

SZENT ISTVÁN EGYETEM
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

**A szarvasmarha vírusos hasmenése vírusának
molekuláris jellemzése, különös tekintettel a
citopatogenitásra**

PhD értekezés tézisei

Készítette:

Dr. Bálint Ádám

Budapest
2005

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Iskolavezető

Prof. Rudas Péter, DSc

Témavezető és témabizottsági tagok:

.....

Prof. Soós Tibor, PhD

Állatgyógyászati Gyógyszer-és Takarmányellenőrző
Intézet

Prof. Belák Sándor, DSc

Svéd Nemzeti Állategészségügyi Intézet és Svéd
Mezőgazdaság-tudományi Egyetem

Dr. Claudia Baule, PhD

Svéd Nemzeti Állategészségügyi Intézet

Dr. Kiss István, PhD

Debreceni Állategészségügyi Intézet

Készült 1 példányban.

.....

Dr. Bálint Ádám

ELŐZMÉNYEK, CÉLOK

A szarvasmarha vírusos hasmenésének vírusa (bovine viral diarrhoea virus, BVDV) a legtöbb szarvasmarhatartó országban előfordul, és az általa előidézett kórkép (bovine viral diarrhoea, BVD) jelentős gazdasági károkat okoz világszerte. Számos európai országban (Svédország, Finnország, Dánia, Norvégia) ez vezetett védekezési és mentesítési programok elindításához. Magyarországon az állományok közel 100%-a fertőzöttnek tekinthető, és a közeli jövőben a mentesítés elindítása elkerülhetetlenné válik.

Sejtkultúrákban okozott sejtkárosító hatásuk (cytopathogen effect, CPE) alapján a BVDV törzseket citopatogén (cp) vagy nem-citopatogén (ncp) biotípusokra osztjuk. Az ncp a (leg)gyakoribb természetesen előforduló biotípus, mert csak ez a biotípus képes perzisztens fertőzés (persistent infection, PI) kialakítására, amely biztosítja a BVDV fennmaradását az állományban. A PI állatokban cp BVDV felülfertőzés hatására kialakulhat a végzetes nyálkahártya betegség (mucosal disease, MD). Az MD-ben szenvedő ugyanazon állatból izolált cp és ncp vírusokat „vírus pár”-nak nevezzük.

A különböző vírus párok molekuláris vizsgálata tisztázta, hogy a cp variánsok a PI állatban a megfelelő ncp törzsekből különféle genomiális változások (sejt-és vírus eredetű inzerciók, kis és nagy duplikációk, pontmutációk valamint deléciók) révén *in vivo* alakulnak ki. Ezeket a genomiális változásokat citopatogenitási markereknek nevezzük. A legtöbb cp BVDV törzs cp markereinek hatásmechanizmusát sikerült meghatározni, azonban

néhány esetben további funkcionális vizsgálatokra van szükség.

A világ legtöbb országában vakcinázással védekeznek a BVD ellen. A klasszikus BVD vakcinákat két csoportra lehet osztani: élő attenuált és inaktivált. Az attenuált vakcinák előnye az alacsony ár és a magas hatékonyság. Az előnyök mellett az élő vakcináknak számos hátránya is ismert. Az immunszuppresszív és magzatkárosító hatás mellett a PI szarvasmarha vakcinázása MD kialakulásához vezethet. Ha a PI állatban jelen lévő ncp BVDV törzs a vakcinához közeli antigénszerkezettel rendelkezik, *korai* MD alakul ki. Ha a vakcinatörzs genetikailag távolabb áll a perzisztensen fertőző ncp BVDV törzstől, a két törzs rekombinálódhat és ez a *késői* MD kialakulását okozhatja. Az attenuált vakcinák elterjedt használata ellenére az attenuáltság molekuláris háttere egyelőre tisztázatlan, azonban az attenuáltság okának tisztázása elkerülhetetlen a hatékony és ártalmatlan vakcinák kifejlesztéséhez.

