

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Kryštof Štafl

Hostitelské faktory účastníci se replikace viru Rousova sarkomu

Host factors involved in Rous sarcoma virus replication

Bakalářská práce

Školitel: prof. RNDr. Jan Svoboda, DrSc.

Praha, 2015

Mé díky patří rodičům za poskytnutí zázemí, spolužákům za pozitivní motivaci a kamarádům za podporu ve chvílích, kdy už ani sebelepší motivace nestačila. Zejména bych ale chtěl poděkovat prof. RNDr. Janu Svobodovi, DrSc., za ochotu vést moji práci a Ing. Aničce Lounkové za uvedení do problematiky, kritické čtení práce a její konstruktivní připomínkování.

Prohlášení:

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

V Praze, 15. 5. 2015

Podpis

Abstrakt

Virus Rousova sarkomu (RSV) zaujímá čestné místo mezi retroviry. Jeho výzkum nám poodhalil tajemství vzniku a vývoje života, mechanismy rakovinného bujení a interakce mezi viry a jejich hostiteli. Viry nejsou schopné replikace bez hostitelských buněk, zneužívají mnoho jejich procesů a faktorů, dokážou buňky přeprogramovat, aby produkovaly velké množství virového potomstva. Vytvářejí tlak na svého hostitele, který se snaží infekci bránit, čímž dochází k vývoji a uplatnění nových variant buněčných proteinů, které buňkám dávají schopnost rezistence.

Tato práce se zabývá hostitelskými faktory, které RSV ve svém replikačním cyklu využívá. Shrnuje současné poznatky o replikačním cyklu retrovirů a faktory, které jsou pro produktivní infekci nutné: buněčné receptory pro virus, endocytotické a sekretorické dráhy, jaderný transport, proteosyntetický aparát, replikaci provirů a její stimulaci. Nejsou opomenuty ani buněčné obranné mechanismy. Současné poznatky jsou srovnány se savčími patogeny, je poukázáno na mezery ve výzkumu. Zmíněn je také důsledek nepřítomnosti hostitelských faktorů, který se projevuje v hostitelské specifitě a permisivitě.

Klíčová slova: alfaretrovirus, ALV, hostitelský faktor, onkogen, permisivita, provirus, replikace viru, retrovirus, reverzní transkripce, RSV, virus ptačí leukózy, virus Rousova sarkomu

Abstract

Rous sarcoma virus (RSV) takes a place of honor among retroviruses. Research of RSV allows us to uncover the secret of the origin and evolution of life, the mechanisms of tumorigenesis and the interaction between viruses and their hosts. Viruses are not able to replicate themselves without host cells. They exploit a number of cellular pathways and factors and they can reprogram the cells to produce great amounts of viral progeny. They exert pressure on their host that leads to development of new types of cellular proteins, which then results in resistance of the cells.

This thesis focuses on the host factors involved in the RSV replication cycle. It summarizes the current knowledge about the replication cycle of retroviruses and the host factors that are necessary for productive infection: cellular receptors, endocytic and secretory pathways, nuclear transport, proteosynthesis, replication of proviruses and its stimulation. The restriction mechanisms of cells are also taken into account. The current knowledge about RSV is compared with facts on mammalian retroviruses and gaps in research are highlighted. The influence of the host cell factor absence, host specificity and cellular permissiveness are correlated and discussed.

Key words: alpharetrovirus, ALV, avian leukosis virus, host factor, oncogene, permissiveness, provirus, retrovirus, reverse transcription, Rous sarcoma virus, RSV, viral replication

Obsah

Abstrakt	IV
Obsah	V
Použité zkratky a jejich původ	VI
1. Úvod	1
2. Hostitelské faktory účastnící se replikace viru Rousova sarkomu	2
2.1 Historický kontext RSV	2
2.2 Virus Rousova sarkomu	3
2.3 Replikační cyklus RSV a hostitelské faktory	4
2.3.1 Buněčné receptory pro vstup RSV	6
2.3.2 Vstup viru do buněk	8
2.3.3 Reverzní transkripce	9
2.3.4 Preintegrační komplex a jeho vstup do jádra	10
2.3.5 Integrace	10
2.3.6 Replikace provirové DNA	12
2.3.7 Transkripce	12
2.3.8 Sestřih	13
2.3.9 Polyadenylace	14
2.3.10 Jaderný export	14
2.3.11 Translace	15
2.3.12 Posttranslační modifikace	16
2.3.13 Cílení proteinových prekurzorů k membráně	16
2.3.14 Pučení virionů	16
2.3.15 Maturace	17
2.4 Restrikční faktory	18
2.4.1 Restrikční faktory indukované interferony	18
2.4.2 Cytidin deaminázy	19
2.4.3 CSN6	19
2.4.4 Umlčování genů	19
2.5 Permisivita hostitelských buněk vůči RSV	20
3. Závěr	21
4. Seznam použité literatury	22

Použité zkratky a jejich původ

AIDS	syndrom získaného selhání imunity	<u>a</u> cquired <u>i</u> mmune <u>d</u> eficiency <u>s</u> ndrome
ALV	virus ptačí leukózy	<u>a</u> vian <u>l</u> eukosis <u>v</u> irus
AMP; ADP; ATP	adenosinmonofosfát; adenosindifosfát; adenosintrifosfát	<u>a</u> denosine <u>m</u> onophosphate; <u>d</u> iphosphate; <u>t</u> riphosphate
ASLV	viry ptačího sarkomu a leukózy	<u>a</u> vian <u>s</u> arcoma and leukosis <u>v</u> iruses
ATM	serin/threonin kináza účastnící se oprav DNA	<u>a</u> taxia <u>t</u> elangiectasia <u>m</u> utated
ATR	serin/threonin kináza účastnící se oprav DNA	<u>A</u> TM and <u>R</u> ad3-related
BAF	protein bránící autointegraci	<u>b</u> arrier-to- <u>a</u> utointegration <u>f</u> actor
CA	virový kapsidový protein	<u>c</u> apsid protein
cDNA	DNA kopie gRNA	<u>c</u> opy <u>D</u> NA
CEF	kuřecí embryonální fibroblasty	<u>c</u> hicken <u>e</u> mryo <u>f</u> ibroblast
CpG ostrov	oblast bohatá na dinukleotidy cytosinu a guanosinu	<u>c</u> ytosine- <u>p</u> hosphate- <u>g</u> uanosine island
CPSF	proteinový komplex rozeznávající polyadenylační signál	<u>c</u> leavage and <u>p</u> olyadenylation <u>s</u> pecificity <u>f</u> actor
CstF	proteinový komplex stimulující CPSF	<u>c</u> leavage <u>s</u> timulation <u>f</u> actor
CyPA	peptidyl-prolyl <i>cis-trans</i> izomeráza	<u>c</u> yclophilin <u>A</u>
c-Src	buněčná protein-tyrosin kináza, protoonkogen	<u>c</u> ellular <u>s</u> arcoma kinase
<i>de novo</i>	od začátku, nově	
DNA	deoxyribonukleová kyselina	<u>d</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid
DNA-PK	DNA-dependenční protein kináza	<u>D</u> NA-dependent protein <u>k</u> inase
dNTPs	deoxyribonukleotidtrifosfáty	<u>d</u> eoxyribo <u>n</u> ucleotide <u>t</u> riphosphates
DRM	membrána odolná detergentu SDS	<u>d</u> etergent <u>r</u> esistant <u>m</u> embrane
DRs	přímé repetice v genomu viru	<u>d</u> irect <u>r</u> epeats
dsDNA; dsRNA	dvojvláknová DNA; RNA	<u>d</u> ouble- <u>s</u> tranded <u>D</u> NA; <u>R</u> NA
EIAV	virus koňské infekční anémie	<u>e</u> quine <u>i</u> nfectious <u>a</u> nemia <u>v</u> irus
Env; <i>env</i>	virový obalový glykoprotein (prekurzor); jeho gen	<u>e</u> nvelope
ESCRT	proteinové komplexy nutné pro endocytózu a další transport, resp. dráha, která je využívá	<u>e</u> ndocytic <u>s</u> orting <u>c</u> omplexes <u>r</u> equired for <u>t</u> ransport
<i>et al.</i>	a kolektiv	<u>e</u> t <u>a</u> lii
Gag; <i>gag</i>	virový strukturální polyprotein (prekurzor); jeho gen	<u>g</u> roup-specific <u>a</u> ntigen
GPI	glykosyl-fosfatidylinositol	<u>g</u> lycosylphosphatidylinositol

gRNA	virová genomová RNA	genomic <u>R</u> NA
GTP	guanosintrifosfát	guanosine <u>t</u> riphosphate
HDAC	histon-deacetyláza	<u>h</u> istone <u>d</u> eacetylase
HIV	virus lidské imunodeficiency	<u>h</u> uman <u>i</u> mmunodeficiency <u>v</u> irus
hnRNP H	jaderný ribonukleoprotein, který se váže na mRNA i pre-mRNA	<u>h</u> eterogeneous <u>n</u> uclear <u>r</u> ibonucleoprotein
HTLV	virus lidské T-leukémie	<u>h</u> uman <u>T</u> -lymphotropic <u>v</u> irus
IN	virová integráza	<u>i</u> ntegrase
<i>in cis</i>	ve stejném, na stejné sekvenci	
<i>in vitro</i>	ve skle, v Petriho misce	
<i>in vivo</i>	v živém, v organizmech	
ISG	interferony stimulovaný gen	<u>i</u> nterferon- <u>s</u> timulated gene
JAK	Janusova protein-tyrosin kináza	<u>J</u> anus <u>k</u> inase
L-doména	aminokyselinová sekvence nutná pro vypuštění virionů	<u>l</u> ate assembly domain
LAV	původní označení pro HIV	<u>l</u> ymphadenopathy- <u>a</u> ssoiated <u>v</u> irus
LDI	ubikvitin ligáza, která interaguje s L-doménou	<u>l</u> ate <u>d</u> omain- <u>i</u> nteracting protein
LDL	lipoprotein s nízkou hustotou	<u>l</u> ow- <u>d</u> ensity lipoprotein
LEDGF	chromatin vazebný antiapoptotický protein	<u>l</u> ens <u>e</u> pithelium- <u>d</u> erived growth <u>f</u> actor
LTR	dlouhá koncová repetice	<u>l</u> ong <u>t</u> erminal <u>r</u> epet
MA	virový matrixový protein	<u>m</u> atrix protein
MBD	bazická doména Gag proteinu, která interaguje s kyselými fosfolipidy	<u>m</u> embrane- <u>b</u> inding <u>d</u> omain
MLV	virus myší leukémie	<u>m</u> urine leukemia <u>v</u> irus
MMLV	Moloneyho virus myší leukémie	<u>M</u> oloney <u>m</u> urine leukemia <u>v</u> irus
MRN komplex	komplex Mre11, Rad50 a NBS1	<u>M</u> re11, <u>R</u> ad50, <u>N</u> BS1 complex
mRNA	RNA sloužící jako předloha pro translaci	<u>m</u> essenger <u>R</u> NA
NC	virový nukleokapsidový protein	<u>n</u> ucleo <u>c</u> apsid protein
NES	jaderný exportní signál	<u>n</u> uclear <u>e</u> xport <u>s</u> ignal
NHEJ	nehomologní rekombinace	<u>n</u> on <u>h</u> omologous <u>e</u> nd <u>j</u> oining
NHE1	přenašeč Na ⁺ /H ⁺ , buněčný receptor	<u>N</u> a ⁺ / <u>H</u> ⁺ <u>e</u> xchanger <u>1</u>
NLS	jaderný lokalizační signál	<u>n</u> uclear <u>l</u> ocalization <u>s</u> ignal
NRS	negativní regulátor sestřihu	<u>n</u> egative <u>r</u> egulator of <u>s</u> plicing
p	protein, následuje číslo vyjadřující molekulovou hmotnost v kDa	protein
PARP	poly(ADP-ribose) polymeráza	poly(<u>A</u> DP- <u>r</u> ibose) <u>p</u> olymerase
PIC	preintegrační komplex	<u>p</u> re <u>i</u> ntegration <u>c</u> omplex

PIP ₂	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát	phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza	phosphatidylinositol 3-kinase
PML	transkripční faktor a onkosupresor	promyelocytic leukemia protein
Pol; <i>pol</i>	virová polymeráza (prekurzor); její gen	polymerase
poly(A)	polyAMP	polyadenylate
PR	virová proteáza (funkční vyštěpený protein)	protease
pre-mRNA	primární transkript	precursor mRNA
Pro; <i>pro</i>	virová proteáza (prekurzor); její gen	protease
Ψ	enkapsidační signál	encapsulation signal
RAV	transformačně defektní RSV, helper virus	Rous-associated virus
RCAS	vektorový systém	replication-competent ASLV LTR with a splice acceptor
RNA	ribonukleová kyselina	ribonucleic acid
RSV	virus Rousova sarkomu	Rous sarcoma virus
RT	virová reverzní transkriptáza	reverse transcriptase
RTC	komplex reverzní transkripce	reverse transcription complex
SDS	dodecylsírán sodný, detergent	sodium dodecyl sulphate
SIV	virus opičí imunodeficiency	simian immunodeficiency virus
snRNP	malý jaderný ribonukleoprotein	small nuclear ribonucleoprotein
SR protein	na serin/arginin bohatý RNA vazebný protein	serine/arginine-rich protein
SRP	ribonukleoprotein rozpoznávající signální sekvenci translatovaného proteinu	signal recognition particle
ssDNA	jednovláknová DNA	single-stranded DNA
STAT	transkripční faktor aktivovaný JAK	signal transducer and activator of transcription
SU	povrchová podjednotka Env	surface subunit
TM	transmembránová podjednotka Env	transmembrane subunit
TNF	cytokin, faktor nádorové nekrózy	tumor necrosis factor
tRNA ^{Trp}	transferová RNA s navázaným tryptofanem	tryptophanyl-transfer RNA
TVA (-B, -C); <i>tva</i> (-b, -c)	buněčný receptor pro podskupinu ASLV-A (-B, -C); jeho lokus	tumor virus A (B, C) receptor
Ub	ubikvitin, malý regulační protein	ubiquitin
U3; U5	3'; 5' netranslatovaná oblast v LTR	3'-; 5'-untranslated region
v- <i>Src</i> ; <i>src</i>	virová protein-tyrosin kináza, onkogen; její gen	viral sarcoma kinase

1. Úvod

Retroviry jsou obalené viry s genomem tvořeným ribonukleovou kyselinou. Ve svém životním cyklu svůj genom přepisují do DNA pomocí virového enzymu reverzní transkriptázy. Vzniklá cDNA je následně integrována do genomu hostitele a replikuje se společně s hostitelskou DNA. Tato strategie činí z retrovirů téměř nepolapitelného nepřítele: i kdyby se imunitnímu systému podařilo zničit všechny viriony, virus ve formě provirové DNA zůstane nadále ukryt v jádře infikovaných buněk.

Virus Rousova sarkomu (RSV) byl vůbec prvním objeveným retrovirem. Jeho přirozeným hostitelem jsou hrabaví ptáci (zejména kur domácí), ve kterých indukuje nádorové bujení. Spolu s blízce příbuzným virem ptačí leukózy (ALV) způsobují úhyn kuřat v hospodářských chovech a následné ekonomické ztráty (Payne *et al.* 2010).

V současné době je většina prostředků věnována výzkumu lidských patogenů, v případě retrovirů převážně viru lidské imunodeficiency (human immunodeficiency virus, HIV), který napadá imunitní systém a způsobuje rozvoj syndromu získaného selhání imunity (acquired immunodeficiency syndrome, AIDS). Přestože mají HIV a RSV značné odlišnosti, je možné velkou část poznatků o viru HIV aplikovat na všechny retroviry včetně RSV a naopak – i výzkum RSV nám pomáhá v boji s HIV.

Všechny viry jsou jako intracelulární paraziti závislé na přítomnosti buněčných hostitelských faktorů, které jim umožňují zakončit replikační cyklus produkcí dostatečného množství potomstva. Právě hostitelské faktory – zejména proteiny, nukleové kyseliny a membránové lipidy – ovlivňují, jaké spektrum organizmů a tkání je virus schopen infikovat, a mohou se tak stát cílem při antivirové terapii. Na rozdíl od virových proteinů u nich neprobíhá tak silná mutageneze, která by rychle vedla k rezistenci vůči léčivům.

Cílem této práce je shrnout aktuální stav výzkumu hostitelských faktorů RSV, zdůraznit rozdíly ve využití těchto faktorů oproti jiným retrovirům a poukázat na mezery, které v této skládačce zbývá doplnit.

