

Állatorvostudományi Egyetem
Aujeszky Aladár Elméleti Állatorvostudományok Doktori Iskola

**A sertés parvovírus SAT⁻ mutáns törzsének és
víziszárnyas vírusok fertőzőképességének vizsgálata
real-time PCR és immunfluoreszcens módszerekkel**

PhD értekezés

Mészáros István

2017

Témavezető és témabizottsági tag:

.....
Dr. Zádori Zoltán
Magyar Tudományos Akadémia
Agrártudományi Kutatóközpont
Állatorvos-tudományi Intézet
témavezető

Dr. Tuboly Tamás
Állatorvostudományi Egyetem,
Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék
témabizottság tagja

Készült 10 példányban. Ez a(z) sz. példány.

.....
Mészáros István

Tartalomjegyzék

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
2. ÖSSZEFOGLALÁS	8
2.1 SUMMARY	10
3. BEVEZETÉS	12
3.1 CÉLKITŰZÉSEK	13
4. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	15
4.1 A SERTÉS PARVOVÍRUS	15
4.2 AZ ER STRESSZ ÉS A SELEJT FEHÉRJE VÁLASZ	16
4.3 A KACSA HEPATITIS A VÍRUS 1	19
4.4 A KACSA CIRKOVÍRUS	20
4.5 A LIBA VÉRZÉSES POLYOMAVÍRUS	21
4.6. A LIBA PARVOVÍRUS	23
5. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	26
5.1 PPV KRESSE FERTŐZŐ KLÓNOK KÉSZÍTÉSE.....	26
5.2 SEJTKULTÚRÁK	26
5.3 SZERVINTÁK ÉS KEZELÉSÜK.....	27
5.4 FERTŐZÉSEK VÍZISZÁRNYAS VÍRUSOKKAL	27
5.5 PPV KRESSE TÖRZSTENYÉSZETEK LÉTREHOZÁSA ÉS TITRÁLÁSA	27
5.6 A PPV KRESSE VÍRUSTÖRZSEK TERJEDÉSÉNEK ÖSSZEHASONLÍTÁSA.....	28
5.7 IMMUNFLUORESCENS FESTÉS	28
5.8 REAL-TIME PCR	29
5.9 SZAPORODÁSI GÖRBE MEGHATÁROZÁSA	31
5.10 APOPTÓZIS ÉS ÉLETKÉPESSÉG VIZSGÁLAT PPV-VEL FERTŐZÖTT SEJTEKEN.....	32
5.11 AZ ER MORFOLÓGIAI VÁLTOZÁSÁNAK ÉS AZ ER STRESSZVÁLASZ FEHÉRJÉINEK DETEKTÁLÁSA PPV-VEL FERTŐZÖTT SEJTEKBEN	33
5.12 ER STRESSZ KIVÁLTÁSA PPV-VEL FERTŐZÖTT SEJTEKBEN	33
5.13 UV-FÉNNYEL KIVÁLTOTT STRESSZ.....	34
5.14 A SAT-DsRED ÉS A CHOP-DsRED FÚZIÓS KONSTRUKCIÓK ELŐÁLLÍTÁSA.....	34
5.15 A PLAZMIDOK TRANSZFORMÁLÁSA, ELLENŐRZÉSE ÉS TISZTÍTÁSA.....	35
5.16 A SAT- ÉS A CHOP-DsRED PLAZMIDOK TRANSZFEKCIÓJA.....	36
5.17 A VÍZISZÁRNYAS VÍRUSOK CIKLUSIDEJÉNEK ÉS FERTŐZŐKÉPESSÉGÉNEK MEGÁLLAPÍTÁSA	37
6. EREDMÉNYEK.....	38
6.1 A VAD TÍPUSÚ ÉS A SAT ⁻ MUTÁNS PPV KRESSE VÍRUSOK TERJEDÉSE.....	38
6.2 CITOPATOGÉN HATÁSOK A VAD TÍPUSÚ ÉS A SAT ⁻ MUTÁNS PPV KRESSE FERTŐZÉS SORÁN	40
6.3 AZ ER MORFOLÓGIAI VÁLTOZÁSAINAK ÉS AZ ER STRESSZVÁLASZ FEHÉRJÉINEK KIMUTATÁSA	43
6.4 ER STRESSZ KIVÁLTÁSA KÉMIAI ANYAGOKKAL ÉS HATÁSUK A PPV FERTŐZÉSRE	45
6.5 A SAT FEHÉRJE EXPRESSZIÓJÁNAK HATÁSA PT SEJTEKBEN	48
6.6 A CHOP LOKALIZÁCIÓJA PT SEJTEKBEN ÉS HATÁSA A VAD TÍPUSÚ ÉS A SAT ⁻ PPV KRESSE VÍRUS TERJEDÉSÉRE	50
6.7 VÍZISZÁRNYAS VÍRUSOK KÓPIASZÁMA PÉZSMARÉCE-EREDETŰ SEJTVONALAKON	52
6.8 A DuCV, DHAV-1, GHPV ÉS GPV SZAPORODÁSI GÖRBÉJE	53
6.9 A VÍRUSOK CIKLUSIDEJÉNEK ÉS A SEJTVONALAK FOGÉKONYSÁGÁNAK MEGHATÁROZÁSA.....	54

7. MEGBESZÉLÉS	57
7.1 A SAT FEHÉRJE HATÁSA A PPV KRESSE VÍRUS TERJEDÉSÉRE ÉS A FERTŐZÖTT SEJTEK LÍZISÉRE	57
7.2 AZ ER STRESSZVÁLASZ AKTIVÁLÓDÁSA ÉS HATÁSA A PPV TERJEDÉSÉRE	59
7.3 A SAT-DsRED ÉS CHOP-DsRED FÚZIÓS FEHÉRJÉK HATÁSA.....	61
7.4 A PÉZSMARÉCE-EREDETŰ SEJTVONALAK PERMISSZIVITÁSÁNAK VIZSGÁLATA	62
7.5 AZ AGE1 SEJTVONALAK FOGÉKONYSÁGA A FERTŐZÉSRE ÉS A VÍRUSOK CIKLUSIDEJE A CRPIX SEJTVONALON.....	64
8. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....	67
9. IRODALOMJEGYZÉK.....	68
10.1 LEKTORÁLT TUDOMÁNYOS FOLYÓIRATBAN MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK.....	84
10.2 KONFERENCIA ÖSSZEFOGLALÓK	84
10.3 A DOKTORI DISSZERTÁCIÓ TÉMÁJÁHOZ NEM KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK	84
11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	86

1. Rövidítések jegyzéke

AAV	adeno-associated virus	adeno-asszociált vírus
ASK1	apoptosis signal-regulated kinase 1	apoptózis szignál-szabályozott kináz 1
ATF	activating transcription factor	aktiváló transzkripciósfaktor
ATP	adenosine-triphosphate	adenozin-trifoszfát
Bak	Bcl-2 homologous antagonist	Bcl-2 homológ antagonist
Bax	Bcl-2-associated X protein	Bcl-2-asszociált X fehérje
Bcl-2	B-cell lymphoma 2	B-sejt limfóma 2
bp	base pair	bázispár
BSA	bovine serum albumin	szarvasmarha szérum albumin
Ca ²⁺	calcium	kalcium-ion
CHOP	C/EBP homologous protein	C/EBP homológ fehérje
DHAV-1	duck hepatitis A virus 1	kacsa hepatitisz A vírus 1
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium	Dulbecco féle módosított Eagle médium
DNS	deoxyribonucleic acid	dezoxiribonukleinsav
DR5	death receptor 5	halál receptor 5
DuCV	duck circovirus	kacsa cirkovírus
DTT	dithiotreitol	ditiotreitól
eIF2 α	eukaryotic initiation factor 2 alfa	eukarióta iniciációs faktor 2 alfa
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálat
ER	endoplasmic reticulum	endoplazmatikus retikulum
ERAD	ER-associated protein degradation	ER-asszociált fehérje lebontás
Ero1 α	ER oxidase 1 alfa	ER oxidáz 1 alfa
FBS	fetal bovine serum	magzati szarvasmarha szérum
GADD34	growth arrest and DNA damage-inducible protein	növekedés gátló és DNS károsodást indukáló fehérje
GHPV	goose haemorrhagic polyomavirus	liba vérzéses polyomavírus
GPV	goose parvovirus	liba parvovírus
GRP78	78 kDa glucose-regulated protein	78 kDa méretű glükóz-regulált fehérje
GTP	guanosine triphosphate	guanozin-trifoszfát

H-1PV	oncolytic parvovirus H1	patkány H1 parvovírus
HEK	human embryonic kidney	humán embrionális vese
HeLa	Henrietta Lacks cell line	Henrietta Lacks sejtvonal
IF	immunofluorescence	immunfluoreszcens
IRE1 α	inositol-requiring enzyme 1 α	inozitolt igénylő enzim 1 α
JNK	c-Jun N-terminal kinase	c-Jun N-terminális kináz
LB	Luria-Bertani	Luria-Bertani
LDH	lactate dehydrogenase enzyme	laktát-dehidrogenáz enzim
MOI	multiplicity of infection	fertőzés multiplicitása
mRNA	messenger RNS	hírvivő RNS
MVM	minute virus of mice	egér mini vírus
NS	non-structural protein	nem-strukturális fehérje
ORF	open reading frame	nyitott leolvasási keret
PBS	Phosphate-buffered saline	foszfát-pufferelt sóoldat
PCR	polymerase chain reaction	polimeráz láncreakció
PERK	double-stranded RNA-activated protein kinase-like ER kinase	kétszálú RNS aktiválta protein kináz-szerű ER kináz
PI	propidium-iodide	propídium-jodid
PK	porcine kidney	sertés vese
pKresse	infectious clone of the wild type Kresse	a vad típusú Kresse törzs fertőző klónja
PPV	porcine parvovirus	sertés parvovírus
pSAT ⁻	infectious clone of the SAT ⁻ Kresse	a SAT ⁻ Kresse törzs fertőző klónja
PT	porcine testis	sertés here
RNS	ribonucleic acid	ribonukleinsav
RPM	revolution per minute	percenkénti fordulatszám
RT-PCR	reverse transcription PCR	reverz transzkripció PCR
SAT	small alternatively translated protein	kisméretű alternatív módon transzlálódó fehérje
SMEDI	stillbirth, mummification, embryonic death, infertility	koraszülés, mummifikáció, embrió halál, terméketlenség
SPF	specific pathogen free	meghatározott kórokozótól mentes
ST	swine testicle cells	sertés here sejtvonal
UPR	unfolded protein response	sejtféherje válasz
UV	ultraviolet	ultraibolya

VP

viral protein

szerkezeti fehérje

Xbp1

X-box binding protein 1

X-box kötő fehérje 1

2. Összefoglalás

A sertés parvovírus (porcine parvovirus: PPV) genomjában található egy rövid, alternatív leolvasási keret (open reading frame: ORF), mely átfedésben van a 2-es szerkezeti fehérjét (viral protein 2: VP2) kódoló gén aminoterminális régiójával, és a SAT (small alternatively translated protein) nevű fehérjét kódolja. Az attenuált NADL-2 törzsben a SAT a sejtek endoplazmatikus retikulumában (ER) halmozódik fel, és hiánya „lassú terjedés” fenotípus kialakulásához vezet. Valós idejű (real-time) PCR és immunfluoreszcens (IF) módszerekkel szeretnénk volna meghatározni, milyen hatással jár a SAT fehérje elvesztése a patogén Kresse törzs fertőzőképességére, illetve feltárni a fehérje hatásának molekuláris hátterét.

A vad típusú és a SAT⁻ mutáns PPV Kresse törzssel végzett *in vitro* összehasonlító vizsgálataink megmutatták, hogy a SAT⁻ PPV törzseknek általános tulajdonságuk a lassú terjedés, amiért a sejtmembrán integritásának hosszabb ideig történő fennmaradása és a vírusok későbbi kijutása a felelős.

A fertőzött sejtek ER membránjában megfigyelhető morfológiai változások és a sejt fehérje válaszbán (unfolded protein response: UPR) szerepet játszó fehérjék – a homeosztázist helyreállító X-box kötő fehérje 1 (X-box binding protein 1: Xbp1) és a pro-apoptotikus C/EBP homológ fehérje (C/EBP homologous protein: CHOP) – expressziója azt mutatta, hogy a PPV fertőzés a SAT jelenlététől függetlenül ER stresszt vált ki. Viszont a CHOP magasabb expressziós rátája és sejten belüli lokalizációjának megváltozása arra utalt, hogy a SAT fokozza a stresszhatás erősségét, és felgyorsítja a fertőzés által kiváltott sejthalált.

Az ER stressz kémiai anyagokkal (DTT, MG132, thapsigargin) történő indukálásakor, a vad típusú és a SAT⁻ vírusfertőzéskor egyaránt tapasztalt gyorsabb víruskijutás igazolta az ER stressz és a terjedés közötti kapcsolatot. A rövid ideig tartó, ultrabolya fénnel történt besugárzás nem járt pozitív hatással a vírusok kópiaszámára és titerére, ami alátámasztja az ER stresszválasz specifikus szerepét a folyamatban.

A transzfekciós kísérletek során a SAT expressziója nem volt elégséges sem az Xbp1 sem a CHOP transzlációjának aktiválásához, ami felveti a lehetőséget, hogy a SAT más vírusfehérjékkel közösen fejti ki hatását. Továbbá, a CHOP expressziója és sejtmagi lokalizációja önmagában nem volt képes semlegesíteni a SAT hiányából következő lassabb terjedést, ami arra utal, hogy a fehérje hatása nem korlátozódik kizárólag a CHOP működésének befolyásolására.

Feltételezésünk szerint a SAT, más vírusfehérjékkel kölcsönhatásban képes erős ER stresszt okozni, ami több UPR útvonal és/vagy más ER stresszválasz aktiválásához vezet a fertőzött sejtekben. Ezeknek az útvonalaknak/fehérjéknek a hatása a CHOP

hatásával kiegészülve, együttesen vezet a korábbi sejthalálhoz és a vírusok gyorsabb terjedéséhez.

A kacsacirkovírus (duck circovirus: DuCV), a kacsacirkovírus hepatitis A vírus 1 (duck hepatitis A virus type 1: DHAV-1), a liba vérzéses polyomavírus (goose haemorrhagic polyomavirus: GHPV) és a liba parvovírus (goose parvovirus: GPV) mindegyike súlyos gazdasági károkat okoz a víziszárnyas állományokban, viszont egyáltalán nem vagy csak kevésbé szaporíthatóak immortalizált sejtvonalakon. Fertőzési kísérletekkel szerettük volna igazolni, hogy pézsmaréce (*Cairina moschata*) eredetű, humán vakcina vírustörzsek szaporítására kifejlesztett AGE1.CR, AGE1.CRplX és AGE1.CS sejtvonalak felhasználhatóak víziszárnyas vírusok kutatásában és diagnosztizálásában is.

Vizsgálataink igazolták, hogy az AGE1 sejtvonalak mind permisszívek a DHAV-1, a GHPV és a GPV fertőzésre, és szemi-permisszívek a DuCV fertőzésre. Alacsony multiplicitású DHAV-1 és DuCV fertőzésnél a különböző sejtvonalakon kapott szaporodási görbék nagyon hasonlóak voltak, míg a GHPV és GPV fertőzéskor a görbék alakja jelentősen függött a sejtvonal típusától. A DHAV-1 és GPV fertőzésre a CRplX, míg a GHPV fertőzésre a CR sejtvonal bizonyult a legérzékenyebbnek.

Az AGE1 sejtvonalak érzékenysége ellenére a termelődött vírusok mennyisége viszonylag alacsony volt. A fertőzés optimalizálása és/vagy a vírusok adaptálódása a sejtekhez viszont megnövelheti a termelődő vírusok mennyiségét, és alkalmassá teheti a sejtvonalakat új, élővakcinák kifejlesztésére és gyártására.

2.1 Summary

A short, alternative open reading frame (ORF) is located in the genome of the porcine parvovirus (PPV) overlapping the amino terminal region of the viral protein 2 (VP2) gene and encode the small alternatively translated protein (SAT). The SAT of the attenuated NADL-2 strain accumulates in the ER and its deletion induces “slow spreading” phenotype. We studied the effect of the deletion of SAT in the pathogen Kresse strain and analysed the signalling pathways involved in its function, using real-time PCR and immunofluorescence (IF) methods.

The *in vitro* comparison of the wild type Kresse strain and its SAT⁻ knockout mutant revealed that “slow spreading” is a general feature of the SAT⁻ PPV viruses, and the prolonged cell integrity and late viral release are responsible for this feature.

PPV infection induces ER stress in the infected cells regardless of SATp presence. It is demonstrated by the morphological changes of the ER, the expression of the unfolded protein response related proteins, the homeostasis restorer X-box binding protein 1 (XBP1) and the pro-apoptotic C/EBP homologous protein (CHOP). However, the presence of SAT protein accelerates the cell death and enhances the ER stress during infection as shown by the higher expression rate and the alteration of the localization of CHOP.

The involvement of irreversible ER stress induction in the viral spreading was confirmed by treatment of infected cells by ER stress inducing chemicals (MG132, DTT and thapsigargin) that accelerated the egress both the wild type and the SAT⁻ viruses. The short-term ultra violet irradiation had no beneficial effect on the copy number and the titer of the viruses underscoring the specificity of ER stress pathways in the acceleration process.

Transfection experiments revealed that the expression of SAT alone cannot activate Xbp1 or CHOP expression, which raises the possibility that SAT exerts its effect in synchrony with other viral proteins. Furthermore, induction of the CHOP expression and the nuclear translocation of CHOP alone cannot be responsible for the biological effect of SAT protein, since nuclear CHOP could not complement the lack of SAT in a co-expression experiment.

Most probably SAT interacts with the effect of other viral proteins, it causes severe ER stress, which results in the activation of more UPR pathways and/or other ER stress response routes in the infected cells. The influence of these pathways/proteins complementing the effect of the CHOP induced genes lead to earlier cell death and accelerated viral spread.

Economically speaking, duck circovirus (DuCV), duck hepatitis A virus 1 (DHAV-1), goose haemorrhagic polyomavirus (GHPV), and goose parvovirus (GPV) are harmful pathogens of waterfowl, and do not or poorly replicate in immortalized cell lines. The AGE1.CR, AGE1.CR.pIX and AGE1.CS muscovy duck (*Cairina moschata*) originated cell lines have been developed previously for the production of human viral vaccines. These cell lines were studied to explore their suitability for propagating the aforementioned avian viruses.

Our investigations verified that the AGE1 cell lines are permissive for the DHAV-1, GHPV and GPV and semi-permissive for the DuCV. In case of low multiplicity DHAV-1 and DuCV infection, the obtained growth curves were very similar in different cell lines, while at the GHPV and GPV infection, the shape of the curves depended on the type of the cell line substantially. The CRpIX proved to be the most sensitive for the DHAV-1 and GPV infection, while the CR was the most suitable for the GHPV replication.

Despite the high sensitivity of the cell lines for viruses, their viral productivity remained relatively low for the investigated field isolates. However, optimization of virus infection and/or the adaptation of the viruses to the cells can increase viral productivity and make these cell lines suitable for vaccine development and production.

3. Bevezetés

Általánosan elfogadott nézet, hogy a parvovírusok fehérjéi két fő nyitott leolvasási keretről (open reading frame: ORF) fordítódnak le, melyek közül az 5' végi néhány nem-strukturális fehérjét (non-structural protein: NS), míg a 3' végi két-három szerkezeti fehérjét (viral protein: VP) kódol (Tattersall, 2008). Az évek során azonban a két fő ORF mellett több parvovírusban fedeztek fel rövid leolvasási kereteket, melyek átfedésben vannak az NS és VP fehérjék ORF-jével. Ezekről az alternatív leolvasási keretéről néhány esetben bebizonyosodott, hogy fehérjéket kódolnak (St. Amand és Astell, 1993; Hermonat és mtsai., 1999). Ezek a kutatások azonban nem keltettek nagy figyelmet, inkább kivételként, mint általános szabályként tekintettek rájuk.

Számítógépes vizsgálatokkal azonosítottak egy, a VP2 fehérjét kódoló génszakasz aminoterminális régiójával átfedő, kisméretű, alternatív ORF-et, amely a *Protoparvovirus* nemzetség valamennyi tagjának genomjában megtalálható. Erről a nemzetség-specifikus ORF-ről lefordítódik egy rövid alternatív módon transzlálódó fehérje (small alternatively translated: SAT), amely a gazdasejt ER-jában halmozódik fel. A sertés parvovírus (porcine parvovirus: PPV) attenuált NADL-2 törzsében a SAT teljes vagy részleges funkcióvesztése „lassan terjedő” mutáns törzsek létrejöttéhez vezetett (Zádori és mtsai., 2005). A feltételezések szerint ez a fehérje hiányából következő nagymértékű sejtlízis csökkenéssel magyarázható.

Munkánk kezdetekor nem tudtunk semmi biztosat a SAT működésének molekuláris mechanizmusairól. Mivel a gazdasejt ER-jában halmozódik fel, feltételeztük, hogy szerepet játszhat a sejt ER stresszválaszának kialakításában vagy módosításában.

Annak ellenére, hogy az ER stressz kialakulásának módja és a sejt által rá adott lehetséges válaszok molekuláris háttere már viszonylag jól ismert (Yoshida és mtsai., 1998; Marciniak és mtsai., 2006; Ron és Hubbard, 2008), ez jelenleg is nagy erővel kutatott terület. Ez annak köszönhető, hogy a folyamat szerepet játszik a daganatsejtek túlélésében (Corazzari és mtsai., 2017; Ojha és Amaravadi, 2017), a növények abiotikus stressztűrésében (Bao és Howell, 2017), az anyagcsere rendellenességek által kiváltott (Demirtas és mtsai., 2016; Sozen és Ozer, 2017) vagy neurodegeneratív eredetű betegségek (Shah és mtsai., 2017; Sukumaran és mtsai., 2017) kialakulásában is.