Munkáim fő célja a BVDV molekuláris biológiájának tanulmányozása volt, különös tekintettel a citopatogenitásra. A magyarországi BVDV törzsek citopatogenitási markereit még nem tanulmányozták. Miután e törzsek többsége kapcsolatban volt egy általunk etikai okokból BVDV-X-nek nevezett vakcina alkalmazásával, további célunk az volt, hogy a vakcina használata körüli jelenségeket a modern molekuláris biológiai módszerek alkalmazásával retrospektív módon tanulmányozzuk.

Specifikus célok

- Az 1970-es években Magyarországon különféle BVD kórformákból (légzőszervi kórképek, enteritis, MD) izolált cp BVDV törzsek citopatogenitási markereinek meghatározása.
- Magyarországon újonnan izolált cp BVDV törzsek citopatogenitási markereinek meghatározása.
- BVDV-X regisztráció előtti (BVDV-Xpre) és forgalmazott (BVDV-X) batch-ek teljes genomjainak meghatározása, annak tisztázására, hogy a különböző batch-ekben különböző BVDV szekvenciák fordultak elő.
- Lehetséges attenuálási markerek meghatározása a BVDV-X genomjában.
- A BVDV-X genomjában talált citopatogenitási marker funkciójának igazolása génexpressziós és reverz genetikai módszerek segítségével.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Sejtkultúrák, fertőzés és vírustitrálás

A kísérleteket standard módszerek szerint végeztük. Másodlagos szarvasmarha orrkagylóhám (bovine turbinate BT) sejteket alkalmaztunk, melyek intézetünkben diagnosztikai és kutatási célokra szolgálnak. A sejttenyészet BVDV mentességét az általunk rutinszerűen alkalmazott ellenőrzési módszerekkel igazoltuk.

RNS kivonás

Miután a BVDV genom poly(A) farokkal nem rendelkezik, total RNS-t izoláltunk a BVDV-vel fertőzött BT sejtek lizátumának felülúszójából. Erre a célra a TRIzol LS reagens (Invitrogen) bizonyult a legalkalmasabbnak, abban az esetben is, amikor hosszú PCR termékeket amplifikáltunk fertőző klón létrehozása céljából.

cDNS szintézis

Rövid PCR termékek amplifikálása esetén a cDNS-t M-MLV RT (Invitrogen) enzim segítségével, random hexanukleotidok, pd(N)6 (Amersham Biosciences) használatával állítottuk elő.

Hosszú PCR termékek esetén a Superscript II RT (Invitrogen) enzimet és egy antiszenz primert (VDAS1) használtunk, amely a genom 3'UTR régiójával volt komplementer. Dupla szálú cDNS használata nem növelte a hosszú PCR termékek amplifikálásának hatékonyságát.

PCR

Nukleotid szekvencia meghatározására létrehozott PCR termékek amplifikálására az Expand High Fidelity Kit-et és az Expand Long Template Kit-et (Roche) használtuk. A teljes NS2-3 gén klónozásánál és a teljes hosszúságú fertőtő klón előállításánál esetén a KOD HiFi DNA polymerase (Novagen) enzimet alkalmaztuk, melynek hatékonysága és proof-reading aktivitása a legjobbnak bizonyult az általunk alkalmazott enzimek közül.

Klónozás és nukleotid szekvenálás

A klónozási és szubklónozási eljárásokat standard módszerek szerint végeztük. A BVDV-X teljes NS2-3 génjének klónozásához a pCI emlős expressziós vektort (Promega) használtuk. A BVDV-X teljes hosszúságú cDNS klónjának instabilitási problémáinak kiküszöbölésére pANCR1180 alacsony kópiaszámú vektort, valamint ElectroTen Blue recombináns *E. coli* kompetens sejteket (Stratagene) alkalmaztunk. A szekvenálást ABI Prism szekvenáló automatán (Model 377) végeztük Big Dye Terminator V3.1 szekvenáló kit (Applied Biosystems) segítségével. A kapott szekvenciákat a DNASTAR szoftvercsomag (Lasergene) segítségével szerkesztettük és elemeztük.