Je třeba podotknout, že výzkum v současnosti striktně nerespektuje přirozený vztah hostitel-virus a je prováděn na tkáňových kulturách, které jsou velmi nedokonalým modelem hostitelského organismu. Ba navíc jsou využívány i buňky pro virus exotické (např. kvasinky), jejichž infekce je možná po výměně virových obalových glykoproteinů. Tímto přístupem vytváříme jakýsi modelový náhled na problematiku, který je sice v obecné rovině postačující, ale v konkrétních situacích může být nepřesný.

2. Hostitelské faktory účastníci se replikace viru Rousova sarkomu

2.1 Historický kontext RSV

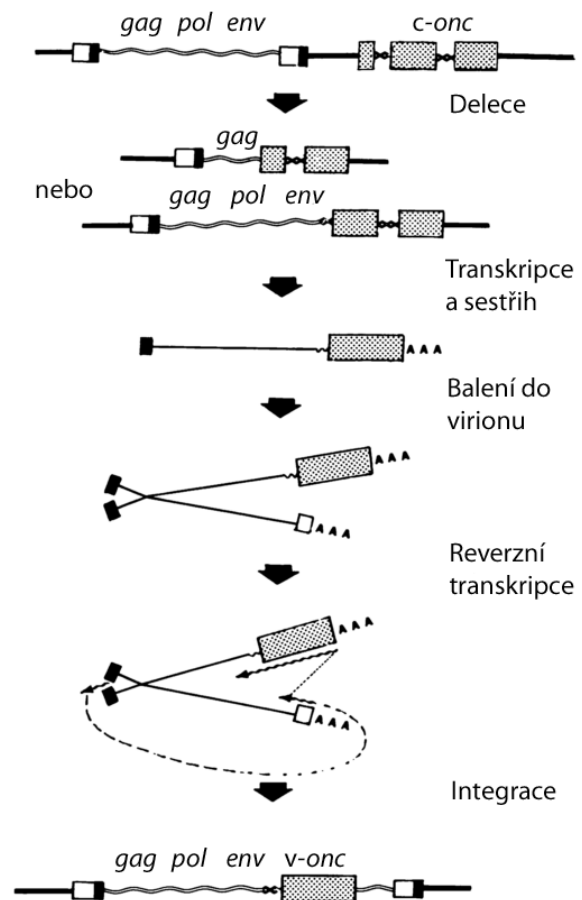
Na počátku 20. století bylo zjištěno, že některé nádory jsou transplantovatelné mezi různými organizmy (Beebe & Ewing 1906; Marine & Lenhart 1910). Prvním takovým nádorem v ptačí říši byl sarkom kura domácího (Rous 1910), záhy se ale ukázalo, že na rozdíl od dříve popsáných rakovinných bujení k jeho přenosu není nutné transplantovat buňky, ale stačí malé množství bezbuněčného filtrátu (Rous 1911). Peyton Rous tedy postuloval, že příčinou rakovinného bujení by mohl být malý parazitický organizmus, jako je tomu i u jiných onemocnění, nebo chemická látka produkovaná nádorovými buňkami. Popsal i vznik rezistence vůči tomuto agens a pozoroval zvýšení agresivity nádoru po několika transplantacích. Později se ukázalo, že tímto agens je virus. V roce 1966 Rous získal Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu za objev prvního rakovinotvorného viru.

Práce na RSV byla krátce po jeho objevu přerušena. Na scénu se vrací až v polovině 20. století, kdy je popsán la-

boratorní postup pro transformaci tkáňových kultur (Temin & Rubin 1958). Pokusy vrcholí objevem RNA-dependentní DNA-polymerázy (reverzní transkriptázy), který rozšířil původně jednostranný vztah mezi DNA a RNA v centrálním dogmatu molekulární biologie (Baltimore 1970; Temin & Mizutani 1970). Za tento objev získali Nobelovu cenu v roce 1975 David Baltimore, Renato Dulbecco a Howard Martin Temin.

V 80. letech byla popsána homologie mezi virovým onkogenem v-Src a buněčnou protein-tyrosin kinázou c-Src (Parker *et al.* 1981; Swanstrom *et al.* 1983). Tento výzkum vedoucí k pochopení vztahu mezi transformujícím virovým proteinem a buněčným protoonkogenem (obr. 1) byl v roce 1989 oceněn Nobelovou cenou pro Johna Michaela Bishopa a Harolda Eliota Varmuse. V roce 1983 byl genom RSV osekvenován (Schwartz *et al.* 1983).

V roce 1983 byl ale také poprvé izolován a popsán HIV-1 (původně jako HTLV-III, resp. LAV), který na sebe následně stáhl většinu pozornosti (Barré-Sinoussi *et al.* 1983; Gallo *et al.* 1983). I tento objev si v roce 2008 vysloužil Nobelovu cenu.



Obrázek 1 | Model transdukce buněčného protoonkogenu (c-onc) do genomu viru. Převzato ze Swanstrom *et al.* (1983), upraveno.

2.2 Virus Rousova sarkomu

Retroviry se podle uspořádání genomu dělí na jednoduché a komplexní. První z nich kódují tři hlavní proteinové produkty, Gag (group-specific antigen), Pol (polymeráza) a Env (obalový glykoprotein), které jsou nezbytnou součástí virionů. Součástí polyproteinů Gag, nebo Pol je také virová proteáza (Pro). Komplexní retroviry nesou navíc geny pro nestrukturní proteiny. Ačkoli RSV kóduje nestrukturní protein v-Src, řadí se mezi jednoduché retroviry. Podle taxonomické příbuznosti tvoří retroviry sedm rodů, RSV je alfaretrovirus (tabulka 1) (Vogt 1997a; Vogt 1997b).

Vzhledem ke své reprodukční strategii, kdy je virová DNA včleněna do chromozomů hostitele, mají retroviry potenciál přeměňovat hostitelské buňky na nádorové. Mohou se integrovat do genu pro onkosupresor (protein kontrolující buněčný cyklus; změna se projevuje recesivně) a tím jej narušit, nebo před hostitelský protoonkogen (protein, který má potenciál se stát onkogenem; změna se projevuje jako dominantní), jehož transkripce je kvůli silnému retrovirovému promotoru zesílena a deregulována. Takové retroviry označujeme jako chronicky transformující.

Při integraci v okolí protoonkogenu může nastat situace, kdy je gen pro onkogen „omylem“ připojen k virovému genomu a sbalen do virionů (obr. 1) (Swanstrom *et al.* 1983). K tomu většinou dochází na úkor jiného virového genu a takový virion není schopen replikace bez doplnění ztracených proteinů. Zmíněný proces je využíván i při genové terapii, kdy transgenní virus vnáší do hostitele upravený gen. I v tomto případě je však možná komplementace pomocí jiného nedefektního viru (tzv. helper virus), nebo pomocí defektního proviru, který je ukryt v genomu hostitele a již neumožňuje vznik infekčních částic (tzv. endogenní virus). Výjimečně je onkogen připojen do virového genomu bez poškození ostatních genů. Výsledkem je virion schopný replikačního cyklu i vyvolání nádorového bujení. Takové viry označujeme jako replikačně kompetentní a akutně onkogenní.

Tabulka 1 | Čeleď Retroviridae – taxonomické rozdělení. Podle Vogt (1997a), aktualizováno s využitím databáze ICTV (2014).

Podčeleď	Rod	Příklad druhu	Genom	
Orthoretrovirinae	„oncoviruses“	Alpharetrovirus	Rous sarcoma virus (RSV) avian leukosis virus (ALV)	jednoduchý
		Betaretrovirus	mouse mammary tumor virus Mason-Pfizer monkey virus	jednoduchý
		Gammaretrovirus	Moloney murine leukemia virus (MMLV) murine leukemia virus (MLV)	jednoduchý
		Deltaretrovirus	primate T-lymphotropic virus bovine leukemia virus	komplexní
		Epsilonretrovirus	walleye dermal sarcoma virus	jednoduchý
	Lentivirus	human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) equine infectious anemia virus (EIAV) simian immunodeficiency virus (SIV)	komplexní	
Spumaretrovirinae	Spumavirus	human foamy virus	komplexní	

To je i případ transformačně nedefektních kmenů RSV (PR-RSV, SR-RSV), které ve svém genomu kódují onkogen v-Src. Jde o protein-tyrosin kinázu, jejíž buněčná varianta c-Src se účastní signalizace a regulačních dějů v buňce. Virem kódovaný protein se od buněčného liší absencí regulačních oblastí a neustále tak stimuluje buněčný růst a dělení. To zajišťuje větší produkci virového potomstva. RSV se pravděpodobně vyvinul z ALV, od kterého se odlišuje pouze přítomností genu pro v-Src (Martin & Duesberg 1972; Temin 1976).

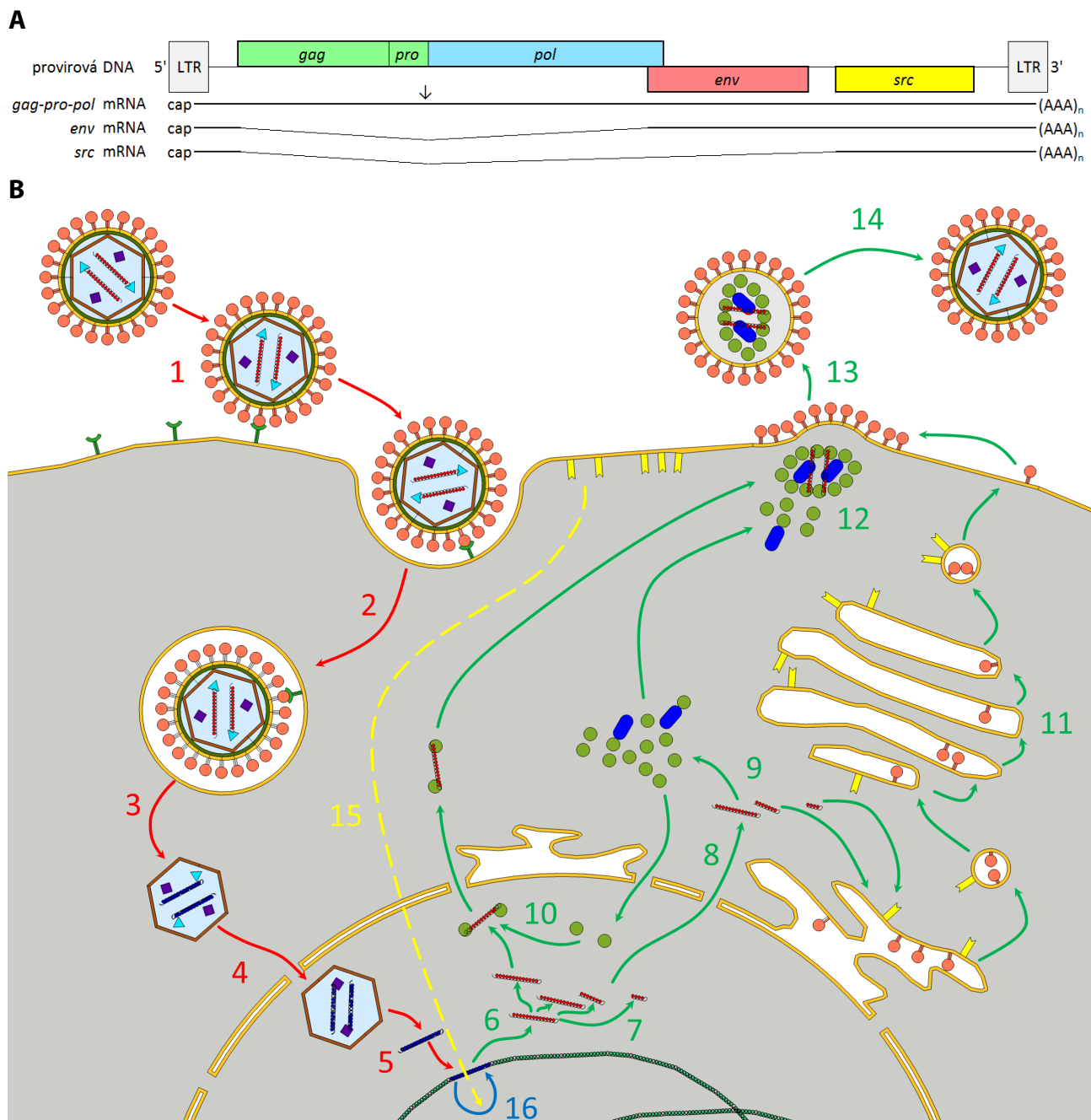
RSV spolu s ALV tvoří skupinu virů ptačího sarkomu a leukózy (avian sarcoma and leukosis viruses, ASLV), která patří mezi alfaretroviry. Ve svém genomu velkém zhruba 9,5 kb (obr. 2A) nese geny *gag*, *pro*, *pol* a *env* a oproti ALV ještě navíc *src*. Celogenomová mRNA dává vzniknout polyproteinu Gag(Pro) a v menší míře i Gag(Pro)-Pol, pro jehož translaci je nutný ribozomální posun čtecího rámce (tzv. frame-shift) o jeden nukleotid zpátky (Jacks & Varmus 1985). Z prekurzoru Gag(Pro) je autokatalyticky vyštěpena proteáza PR, která během maturace štěpí Gag na proteiny MA (matrixový protein), p2a, p2b, p10, CA (kapsidový protein) a NC (protein nukleokapsidy) i prekurzor Pol na RT (reverzní transkriptáza) a IN (integráza). Sestřižená mRNA nese geny *env* a *src*, nebo jen *src*. Eukaryotická mRNA je monocistronní – ribozóm rozpoznává první vazebné místo, proto je ze sestřižených mRNA translatován vždy jen první gen. Z genu *env* vzniká polyprotein Env, který buněčná proteáza v Golgiho aparátu štěpí na glykoproteiny SU (povrchová podjednotka) a TM (transmembránová podjednotka) (Vogt 1997b). Ze *src* je syntetizován protein v-Src.

2.3 Replikační cyklus RSV a hostitelské faktory

Replikační cyklus RSV (obr. 2B) se rozděluje na časnou a pozdní fázi. Časná fáze začíná rozpoznáním buněčného receptoru a následnou endocytózou. Po okyselení vzniklého endozómu virové proteiny fúzí endozomální a virovou membránu a nukleokapsida se uvolňuje do cytoplazmy. Tam se formuje komplex reverzní transkripce a za přítomnosti deoxyribonukleotidů probíhá přepis virové genomové RNA (gRNA) do DNA kopie (cDNA), která je ve formě preintegračního komplexu přenesena do jádra a integrována do genomu hostitele.

V pozdní (chronické) fázi probíhá nepřetržitá transkripce proviru do pre-mRNA, ze které je část sestřihována do subgenomových mRNA. Všechny virové mRNA jsou opatřeny 5' čepičkou a 3' poly(A) koncem. Následně jsou translokovány z jádra do cytoplazmy a translatovány hostitelskými ribozómy na strukturální polyproteiny a virový onkogen v-Src, který stimuluje dělení infikovaných buněk. Polyproteiny jsou spolu s gRNA směřovány k buněčné membráně, kde dochází ke skládání nových virionů. Po vypučení z buňky se z polyproteinu Gag autokatalyticky vyštěpí virová proteáza, která dále štěpí Gag a Pol prekurzory. Tím vzniká maturovaná částice schopná další infekce.

Během celého procesu RSV využívá hostitelské faktory, které jsou pro něj esenciální. Absenci mnohých z nich virus nedokáže nahradit. RSV je přizpůsoben faktorům v ptačích buňkách, nicméně je schopen infikovat i některé buňky savců, integrovat do jejich genomu provirus a ve výjimečných případech se v nich i replikovat (viz kap. 2.5 Permisivita hostitelských buněk vůči RSV).



Obrázek 2 | A | Uspořádání genomu viru Rousova sarkomu. Transkripce probíhá z LTR (long terminal repeat) oblastí provirové DNA a primární transkript následně podstupuje alternativní sestřih, jehož výsledkem jsou tři populace mRNA. První tvoří nesestřihená celogenomová mRNA, ze které se translatují geny pro Gag (group-specific antigen), Pro (proteáza) a Pol (polymeráza); druhou sestřihěná pro protein Env (obalový glykoprotein) a třetí sestřihěná pro protein v-Src (virový onkogen). Všechny mRNA jsou opatřeny m⁷G čepičkou na 5' konci a na 3' konci jsou polyadenylovány. Šipka označuje místo posunu čtecího rámce o jeden nukleotid zpět. Zdrojem dat pro ilustraci je nukleotidová sekvence z Schwartz *et al.* (1983).

