aby bolo možné považovať opakovaný výskyt provírusu v týchto miestach za výsledok onkogénnej selekcie, nie za náhodnú koincidenciu. V zhode s tým bol takmer vo všetkých CIS (a to vrátane dvoch CIS s nízkou štatistickou signifikanciou) nájdený kurací gén, ktorý má potenciál na transformáciu bunky (FRK, TERT, CTDSPL, EGFR/ERBB1, MYB, MYC, POU2F1/OCT1, PPP4R3B/SMEK2, CXorf57/RADX, CDNK2B/INK4B, BRAF a GLI2. Výnimkou je iba MRPL39). Všetky CIS sa nachádzali vnútri alebo v tesnom susedstve týchto génov. Detaily jednotlivých CIS (vrátane počtu zásahov, veľkosti clusteru, signifikancie, vzájomnej polohy a transkripčnej orientácie génu a provírusu a krátkeho popisu funkcie génu) sú zhrnuté v Tabuľke1.

CIS/gene	no. of hits	cluster size in bp	no. of VIs in histol. group	statistical significance	provirus position	provirus orientation	tumor type	inducing virus	gene product description
FRK	14	10162	69	$8 \cdot 10^{-53}$ / $6 \cdot 10^{-46}$	up	sense/antisense	LHS	HPRS103 + MAV-J	nuclear tyrosine-protein kinase
TERT	5	383	65	$5 \cdot 10^{-20}$ / $2 \cdot 10^{-17}$	up	sense/antisense	myelo	HPRS	telomerase catalytic subunit
CTDSPL	5	27154	121	$4 \cdot 10^{-11}$ / $1 \cdot 10^{-6}$	in	sense	B-lympho + myelo	HPRS(A) + MQNCSU	serin/threonine-protein phosphatase
EGFR/ERBB1	3	505	43	$2 \cdot 10^{-9}$ / $9 \cdot 10^{-7}$	in	sense/antisense	ICC + erythro + myelo	HPRS	transmembrane tyrosine-protein kinase
MYB	3	5248	56	$5 \cdot 10^{-7}$ / $2 \cdot 10^{-3}$	in	sense/antisense	B-lympho	HPRS(A) + MQNCSU	transcriptional factor
MYC	3	4569	121	$4 \cdot 10^{-5}$ / $2 \cdot 10^{-2}$	in/up	sense	myelo + B-lympho	HPRS(A)	transcriptional factor
MIRPL39	2	557	56	$6 \cdot 10^{-4}$ / 0,3	down	antisense	B-lympho	HPRS103	mitochondrial ribosomal protein
POU2F1/OCT1	2	897	56	$1 \cdot 10^{-3}$ / 0,6	in	sense/antisense	B-lympho	HPRS103	transcriptional factor
PPP4R3B/SMEK2	2	2521	65	$4 \cdot 10^{-3}$ / 1	in	sense/antisense	myelo	HPRS103	protein phosphatase regulatory subunit
CXorf57/RADX	2	1987	90	$6 \cdot 10^{-3}$ / 1	in	sense/antisense	erythro + myelo	HPRS103	ssDNA-binding protein
CDNK2B/INK4B	2	3142	103	0,01 / 1	up	sense/antisense	NB + erythro	HPRS103 + MAV-J	cyclin-dependent kinase inhibitor
BRAF	2	4843	147	0,04 / 1	in	sense	NB + LHS	HPRS103 + MAV-J	serin/threonine-protein kinase
GLI2	2	6907	125	0,04 / 1	in	sense	B-lympho + LHS	HPRS(A) + MAV-J	transcriptional factor

Tabuľka 1: Všeobecné miesta integrácie (CIS) s uvedeným počtom zásahov daného miesta, veľkosťou clusteru, štatistickou signifikanciou uvedenou ako spodná a vrchná hranica P value, pozícia a orientácia provirusu vzhľadom k pozícii a orientácii daného génu, typ nádoru, v ktorom boli dané CIS pozorované, vírus, ktorým boli nádory indukované a výsledný génový produkt. Typ nádoru je zaznačený skratkou anglických názvov: LHS – lung hemangiosarcoma, myelo – myeloid leukosis, B-lympho – B-lymphomas, ICC – intrahepatic cholangiocarcinomas, erythro – erythroblastosis, NB – nephroblastomas

5.5.1 Úspešnosť detekcie integračných miest vírusu (VIS)

Zo 490 fragmentov DNA izolovaných z gélu, reamplifikovaných pomocou PCR a sekvenovaných nebolo možné u 24 % určiť chromozomálnu pozíciu VIS v zostave genómu *Gallus gallus*. Možných dôvodov je hneď niekoľko a súvisia s metódou ich spracovania a detekcie pomocou metódy iPCR.

Časť integračných miest provírusov nemohla byť určená z dôvodu prítomnosti miest rozpoznávaných linearizačnými enzýmami v amplifikovaných sekvenciách. Keďže priemerný výskyt cieľových miest pre enzýmy PstI + NsiI (1. krok metódy) je raz za ca 800 bp a cieľových miest pre linearizačné enzýmy ApaLI, BclI a BstXI (3. krok metódy) je raz za ca 4000 bp, približne 20 % (800/4000) fragmentov spájajúcich provírus a kurací genóm nemohlo byť detegovaných, lebo boli rozštiepené linearizačným enzýmom. Toto platí pre vírus HPRS-103. Pre MAV-J boli použité primárne restriktčné enzýmy BclI a BstYI štiepiace raz za 900 bp a linearizačný enzým ApaLI, štiepiaci približne raz za 4000 bp. V prípade tohto vírusu sa teda predpokladá strata fragmentu spojujúceho provírus a kuraciu sekvenciu približne 22,5 %. V prípade nedefektných provírusov stačí identifikovať ktorýkoľvek koniec provírusu. Pravdepodobnosť straty oboch fragmentov by bola len 4 % ($0,20^2$) pre HPRS-103 a 5 % ($0,225^2$) pre vírus MAV-J. Pretože ale podstatná väčšina onkogén-aktivujúcich provírusov je silne defektných a väčšina z nich obsahuje iba jedno LTR susediace s bunkovou sekvenciou (nepublikované dáta Oddelenia vírusovej a bunkovej genetiky AV ČR), je podiel VIS stratených z vyššie popísaného dôvodu niekde medzi 4 resp. 5 % a 20 resp. 22,5 %.

Ďalej, približne 3 % fragmentov po štiepení kuracej DNA zmesou enzýmov PstI+NheI alebo BstYI+BclI je dlhších, než 5kb, čo presahuje veľkostný limit PCR za našich podmienok.