A választott kutatási téma relevanciáját igazolja, hogy kapcsolatot keres az ER stresszválaszban bekövetkező változások és a sejthalál között, mely eredmények (azon túl, hogy bővítik a vírus-gazdasejt interakciókról eddig megszerzett ismereteinket) segíthetnek megérteni a fent említett folyamatokat is. Emellett alátámaszthatják azt a nézetet is, amely szerint az átfedő, alternatív ORF-ek által kódolt fehérjék jelentős biológiai hatással bírnak.

A SAT hatásának molekuláris hátterét feltáró vizsgálatokat immunfluoreszcens és valós idejű (real-time) PCR módszerekre alapoztuk. Mind a két módszer széleskörűen alkalmazott vírus-gazdasejt interakciók feltárására (Sauter és mtsai., 2012; Zhang és mtsai., 2008), ám mi egyrészt úgy gondoltuk, hogy együttes használatukkal robosztusabb eredmények érhetők el, másrészt pedig demonstrálni kívántuk, hogy az alkalmazott kutatásban, sejtvonalak permisszivitásának vizsgálatához és vírustörzsek jellemzéséhez is jól alkalmazhatóak közösen.

Napjainkban a víziszárnyas-tenyésztés és -feldolgozás egyre inkább gépesített gazdaságokban történik. A súlyos anyagi károk megelőzéséhez az állományok folyamatos monitorozására és az egészségügyi veszélyekre való gyors reakcióra van szükség, amihez elengedhetetlen a kórokozók egyszerű, olcsó és gyors kimutatása, meghatározása.

A kacsacirkovírus (duck circovirus: DuCV), a kacsacirkohepatitis A vírus 1 (duck hepatitis A virus type 1: DHAV-1), a libavérzéses polyomavírus (goose haemorrhagic polyomavirus: GHPV) és a libaparvovírus (goose parvovirus: GPV) közös jellemzője, hogy gyengén vagy egyáltalán nem replikálódnak immortalizált sejtvonalakon, így vizsgálatukhoz legtöbbször primer sejtekre vagy embrionált tojásokra van szükség, amelyek előállításuk és használata számos hátránnyal jár. Az oltott tojásokkal folytatott kísérletek viszonylag hosszú időt vesznek igénybe, a primer sejteknek korlátozott az osztódási potenciálja, valamint mindkettő előállításához meghatározott kórokozótól mentes (specific pathogen free – SPF) állomány fenntartására van szükség, ami jelentősen megdrágítja a vizsgálatokat.

A közelmúltban kifejlesztették a pézsmaréce-eredetű AGE1.CR, AGE1.CRpIX és AGE1.CS sejtvonalakat (Jordan és mtsai., 2009), melyeket a humán adenovírus 5-ből származó E1A és E1B gének expressziójával immortalizáltak. A CR és CRpIX sejtvonal korábban már fogékonynak bizonyult módosított Ankara vakcina vírus, influenza A vírus és baromfipestis vírus fertőzésre (Jordan és mtsai., 2009; Lohr és mtsai., 2009; Jordan és mtsai., 2011; Lohr és mtsai., 2012). Feltételezésünk szerint ezek a pézsmaréce-eredetű sejtvonalak alkalmasak lehetnek az említett (víziszárnyasokat fertőző) vírusok kimutatására, vizsgálatára is.

3.1 Célkitűzések

Munkánk célja a SAT fehérje hatásának vizsgálata volt a patogén PPV Kresse törzs terjedésére, real-time PCR és immunfluoreszcens módszerekkel, annak érdekében, hogy meghatározzuk, a „lassú terjedéses” fenotípus kialakulása általános jelenségnek számít-e a SAT⁻ PPV törzsekben.

Az általunk létrehozott mutáns PPV Kresse törzs felhasználásával tanulmányozni kívántuk, hogy az alternatív leolvasási keretről lefordítódó SAT hogyan befolyásolja a fertőzött sejtekben megjelenő citopatogén hatásokat. Célunk volt, hogy igazoljuk, a SAT-vírus lassabb terjedése együtt jár a fertőzött sejtek gyengébb lízisével.

Bizonyítani kívántuk, hogy a SAT képes befolyásolni a fertőzött sejtekben kialakuló ER stresszválaszt, továbbá az ER stressz mesterséges, kémiai anyagokkal való kiváltásával alátámasztani, hogy a stresszhatás megjelenése együtt jár a vírus gyorsabb terjedésével, így igazolni az ER stresszválasz és a vírus terjedése közötti kapcsolatot.

A SAT gén plazmidba klónozásával és fogékony sejtekbe transzfektálásával kívántuk megállapítani, hogy a fehérje önmagában, függetlenül más vírusfehérjéktől, milyen hatást vált ki a sejtekben.

Célunk volt, hogy immunfluoreszcens festés és real-time PCR módszerek segítségével vizsgáljuk, hogy a DuCV, a DHAV-1, a GPV és a GHPV vírusok képesek-e replikálódni az AGE1.CR, AGE1.CRpiX vagy az AGE1.CS sejt vonalakon.

Tesztelni akartuk a SAT vizsgálatok már alkalmazott módszert, a magas és alacsony multiplicitású fertőzések kombinált vizsgálatát a replikálódásra képes vírusok ciklusidejének meghatározásához.

Real-time PCR módszer segítségével kívántuk felrajzolni a replikálódásra képes vírusok szaporodási görbét, immunfluoreszcens festés és real-time PCR módszer együttes használatával pedig megállapítani a vírusok fertőzőképességét, olyan módon, hogy meghatározzuk, mennyi vírus szükséges egyetlen sejt sikeres fertőzéséhez a különböző sejt vonalakon.

4. Irodalmi áttekintés

4.1 A sertés parvovírus

A sertés parvovírus, az *Ungulate protoparvovirus 1* fajba, a *Parvoviridae* családba és a *Protoparvovirus* nemzetségébe tartozik. A 20-28 nm átmérőjű, burok nélküli kapszid tartalmazza a nagyjából öt kilobázis méretű, negatív szálú DNS genomot, melynek két végén palindrom szekvenciák találhatók, amelyek fordított ismétlődő végződéseket (inverted terminal repeats) hoznak létre (Bergeron és mtsai., 1993).

A PPV genomban található két fő ORF közül az 5' végi három NS fehérjét kódol, melyek közül az NS1 fehérje helikáz aktivitással rendelkezik, valamint képes aktiválni az apoptózist és a lízist (Rayet és mtsai., 1998; Sol és mtsai., 1999; Daeffler és mtsai., 2003). A 3' végi ORF kódolja a C-terminális részükben megegyező három VP fehérjét (Bergeron és mtsai., 1993). Közülük a VP1 egyedi, N-terminális régiójában található egy, a sikeres fertőzéshez nélkülözhetetlen Ca^{2+} -függő foszfolipáz A2 domén (Zádori és mtsai., 2001).

A nemzetség minden tagjában található továbbá egy rövid, 50-68 aminosav hosszúságú ORF, mely a VP2 fehérje starthelyének közelében kezdődik, és egy alternatív leolvasási kereten átfed a VP fehérjék ORF-jével. Az attenuált NADL-2 törzsnél bizonyították, hogy az ORF-ről egy fehérje fordítódik le (SAT), melynek 21–44. aminosavja egy transzmembrán alfa-hélixet alkot, ami kulcsszerepet játszik a fehérje lokalizációjában (Zádori és mtsai., 2005). A vad típusú SAT a fertőzött sejtek ER membránjában halmozódik fel, míg az alfa-hélix eliminációja vagy mutációja esetén a fehérje lokalizációja nem korlátozódik egyetlen sejtalkotóra, hanem diffúzan megtalálható az egész sejtben. Hiánya esetén szövettanilag „lassú terjedésű” fenotípus alakul ki. A SAT funkciója és a hatása mögött álló molekuláris mechanizmusok jelenleg nem ismertek, a feltételezések szerint ER stresszt vált ki a sejtekben. (Zádori és mtsai., 2005).

Felnőtt kocákban a vírus szaporodási zavarokat okoz, amelynek általános jele a mumifikált magzatok születése, de jelentkezhet terméketlenség, vetélés, korai ellés, ritkábban a gyenge, újszülött állatok elhullása (stillbirth, mummification, embryonic death, infertility: SMEDI) (Johnson és Collings, 1969; Mengeling, 1992). A PPV vertikálisan – feltételezhetően – az anyai makrofágok segítségével jut át a méhlepényen (Paul és mtsai., 1979; Mengeling és mtsai., 2000), míg horizontálisan a fertőzött állatok vizeletével, bélsárral és az ezekkel szennyezett takarmánnyal, vízzel, tárgyakkal terjed (Mengeling és Paul, 1986). A tünetek erős összefüggést mutatnak a magzatok korával. A vemhesség 35. napja előtti fertőződés az embrió halálához és felszívódásához vezet

(Mengeling és mtsai., 1980). Ha a magzatok a vemhesség 35. és 70. napja között, a csontképződés beindulása után fertőződnek meg, akkor mumifikált magzatok jönnek a világra (Mengeling és Cutlip, 1975; Joo és mtsai., 1976). A 70. nap után történt fertőzés esetében a magzatok immunrendszere már elég fejlett, hogy túléljék a betegséget (Joo és mtsai., 1976).

A vírus a magzat és a placenta gyorsan osztódó sejtjeiben replikálódik, ami vérzéseket és ödémát okoz, valamint az érrendszer károsodása miatt vér és nyirok folyadék felhalmozódást a testüregekben (Mengeling, 1992). Az 1980-as években izoláltak egy szélesebb szövettropizmussal rendelkező, erősen patogén PPV törzset (Kresse törzs) (Choi és mtsai., 1987; Oraveerakul és mtsai., 1993), amely nekrotikus léziókat okoz a fertőzött állatok ajkán, nyelvén, orrán és lábán (Kresse és mtsai., 1985).

A PPV fertőzés kimutatására több módszert is kidolgoztak. A vírus hemagglutinációs tulajdonsága miatt a fertőzött állatok savójával hemagglutináció-gátlási próbát lehet végezni (Cartwright és mtsai., 1969; Morimoto és mtsai., 1972). A fertőzött sejtek kimutathatók IF festéssel, vírus specifikus ellenanyagok használatával (Mengeling, 1972). A virális DNS kimutatható PCR alapú technikákkal (Boisvert és mtsai., 2010), a fertőzés tényének megállapításához az ELISA használata is elterjedt (Hohdatsu és mtsai., 1988; Westenbrink és mtsai., 1989; Jenkins, 1992). A PPV jól fenntartható sertés here (porcine testis: PT), sertés vese (porcine kidney: PK) vagy sertés petevezeték eredetű sejtvonalakon. A citopatogén hatások a fertőzést követő 16.-20. órától figyelhetőek meg (Cartwright és mtsai., 1969).

Tekintettel a PPV által okozott súlyos anyagi károkra, a vírus elleni vakcinák fejlesztése már a 70-es években megkezdődött. A kémiai úton inaktivált vakcinák használata eredményesen növelte a vírusellenes ellenanyagok szintjét (Joo és mtsai., 1977; Wrathall és mtsai., 1984), és hatékonyságukat a fertőzési kísérletek is igazolták (Fujisaki és mtsai., 1978). Az élő vakcinák fejlesztésekor az attenuált NADL-2 törzssel végzett intramuszkuláris oltás magasabb ellenanyag szinteket eredményezett, mint az oronazális úton bejuttatott vírus, és nem vezetett a magzatok megfertőződéséhez (Mengeling és Cutlip, 1976; Paul és Mengeling, 1984). A rekombináns DNS technológiával előállított vírusszerű partikulumok hasonló erejű immunválaszt váltanak ki, mint a hagyományos vakcinák, ezért oltóanyagként is használhatók (Martinez és mtsai., 1992).

4.2 Az ER stressz és a selejt fehérje válasz

Az ER számos, külön-külön is fontos sejt folyamatban játszik szerepet. Ilyen a lipid bioszintézis, a Ca^{2+} homeosztázis fenntartása vagy a fehérjék feltekeredésének és poszt-transzlációs módosulásainak szabályozása (Berridge és mtsai., 2000; Walter és

Ron, 2011). Vizsgálatok igazolták, hogy csak a funkcióképes, helyes térszerkezetű fehérjék kerülnek be az ER-ról leváló vezikulumokba és szállítódnak a rendeltetési helyükre, míg a hibásan vagy részlegesen feltekeredett proteinek dajkafehérjékhez kötődve felhalmozódnak az ER csatornahálózatában (Hurtley és mtsai., 1989). Ezt a sejt stresszhatásként érzékeli, amelynek leküzdésére egy evolúciósan rendkívül konzervatív jelátviteli kaszkád alakult ki, amit ER stresszválasznak vagy selejt fehérje válasznak (unfolded protein response: UPR) hívunk.

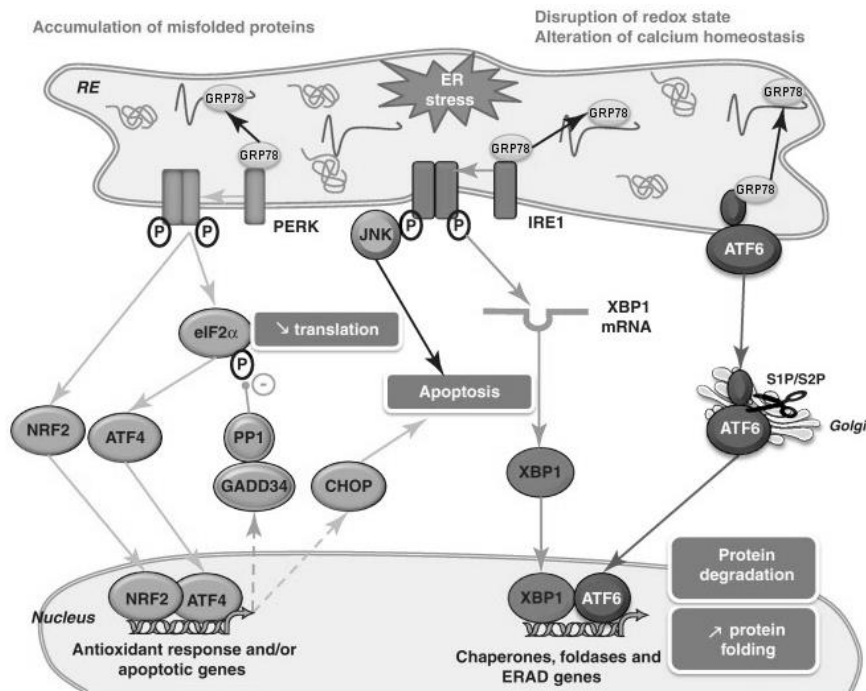
Az UPR-t az ER membránjába ágyazott szenzor fehérjék, az inozitolt igénylő enzim 1 α (inositol-requiring enzyme 1 α : IRE1 α) (Tirasophon és mtsai., 1998; Wang és mtsai., 1998), a kétszálú RNS aktiválta protein kináz-szerű ER kináz (pancreatic endoplasmic reticulum kinase: PERK) (Harding és mtsai., 2000) és az aktiváló transzkripció faktor (activating transcription factor: ATF) 6 (Haze és mtsai., 1999; Shen és mtsai., 2002) szabályozzák. Ezeknek a szenzor fehérjéknek a működését a 78 kDa méretű glükóz-regulált fehérje (78 kDa glucose-regulated protein: GRP78) nevű dajkafehérje gátolja azáltal, hogy hozzákötődik az ER lumenje felé néző (N-terminális) doménjükhöz (Sommer és mtsai., 2002; Fels és Koumenis, 2006; Ron és Hubbard, 2008). Egyensúlyi állapotban a GRP78 kellő mennyiségben áll rendelkezésre ahhoz, hogy a szenzor fehérjéket is blokkolja, és az újonnan szintetizálódott proteinek feltekeredését is szabályozza. A hibásan feltekeredett fehérjék felhalmozódása az ER lumenben azonban az egyensúly megbomlásához vezet. Ilyenkor a GRP78 leválik a szenzor fehérjékről, aminek következtében mind a PERK, mind az IRE1 α homodimereket képez és transz-autofoszforyláció következtében aktiválódik (Liu és mtsai., 2002; Ma és mtsai., 2002), az ATF6 pedig a Golgi-készülékbe vándorol, ahol aktiválódik (Chen és mtsai., 2002) (1. ábra).

Az ATF6-ról Golgi-rezidens proteázok (Golgi-resident site-1 és site-2 protease: S1P és S2P) lehasítják a lokalizációs szignált, így a bázikus leucin-cipzárt tartalmazó transzkripció faktor a citoplazmába, majd a sejtmagba kerül (Haze és mtsai., 1999). Az ATF6 számos olyan gén transzkripcióját serkenti, melyek támogatják az ER stressz leküzdését, együttműködnek a fehérjék feltekerésében, a fehérje szekrécióban vagy az ER-asszociált fehérje lebontásban (ER-associated protein degradation: ERAD) (pl. X-box kötő fehérje 1 (X-box binding protein 1: Xbp1)) (Yoshida és mtsai., 2001; Yamamoto és mtsai., 2007; Healy és mtsai., 2009).

Az aktivált IRE1 α endonukleáz aktivitású doménje kihalásít egy 26 bp hosszúságú szakaszt az Xbp1-et kódoló mRNS-ből (Calfon és mtsai., 2002; Lee és mtsai., 2002). A hasított mRNS-ről leíródó Xbp1 egy transzkripció faktor, amely dajkafehérjéket kódoló, az ERAD-ban, valamint a foszfolipid bioszintézisben (az ER hálózat növekedésében) szerepet játszó gének kifejeződését szabályozza (Sriburi és mtsai., 2004; Yamamoto és

mtsai., 2007). Így, az egyik legfontosabb felelőse a fehérje feltekerő (protein folding) kapacitás növelésének és a normál, homeosztatisz működés visszaállításának (Braakman és Bulleid, 2011; Jäger és mtsai., 2012). Az mRNS hasítás mellett az IRE1 α aktiválja az apoptózisszignál-szabályozott kináz 1-et (apoptosis signal-regulated kinase 1: ASK1) és a c-Jun N-terminális kinázt (c-Jun N-terminal kinase: JNK) (Urano és mtsai., 2000; Nishitoh és mtsai., 2002). A JNK aktivációja, tartósan fennálló ER stressz során, gátolja az antiapoptotikus Bcl-2 fehérjecsalád tagjainak működését, valamint a Bcl-2-asszociált X fehérje (Bcl-2-associated X protein: Bax) és a Bcl-2 homológ antagonist (Bcl-2 homologous antagonist: Bak) fehérjék oligomerizációjához vezet, ami az apoptózis mitokondriális útjának beindítását eredményezi.

Az autofoszforilálódott PERK fő szubsztrátja az eukarióta iniciációs faktor 2 alfa (eukaryotic initiation factor 2 alfa: eIF2 α), amely a foszforilációja után lassítja a sejt fehérjéinek a szintézisét annak érdekében, hogy csökkentse a dajkafehérjék terhelését (Harding és mtsai., 2000). Ezzel együtt viszont néhány protein, köztük az ATF4 transzkripciós faktor termelődését támogatja. Az ATF4 a stresszhatás semlegesítésében szerepet játszó gének indukciója mellett a pro-apoptotikus folyamatokban kulcsszerepet játszó C/EBP homológ fehérje (C/EBP homologous protein: CHOP) génjének kifejeződését is elősegíti (Fels és Koumenis, 2006). A CHOP aktiválja az apoptotikus útvonalakat, de teljes hatását csak abban az esetben fejt ki, ha a stresszválasz nem képes a homeosztázis visszaállítására, és a hibás térszerkezetű fehérjék szintje tartósan magas marad (Nishitoh, 2012; Schönthal, 2012).



1. ábra. A sejt fehérje válasza (Flamment és mtsai., 2012).

4.3 A kacsza hepatitis A vírus 1

A DHAV-1 a *Picornaviridae* család *Avihepatovirus* nemzetségének tagja (Kim és mtsai., 2006; Tseng és mtsai., 2007). Genomja 7600-7800 bp hosszúságú, pozitív szálú RNS (Kim és mtsai., 2006), mely egy nagyjából 30 nm átmérőjű, ikozaéderes szimmetriájú, burok nélküli kapszidba csomagolódik (Richter és mtsai., 1964).

A genom egyetlen ORF-et tartalmaz, az erről keletkező poliproteinből proteolitikus hasítással összesen 12 féle fehérje képződik (Kim és mtsai., 2006; Tseng és mtsai., 2007). A kapszid felépítésében részt vevő három szerkezeti fehérje (VP0, VP1 és VP3) közül a VP1 felelős a fertőzéskor a sejt felszíni receptorokhoz való kötődésért (Li és mtsai., 2017). A 2B és 3A fehérjék membrán-asszociáltak, a 2C fehérje ATPáz motívumokat tartalmaz (Koonin és Dolja, 1993) és feltételezhetően helikáz aktivitása van (Tseng és mtsai., 2007), a 3B a vírus replikációjában vesz részt, a 3C a vírus proteáza, a 3D pedig egy RNS-függő RNS polimeráz (Kim és mtsai., 2006; Tseng és mtsai., 2007). A további három (2A1, 2A2, 2A3) fehérje hatása pontosan nem ismert. A 2A2 egy GTPáz-szerű fehérje, mely apoptózist indukál primer szövettenyészetben (Cao és mtsai., 2017), más picornavírusokban pedig a vírus-gazdasejt kölcsönhatásokat befolyásolja (Hughes és Stanway, 2000).