B | Replikační cyklus RSV. Časná fáze: 1) rozpoznání buněčného receptoru; 2) receptorem zprostředkovaná endocytóza; 3) fúze virové membrány s membránou endozómu, zformování komplexu reverzní transkripce a samotná reverzní transkripce; 4) vznik preintegračního komplexu a jeho import do jádra; 5) integrace virové cDNA (modře) do genomu hostitele (zeleně). Pozdní fáze: 6) transkripce proviru; 7) sestřih virové mRNA (červeně), capping, polyadenylace; 8) export mRNA z jádra do cytoplazmy; 9) translace, syntéza polyproteinů Gag(Pro) (zelený), Gag(Pro)-Pol (zelenomodrý), Env (červený) a proteinu v-Src; 10) translokace Gag(Pro) do jádra, jeho asociace s nesestřihěnou gRNA a export komplexu z jádra; 11) posttranslační úpravy Env a v-Src v sekretorické dráze, expozice na povrch buňky; 12) skládání virionů; 13) pučení; 14) maturace, štěpení polyproteinových prekurzorů. Onkogeneze: 15) protein-tyrosin kináza v-Src fosforyluje sekundární posly a stimuluje buňku k růstu a buněčnému dělení. Vertikální přenos: 16) provirus se replikuje s hostitelskou DNA a přenáší se do dalších generací.

2.3.1 Buněčné receptory pro vstup RSV

Retroviry mají na svém povrchu virové obalové glykoproteiny, které rozpoznávají proteiny na povrchu hostitelských buněk – buněčné receptory. Díky této interakci jsou retroviry schopny identifikovat hostitelské buňky a přichytit se na ně. Přítomnost receptorů určuje tropismus virů: často jsou buněčné receptory specifické pro určitý organizmus nebo tkáň.

Právě podle variant proteinu Env a jím ovlivněné hostitelské specifity můžeme skupinu ASLV rozdělit do podskupin A-E, J a K (tabulka 2) (Vogt & Ishizaki 1965; Vogt 1967; Duff & Vogt 1969; Payne *et al.* 1991; Cui *et al.* 2014). Podskupiny F-I byly objeveny v genomu divokých druhů ptactva ve formě endogenních provirů a od ASLV se liší i v Gag a polymeráze (Fujita *et al.* 1974; Hanafusa *et al.* 1976; Troesch & Vogt 1985). Mezi jednotlivými podskupinami ALV a RSV může probíhat rekombinace, což dokazuje množství chronicky i akutně onkogenních izolovaných kmenů (Temin & Kassner 1976).

Každá z podskupin A-E využívá některý z buněčných receptorů kódovaných v lokusech *tva*, *twb* či *twc* (tumor virus A, B, C) (Rubin 1965; Payne & Biggs 1966). Tyto lokusy byly objeveny již v šedesátých letech, neexistovaly ale metody pro identifikaci proteinových produktů.

V lokusu *tva* je kódován protein TVA patřící mezi receptory pro LDL (low-density lipoprotein). Jeho smyčka, která váže LDL, slouží jako receptor podskupině A (Bates *et al.* 1993; Young *et al.* 1993). Primární transkript je alternativně sestřihován do dvou forem: kratší TVA800 s GPI kotvou na C-konci a delší TVA950 s transmembránovou doménou (Bates *et al.* 1993).

Lokus *twb* má několik alel, mj. *twb^{S1}* a *twb^{S3}*, které kódují proteiny TVB^{S1} a TVB^{S3}. Ty se od sebe liší záměnou cysteinu (TVB^{S1}) za serin (TVB^{S3}) v pozici 62. Jedná se o varianty receptoru pro TNF (tumor necrosis factor). Obě varianty proteinu slouží jako receptor pro podskupiny B a D. Podskupina E vyžaduje TVB^{S1} (Adkins *et al.* 2000). Byla objevena také alela *twb^T* v krutích buňkách, která kóduje protein TVB^T, fungující jako receptor pouze pro ASLV-E (Adkins *et al.* 1997).

Gen *twc* kóduje protein TVC, který využívá podskupina C. Je sekvenčně nejvíce podobný savčímu imunoglobulinu – butyrophilinu BTN1A1 (Elleder *et al.* 2005).

Každý z lokusů může obsahovat také rezistentní alely (*tva^r*, *tva^{r2}*, *twb^r*, *twc^r*), rezistence se potom projevuje většinou jako defekt v expresi receptoru – tedy pouze u recesivních homozygotů (Klucking *et al.* 2002; Elleder *et al.* 2004).

Později objevená podskupina J vznikla pravděpodobně rekombinací s endogenními retroviry (Benson *et al.* 1998). Jako receptor využívá Na⁺/H⁺ přenašeč NHE1 (Chai & Bates 2006). Na rozdíl od ostatních ptáčích druhů nebyla mezi kuřaty pro tento receptor objevena rezistentní alela *twj^r*, kvůli čemuž se virus rychle šíří v kuřecích chovech (Payne *et al.* 2010; Kučerová *et al.* 2013).

Tabulka 2 | Ptačí retroviry. Zatímco ASLV a LPDV patří mezi alfaretroviry, REV je gammaretrovirus. Endogenní retroviry jsou klasifikovány spíše jako retrotranspozony, nicméně bylo prokázáno, že většina ptačích endogenních retrovirů je sekvenčně příbuznější s beta- a gammaretroviry (Bolisetty *et al.* 2012).

ASLV, avian sarcoma and leukosis viruses; BTN1A1, butyrophilin, subfamily 1, member A1; CSV, chicken syncytial virus; CZAV, Carr-Zilber associated virus; GPV, Golden pheasant virus; QV, Gamble's quail virus; HPRS, Houghton Poultry Research Station; LDLR, low density lipoprotein receptor; LPDV, lymphoproliferative disease virus; MAV, myeloblastosis-associated virus; NHE1, Na⁺/H⁺ exchanger 1; PR-RSV, Prague strain Rous sarcoma virus; RAV, Rous-associated virus; REV, reticulo-endotheliosis virus; RPV, ring-necked pheasant virus; SNV, spleen necrosis virus; SR-RSV, Schmidt-Ruppin strain RSV; SRVR, simian retrovirus receptor; TNFR, tumor necrosis factor receptor. Převzato z Weiss (1993), upraveno.

Skupina	Podskupina	Příklad kmene	Hostitel	Přenos	Receptor
ASLV	A	RAV-1 PR-RSV-A	kuře	exogenní	TVA800, TVA950 (LDLR)
	B	MAV-2 PR-RSV-B	kuře	exogenní	TVB ^{S1} , TVB ^{S3} (TNFR)
	C	RAV-49 PR-RSV-C	kuře	exogenní	TVC (BTN1A1)
	D	CZAV SR-RSV-D	kuře	exogenní	TVB ^{S1} , TVB ^{S3} (TNFR)
	E	RAV-0 RAV-60	kuře	endogenní	TVB ^{S1} , TVB ^T (TNFR)
	J	HPRS-103	kuře	exogenní	NHE1
	K	JS11C1	kuře	endogenní	-
Game bird viruses	F	RPV RAV-61	bažant obecný	endogenní	-
	G	GPV	bažant zlatý	endogenní	-
	H	RAV-62	koroptev polní	endogenní	-
	I	QV	křepel přílbový	endogenní	-
REV	-	REV CSV SNV	krocán kuře kachna	exogenní	SRVR
	LPDV	-	krocán	exogenní	-

2.3.2 Vstup viru do buněk

Viry obecně dělíme na neobalené a obalené (s fosfolipidovou membránou na svém povrchu). Obalené, mezi které patří i retroviry, využívají pro uvolnění nukleokapsidy do cytoplazmy fúze virového obalu s membránovým systémem hostitelské buňky. Fúze je stimulována buď rozpoznáním koreceptoru na cytoplazmatické membráně, nebo okyselením vakuoly po endocytóze virionu. Některé retroviry (např. HIV-1) dokážou využívat obě cesty, avšak skupina ASLV vstupuje do buněk pouze endocytózou. I v tomto se jednotlivé podskupiny ASLV odlišují, konkrétní endocytotická dráha je totiž funkčně spojena s receptorem, který ji dokáže aktivovat.

Podskupina ASLV-A využívá dvou cest vstupu do buňky. Tou první je po interakci s receptorem TVA800, který je pomocí GPI kotvy přichycen do oblasti membrány odolné vůči detergentu SDS (detergent-resistant membrane, DRM), DRM zprostředkovaná endocytóza (Narayan *et al.* 2003). DRM je bohatá na cholesterol, sphingolipidy a protein caveolin-1, což umožňuje tvorbu caveolů (Kurzchalia & Parton 1999, review). Druhou možností je vstup přes transmembránovou formu receptoru TVA950, při němž nedochází k DRM zprostředkované endocytóze. I osud virionů se liší – zřejmě směřují clathrinovou endocytózou do jiného kompartmentu, kde jsou pomalu degradovány (Narayan *et al.* 2003).

ASLV-B vstupuje do buněk clathrinem zprostředkovanou endocytózou (Diaz-Griffero *et al.* 2002), která je na caveolinu-1 nezávislá. Receptor TVB^{S3} není asociován s DRM a je kolokalizován s clathrinem (Diaz-Griffero *et al.* 2005).

Jak pro clathrinovou tak caveolinovou endocytózu je nutný dynamin, který se podílí na odškrcení vakuoly (Damke *et al.* 1994; Oh *et al.* 1998), nicméně v buňkách exprimujících mutantní formu dynaminu (K44A) jsou využívány alternativní endocytotické dráhy na dynaminu nezávislé (Damke *et al.* 1995). Podobně si buňka dokáže poradit i při absenci clathrinu (Wetley *et al.* 2002).

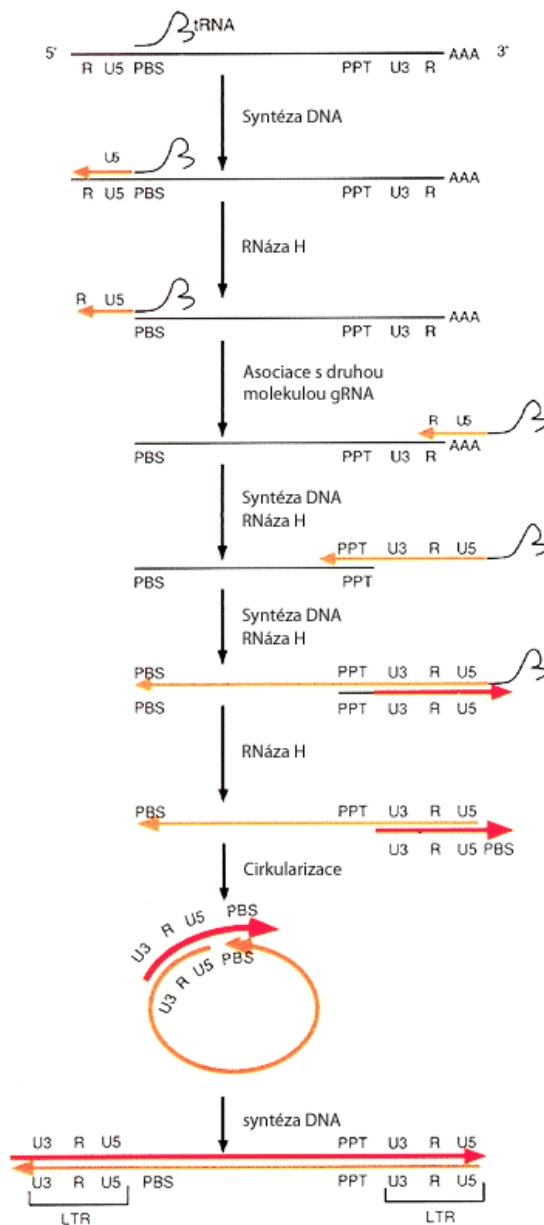
Bylo zjištěno, že RSV je po vystavení nízkému pH stále schopen, na rozdíl od viru chřipky, vstoupit do buněk. To vedlo k předpokladu, že kyselé endozomální prostředí není pro infekci nutné (Gilbert *et al.* 1990). Další experimenty však ukázaly, že virový obalový glykoprotein Env prochází konformační změnou při specifické vazbě na receptor a teprve po této změně se virus stává citlivým na pH (Mothes *et al.* 2000). K mísení virové a endozomální membrány sice dochází v neutrálním pH (Earp *et al.* 2003), pro produktivní infekci je však nutné okyselení vakuoly (Diaz-Griffero *et al.* 2002; Narayan *et al.* 2003), a to pomocí vakuolární H⁺/ATPázy (Márquez-Sterling *et al.* 1991). Ta se do časného endozómu dostává jeho splýváním se staršími endozómy, které reguluje fosfatidylinositol 3-kináza (PI3K) prostřednictvím proteinu Rab5 (Li *et al.* 1995). Právě PI3K je aktivována receptorem podskupiny J a clathrinovou endocytózou skupin A a B (Feng *et al.* 2011). Po okyselení dochází k dalším konformačním změnám virových proteinů, které vyústí ve fúzi membrán.

2.3.3 Reverzní transkripce

Ačkoli viriony nesou RNA, virová cDNA byla detegována již v cytoplasmě (Varmus *et al.* 1974). Po fúzi membrán a uvolnění nukleokapsidy z endozómu dochází ke zformování RTC (reverse transcription complex), který za přítomnosti deoxyribonukleotidů (dNTPs) a dvojmocných kationtů přepisuje gRNA do cDNA. Pro zahájení syntézy DNA je vždy nutný primer, v případě ptačích retrovirů je jím tRNA^{Trp} navázaná na PBS (primer binding site) v gRNA již při skládání virionů (Folk & Faras 1976). Schéma reverzní transkripce je zobrazeno na obr. 3.

Přesné složení RTC není známo, protože je problematické komplex izolovat a jeho velikost se mění podle použité metody purifikace. Interakce mezi jednotlivými složkami jsou slabé a po opůsobení detergenty zanikají. Navíc i přímo v buňkách jsou zastoupeny různě kompletní RTC, přičemž pokud některý z faktorů chybí, nevede to k produktivní infekci. Byly provedeny izolace RTC MMLV (Moloney murine leukemia virus) a HIV-1 a z průniku těchto studií můžeme usoudit, že v RTC jsou zastoupeny kromě nukleových kyselin i virové proteiny RT a IN. CA protein je součástí RTC u MMLV, ale do jádra už nevstupuje, v případě HIV-1 se CA v RTC nenachází, na rozdíl od proteinů MA a NC (Fassati & Goff 1999; Fassati & Goff 2001). V případě HIV-1 byla popsána interakce mezi MA a aktinem, která je nutná pro efektivní reverzní transkripci (Bukrinskaya *et al.* 1998).

Proces reverzní transkripce je na hostitelských faktorech nezávislý, s výjimkou dNTPs a dvojmocných kationtů, které jsou pro reakci *in vitro* nezbytné (Rothenberg & Baltimore 1975; Rothenberg & Baltimore 1977; Clayman *et al.* 1979). Při inkubaci neporušených virionů HIV-1 s dNTPs a polyaminy (např. spermin, spermidin) *in vivo* byla pozorována dokonce reverzní transkripce (tzv. přirozená endogenní reakce) ještě před vstupem do buněk (Zhang *et al.* 1996).



Obrázek 3 | Schéma reverzní transkripce. tRNA je asociovaná s virovou gRNA (černě) a slouží jako primer pro reverzní transkripci. Po syntéze 3' konce minus-vlákná DNA (oranžově) je komplementární gRNA štěpena reverzní transkriptázou, respektive její RNázovou aktivitou. Následně je pomocí komplementarity repetitivní sekvence (R) využita jako templát druhá molekula gRNA, která je během reverzní transkripce fragmentována RNázovou aktivitou reverzní transkriptázy. Krátké fragmenty slouží jako primery pro syntézu plus-vlákná DNA (červeně). Po odstranění primeru molekula obsahuje lepivé konce, vzniká cirkulární meziprodukt, který dává vzniknout lineární dsDNA. LTR, long terminal repeat; PBS, primer binding site; PPT, polypurinový trakt; R, repetitivní oblast; U3, U5, netranslatované oblasti na 3', resp. 5' konci. Převzato z Telesnitsky & Goff (1997), upraveno.

2.3.4 Preintegrační komplex a jeho vstup do jádra

Přepsaná cDNA tvoří spolu s proteiny preintegrační komplex (PIC) (Bowerman *et al.* 1989; Lee & Coffin 1990). Jeho účelem je přenos virové cDNA do jádra a následná integrace.

Výsledky prvotních výzkumů byly mylně interpretovány, soudilo se, že vstupu do jádra neproliferujících buněk jsou schopny jen komplexní retroviry a ty jednoduché musejí čekat až na buněčné dělení a rozpad jaderné membrány. Přímo pro ASLV bylo toto omezení infekce buněk v interfázi experimentálně dokázáno (Humphries & Temin 1972; Humphries & Temin 1974); následně však bylo zjištěno, že retrovirový cyklus je v nedělicích se buňkách blokován už na úrovni reverzní transkripce, kdy je v cytoplazmě malé množství dNTPs (Fritsch & Temin 1977). Pozdější pokusy ukazují, že buněčné dělení není v reprodukci RSV esenciální, neboť malé množství buněk (3 %) bylo infikováno i ve stacionární fázi (Hatzioannou & Goff 2001; Katz *et al.* 2002).