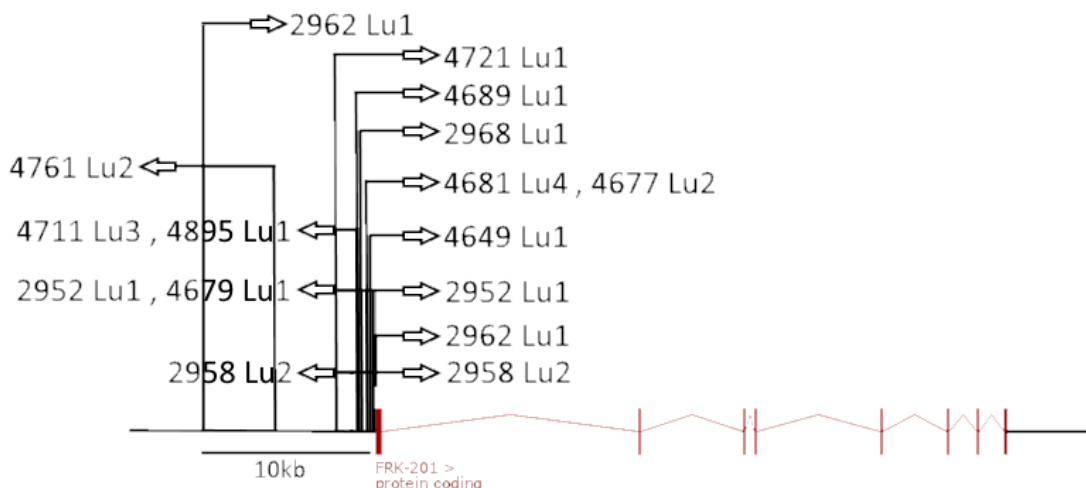
Nakoniec, 9% izolovaných fragmentov nemohlo byť jednoznačne priradených ku kuraciemu genómu, pretože sekvencia DNA za provírusom bola veľmi krátka, sekvencia sa nachádzala v medzerách zostavy kuracieho genómu, prípadne išlo o repetitívne sekvencie prítomné v hostiteľskom genóme v mnohých kópiách.

Ako ukázali získané iPCR sekvencie, vysoký obsah GC ani prítomnosť sekvencií vytvárajúcich dlhé slučky neboli prekážkou pre detekciu, čo potvrdzuje, že používané neštandardné podmienky PCR (vlastný mix polymeráz, nízka Mg^{2+} koncentrácia a veľmi dlhá elongačná fáza pri zníženej teplote) sa vyznačujú vysokou procesivitou.

Keďže v rámci tejto práce neboli uskutočňované experimenty zamerané na mRNA, ktoré by ukazovali prepis génov zasiahnutých provírusom, ani mieru ich expície a naznačovali konkrétne modely deregulácie týchto génov vírusom a vznik nádoru, z miest integrácie a sekvenácie okolia provírusu sa dalo len určiť, kde presne sa vírus integroval a v akej orientácii vzhľadom na orientáciu daného génu sa nachádzal. Jednotlivé gény a miesta integrácie vírusov do týchto génov a ich okolia bola graficky znázornená.

Génom s najvyšším počtom zásahov (14) bol FRK. Vo všetkých prípadoch sa jednalo o nádory typu LHS a všetky integrované provírusy (HPRS-103 aj MAV-J) Príloha1 sa nachádzali upstream od samotného génu, prítomné v oboch orientáciách. V dvoch prípadoch došlo k preskupeniu vírusu, kedy pravá a ľavá časť provírusu (detegované pomocou iPCR oddelene a neskôr po analýze sekvencií priradené k sebe) nemali totožnú orientáciu. Označenie takéhoto provírusu teda muselo byť sense/antisense a aj graficky sú tieto prípady znázornené v oboch orientáciách. Jedná sa o vzorky 2952 Lu1 a 2958 Lu2. Na obrázku je tiež dvakrát zaznačené 2962 Lu1. V tomto prípade sa jedná o dve rozdielne integrácie vzdialené od seba 10 kb v rámci jedného nádoru. Hoci veľkosť clusteru bola 10 kb, väčšina integrácií (11 zo 14) sa nachádzala menej ako 1 kb upstream od začiatku génu v jeho promótorovej oblasti (obr.26)

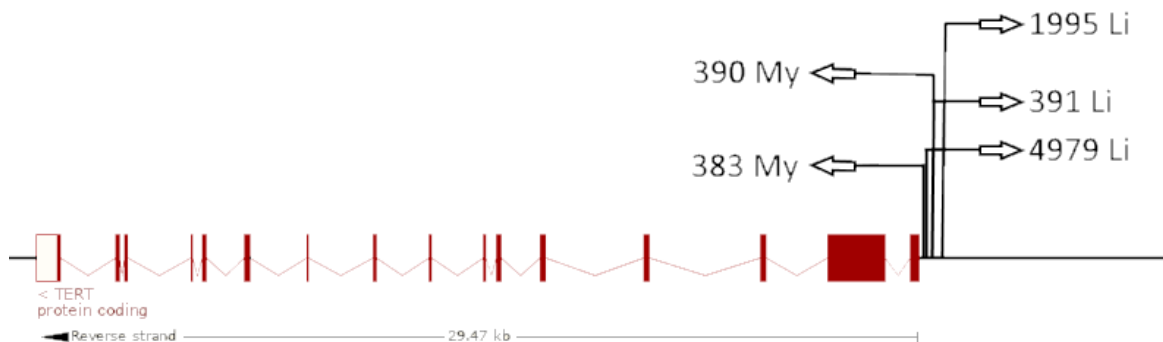
Gén FRK kóduje jadrovú tyrozín kinázu, ktorá má za normálnych okolností funkciu v G1 a S fáze bunkového cyklu a potlačuje rast bunky. V bunkách mliečnych žliaz má dokonca tumor supresorový účinok (Brauer and Tyner 2009).



Obrázok 26: Grafické znázornenie všeobecných miest integrácie do okolia génu FRK nachádzajúcich sa v nádoroch LHS (lung hemangiosarcoma). Upstream od tohto génu bolo integrovaných 14 provírusov, z toho 11 do vzdialenosti menej ako 1 kb upstream od začiatku génu, v oboch orientáciách. Vo vzorkách 2952 Lu1 a 2958 Lu2 došlo k preskupeniu provírusu, čo sa prejavilo na rozdielnej orientácii pravého a ľavého fragmentu provírusu. Z toho dôvodu sú dané vzorky uvedené v obrázku dvakrát, v oboch orientáciách. V prípade vzorky 2962 Lu1, ktorá sa v obrázku tiež nachádza dvakrát, sa jedná o dve nezávislé integrácie v jednom nádore vzdialené od seba 10 kb.

Ďalším génom zasiahnutým vírusmi podskupiny J (HPRS-103 a HPRS-103 dXSR) (Príloha1) bol TERT. Všetkých 5 integrácií sa nachádzalo upstream tesne pred génom, pričom cluster bol v tomto prípade veľmi malý. Jednotlivé integrácie sa nachádzali v rozmedzí necelých 400 bp. V troch prípadoch mali integrované provírusy opačnú orientáciu ako gén TERT, v dvoch prípadoch bola orientácia rovnaká (obr27). Všetky nádory, v ktorých bol tento gén integračne zasiahnutý boli myeloidné leukózy.

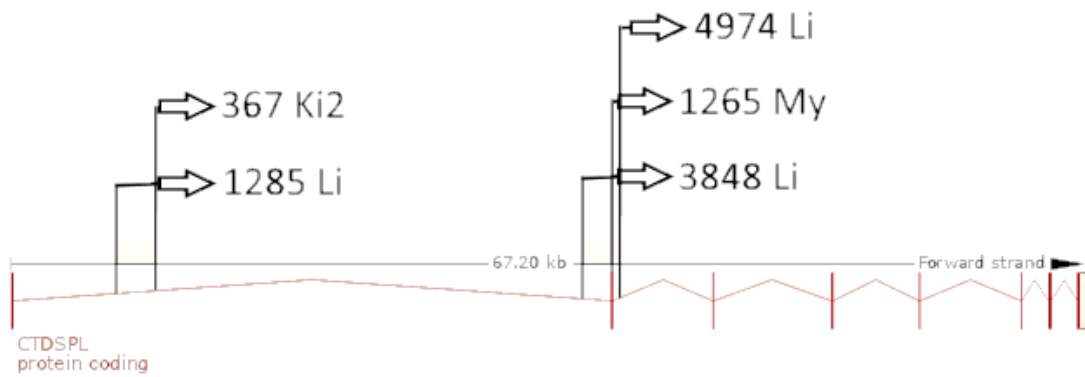
Gén TERT kóduje katalytickú podjednotku reverznej transkriptázy enzýmu telomerázy. Telomeráza je enzým predlžujúci časti DNA- teloméry. Vo väčšine buniek tela sa tento gén nachádza v neaktívnom stave, aby bunky podliehali bunkovému starnutiu. Naopak, jej nadexpresia spôsobuje, že bunky, ktoré by mali podliehať starnutiu ďalej prežívajú a proliferujú, čo môže viesť k vzniku nádorov.