Western blot analízis

A transzfektált sejteket eltávolítottuk a szövettenyésztő edény faláról, majd 10 000 x g fordulaton centrifugáltuk a sejtüledék pelletizálása céljából. A pelletet jéghideg PBS-sel mostuk, hogy eltávolítsuk a reakciót zavaró egyéb fehérjéket, a pelletet 50 µl PBS-ben reszuszpendáltuk. Ezt a koncentrált szuszpenziót használtuk SDS-PAGE és

Western blot reakciók végrehajtásához standard protokollok szerint.

Immunoperoxidáz reakció

Ez a módszer használatos a PI szarvasmarhák vérsavójából BVDV-specifikus antigének kimutatására. Ezt a módszert alkalmaztuk a vírusantigén kimutatására a teljes hosszúságú fertőző klónokból visszanyert vírusok azonosítására.

EREDMÉNYEK ÉS MEGBEZÉLÉS

Munkánk első részében az 1970-es években izolált hat „archív” cp BVDV törzs lehetséges citopatogenitási markereit határoztuk meg. A vírusok a BVDV által előidézett különböző kórképeket képviselték: enteritis és MD, mely esetek valószínűleg kapcsolatban voltak a BVDV-X vakcina használatával, valamint légzőszervi megbetegedések. A vakcina és a cp BVDV izolátumok teljes NS2-3 génjét amplifikáltuk RT-PCR segítségével, és szekvenálással meghatároztuk nukleotidsorrendjüket. Az eredmények azt mutatták, hogy új cp markereket sikerült találni minden egyes vizsgált vírusban az NS2 génben, a 4355 pozícióban. Ezek a cp markerek hasonlítottak a BVDV CP7 referencia törzsben talált cp faktorhoz. Az enteritis és MD izolátumok, valamint a vakcina NS2-3 régiója (valamint 5'UTR és E2) azonosnak mutatkozott, jelezvén, hogy a vakcina *korai* MD kialakulásához vezetett. A cp marker 45 nukleotid hosszúnak bizonyult, ez a virális inzerció eredetileg a normál BVDV genom NS4B/NS5A régiójában helyezkedik el. A H3887 légzőszervi izolátumban egy sejt-eredetű 21 nukleotid hosszú inzerciót találtunk. Az inzerció a legnagyobb hasonlóságot egy murine interferon-induced guanylate-binding protein 1 génszakasszal mutatta. Ez az első celluláris inzerció a 4355 pozícióban. A H3142 légzőszervi izolátumban egy 42 nukleotid hosszú virális duplikációt találtunk a 4355 pozíció közelében. Ez a nukleotid szakasz a normál BVDV genom NS5B génjében foglal helyet. Ebben az izolátumban 93 nukleotiddal lejjebb egy 3 nukleotid hosszú deléciót is találtunk.

A cp BVDV izolátumokban talált genomiális változások a 4355 pozícióban, illetve közelében találhatóak, jelezvén, hogy ez a genomiális régió rekombinációs hot spot lehet az ncp BVDV törzsekben.

Munkánk második részében két, MD esetekből újonnan izolált cp BVDV törzs citopatogenitási markereit jellemeztük. A H4956 izolátumban egy jiv-szerű celluláris inzerciót találtunk, amely hasonlított a BVDV NADL referencia törzsből, illetve egyes BVDV 1 és BVDV 2 izolátumokban leírtakhoz. A H115/PCR törzsből egy hosszú duplikációt fedeztünk fel. A duplikáció egy teljes ubikvitin monomert és a komplett NS3 gént tartalmazta. Az inzerciók és a duplikáció a két újonnan izolált cp BVDV törzsből további bizonyítékot szolgáltatott, hogy az A és B pontban történt rekombinációk a leggyakoribb mechanizmusok, melyek a BVDV citopatogenitálásának kialakulásához vezethetnek.