Bár a DHAV-1 bár a felnőtt állatokat is képes megfertőzni, betegséget csak fiatal kacsákban okoz. A vertikális irányú fertőzésátvitelre nincsenek bizonyítékok (Asplin, 1958), horizontálisan viszont gyorsan terjed: feltehetően a garat, vagy a felsőlégutak területén jut be a szervezetbe (Tóth és Norcross, 1981). A fertőzött állatok mozgása először lelassul, ataxia jelentkezik, majd egy helyben gubbasztanak, a szemüket félig lecsukják. Rövid időn belül az oldalukra dőlnek, a lábuk rángatózik, a fejük görcsösen hátrahajlik. Az elhullás rendkívül gyorsan, a tünetek megjelenése után néhány órával megtörténik. A vírus által okozott morbiditás és mortalitás az egyhetes kornál fiatalabb kacsák között 95%, az 1–3 hetes kor közötti kacsáknál 50% körül alakul, míg 4–5 hetes vagy idősebb korú madaraknál az elhullások száma elhanyagolható. A fertőzést túlélő állatok a fertőzést követő 8 hétig ürítik a vírust (Woolcock, 2008; Okda és mtsai., 2013).

A DHAV-1 fertőzésre jellemző a máj megnagyobbodása, felületén pöttyök, vérzések, véraláfutások, gyulladás figyelhető meg. Felülete gyakran vörösesre színeződik vagy vöröses foltok jelennek meg rajta. A lép időnként megnagyobbodik és foltos, a vese duzzadt és bővérű. Mikroszkóposan a májsejtek elhalása figyelhető meg, a fertőzést túlélő állatoknál jellemző az epevezeték hiperpláziája, illetve a májszövet regenerációja (Fabricant és mtsai., 1957).

Természetes körülmények között a vírus csak tőkés récében (*Anas platyrhynchos*) és házasított fajtáiban okoz betegséget, ugyanakkor mesterségesen több madárfaj fiatal

egyede is fertőzhetőnek bizonyult. A fertőzött pézsmarécénél, galambnál (*Columba livia*) és házi tyúknál (*Gallus gallus domesticus*) a DHAV-1 elhullást nem okoz (Hwang, 1974). Utóbbiak nem csak tünetmentesen hordozzák a vírust, de azt képesek átadni fajtársaiknak is (Asplin, 1961). Alacsony mortalitás figyelhető meg a fertőzött házi pulykánál (*Meleagris gallopavo domesticus*) és fürjeknél (*Coturnix coturnix*) (Hwang, 1974), míg a fácán (*Phasianus colchicus*), a házilúd (*Anser anser*) és a gyöngytyúk (*Numida meleagris*) fertőzésekor magas mortalitási rátát tapasztaltak (Hwang, 1974).

A DHAV-1 elektronmikroszkóp segítségével kimutatható a fertőzött állatok májából (Adamiker, 1969). Elsődleges kacsza embrionális májsejteken szaporítva citopatogén hatásokat, a sejtek lekerekedését, nekrozisát okozza (Woolcock, 1986). A fertőzés igazolható vírus neutralizációs teszttel (Woolcock és mtsai., 1982; Wu és mtsai., 2015) vagy ELISA módszerrel (Zhao és mtsai., 1991). A virális nukleinsav kimutatható hagyományos PCR (Kim és mtsai., 2007; Anchun és mtsai., 2009) vagy real-time PCR technikákkal (Yang és mtsai., 2008). A vírus hagyományosan csirke embriókban (Levine és mtsai., 1950) vagy kacsza embrionális sejteken szaporítható (Golubnichi és mtsai., 1976). A közelmúltban azonban kifejlesztettek egy immortalizált sejtvonalat, amely permisszívnek bizonyult a DHAV-1 fertőzésre (Fu és mtsai., 2012).

Az immunizált tojók anyai ellenanyagai védelmet biztosítanak a fiatal állatoknak életük első két hetében, amelyet egy 7-10 napos korban történő vakcinázással fenn lehet tartani a fogékony életkor végéig (Hanson és Tripathy, 1976).

4.4 A kacsza cirkovírus

A DuCV a *Circoviridae* családba, azon belül a *Circovirus* nemzetségbe tartozik. A burok nélküli, 15-16 nm átmérőjű, ikozaéderes szimmetriájú kapszid tartalmazza az egyszálú, negatív polaritású, nagyjából 2 kilóbázis hosszúságú, cirkuláris DNS-t (Hattermann és mtsai., 2003).

A vírusgenom két fő ORF-et tartalmaz, melyek közül az ORF1 a replikációban szerepet játszó *rep* gént, míg az ORF2 a vírus kapszidját felépítő struktúrfehérje *cap* nevű génjét kódolja. Ezek mellett, az ORF1-gyel komplementer szálon a genom tartalmaz egy harmadik, rövidebb leolvasási keretet. Az erről lefordítódó fehérje képes apoptózist indukálni a fertőzött sejtekben (Xiang és mtsai., 2012). A két fő ORF között intergénikus régiók helyezkednek el. A rövidebb (a *rep* és *cap* gén 5' végei közötti) szakaszon két, 10 bp hosszúságú komplementer szekvencia egy hajtű (stem-loop) struktúrát hoz létre, mely a nukleinsav megsokszorozódásakor replikációs origóként szolgál (Hattermann és mtsai., 2003; Banda és mtsai., 2007). A 3' végek közötti intergénikus szakasz funkciója jelenleg nem ismert, a feltételezések szerint a vírusgenom kapszidba csomagolását szabályozza (Hattermann és mtsai., 2003).

A kis genomméret és a saját polimeráz enzim hiánya miatt a DuCV replikációja erősen függ a gazdasejt enzimeitől. A cirkovírusok a fertőzött sejt magjában szaporodnak, ahol sejtmag zárványokat hoznak létre (Todd és mtsai., 2001). A DuCV fertőzést írtak már le pézsmarécénél, pekingi kacsánál (*Anas platyrhynchos domesticus*) és mulard kacsánál is (Hattermann és mtsai., 2003; Soike és mtsai., 2004).

A DuCV-vel fertőzött állatoknál tollasodási zavar, növekedésbeli visszamaradottság és testsúlyvesztés jelentkezik. A vírus a nyirokszerveket is támadja, így immunszuppresszív hatása is van, ezért a betegség lefolyását más virális vagy bakteriális fertőzések súlyosbíthatják (Soike és mtsai., 2004; Fringuelli és mtsai., 2005). A DuCV-vel fertőzött kacsákban nekrozis, hisztiocitózis, limfocita deplécio figyelhető meg a Fabricius-féle tömlőben. A tolltüszők területén vérzések, gyulladás látható (Soike és mtsai., 2004).

Mivel jelenleg nem áll rendelkezésre olyan sejtvonal, melyen a vírus szaporítható lenne (Woods és mtsai., 2008), ezért a kimutatására elsősorban PCR és real-time PCR alapú technikákat használnak (Fringuelli és mtsai., 2005; Chen és mtsai., 2006; Wan és mtsai., 2011). A vírus ugyanakkor elektronmikroszkóppal kimutatható a Fabricius-féle tömlőből (Soike és mtsai., 2004), valamint az állatok fertőzöttsége ELISA módszer használatával is megállapítható (Liu és mtsai., 2010).

4.5 A liba vérzésemes polyomavírus

A GHPV vagy új nevén a házilúd polyomavírus 1 (*Anser anser polyomavirus 1*) a *Polyomaviridae* család *Gammapolyomavirus* nemzetségébe tartozik (Stoll és mtsai., 1993). A vírus 5,2 kilóbázis hosszúságú, cirkuláris, duplaszálú DNS genomját egy nagyjából 45 nm átmérőjű, burok nélküli kapszid tartalmazza (Guérin és mtsai., 2000; Reimar és Hermann, 2003).

A genomról két mRNS íródik le. Közülük a korai mRNS kódolja a nagyméretű és a kisméretű tumor antigént, amelyek többfunkciós szabályozó fehérjék. A késői mRNS-ről a kapszid felépítésében részt vevő három struktúrfehérje íródik le. Egy további, rövid ORF található még a genomban, amely egy negyedik struktúrfehérje kódolásáért felelős. A két fő mRNS-t kódoló genomszakasz között egy közel 350 bp hosszúságú nem kódoló régió helyezkedik el, amely az mRNS-ek transzkripcióját szabályozó promotereket, illetve a genom replikációjához szükséges szekvenciákat tartalmazza (Reimar és mtsai., 2003).

A GHPV felelős a fiatal libákban előforduló vérzésemes vese- és bélgyulladás kialakulásáért. Horizontálisan a fertőzött állatok ürülékével és az azzal szennyezett tárgyakkal, takarmánnyal terjed. A vírus vertikális terjedésre való képessége pedig még megerősítésre szorul (Bernáth és mtsai., 2006; Guérin, 2008). A vírus az 1–10 hetes

libákat képes megbetegíteni, a mortalitás 5-80% között változik (Palya és mtsai., 2004; Guérin, 2008). A lappangási idő az életkortól függ, egy napos korokban fertőzött libáknál nagyjából egy hét, míg 3 hetes állatoknál akár két hét is lehet (Palya és mtsai., 2004).

A GHPV először feltehetően az érfalak epithél sejteiben replikálódik, ami (az első elváltozásként) arteriolitist okoz (Lacroux és mtsai., 2004; Palya és mtsai., 2004). Az észlelhető klinikai tünetek csak néhány órával az elhullás előtt jelentkeznek. Az állatok egy helyben gubbasztanak, majd rövidesen kómába esnek, és elpusztulnak (Bernáth és mtsai., 2006; Kisary, 1993). Idült kórfejlődés esetén köszvény és sántaság jelentkezik (Miksch és mtsai., 2002). Az elhullott állatoknál bőr alatti ödémák, hasvízkór, a vesék gyulladása, ritkábban vérzéses bélgyulladás figyelhető meg (Lacroux és mtsai., 2004). Utóbbiak együtt járnak a vese tubulusok és a bélrendszer hámsejtjeinek nekrozisával (Lacroux és mtsai., 2004; Palya és mtsai., 2004). A Fabricius-féle tömlőben a fehérvérsejtek pusztulása B-limfocita depléciót okoz (Guérin és mtsai., 2000; Lacroux és mtsai., 2004). A vese működési zavarai miatt a vérben megnövekszik a húgysav koncentrációja (Guérin, 2008), ami nátrium-urát képződéséhez vezet, amely krónikus fertőzés esetén kristályokat alkot és lerakódik az ízületekben (Schettler, 1980).

A vírus szűk szövetotropizmusú, az epithél- és a nyirok sejtek fertőzésére specializálódott (Shah, 1996), ami jól magyarázza a kórfejlődését, illetve előre vetíti a fertőzés immunszuppresszív hatását.

A GHPV fertőzést eddig csak fiatal libáknál (*Anser anser domesticus*) írták le, illetve vadon élő nyári ludaknál. Más víziszárnyasok, így a pézsmaréce is, ellenállóak a betegséggel szemben (Guérin, 2008; Corrand és mtsai., 2011).

A vírus gyors kimutatására rendelkezésre állnak PCR és érzékenyebb real-time PCR alapú módszerek (Guérin és mtsai., 2000; Reimar és Hermann, 2003; Leon és mtsai., 2013). A vírus a fertőzött sejtek magjából IF festéssel, vagy elektronmikroszkóppal kimutatható (Guérin, 2000). A vírusellenes ellenanyagok detektálhatóak ELISA és hemagglutináció-gátlási próbával (Zielonka és mtsai., 2006). A vírus izolálása liba embrionált tojásokon vagy veséből származó elsődleges epithél sejteken történik (Guérin és mtsai., 2000; Bernáth és mtsai., 2006).

Mivel a tünetek megjelenése után a betegség már nem gyógyítható, az anyagi veszteségek elkerülésének egyetlen módja a fertőzés megelőzése, amihez rekombináns alegység vakcina áll rendelkezésre (Mató és mtsai., 2009). A tojók tojásrakási időszak előtti vakcinázásával biztosítható a fiókák védettsége, ami a fiatal állatok oltásával a fertőzésre fogékony életkor végéig fenntartható.

4.6. A liba parvovírus

A GPV a *Parvoviridae* család *Dependoparvovirus* nemzetségének önálló replikációra képes tagja (Brown és mtsai., 1995). A kapszid 20-22 nm átmérőjű, burok nélküli, ikozaéderes szimmetriájú. A GPV genomja nagyjából 5000-5100 bp hosszúságú, egyszálú DNS, melyet egymással identikus, hajtúszerű, fordított, ismétlődő végződés (inverted terminal repeats) fognak közre (Zádori és mtsai., 1995). Az 5' és a 3' vég azonossága miatt a DNS-nek mind a pozitív, mind a negatív szála fertőzőképes, az érett virionokban az arányuk 50-50%.

A genom két nyitott leolvasási keretben legalább hét fehérjét kódol. Az 5' végi ORF legalább három NS fehérjét, amelyek a vírusgenom replikációjában játszanak szerepet, míg a 3' végi ORF három VP fehérjét, amelyek a kapszid felépítésében vesznek részt (Qiu és mtsai., 2005), míg egy, a VP fehérjék ORF-jével átfedő, alternatív leolvasási keret a víruskapszid összeépülését aktiváló fehérjét (assembly-activating protein). A kapszidot nagyjából 50 VP3 fehérje (kb. 60 kDa), valamint 5-5 VP1 és VP2 fehérje (kb. 65 és 81 kDa) építi fel (Zádori és mtsai., 1995).

A vírus nem rendelkezik saját polimeráz enzimmel, így replikációja sejt eredetű fehérjék segítségével megy végbe. Ez részben magyarázza kórtani jellemzőit is: gyorsan osztódó sejtekben való szaporodás (bélhám-, szívizom- és limfoid sejtek), embriókárosító hatás. A sejtekbe receptor közvetített endocitózissal jut be, a sejtmagban szaporodik, és a virion összeépülése is ott történik. A törzsek patogenitásáért felelős genetikai faktorok egyelőre nagyrészt tisztázatlanok, bár korábbi vizsgálatok már bizonyították, hogy ha változás történik a receptor kötőhely aminosav szekvenciájában, az a gazdaspecifitás mellett a patogenitást is befolyásolhatja (Chang és mtsai., 2000).

A vírussal való fertőződés történhet vertikálisan a tojásban, vagy kikeléskor a szennyezett tojáshejtől (Schettler, 1972). A vírusok horizontálisan a szennyezett vízzel és takarmánnyal terjednek. Légzőszervi úton vagy kötőhártyán keresztül történt fertőzésről nincsenek adatok (Kisary, 1993). Szájon át történő fertőzéskor a vírusok először a bélhámsejtekben replikálódnak, majd a vérrel terjednek tovább más szervekbe (lép, máj, vész- és szívizom, stb.). A tünetek súlyossága szoros összefüggést mutat a kórral és a maternális ellenanyagok szintjével. A vírus általában a kikelés utáni első négy hétben okoz tüneteket. Ha az állatok germinatív úton vagy életük első tíz napjában fertőződnek, akkor a mortalitás akár a 100%-ot is elérheti, és a fertőzés után 11-12 nappal tetőzik. A tünetek közé tartozik a csökkent víz- és takarmányfelvétel, étvágytalanság, kóros soványság, levertség, polydipsia és hasmenés (Schettler, 1971b). Ha a madarak kéthetes koruk körül fertőződnek meg, a tünetek kevésbé súlyosak: kötőhártya-gyulladás, orrfolyás, néha a hasüregi folyadék felhalmozódás miatt kitágult,

lógó has jelenik meg. A mortalitás a fertőzés után 10 nappal tetőzik és elérheti a 60%-ot. A fertőzést túlélő állatok növekedése visszamarad, tollasodási zavarok jelentkeznek főleg a nyakon és a háton (Derzsy, 1967; Schettler, 1971b). Kettő-négy hetes kor közötti megfertőződés esetén a mortalitás már csak 25%-os, négy hetes kor után általában nem éri el a 10%-ot. A tünetek között a sántaság, tollasodási zavar, étvágytalanság és a növekedésbeli visszamaradás figyelhető meg (Schettler, 1971b).

A GPV fertőzés akut fázisában jellemző a májgyulladás, szövetelhalás a májkapillárisok körül, valamint Cowdry-A típusú zárványtestek megjelenése a Kupffer-sejtekben. A krónikus fázisban jellemző a bélgyulladás és izomsorvadás. A szív megduzzad, a szívcsúcs lekerekedik, a szívizom elszíneződik. A máj gyulladt, hyperaemiás, a hasüregben fibrines folyadék halmozódik fel. Időnként ödémák és vérzések láthatóak a combizomban. A szájüregi nyálkahártya, a garat és a gége diphtheroid elváltozásokat mutathat (Derzsy, 1967; Nagy és Derzsy, 1968; Schettler, 1971b).

A GPV természetes gazdaállatai a házilúd és a pézsmaréce, de írtak már le fertőzést kanadai lúdnál (*Branta canadensis*) és sarki lúdnál (*Chen caerulescens*) is (Schettler, 1971a). Szerológiai vizsgálatok igazolják, hogy a vadlúdfajok közül a vetési lúd (*Anser fabalis*) és a nagy lilik (*Anser albifrons*) is fogékony lehet a GPV fertőzésre (Hlinak és mtsai., 1998). A tőkés réce és háziásított fajtái viszont nem érzékenyek a vírusra, habár néhány napos korban kacsra tojóshoz adaptált GPV-vel a pekingi kacsra parenterálisan fertőzhető, ennek azonban az állatorvosi gyakorlatban nincs különösebb jelentősége. A házi tyúk és más tyúkfélék, illetve a pézsmaréce és a pekingi kacsra hibridje (mulard kacsra) sem fertőzhető GPV-vel (Derzsy és mtsai., 1970; Schettler, 1971b; Hoekstra és mtsai., 1973).

A fertőzés tényének megállapítására több módszer is létezik. Hagyományos szövettani vizsgálatkor tipikus esetben a mikroszkópos elváltozások (a lymphohistiocytás myocarditis, a szívizom elfajulás és a Cowdry-A magzárványok) együttes megléte utal a betegségre, de rendelkezésre állnak immunológiai módszerek, mint az ELISA (Kardi és Szegletes, 1996), immunfluoreszcens és immunhisztokémiai festés (Schettler, 1973; Roszkowszky és mtsai., 1982; Alexandrov és mtsai., 1999, Takehara és mtsai., 1999), vagy molekuláris biológiai módszerek, mint a PCR (Sirivan és mtsai., 1998; Chang és mtsai., 2000). A vírus izolálás hagyományosan liba embrionális fibroblaszt sejteken történik (Kisary és Derzsy, 1974).

Mivel az érett virionok nagyon ellenállóak a külső környezeti hatásokkal szemben, nehéz és költséges egy állomány GPV mentességét megőrizni, ha pedig egyszer a vírusok megjelentek, akkor a mentesítés gyakorlatilag megoldhatatlan. Az egyetlen módszer, amellyel az anyagi veszteségeket meg lehet előzni, az állomány folyamatos

vakcinázása. Azonban a húsnaposnál fiatalabb állatoknál az aktív immunizálás az immunrendszer fejletlensége miatt nem kellően hatékony (Kisary, 1977). Azt, hogy az állatok ne legyenek védtelenek életük első napjaiban (mikor egyébként is a legfogékonyabbak a betegségre), passzív immunizálással lehet elérni. A tojókból származó ellenanyagok elégséges szikimmunitást biztosítanak, amely nagyjából 3 hetes korig marad fenn, így a kikelt fiókák védettek lesznek életük első heteiben (Kisary, 1993; Kelemen és mtsai., 1997). Az immunizált tojóknál a tojószezon alatt a vírusellenes ellenanyagok szintje fokozatosan csökken, az időszak végén csak a kezdeti érték fele, harmada. Amennyiben a neutralizációs antitestek titere ekkor még 1:50 körül alakul, akkor a maternális ellenanyagok még megfelelő védelmet biztosítanak a fiókáknak (Kelemen és mtsai., 1997).

Az 1980-as, 1990-es évek során leginkább attenuált vakcinákat használtak az aktív immunizáláshoz. Az attenuált GPV törzseket elsődleges lúd és pészmaréce fibroblaszt sejteken, illetve kacsa embriókban állították elő (Kisary és mtsai., 1978; Gough és Spackman, 1982; Takehara és mtsai., 1998; Alexandrov és mtsai., 1999). A rekombináns vakcinák fejlesztése az 1990-es években kezdődött (Kisary és Tóth, 1997).

5. Anyag és módszer

5.1 PPV Kresse fertőző klónok készítése

A vad típusú vírus fertőző klónját (pKresse) a Bergeron és munkatársai által leírt módon hoztuk létre (Bergeron és mtsai., 1996), amihez a PPV Kresse törzset Dr. Peter Tijssen bocsájtotta rendelkezésünkre. A következő lépésben ezt módosítottuk a Zádori és szerzőtársai által korábban publikált módszer szerint (2005). A módosítás során, a pKresse klónban két nukleotidot kicseréltünk a SAT ORF-jében (T-2842→A és T-2845→C). Ezzel egy STOP kodont illesztettünk a leolvasási keretbe, és megváltoztattuk az azt követő metionint kódoló tripletet, amely iniciációs kodonként funkcionálhatott volna (2. ábra). A változtatások a VP fehérjében nem okoztak aminosav cserét. Az így átalakított fertőző klónt pSAT⁻-nak neveztük.

pKresse szekvenciája

```
DNS szekvencia 2820- ATGTGGAACAACACAACCCTATTAATGCAGGCACTGAATTGTCTGCAACAGGAA -2873
+1 ORF (VP1)   V E Q H N P I N A S T E L S A T G
+2 ORF (SAT)  M W N N T T L L M Q A L N C L Q Q E
```

pSAT⁻ szekvenciája

```
DNS szekvencia 2820- ATGTGGAACAACACAACCCTATAAACGCAGGCACTGAATTGTCTGCAACAGGAA -2873
+1 ORF (VP1)   V E Q H N P I N A S T E L S A T G
+2 ORF (SAT)  M W N N T T L STOP T Q A L N C L Q Q E
```

2. ábra. A vad típusú és a SAT⁻ fertőző klón közötti különbség. A szekvencia részlet a SAT fehérje iniciációs kodonjával kezdődik. A módosított nukleotidok és az érintett aminosavak félkövér betűkkel láthatók.

