

## **Souhrn výsledků**

Retroviróvé vektory, které jsou schopné efektivně přenášet genetickou informaci do cílových buněk a integrovat se do jejich DNA, jsou velice užitečné pro mnoho experimentů, ale pouhý stabilní přenos genů ještě nemusí být dostačující. V expresi přenesených genů hrají významnou roli také epigenetické modifikace. Exprese může být přerušena již v momentě integrace DNA vektoru nebo může docházet k postupnému vypínání kopií vektoru během dlouhodobých experimentů. Retroviróvé vektory se mohou ve stabilitě exprese významně lišit, ale postupnému transkripčnímu umlčování podléhají všechny. Proto je zapotřebí modifikovat retroviróvé vektory za účelem stabilizace jejich exprese v cílových buňkách. Stabilní exprese je důležitá zejména v oblasti genové terapie, kde je opakování transdukce často nemožné nebo velmi komplikované.

Retroviróvé vektory odvozené od ASLV jsou v savčích buňkách velmi účinně umlčovány. Testovali jsme možnost stabilizovat expresi těchto vektorů inzercí vnitřního elementu CpG ostrova (IE). CpG ostrovy jsou známé svou schopností udržovat přílehlé promotory transkripčně aktivní. Konstruovali jsme vnitřní element CpG ostrova genu pro adenosinfosforibosyltransferázu o délce 120bp. Tento element byl vložen v sense i antisense orientaci do tří různých míst uvnitř LTR (na začátek oblasti U3, mezi enhancery a promotor a na začátek oblasti U5). Tyto vektory vykazovaly různou míru ochrany před transkripčním umlčováním. Nejméně stabilní byly ty vektory, které měly IE vložen na začátek LTR resp. U3. Naopak nejstabilnější expresi vykazovaly vektory s vložením IE mezi oblast enhancerů a promotor. Tyto vektory byly kultivovány po dobu tří měsíců aniž by u nich bylo pozorováno výrazné umlčování exprese. Kromě toho jsme se pokusili vložit mezi enhancery a promotor tandem dvou IE v antisense orientaci a pozorovali jsme ještě výraznější ochranný efekt. Takový vektor vykazoval velice stabilní expresi a téměř žádné umlčování během čtyř měsíců kultivace. Během experimentů se ukázalo, že orientace IE nehraje významnou roli v ochranné funkci elementu.

Použitý IE obsahuje dvě vysoce afinní vazebná místa transkripčního faktoru Sp1. Do elementu jsme zavedli bodové mutace, které kompletně zrušily schopnost sekvence vázat příslušný protein. Všechny vektory obsahující IE s mutovanými Sp1 místy vykazovaly ve srovnání s jejich nemutovanými partnery významně sníženou stabilitu exprese GFP. Naše výsledky ukazují, že vazebná místa Sp1 jsou důležitá pro ochranu funkce IE, ale přinejmenším část této funkce je zachována i v elementu s mutovanými vazebnými místy pro Sp1. Dále jsme testovali možnost reaktivace umlčených vektorů působením inhibitorů metyltransferáz (5-azacytidin – 5-azaC) a histondeacetyláz (Trichostatin A – TSA). Oba inhibitory aplikované zvlášť byly schopné reaktivovat umlčené vektory, ale nejvýraznějšího efektu bylo dosaženo kombinací obou. Několik týdnů po infekci bylo možné reaktivovat většinu umlčených vektorů. Možnost reaktivace však postupně klesala a po čtyřech měsících kultivace již byly schopné reaktivace pouze 2% vektorů. To pravděpodobně souvisí s nástupem dalších epigenetických mechanismů, které udržují umlčený stav vektoru. Dále jsme analyzovali metylační stav vektorů a zjistili jsme, že umlčené vektory jsou po dlouhé době od infekce masivně metylované. Na druhou stranu stabilní modifikované vektory, které nepodléhají umlčování, vykazovaly pouze zanedbatelnou úroveň metylace. Tento stav se však velice lišil od stavu, který byl pozorován krátce po infekci. I umlčené vektory byly méně metylované než tytéž vektory delší dobu po infekci. Z toho vyplývá, že umlčování



integrovaných provirů je spojeno s metylací CpG dinukleotidů v promotorových oblastech, nicméně existují další umlčovací mechanismy, které předcházejí nástupu metylace provirových LTR.