Munkánk harmadik szakaszában a BVDV-X vakcina teljes genom analízisét végeztük el. A BVDV-X vakcinát évtizedeken át (de ma már nem) Oregon C24V származékként forgalmazták. Az előzetes szekvenálási adatok azonban azt sejtették, hogy a vakcina kifejlesztése közben rekombináció történt a vakcinatörzs és egy ismeretlen vad típusú törzs között. Ezért meghatároztuk egy pre-regisztrációs (BVDV-Xpre) és egy forgalmazott (BVDV-X) batch nukleotid sorrendjét. A teljes genom analízisének eredményei megerősítették, hogy a vakcina kifejlesztése az Oregon C24V törzsből indult ki. Meglepő módon a forgalmazott vakcina teljes nukleotidsorrendjének vizsgálata azt mutatta, hogy ez a törzs a BVDV 1b alcsoportba tartozik, 93,7%-os hasonlóságot mutatva a BVDV Osloss referencia

törzzsel. A nukleotid hasonlóság az Oregon C24V törzzsel lényegesen alacsonyabb, mindössze 77,4% volt. Ezek az adatok azt támasztják alá, hogy az Oregon C24V-től jelentősen különböző törzs a vakcina kifejlesztésének *in vitro* és *in vivo* lépései alatt bekövetkező törzsváltás során került a vakcinába. A törzsváltás ellenére a vakcina megtartotta eredeti hatékony és ártalmatlan jellemzőit. E munka eredményei hangsúlyozzák, hogy a kereskedelmi forgalomban lévő élő attenuált vakcinák exogén BVDV törzzsel való szennyeződése valós veszély, és ellenőrzésükhöz modern molekuláris módszerekre is szükség van.

Az utolsó két kísérletben a BVDV-X vakcina genomjában talált citopatogenitási marker funkcióját vizsgáltuk. Az első lépésben a 45 nukleotid hosszú inzerciónak az NS3 protein expressziójában betöltött szerepét elemeztük. A vakcinavírus teljes NS2-3 génjét és egy PCR mutagenezissel létrehozott inzerció-negatív variánsát pCI emlős expressziós vektorba klónoztuk, majd BT sejtekben kifejeztük. A Western blot analízis kimutatta, hogy az inzerció hozzájárult az NS2-3 részleges vágásához, amely az NS3 citopatogenitási marker fehérje megjelenéséhez vezetett.

A következő lépésben azt vizsgáltuk, hogy a 45 nukleotid hosszú inzerció a BVDV-X citopatogenitását okozza-e. Ehhez létrehoztuk a vírus teljes hosszúságú fertőző klónját. A klónból visszanyert rekombináns vírus, BVDV-XR, kissé lassabban replikálódott, mint az eredeti BVDV-X, azonban további reverz genetikai vizsgálatokra alkalmasnak bizonyult. Miután a vakcina természetes ncp párja nem volt elérhető, PCR mutagenezissel egy ncp mutáns klónt állítottunk elő. A klónból visszanyert vírus,

BVDV-XR-INS-, hasonló növekedési jellemzőket mutatott, mint a cp párja, de CPE-t nem mutatott. Ez a megfigyelés végső bizonyítékkul szolgált, hogy az inzerció nélkülözhetetlen a BVDV-X citopatogenitásának kialakításában.

Összefoglalva, a jelen tanulmányok új információkat szolgáltattak a BVDV molekuláris biológiájáról, valamint a citopatogenitás és a rekombinációk kapcsolatáról, mely fontos terület az állatorvosi virológia alap- és alkalmazott kutatásai szempontjából.

ÚJ EREDMÉNYEK ÉS MEGÁLLAPÍTÁSOK

- Három különböző, eddig ismeretlen rövid inzerció járul valószínűleg hozzá a Magyarországon az 1970-es években izolált citopatogén BVDV törzsek és a BVDV-X élő attenuált vakcina citopatogenitásához.
- Két, Magyarországon MD esetekből újonnan izolált cp BVDV törzs citopatogenitását két különböző, előzőleg leírt citopatogenitási markerekhez hasonló genomiális változás okozza, melyek bizonyítják, hogy a BVDV citopatogenitásáért gyakran az A és B pontbeli rekombinációk felelősek.
- Meghatároztuk egy BVDV-X pre-regisztrációs batch, BVDV-Xpre teljes genomjának nukleotidsorrendjét. Ez az első olyan genetikailag teljesen jellemzett vakcina, melynek a virulens párja megtalálható a GenBank-ban. Ezen kívül

bizonyítást nyert, hogy a vakcina kifejlesztése Oregon C24V törzsből indult ki.