5.2 Sejtkultúrák

Az általunk használt PT sejteket Dr. Peter Tijssen bocsájtotta rendelkezésünkre, míg az AGE1.CR, AGE1.CRpIX és AGE1.CS sejtek (Jordan és mtsai., 2009) Dr. Ingo Jordan laboratóriumából származtak. Valamennyi sejtvonalat (PT, CR, CS és CRpIX) 75 cm²-es sejtenyészítő flaskában tenyésztettük. Az alkalmazott tápfolyadék DMEM (4,5 g/l glükózt és L-glutamint tartalmaz) (Lonza, Bázél, Svájc) alapú volt, amely 10% FBS-t (PAA, Cölbe, Németország), 1% penicillin-sztreptomycin oldatot (PAA, Cölbe, Németország) és 1% nátrium-piruvát oldatot (Lonza, Bázél, Svájc) tartalmazott. A sejteket 37 °C-on, 5%-os CO₂ szint mellett tartottuk fenn. A fertőzésekhez mindig 50%-os konfluenciájú sejtkultúrát használtunk.

5.3 Szervminták és kezelésük

A szervhomogenizátumokat a Dr. Bálint Ádámtól kapott szervmintákból hoztuk létre. A DuCV és a DHAV-1 minta fertőzött kacska lépéből, illetve májából származott, a GPV és a GHPV mintákat fertőzött, fiatal libák májából, illetve veséjéből izoláltuk. Az állatok különböző magyarországi tenyészetekből származtak, és mind természetes úton fertőződtek meg. A kórokozók azonosítását az említett szervek felhasználásával a Nemzeti Élelmiszerlánc Biztonsági Hivatal Állatorvosi Diagnosztikai Igazgatóságánál végezték PCR és RT-PCR módszerekkel.

Első lépésben a szervmintákat dörzsmozsár segítségével homogenizáltuk, majd 5 percig 10.000 RPM fordulatszámon centrifugáltuk. A felülúszókat 0,22 µm-es szűrőn átszűrtük, és tápfolyadékkal 3×-os, 10×-es, 30×-os és 100×-os hígításokat készítettünk belőlük, hogy a sejtek számára esetlegesen toxikus hatásokat kiküszöböljük.

5.4 Fertőzések víziszárnyas vírusokkal

Az AGE1 sejtvonalak permisszivitásának meghatározásához a 3×-osra, 10×-esre, 30×-osra és 100×-osra hígított szervhomogenizátumokból 100-100 µl-t mértünk át 24-vájatú sejtenyészítő lemezre lerakott, nagyjából 50%-os konfluenciájú (~1×10⁵ db sejt/vájat) CR, CS és CRpIX sejtekre. A fertőzés után 72 órával a fertőzött sejtek felülúszójából 100 µl-t átmértünk frissen lerakott sejtekre. Ezt a lépést tíz alkalommal megismételtük, így az eredeti szervhomogenizátumokhoz képest a vírusok mennyisége legkevesebb 3×10¹¹ szeresre hígult.

5.5 PPV Kresse törzstenyészetek létrehozása és titrálása

A vad típusú és a mutáns PPV Kresse törzstenyészetek előállításához a pKresse és a pSAT⁻ plazmidokat 75 cm²-es sejtenyészítő flaskában lévő, 50%-os konfluenciájú (~4×10⁶ db sejt) PT sejtekbe transzfektáltuk. A transzfekcióhoz TurboFect Transfection Reagent-et (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) használtunk, a gyártó utasításait betartva. 120 órával a transzfekciót követően 500 µl felülúszóval, 75 cm²-es flaskára letett, 50%-os konfluenciájú PT sejtenyészetet fertőztünk.

További 120 óra elteltével a vírustartalmú felülúszót eltávolítottuk a sejtekről, tízes léptékű hígítási sort készítettünk belőle, majd 50%-os konfluenciájú, 96-vájatú sejtenyészítő lemezen lévő PT sejteket fertőztünk vele (~2,5×10⁴ db sejt/vájat). A fertőzött sejtek számát 20 órával később, IF festés alkalmazásával állapítottuk meg, majd a legmagasabb hígítási foknak és a fertőzött sejtek számának ismeretében meghatároztuk a törzstenyészetek fertőző titerét.

5.6 A PPV Kresse vírustörzsek terjedésének összehasonlítása

24-vájatú sejtenyészítő lemezre lerakott, 50%-os konfluenciájú ($\sim 1 \times 10^5$ db sejt/vájat) PT sejteket fertőztünk alacsony multiplicitással (MOI: 0,01). Két órával később a felülúszót lecseréltük, majd a sejteket 3%-os formaldehiddel, 2 óránként fixáltuk. Az első fertőzött sejtek és a másodlagos fertőzésekre utaló fluoreszcens fókuszok megjelenését, valamint a fókuszok növekedését IF festéssel követtük nyomon.

Azért, hogy igazoljuk, hogy a megjelenő fluoreszcens fókuszok másodlagos fertőzésekből származnak, nem pedig olyan fertőzött sejtek, melyek később léptek be a sejtosztódás S-fázisába, és így később kezdődött bennük a vírus életciklusa, tápfolyadékban 20×-osra hígított 3C9 (CRL-17, ATCC) monoklonális, kapszid-specifikus ellenanyaggal inkubáltuk őket a fertőzés utáni 4. órától. Ezzel megakadályoztuk a sejtek újrafertőződését és a fluoreszcens fókuszok képződését. A 20×-os hígítást egy előkísérlet segítségével határoztuk meg, ahol a fertőzés előtt 1 óráig inkubáltuk a vírus tartalmú felülúszókat különböző hígítású ellenanyaggal, illetve kontrollként kezeletlen vírussal fertőztük a sejteket. A 20×-os hígítás volt a legnagyobb, amely képes volt teljesen blokkolni a fertőzést.

5.7 Immunfluoreszcens festés

A 24-vájatú lemezen lévő sejteket szobahőmérsékleten, 300 μ l, 3%-os formaldehiddel fixáltuk. 30 perc inkubálás után a formaldehidet eltávolítottuk, majd kétszer átmostuk a sejteket 500 μ l IF pufferrel (1,5 g BSA, 30 ml 10x PBS desztillált vízzel feltöltve 300 ml-re). Ezt követően 15 percig, 300 μ l, 1%-os Triton X-100-zal kezeltük a mintákat. A Triton X-100 eltávolítása és újabb kétszeri mosás után a sejteket 200 μ l, PBS-ben 5%-osra hígított, inaktivált lószérumban, 30 percig, szobahőmérsékleten inkubáltuk. A lószérum leszívása és kétszeri mosás után a sejteket 1 órán át, szobahőmérsékleten, IF pufferrel 40×-esre hígított, 3C9 PPV kapszid-specifikus egérellenanyag oldatban valamint víziszárnyas vírus specifikus savóban (1. táblázat) inkubáltuk, melyeket Dr. Bálint Ádám bocsátott rendelkezésünkre (megfelelő, DuCV specifikus savó nem volt elérhető). Az ellenanyagok eltávolítása és kétszeri mosás után 200 μ l, IF pufferrel 500-szorosra hígított CF568 kecske anti-egér IgG-t (H+L) (Biotium, Fremont, USA) vagy 60-szorosra hígított FITC-cel jelölt anti-kacsa másodlagos ellenanyagot (Nordic MUBio, Susteren, Hollandia) (amely keresztreakciót mutatott a liba ellenanyagokkal) mértünk a vájatokba, a sejtmagokat pedig 1 μ g/ml koncentrációjú Hoechst 33342 reagens segítségével láthatóvá tettük. A sejteket sötétben, szobahőmérsékleten, 1 órán át inkubáltuk. A feleslegben jelen lévő – nem kötődő – ellenanyagokat ismételt mosással távolítottuk el. A kiértékeléshez Axio Observer D1

(Zeiss, Oberkochen, Németország) típusú inverz fluoreszcens mikroszkópot használtunk.

1. táblázat. Az alkalmazott vírus specifikus savók hígításai.

Vírus	Ellenanyag típusa	Sejtvonal		
		CR	CR.pIX	CS
DHAV-1	DHAV-1 + kacsa szérum;	1:300	1:300	1:300
	anti-kacsa ellenanyag	1:60	1:60	1:60
GPV	GPV + liba szérum;	1:100	1:100	1:100
	anti-kacsa ellenanyag	1:60	1:60	1:60
GHPV	GHPV+ liba szérum;	1:100	1:100	1:100
	anti-kacsa ellenanyag	1:60	1:60	1:60

5.8 Real-time PCR

A víziszárnyas vírusok kimutatásához használt reakció során alkalmazott primerek (2. táblázat) közül a DuCV specifikus primereket Dr. Dán Ádám, a Nemzeti Élelmiszerlánc Biztonsági Hivatal Állatorvosi Diagnosztikai Igazgatóságának munkatársa tervezte az AY228555.1-es azonosító számú szekvencia alapján. A többi primer tervezéséhez génbankban található szekvenciákat használtunk fel. A GPV-hez az NC_0017001.1-es, a GHPV-hez a HQ681902.1-es, míg a DHAV-1 esetén az NC_008250.1-es azonosító számú szekvenciát vettük alapul.

2. táblázat. Víziszárnyas vírusok kimutatására felhasznált primerek.

Vírus	Szekvencia	Pozíció	Méret	Gén
DuCV	5'-CAC CCT TAA TAA CCC TAC CTT TG-3'	90-112	245 bp	rep
	5'-GAC TCT TTG GCG CAA TAT TCT TC-3'	313-335		
GHPV	5'-TTA GCC AGG CAG TGA CTG TT-3'	2120-2139	362 bp	VP1
	5'-TAG CAT CCT TCA GAG GTG GT-3'	2463-2482		
GPV	5'-GGC TTT GTA CTT CCT GGC TAT AAG TAT-3'	2592-2618	508 bp	VP1-2
	5'-GAG GCA TTA CCC ACT CCA TCG-3'	3080-3100		
DHAV-1	5'-CAT TAT GGT GTG CAG TGT GG-3'	3405-3424	418 bp	2A3-2B
	5'-ACA CGG ACA ACT TCA TTT TCC-3'	3803-3823		

A PPV genom kópiaszámának meghatározásához használt reakció oldat 18,25 µl desztillált vizet, 2,5 µl DreamTaq puffert (Thermo Scientific, Waltham, USA), 0,5 µl dNTP keveréket (2 mM) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), 1 µl forward primert (5'-CTT TAG CCT TGG AGC CGT GGA-3'), 1 µl reverse primert (5'-AAC TAC CCT TAC CTC TTG CTC TT-3') (20 pmol/µl) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), 1 µl tisztított vírus DNS-t, 0,5 µl DreamTaq DNS polimerázt (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) és 1,25 µl 20× EvaGreen™ Dye-t (Biotium, Fremont, USA) tartalmazott.

A reakció 5 perces, 95 °C-os elődenaturációs lépéssel kezdődött, amit 40 ismétlődő ciklus követett. A ciklus első lépése 95 °C-os, 30 mp-es denaturáció volt. Ezt követte az 58 °C-os, szintén 30 mp hosszúságú lépés, amely a primer kötődés szakasza. A harmadik, 72 °C-os, 50 mp hosszúságú lépésben szintetizálódott az új DNS szál. A 40. ciklus után 72 °C-os, 5 perc hosszúságú, végső szintetizáló lépés következett.

A víziszárnyas vírusok kimutatásához használt reakció oldat a DNS vírusok esetén 18,25 µl desztillált vízből, 2,5 µl Dream Taq pufferből (Thermo Scientific, Waltham, USA), 0,5 µl dNTP keverékből (2 mM) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), 1-1 µl forward és reverz primerből (40 pmol/µl) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), 1 µl tisztított vírus DNS-ből, 0,5 µl DreamTaq DNS polimerázból (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) és 1,25 µl 20× EvaGreen™ Dye-ből (Biotium, Fremont, USA) állt.

A DHAV-1 vizsgálatához RT-PCR-t alkalmaztunk, amelynél a reakció oldat 10,75 µl RNáz mentes desztillált vizet (Qiagen, Venlo, Hollandia), 4 µl 5× OneStep RT-PCR puffert (Qiagen, Venlo, Hollandia) 0,8 µl dNTP keveréket (10 mM) (Qiagen, Venlo, Hollandia), 0,8-0,8 µl forward és reverz primert (50pmol/ µl), 0,8 µl tisztított vírus RNS-t, 0,8 µl OneStep RT-PCR Enzim mixet (Qiagen, Venlo, Hollandia) és 1 µl 20× EvaGreen™ Dye-t (Biotium, Fremont, USA) tartalmazott. A hőmérsékleti kondíciókat a 3. táblázat tartalmazza.

3. táblázat. A PCR kísérletek hőmérsékleti kondíciói.

	DuCV		GPV		GHPV		DHAV-1		ismétlés
reverz transzkripció	-	-	-	-	-	-	50 °C	30 perc	1
elődenaturáció	95 °C	5 perc	95 °C	3 perc	95 °C	3 perc	95 °C	15 perc	1
denaturáció	95 °C	30 mp	95 °C	30 mp	95 °C	30 mp	95 °C	1 perc	40
primer kötődés	50 °C	30 mp	55 °C	30 mp	53 °C	30 mp	53 °C	1 perc	
DNS szintézis	72 °C	1 perc	72 °C	45 mp	72 °C	45 mp	72 °C	1 perc	
befejező fázis	72 °C	3 perc	72 °C	3 perc	72 °C	3 perc	72 °C	10 perc	1

A reakciókat StepOnePlus™ Real-Time PCR típusú real-time PCR gépben (Applied Biosystem, Waltham, USA) végeztük. A készülék a reakció után megállapítja a keletkezett termékek olvadási hőmérsékletét. Az eredményeket csak akkor fogadtuk el, ha az olvadási görbe nem mutatott aspecifikus termékeket.

A vírusok mennyiségének meghatározásához ismert kópiaszámú mintából, tízes léptékű hígítással sztenderd sort készítettünk. Az ismert kópiaszámú minta előállításához a fentiekhez hasonló PCR-t állítottunk össze, azzal a különbséggel, hogy a reakció oldatból a 20× EvaGreen™ Dye-t (Biotium, Fremont, USA) kihagytuk, és helyette desztillált vizet mértünk a csövekbe. Templátként a pKresse fertőző klónt (a PPV kísérletekben) vagy a szervhomogenizátumokból tisztított vírus nukleinsavat (a víziszárnyas vírusok vizsgálatakor) használtuk. A PCR termékeket agaróz gélen elválasztottuk, majd a DNS-t NucleoSpin® PCR Clean-up Gel Extraction Kit (Macherey-Nagel, Düren, Németország) segítségével kitisztítottuk. A DNS minták koncentrációját NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) típusú spektrofotométerrel mértük, majd a PCR termékek hosszának ismeretében kiszámoltuk a mintákban lévő vírusfragmentumok kópiaszámát, amihez egy interneten elérhető kalkulátort használtunk fel (<http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>).

A real-time PCR kiértékelésekor a StepOne™ 2.2.2 vezérlőszoftver automatikusan regressziós egyenest illeszt a sztenderd sor pontjaira. A kópiaszámok meghatározását minden mintán legalább háromszor elvégeztük, és csak akkor fogadtuk el az eredményeket, ha a determinációs együttható értéke 0,95-nél nagyobb volt.

5.9 Szaporodási görbe meghatározása

A PPV kópiaszámok változásának követéséhez 24-vájatú sejtenyészítő lemezen lévő PT sejteket fertőztünk (4 párhuzamos fertőzés) a vad típusú és a SAT⁻ mutáns vírussal magas és alacsony multiplicitással (MOI: 0,01 és 3). A felülúszókból 0 és 96 h között mintát vettünk, melyből a virális DNS-t High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche, Bazel, Svájc) segítségével tisztítottuk ki a gyártó utasításai szerint. Az így nyert DNS minták kópiaszámát real-time PCR módszer alkalmazásával állapítottuk meg (lásd fentebb).

Azért, hogy a PPV Kresse törzs szaporodási görbéjéből származó eredményeket össze tudjuk vetni az NADL-2 törzsnél kapott korábbi eredményekkel (Zádori és mtsai., 2005), az alacsony multiplicitású fertőzésből származó felülúszók fertőző titerét is meghatároztuk (a fentebb ismertetett módon). A magas multiplicitású fertőzés felülúszóit DNáz kezelésnek is alávetettük, hogy össze tudjuk hasonlítani a kapszidba csomagolt, érett virionok számát és a halott sejtekből kiszabaduló maradék, szabad, DNáz szenzitív, virális DNS mennyiségét a vad típusú és a SAT⁻ vírusfertőzés között.

A DNáz kezeléskor 200 µl vírusos felülúszókhoz hozzáadtunk 20 µl 10× DNáz puffert (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) mely már tartalmazott 25mM MgCl₂-t, valamint 4 µl 50 U/µl bovine pancreatic DNase I-et (Roche, Bázél, Svájc). A mintákat 90 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten, majd a vírus DNS-t High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche, Bázél, Svájc) használatával kitisztítottuk. A kezelt DNS minták kópiaszámát szintén real-time PCR segítségével határoztuk meg.

A DuCV, DHAV-1, GHPV és GPV izolátumokkal (amelyek pozitívak lettek a PCR vizsgálatok során) 24-vájatú sejttenyésztő lemezre lerakott, CR, CS és CRpIX sejteket fertőztünk alacsony multiplicitással (MOI: 0,01). Két óra elteltével lecseréltük a sejteken a tápfolyadékot. A felülúszókból a fertőzés utáni 4., 24., 48. és 72. órában mintát vettünk, amelyekből a már ismertetett módon kivontuk a virális nukleinsavat. A vírusok mennyiségének változását a felülúszóban real-time PCR segítségével követtük nyomon.

5.10 Apoptózis és életképesség vizsgálat PPV-vel fertőzött sejteken

Az apoptotikus és a lizált sejtek számának a különböző vírustörzsekkel történt fertőzések közötti összehasonlításához 24-vájatú sejttenyésztő lemezen fertőztük a sejteket, magas multiplicitással (MOI: 3). A fertőzés után a sejteket különböző időpontokban (0, 18, 24, 28, 36, 42, 48, 64, 72, 88 óra), sötétben inkubáltuk, 1 µg/ml koncentrációjú Hoechst 33342 reagens és 0,25 µg/ml koncentrációjú propídium-jodid (PI) oldatban, 1 órán keresztül, szobahőmérsékleten. Minden időpontban legalább három-három fertőzött vájatot vizsgáltunk, amelyekben a sejteket előzőleg nem fixáltuk, és a membránjukat nem tártuk fel, illetve kontroll vizsgálatként három, nem fertőzött sejteket tartalmazó vájatot is bevontunk az elemzésbe. Az inkubáció végeztével a sejteket kétszer átmostuk 500 µl PBS-sel, majd a vájatokról Axio Observer D1 (Zeiss, Oberkochen, Németország) típusú inverz fluoreszcens mikroszkóppal fotókat készítettünk. Egy időpontról átlagosan 4-6 felvétel készült, melyeken leszámoltuk a propídium-joddal festődő, tehát sérült membránú sejteket, az apoptotikus sejtmagokat és az összsejtszámot.

Apoptotikus sejtmagnak a Hoechst-reagenssel erősen festődő, kondenzált, vagy fragmentálódott magokat tekintettük, melyekben a pyknotikus magok mérete nagyjából 1-4 µm között volt (Hristov és mtsai., 2004). Minden időpontnál legalább 1000 darab sejtet számoltunk le, amihez legalább 4 darab fényképre volt szükség. Ez alól csak a fertőzés késői szakasza volt kivétel, ahol a vájatok aljára rögzült sejtek száma (mint életképességi indikátor) már nem érte el a kezdeti érték 20%-át. A számolást két személy végezte, egymástól függetlenül. Az eredményeket átlagoltuk, és Mann-Whitney

U-teszt alkalmazásával hasonlítottuk össze. Az volt a nullhipotézisünk, hogy a két minta azonos populációból származik.

A sejtlízis mértékének meghatározásához a sejtekről leszívott tápfolyadékban meghatároztuk a laktát-dehidrogenáz enzim (LDH) aktivitását is (Korzeniewski és Callewaert, 1983; Legrand és mtsai., 1992; Georgen és mtsai., 1993). Ehhez a Roche cég (Bázel, Svájc) által forgalmazott Cytotoxicity Detection Kitet használtuk a gyártó utasításait követve. Az abszorbanciákat 480 nm-es hullámhosszon mértük ELx800 ELISA plate reader (Dialab GMBH., Ausztria) műszer segítségével. A tápfolyadék háttérének meghatározásához megmértük a tiszta, sejtmentes médium abszorbanciáját is. Az így kapott értéket levontuk a felülúszók mérésekor kapott abszorbancia értékekből.