Obrázok 25: Grafické znázornenie všeobecných miest integrácie do okolia génu TERT nachádzajúcich sa vo vzorkách myeloidnej leukózy. Všetkých 5 integrovaných provírusov sa nachádzalo upstream od génu TERT v rozmedzí ani nie 400 bp, dva z nich v rovnakej orientácii ako daný gén, tri v orientácii opačnej.

CTDSPL bol ďalší gén patriaci medzi CIS v tejto práci. V prípade tohto génu sa všetky integrácie nachádzali vnútri génu a v rovnakej orientácii. Jedna z piatich integrácií sa nachádzala vnútri exonu (obr.28), čo mohlo ovplyvniť konečnú podobu proteínu a spôsobiť jeho skrátenie. Vírusy integrované do tohto génu boli HPRS-103 ako zástupca J podskupiny a HPRS-103(A) a MQ-NCSU ako zástupcovia podskupiny A (Príloha1).

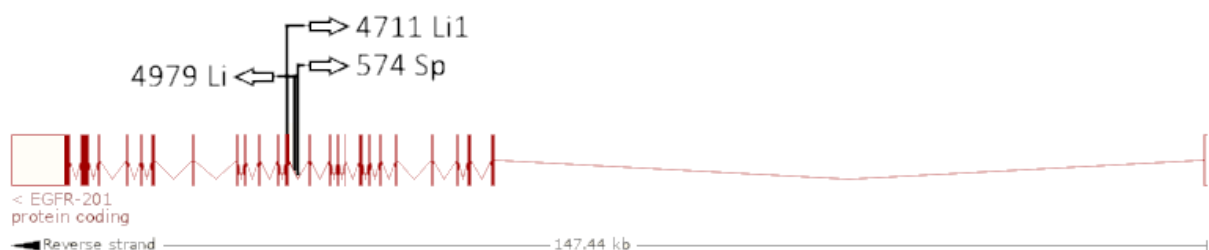
CTDSPL patrí medzi tumor supresorové gény a jeho funkcia v ľudských bunkách je umlčovanie nervových génov v iných typoch buniek, než nervových. Ďalej negatívne reguluje transkripciu RNA polymerázy II. Keďže CTDSPL patrí medzi tumor supresorové gény, zmeny v jeho transkripte, prípadne jeho skrátenie v dôsledku integrácie provírusu do jedného z exonov by mohlo viesť k vzniku nádoru.



Obrázok 26: Grafické znázornenie všeobecných miest integrácie provírusov do génu CTDSPL. Všetky integrácie sa nachádzali vnútri génu, štyri integrácie v dvoch intronových oblastiach a jedna v oblasti exonu. Všetky provírusy mali orientáciu totožnú s orientáciou génu.

EGFR (epidermal growth factor receptor) je transmembránový proteín, ktorý slúži ako receptor. Po naviazaní vhodného ligandu nastáva aktivácia tyrozín kinázy na cytoplazmatickej strane proteínu, ktorá fosforyluje rôzne substráty vnútri bunky. Tieto hrajú úlohu v bunkovom raste a syntéze DNA. Mutácie vedúce k nadexpresii tohto génu boli nájdené v mnohých typoch nádorových ochorení.

V tejto práci patrí gén EGFR medzi 6 CIS. Všetky tri integrované provírusy patrili k podskupine J (MAV-J a HPRS-103) (Príloha1) a nachádzali sa vnútri génu, dva z nich v opačnej orientácii vzhľadom na orientáciu génu EGFR (obr.29). Veľkosť clusteru bola len 505 bp. Ako ďalej možno na obrázku vidieť, dve integrácie sa nachádzali v oblasti intronu a jedna v oblasti exonu. Toto pravdepodobne viedlo (podobne ako u génu CTDSPL) ku skráteniu výsledného proteínu a vzniku nádorov.

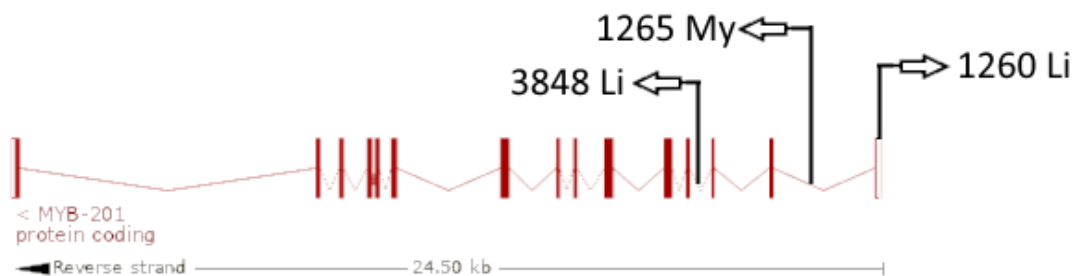


Obrázok 27: Grafické znázornenie všeobecných miest integrácie provírusov do génu EGFR. Všetky tri integrácie sa nachádzali vnútri génu, dve z nich v introne blízko pri sebe, jedna v exone. Provírusy boli prítomné v oboch orientáciách vzhľadom k orientácii génu.

Predposledným génom patriacim medzi CIS bol MYB. Všetky tri integrácie (HPRS-103(A) a MQ-NCSU) (Príloha1) sa nachádzali vnútri génu, ale ich rozptyl bol viac ako 5 kb veľký.

Ako vidno na obrázku 30, dve integrácie provírusov sa nachádzali v dvoch rôznych intronoch, orientované zhodne s orientáciou génu. Tretia integrácia sa nachádzala v prvom exone génu, v tzv. UTR (netranslatovaná oblasť), orientovaná opačne.

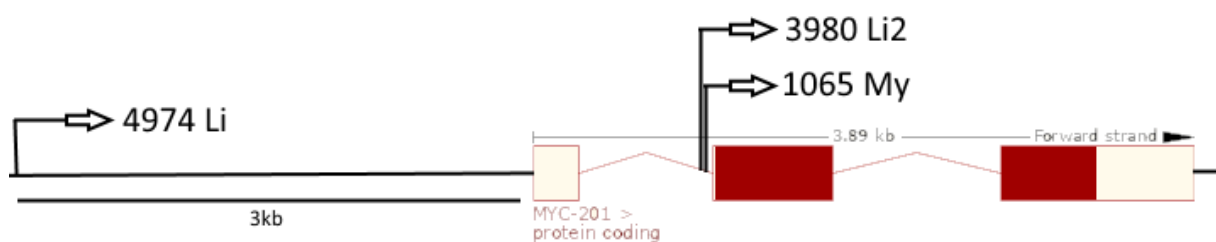
Čo sa funkcie týka, MYB je považovaný za onkogén. V bunke slúži ako transkripčný regulátor, v organizme hrá kľúčovú úlohu v regulácii krvotvorby. Často sa preto poruchy v jeho expresii a štruktúre spájajú s výskytom leukémie a lymfómu. Aj v tejto práci pochádzali vzorky, kde bol gén MYB zasiahnutý integráciou provírusu z B-lymfómov.