- Meghatároztuk a BVDV-X forgalmazott vakcina teljes nukleotidsorrendjét, és az adatok azt mutatták, hogy a vakcina nem tartalmaz Oregon C24V szekvenciákat, jelezvén, hogy törzsváltás történt a vakcina kifejlesztése során. A forgalmazott vakcina a BVDV 1b alcsoporthoz tartozik, és a legnagyobb hasonlóságot a BVDV Osloss referencia törzsszel mutatta.
- A BVDV-X NS2-3 génjének expressziós kísérletei bebizonyították, hogy a 45 nukleotid hosszú virális inzerció felelős az NS3 citopatogenitási marker fehérje kifejeződéséért.
- A BVDV-X teljes hosszúságú fertőző klónjának elkészítése és reverz mutagenézise bizonyította, hogy a 45 nukleotid hosszú virális inzerció felelős a vírus citopatogenitásáért.
- A fertőző klón továbbá eszköz lehet a másik két új citopatogenitási marker vizsgálatához, valamint genetikailag módosított élő attenuált vakcina kifejlesztésének alapjául szolgálhat.

PUBLIKÁCIÓS LISTA

Referált cikk

Bálint, Á., Pálfi, V., Belák, S., Baule, C., 2005. Viral sequence insertions and a novel cellular insertion in the NS2 gene of cytopathic isolates of bovine viral diarrhoea virus as potential cytopathogenicity markers. *Virus Genes* **30**: 49-58.

Bálint, Á., Baule, C., Kiss, I., Kecskeméti, S., Belák, S., 2005. Cytopathogenicity markers in the genome of Hungarian cytopathic isolates of bovine viral diarrhoea virus. *Acta Veterinaria Hungarica* **53**: 125-136.

Bálint, Á., Baule, C., Pálfi, V., Belák, S., 2005. Retrospective genome analysis of a live vaccine strain of bovine viral diarrhoea virus. *Veterinary Research* **36**: 89-99.

Bálint, Á., Baule, C., Pálfi, V., Belák, S. A 45-bp insertion in the NS2 gene is responsible for the cytopathogenicity of bovine viral diarrhoea virus. *Virus Genes*, közlésre elfogadva.

Bálint, Á., Kiss, I., Belák, S. Újabb ismeretek a szarvasmarha vírusos hasmenése kórokozójának (BVDV) molekuláris biológiájáról. *Magy. Áo. Lapja*, közlésre elfogadva.

Bálint, Á., Kiss, I., Belák, S. A molekuláris módszerek alkalmazása a szarvasmarha vírusos hasmenése diagnosztikájában és a betegség elleni védekezésben. *Magy. Áo. Lapja*, közlésre elfogadva.

Absztrakt

Bálint, Á., Pálfi, V., Baule, C., Belák, S. Sejt- és vírus eredetű inzerciók, mint a szarvasmarha vírusos hasmenése vírusának új lehetséges citopatogenitási markerei. *Akadémiai Beszámolók*. Budapest, 2005. január 25. (előadás)

Bálint, Á., Pálfi, V., Baule, C., Dencső, L., Hornyák, Á., Belák, S. Génexpressziós és reverz genetikai módszerek a szarvasmarha vírusos hasmenése vírusa citopatogenitásának meghatározásában. *Akadémiai Beszámolók*. Budapest, 2005. január 25. (előadás)

Bálint, Á., Pálfi, V., Baule, C., Dencső, L., Belák, S., 2005. Novel cytopathogenicity markers of bovine viral diarrhoea virus. *Microbes of a changing world. Joint Meeting of the three divisions of the IUMS hosted by the American Society for Microbiology*. San Francisco, 2005. július 23-28. (poszter)