5.11 Az ER morfológiai változásának és az ER stresszválasz fehérjéinek detektálása PPV-vel fertőzött sejtekben

A 3-as multiplicitással fertőzött sejteket a fertőzést követő 12-72 óra között immunfluoreszcens festéssel vizsgáltuk. A korábban ismertetett módszeren annyit változtattunk, hogy az ER láthatóvá tételére használható kalretikulin (Michalak és mtsai., 1999) detektálásához elsődleges ellenanyagként 200x-osra hígított egér anti-kalretikulin ellenanyagot, míg az ER stressz markerként használható CHOP vagy Xbp1 fehérjék (Samali és mtsai., 2010) kimutatásához 500x-osra hígított egér anti-CHOP (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) vagy 300x-osra hígított nyúl anti-Xbp1 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA) ellenanyagokat használtunk. Mivel a vírus kimutatására használt kapszid-specifikus ellenanyagunk is egér eredetű volt, ezért a fertőzött sejteket PPV-vel fertőzött sertés savójával mutattuk ki, amelyet Dr. Bálint Ádám, a Nemzeti Élelmiszerlánc Biztonsági Hivatal Állatorvosi Diagnosztikai Igazgatóságának munkatársa bocsájtott rendelkezésünkre. Másodlagos ellenanyagként 500x-os hígítású CF586 anti-egér vagy 300x-os hígítású CF488a anti-nyúl és 1000x-es hígítású CF586 anti-sertés ellenanyagokat használtunk (Biotium, Fremont, USA).

5.12 ER stressz kiváltása PPV-vel fertőzött sejtekben

24-vájatú sejttenyésztő lemezen fertőztük a sejteket vad típusú és SAT⁻ mutáns vírussal alacsony és magas multiplicitással (MOI: 0,01 és 3). A fertőzött sejteket a fertőzést követően különböző időintervallumokban ER stressz kiváltására képes kémiai anyagokkal (MG132, thapsigargin, dithiotreitol (DDT)) kezeltük (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Az alkalmazott koncentrációkat úgy állítottuk be, hogy mindegyik aktiválja az ER stresszválasz fehérjéit (amit 12 órával a kezeléseket után IF festéssel ellenőriztünk), de a vizsgálati időn belül még ne legyen letális a sejtek számára. A

vegyszereket tápfolyadékban hígítottuk, az inkubáció 37 °C-on, 5%-os CO₂ szint mellett történt.

A 20 µM végkoncentrációjú MG132 és 10 mM végkoncentrációjú DTT kezelést a fertőzést követő 0-5., 3-8., 5-10., 7-12. órában végeztük, míg a 10 µM-os thapsigargin kezelést a fertőzés utáni 2-4., 4-6., 6-8. órában. Az inkubáció végén a sejteket kétszer átmostuk 500 µl PBS-sel, 1 ml friss tápfolyadékot mértünk rájuk, és visszatettük az inkubátorba. Az alacsony multiplicitással fertőzött sejteket a fertőzés utáni 20. órában fixáltuk és (a fentebb ismertetett módon) IF festéssel detektáltuk a másodlagos fertőzésekre utaló fluoreszcens fókuszokat. A magas multiplicitású fertőzésnél a fertőzés 24. órájában leszívtuk a sejtekről a tápfolyadékot, amelyből a korábban leírt módon kitisztítottuk a virális DNS-t. A kópiaszámokat real-time PCR segítségével állapítottuk meg (lásd fentebb), valamint a már ismertetett módon meghatároztuk a felülúszókban a vírusok fertőző titerét is.

5.13 UV-fénnyel kiváltott stressz

A magas multiplicitással fertőzött sejteket (MOI: 3) a fertőzés 0., 3., 9. és 12. órájában, 5 percen keresztül sugároztuk UV-C fénnel, melyhez a sejtektől 50 cm távolságra elhelyezett, 30 W teljesítményű UV-lámpát használtunk. Előzőleg immunfluoreszcens festés segítségével megbizonyosodtunk róla, hogy a kezelés nem aktiválja az ER stresszválasz fehérjéit. A felülúszókat itt is a 24. órában gyűjtöttük össze a sejtekről, és a már említett módon meghatároztuk bennük a vírusok kópiaszámát és fertőző titerét.

5.14 A SAT-DsRed és a CHOP-DsRed fúziós konstrukciók előállítása

A Ds-Reddel jelölt SAT és CHOP fúziós konstrukciókat a DsRed-Monomer-N1 plazmid (Clontech, Mountain View, USA) módosításával állítottuk elő, amelyhez a SAT és a CHOP gént tartalmazó DNS fragmenteket PCR során amplifikáltuk. Ehhez a PPV-SATf (5'-GC GGTACC ATG TGG AAC AAC ACA ACC CTA-3'), a PPV-SATr (5'-CG GGTACC TT GAT GTA TGA GTC TTG ATG CGT-3'), a F-CHOP-DsRed (5'-GC AAGCTT ATG GCA GCT GAG TCA TTG CCT-3') és a R-CHOP-DsRed (5'-GC GGATCC CG TGC TTG GTG CAG ATT AAC CAT-3') primereket használtuk. A templát a SAT gén esetében a pKresse fertőző klón volt. A CHOP esetében a fertőzött PT sejtekből először RNS-t tisztítottunk RiboZol (Amresco, Solon, USA) alkalmazásával, majd reverz transzkripcióval, Superscript III enzim (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) és az R-CHOP-DsRed primer felhasználásával cDNS-t állítottunk elő, mindkét esetben betartva a gyártó utasításait.

A reakció oldat 17,25 µl desztillált vizet, 5 µl 5× puffert (Thermo Scientific, Waltham, USA), 0,5 µl dNTP keveréket (2 mM) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), 0,5 µl forward primert, 0,5 µl reverse primert (40 pmol/µl) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), 1 µl templát DNS-t vagy cDNS-t és 0,25 µl Phusion Hot Start DNS polimerázt (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) tartalmazott.

A reakció 5 perces 95 °C-os elődenaturációs lépéssel kezdődött, majd egy 40-szer ismétlődő ciklus következett, aminek első lépése 95 °C-os, 30 mp hosszúságú denaturáció volt. Ezt követte a SAT gén esetében egy 58 °C-os, míg a CHOP gén amplifikációjakor egy 59 °C-os, szintén 30 mp-es szakasz. Végül a harmadik, 72 °C-os, 1 perc hosszúságú lépésben szintetizálódott az új DNS szál. A 40. ciklust egy 5 perc hosszúságú, 72 °C-os végső szintetizáló lépés követte.

A PCR termékeket agaróz gélen elválasztottuk, majd a DNS-t NucleoSpin® PCR Clean-up Gel Extraction Kit (Macherey-Nagel, Düren, Németország) segítségével, a gyártó utasítási szerint kitisztítottuk. Az izolált fragmenteket és a DsRed-Monomer-N1 plazmidot KpnI vagy HindIII és BamHI (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) restrikciós endonukleázokkal emésztettük, majd T4 ligáz (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) felhasználásával, a gyártó által javasolt módon, a komplementer végződésű fragmenteket összeillesztettük.

5.15 A plazmidok transzformálása, ellenőrzése és tisztítása

Kémiaileg kompetenssé tett DH5α sejteket 5-10 perc alatt jégen kiolvasztottunk, majd 50 µl kompetens sejthez 1 µl, a fentiek szerint elkészített ligátumot mértünk. Elkeverés után 30 percig jégen tartottuk a mintákat, majd következett egy 90 mp hosszúságú, 42 °C-os inkubáció. A hősokk után 750 µl antibiotikum-mentes folyékony LB tápoldatot adtunk a sejtekhez, 45 percig inkubáltuk őket 37 °C-on, majd 1 percig, 6000 RPM fordulatszámon és 4 °C-on centrifugáltuk őket. A felesleges tápoldatot eltávolítottuk a csövekből úgy, hogy nagyjából 100 µl maradjon, amelyben felfuszpendáltuk a sejteket, majd kanamicin tartalmú szilárd LB táptalajra szélesztettük. Egy éjszakán át tartó 37 °C-os inkubáció után a telepeket steril pipettahegy segítségével folyékony LB tápoldatba helyeztük, és egy újabb éjszakán át inkubáltuk 37 °C-on, 200 RPM fordulatszámon.

A baktériumos tápoldatból 1,5-1,5 ml-t eppendorf csövekbe mértünk, majd a mintákat 1 percig, 6000 RPM fordulatszámon, 4 °C-on centrifugáltuk. A csövekből eltávolítottuk a tápoldatot, majd a baktériumokat 200 µl izotóniás oldatban (50 mM glükóz, 25 mM Tris [pH: 8], 10 mM EDTA [pH:8]) felfuszpendáltuk. A szuszpenziókhöz hozzáadtunk 200 µl-t lizáló oldatot (1% SDS, 0,2 M-os NaOH, steril DV-ben feloldva), a mintákat óvatosan elkevertük, majd a csövekbe mértünk újabb 200 µl-t a harmadik

oldatból (3 M-os kálium-acetát, 11,5% ecetsav, steril DV-ben hígítva), és keverés után 10 percig, jégen állni hagytuk. Az inkubálás után a csöveket 5 percig, 13000 RPM fordulatszám mellett, 4 °C-on centrifugáltuk, majd a felülúszókat átmértük új eppendorf csövekbe. A mintákhoz 450 µl izopropanolt adtunk, és óvatos elkeverés után, szobahőmérsékleten, 5 percig állni hagytuk őket, majd újra 5 percig, 13000 RPM fordulatszámon, 4 °C-on centrifugáltuk őket. A felülúszókat eltávolítottuk, a kicsapódott DNS-t 500 µl, 70%-os etanollal mostuk. Egy utolsó, 1 perc hosszú, 13000 RPM fordulatszámú, 4 °C-on történt centrifugálás után a felülúszókat eltávolítottuk, és hagytuk a mintákat kiszáradni. A DNS-t 50 µl RNázos 0,5× TE-ben vettük fel.

Annak ellenőrzésére, hogy a plazmid valóban tartalmazza az inszert DNS-t, a tisztított plazmidot a klónozáshoz használt hasító enzimekkel emésztettük, majd a keletkezett termékek méretét agaróz gélelektroforézis segítségével ellenőriztük.

Amennyiben a termékek mérete megfelelő volt, a megmaradt baktériumos tápoldatot (starter tenyészetnek használva) átmértük 100 ml folyékony LB tápoldatba és 37 °C-on, egy éjszakán át, 200 RPM fordulatszámon rázattuk. A plazmid DNS tisztításához a Geneaid™ Midi Plasmid Kitet használtuk (Geneaid Biotech Ltd., Új-Tajpej, Tajvan), betartva a gyártó utasításait.

5.16 A SAT- és a CHOP-DsRed plazmidok transzfekciója

A SAT-DsRed plazmidot PT sejtekbe transzfektáltuk TurboFect transzfekciós reagens (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) segítségével, követve a gyártó utasításait. A transzfekció után különböző időpontokban (16 és 48 óra között 4 óránként) fixáltuk a sejteket és IF festés segítségével vizsgáltuk a CHOP és az Xbp1 fehérjék aktiválódását, valamint az ER-ban bekövetkező morfológiai változásokat. A kísérleten annyit változtattunk a fentiekben leírtakhoz képest, hogy a CHOP és a kalretikulin kimutatásához használt másodlagos ellenanyagunk ezúttal egy CF488a anti-egér ellenanyag (Biotium, Fremont, USA) volt.

Annak érdekében, hogy a vírusfertőzés hatását a CHOP sejten belüli lokalizációjára megvizsgálhassuk, a CHOP-DsRed plazmidot kotranszfektáltuk a pKresse és a pSAT⁻ fertőző klónokkal. Ehhez szintén TurboFect transzfekciós reagenst (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) használtunk, de a gyártó által javasolt protokollon a következők szerint változtattunk:

1 µg fertőző klón és 1 µg plazmid DNS-t felhígítottunk 10 µl MQ tisztaságú vízben, majd 90 µl DMEM médiumot és 3 µl TurboFect reagenst adtunk hozzá. Alapos elkeverés után a transzfekciós keveréket 20 percig, szobahőmérsékleten állni hagytuk. Az inkubáció után hozzáadtuk 1 ml tápfolyadékban szuszpendált PT sejthez (nagyjából $1,6 \times 10^5$ darab sejt), és billenőpadon, gyengéden rázattuk. Három óra elteltével a

csöveket 3600 RPM fordulatszámon, 2 percig centrifugáltuk, leszívtuk a felülúszókat, 1 ml friss tápfolyadékban felszuszpendáltuk a sejteket, és a továbbiakban 24-vájatú sejttenyésztő lemezen tartottuk őket. A transzfekció után 12, 16, 24, 32, 40 és 48 órával fixáltuk a sejteket, és a fertőzést IF festéssel mutattuk ki.

A fenti módszert követve a CHOP-DsRed plazmidot és a pSAT⁻ fertőző klónt kotranszfektáltuk PT sejtekbe (követve a fenti protokollt), és a fertőzött sejteket 96 órával a transzfekció után IF festéssel detektáltuk. Kontrollként módosítatlan DsRed-Monomer-N1 plazmidot és a SAT-DsRed plazmidot is kotranszfektáltuk a pSAT⁻ és a pKresse fertőző klónokkal.

5.17 A víziszárnyas vírusok ciklusidejének és fertőzőképességének megállapítása

A vírusok ciklusidejének meghatározásához 24-vájatú sejttenyésztő lemezre lerakott, CR, CS és CRpIX sejteket fertőztünk magas és alacsony multiplicitással (MOI: 2 és 0,01). Két órával a fertőzés után a tápfolyadékot lecseréltük, majd 2 óránként 3%-os formaldehiddel fixáltuk a sejteket egészen a 48. óráig. A fertőzött sejteket IF festés alkalmazásával mutattuk ki, a lentebb ismertetett módon. A ciklus kezdetének azt az időpontot vettük, amikor először detektáltunk fertőzött sejteket a magas multiplicitással fertőzött vájatokban, a végének pedig azt, amikor először jelentek meg másodlagos fertőzésre utaló fluoreszcens fókuszok az alacsony multiplicitással fertőzött sejteknél.

A vírusok fertőzőképességének, a sejtvonalak fogékonyságának, illetve az IF festés kimutatási határának megállapításához az ismert kópiaszámú izolátumokból tízes léptékű hígítási sort készítettünk, majd 24-vájatú sejttenyésztő lemezen növesztett CR, CS és CRpIX sejteket fertőztünk. A fertőzés után 22 órával a sejteket 3%-os formaldehiddel fixáltuk, és IF festéssel meghatároztuk azt a legnagyobb hígítást, ahol még láthatók voltak fertőzött sejtek. A kópiaszám és a fertőzött sejtek számának ismeretében kiszámoltuk, mennyi vírus volt szükséges egyetlen fertőzött sejt detektálásához.

6. Eredmények

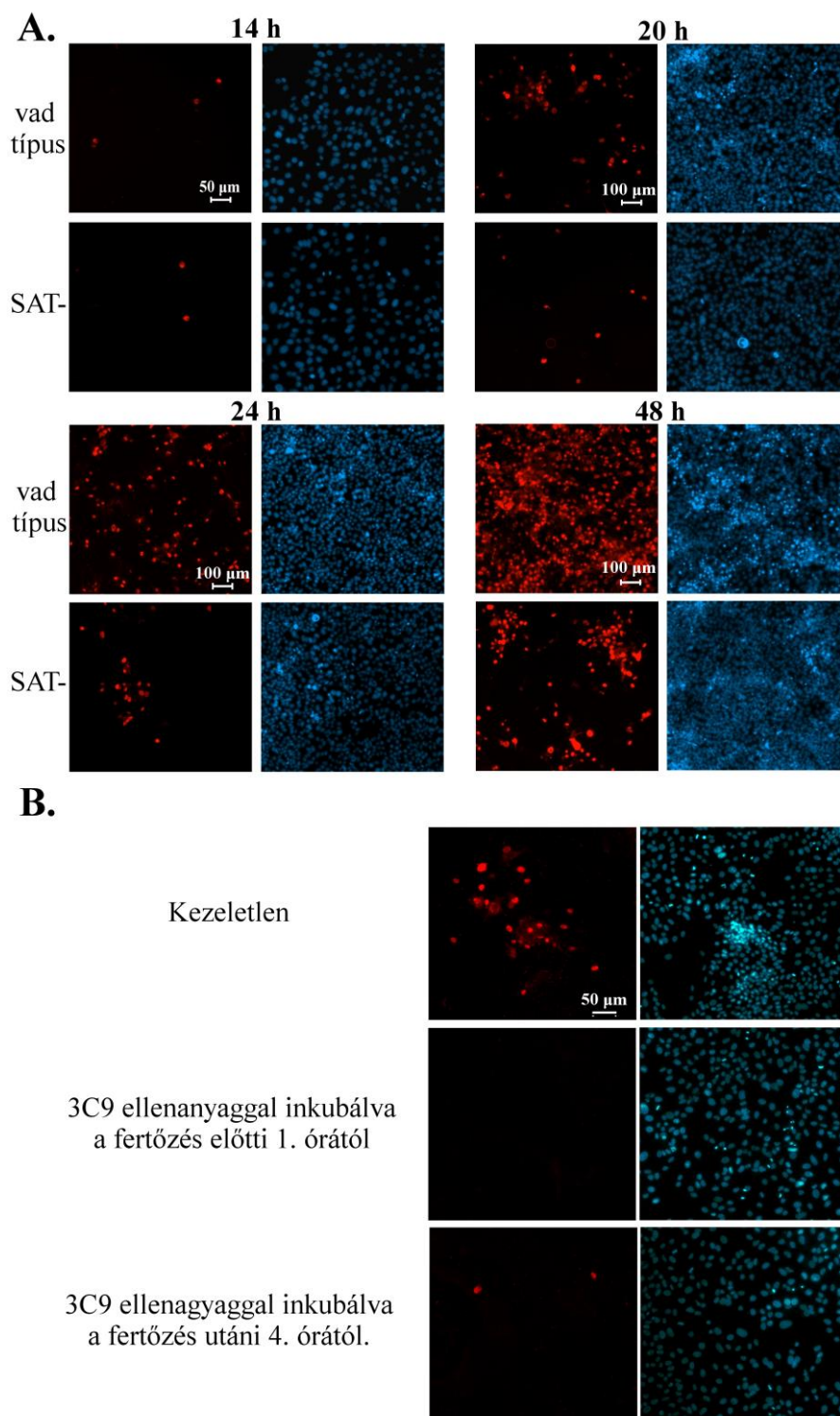
6.1 A vad típusú és a SAT⁻ mutáns PPV Kresse vírusok terjedése

Első lépésként arra voltunk kíváncsiak, hogy a SAT elvesztése esetén a patogén Kresse törzsben is kialakul-e a lassú „terjedéses fenotípus”, mint ahogy azt az attenuált NADL-2 törzsnél tapasztalták. A terjedés sebességének összehasonlítása érdekében a SAT⁻ mutáns és a vad típusú PPV Kresse vírussal fertőztünk PT sejteket, különböző multiplicitással.

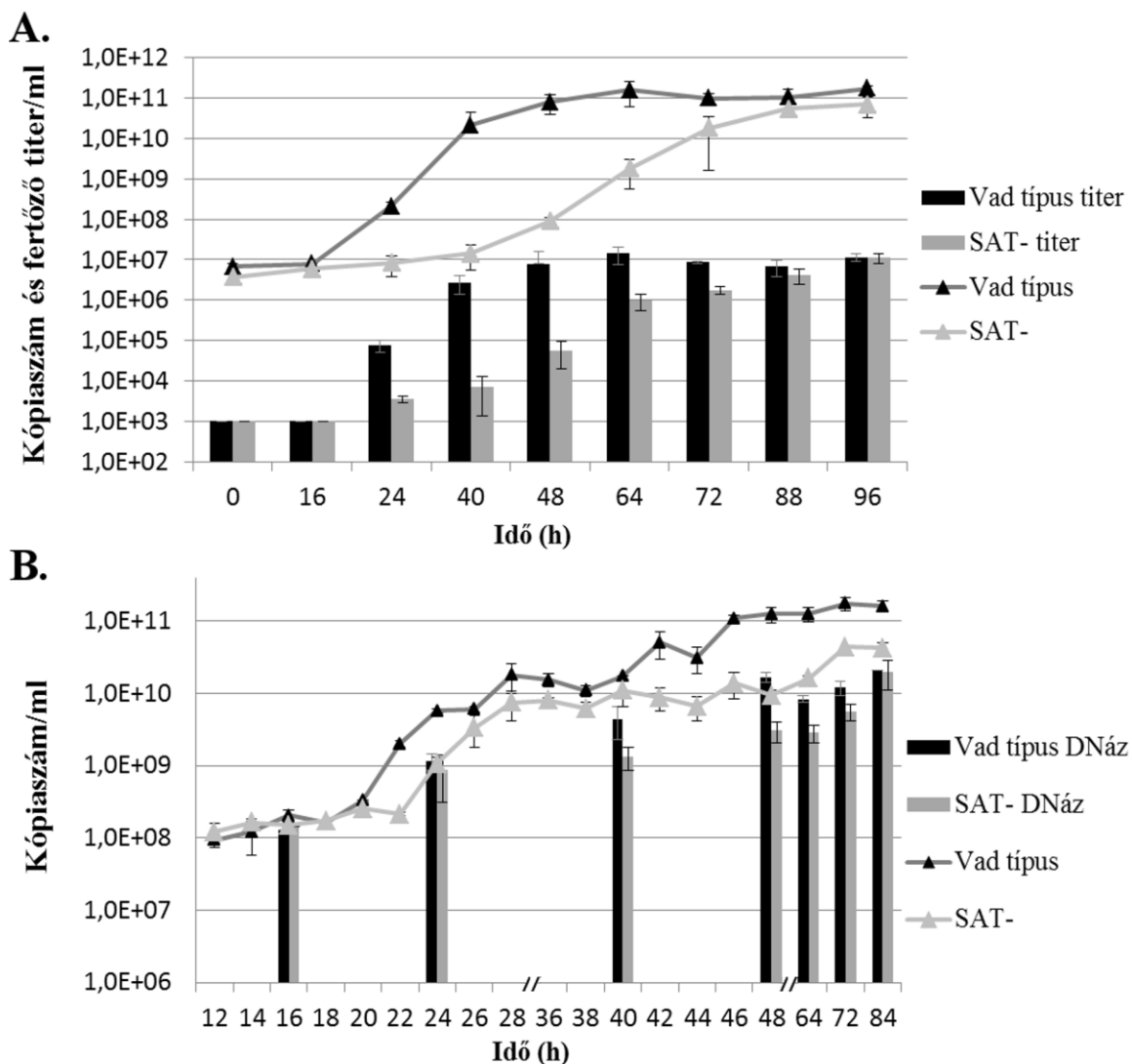
Az alacsony multiplicitású fertőzések során, kapszid-specifikus ellenanyagokkal, a fertőzés utáni 12. órában tudtuk kimutatni az első fertőzött sejteket, amelyek száma a későbbiekben folyamatosan emelkedett. A vad típusú vírussal fertőzött sejteknél először a 20. órában jelentek meg másodlagos fertőzésre utaló fluoreszcens fókuszok (egymáshoz közel, csoportosan elhelyezkedő, fertőzött sejtek), míg a mutáns vírussal fertőzött vájatokban ilyeneket először csak a 24. órában láttunk (3/A ábra). A különbség a két fertőzés között fokozatosan nőtt. A 48. órára a vad típusú vírus szinte az összes sejtet megfertőzte már, míg a SAT⁻ mutánssal fertőzött vájatokban egyre növekvő fluoreszcens fókuszokat detektáltunk. 3C9 kapszid-specifikus ellenanyagok tápfolyadékhoz adásával blokkolni tudtuk a sejtekből kiszabaduló vírusokat és így a fluoreszcens fókuszok kialakulását (3/B ábra) mind a két vírustörzsszel történt fertőzés esetén. A kapott eredmények jól egybevágtak vírusok a kópaiszámának és a titerének változásaival (4/A ábra). A vad típusú vírussal mért értékek a fertőzés 48. órája után lényegesen már nem változtak, míg a SAT⁻ vírussal mért értékek a fertőzés 88. óráig folyamatosan növekedtek.