V další části projektu jsme se zaměřili na vstup ASLV virů a vektorů od nich odvozených do buňky. Klíčovým krokem vstupu viru je vazba virové partikule na buněčný receptor. Identifikovali jsme gen kódující buněčný receptor pro viry podskupiny C viru ASLV. Lokus *trc* byl lokalizován již dříve (Elleder et al., 2004) a my jsme testovali klony BAC odpovídající identifikované oblasti. Po identifikaci klonu BAC obsahujícího lokus *trc* jsme dále tento lokus identifikovali pozičním klonováním a následně klonovali cDNA kódující předpokládaný receptor *Tvc*. Zjistili jsme, že mRNA *trc* je dlouhá 1875 nukleotidů s jedním otevřeným čtecím rámcem kódujícím 488 aminokyselin. Předpokládaná aminokyselinová sekvence receptoru *Tvc* byla použita pro vyhledávání v proteinové databázi NCBI s použitím algoritmu protein-protein BLAST. Jako nejpodobnější proteiny byly nalezeny lidské a bovinní butyrofiliny *BTN1A1* a myší butyrofilin *BTN1A1*. Po zjištění sekvence mRNA jsme se zaměřili na důkladné prověření identifikace genu jako receptoru *Tvc*. cDNA byla klonována do expresního plazmidu pod kontrolou časného promotoru SV40. Tímto plazmidem jsme transfekovali embryonální fibroblasty linie L15, která je rezistentní k infekci viru podskupiny C, a následně tyto buňky vystavili replikačně kompetentnímu virovému vektoru RCASBP(C)GFP, který má na svém povrchu obalový protein viru ASLV podskupiny C a kóduje reportérový gen GFP. Ukázalo se, že transfekované buňky byly citlivé k infekci tímto vektorem. Stejných výsledků jsme dosáhli transfekcí savčích buněk. Předchozí experimenty poskytly dostatečná data potvrzující funkci identifikovaného genu jako receptoru *Tvc*, nicméně neposkytla jasný důkaz, že identifikovaný gen je jediným genem kódujícím funkční *Tvc* receptor. Proto jsme se rozhodli připravit buňky, které budou mít tento gen odstraněn ze svého genomu a následně testovat jejich citlivost k infekci viru podskupiny C. Kuřecí buněčná linie DT40 je citlivá k infekci viru podskupiny C a díky vysoké frekvenci homologní rekombinace je vhodná pro cílenou delecí genů. Genomové oblasti obklopující gen *trc* v buňkách DT40 byly klonovány a použity k cílené integraci a kompletní delecii kódující sekvence *trc*. Buněčný klon DT40 *trc*<sup>-/-</sup> se stejnou morfologií, životaschopností a růstovými vlastnostmi byl vybrán pro další testování. Původní buňky DT40 a DT40 *trc*<sup>-/-</sup> klon byly vystaveny vektoru RCASBP(C)GFP (obal podskupiny C) a RCASBP(B)GFP (obal podskupiny B) a analyzovány pomocí fluorescenční mikroskopie. Původní buňky DT40 byly citlivé k infekci vektory s obaly obou podskupin. Naopak DT40 *trc*<sup>-/-</sup> klon byl velice

rezistentní k infekci vektorem nesoucím obal podskupiny C, ale stále citlivý k infekci vektorem podskupiny B. Tato data potvrzují, že námi identifikovaný gen *tvb* je jediným receptorem pro vstup virů podskupiny C.

Citlivost k infekci viry ASLV nemá pouze bimodální charakter (citlivost vs. rezistence). Některé mutace mohou změnit vazebné místo virového receptoru, že vede ke snížené citlivosti a semirezistentnímu fenotypu. Charakterizace takových semirezistentních alel virových receptorů může poskytnout důležitá data týkající se vazby virové partikule na molekulu receptoru. Díky dostupnosti různých kuřecích linií máme možnost hledat linie se změněnou citlivostí k infekci viry ASLV. Detailní analýza jejich receptorů může pomoci lépe porozumět mechanismu vazby viru na virový receptor. Testováním jsme zjistili, že linie M je částečně rezistentní k infekci viry ASLV podskupiny B, D a E. Analyzovali jsme sekvenci lokusu *tvb* a našli jsme substituci C125S v doméně bohaté na cystein 3 (CRD3). Abychom posoudili vliv mutace C125S v kuřecím receptoru *Tvb* na citlivost k viru ASLV, byly infikovány embryonální fibroblasty linie M a BL nízkou koncentrací vektoru RCASBP GFP. Poté byl sledován průběh infekce a kvantifikováno množství GFP pozitivních buněk pomocí průtokové cytometrie. Embryonální fibroblasty linie BL jsou citlivé k infekci viry podskupiny A, B, C a D a byly použity jako pozitivní kontrola. Jak se předpokládalo, fibroblasty linie M i BL byly účinně infikovány viry podskupiny C - téměř polovinou buněk infikovaných jeden den po infekci a v podstatě všemi buňkami infikovanými třetí den po infekci. Velice odlišných výsledků bylo dosaženo, jestliže byly fibroblasty infikovány viry podskupiny B. Podle očekávání byly fibroblasty linie BL infikovány viry podskupiny B podobnou rychlostí jako viry podskupiny C. Avšak fibroblasty linie M byly infikovány viry podskupiny B s výrazně nižší účinností a virus se v kultuře buněk šířil velmi pomalu. V odděleném experimentu byly fibroblasty linie M infikovány vektory s obalem podskupin C, D a E, přičemž druhý den byla vyhodnocena účinnost této infekce. Stejně jako v prvním experimentu bylo 50% fibroblastů linie M infikováno kontrolním vektorem podskupiny C, ale pouze velmi málo jich bylo infikováno vektorem podskupiny D a žádné nebyly infikovány vektorem podskupiny E. Zmíněná data jasně ukazují, že přinejmenším v kultivovaných buňkách vede mutace C125S receptoru *Tvb* k snížené citlivosti embryonálních fibroblastů linie M k infekci viry ASLV podskupiny B, která vede k významnému zpomalení šíření viru. Tato mutace dále vede k ještě výraznějšímu snížení citlivosti k virům podskupiny D a téměř kompletní rezistenci k virům podskupiny E.