Obrázok 8: Grafické znázornenie všeobecných miest integrácie provírusov do génu MYB pochádzajúcich zo vzoriek B-lymfómov. Z troch integrácií dovnútra génu sa dve nachádzali v dvoch rôznych intronoch a jedna v UTR oblasti prvého exonu. Integrácie do oblastí intrónov mali orientáciu totožnú s orientáciou génu, provírus integrovaný do oblasti prvého exonu mal opačnú orientáciu.

Posledným CIS je známy protoonkogén MYC. Produktom tohto génu je jadrový fosfoproteín, ktorý má úlohu transkripčného faktora. Ovplyvňuje proliferáciu bunky, má úlohu v apoptóze a tiež ovplyvňuje bunkový rast. Veľký vplyv má v organizme hlavne na proliferáciu B-buniek. V tejto práci bol identifikovaný ako všeobecné miesto integrácie v B-lymfocytoóme a dvoch prípadoch myeloidnej leukózy.

Ako možno vidieť na obrázku 31, vírus (HPRS-103(A)) (Príloha 1) sa integroval dovnútra tohto génu dvakrát do oblasti intronu tesne pred druhý exon a jedenkrát do vzdialenosti 3 kb upstream od začiatku génu. Všetky tri provírusy mali orientáciu totožnú s orientáciou génu MYC.



Obrázok 9: Grafické znázornenie všeobecných miest integrácie provírusov do génu MYC pochádzajúcich z B-lymfocytoómu a dvoch myeloidných leukóz. Všetky tri integrácie sa nachádzali v rovnakej orientácii ako gén MYC, dve orientácie sa nachádzali blízko seba v introne, jedna integrácia bola vzdialená 3 kb upstream od začiatku génu.

6 Diskusia

Vtáacie retrovírusy podskupiny J spôsobujú u rôznych línii kurčiat rôzne spektrum nádorov. HPRS-103 indukuje u rôznych mäsových typov a Leghorn kmeňov kurčiat myeloidné leukózy, takisto ako chimerický RCAS(J), ktorý v SPF (specific pathogen-free) línii 0 a línii 15 kurčiat indukoval okrem myeloidnej leukózy aj erytroblastózu (Chesters et al. 2002).

Vzorky získané v rámci spolupráce so skupinou Dr. Venugopala Naira a molekulárne analyzované v rámci tejto práce tiež pochádzali z kureníc SPF línie 0 a 15 a línie 21 mäsového typu, ktoré boli infikované J podskupinou vtáčích retrovírusov (HPRS-103 a HPRS-103dXSR). Až na jeden prípad sa jednalo o vzorky buď myeloidnej leukózy, alebo erytroblastózy. V in vivo pokusoch tejto práce boli použité ako experimentálne zvieratá kurenice Brown Leghorn a White Leghorn línie CB, u ktorých bolo spektrum nádorov odlišné. Po infekcii kurčiat vírusom HPRS-103 boli pozorované hlavne pľúcne hemangiosarkómy a intrahepatické cholangiocelulárne karcinómy, po infekcii vírusom MAV-J to boli hlavne nefroblastómy a pľúcne hemangiosarkómy, ale aj intrahepatické cholangiocelulárne karcinómy, alebo ovariálne adenokarcinómy a iné. Každopádne, myeloidná leukóza sa našla len u jedného Brown Leghorn jedinca infikovaného MAV-J, erytroblastóza nebola pozorovaná vôbec.

Tieto výsledky naznačujú, že kuracia línia použitá v pokusoch môže mať takisto vplyv na incidenciu a spektrum nádorov po infekcii vírusmi podskupiny J. Podobné výsledky boli pozorované aj po infekcii 3 mäsových typov kurčiat a 5 Leghorn plemien kurčiat vírusom HPRS-103, kde bol u mäsových typov pozorovaný výskyt myeloidnej leukózy a renálnych adenómov, ktoré sa s podobnou incidenciou vyskytovali aj u línie 0, ale u ostatných línii sa vyskytovali menej alebo vôbec (L. N. Payne, Gillespie, and Howes 1992).

Ako sa predpokladalo, z kurčiat infikovaných vírusom MAV-J bol izolovaný väčší počet a takisto širšie spektrum nádorov. MAV-J vznikol z vírusu MAV-2 výmenou génu envB za envJ, pričom zvyšok vírusu ostal pôvodný. LTR vírusu MAV-J obsahuje silnejší promótor než HPRS-103. Rozdiel v LTR medzi HPRS-103 a MAV-J má pravdepodobne takisto vplyv na tkanivový tropizmus vírusu (Brown and Robinson 1988), čo je v tejto práci veľmi dobre pozorovateľné na výskyte nefroblastómov len u kureníc infikovaných MAV-J podobne ako tomu je u vírusu MAV-2(N) (Wattst and Smith 1980b).

36 dní po infekcii boli vírusy HPRS-103 aj MAV-J prítomné vo vzorkách všetkých odobraných orgánov v množstve približne 5 provírusov na genóm, ako ukázali výsledky semikvantitatívnej

metódy PCR zameranej na amplifikáciu kuracieho génu MET a vírusového envJ. Tkanivový tropizmus bol u vírusov podskupiny J v minulosti zisťovaný imunohistochemicky (gag a obalový glykoproteín gp85). V prvom prípade (gag) bol vírus detegovaný vo všetkých testovaných tkanivách okrem kostnej drene (Arshad et al. 1997), v druhom prípade (gp85) aj v kostnej dreni (Williams et al. 2004).

Na zvýšenie výskytu nádorov u oboch vírusov bola použitá tumor-promočná forma infekcie - injekcia nenádorových vírus-produkujúcich buniek do krvného riečiska embrya cez chorioalantoickú žilu (Pajer, Karafiát, Pečenka, et al. 2009). Toto nemalo za úlohu zvýšiť rýchlosť alebo zlepšiť schopnosť vírusu preinfikovať embryo. Podľa pozorovaní Oddelenia vírusovej a bunkovej genetiky AV ČR (nepublikované výsledky) je v takomto prípade rýchlosť infekcie dokonca mierne znížená. Bunky, ktoré boli injikované do kuracích embryí pri infekcii neproliferovali, nedávali tak vznik nádorom a pravdepodobne ani nepreživali, pretože sa nepodarilo detegovať ich prípadné potomstvo (Pajer, Karafiát, Pečenka, et al. 2009). Nádory odobrané zo zvierat infikovaných vírus-produkujúcimi bunkami boli histologicky rovnaké ako tie z jedincov infikovaných vírusom samotným, čo naznačuje, že daným nádorom dali v oboch prípadoch infekcie vznik bunky infikované a transformované tým daným vírusom, a nie bunky iné. Zároveň to nerozšírilo spektrum nádorov vyskytujúcich sa u daných pokusných skupín. V prípade infekcie plemena White Leghorn DF-1 bunkami produkujúcimi vírus MAV-J, bol v dvoch prípadoch pozorovaný ovariálny adenokarcinóm. Vzhľadom k počtu jedincov v skupinách však nemožno s istotou povedať, že dané adenokarcinómy vznikli práve vďaka tumor-promočnému efektu infekcie.