A magas multiplicitású fertőzéskor nem tapasztaltunk ekkora eltérést a két vírustörzs között (4/B ábra). Míg a SAT⁻ vírussal fertőzéskor a kópiaszámok növekedése csak a 22-24. óra között kezdődött meg, addig a vad típusú vírussal már a 18-20. óra között elindult, és a mutáns vírus kópiaszáma végig a vad típusú vírussal mért értékek alatt maradt. A különbség azonban nem emelkedett egy nagyságrend fölé (a fertőzés utáni 22. órában és 46-48 óra között volt a legmagasabb), ráadásul az eltérés még alacsonyabb volt, ha a DNáz kezelés után megmaradt (tehát csak a kapszidba csomagolt nukleinsav) kópiaszámot néztük. A legnagyobb különbség a 48. órában volt látható, mely utána fokozatosan eltűnt, és a 84. órára gyakorlatilag egyenlő értékeket kaptunk ($2,10 \times 10^{10}/\text{ml}$ a vad típusú és $1,99 \times 10^{10}/\text{ml}$ a mutáns vírussal). Utóbbi változás jól megfeleltethető az alacsony multiplicitású fertőzésnél tapasztaltakkal. A teljes és a DNáz kezelés utáni kópiaszámok összehasonlításából az is kiderült, hogy a vad típusú

vírussal történt fertőzéskor több DNáz szenzitív (részleges, vagy nem kapszidba csomagolt) virális DNS szabadult ki a sejtekből.



3. ábra. A vad típusú és a SAT⁻ mutáns PPV Kresse vírusok terjedése alacsony multiplicitású fertőzésnél (MOI: 0,01), PT sejtvonalon. A fertőzött sejteket kapszid-specifikus ellenanyaggal jelöltük (piros), a sejtmagokat Hoechst 33342 reagenssel (kék) festettük. **A)** A vírustörzsek terjedése különböző időpontokban. **B)** A vírusneutralizációs kísérlet eredménye a vad típusú vírusfertőzéskor, a fertőzés utáni 24. órán.



4. ábra. Kópiaszám és fertőző titer változások a vírusfertőzés lefolyása során a fertőzött sejtek felülúszójában. **A)** A kópiaszám és fertőző titer változása alacsony multiplicitású fertőzés esetén (MOI: 0,01). **B)** A teljes és a DNáz kezelés után mért kópiaszámok a magas multiplicitású fertőzéskor (MOI: 3).

6.2 Citopatogén hatások a vad típusú és a SAT⁻ mutáns PPV Kresse fertőzés során

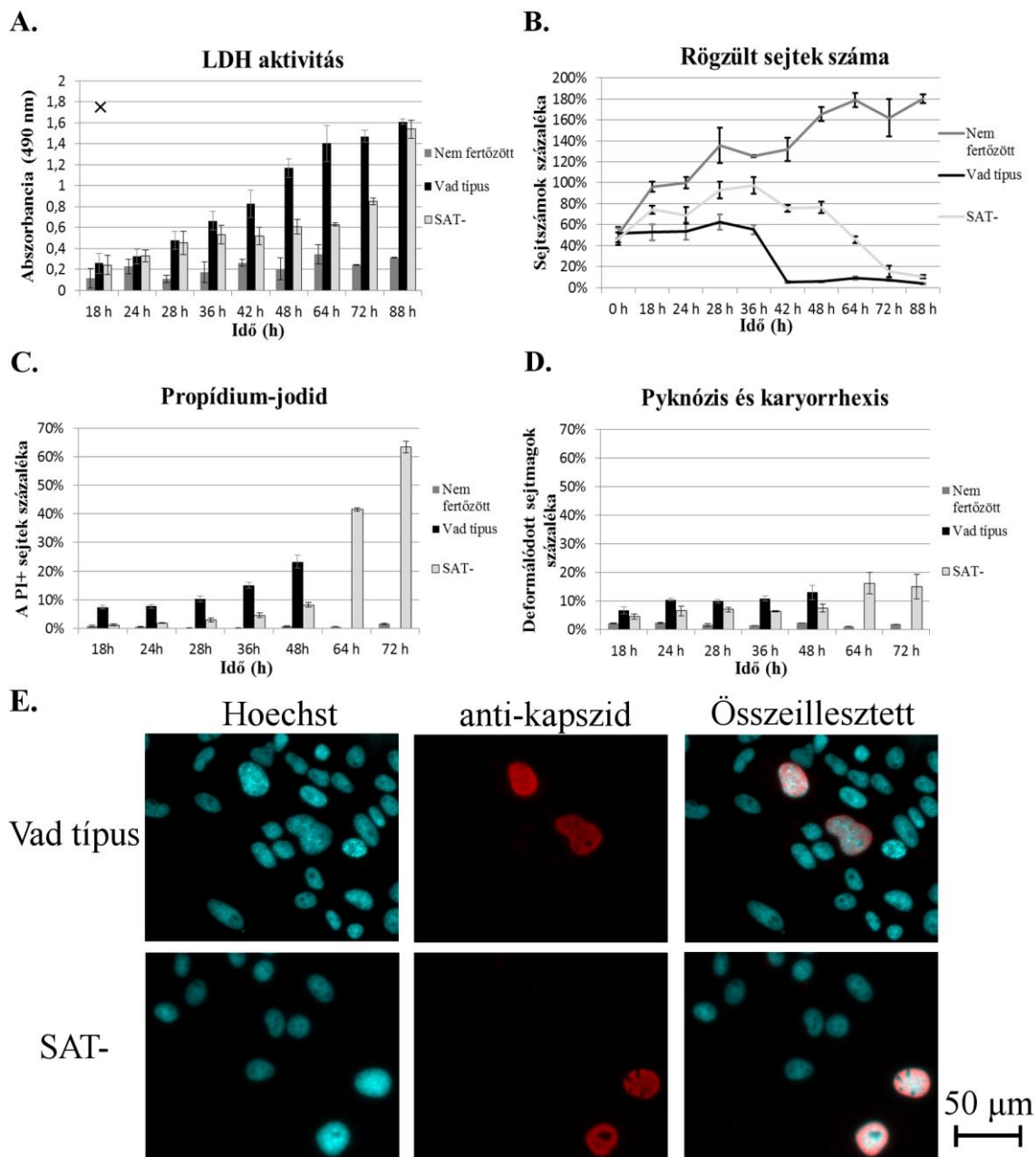
Miután láttuk, hogy a két PPV törzssel történt fertőzések során a termelődött vírusok mennyisége közel azonos volt, azt feltételeztük, hogy a terjedéskért a vírustörzsek eltérő erősségű citopatogén hatásai felelősek. Ezért a következő lépésben a fertőzött sejteknél megfigyelhető apoptózist, nekrozist, sejtlyizist és az összejezszámot vizsgáltuk (utóbbinál csak a vájatok aljához még rögzült sejteket vettük figyelembe).

A vad típusú vírussal fertőzött sejtek felülúszójában mért LDH aktivitás folyamatosan növekedett a vizsgált időszakban (5/A ábra). A növekedés különösen gyors volt a fertőzés 24. és 64. órája között, majd a vizsgált időszak végéig (88 óra) csak enyhe további emelkedést tapasztaltunk. A mutáns vírussal fertőzött sejteknél mért enzimaktivitás a fertőzés 64. órájáig csak enyhe növekedést mutatott, így a 64. órában csak kevesebb mint fele akkora értékű volt, mint a vad típusú vírussal fertőzött sejteknél. A 64. és a 88. óra között viszont gyors emelkedés következett, amelynek következtében a fertőzés 88. órájában már közel azonos értékeket mértünk a különböző vírussal fertőzött sejtek felülúszójában. Megfigyeltük továbbá, hogy az első 48 órát vizsgálva, a vad típusú vírussal történt fertőzéskor, az LDH értékek növekedése exponenciális volt (R^2 : 0,9946), míg a mutáns vírussal fertőzött sejtek felülúszójában logaritmikus (R^2 : 0,9639).

Hasonló különbségeket tapasztaltunk a vájatok aljához rögzült összsejtszám (mint életképességi indikátor) változások vizsgálatakor, mint az LDH aktivitás mérése során (5/B ábra). Míg a vad típusú vírussal fertőzött vájatban a 48. órára gyakorlatilag az összes sejt elpusztult vagy már nem rögzült a vájat aljához (csak a sejtek 6% maradt meg a konfluens sejtszámhoz képest), addig a SAT⁻ vírussal fertőzött sejtek száma 48-72 óra között kezdett el meredeken csökkenni. Ez ahhoz vezetett, hogy a 88. órában már közel megegyezett a különböző vírusfertőzéseknél látott sejtszám (4% és 10%).

A sejteken végzett PI festés megmutatta, hogy a SAT⁻ vírussal fertőzött (de a vájat aljáról még nem levált) sejtek tovább megőrzik sejtmembránjuk integritását, mint azok, amelyek a vad típusú vírussal voltak fertőzve (5/C ábra). A pyknotikus és karyorrhektikus (apoptotikus) sejtmagok aránya (14% a vad típusú és 8% a mutáns vírusfertőzésnél a 48. órában) végig a PI pozitív sejtek aránya alatt maradt, és csak enyhe emelkedést mutatott a fertőzés során (5/D ábra). A fertőzést követő 48 óráig a vad típusú vírussal fertőzött sejteknél minden vizsgált időpontban magasabb értékeket kaptunk. A különbségek a 28-48. óráig szignifikánsak voltak ($p < 0,046$), a későbbi időpontokban pedig, a túl alacsony összsejtszám miatt már nem lehetett érdemi következtetéseket levonni.

További citopatogén hatásként, a fertőzés korai szakaszában mind a két vírustörzsszel történt fertőzésnél jellemző volt a sejtmagok méretének növekedése, megduzzadása (5/E ábra).

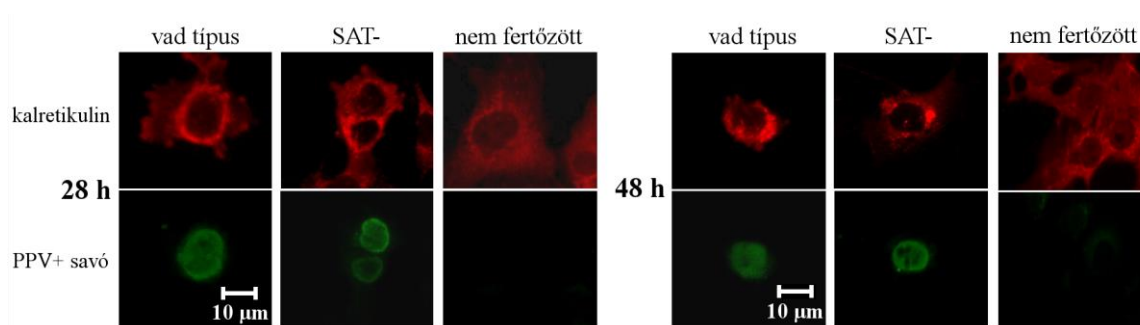


5. ábra. Citopatogén hatások a vad típusú és a SAT⁻ mutáns PPV Kresse törzsekkel fertőzött PT sejtekben. **A)** LDH aktivitás a fertőzött és a kontroll sejtek felülúszójában. A maximális abszorpciós értéket a 18. órában × szimbólummal jelöltük. **B)** A sejtenyésző vájatok aljához rögzült sejtek százalékos aránya. A nem fertőzött sejteknél a 24. órában kapott mennyiséget tekintettük 100%-nak (itt volt a konfluencia is 100%). **C)** A rögzült, propídium-jodiddal festődő sejtek százalékos aránya. Az értékeket a vad típusú vírusnál 48 óra után, a túl alacsony összsejtszám miatt már nem ábrázoltuk. **D)** A rögzült, pyknotikus és karyorrhektikus sejtek százalékos aránya. Az értékeket a vad típusú vírusnál 48 óra után, a túl alacsony összsejtszám miatt már nem ábrázoltuk. **E)** Megduzzadt, felfúvódott sejtmagok a fertőzés korai (22 óra) szakaszában.

6.3 Az ER morfológiai változásainak és az ER stresszválasz fehérjéinek kimutatása

Mivel a SAT fehérjéről ismert volt, hogy a sejtek ER membránjában lokalizálódik, ezért feltételeztük, hogy a jelenlétében megfigyelhető erősebb citopatogén hatásokért az ER stressz a felelős. Ennek igazolására nyomon követtük a fertőzött sejtek ER morfológiájának változását, illetve az ER stresszre adott selejt fehérje válasz két kulcsfehérjéének, az Xbp1-nek és a CHOP-nak az aktiválódását.

A magas multiplicitással (MOI: 3) fertőzött sejteken végzett IF festés alapján a PPV fertőzés – függetlenül a SAT fehérje jelenlététől – az ER membránjának kondenzációját okozta a sejtekben, amely csomók, rögök, hólyagok kialakulásához vezetett, főleg a sejtplazma magkörüli részein (6. ábra). Az ER morfológiájának megváltozásában nem tapasztaltunk karakteres különbséget a vad típusú és a SAT⁻ vírussal fertőzött sejtek között.

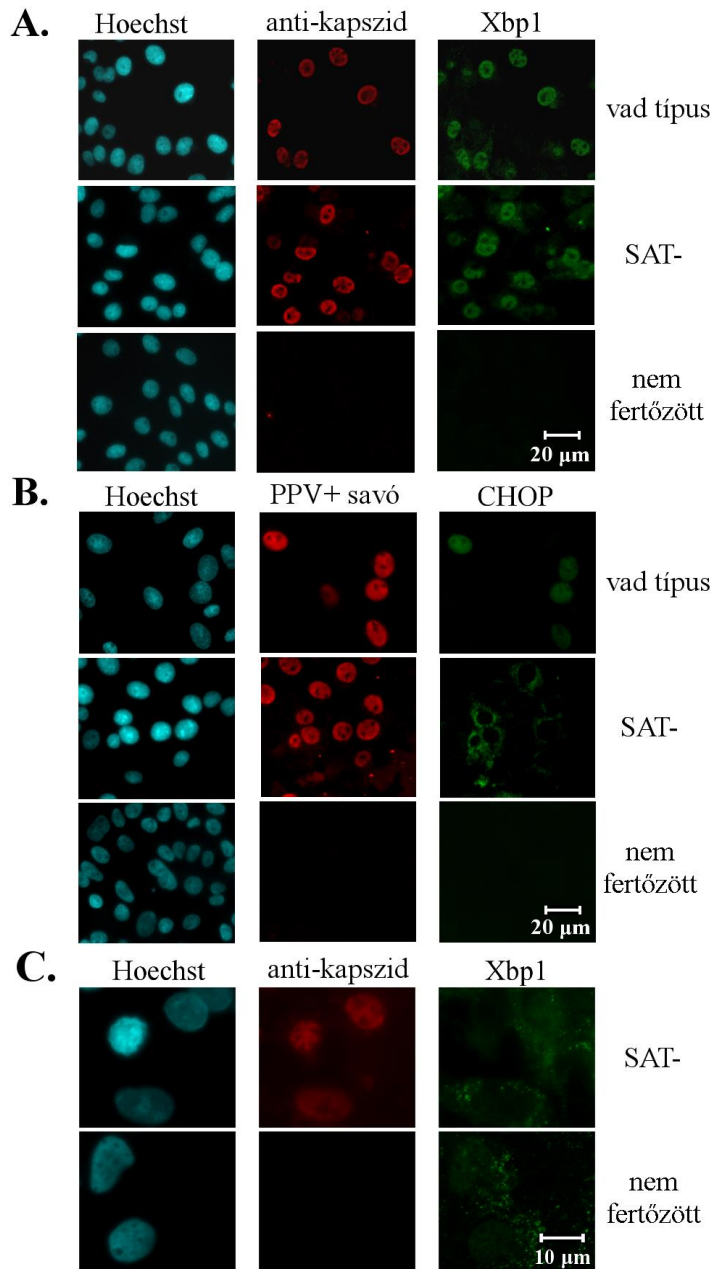


6. ábra. Az ER morfológiai változásai PPV-vel fertőzött PT sejtekben. Az ER-t anti-kalretikulin ellenanyagokkal (piros) jelöltük, míg a fertőzött sejteket PPV pozitív savóval tettük láthatóvá (zöld).

Szintén nem volt különbség az UPR reverzibilis szakaszában szerepet játszó Xbp1 fehérje aktivációjában. A fehérjét mind a két vírustörzzsel történt fertőzés 14. órájától ki tudtuk mutatni, leginkább a sejtek magjában, időnként a citoplazmában is. A 16-18. óra között meredeken nőtt azoknak a fertőzött sejteknek a száma, melyekben aktiválódott. Ez az érték a fertőzés 18. órájában, nagyjából 95%-on tetőzött (7/A ábra), majd meredeken csökkeni kezdett, és a 20. órában már csak a fertőzött sejtek közel 5%-ában volt kimutatható. Érdekes módon a SAT⁻ vírussal fertőzött sejtekben a fertőzés utáni 60. óra környékén újra detektálható volt a citoplazmában és a sejtmagokban, bár ekkor már a nem fertőzött sejtekben is kimutatható volt (7/C ábra).

Az UPR irreverzibilis szakaszában szerepet játszó CHOP a vad típusú vírussal fertőzött sejtekben a 22. órában volt először kimutatható, nagyjából a fertőzött sejtek 20%-ának a sejtmagjában (7/B ábra) jelent meg. Ez az érték a 24. órában, 75%-on

tetőzött és nem változott lényegesen a fertőzés 36. órájáig. A SAT⁻ vírussal fertőzött sejtekben a fehérje szintén a 22. órától volt kimutatható (itt is a fertőzött sejtek 20%-ában) és aránya a 24. órában tetőzött, de alacsonyabb szinten (41%), és végig a sejtek magja körül lokalizálódott. Ez az érték a fertőzést követő 36. óráig nem változott, majd fokozatosan csökkenni kezdett, és 48 óra után a fehérje már nem volt kimutatható.



7. ábra. Az ER stresszválasz fehérjeinek lokalizációja PPV fertőzés során. **A)** Az Xbp1 ER stressz marker (zöld) lokalizációja vad típusú és SAT⁻ PPV-vel fertőzött sejtekben (piros) a fertőzés 18. órájában. **B)** A CHOP ER stressz marker (zöld) lokalizációja vad típusú és SAT⁻ PPV-vel fertőzött sejtekben (piros) a fertőzés 24. órájában. **C)** Az Xbp1 (zöld) aktiválódása a SAT⁻ vírussal fertőzött (piros) és a nem fertőzött sejtekben (60. óra).

6.4 ER stressz kiváltása kémiai anyagokkal és hatásuk a PPV fertőzésre

Azért, hogy további bizonyítékokat szerezzünk arra, hogy az ER stresszválasz aktiválása képes befolyásolni a PPV fertőzés lefolyását, ER stressz kiváltására alkalmas kémiai anyagokkal kezeltünk fertőzött sejteket. Az alkalmazott koncentrációkat (10 mM DTT, 20 μ M MG132 és 10 μ M thapsigargin) úgy állítottuk be, hogy a sejtek számára még ne legyen letális, de aktiválja az Xbp1 és a CHOP expresszióját (8/B ábra, csak az MG132 kezelést tüntettük fel).