PIC je (v případě HIV-1 a MLV) složen z virové cDNA, integrázy, reverzní transkriptázy, matrixového a nukleokapsidového proteinu a hostitelského dimeru DNA vazebných proteinů Ku70/Ku80. Ku70 a Ku80 jsou podjednotkami DNA-dependentní protein kinázy (DNA-PK) rozpoznávající dsDNA zlomy (Miller *et al.* 1997; Li *et al.* 2001). Pro svoji velikost (více než 160S) není PIC schopen volné difúze do jádra skrz jaderné póry. Proto integráza RSV obsahuje bazický jaderný lokalizační signál (nuclear localization signal, NLS) (Kukolj *et al.* 1997; Kukolj *et al.* 1998). Pro translokaci IN je sice využíván importin- β , ale ne v dimeru s importinem- α . Jako adaptorový protein zřejmě slouží některý z hostitelských faktorů (importin-5, importin-7 či transportin-1) využívaných pro transport histonu H1. V procesu také dochází ke spotřebě ATP, ať už při samotném transportu, či při doplňování GTP (Bäuerle *et al.* 2002; Andrade *et al.* 2008).

Později byly objeveny NLS také v MA a NC doménách polyproteinu Gag. MA neobsahuje běžný bazický NLS a je v ptačích buňkách translokován slabě, a sice pomocí přenašečů transportin-SR a importin-11. Hlavní NLS polyproteinu Gag je v NC doméně a využívá transportní systém založený na importinu- α (Butterfield-Gerson *et al.* 2006). Tato interakce pomáhá vstupu PIC do jádra; její hlavní význam bude zmíněn dále (viz kap. 2.3.10 Jaderný export).

2.3.5 Integrace

Segmentované plus-vlákno DNA je v jádře doplněno a opraveno a spolu s genomovým minus-vlákem může být původně lineární molekula cirkularizována (Shank & Varmus 1978). Na obou procesech se podílejí hostitelské enzymy. Cirkulární forma je však vedlejším produktem a není použita při integraci (Brown *et al.* 1989).

Církulární molekuly mohou obsahovat jednu, či dvě LTR sekvence. Na vzniku 2-LTR kruhů se podílí nehomologní opravy DNA (nonhomologous end joining, NHEJ); 1-LTR kruhy vznikají i při poškození této cesty (Li *et al.* 2001) jako výsledek homologní rekombinace závislé na komplexu MRN (Mre11, Rad50 a NBS1) (Kilzer *et al.* 2003).

Autointegraci brání hostitelský protein BAF (barrier-to-autointegration factor), který se váže na virovou DNA, kondenzuje ji a tím omezuje její přístupnost (Lee & Craigie 1998; Skoko *et al.* 2009). Jeho aminokyselinová sekvence je mezidruhově variabilní a mohla by být zodpovědná za hostitelskou specifitu viru. Nicméně interakce s alfaretroviry zatím nebyla prokázána.

Pro integraci je zřejmě esenciální DNA-PK, která se podílí na NHEJ (Daniel *et al.* 1999). Toto bylo zjištěno jak pro RSV, tak pro HIV-1 a MMLV. Další práce však ukázala, že minimálně pro integraci HIV-1 není DNA-PK nutná (Baekelandt *et al.* 2000). NHEJ se kromě tří podjednotek DNA-PK (DNA-PKcs, Ku70, Ku80) účastní i komplex XRCC4-DNA ligáza-IV. DNA-PK může navíc aktivovat MRN dráhu (Smith & Jackson 1999, review).

V buňkách bez funkční DNA-PK ji nahrazuje ATM (ataxia telangiectasia mutated) kináza, která se na procesu integrace obvykle nepodílí, její absence za současné aktivity DNA-PK nevede k snížení virové transdukce. Následně je DNA opravena dráhou využívající ATR (ATM and Rad3-related) kinázy. Inhibítorem aktivity ATM i ATR je kofein – v buňkách pod jeho vlivem je snížena integrace jak HIV-1, tak RSV (Daniel *et al.* 2003). Ke snížení aktivity ATM a ATR o 50 % *in vitro* je nutná 0,2, resp. 1,1mM koncentrace kofeinu. DNA-PK ke kofeinu senzitivní není (Sarkaria *et al.* 1999).

U HIV-1 byla pozorována také integrace pomocí homologní rekombinace s účastí MRN inhibovaná proteiny RAD18, RAD51 a RAD52, které interagují s IN (Lau *et al.* 2004; Lloyd *et al.* 2006; Cosnefroy *et al.* 2012).

Původní studie, která neuvažovala podíl hostitelských faktorů na specifitě integrace, ukázala, že integrace probíhá do přístupných oblastí hostitelské DNA s rozvolněnými nukleozómy, často se slabou transkripční aktivitou. Naopak silnější transkripce integraci inhibuje, neboť DNA vazebné proteiny a celý transkripční aparát brání nasednutí integrázy (Weidhaas *et al.* 2000). To bylo následně prokázáno pro transkripční faktory HNF3 a GATA4, které brání integraci do svých vazebných míst (Taganov *et al.* 2004).

Preference integrační oblasti se ale mezi retroviry liší, což poukazuje na vliv hostitelských faktorů (Mitchell *et al.* 2004). Například u HIV-1 byla pozorována interakce mezi integrázou a LEDGF/p75 (lens epithelium-derived growth factor), který směřuje PIC specificky k euchromatinu (Cherepanov *et al.* 2003). Tato interakce je ale lentivirově specifická a u jiných retrovirů neprobíhá (Busschots *et al.* 2005).

Pro klinické využití v genové terapii byla sledována integrace ASLV v lidských buňkách. Alfaretrovirové vektory se jeví jako bezpečnější alternativa lentivirových a gammaretrovirových vektorů. ASLV v lidských buňkách totiž nepreferují integraci do transkripčních počátků a pouze málo jsou zvýhodněny transkripčně aktivní oblasti a CpG ostrovy, na které jsou geny bohaté (Mitchell *et al.* 2004; Moiani *et al.* 2014). Za možnou příčinu byla uváděna absence některého z hostitelských faktorů v lidských buňkách, proto byla nedlouho po osekvenování kuřecího genomu provedena podobná studie na kuřecích embryonálních fibroblastech (CEF). Ta ale pouze potvrdila data získaná na lidských buňkách, které se zřejmě ve faktorech ovlivňujících specifitu integrace ASLV od CEF neliší – pokud vůbec takové faktory existují (Barr *et al.* 2005). Je potřeba vzít v potaz, že lidský genom je třikrát větší než kuřecí, na čemž se podílí hlavně rozvoj nekódujících oblastí. ASLV v přirozeném hostiteli mají vyšší pravděpodobnost, že se „trefí“ do transkripčně aktivní lokality, zatímco savčí retroviry se do ní nechávají nasměrovat.

2.3.6 Replikace provirové DNA

Virus je ve formě proviru integrován do některého z hostitelských chromozomů a jeho DNA se nijak neliší od svého okolí. Má pouze nižší obsah GC párů oproti transkribovaným kuřecím genům (Robinson *et al.* 1965). Replikační aparát nemá šanci provirus rozpoznat a při syntéze DNA v S-fázi buněčného cyklu vzniká jeho kopie. Ta je při mitóze a cytokinezi předána dceřině buňce a virová informace se tak šíří i vertikálním směrem. Tato myšlenka byla poprvé postulována v 60. letech jako tzv. provirová hypotéza (Temin 1961; Svoboda *et al.* 1963).

Buňky jsou k replikaci DNA stimulovány pomocí virového onkogenu v-Src – protein-tyrosin kinázy, jejíž buněčný homolog c-Src se mj. podílí na zprostředkování signálů pro buněčný růst a dělení v embryonálním vývoji zdravého organismu (Collett & Erikson 1978; Slamon & Cline 1984).

2.3.7 Transkripce

Proviróvá DNA je velmi silně transkribována. Mechanismus se neliší od přepisu hostitelských genů pro mRNA, také je využit transkripční aparát s RNA polymerázou II. Intenzitu transkripce ovlivňují regulační sekvence lokalizované před samotným genem – promotorová oblast, na kterou se váže polymeráza, a kompetice enhancerů se silencersy, respektive proteinů, které se na ně vážou.

Tyto regulační sekvence jsou umístěny v LTR oblasti proviru, kterou můžeme rozdělit na regiony U3-R-U5, přičemž U3 se na 5' konec dostává během reverzní transkripce (obr. 3). V U3 oblasti PR-RSV-C jsou obsaženy promotorové sekvence GGAAAGAAAAG (CAT-box) a TATTTAAG (TATA-box). Transkripce začíná zhruba o 20 nukleotidů od TATA-boxu dále dinukleotidem GC, na vzniklém transkriptu je hostitelskými enzymy vytvořena 5' čepička m⁷GpppGmC (Yamamoto *et al.* 1980).

Transkripce je zesílena enhancery před promotorem. A právě enhancery definují transformační potenciál chronicky onkogenních kmenů: zatímco endogenní RAV-0 neobsahuje žádnou enhancerovou sek-

venci (ačkoli promotorovou oblast ano) a nezpůsobuje leukózu, RAV-1, RAV-2 a transformačně defektní RSV vážou regulační proteiny velmi silně, což jednak zvyšuje množství vyprodukovaného potomstva, zároveň ale i pravděpodobnost transformace buněk zesílenou transkripcí genů dále v genomu – potenciálních onkogenů (Hayward *et al.* 1981; Weber & Schaffner 1985). Jako enhancery fungují U3 tandemové repetice: RAV-0 neobsahuje žádnou, PR-RSV-C dvě a RAV-1 dokonce čtyři (Hodgson *et al.* 1987). Další enhancery byly objeveny za promotorem v *gag* genu (Arrigo *et al.* 1987).

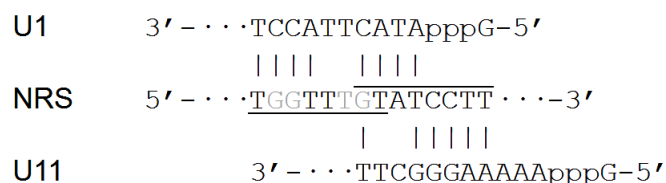
RSV byl hojně využíván jako model pro detekci transkripčních faktorů. Ruddell (1995) popsané interakce přehledně shrnuje ve svém review.

2.3.8 Sestřih

Veškeré subgenomové mRNA obsahují stejnou počáteční sekvenci o zhruba 100 nukleotidech (Weiss *et al.* 1977). To vedlo k hypotéze, že na vzniku populace menších mRNA (pro proteiny Env a v-Src) se podílí jaderný sestřih (Stoltzfus & Kuhnert 1979).

Virová pre-mRNA RSV obsahuje jedno 5' normální a dvě 3' suboptimální sestřihová místa (ALV po jednom), která jsou rozpoznávána s nižší účinností, než je běžné u hostitelské pre-mRNA (McNally & Beemon 1992). Komplexní retroviry navíc kódují proteiny, které sestřih regulují negativní zpětnou vazbou (Feinberg *et al.* 1986). Žádný z proteinů RSV se regulace sestřihu neúčastní, nicméně byly identifikovány RNA sekvence ovlivňující sestřih *in cis*. Jde o oblasti před 3' akceptory a oblast v genu *gag*, která obsahuje negativní regulátor sestřihu (NRS) (Arrigo & Beemon 1988; Katz *et al.* 1988; Stoltzfus & Fogarty 1989).

NRS na sebe váže všechny sestřihové faktory podílející se na normálním sestřihu (U1, U2, U4, U5 a U6 snRNPs), ale navíc i U11 a U12 snRNPs, které se podílejí na U12-dependentním sestřihu a zde kompetují o vazebné místo s U1 a U2. Tím určují poměr sestřizžené a nesestřizžené pre-mRNA (Gontarek *et al.* 1993; Hibbert *et al.* 1999). Sekvence NRS je podobná běžným 5'



Obrázek 4 | Párování bazí mezi RNA negativního regulátoru sestřihu (NRS) a sestřihových faktorů U1 a U11. Místo rozeznávané U1 je podtržené, U11 nadtržené; šedivě vyznačeno místo sestřihu. Podle McNally & McNally (1999), upraveno.

sestřihovým místům pro vazbu U1 a U11, obě vazebná místa se ale překrývají (obr. 4) a komplementarita NRS s RNA U1 a U11 je pouze v osmi z deseti, respektive šesti z osmi bazí (McNally & McNally 1999).

Další experimenty s NRS vedly k poznatku, že pro vazbu U11 a následný U12-dependentní sestřih jsou nutné RNA vazebné SR proteiny hnRNP H, SF2/ASF a SC35 (McNally & McNally 1996; Fogel & McNally 2000; McNally *et al.* 2006). Také bylo zjištěno, že lidský U5 snRNP hPrp8 se na 5' sestřihové místo v NRS váže nesprávně, nebo se neváže vůbec, což brání úspěšnému dokončení sestřihu (Giles & Beemon 2005). V savčích buňkách však sestřih virové pre-mRNA neprobíhá optimálně a objevují se populace anomálně sestřizžených mRNA (Berberich *et al.* 1990; Lounková *et al.* 2014).

2.3.9 Polyadenylace

Sestříhový aparát navázaný na hostitelskou pre-mRNA stimuluje polyadenylaci na 3' konci. Díky tomu se z jádra nesestřížená mRNA nedostává, případně je bez poly(A) v cytoplazmě degradována. Všechny virové RNA jsou před exportem z jádra také polyadenylovány nezávisle na tom, zda obsahují intronovou sekvenci. To způsobuje NRS element a hlavně jaderné faktory na něm navázané – bez vazby SR proteinů a snRNPs na NRS k dochází k pročtení polyadenylačního signálu a RNA polyadenylována není. Komplex NRS napodobuje funkční spliceozóm a stimuluje polyadenylační komplex (Fogel *et al.* 2002).

Samotná polyadenylace je poměrně málo účinná, zhruba v 15 % dochází k pročtení polyadenylačního signálu a vznikají delší transkripty. I to má svůj účel, neboť při integraci před buněčný protoonkogen dochází k zesílení jeho produkce, navíc chronicky onkogenní ALV může inkorporovat tento onkogen do svého genomu (tímto způsobem se vyvinul RSV) (Herman & Coffin 1986).

Nepředpokládá se, že by samotná polyadenylace byla zprostředkována jinými hostitelskými faktory než u buněčných mRNA, i RSV obsahuje standardní polyadenylační signál AAUAAA. Na něj specificky nasedá protein CPSF (cleavage and polyadenylation specificity factor) (Christofori & Keller 1988), jehož vazba je stabilizována CstF (cleavage stimulation factor). CstF rozpoznává následnou sekvenci bohatou na U či GU a právě tato oblast je v případě RSV suboptimální (MacDonald *et al.* 1994; Maciolek & McNally 2008), což vede ke snížení účinnosti polyadenylace. Na procesu se podílejí také poly(A) polymeráza a cleavage faktory (CF I a II) (Christofori & Keller 1988).

2.3.10 Jaderný export

Nesestřížená buněčná mRNA není z jádra exportována, ale retroviry musí toto omezení obejít. Komplexní retroviry kódují protein Rev (nebo jiný podobný protein), který se váže na Rev-responsible element v *env* genu (Malim *et al.* 1989). Nesestřížená virová mRNA díky tomu může interagovat s jaderným exportinem-1. Jednoduché retroviry podobný protein nekódují, jsou závislé na buněčných faktorech, pro jejichž vazbu nesou specifickou sekvenci *in cis*. Pro tento účel byly v genomu RSV identifikovány přímé repetice (direct repeats, DRs) (Ogert *et al.* 1996). Pro export jsou nutné buněčné faktory Tap, jeho kofaktor p15 a DEAD box helikáza Dbp5 (LeBlanc *et al.* 2007), ale proteiny, které přímo interagují s DRs, nejsou známy.

Část virové nesestřížené mRNA slouží jako gRNA a je inkorporována do virionů. Pro její export z jádra je pravděpodobně využíván virový protein Gag, který obsahuje jak NLS, tak exportní signál (nuclear export signal, NES). NLS jsou v doménách MA a NC a podílejí se také na importu PIC do jádra v rané fázi infekce; NES je lokalizován v doméně p10, která není součástí PIC. (Scheifele *et al.* 2002). NC NLS se překrývá s doménou zprostředkovávající vazbu Gag s enkapsidačním signálem Ψ na gRNA, ta je ale ihned po translaci Gag obsazena importiny, takže k vazbě v cytoplazmě nedochází. Gag je translokován do jádra, kde se importiny oddělí a Gag asociuje s gRNA. To vede k dimerizaci Gag a navázání

CRM-1/RanGTP komplexu, který exportuje Gag/gRNA z jádra (Scheifele *et al.* 2002; Gudleski *et al.* 2010). V cytoplasmě dochází k multimerizaci Gag a vzniku virionů (Swanstrom & Wills 1997).