Výsledky tumor-promočného efektu injekcie vírus-produkujúcich buniek sú v kapitole výsledky spojené s výsledkami injekcie vírusu samotného a prezentované len pod názvom vírusu (napr. infekcia vírusom HPRS-103 a infekcia bunkami DF-1 produkujúcimi HPRS-103 sú zlúčené a prezentované ako výsledky HPRS-103). V prípade rozdelenia na jednotlivé skupiny podľa spôsobu infekcie by vzniklo viac menších skupín výsledkov, čo by prácu výrazne zneprehľadňovalo, aj keď výsledky ako také by sa výrazne nezmenili.

Využívanie rôznych tumor promočných efektov v pokusoch tiež modeluje prirodzené deje vyskytujúce sa počas života organizmu v nelaboratórnych podmienkach. Napríklad fajčenie a nečistoty ovzdušia prispievajú u ľudí k vzniku rakoviny pľúc (Lee, Forey, and Coombs 2012; O'Keefe et al. 2018), nadmerné užívanie alkoholu zvyšuje riziko vzniku rakoviny pečene (Turati et al. 2014). Čo sa iných živočíchov týka, hlavnými faktormi prispievajúcimi k vzniku

napríklad karcinómu spinocelulárnych buniek u mačiek sú: pasívne fajčenie (mačka je vystavená cigaretovému dymu), obojky proti blchám, vek, ale aj kŕmenie mačky mäkkou stravou z plechovky, čo zvyšuje riziko vzniku karcinómu oproti suchej strave v podobe granúl (Marretta, Garrett, and Marretta 2007).

Retrovírusy sú schopné integrovať sa do genómu hostiteľskej bunky v podobe provírusu, ale jednotlivé skupiny retrovírusov dávajú prednosť rôznym miestam integrácie. Vtáčie retrovírusy sa integrujú takmer náhodne (Withers-Ward et al. 1994; Mitchell et al. 2004). Napriek tomu, že inzercia vtáčích retrovírusov je takmer náhodná, boli identifikované miesta integrácie pravdepodobne zodpovedné za vznik nádorov (Clurman and Hayward 1989; Li et al. 2006; Pajer et al. 2006), čo naznačuje, že integrácia vírusu do konkrétneho miesta v genóme danej bunky transformuje, dáva im možnosť prerásť bunky okolité a dať vznik nádoru. Toto je prípad aj 6 všeobecných miest integrácie (CIS) vtáčích retrovírusov podskupiny A a J identifikovaných v tejto práci, keďže všetky zo zasiahnutých génov patria buď medzi protoonkogény (MYB, MYC), nádorové supresory (FRK, CTDSPL), alebo majú významné funkcie v bunkovom cykle, proliferácii, replikácii DNA alebo apoptóze (TERT, EGFR). Poloha a orientácia provírusov pre každé CIS sa líšila. Kým u génov FRK a TERT boli všetky provírusy integrované upstream od začiatku génu v oboch orientáciách, gény CTDSPL, EGFR a MYB obsahovali integrované provírusy vnútri génu (v intrónoch aj exónoch). Gén MYC bol dvakrát zasiahnutý dovnútra génu, jedna integrácia sa nachádzala upstream od jeho začiatku.

To, že integrácie do týchto konkrétnych génov nie sú čisto náhodné, alebo založené len na dobrej prístupnosti toho daného miesta pre inzerciu provírusu posilňuje aj fakt, že sa medzi vzorkami nevyskytoval nádor, ktorý by niesol viac, ako jedno z detegovaných CIS.

Nádorovo-supresorová funkcia proteínu FRK bola popísaná hlavne u ľudských gliómov (Zhou et al. 2012; Hua et al. 2014; Shi et al. 2015) a rakoviny prsníkov (Craven, Cance, and Liu 1995; Yim et al. 2009; Jin and Craven 2014; Kim et al. 2015; Ogunbolude et al. 2017). Ako všeobecné miesto integrácie vtáčích retrovírusov bol gén FRK identifikovaný u pľúcnych nádorov, ktoré vznikli inzerčnou mutagenézou MAV-2, izolovaných z kurčiat inbredného plemena White Leghorn línie CB a CC (Pajer, Karafiát, Pecenka, et al. 2009). Použitím vtáčích retrovírusov podskupiny J boli v tejto práci dosiahnuté podobné výsledky. Všeobecné miesta integrácie v pľúcnych hemangiosarkómoch sa nachádzali upstream od začiatku génu FRK, rozdiel bol len v orientácii provírusov. Zatiaľ čo MAV-2 sa vo všetkých prípadoch integroval v transkripčnej orientácii zhodnej s genómom, v tejto práci boli pozorované aj provírusy orientované opačne.

TERT spolu s ďalšími génmi bol identifikovaný ako všeobecné miesto integrácie ALV-J v myeloidnej leukóze. Bolo pozorované, že ALV-J provírusy sa opakovane integrovali do miest 0,2 – 10 kb upstream od začiatku génu TERT, čo odpovedá oblasti transkripčného promótoru. Inzercie boli najmä v opačnej transkripčnej orientácii než TERT (Y. Li et al. 2014). Porovnateľné výsledky boli pozorované u B-lymfómov vyvolaných ALV. Všeobecné miesta integrácie boli znova identifikované v oblasti promótoru TERT v oboch orientáciách. Expresia TERT bola v týchto nádoroch zvýšená, ale keďže bola väčšina provírusov integrovaná v opačnej transkripčnej orientácii, bola zistená prítomnosť novej antisense lncRNA prepisovanej z TERT promótoru. Táto lncRNA bola v nádoroch upregulovaná a pravdepodobne hrá úlohu vo vzniku nádorov (Yang et al. 2007; Nehyba et al. 2016). Výsledky tejto práce sú porovnateľné. U myeloidnej leukózy vyvolanej HPRS-103 a HPRS-103dXSR bola identifikovaná oblasť upstream od začiatku TERT zodpovedajúca promótoru, kde sa provírusy integrovali v oboch orientáciách. Expresia TERT nebola testovaná ale predpokladá sa, že jej hodnota by bola zvýšená. Taktiež je veľmi pravdepodobné, že novoobjavená lncRNA hrá úlohu aj v nádoroch testovaných v tejto práci, keďže väčšina integrovaných provírusov mala opačnú orientáciu než TERT.

CTDSPL patrí medzi gény často mutované v mnohých nádoroch epiteliálneho pôvodu, ako sú pľúčne, obličkové, ovariálne karcinómy a karcinómy prsníka a bol označený za nádorový supresor (Kashuba et al. 2004; Kashuba et al. 2009; Senchenko et al. 2010). Zároveň sa stal jedným z všeobecných miest integrácie ALV v B-lymfómoch, kde sa vírus integroval hlavne do intrónu 2. Prevažná väčšina integrovaných provírusov sa nachádzala v rovnakej transkripčnej orientácii ako gén samotný (J. F. Justice, Morgan, and Beemon 2015). Toto opäť do veľkej miery potvrdzuje táto práca, kde sa podarilo identifikovať CTDSPL ako všeobecné miesto integrácie A podskupiny vtáčích retrovírusov u B-lymfómov a myeloidnej leukózy, pričom všetky integrované provírusy sa nachádzali v rovnakej orientácii ako gén. Pozorované boli hlavne integrácie do intrónu 1, ale tiež do intrónu 2 a exónu 2.