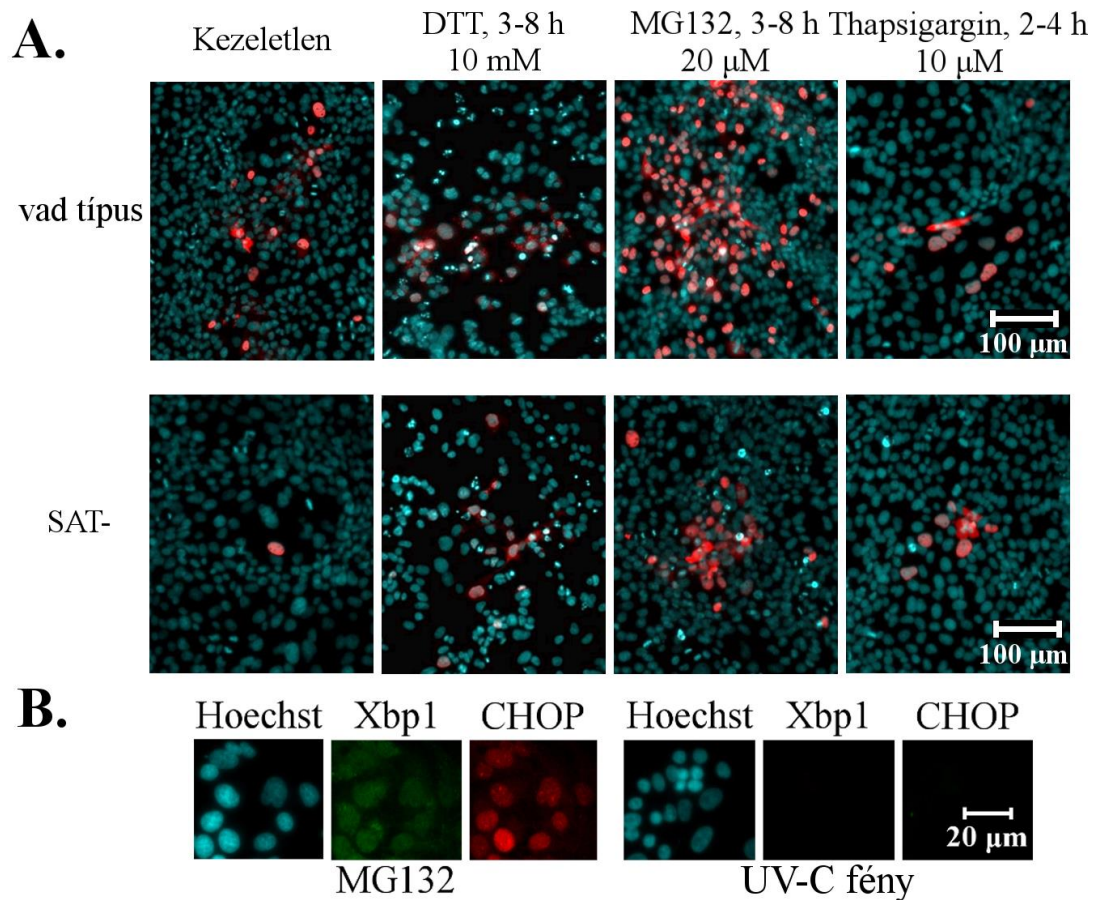
A kezelés hatására az alacsony multiplicitással (MOI: 0,01) fertőzött sejteknél a fertőzés 20. órájában már nem csak a vad típusú, hanem a SAT⁻ vírusfertőzés is lehetett másodlagos fertőzésekre utaló fluoreszcens fókuszokat detektálni (8/A ábra.). A legerősebb pozitív hatást a fertőzés utáni 3-8. órás MG132 kezeléssel tudtuk elérni. A DTT-vel inkubált sejteknél is ez a kezelési intervallum bizonyult a leghatékonyabbnak, viszont jelentős sejtkárosító hatást is tapasztaltunk. A thapsigargin használatakor pedig le kellett rövidítenünk a kezelés hosszát (ötről két órára), mert a vegyszer hosszabb inkubálás esetén gátolta a fertőzést.

Az ER stressz kiváltására képes vegyszerekkel kezelt és magas multiplicitással (MOI: 3) fertőzött sejtek felülúszójában mért kópiaszámok és titrálási eredmények megerősítették az IF festés során tapasztaltakat. Mindegyik kémiai anyaggal történt kezelés növelte a vírusok felülúszóban mért kópiaszámát. A fertőzés 7. órájában indult DTT kezelésnek volt a legerősebb pozitív hatása a vad típusú vírus kópiaszámára (4,41 \times -es növekedés), míg a fertőzés 3-8. órája közötti MG132 kezelés hatására kaptuk a legmagasabb kópiaszámot (71,67 \times magasabb, mint a kezeletlen sejteknél) és titert a SAT⁻ vírussal történt fertőzésekor (9/A ábra). Ráadásul a vegyszerekkel kiváltott ER stressz hatására a mutáns vírus kópiaszáma majdnem minden esetben magasabb lett, mint a vad típusú vírusról mért értékek. Ez alól csak a viszonylag késői (a fertőzés 7. és 12. órája közötti) DTT kezelés volt kivétel.

Vizsgálatainkat kiterjesztettük UV-C fényel kezelt sejtekre, hogy megállapíthassuk, a kezelések pozitív hatásai mennyiben köthetők specifikusan az ER stressz kialakulásához és mennyiben általános a stresszhez. Megállapítottuk, hogy a besugárzás nem vezetett sem az Xbp1, sem a CHOP aktiválódásához (8/B ábra), illetve azt, hogy hatása a vad típusú és a mutáns vírus kópiaszámára enyhén negatív vagy semleges volt (9/B ábra).

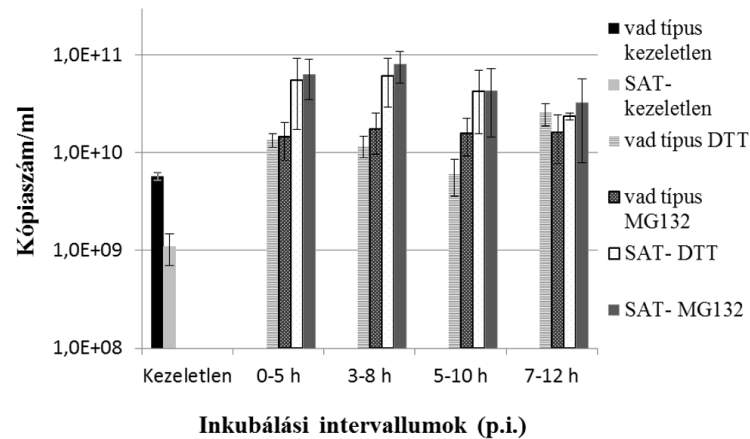
A felülúszók fertőző titerének megállapításakor kapott eredmények jól egybevágtak a kópiaszámok mérésénél kapott értékekkel (9/C ábra). Ez alól csak az UV-fényel

besugárzott sejtek jelentettek kivételt, ahol két nagyságrenddel alacsonyabb értékeket kaptunk, mint a kezeletlen sejteken végzett fertőzéseknél.

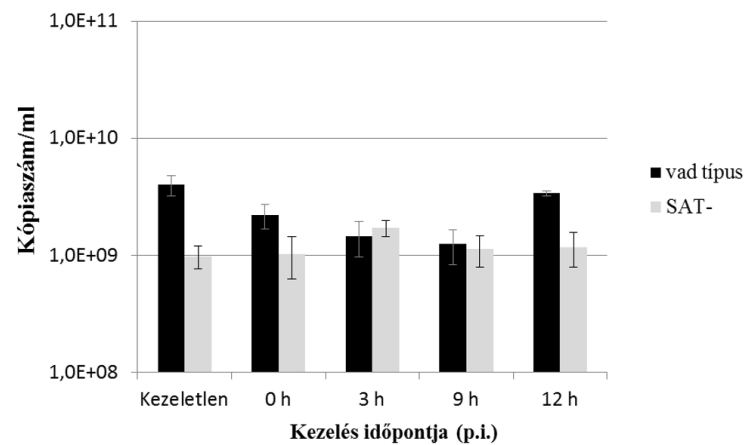


8. ábra. A vad típusú és a SAT⁻ mutáns PPV Kresse terjedése ER stresszt kiváltó kezelés után, alacsony multiplicitású fertőzésnél (MOI: 0,01). **A)** A fertőzés 20. órájában fixált, fertőzött PT sejtek. A fertőzést (piros) anti-kapszid ellenanyagok használatával detektáltuk, a sejtmagokat Hoechst-reagens (kék) segítségével tettük láthatóvá. **B)** Az Xbp1 (zöld) és a CHOP (piros) aktiválódása 20 μ M MG132-vel és UV-C fényvel kezelt sejtekben 12 órával a kezelés után.

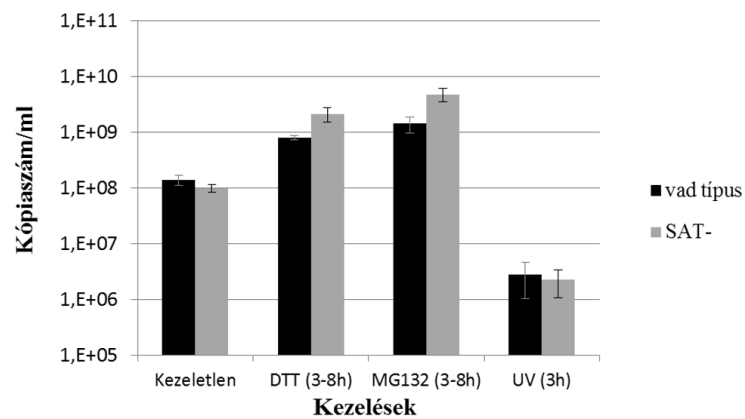
A. A kópiaszámok a fertőzés 24. órájában.



B. UV-fény kezelés hatása a kópiaszámokra



C. Fertőző titerek a fertőzés 24. órájában

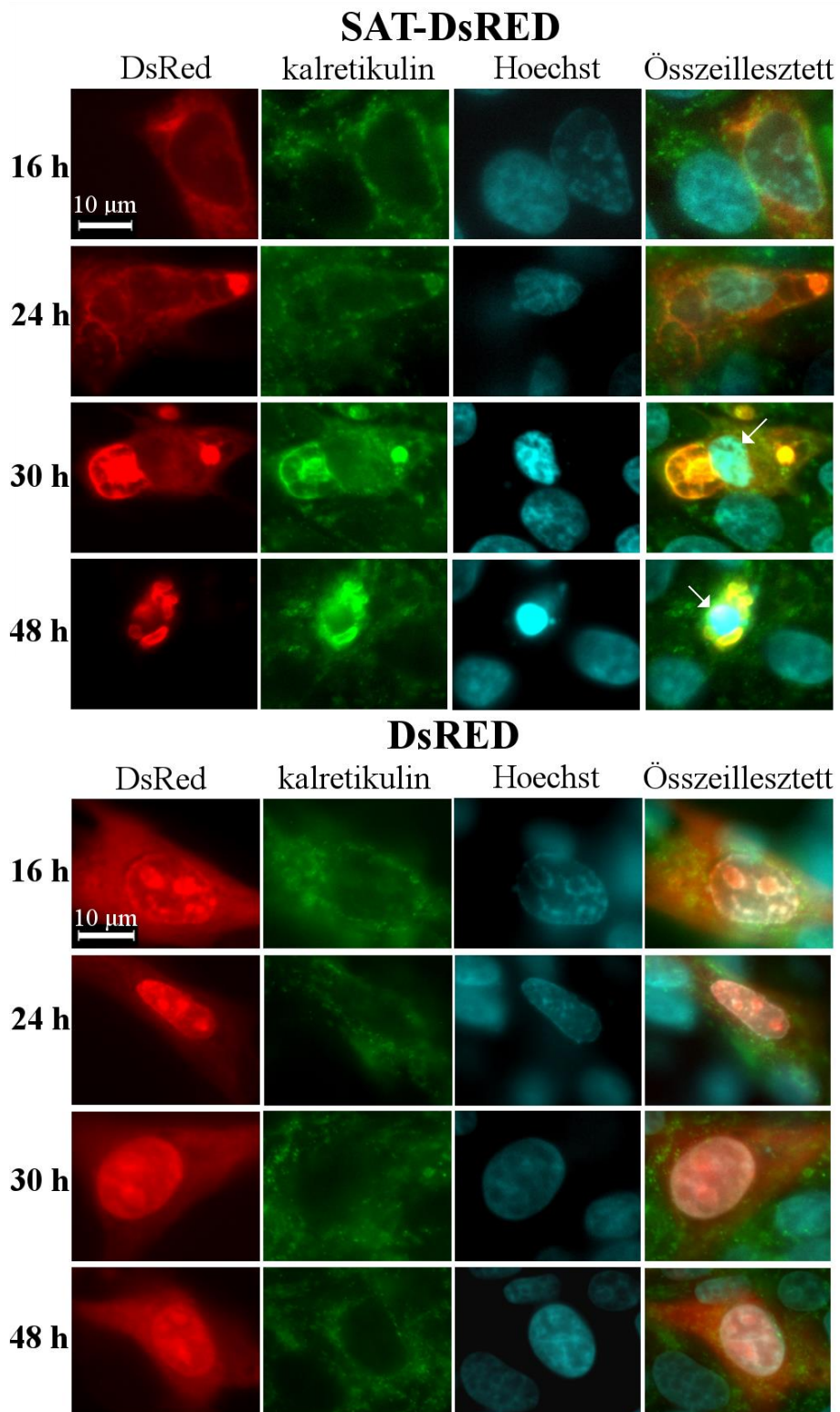


9. ábra. A kópiaszámok és fertőző titerek változása a magas multiplicitással (MOI: 3) fertőzött sejtek felülúszójában a fertőzés 24. órájában, ER stresszt kiváltó kémiai anyagok és UV-C fény kezelés hatására. **A)** A fertőzés különböző intervallumaiban ER stresszt indukáló vegyszerekkel (20 μ M és 10 mM DTT) kezelt sejteken mért kópiaszámok. **B)** A különböző időpontokban történt UV-C fény kezelés hatása a vad típusú és a SAT⁻ vírus kópiaszámára. **C)** A vad típusú és a SAT⁻ mutáns vírus fertőző títere a kezelt sejtek felülúszójában.

6.5 A SAT fehérje expressziójának hatása PT sejtekben

Annak érdekében, hogy további megerősítést szerezzünk a SAT ER stressz kiváltásban játszott szerepéről, a fehérjét plazmidba klónoztuk, PT sejtekbe transzfektáltuk, majd vizsgáltuk, hogy más vírusfehérjék jelenléte nélkül a SAT képes-e az Xbp1 vagy a CHOP expresszióját aktiválni.

A SAT-DsRed plazmid PT sejtekbe transzfektálása megmutatta, hogy a SAT fehérje önmagában nem képes sem az Xbp1, sem a CHOP aktiválására. Ugyanakkor a normál vírusfertőzéshez hasonló morfológiai változást okozott a sejtek ER-jában (10. ábra), amely a korai fázisban (transzfekeció utáni 16. óra körül) az ER membrán sejttag körül kondenzációjában, majd később csomók, rögök, vezikulák kialakításában nyilvánult meg. A kalretikulin, mint ER marker előfordulása a sejtben belül jól megfigyelhetően egybeesett a SAT-DsRed lokalizációjával. A transzfekeció 30. órájától kezdve detektálhatók voltak erősebben festődő, kondenzálódó (apoptotikus) sejttagok, illetve folyamatosan csökkent a még detektálható, transzfektált sejttagok száma. A 48. óra után már nagyon kevés, SAT-DsRed fehérjét expresszáló sejt volt látható, míg a csak DsRed plazmiddal transzfektált sejttagok a transzfekeció után még 90 órával is kimutathatók voltak.



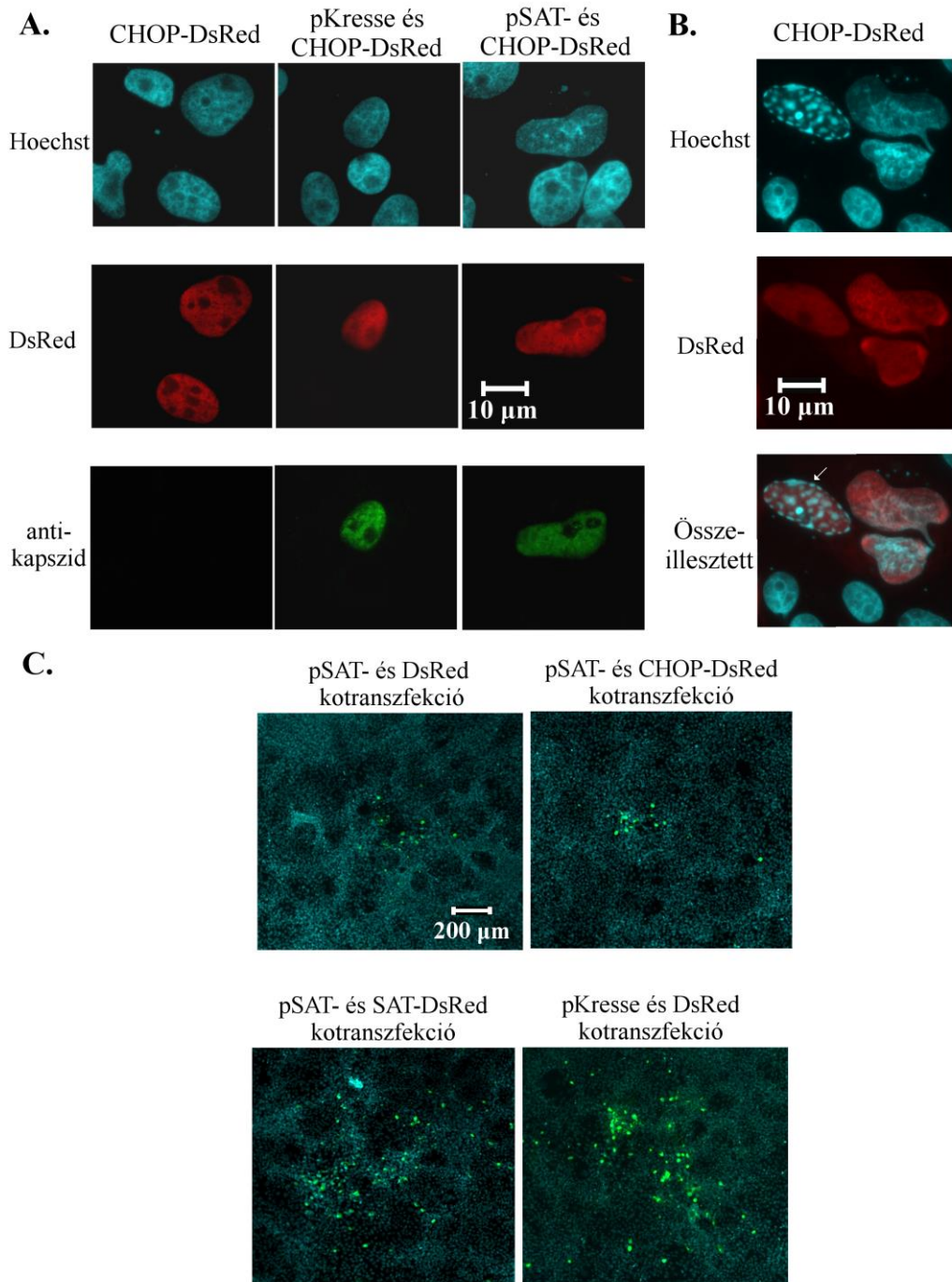
10. ábra. Az ER morfológiai változása a SAT-DsRed-et expresszáló PT sejtekben. A sejteket a SAT-DsRed, illetve kontrollként a DsRed (piros) plazmiddal transzfektáltuk, az ER-t anti-kalretikulin ellenanyagokkal (zöld) jelöltük, míg a sejtmagokat Hoechst-reagens (kék) segítségével tettük láthatóvá. A nyilak a transzfekció késői szakaszában (30 óra után) megjelenő apoptotikus magokat jelölik.

6.6 A CHOP lokalizációja PT sejtekben és hatása a vad típusú és a SAT⁻ PPV Kresse vírus terjedésére

Miután a fertőzési kísérletek során (a vad típusú és a SAT⁻ mutáns vírus fertőzése között) a CHOP lokalizációjában tapasztaltunk különbséget, arra voltunk kíváncsiak, hogy a vad típusú vírusherítéskor megfigyelt erősebb citopatogén hatások és gyorsabb terjedés megjelenéséhez csak a CHOP sejtmagi lokalizációjára van-e szükség? Valamint, hogy a SAT fehérje más vírusherjék jelenléte nélkül képes-e befolyásolni a CHOP sejten belüli eloszlását?

Az általunk létrehozott CHOP-DsRed plazmidról termelődő fúziós fehérje a transzfektált PT sejtek magjában lokalizálódott. Ez nem változott akkor sem, amikor a plazmidot a pKresse vagy a pSAT fertőző klónokkal együtt transzfektáltuk a sejtekbe (11/A ábra). Megjelenése a magban már viszonylag korán (a transzfekció 18. órájától) apoptózisra jellemző, fragmentálódott sejtmagok kialakulásához vezetett (11/B ábra) egyes sejtekben, és a 48. órára gyakorlatilag az összes transzfektálódott sejt elpusztult.

Amikor a CHOP-DsRed plazmidot a pSAT⁻ fertőző klónnal közösen transzfektáltuk nem tapasztaltuk, hogy (összehasonlítva a pSAT⁻ és a DsRed kotranszfekciójával) gyorsította volna a vírus terjedését (11/C ábra). Ezzel szemben a SAT-DsRed és a pSAT⁻ kotranszfekciójakor a SAT⁻ vírus terjedésének sebessége nagyjából megegyezett a vad típusú vírus terjedésével (a kontrollként használt pKresse és a DsRed plazmid kotranszfekciójával összehasonlítva).