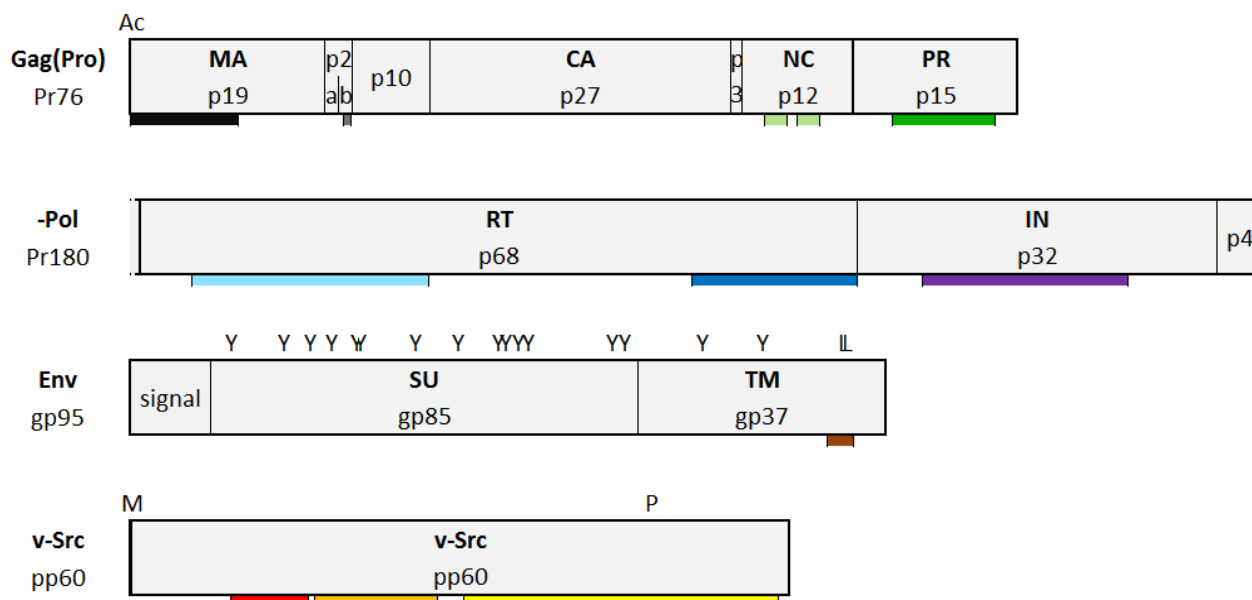
Export sestřižené i nesestřižené virové mRNA určené k translaci není na Gag závislý (LeBlanc *et al.* 2007). Interakce mezi Gag a některými z nesestřižených virových mRNA mění jejich význam v replikačním cyklu na gRNA, která už není translatována.

2.3.11 Translace

Po exportu mRNA z jádra na ni nasedá ribozóm a translace probíhá stejně jako u hostitelských mRNA. Ribozóm mRNA skenuje a hledá AUG start-kodón. V případě proteinů Gag(Pro), Gag(Pro)-Pol a Env translace začíná až na čtvrtém AUG; předchozí tři otevřené čtecí rámce dávají vzniknout krátkým peptidům, které modulují replikační cyklus RSV (Swanstrom *et al.* 1982; Moustakas *et al.* 1993). V mRNA sestřižené pro syntézu v-Src je AUG4 následován stop-kodónem, funkční v-Src je translatován až z pátého AUG (Hughes *et al.* 1984).

Oproti jiným retrovirům je virová proteáza ASLV součástí polyproteinu Gag, nikoliv Pol. Gen *pol* je translatován zhruba 20× méně, protože musí těsně před stop-kodónem genu *gag* dojít k frame-shiftu o jednu bázi zpět (Jacks & Varmus 1985). Příčinou frame-shiftu je sekvence AAAUUUA a následná sekundární struktura, která posun stimuluje (Jacks *et al.* 1988).

Při translaci *env* je signální sekvence (obr. 5) vznikajícího polyproteinu rozpoznána SRP (signal recognition particle) a ribozóm je přesunut k membráně endoplazmatického retikula, do jehož lumen je Env syntetizován. Tento proces je shodný s translací buněčných proteinů sekretorické dráhy (Vogt 1997b).



Obrázek 5 | Proteinové prekurzory RSV. Zvýrazněny domény: Gag(Pro): MBD (černě), L-doména (šedivě), dvě Zinc-finger (světle zeleně), peptidázová A2 (tmavě zeleně); Pol: polymerázová (světle modře), RNáza H (tmavě modře), integrázová (fialově); Env: transmembránová (hnědě); v-Src: SH3 (červeně), SH2 (oranžově), protein kinázová (žlutě). Posttranslační modifikace: acetylace (Ac), glykosylace (Y), palmitoylace (L), myristylace (M) a fosforylace (P). gp, glykoprotein; p, protein; pp, fosfoprotein; Pr, prekurzor. S využitím záznamů v databázi UniProt (2015).

2.3.12 Posttranslační modifikace

Po translaci jsou virové proteiny modifikovány buněčnými enzymy (obr. 5). Na rozdíl od ostatních retrovirů není Gag na N-konci v ptačích buňkách myristylován, ale pouze acetylován (Palmiter *et al.* 1978). To brání jeho degradaci buněčnými enzymy. Zhruba polovina molekul je navíc fosforylována v MA a NC doménách, tato modifikace ale není nutná pro retrovirový cyklus (Lai 1976).

Protože Env je transmembránový protein s extracelulární částí, je v endoplazmatickém retikulu bohatě N-glykosylován a na dvou cysteinech TM podjednotky palmitoylován (Martin & Duesberg 1972; Ochsenbauer-Jambor *et al.* 2001; Pike *et al.* 2011). V Golgiho aparátu je Env pomocí buněčné proteázy furinu štěpen na SU a TM podjednotky, které zůstávají spojeny disulfidickými vazbami (Leamson & Halpern 1976; Garten *et al.* 1994; Pike *et al.* 2011).

Z proteinu v-Src je odštěpen N-koncový methionin a následující glycin je myristylován. Díky tomu je v-Src schopen asociovat s plazmatickou membránou (Sefton *et al.* 1982). Protein se také autokatalyticky fosforyluje na tyrosinu 416 (Neil *et al.* 1981).

2.3.13 Cílení proteinových prekurzorů k membráně

Byla objevena interakce Gag proteinu s molekulárním motorem KIF-4 (Tang *et al.* 1999), patřícím mezi kineziny, které přesunují buněčné kompartmenty směrem k plus-konci mikrotubulů (Sekine *et al.* 1994). Pravděpodobně se podílí na transportu virových proteinů pod cytoplazmatickou membránu před jejich skládáním, nicméně přesný význam této interakce zůstává neznámý.

Následně Gag pomocí velké bazické MBD (membrane-binding domain) na začátku MA podjednotky (obr. 5) asociuje s fosfatidylinositol-(4,5)-bisfosfátem (PIP₂) (Verderame *et al.* 1996). RSV a HIV-1 jsou oproti jiným retrovirům na PIP₂ přímo závislé, za přítomnosti gRNA se nevážou k fosfatidylcholinu a fosfatidylserinu (Inlora *et al.* 2014). Toto omezení zaručuje, že ke skládání virionů bude docházet pod cytoplazmatickou membránou. Je také možné, že MBD interaguje s rozpustným fosfatidylinositol-(3,4,5)-trifosfátem už v jádře a využívá jeho cílení k cytoplazmatické membráně (Nadaraia-Hoke *et al.* 2013).

2.3.14 Pučení virionů

Do každého virionu ASLV je inkorporováno zhruba 100 molekul ubikvitinu (Ub), což odpovídá 5× vyšší než cytoplazmatické koncentraci (Putterman *et al.* 1990). Pro srovnání, počet Gag(Pro) prekurzorů je zhruba 1500, což odpovídá 78 % veškerých proteinů ve virionu (Vogt & Simon 1999). Většina Ub je volná, část je vázaná na Gag. Ub je nutný zřejmě až na samotném konci pučení, kdy umožňuje oddělení virové a cytoplazmatické membrány (Patnaik *et al.* 2000).

Podjednotka p2b Gag prekurzoru obsahuje L-doménu (late assembly domain) (obr. 5) s aminokyselinovými zbytky PPPPYV (Parent *et al.* 1995). Na ni se váží proteiny LDI-1 a LDI-2 (late domain-interacting) z rodiny Nedd4-like (neuronal precursor cell-expressed developmentally down-regulated) E3 ubikvitin ligáz (Kikonyogo *et al.* 2001).

LDI v cytoplazmě ubikvitinylují lysiny v MA podjednotce Gag, přičemž do virionů se dostávají pouze mono-Ub molekuly (Spidel *et al.* 2004; Vana *et al.* 2004). To je v rozporu s původním pozorováním, podle něhož RSV obsahuje pouze volný Ub (Putterman *et al.* 1990); je možné, že Ub je při maturaci odbouráván virovou proteázou, nebo stačí pouze malé množství Gag-Ub pro úspěšné vypučení. Nezbytná je také samotná L-doména, kterou umělá ubikvitinylace na C-konci Gag nedokáže nahradit (Patnaik *et al.* 2000).

RSV pro vypučení vyžaduje proteiny Eap20, Eap30, Eap45 dráhy ESCRT-II (endocytic sorting complexes required for transport) a Chmp1-7 s Vps4 AAA ATPázou dráhy ESCRT-III. Právě Vps4 dodává energii pro odškrcení membrán, pro svoji funkci vyžaduje ATP a spolupráci s proteinem LIP-5. RSV na rozdíl od HIV-1 nevyužívá dráhu ESCRT-I (Medina *et al.* 2005; Scott *et al.* 2005; Pincetic *et al.* 2008).

RSV i HIV-1 obsahují sekundární L-doménu LYPSL v proteinu p10 (resp. p6). Na ni se váže protein Alix, který je schopen využít ESCRT-I dráhu přes vazbu Tsg101. Tuto cestu využívá právě HIV-1, ve wild-type RSV se neuplatňuje (Dilley *et al.* 2010).

2.3.15 Maturace

Vypučené viriony stále obsahují neštěpené proteinové prekurzory, aby byla snížena pravděpodobnost infekce mateřské buňky. Pouze Env je naštěpen již v Golgiho aparátu. Virová proteáza se sama vyštěpí z Gag(Pro) prekurzoru a dále štěpí Gag a Pol na funkční proteiny (von der Helm 1977; Stewart *et al.* 1990). Virion maturuje a je připraven infikovat dalšího hostitele.

HIV-1 navíc inkorporuje do virionů hostitelskou peptidyl-prolyl izomerázu cyclophilin A (CyPA), která během maturace mění konformaci Gag proteinu, což umožňuje efektivní vazbu na receptory a vstup do buněk (Braaten *et al.* 1996). Žádná práce ale nenaznačuje účast CyPA ani jiných hostitelských faktorů na maturaci RSV.

2.4 Restrikční faktory

Společná evoluce hostitelů a jejich virů vedla k vyvinutí účinné obrany proti virové infekci. Hostitelské buňky kódují a následně exprimují restrikční faktory, kterými se snaží zabránit produkci infekčního virového potomstva, nebo alespoň informovat okolní buňky, potažmo celý organizmus, že infekce probíhá. Viry ovšem mají vysokou mutační rychlost a velmi rychle naleznou odpověď na nově vyvinuté buněčné zbraně. Tento nekonečný souboj je zřejmě jedním z hlavních důvodů pro existenci sestřihu, apoptózy a vlastně celého imunitního systému hostitele.

Restrikční faktory se v poslední době těší velkému zájmu vědeckých týmů, neboť mají potenciál v antivirové terapii, zejména proti HIV. Přestože se často jedná o evolučně konzervované proteiny, jejich konkrétní funkce se mezidruhově liší. I proto o restrikčních faktorech ptačích buněk zatím mnoho nevíme.

2.4.1 Restrikční faktory indukované interferony

Interferony jsou molekuly, které zprostředkovávají antivirovou imunitní odpověď. Pomocí JAK protein-tyrosin kináz modulují funkci STAT (signal transducer and activator of transcription) proteinů, což vede ke změně expresního profilu buněk. Interferony rozdělujeme na podtypy α , β a γ ; jimi vyvolané reakce se různí (Stark *et al.* 1998, review).

Protože se v retrovirovém cyklu nevyskytuje dsRNA, nedochází ke stimulaci 2'-5'A syntetázy ani PKR dráhy. Interferon- α ale zesiluje expresi proteinů Daxx a PML (promyelocytic leukemia) (Greger *et al.* 2005; Heuser *et al.* 1998).

Savčí protein Daxx interaguje s integrázou RSV hned po vstupu PIC do jádra a následuje ji do místa integrace. Reprimuje transkripci na úrovni DNA pomocí aktivace metyltransferáz Dnmt1, Dnmt3a a Dnmt3b, které metylují CpG v oblasti LTR promotorů. Také způsobuje epigenetické změny, neboť aktivuje histon-deacetylázy 1 a 2 (HDAC1, HDAC2) (Greger *et al.* 2005; Shalginikh *et al.* 2013).

Další práce poukazují na vliv multiproteinových komplexů známých jako NBs (nuclear bodies) a jejich jednotlivých komponentů, hlavně proteinu PML. Ačkoli byly zkoumány interakce mnoha virů s těmito proteiny (Regad & Chelbi-Alix 2001), ASLV mezi ně zatím nepatří.

Interferony ovlivňují také expresi TRIM E3 ubikvitin ligáz. Byl prokázán vliv savčích TRIM proteinů na různé fáze cyklů HIV-1, MLV, ale i ALV; vzhledem k evoluční konzervovanosti by měly existovat homologní proteiny i v ptačích buňkách, ale nemusí plnit stejnou funkci (Uchil *et al.* 2008).

Dále interferony indukují expresi genu ISG15 (interferon-stimulated gene), který kóduje protein homologní k ubikvitinu. Jeho vazba na ESCRT-III proteiny Chmp2A a Chmp5 blokuje jejich transport k bu-

něčné membráně a zprostředkování interakce mezi LIP-5 a ATPázou Vps4, což následně brání odštěpení virionů od cytoplazmatické membrány (Pincetic *et al.* 2010; Kuang *et al.* 2011).

2.4.2 Cytidin deaminázy

Virový cyklus HIV-1, SIV (simian immunodeficiency virus), EIAV (equine infectious anemia virus) a MLV inhibuje lidská cytidin deamináza APOBEC3G, která je inkorporována do virionů HIV-1 a vnáší mutace do ssDNA přeměnou cytosinu na uracil. To vede k rozpoznání uracil-DNA glykosidázami a vzniku abazických míst a následné degradaci DNA. Savčí retroviry si proti deaminázám musely vyvinout obranu, z tohoto důvodu HIV-1 kóduje protein Vif (Mangeat *et al.* 2003). Ptačí buňky homology proteinů APOBEC3 neobsahují a RSV se s nimi běžně nesetkává, proto je na jejich aktivitu velmi citlivý (Wiegand & Cullen 2007).

2.4.3 CSN6

Nově objeveným ptačím restričním faktorem je CSN6, což je podjednotka signalozómu COP9. CSN6 je exprimován v kuřecích buňkách, váže se na katalytickou podjednotku IN a inhibuje její funkci (Wang *et al.* 2014).

2.4.4 Umlčování genů

Přestože v ptačích buňkách k umlčování transkripce RSV provirů příliš nedochází, tato účinná restrikce byla pozorována při infekci savčích buněk. Cytosin v CpG oblastech LTR a následně dalších virových genů je metylován a exprese je snížena (Searle *et al.* 1984). V savčích buňkách k umlčení stačí už slabá metylace LTR, zatímco v ptačích je nutná větší hustota (Hejnar *et al.* 1999). Metylace je totiž závislá na konkrétní sekvenci a dá se jí zabránit inzercí CpG části savčího genu do regulačních sekvencí RSV v LTR oblasti (Šenigl *et al.* 2008).

Za metylaci v lidských buňkách jsou zodpovědné zejména *de novo* DNA metyltransferázy Dnmt3a a Dnmt3b (Šenigl *et al.* 2012).

Na represi transkripce se také podílí Poly(ADP-ribose) polymeráza-1 (PARP-1), která kromě své hlavní enzymatické aktivity mj. aktivuje histon-deacetylázy a DNA metyltransferázy. V buňkách deficientních na PARP-1 dochází k několikanásobnému nárůstu množství infekčního viru, a to jak HIV-1 a MLV, tak i RAV-1. Nicméně ani přítomnost poměrně velkého množství PARP-1 nebrání transkripci natolik, jak bychom mohli očekávat – zřejmě ne všechny molekuly jsou schopné represe, což poukazuje na možný vliv posttranslačních modifikací či dalších kofaktorů (Bueno *et al.* 2012).