EGFR (epidermal growth factor receptor) má v bunke funkciu regulátora vývoja epitelu a homeostázy. V nádoroch sa často vyskytuje v mutovanej forme, alebo je nadexprimovaný (Sigismund, Avanzato, and Lanzetti 2018). Ako všeobecné miesto integrácie s najvyšším počtom integrácií bol identifikovaný u MAV-2 indukovaných nádorov pečene. Všetky integrácie boli v tomto prípade veľmi blízko pri sebe v oboch orientáciách uprostred génu, čo pravdepodobne spôsobilo produkciu poškodenej verzie receptora, ktorý nebol schopný na seba viazať ligandy, čo aj v neprítomnosti ligandu spôsobovalo jeho stálu kinázovú aktivitu

(Pecenka et al. 2017). V tejto práci boli pozorované tri miesta integrácie do génu EGFR a to J podskupinou ALV (HPRS-103 a MAV-J) v intrahepatickom cholangiocelulárnom karcinóme, myeloidnej leukóze a erytroblastóze. Všetky tri integrácie provírusov boli blízko pri sebe v rovnakom regióne génu, ako vyššie popísané, dokonca jedna z integrácií spadala do toho istého exonu ako v práci Pečenka a kolektív, 2017. Možno teda predpokladať, že aj v prípade tejto práce mohlo dôjsť k produkcii poškodeného proteínu, ktorý bol pravdepodobne skráteneý.

MYB je gén, ktorého prestavba a znásobenie boli detegované v ľudských nádoroch ako rakovina hrubého čreva, glioblastómy, nádory pankreasu alebo rakovina prsníka s BRCA-1 mutáciou. c-myb je exprimovaný takmer vo všetkých ľudských leukémiách a lymfómoch. Jeho expresia je relatívne vysoká vo všetkých nezrelých proliferujúcich hematopoetických bunkách, keďže tento gén je potrebný na dokončenie hematopoézy (Ness 2003). MYB gén bol detegovaný ako všeobecné miesto integrácie ALV u B-lymfómov s použitím vírusu EU-8. Takto indukované nádory obsahovali provírus integrovaný v lokuse c-myb a to vo všetkých testovaných vzorkách. Niektoré provírusy boli integrované upstream, avšak väčšina inzercii bola downstream od iniciačného kodónu génu. Bolo súdené, že práve tieto downstream inzercie viedli k skráteneiu génového produktu (Kanter, Smith, and Hayward 1988). Ďalší výskyt MYB génu ako všeobecného miesta integrácie bol znova u B-lymfómov s použitím niekoľkých kmeňov ALV. MYB bol piatym najčastejšie sa vyskytujúcim miestom integrácie provírusu s celkovým počtom 28 integrácií (J. F. Justice, Morgan, and Beemon 2015). V tomto prípade však nebola pozícia ani orientácia provírusov uvádzaná. V tejto práci bol gén MYB zasiahnutý v troch rôznych nádoroch (B-lymfómy) pochádzajúcich z infekcie podskupinou A (HPRS(A), MQ-NCSU). Všetky tri inzercie sa nachádzali vnútri génu. Dve z nich vnútri intrónov, orientované zhodne s transkripčnou orientáciou génu, tretia v nekódujúcej časti prvého exónu orientovaná opačne. Predpokladá sa, že integrácie do týchto miest mohli spôsobiť poškodenie výsledného produktu génu, alebo mohli zmeniť mieru jeho expresie a tým prispieť k vzniku ochorenia.

MYC je transkripčný faktor, ktorý je zapojený v regulácii apoptózy, proliferácie bunky a jej diferenciácii (Amati and Land 1994). Zároveň je to prvý gén identifikovaný ako všeobecné miesto integrácie ALV, prispievajúci k nádorovej transformácii a vzniku lymfómov (William S. Hayward, Neel, and Astrin 1981b) (W S Hayward, Neel, and Astrin 1981b). Odvtedy bol identifikovaný ako miesto integrácie ALV u B-lymfómov, či myeloidnej leukózy indukovanej ALV-J (Justice, Morgan, and Beemon 2015; Y. Li et al. 2014). V tejto práci bol MYC identifikovaný ako všeobecné miesto integrácie ALV-A (HPRS(A)) u myeloidnej leukózy a B-

lymfómov. Hoci počet integrácií nie je vysoký a ich rozptyl je relatívne veľký, bol tento gén zahrnutý do všeobecných miest integrácie provírusov. Dve z integrácií sa nachádzali v intróne 1, upstream tesne pred exómom, s malou vzdialenosťou medzi integráciami. Tretia integrácia spadala do vzdialenosti 3 kb upstream od začiatku génu. Všetky integrácie mali transkripčnú orientáciu zhodnú s orientáciou génu. Hoci hodnoty RNA neboli testované predpokladá sa, že u týchto nádorových vzoriek by boli zvýšené rovnako, ako tomu bolo u myeloidnej leukózy ALV-J, v dôsledku integrácie provírusu a deregulácie génu (Y. Li et al. 2014). Výsledky výskumu by tiež mohol ovplyvniť čas infekcie pokusných zvierat. Predpokladá sa, že čas infekcie je dôležitým faktorom a čím neskôr je zviera infikované (hlavne po vyliahnutí), tým väčšia je pravdepodobnosť detekcie nádorov s integráciami v géne MYC (J. F. Justice, Morgan, and Beemon 2015). Zvieratá, u ktorých boli detegované integrácie v géne MYC ako aj všetky ostatné zvieratá v pozorovanej skupine boli infikované in ovo v jedenástom embryonálnom dni.

7 Zhrnutie

Táto práca sa zameriava na indukciu nádorov pomocou inzerčnej mutagenézy s použitím vtáčich retrovírusov podskupiny J a A a následnú identifikáciu integračných miest provírusov (VIS), ako aj všeobecných miest integrácie (CIS) prispievajúcich k vzniku nádoru.

Záveru práce sú:

- Vírus HPRS-103 po infekcii in ovo vyvolával u oboch plemien kurčiat (Brown Leghorn a White Leghorn) najmä intrahepatické cholangiocelulárne karcinómy a pľúcne hemangiosarkómy.
- Rekombinantný vírus MAV-J dosahoval podľa očakávania vyššiu účinnosť indukcie nádorov. Spektrum pozorovaných nádorov bolo širšie ako u vírusu HPRS-103 s najväčším výskytom nádorov obličiek histologicky klasifikovaných ako nefroblastómy (u oboch plemien). Druhým najrozšírenejším nádorom bol pľúcny hemangiosarkóm (u oboch plemien).
- Zo 490 vzoriek DNA fragmentov bolo u 373 možné určiť presnú polohu v kuracom génóme, čo predstavovalo jednotlivé VIS.
- Pomocou výpočtu štatistickej signifikancie bolo určených 6 CIS.
- Jednotlivé CIS predstavujú oblasti génov alebo ich okolie. Jedná sa o gény FRK, TERT, CTDSPL, EGFR, MYB a MYC zasiahnuté 14, 5, 5, 3, 3, 3 krát (v uvedenom poradí). Deregulácia všetkých týchto génov má potenciál prispieť k vzniku nádoru. FRK a CTDSPL sú nádorové supresory, MYB a MYC patria medzi protoonkogény, EGFR hrá úlohu v regulácii bunkovej proliferácie a apoptózy TERT kóduje enzým telomerázu, ktorý sa vo väčšine buniek nachádza v neaktívnom stave.