Předchozí data byla navíc potvrzena testováním afinity. Vazba proteinu Tvb linie M k obalovým glykoproteinům virů všech tří podskupin byla detekována, avšak s výrazně nižší afinitou než k proteinu Tvb divokého typu: ASLV(B) s 10x až 25x nižší afinitou, ASLV(D) s 25x až 50x nižší afinitou a ASLV(E) vykazoval pouze minimální afinitu na hranici detekce.

Kromě analýzy vstupu viru do buňky a struktury a funkce virových receptorů jsme se také zabývali přípravou vektorů vhodných pro dlouhodobou expresi transgenu. Tyto vektory jsou velmi užitečné pro určité typy experimentů vyžadujících dlouhodobou expresi transgenu, přípravu transgenních zvířat a také pro genovou terapii. Připravili jsme vektory, které exprimují gen *v-src* a jeho kinázově neaktivní mutantu Y416F-K295N a zároveň obsahují rezistenční marker. Infekcí křeččích fibroblastů těmito vektory a následnou selekcí antibiotikem jsme připravili buněčné linie stabilně exprimující *v-src* nebo jeho zmíněnou mutantu. Tyto linie jsme použili ke studiu vlivu exprese genu *v-src* na aktivitu endogenního genu *c-src*. Exprese konstitutivně aktivního genu *v-src* vedla k aktivaci endogenního *c-src* a zvýšení celkové protein tyrosinovou fosforylaci v infikovaných buňkách. Exprese kinázově neaktivní mutanty vedla k hypofosforylaci Tyr416 endogenního *c-src*. Jak aktivace tak inaktivace *c-src* může být vysvětlena přímou interakcí *v-src* a *c-src*, která může buď podněcovat transfosforylaci regulačního Tyr416 v případě aktivace nebo naopak aktivaci zabraňovat tvorbou přechodných neaktivních komplexů mutantu Y416F-K295N a *c-src*.

Výše zmíněné vektory jsou vhodné pro dlouhodobou expresi v buněčných liniích, kde je dostatek času pro selekci transdukovaných buněk a také pro reselekcii v případě ztráty exprese. Tyto vektory však nejsou vhodné pro přípravu transgenních zvířat pomocí transdukce spermatogoniálních kmenových buněk (SSC) a jejich transplantace do kohoutů sterilizovaných opakovaným ozařováním  $\gamma$  zářením. To je způsobeno problematickou kultivací SSC *in vitro* a nemožností jejich selekce, protože delší kultivace snižuje jejich schopnost kolonizovat semenotvorný epitel a ustanovit tak exogenní spermatogenezi. Explantované SSC mohou být kultivovány pouze několik hodin *in vitro*, což poskytuje dostatek času pouze pro účinnou infekci. Pro tento účel bylo nezbytné připravit virus ve vysoké koncentraci a s obalem schopným infikovat kuřecí SSC. Připravili jsme retrovirový vektor odvozený od viru myši leukémie (MLV), který je vysoce aktivní v ptačích buňkách. Tento vektor byl obalen glykoproteinem G viru vesikulární stomatitidy (VSV-G) a může být produkován v koncentraci vyšší než  $10^5$  FFU/ml. Díky obalu tvořenému VSV-G a jeho odolností, jsme byli schopni tento virus koncentrovat pomocí ultracentrifugace až na úroveň dosahující  $10^8$  FFU/ml. Tato koncentrace viru je dostatečná pro účinnou transdukcii

explantovaných SSC. Infikovali jsme kulturu rozvolněných testikulárních buněk koncentrovaným vektorem nesoucím reportérový gen pro GFP. Účinnost infekce a životaschopnost buněk byla analyzována pomocí průtokové cytometrie. Analýza metylace CpG dinukleotidů neodhalila žádnou významnou metylaci vektoru v infikovaných buňkách naznačující, že epigenetické umlčování nehraje významnou roli v této fázi vývoje pohlavních buněk. Po transplantaci do sterilních kohoutů tyto buňky obnovily spermatogenezi během devíti týdnů s přibližně stejnou účinností jako neinfikované buňky. U recipientních kohoutů s obnovenou spermatogenezí byla ve spermiích detekována transdukce reportérového genu. Naše data ukazují, že stejně jako u myši nebo krys představuje transplantace retrovirem infikovaných spermatogonií účinný systém pro vnášení genů do samčích pohlavních buněk a následnou přípravu transgenních kuřat.

Výše zmíněná data demonstrují velikou univerzálnost retrovirových vektorů pro účely přenosu genů, avšak stále existuje mnoho oblastí pro výzkum a zdokonalování. Stabilita exprese vektoru zejména v kmenových buňkách je stále záležitostí intenzivního výzkumu.