2.5 Permisivita hostitelských buněk vůči RSV

Po odhalení a popsání infekčního původce Rousova sarkomu vyvstala logická otázka, zda je jeho infektivita omezena pouze na kuřata. Začátkem 40. let byl pozorován přenos RSV mezi kuřaty a kachnami (Duran-Reynals 1942) a i proto se začaly na konci 50. let provádět pokusy o infekci savčích buněk.

Savčím modelem pro studium RSV se staly krysy, ve kterých virus dokázal indukovat rakovinné bujení (Svet-Moldavsky 1957). Dokonce se podařilo z jednoho nádoru izolovat infekční virus (Altaner & Svec 1966), byl ale mutantní v Env glykoproteinu, což poukazuje na přizpůsobení se novému hostiteli (Altaner & Temin 1970). Nicméně tato pozorování jsou výjimečná, virový cyklus je většinou zablokován po integraci.

Heterotransmisí mezi druhy brání zejména účinná metylace promotorových a enhancerových oblastí proviru, respektive vyšší citlivost transkripčních faktorů na metylaci DNA v nepermisivních buňkách (Hejnar *et al.* 1999). Dochází také k aberantnímu sestřihu *env* mRNA a export nesestřižené mRNA z jádra je výrazně méně účinný (Berberich *et al.* 1990; Lounková *et al.* 2014). Zřejmě z těchto důvodů je v křeččích buňkách exprimováno pouze malé množství Gag prekurzoru, Env není syntetizován vůbec a žádný detegovatelný virus není produkován. Expresi proviru lze obnovit fúzí nepermisivních buněk s kuřecími buňkami, které zřejmě komplementují absenci některého z hostitelských faktorů – nicméně výzkum je teprve v počátcích a nelze zatím specifikovat, o kolik faktorů se jedná a které to jsou (Svoboda & Dourmashkin 1969; Lounková *et al.* 2014).

Zde je třeba poznamenat, že od izolace jednotlivých kmenů RSV již uplynulo mnoho let a díky pasážování došlo k selekci nejúspěšnějších mutantů pro infekci tkáňových kultur. Také rozšíření hostitelské specifity může souviset s mutagenezí, neboť první mezidruhový přenos byl pozorován až 30 let od izolace RSV.

3. Závěr

Neustále probíhající souboj mezi virem a jeho hostitelem nám umožňuje nahlédnout do naší evoluční minulosti. Tlak na vývoj antivirové obrany dal vzniknout nesčetnému množství mechanismů, díky kterým jsou složitější organizmy schopny obstát v dnešním světě. Přípomínkou nám může být pohled na náš vlastní genom, jehož podstatnou část tvoří retrotranspozony a endogenní retroviry.

Porozuměním obranným mechanismům a jeho aplikací jsme dnes schopni buňkám v tomto boji pomoci: můžeme uměle zvyšovat účinnost restričních faktorů a poskytovat jejich výhody jednodušším organizmům. Naopak identifikací hostitelských faktorů, které virus zneužívá ve svém replikačním cyklu, získáváme jasný cíl pro vývoj léčiv.

Virus Rousova sarkomu a jeho chování v kuřecích buňkách jsou pro nás dobrým modelem. Pro vědecké pracovníky je RSV bezpečnější alternativou lidských patogenů, mezi které patří HIV. Jednodušší bezpečnostní opatření snižují náklady na výzkum, získané poznatky však nemají nižší hodnotu a byly úspěšně aplikovány na HIV už krátce po jeho objevu. Hostitelské faktory RSV ale zůstávaly dlouho na okraji našeho zájmu a zbývá zde doplnit mnoho souvislostí.

Přestože HIV zůstává naším primárním nepřítelem mezi retroviry, i obrana proti RSV má pro naši společnost význam. Vývojem vakcín jsme schopni eliminovat ekonomické ztráty, které ptačí retroviry způsobují v chovech drůbeže. Naskýtá se nám i možnost genetických manipulací a to jak na straně hostitele, tak na straně viru. V současnosti probíhá vývoj kuřecí linie s bodovou mutací v receptoru NHE1, která by se mohla stát rezistentní vůči ALV-J. Kromě technických problémů ale narážíme také na otázku etiky. Přestože by se tato linie neměla fenotypově lišit od jiných kuřat, jedná se již o geneticky modifikované organizmy a toto stigma je předem radí na nepopulární pozici. Zůstává otázkou, zda ekonomický a technologický přínos převáží předsudky společnosti – či spíše kdy se tak stane.

Existence RSV pro naši společnost nemusí být jen problémem, ale i přínosem. Do rozvoje genové terapie bylo investováno mnoho prostředků, výsledky se však dostávají velmi pomalu. A právě k RSV se nyní přesouvá pozornost. Byl vyvinut vektorový systém RCAS, ve kterém je možné nahradit virový onkogen *src* jiným genem, schopným komplementovat poškozené funkce u dědičných poruch. Tento systém je bezpečnější než dříve používané vektory odvozené od gammaretrovirů či lentivirů, protože alfaretroviry jsou do genomu lidských buněk integrovány náhodně a pravděpodobnost rozvoje leukémie či jiného nádorového onemocnění je tak mnohem nižší. Zatím nevyřešeným problémem však zůstává transkripční umlčování proviru v savčích buňkách.

Od Rousova objevu uplynulo již více než 100 let. Díky intenzivnímu výzkumu v minulém století jsme se přiblížili k pochopení interakcí mezi retroviry a jejich hostiteli, nedá se však říci, že by se neprozkoumaná oblast zmenšila, naopak. Získali jsme nadhled nad celou problematikou a nyní se můžeme zaměřit na konkrétní cíle. Čelíme novým výzvám, které mohou naši společnost posunout zase o kousek dál.

4. Seznam použité literatury

- Adkins, H. B., Brojatsch, J., Naughton, J., Rolls, M. M., Pesola, J. M. & Young, J. A. T., 1997. Identification of a cellular receptor for subgroup E avian leukosis virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(21), pp.11617–11622.
- Adkins, H. B., Brojatsch, J. & Young, J. A. T., 2000. Identification and characterization of a shared TNFR-related receptor for subgroup B, D, and E avian leukosis viruses reveal cysteine residues required specifically for subgroup E viral entry. *Journal of virology*, 74(8), pp.3572–3578.
- Altaner, C. & Svec, F., 1966. Virus production in rat tumors induced by chicken sarcoma virus. *Journal of the National Cancer Institute*, 37(6), pp.745–752.
- Altaner, C. & Temin, H. M., 1970. Carcinogenesis by RNA sarcoma viruses. XII. A quantitative study of infection of rat cells *in vitro* by avian sarcoma viruses. *Virology*, 40(1), pp.118–134.
- Andrake, M. D., Sauter, M. M., Boland, K., Goldstein, A. D., Hussein, M. & Skalka, A. M., 2008. Nuclear import of avian sarcoma virus integrase is facilitated by host cell factors. *Retrovirology*, 5, p.73.
- Arrigo, S. & Beemon, K., 1988. Regulation of Rous sarcoma virus RNA splicing and stability. *Molecular and cellular biology*, 8(11), pp.4858–4867.
- Arrigo, S., Yun, M. & Beemon, K., 1987. *cis*-acting regulatory elements within *gag* genes of avian retroviruses. *Molecular and cellular biology*, 7(1), pp.388–397.
- Baekelandt, V., Claeys, A., Cherepanov, P., De Clercq, E., De Strooper, B., Nuttin, B. & Debyser, Z., 2000. DNA-dependent protein kinase is not required for efficient lentivirus integration. *Journal of virology*, 74(23), pp.11278–11285.
- Baltimore, D., 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature*, 226(5252), pp.1209–1211.
- Barr, S. D., Leipzig, J., Shinn, P., Ecker, J. R. & Bushman, F. D., 2005. Integration targeting by avian sarcoma-leukosis virus and human immunodeficiency virus in the chicken genome. *Journal of virology*, 79(18), pp.12035–12044.
- Barré-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W. & Montagnier, L., 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science (New York, N. Y.)*, 220(4599), pp.868–871.
- Bates, P., Young, J. A. T. & Varmus, H. E., 1993. A receptor for subgroup A Rous sarcoma virus is related to the low density lipoprotein receptor. *Cell*, 74(6), pp.1043–1051.
- Bäuerle, M., Doenecke, D. & Albig, W., 2002. The requirement of H1 histones for a heterodimeric nuclear import receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 277(36), pp.32480–32489.
- Beebe, S. P. & Ewing, J., 1906. A study of the so-called infectious lymphosarcoma of dogs. *The Journal of medical research*, 15(2), pp.209–227.
- Benson, S. J., Ruis, B. L., Fadly, A. M. & Conklin, K. F., 1998. The unique envelope gene of the subgroup J avian leukosis virus derives from *ev/J* proviruses, a novel family of avian endogenous viruses. *Journal of virology*, 72(12), pp.10157–10164.
- Berberich, S. L., Macias, M., Zhang, L., Turek, L. P. & Stoltzfus, C. M., 1990. Comparison of Rous sarcoma virus RNA processing in chicken and mouse fibroblasts: evidence for double-spliced RNA in nonpermissive mouse cells. *Journal of virology*, 64(9), pp.4313–4320.

- Bolisetty, M., Blomberg, J., Benachenhou, F., Sperber, G. & Beemon, K., 2012. Unexpected diversity and expression of avian endogenous retroviruses. *mBio*, 3(5), pp.1–10.
- Bowerman, B., Brown, P. O., Bishop, J. M. & Varmus, H. E., 1989. A nucleoprotein complex mediates the integration of retroviral DNA. *Genes & development*, 3(4), pp.469–478.
- Braaten, D., Franke, E. K. & Luban, J., 1996. Cyclophilin A is required for an early step in the life cycle of human immunodeficiency virus type 1 before the initiation of reverse transcription. *Journal of virology*, 70(6), pp.3551–3560.
- Brown, P. O., Bowerman, B., Varmus, H. E. & Bishop, J. M., 1989. Retroviral integration: structure of the initial covalent product and its precursor, and a role for the viral IN protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(8), pp.2525–2529.
- Bueno, M. T., Reyes, D., Valdes, L., Saheba, A., Urias, E., Mendoza, C., Fregoso, O. I. & Llano, M., 2012. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 promotes transcriptional repression of integrated retroviruses. *Journal of virology*, 87(5), pp.2496–2507.
- Bukrinskaya, A. G., Brichacek, B., Mann, A. & Stevenson, M., 1998. Establishment of a functional human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcription complex involves the cytoskeleton. *The Journal of experimental medicine*, 188(11), pp.2113–2125.
- Busschots, K., Vercammen, J., Emiliani, S., Benarous, R., Engelborghs, Y., Christ, F. & Debyser, Z., 2005. The interaction of LEDGF/p75 with integrase is lentivirus-specific and promotes DNA binding. *Journal of Biological Chemistry*, 280(18), pp.17841–17847.
- Butterfield-Gerson, K. L., Scheifele, L. Z., Ryan, E. P., Hopper, A. K. & Parent, L. J., 2006. Importin-beta family members mediate alpharetrovirus Gag nuclear entry via interactions with matrix and nucleocapsid. *Journal of virology*, 80(4), pp.1798–1806.
- Clayman, C. H., Mosharrafa, E. & Faras, A. J., 1979. *In vitro* synthesis of infectious transforming DNA by the avian sarcoma virus reverse transcriptase. *Journal of virology*, 29(1), pp.242–249.
- Collett, M. S. & Erikson, R. L., 1978. Protein kinase activity associated with the avian sarcoma virus *src* gene product. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(4), pp.2021–2024.
- Cosnefroy, O., Tocco, A., Lesbats, P., Thierry, S., Calmels, C., Wiktorowicz, T., Reigadas, S., Kwon, Y., De Cian, A., Desfarges, S., Bonot, P., San Filippo, J., Litvak, S., Le Cam, E., Rethwilm, A., Fleury, H., Connell, P. P., Sung, P., Delelis, O., Andreola, M. L. & Parissi, V., 2012. Stimulation of the human RAD51 nucleofilament restricts HIV-1 integration *in vitro* and in infected cells. *Journal of Virology*, 86(1), pp.513–526.
- Cui, N., Su, S., Chen, Z., Zhao, X. & Cui, Z., 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), pp.2512–2522.
- Damke, H., Baba, T., Van Der Blik, A. M. & Schmid, S. L., 1995. Clathrin-independent pinocytosis is induced in cells overexpressing a temperature-sensitive mutant of dynamin. *Journal of Cell Biology*, 131(1), pp.69–80.
- Damke, H., Baba, T., Warnock, D. E. & Schmid, S. L., 1994. Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. *Journal of Cell Biology*, 127(4), pp.915–934.
- Daniel, R., Kao, G., Taganov, K., Greger, J. G., Favorova, O., Merkel, G., Yen, T. J., Katz, R. A. & Skalka, A. M., 2003. Evidence that the retroviral DNA integration process triggers an ATR-dependent DNA damage response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(8), pp.4778–4783.

- Daniel, R., Katz, R. A. & Skalka, A. M., 1999. A role for DNA-PK in retroviral DNA integration. *Science (New York, N. Y.)*, 284(5414), pp.644–647.
- Diaz-Griffero, F., Hoschander, S. A. & Brojatsch, J., 2002. Endocytosis is a critical step in entry of subgroup B avian leukosis viruses. *Journal of virology*, 76(24), pp.12866–12876.
- Diaz-Griffero, F., Jackson, A. P. & Brojatsch, J., 2005. Cellular uptake of avian leukosis virus subgroup B is mediated by clathrin. *Virology*, 337(1), pp.45–54.
- Dilley, K. A., Gregory, D., Johnson, M. C. & Vogt, V. M., 2010. An LYPSL late domain in the Gag protein contributes to the efficient release and replication of Rous sarcoma virus. *Journal of virology*, 84(13), pp.6276–6287.
- Duff, R. G. & Vogt, P. K., 1969. Characteristics of two new avian tumor virus subgroups. *Virology*, 39(1), pp.18–30.
- Duran-Reynals, F., 1942. The reciprocal infection of ducks and chickens with tumor-inducing viruses. *Cancer Research*, 2, pp.343–369.
- Earp, L. J., Delos, S. E., Netter, R. C., Bates, P. & White, J. M., 2003. The avian retrovirus avian sarcoma/leukosis virus subtype A reaches the lipid mixing stage of fusion at neutral pH. *Journal of virology*, 77(5), pp.3058–3066.
- Elleder, D., Melder, D. C., Trejbalová, K., Svoboda, J. & Federspiel, M. J., 2004. Two different molecular defects in the Tva receptor gene explain the resistance of two tvar lines of chickens to infection by subgroup A avian sarcoma and leukosis viruses. *Journal of virology*, 78(24), pp.13489–13500.
- Elleder, D., Stepanets, V., Melder, D. C., Šenigl, F., Geryk, J., Pajer, P., Plachý, J., Hejnar, J., Svoboda, J. & Federspiel, M. J., 2005. The receptor for the subgroup C avian sarcoma and leukosis viruses, Tvc, is related to mammalian butyrophilins, members of the immunoglobulin superfamily. *Journal of virology*, 79(16), pp.10408–10419.
- Fassati, A. & Goff, S. P., 2001. Characterization of intracellular reverse transcription complexes of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of virology*, 75(8), pp.3626–3635.
- Fassati, A. & Goff, S. P., 1999. Characterization of intracellular reverse transcription complexes of Moloney murine leukemia virus. *Journal of virology*, 73(11), pp.8919–8925.
- Feinberg, M. B., Jarrett, R. F., Aldovini, A., Gallo, R. C. & Wong-Staal, F., 1986. HTLV-III expression and production involve complex regulation at the levels of splicing and translation of viral RNA. *Cell*, 46(6), pp.807–817.
- Feng, S., Cao, W. & Liao, M., 2011. The PI3K/Akt pathway is involved in early infection of some exogenous avian leukosis viruses. *Journal of General Virology*, 92(7), pp.1688–1697.
- Fogel, B. L., McNally, L. M. & McNally, M. T., 2002. Efficient polyadenylation of Rous sarcoma virus RNA requires the negative regulator of splicing element. *Nucleic acids research*, 30(3), pp.810–817.
- Fogel, B. L. & McNally, M. T., 2000. A cellular protein, hnRNP H, binds to the negative regulator of splicing element from Rous sarcoma virus. *Journal of Biological Chemistry*, 275(41), pp.32371–32378.
- Folk, W. R. & Faras, A. J., 1976. Initiation of DNA synthesis by the avian oncornavirus RNA-directed DNA polymerase: tryptophan tRNA as the major species of primer RNA. *Journal of virology*, 17(3), pp.1049–1051.
- Fritsch, E. F. & Temin, H. M., 1977. Inhibition of viral DNA synthesis in stationary chicken embryo fibroblasts infected with avian retroviruses. *Journal of virology*, 24(2), pp.461–469.
- Fujita, D. J., Chen, Y. C., Friis, R. R. & Vogt, P. K., 1974. RNA tumor viruses of pheasants: characterization of avian leukosis subgroups F and G. *Virology*, 60(2), pp.558–571.