8 Zoznam použitej literatúry

- Abounader, Roger, and John Laterra. 2005. "Scatter Factor/Hepatocyte Growth Factor in Brain Tumor Growth and Angiogenesis." *Neuro-oncology* 7(4): 436–51.
- Amati, Bruno, and Hartmut Land. 1994. "Myc-Max-Mad: A Transcription Factor Network Controlling Cell Cycle Progression, Differentiation and Death." *Current Opinion in Genetics and Development* 4(1): 102–8.
- Armanios, M., and C.W. Greider. 2005. "Telomerase and Cancer Stem Cells." *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 70(0): 205–8.
- Arshad, S. S. et al. 1997. "Tissue Tropism of the HPRS-103 Strain of J Subgroup Avian Leukosis Virus and of a Derivative Acutely Transforming Virus." *Veterinary Pathology* 34(2): 127–37.
- Athar, Mohammad, and Mohammad Iqbal. 1998. "Ferric Nitritotriacetate Promotes N-Diethylnitrosamine-Induced Renal Tumorigenesis in the Rat: Implications for the Involvement of Oxidative Stress." *Carcinogenesis* 19(6): 1133–39.
- Bell, E. T., and A. T. Henrici. 1916. "Renal Tumors in the Rabbit." *The Journal of Cancer Research* 1(2): 157–68.
- Brauer, Patrick M, and Angela L Tyner. 2009. "RAKing in AKT: A Tumor Suppressor Function for the Intracellular Tyrosine Kinase FRK." *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 8(17): 2728–32.
- Brill, Elliott et al. 2010. "ZIC1 Overexpression Is Oncogenic in Liposarcoma." *Cancer research* 70(17): 6891–6901.
- Brown, D W, and H L Robinson. 1988. "Influence of Env and Long Terminal Repeat Sequences on the Tissue Tropism of Avian Leukosis Viruses." *J Virol* 62(0022–538X (Print)): 4828–31.
- Cheng, Ziqiang, Jianzhu Liu, Zhizhong Cui, and Li Zhang. 2010. "Tumors Associated with Avian Leukosis Virus Subgroup J in Layer Hens during 2007 to 2009 in China." *Journal of Veterinary Medical Science* 72(8): 1027–33.
- Chesters, P M et al. 2002. "The Viral Envelope Is a Major Determinant for the Induction of Lymphoid and Myeloid Tumours by Avian Leukosis Virus Subgroups A and J, Respectively." *The Journal of general virology* 83(Pt 10): 2553–61.
- Clurman, B E, and W S Hayward. 1989. "Multiple Proto-Oncogene Activations in Avian Leukosis Virus-Induced Lymphomas: Evidence for Stage-Specific Events." *Molecular and Cellular Biology* 9(6): 2657–64.
- Craven, Rolf J., William G. Cance, and Edison T. Liu. 1995. "The Nuclear Tyrosine Kinase Rak Associates with the Retinoblastoma Protein PRb." *Cancer Research* 55(18): 3964–68.
- Cui, N. et al. 2014. "Genomic Sequence Analysis and Biological Characteristics of a Rescued Clone of Avian Leukosis Virus Strain JS11C1, Isolated from Indigenous Chickens." *Journal*

- of *General Virology* 95(Pt_11): 2512–22.
- Dang, Chi V. 2012. “MYC on the Path to Cancer.” *Cell* 149(1): 22–35.
- Dong, Xuan et al. 2015. “Avian Leukosis Virus in Indigenous Chicken Breeds, China.” *Emerging Microbes & Infections* 4(12): e76–e76.
- Van Etten, R A, P Jackson, and D Baltimore. 1989. “The Mouse Type IV C-Abl Gene Product Is a Nuclear Protein, and Activation of Transforming Ability Is Associated with Cytoplasmic Localization.” *Cell* 58(4): 669–78.
- Fung, Yuen-Kai T, Lyman B Crittendent, Aly M Fadlyt, and Hsing-Jien Kung. 1983. 80 Proc. NatL Acad. Sci. USA *Tumor Induction by Direct Injection of Cloned V-Src DNA into Chickens*.
- Garcia, Stéphane et al. 2007. “Poor Prognosis in Breast Carcinomas Correlates with Increased Expression of Targetable CD146 and C-Met and with Proteomic Basal-like Phenotype.” *Human Pathology* 38(6): 830–41.
- Gherardi, Ermanno, Walter Birchmeier, Carmen Birchmeier, and George Vande Woude. 2012. “Targeting MET in Cancer: Rationale and Progress.” *Nature Reviews Cancer* 12(2): 89–103.
- Graf, Thomas. 1972. “A Plaque Assay for Avian RNA Tumor Viruses.” *Virology* 50(2): 567–78.
- Hayward, W S, B G Neel, and S M Astrin. 1981a. “Activation of a Cellular Onc Gene by Promoter Insertion in ALV-Induced Lymphoid Leukosis.” *Nature* 290(5806): 475–80.
- Hua, Lei et al. 2014. “FRK Suppresses the Proliferation of Human Glioma Cells by Inhibiting Cyclin D1 Nuclear Accumulation.” *Journal of Neuro-Oncology* 119(1): 49–58.
- Jin, L, and R J Craven. 2014. “The Rak/Frk Tyrosine Kinase Associates with and Internalizes the Epidermal Growth Factor Receptor.” *Oncogene* 33(3): 326–35.
- Jones, T L. 1952. “Embryonal Nephroma in a Dog.” *Canadian journal of comparative medicine and veterinary science* 16(3): 153–54.
- Justice, James et al. 2015. “The MET Gene Is a Common Integration Target in Avian Leukosis Virus Subgroup J-Induced Chicken Hemangiomas.” *Journal of Virology* 89(9): 4712–19.
- Justice, James F., Robin W. Morgan, and Karen L. Beemon. 2015. “Common Viral Integration Sites Identified in Avian Leukosis Virus- Induced B-Cell Lymphomas.” *mBio* 6(6): 1–11.
- Kanter, M R, R E Smith, and W S Hayward. 1988. “Rapid Induction of B-Cell Lymphomas: Insertional Activation of c-Myb by Avian Leukosis Virus.” *J Virol* 62(0022–538X (Print)): 1423–32.
- Kashuba, Vladimir I. et al. 2009. “High Mutability of the Tumor Suppressor Genes RASSF1 and RBSP3 (CTDSPL) in Cancer.” *PLoS ONE* 4(5).
- Kashuba, Vladimir I et al. 2004. “RBSP3 (HYA22) Is a Tumor Suppressor Gene Implicated in Major Epithelial Malignancies.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