- Gallo, R. C., Sarin, P. S., Gelmann, E. P., Robert-Guroff, M., Richardson, E., Kalyanaraman, V. S., Mann, D., Sidhu, G. D., Stahl, R. E., Zolla-Pazner, S., Leibowitch, J. & Popovic, M., 1983. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science (New York, N. Y.)*, 220(4599), pp.865–867.
- Garten, W., Hallenberger, S., Ortmann, D., Schäfer, W., Vey, M., Angliker, H., Shaw, E. & Klenk, H. D., 1994. Processing of viral glycoproteins by the subtilisin-like endoprotease furin and its inhibition by specific peptidylchloroalkylketones. *Biochimie*, 76(3-4), pp.217–225.
- Gilbert, J. M., Mason, D. & White, J. M., 1990. Fusion of Rous sarcoma virus with host cells does not require exposure to low pH. *Journal of virology*, 64(10), pp.5106–5113.
- Giles, K. E. & Beemon, K. L., 2005. Retroviral splicing suppressor sequesters a 3' splice site in a 50S aberrant splicing complex. *Molecular and cellular biology*, 25(11), pp.4397–4405.
- Gontarek, R. R., McNally, M. T. & Beemon, K., 1993. Mutation of an RSV intronic element abolishes both U11/U12 snRNP binding and negative regulation of splicing. *Genes and Development*, 7(10), pp.1926–1936.
- Greger, J. G., Katz, R. A., Ishov, A. M., Maul, G. G. & Skalka, A. M., 2005. The cellular protein Daxx interacts with avian sarcoma virus integrase and viral DNA to repress viral transcription. *Journal of virology*, 79(8), pp.4610–4618.
- Gudleski, N., Flanagan, J. M., Ryan, E. P., Bewley, M. C. & Parent, L. J., 2010. Directionality of nucleocytoplasmic transport of the retroviral Gag protein depends on sequential binding of karyopherins and viral RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(20), pp.9358–9363.
- Hanafusa, T., Hanafusa, H., Metroka, C. E., Hayward, W. S., Rettenmier, C. W., Sawyer, R. C., Dougherty, R. M. & Distefano, H. S., 1976. Pheasant virus: new class of ribodeoxyvirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(4), pp.1333–1337.
- Hatzioannou, T. & Goff, S. P., 2001. Infection of nondividing cells by Rous sarcoma virus. *Journal of virology*, 75(19), pp.9526–9531.
- Hayward, W. S., Neel, B. G. & Astrin, S. M., 1981. Activation of a cellular onc gene by promoter insertion in ALV-induced lymphoid leukemia. *Nature*, 290(5806), pp.475–480.
- Hejnar, J., Plachý, J., Geryk, J., Machoň, O., Trejbalová, K., Guntaka, R. V. & Svoboda, J., 1999. Inhibition of the Rous sarcoma virus long terminal repeat-driven transcription by *in vitro* methylation: different sensitivity in permissive chicken cells versus mammalian cells. *Virology*, 255(1), pp.171–181.
- Von der Helm, K., 1977. Cleavage of Rous sarcoma viral polypeptide precursor into internal structural proteins *in vitro* involves viral protein p15. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(3), pp.911–915.
- Herman, S. A. & Coffin, J. M., 1986. Differential transcription from the long terminal repeats of integrated avian leukosis virus DNA. *Journal of virology*, 60(2), pp.497–505.
- Heuser, M., van der Kuip, H., Falini, B., Peschel, C., Huber, C. & Fischer, T., 1998. Induction of the pro-myelocytic leukaemia gene by type I and type II interferons. *Mediators of inflammation*, 7(5), pp.319–325.
- Hibbert, C. S., Gontarek, R. R. & Beemon, K. L., 1999. The role of overlapping U1 and U11 5' splice site sequences in a negative regulator of splicing. *RNA (New York, N. Y.)*, 5(3), pp.333–343.
- Hodgson, C. P., Arora, P. & Fisk, R. Z., 1987. Nucleotide sequence of the long terminal repeat of the avian retrovirus RAV-1: evolution of avian retroviruses. *Nucleic acids research*, 15(5), p.2393.

- Hughes, S., Mellstrom, K., Kosik, E., Tamanoi, F. & Brugge, J., 1984. Mutation of a termination codon affects *src* initiation. *Molecular and cellular biology*, 4(9), pp.1738–1746.
- Humphries, E. H. & Temin, H. M., 1972. Cell cycle-dependent activation of Rous sarcoma virus-infected stationary chicken cells: avian leukosis virus group-specific antigens and ribonucleic acid. *Journal of virology*, 10(1), pp.82–87.
- Humphries, E. H. & Temin, H. M., 1974. Requirement for cell division for initiation of transcription of Rous sarcoma virus RNA. *Journal of virology*, 14(3), pp.531–546.
- Chai, N. & Bates, P., 2006. Na⁺/H⁺ exchanger type 1 is a receptor for pathogenic subgroup J avian leukosis virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(14), pp.5531–5536.
- Cherepanov, P., Maertens, G., Proost, P., Devreese, B., Van Beeumen, J., Engelborghs, Y., De Clercq, E. & Debysers, Z., 2003. HIV-1 integrase forms stable tetramers and associates with LEDGF/p75 protein in human cells. *Journal of Biological Chemistry*, 278(1), pp.372–381.
- Christofori, G. & Keller, W., 1988. 3' cleavage and polyadenylation of mRNA precursors *in vitro* requires a poly(A) polymerase, a cleavage factor, and a snRNP. *Cell*, 54(6), pp.875–889.
- ICTV, 2014. ICTV Master Species List 2014 v3. Available at: http://talk.ictvonline.org/files/ictv_documents/m/msl/5208/download.aspx [Accessed April 22, 2015].
- Inlora, J., Collins, D. R., Trubin, M. E., Chung, J. Y. J. & Ono, A., 2014. Membrane binding and subcellular localization of retroviral Gag proteins are differentially regulated by MA interactions with phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate and RNA. *mBio*, 5(6), pp.e02202–14.
- Jacks, T., Madhani, H. D., Masiarz, F. R. & Varmus, H. E., 1988. Signals for ribosomal frameshifting in the Rous sarcoma virus *gag-pol* region. *Cell*, 55(3), pp.447–458.
- Jacks, T. & Varmus, H. E., 1985. Expression of the Rous sarcoma virus *pol* gene by ribosomal frameshifting. *Science (New York, N. Y.)*, 230(4731), pp.1237–1242.
- Katz, R. A., Greger, J. G., Darby, K., Boimel, P., Rall, G. F. & Skalka, A. M., 2002. Transduction of interphase cells by avian sarcoma virus. *Journal of virology*, 76(11), pp.5422–5434.
- Katz, R. A., Kotler, M. & Skalka, A. M., 1988. *cis*-acting intron mutations that affect the efficiency of avian retroviral RNA splicing: implication for mechanisms of control. *Journal of virology*, 62(8), pp.2686–2695.
- Kikonyogo, A., Bouamr, F., Vana, M. L., Xiang, Y., Aiyar, A., Carter, C. & Leis, J., 2001. Proteins related to the Nedd4 family of ubiquitin protein ligases interact with the L domain of Rous sarcoma virus and are required for Gag budding from cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(20), pp.11199–11204.
- Kilzer, J. M., Stracker, T., Beitzel, B., Meek, K., Weitzman, M. & Bushman, F. D., 2003. Roles of host cell factors in circularization of retroviral DNA. *Virology*, 314(1), pp.460–467.
- Klucking, S., Adkins, H. B. & Young, J. A. T., 2002. Resistance to infection by subgroups B, D, and E avian sarcoma and leukosis viruses is explained by a premature stop codon within a resistance allele of the *tvb* receptor gene. *Journal of virology*, 76(15), pp.7918–7921.
- Kuang, Z., Seo, E. J. & Leis, J., 2011. Mechanism of inhibition of retrovirus release from cells by interferon-induced gene ISG15. *Journal of virology*, 85(14), pp.7153–7161.
- Kučerová, D., Plachý, J., Reinišová, M., Šenigl, F., Trejbalová, K., Geryk, J. & Hejnar, J., 2013. Nonconserved tryptophan 38 of the cell surface receptor for subgroup J avian leukosis virus discriminates sensitive from resistant avian species. *Journal of virology*, 87(15), pp.8399–8407.

- Kukolj, G., Jones, K. S. & Skalka, A. M., 1997. Subcellular localization of avian sarcoma virus and human immunodeficiency virus type 1 integrases. *Journal of virology*, 71(1), pp.843–847.
- Kukolj, G., Katz, R. A. & Skalka, A. M., 1998. Characterization of the nuclear localization signal in the avian sarcoma virus integrase. *Gene*, 223(1-2), pp.157–163.
- Kurzchalia, T. & Parton, R., 1999. Membrane microdomains and caveolae. *Current Opinion in Cell Biology*, 11(4), pp.424–431.
- Lai, M. M., 1976. Phosphoproteins of Rous sarcoma viruses. *Virology*, 74(2), pp.287–301.
- Lau, A., Kanaar, R., Jackson, S. P. & O'Connor, M. J., 2004. Suppression of retroviral infection by the RAD52 DNA repair protein. *The EMBO journal*, 23(16), pp.3421–3429.
- Leamson, R. N. & Halpern, M. S., 1976. Subunit structure of the glycoprotein complex of avian tumor virus. *Journal of virology*, 18(3), pp.956–968.
- LeBlanc, J. J., Uddowla, S., Abraham, B., Clatterbuck, S. & Beemon, K. L., 2007. Tap and Dbp5, but not Gag, are involved in DR-mediated nuclear export of unspliced Rous sarcoma virus RNA. *Virology*, 363(2), pp.376–386.
- Lee, M. S. & Craigie, R., 1998. A previously unidentified host protein protects retroviral DNA from autointegration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(4), pp.1528–1533.
- Lee, Y. M. & Coffin, J. M., 1990. Efficient autointegration of avian retrovirus DNA *in vitro*. *Journal of virology*, 64(12), pp.5958–5965.
- Li, G., D'Souza-Schorey, C., Barbieri, M. A., Roberts, R. L., Klippel, A., Williams, L. T. & Stahl, P. D., 1995. Evidence for phosphatidylinositol 3-kinase as a regulator of endocytosis via activation of Rab5. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(22), pp.10207–10211.
- Li, L., Olvera, J. M., Yoder, K. E., Mitchell, R. S., Butler, S. L., Lieber, M., Martin, S. L. & Bushman, F. D., 2001. Role of the non-homologous DNA end joining pathway in the early steps of retroviral infection. *EMBO Journal*, 20(12), pp.3272–3281.
- Lloyd, A. G., Tateishi, S., Bieniasz, P. D., Muesing, M. A., Yamaizumi, M. & Mulder, L. C. F., 2006. Effect of DNA repair protein Rad18 on viral infection. *PLoS Pathogens*, 2(5), pp.368–373.
- Lounková, A., Dráberová, E., Šenigl, F., Trejbalová, K., Geryk, J., Hejnar, J. & Svoboda, J., 2014. Molecular events accompanying Rous sarcoma virus rescue from rodent cells and the role of viral gene complementation. *Journal of virology*, 88(6), pp.3505–3515.
- MacDonald, C. C., Wilusz, J. & Shenk, T., 1994. The 64-kilodalton subunit of the CstF polyadenylation factor binds to pre-mRNAs downstream of the cleavage site and influences cleavage site location. *Molecular and cellular biology*, 14(10), pp.6647–6654.
- Maciolek, N. L. & McNally, M. T., 2008. Characterization of Rous sarcoma virus polyadenylation site use *in vitro*. *Virology*, 374(2), pp.468–476.
- Malim, M. H., Hauber, J., Le, S. Y., Maizel, J. V & Cullen, B. R., 1989. The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature*, 338(6212), pp.254–257.
- Mangeat, B., Turelli, P., Caron, G., Friedli, M., Perrin, L. & Trono, D., 2003. Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature*, 424(6944), pp.99–103.

- Marine, D. & Lenhart, C. H., 1910. Observations and experiments on the so-called thyroid carcinoma of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and its relation to ordinary goitre. *The Journal of Experimental Medicine*, 12(3), pp.311–337.
- Márquez-Sterling, N., Herman, I. M., Pesacreta, T., Arai, H., Terres, G. & Forgac, M., 1991. Immunolocalization of the vacuolar-type (H⁺)-ATPase from clathrin-coated vesicles. *European journal of cell biology*, 56(1), pp.19–33.
- Martin, G. S. & Duesberg, P. H., 1972. The a subunit in the RNA of transforming avian tumor viruses. I. Occurrence in different virus strains. II. Spontaneous loss resulting in nontransforming variants. *Virology*, 47(2), pp.494–497.
- McNally, L. M. & McNally, M. T., 1996. SR protein splicing factors interact with the Rous sarcoma virus negative regulator of splicing element. *Journal of virology*, 70(2), pp.1163–1172.
- McNally, L. M. & McNally, M. T., 1999. U1 small nuclear ribonucleoprotein and splicing inhibition by the Rous sarcoma virus negative regulator of splicing element. *Journal of virology*, 73(3), pp.2385–2393.
- McNally, L. M., Yee, L. & McNally, M. T., 2006. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H is required for optimal U11 small nuclear ribonucleoprotein binding to a retroviral RNA-processing control element: Implications for U12-dependent RNA splicing. *Journal of Biological Chemistry*, 281(5), pp.2478–2488.
- McNally, M. T. & Beemon, K., 1992. Intronic sequences and 3' splice sites control Rous sarcoma virus RNA splicing. *Journal of virology*, 66(1), pp.6–11.
- Medina, G., Zhang, Y., Tang, Y., Gottwein, E., Vana, M. L., Bouamr, F., Leis, J. & Carter, C. A., 2005. The functionally exchangeable L domains in RSV and HIV-1 Gag direct particle release through pathways linked by Tsg101. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 6(10), pp.880–894.
- Miller, M. D., Farnet, C. M. & Bushman, F. D., 1997. Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *Journal of virology*, 71(7), pp.5382–5390.
- Mitchell, R. S., Beitzel, B. F., Schroder, A. R. W., Shinn, P., Chen, H., Berry, C. C., Ecker, J. R. & Bushman, F. D., 2004. Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences. *PLoS Biology*, 2(8), p.e234.
- Moiani, A., Suerth, J. D., Gandolfi, F., Rizzi, E., Severgnini, M., De Bellis, G., Schambach, A. & Mavilio, F., 2014. Genome-wide analysis of alpharetroviral integration in human hematopoietic stem/progenitor cells. *Genes*, 5(2), pp.415–429.
- Mothes, W., Boerger, A. L., Narayan, S., Cunningham, J. M. & Young, J. A. T., 2000. Retroviral entry mediated by receptor priming and low pH triggering of an envelope glycoprotein. *Cell*, 103(4), pp.679–689.
- Moustakas, A., Sonstegard, T. S. & Hackett, P. B., 1993. Effects of the open reading frames in the Rous sarcoma virus leader RNA on translation. *Journal of virology*, 67(7), pp.4350–4357.
- Nadaraia-Hoke, S., Bann, D. V., Lochmann, T. L., Gudleski-O'Regan, N. & Parent, L. J., 2013. Alterations in the MA and NC domains modulate phosphoinositide-dependent plasma membrane localization of the Rous sarcoma virus Gag protein. *Journal of virology*, 87(6), pp.3609–3615.
- Narayan, S., Barnard, R. J. O. & Young, J. A. T., 2003. Two retroviral entry pathways distinguished by lipid raft association of the viral receptor and differences in viral infectivity. *Journal of virology*, 77(3), pp.1977–1983.

- Neil, J. C., Ghysdael, J., Vogt, P. K. & Smart, J. E., 1981. Homologous tyrosine phosphorylation sites in transformation-specific gene products of distinct avian sarcoma viruses. *Nature*, 291(5817), pp.675–677.
- Ogert, R. A., Lee, L. H. & Beemon, K. L., 1996. Avian retroviral RNA element promotes unspliced RNA accumulation in the cytoplasm. *Journal of virology*, 70(6), pp.3834–3843.
- Oh, P., McIntosh, D. P. & Schnitzer, J. E., 1998. Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium. *Journal of Cell Biology*, 141(1), pp.101–114.
- Ochsenbauer-Jambor, C., Miller, D. C., Roberts, C. R., Rhee, S. S. & Hunter, E., 2001. Palmitoylation of the Rous sarcoma virus transmembrane glycoprotein is required for protein stability and virus infectivity. *Journal of virology*, 75(23), pp.11544–11554.
- Palmiter, R. D., Gagnon, J., Vogt, V. M., Ripley, S. & Eisenman, R. N., 1978. The NH₂-terminal sequence of the avian oncovirus *gag* precursor polyprotein (Pr76gag). *Virology*, 91(2), pp.423–433.
- Parent, L. J., Bennett, R. P., Craven, R. C., Nelle, T. D., Krishna, N. K., Bowzard, J. B., Wilson, C. B., Puffer, B. A., Montelaro, R. C. & Wills, J. W., 1995. Positionally independent and exchangeable late budding functions of the Rous sarcoma virus and human immunodeficiency virus Gag proteins. *Journal of virology*, 69(9), pp.5455–5460.
- Parker, R. C., Varmus, H. E. & Bishop, J. M., 1981. Cellular homologue (*c-srv*) of the transforming gene of Rous sarcoma virus: isolation, mapping, and transcriptional analysis of *c-srv* and flanking regions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(9), pp.5842–5846.
- Patnaik, A., Chau, V. & Wills, J. W., 2000. Ubiquitin is part of the retrovirus budding machinery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(24), pp.13069–13074.
- Payne, L. N. & Biggs, P. M., 1966. Genetic basis of cellular susceptibility to the Schmidt-Ruppin and Harris strains of Rous sarcoma virus. *Virology*, 29(2), pp.190–198.
- Payne, L. N., Brown, S. R., Bumstead, N., Howes, K., Frazier, J. A. & Thouless, M. E., 1991. A novel subgroup of exogenous avian leukosis virus in chickens. *Journal of General Virology*, 72(4), pp.801–807.
- Payne, L. N., Gillespie, A. M. & Howes, K., 2010. Recovery of acutely transforming viruses from myeloid leukosis induced by the HPRS-103 strain of avian leukosis virus. *Avian diseases*, 37(2), pp.438–450.
- Pike, G. M., Madden, B. J., Melder, D. C., Charlesworth, M. C. & Federspiel, M. J., 2011. Simple, automated, high resolution mass spectrometry method to determine the disulfide bond and glycosylation patterns of a complex protein: subgroup A avian sarcoma and leukosis virus envelope glycoprotein. *The Journal of biological chemistry*, 286(20), pp.17954–17967.
- Pincetic, A., Kuang, Z., Seo, E. J. & Leis, J., 2010. The interferon-induced gene ISG15 blocks retrovirus release from cells late in the budding process. *Journal of virology*, 84(9), pp.4725–4736.
- Pincetic, A., Medina, G., Carter, C. & Leis, J., 2008. Avian sarcoma virus and human immunodeficiency virus, type 1 use different subsets of ESCRT proteins to facilitate the budding process. *Journal of Biological Chemistry*, 283(44), pp.29822–29830.
- Putterman, D., Pepinsky, R. B. & Vogt, V. M., 1990. Ubiquitin in avian leukosis virus particles. *Virology*, 176(2), pp.633–637.
- Regad, T. & Chelbi-Alix, M. K., 2001. Role and fate of PML nuclear bodies in response to interferon and viral infections. *Oncogene*, 20(49), pp.7274–7286.

- Robinson, W. S., Pitkanen, A. & Rubin, H., 1965. The nucleic acid of the Bryan strain of Rous sarcoma virus: purification of the virus and isolation of the nucleic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 54(1), pp.137–144.
- Rothenberg, E. & Baltimore, D., 1977. Increased length of DNA made by virions of murine leukemia virus at limiting magnesium ion concentration. *Journal of virology*, 21(1), pp.168–178.
- Rothenberg, E. & Baltimore, D., 1975. Synthesis of long, representative DNA copies of the murine RNA tumor virus genome. *Journal of virology*, 17(1), pp.168–174.
- Rous, P., 1911. A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 13(4), pp.397–411.
- Rous, P., 1910. A transmissible avian neoplasm. (Sarcoma of the common fowl.). *The Journal of Experimental Medicine*, 12(5), pp.696–705.
- Rubin, H., 1965. Genetic control of cellular susceptibility to pseudotypes of Rous sarcoma virus. *Virology*, 26, pp.270–276.
- Ruddell, A., 1995. Transcription regulatory elements of the avian retroviral long terminal repeat. *Virology*, 206(1), pp.1–7.
- Sarkaria, J. N., Busby, E. C., Tibbetts, R. S., Roos, P., Taya, Y., Karnitz, L. M. & Abraham, R. T., 1999. Inhibition of ATM and ATR kinase activities by the radiosensitizing agent, caffeine. *Cancer Research*, 59(17), pp.4375–4382.
- Scott, A., Chung, H.-Y., Gonciarz-Swiatek, M., Hill, G. C., Whitby, F. G., Gaspar, J., Holton, J. M., Viswanathan, R., Ghaffarian, S., Hill, C. P. & Sundquist, W. I., 2005. Structural and mechanistic studies of VPS4 proteins. *The EMBO journal*, 24(20), pp.3658–3669.
- Searle, S., Gillespie, D. A. F., Chiswell, D. J. & Wyke, J. A., 1984. Analysis of the variations in proviral cytosine methylation that accompany transformation and morphological reversion in a line of Rous sarcoma virus-infected Rat-1 cells. *Nucleic acids research*, 12(13), pp.5193–5210.
- Sefton, B. M., Trowbridge, I. S., Cooper, J. A. & Scolnick, E. M., 1982. The transforming proteins of Rous sarcoma virus, Harvey sarcoma virus and Abelson virus contain tightly bound lipid. *Cell*, 31(2 Pt 1), pp.465–474.
- Sekine, Y., Okada, Y., Noda, Y., Kondo, S., Aizawa, H., Takemura, R. & Hirokawa, N., 1994. A novel microtubule-based motor protein (KIF4) for organelle transports, whose expression is regulated developmentally. *Journal of Cell Biology*, 127(1), pp.187–201.
- Shalginskikh, N., Poleshko, A., Skalka, A. M. & Katz, R. A., 2013. Retroviral DNA methylation and epigenetic repression are mediated by the antiviral host protein Daxx. *Journal of virology*, 87(4), pp.2137–2150.
- Shank, P. R. & Varmus, H. E., 1978. Virus-specific DNA in the cytoplasm of avian sarcoma virus-infected cells is a precursor to covalently closed circular viral DNA in the nucleus. *Journal of virology*, 25(1), pp.104–114.
- Scheifele, L. Z., Garbitt, R. A., Rhoads, J. D. & Parent, L. J., 2002. Nuclear entry and CRM1-dependent nuclear export of the Rous sarcoma virus Gag polyprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(6), pp.3944–3949.
- Schwartz, D. E., Tizard, R. & Gilbert, W., 1983. Nucleotide sequence of Rous sarcoma virus. *Cell*, 32(3), pp.853–869.

- Skoko, D., Li, M., Huang, Y., Mizuuchi, M., Cai, M., Bradley, C. M., Pease, P. J., Xiao, B., Marko, J. F., Craigie, R. & Mizuuchi, K., 2009. Barrier-to-autointegration factor (BAF) condenses DNA by looping. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(39), pp.16610–16615.
- Slamon, D. J. & Cline, M. J., 1984. Expression of cellular oncogenes during embryonic and fetal development of the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(22), pp.7141–7145.
- Smith, G. C. M. & Jackson, S. P., 1999. The DNA-dependent protein kinase. *Genes & development*, 13(8), pp.916–934.
- Spidel, J. L., Craven, R. C., Wilson, C. B., Patnaik, A., Wang, H., Mansky, L. M. & Wills, J. W., 2004. Lysines close to the Rous sarcoma virus late domain critical for budding. *Journal of virology*, 78(19), pp.10606–10616.
- Stark, G. R., Kerr, I. M., Williams, B. R., Silverman, R. H. & Schreiber, R. D., 1998. How cells respond to interferons. *Annual review of biochemistry*, 67, pp.227–64.
- Stewart, L., Schatz, G. & Vogt, V. M., 1990. Properties of avian retrovirus particles defective in viral protease. *Journal of virology*, 64(10), pp.5076–5092.
- Stoltzfus, C. M. & Fogarty, S. J., 1989. Multiple regions in the Rous sarcoma virus *src* gene intron act *in cis* to affect the accumulation of unspliced RNA. *Journal of virology*, 63(4), pp.1669–1676.
- Stoltzfus, C. M. & Kuhnert, L. K., 1979. Evidence for the identity of shared 5'-terminal sequences between genome RNA and subgenomic mRNA's of B77 avian sarcoma virus. *Journal of virology*, 32(2), pp.536–545.
- Svet-Moldavsky, G. J., 1957. Development of multiple cysts and of hemorrhagic afflictions of internal organs in albino rats treated during the embryonic or newborn period with Rous sarcoma virus. *Nature*, 180(4597), pp.1299–1300.
- Svoboda, J. & Dourmashkin, R., 1969. Rescue of Rous sarcoma virus from virogenic mammalian cells associated with chicken cells and treated with Sendai virus. *The Journal of general virology*, 4(4), pp.523–529.
- Svoboda, J., Chýle, P., Šimkovič, D. & Hilgert, I., 1963. Demonstration of the absence of infectious Rous virus in rat tumour XC, whose structurally intact cells produce Rous sarcoma when transferred to chicks. *Folia biologica*, 9, pp.77–81.
- Swanstrom, R., Parker, R. C., Varmus, H. E. & Bishop, J. M., 1983. Transduction of a cellular oncogene: the genesis of Rous sarcoma virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(9), pp.2519–2523.
- Swanstrom, R., Varmus, H. E. & Bishop, J. M., 1982. Nucleotide sequence of the 5' noncoding region and part of the *gag* gene of Rous sarcoma virus. *Journal of virology*, 41(2), pp.535–541.
- Swanstrom, R. & Wills, J. W., 1997. Synthesis, assembly, and processing of viral proteins. In J. M. Coffin, S. H. Hughes, & H. E. Varmus, eds. *Retroviruses*. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Šenigl, F., Auxt, M. & Hejnar, J., 2012. Transcriptional provirus silencing as a crosstalk of de novo DNA methylation and epigenomic features at the integration site. *Nucleic Acids Research*, 40(12), pp.5298–5312.
- Šenigl, F., Plachý, J. & Hejnar, J., 2008. The core element of a CpG island protects avian sarcoma and leukemia virus-derived vectors from transcriptional silencing. *Journal of virology*, 82(16), pp.7818–7827.

- Taganov, K. D., Cuesta, I., Daniel, R., Cirillo, L. A., Katz, R. A., Zaret, K. S. & Skalka, A. M., 2004. Integrase-specific enhancement and suppression of retroviral DNA integration by compacted chromatin structure *in vitro*. *Journal of virology*, 78(11), pp.5848–5855.
- Tang, Y., Winkler, U., Freed, E. O., Torrey, T. A., Kim, W., Li, H., Goff, S. P. & Morse, H. C., 1999. Cellular motor protein KIF-4 associates with retroviral Gag. *Journal of virology*, 73(12), pp.10508–10513.
- Telesnitsky, A. & Goff, S. P., 1997. Reverse Transcriptase and the Generation of Retroviral DNA. In J. M. Coffin, S. H. Hughes, & H. E. Varmus, eds. *Retroviruses*. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Temin, H. M., 1961. Mixed infection with two types of Rous sarcoma virus. *Virology*, 13, pp.158–163.
- Temin, H. M., 1976. The DNA provirus hypothesis. *Science (New York, N. Y.)*, 192(4244), pp.1075–1080.
- Temin, H. M. & Kassner, V. K., 1976. Avian leukosis viruses of different subgroups and types isolated after passage of Rous sarcoma virus-Rous-associated virus-0 in cells from different ring-necked pheasant embryos. *Journal of virology*, 19(2), pp.302–312.
- Temin, H. M. & Mizutani, S., 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature*, 226(5252), pp.1211–1213.
- Temin, H. M. & Rubin, H., 1958. Characteristics of an assay for Rous sarcoma virus and Rous sarcoma cells in tissue culture. *Virology*, 6(3), pp.669–688.
- Troesch, C. D. & Vogt, P. K., 1985. An endogenous virus from Lophortyx quail is the prototype for envelope subgroup I of avian retroviruses. *Virology*, 143(2), pp.595–602.
- Uchil, P. D., Quinlan, B. D., Chan, W. T., Luna, J. M. & Mothes, W., 2008. TRIM E3 ligases interfere with early and late stages of the retroviral life cycle. *PLoS Pathogens*, 4(2), p.e16.
- UniProt, 2015. Rous sarcoma virus (strain Prague C) (RSV-PrC). *UniProt*. Available at: <http://www.uniprot.org/taxonomy/11888> [Accessed May 4, 2015].
- Vana, M. L., Tang, Y., Chen, A., Medina, G., Carter, C. & Leis, J., 2004. Role of Nedd4 and ubiquitination of Rous sarcoma virus Gag in budding of virus-like particles from cells. *Journal of virology*, 78(24), pp.13943–13953.
- Varmus, H. E., Guntaka, R. V., Fan, W. J., Heasley, S. & Bishop, J. M., 1974. Synthesis of viral DNA in the cytoplasm of duck embryo fibroblasts and in enucleated cells after infection by avian sarcoma virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71(10), pp.3874–3878.
- Verderame, M. F., Nelle, T. D. & Wills, J. W., 1996. The membrane-binding domain of the Rous sarcoma virus Gag protein. *Journal of virology*, 70(4), pp.2664–2668.
- Vogt, P. K., 1967. A virus released by “nonproducing” Rous sarcoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 58(3), pp.801–808.
- Vogt, P. K., 1997a. Historical introduction to the general properties of retroviruses. In J. M. Coffin, S. H. Hughes, & H. E. Varmus, eds. *Retroviruses*. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Vogt, P. K., 1997b. Retroviral virions and genomes. In J. M. Coffin, S. H. Hughes, & H. E. Varmus, eds. *Retroviruses*. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Vogt, P. K. & Ishizaki, R., 1965. Reciprocal patterns of genetic resistance to avian tumor viruses in two lines of chickens. *Virology*, 26(4), pp.664–672.

- Vogt, V. M. & Simon, M. N., 1999. Mass determination of Rous sarcoma virus virions by scanning transmission electron microscopy. *Journal of virology*, 73(8), pp.7050–7055.
- Wang, Z., Xu, A., Hou, X., Chen, F., Cao, W., Yu, J., Liao, M. & Tang, J., 2014. COP9 signalosome subunit 6 binds and inhibits avian leukosis virus integrase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 453(3), pp.527–532.
- Weber, F. & Schaffner, W., 1985. Enhancer activity correlates with the oncogenic potential of avian retroviruses. *The EMBO journal*, 4(4), pp.949–956.
- Weidhaas, J. B., Angelichio, E. L., Fenner, S. & Coffin, J. M., 2000. Relationship between retroviral DNA integration and gene expression. *Journal of virology*, 74(18), pp.8382–8389.
- Weiss, R. A., 1993. Cellular receptors and viral glycoproteins involved in retrovirus entry. In J. A. Levy, ed. *The Retroviridae*. Springer Science & Business Media New York.
- Weiss, S. R., Varmus, H. E. & Bishop, J. M., 1977. The size and genetic composition of virus-specific RNAs in the cytoplasm of cells producing avian sarcoma-leukosis viruses. *Cell*, 12(4), pp.983–992.
- Wetley, F. R., Hawkins, S. F. C., Stewart, A., Luzio, J. P., Howard, J. C. & Jackson, A. P., 2002. Controlled elimination of clathrin heavy-chain expression in DT40 lymphocytes. *Science (New York, N. Y.)*, 297(5586), pp.1521–1525.
- Wiegand, H. L. & Cullen, B. R., 2007. Inhibition of alpharetrovirus replication by a range of human APOBEC3 proteins. *Journal of virology*, 81(24), pp.13694–13699.
- Yamamoto, T., de Crombrughe, B. & Pastan, I., 1980. Identification of a functional promoter in the long terminal repeat of Rous sarcoma virus. *Cell*, 22(3), pp.787–797.
- Young, J. A. T., Bates, P. & Varmus, H. E., 1993. Isolation of a chicken gene that confers susceptibility to infection by subgroup A avian leukosis and sarcoma viruses. *Journal of virology*, 67(4), pp.1811–1816.
- Zhang, H., Dornadula, G. & Pomerantz, R. J., 1996. Endogenous reverse transcription of human immunodeficiency virus type 1 in physiological microenvironments: an important stage for viral infection of nondividing cells. *Journal of virology*, 70(5), pp.2809–2824.