- United States of America* 101(14): 4906–11.
- Kim, Jung-Lye et al. 2015. "The Role of Rak in the Regulation of Stability and Function of BRCA1." *Oncotarget* 8(49): 86799–815.
- Lee, Peter N., Barbara A. Forey, and Katharine J. Coombs. 2012. "Systematic Review with Meta-Analysis of the Epidemiological Evidence in the 1900s Relating Smoking to Lung Cancer." *BMC Cancer* 12.
- Li, Chang Long et al. 2006. "Integration of Myeloblastosis Associated Virus Proviral Sequences Occurs in the Vicinity of Genes Encoding Signaling Proteins and Regulators of Cell Proliferation." *Cell Communication and Signaling* 4.
- Li, Y. et al. 2014. "The MYC, TERT, and ZIC1 Genes Are Common Targets of Viral Integration and Transcriptional Deregulation in Avian Leukosis Virus Subgroup J-Induced Myeloid Leukosis." *Journal of Virology* 88(6): 3182–91.
- Marretta, Jennifer J., Laura Diane Garrett, and Sandra Manfra Marretta. 2007. "Feline Oral Squamous Cell Carcinoma: An Overview." *Veterinary Medicine* 102(6): 392–406.
- Mitchell, Rick S. et al. 2004. "Retroviral DNA Integration: ASLV, HIV, and MLV Show Distinct Target Site Preferences." *PLoS Biology* 2(8).
- Nehyba, Jiri et al. 2016. "Avian Leukosis Virus Activation of an Antisense RNA Upstream of TERT in B-Cell Lymphomas." *Journal of Virology* 90(20): 9509–17.
- Ness, Scott A. 2003. "Myb Protein Specificity: Evidence of a Context-Specific Transcription Factor Code." *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 31(2): 192–200.
- Nicholson, G. W. 1931. "An Embryonic Tumour of the Kidney in a Foetus." *The Journal of Pathology and Bacteriology* 34(6): 711–30.
- O’Keeffe, Linda M. et al. 2018. "Smoking as a Risk Factor for Lung Cancer in Women and Men: A Systematic Review and Meta-Analysis." *BMJ Open* 8(10): 1–12.
- Ogunbolude, Y. et al. 2017. "FRK Inhibits Breast Cancer Cell Migration and Invasion by Suppressing Epithelial-Mesenchymal Transition." *Oncotarget* 8(68): 113034–65.
- Pajer, Petr et al. 2006. "Identification of Potential Human Oncogenes by Mapping the Common Viral Integration Sites in Avian Nephroblastoma." *Cancer Research* 66(1): 78–86.
- Pajer, Petr, Vít Karafiát, Vladimír Pecenka, et al. 2009. "Industasis, a Promotion of Tumor Formation by Nontumorigenic Stray Cells." *Cancer research* 69(11): 4605–12.
- Pajer, Petr, Vít Karafiát, Vladimír Pečenka, et al. 2009. "Industasis, a Promotion of Tumor Formation by Nontumorigenic Stray Cells." *Cancer Research* 69(11): 4605–12.
- Payne, G S, J M Bishop, and H E Varmus. 1982. "Multiple Arrangements of Viral DNA and an Activated Host Oncogene in Bursal Lymphomas." *Nature* 295(5846): 209–14.
- Payne, L. N., and V. Nair. 2012a. "The Long View: 40 Years of Avian Leukosis Research." *Avian*

- Pathology* 41(1): 11–19.
- Payne, L N, A M Gillespie, and K Howes. 1992. "Myeloid Leukaemogenicity and Transmission of the HPRS-103 Strain of Avian Leukosis Virus." *Leukemia* 6(11): 1167–76.
- Payne, L N, and K Howes. 1991. "Eradication of Exogenous Avian Leukosis Virus from Commercial Layer Breeder Lines." *The Veterinary record* 128(1): 8–11.
- Pecenka, Vladimir et al. 2017. "HRAS , EGFR , MET , and RON Genes Are Recurrently Activated by Provirus Insertion in Liver Tumors Induced by the Retrovirus Myeloblastosis-Associated Virus 2" ed. Karen L. Beemon. *Journal of Virology* 91(20).
- Peghini, Paolo L et al. 2002. "Overexpression of Epidermal Growth Factor and Hepatocyte Growth Factor Receptors in a Proportion of Gastrinomas Correlates with Aggressive Growth and Lower Curability." *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer*
- Plummer, P J. 1951. "A Survey of Sixty Tumours from Domesticated Animals." *Canadian journal of comparative medicine and veterinary science* 15(10): 231–52.
- Reddy, E Premkumar, M J Smith, and A Srinivasan. 1983. 80 Proc. NatL Acad. Sci. USA *Nucleotide Sequence of Abelson Murine Leukemia Virus Genome: Structural Similarity of Its Transforming Gene Product to Other Onc Gene Products with Tyrosine-Specific Kinase Activity.*
- Rohrschneider, L R, and L M Najita. 1984. "Detection of the V-Abl Gene Product at Cell-Substratum Contact Sites in Abelson Murine Leukemia Virus-Transformed Fibroblasts." *Journal of virology* 51(2): 547–52.
- Rous, Peyton. 1910. "A TRANSMISSIBLE AVIAN NEOPLASM. (SARCOMA OF THE COMMON FOWL)." *Journal of Experimental Medicine* 12(5): 696–705.
- Rous, Peyton. 1911. "Transmission of a Malignant New Growth by Means of a Cell-Free Filtrate." *The Journal of the American Medical Association* 56(198): 23–25.
- Sandelini, Karin, and T Estola. 1974. "Occurrence of Different Subgroups of Avian Leukosis Virus in Finnish Poultry." *Avian Pathology* 3(3): 159–68.
- Senchenko, Vera N. et al. 2010. "Simultaneous Down-Regulation of Tumor Suppressor Genes RBSP3/CTDSPL, NPRL2/G21 and RASSF1A in Primary Non-Small Cell Lung Cancer." *BMC Cancer* 10.
- Shi, Qiong et al. 2015. "FRK Inhibits Migration and Invasion of Human Glioma Cells by Promoting N-Cadherin/ β -Catenin Complex Formation." *Journal of Molecular Neuroscience* 55(1): 32–41.
- Sigismund, Sara, Daniele Avanzato, and Letizia Lanzetti. 2018. "Emerging Functions of the EGFR in Cancer." *Molecular Oncology* 12(1): 3–20.
- Smith, R E, and C Moscovici. 1969. "The Oncogenic Effects of Nontransforming Viruses from Avian Myeloblastosis Virus." *Cancer research* 29(7): 1356–66.

- Stehelin, D., H. E. Varmus, J. M. Bishop, and P. K. Vogt. 1976. "DNA Related to the Transforming Gene(s) of Avian Sarcoma Viruses Is Present in Normal Avian DNA." *Nature* 260(5547): 170–73.
- Turati, F. et al. 2014. "Alcohol and Liver Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Studies." *Annals of Oncology* 25(8): 1526–35.
- Walter, W. G., B. R. Burmester, and Charles H. Cunningham. 1962. "Studies on the Transmission and Pathology of a Viral-Induced Avian Nephroblastoma (Embryonal Nephroma)." *Avian Diseases* 6(4): 455.
- Wattst, Susan L, and Ralph E Smith. 1980a. 27 INFECTION AND IMMUNITY *Pathology of Chickens Infected with Avian Nephroblastoma Virus MAV-2(N)*.
- Williams, Susan M. et al. 2004. "Tissue Tropism and Bursal Transformation Ability of Subgroup J Avian Leukosis Virus in White Leghorn Chickens." *Avian Diseases* 48(4): 921–27.
- Withers-Ward, Elizabeth S., Yoshihiro Kitamura, Joanne P. Barnes, and John M. Coffin. 1994. "Distribution of Targets for Avian Retrovirus DNA Integration in Vivo." *Genes and Development* 8(12): 1473–87.
- Yang, F. et al. 2007. "Telomerase Reverse Transcriptase Expression Elevated by Avian Leukosis Virus Integration in B Cell Lymphomas." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(48): 18952–57.
- Yim, Eun-kyoung et al. 2009. "Rak Functions as a Tumor Suppressor by Regulating PTEN Protein Stability and Function." *Cancer cell* 15(4): 304–14.
- Zhou, Xiuping et al. 2012. "FRK Controls Migration and Invasion of Human Glioma Cells by Regulating JNK/c-Jun Signaling." *Journal of Neuro-Oncology* 110(1): 9–19.