11. ábra. A sertés CHOP lokalizációja és hatása a vad típusú és a SAT⁻ PPV Kresse vírus terjedésére. A vírust anti-kapszid ellenanyagokkal (zöld) mutattuk ki, a sejtmagokat pedig Hoechst-reagenssel (kék) tettük láthatóvá. A) A CHOP-DsRed fúziós fehérje (piros) kotranszfekciója a fertőző klónokkal és lokalizációja PT sejtekben a transzfekció utáni 24. órában. B) A CHOP-DsRed citopatogén hatása a transzfekció 18. órájában. A fragmentálódott sejtmagot nyíllal jelöltük. C) A SAT⁻ vírus terjedése a pSAT⁻ fertőző klón CHOP-DsRed, illetve a SAT-DsRed plazmiddal történt kotranszfekciója utáni 96. órában. Kontrollként látható a vad típusú vírus terjedése a pKresse fertőző klón és a DsRed plazmid kotranszfekciója után (96. óra).

6.7 Víziszárnyas vírusok kópiaszáma pézsmaréce-eredetű sejtvonalakon

Miután a SAT fehérjével kapcsolatos kísérletek során azt tapasztaltuk, hogy az IF festés és a real-time PCR technikák együttes használatával pontosabb, árnyaltabb, robosztusabb eredmények nyerhetők a vírusok terjedéséről és ciklusidejéről, ezért a módszerek alkalmazását kiterjesztettük alkalmazott kutatások során hasznosítható sejtvonalak permisszivitásának vizsgálatára. Vizsgálatainkhoz olyan vírusokat választottunk ki, melyek mind képesek a víziszárnyas állományokban súlyos gazdasági károkat okozni (DHAV-1, DuCV, GHPV, GPV).

Első lépésben a fertőzött állatokból származó szerveket homogenizáltunk, és a bennük lévő vírusokkal pézsmaréce-eredetű, immortalizált sejtvonalakot fertőztünk. Az átoltási sorozat végén mind a négy vírus esetén tudtunk nukleinsavat detektálni a sejtek felülúszójában.

A DuCV esetében nem tapasztaltunk citopatogén hatást a fertőzött sejteknél, a végső kópiaszáma pedig, két kiugró értéket leszámítva (10^6 és 10^7 /ml) viszonylag alacsony volt (10^5 /ml), és nem érte el a kiindulási szervhomogenizátumban mért értéket (4. táblázat).

Az átoltások során végig citopatogén hatás volt megfigyelhető a DHAV-1-gyel fertőzött vájatokban, az utolsó felülúszókban pedig 10^7 - 10^8 /ml-es kópiaszámokat detektáltunk (4. táblázat), mely közel két nagyságrenddel magasabb érték, mint amit a kiindulási vírushomogenizátumban mértünk.

A GHPV fertőzéskor nem minden esetben észleltünk citopatogén hatást, az utolsó felülúszókban mért kópiaszámok értéke pedig viszonylag nagy intervallumban, 10^4 /ml és 10^7 /ml között szóródott (4. táblázat). A CRpIX sejtvonalnál egy esetben nem tudtunk nukleinsavat detektálni a felülúszóban, míg a CR sejtvonalt fertőzésekor, két esetben sikerült ugyan a vírus DNS-t kimutatni, de az olvadási görbék több eltérő méretű (aszpecifikus) terméket is mutattak a mintákban.

A GPV fertőzés során erős citopatogén hatás volt megfigyelhető mind a három sejtvonalon. A vírus kópiaszáma az átoltási sorozat végén nagyjából megegyezett azzal, mint amit a szervhomogenizátumban mértünk (10^6 - 10^7 /ml), kivéve a CS sejtvonalon, ahol lényegesen magasabb értékeket kaptunk (4. táblázat). A CRpIX sejtvonalt fertőzésekor az olvadási görbék alapján egy esetben több termék is észlelhető volt a mintákban.

4. táblázat. A virális nukleinsav kópiaszáma (kópia/ml) a kiindulási vírusmintákban és az átoltási sorozat végén, a különböző sejtvonalakon. A „–” szimbólum azokat a hígításokat jelöli, ahol nem tudtunk vírust kimutatni, míg a *-gal jelölt adatokat a hibás olvadási görbe miatt nem vettük figyelembe.

Sejtvonal	Hígulás 10 átoltás után	Vírusok			
		DuCV	DHAV-1	GHPV	GPV
CR.pIX	3×10^{11}	$3,60 \times 10^5$	$1,26 \times 10^8$	$7,53 \times 10^4$	$1,23 \times 10^7$
	10×10^{11}	$3,79 \times 10^5$	$7,49 \times 10^7$	–	$9,79 \times 10^6$
	30×10^{11}	$2,59 \times 10^5$	$1,87 \times 10^8$	$5,62 \times 10^6$	$1,93 \times 10^7$
	100×10^{11}	$2,06 \times 10^6$	$3,88 \times 10^8$	$1,91 \times 10^6$	*
CR	3×10^{11}	$6,67 \times 10^5$	$1,59 \times 10^8$	*	$6,89 \times 10^6$
	10×10^{11}	$2,77 \times 10^5$	$2,59 \times 10^8$	$6,82 \times 10^7$	$1,03 \times 10^7$
	30×10^{11}	$1,69 \times 10^7$	$8,12 \times 10^5$	*	$3,43 \times 10^7$
	100×10^{11}	$3,35 \times 10^5$	$1,65 \times 10^8$	$3,97 \times 10^6$	$1,02 \times 10^7$
CS	3×10^{11}	$5,33 \times 10^5$	$1,25 \times 10^8$	$1,88 \times 10^7$	$5,81 \times 10^8$
	10×10^{11}	$2,45 \times 10^5$	$2,49 \times 10^8$	$2,77 \times 10^6$	$1,34 \times 10^7$
	30×10^{11}	$2,76 \times 10^5$	$1,41 \times 10^8$	$3,47 \times 10^5$	$2,41 \times 10^6$
	100×10^{11}	$5,45 \times 10^5$	$7,04 \times 10^7$	$4,40 \times 10^5$	$2,32 \times 10^9$
Kiindulási kópiaszám		$1,39 \times 10^8$	$2,43 \times 10^6$	$1,71 \times 10^6$	$5,70 \times 10^6$

6.8 A DuCV, DHAV-1, GHPV és GPV szaporodási görbéje

A vírusok szaporodásának további jellemzésére a következő lépésben egy alacsony multiplicitású fertőzés után meghatároztuk a vírusok kópiaszámának szaporodási görbét a fertőzött sejtek felülúszójában.

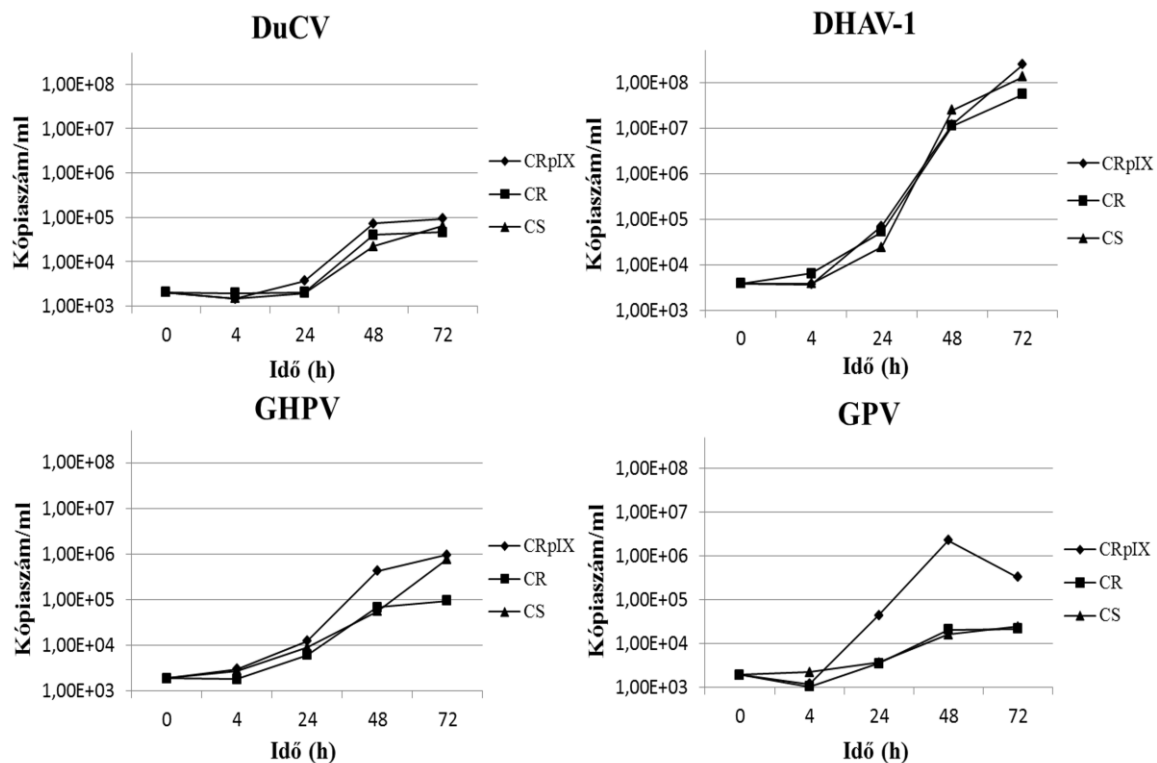
A DuCV szaporodási görbéje nagyjából megegyezett mind a három vizsgált sejtvonalon (12. ábra). A kópiaszám növekedés a 24. óra után kezdődött és a 48-72 óra között már nem változott lényegesen.

A DHAV-1 kópiaszám változása is nagyon hasonló volt a három sejtvonalon (12. ábra). A növekedés itt már a fertőzést követő 4. óra után elkezdődött, különösen gyors volt 24-48 óra között, majd a 48. óra után lelassult.

A GHPV szaporodási görbéje, a fertőzött sejtvonaltól függően eltérő lefutású volt (12. ábra). A kópiaszám növekedés mindhárom esetben a fertőzés 4. órája után kezdődött, de a CR és a CS sejtvonalon a 48. óráig visszafogottabb volt, ezért ekkor a CRpIX sejtek felülúszójában már közel egy nagyságrenddel több vírust tudtunk kimutatni. A CR sejtek fertőzésekor a kópiaszám 48-72 óra között lényegesen már nem változott, a CRpIX sejteknél a növekedés lassabban ugyan, de folytatódott, míg a CS sejteknél a kópiaszám hasonló mértékben növekedett, mint 24-48 óra között. Így a

fertőzés 72. órájára a CR és a CRpIX sejtvonalak felülúszójában közel azonos kópiaszámokat mértünk.

A CR és CS sejtvonalaknak GPV-vel történő, alacsony multiplicitású fertőzésekor (MOI: 0,01), lényegesen kevesebb volt a képződött vírusok száma (nagyjából $2,5 \times 10^4$ /ml) (12. ábra), mint az átoltási sorozat végén (10^7 - 10^9 /ml) (4. táblázat). Az alacsonyabb kópiaszám értékeket a CRpIX sejtek fertőzésekor is tapasztaltuk, annak ellenére, hogy itt volt a víruskópiaszám növekedés a leggyorsabb.



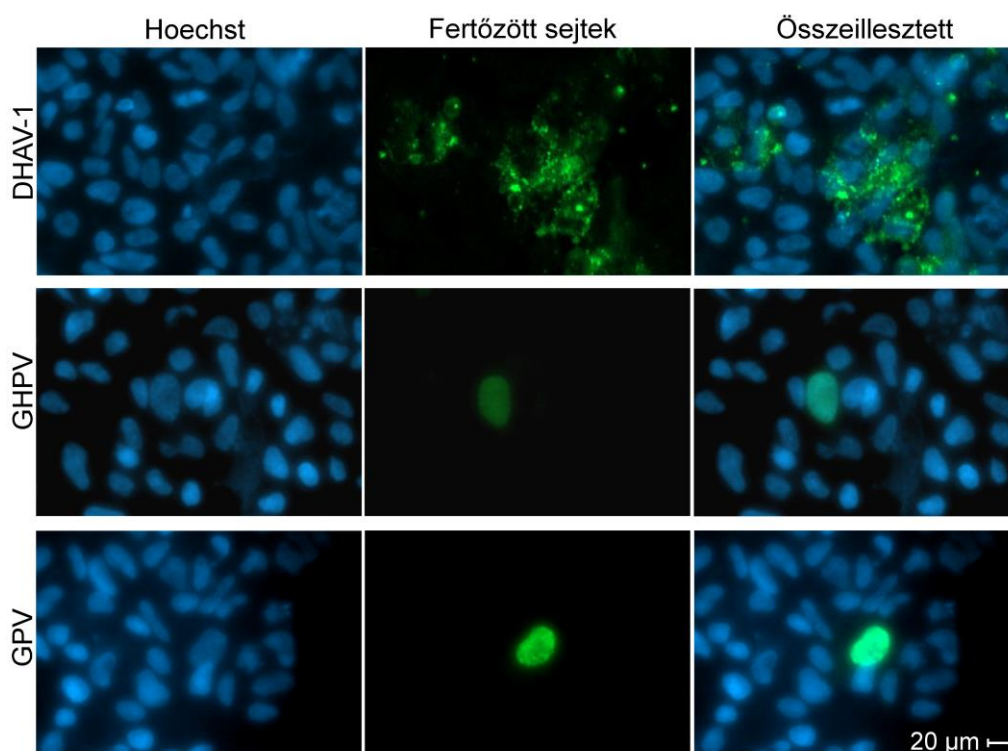
12. ábra. A vizsgált víziszárnyas vírusok szaporodási görbéje a három sejtvonalon. A sejteket alacsony multiplicitással fertőztük (MOI: 0,01), a kópiaszámokat pedig real-time PCR segítségével határoztuk meg a fertőzés különböző időpontjaiban.

6.9 A vírusok ciklusidejének és a sejtvonalak fogékonyságának meghatározása

A sejtvonalak permisszivitásának további megerősítése céljából (ahol elérhetőek voltak vírus pozitív savók) a vírusok szaporodását IF festéssel is megerősítettük, valamint, a vírusok ciklusidejét is meghatároztuk (a DuCV esetében vírus pozitív savó nem állt rendelkezésre). Az IF festés bevonásával arra is lehetőségünk adódott, hogy a meghatározzuk a sejtvonalak fogékonyságát az egyes vírusokra, illetve a vírusok fertőzőképességét az egyes sejtvonalakra vonatkoztatva.

A fertőzött sejteken elvégzett IF festési kísérletek megerősítették a real-time PCR vizsgálatok eredményeit. Mind a három vizsgált vírust (DHAV-1, GHPV, GPV) ki tudtuk mutatni mind a három sejtvonalon. A DHAV-1 esetében a sejtmagok árnyékát kirajzoló, festődő citoplazma és a sejtmag egyik oldalán csoportosuló, fényes, perinukleáris foltok jól megkülönböztethetővé tették a fertőzött sejteket (13. ábra, csak a CRpIX sejtvonalon végzett IF festés). A magas multiplicitású fertőzéskor (MOI: 2) az első pozitív sejteket a fertőzés 12. órájában tudtuk detektálni (2 órával korábban, mint alacsony multiplicitásnál), míg a másodlagos fertőzéseket jelző, fluoreszcens fókuszok az alacsony multiplicitású fertőzés (MOI: 0,01) 24. órájától voltak megfigyelhetőek. Ezek alapján a DHAV-1 ciklusideje 10-14 óra közé tehető.

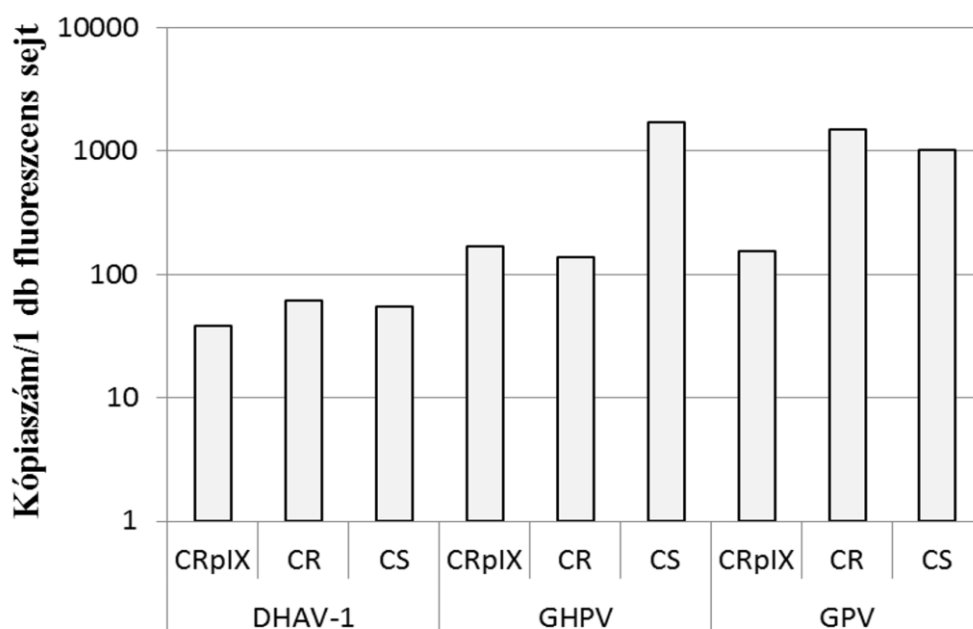
A GHPV és GPV fertőzéskor erősen festődő sejtmagokat láttunk, a vírusok replikációjának bizonyítékaként (13. ábra, csak a CRpIX sejtvonalon végzett IF festés). Az első fertőzött sejtek a GHPV esetében a fertőzés (MOI: 2) 16. órájában, míg a GPV esetében a 14. órában voltak észlelhetőek (2 órával korábban, mint alacsony multiplicitásnál). A polyomavírussal újrafertőződött sejtek a 30. órától, míg a parvovírussal másodlagosan fertőzött sejtek a 28. órától jelentek meg. Így mind a GHPV, mind a GPV ciklusideje 12-16 óra közé tehető.



13. ábra. DHAV-1, GHPV és GPV-vel fertőzött CRpIX sejtek immunfluoreszcens festése, alacsony multiplicitású (MOI: 0,01) fertőzés 24. órájában. A sejtmagokat Hoechst-reagenssel, a vírusokat fertőzött állatok savójával és FITC-cel jelölt anti-kacsa ellenanyaggal tettük láthatóvá.

A vírusok fertőzőképességére és a sejtvonalak fogékonyságára az egy darab, IF festéssel detektálható, fertőzött sejt megjelenéséhez szükséges víruskópiaszámok alapján következtettünk. A kapott kópiaszámok 55 és 1705 között változtak (14. ábra).

Mindhárom sejtvonal a DHAV-1 fertőzésre bizonyult a legfogékonyabbnak, a kapott értékek pedig nagyon hasonlóak voltak. A GHPV-ból egy nagyságrenddel magasabb kópiaszámra volt szükség a CS sejtek sikeres fertőzéséhez, mint a CR és CRpIX sejteknél. A GPV fertőzésre a CRpIX sejtek voltak a legfogékonyabbak, közel egy nagyságrenddel kevesebb vírus elég volt az IF festéssel detektálható fertőzéshez. Általánosságban is a CRpIX vonal bizonyult a legérzékenyebbnek, bár (a GPV fertőzés kivételével) közel azonos értékeket kaptunk a CR sejteknél is.



14 ábra. Az AGE1 sejtvonalak fogékonysága a vizsgált víziszárnyas vírusok fertőzésére az egy IF festéssel detektálható fertőzött sejthez szükséges kópiaszám alapján. Az IF festést a fertőzés 22. órájában végeztük, a kópiaszámokat real-time PCR alkalmazásával állapítottuk meg.

7. Megbeszélés

7.1 A SAT fehérje hatása a PPV Kresse vírus terjedésére és a fertőzött sejtek lízisére

A PPV NADL-2 törzsével végzett korábbi vizsgálatok bebizonyították, hogy a SAT fehérje a fertőzött sejtek ER-jában halmozódik fel és pozitív hatással van a vírus terjedésére (Zádori és mtsai., 2005). Eredményeink alapján a fehérjének nagyon hasonlóak a jellemzői a PPV Kresse törzsből is, így a hiányában bekövetkező „lassú terjedés” fenotípus kialakulása általános jelenségnek tekinthető a PPV törzsekénél. A vad típusú és a SAT⁻ Kresse törzsszel végzett *in vitro* fertőzési kísérletek azt is megmutatták, hogy az első fertőzött sejtek mindkét esetben, a fertőzés utáni 12. órától mutathatók ki a kapszid-specifikus ellenanyagokkal (3. ábra). Ez arra utal, hogy a vírusok bejutása a sejtekbe, a dekapszidáció, a nukleinsav replikációja, a vírus fehérjék szintézise és a kapszid összeépülése azonos sebességgel történik, függetlenül a SAT fehérje jelenlététől.

Eltérést tapasztaltunk viszont a magas és alacsony multiplicitású fertőzésnél a vírus kópiaszámok növekedési üteme között (4. ábra). Alacsony multiplicitásnál jelentős különbség mérhető a vad típusú és a mutáns vírusok kópiaszáma és titere között (több mint három nagyságrend) a fertőzés 40-64. órája között (4/A ábra). Ez a különbség jól magyarázható a SAT⁻ vírus felszabadulás kezdetének a 3-4 órával későbbre tolódásával (4/B ábra), amely az újrafertőzések során, a vírus további replikációs ciklusában, tovább halmozódik, valamint a parvovírusok szaporodásához nélkülözhetetlen osztódó sejtek számának csökkenésével. Vizsgálataink alapján egy nem fertőzött vájatban a sejttség több mint 2,5x-ére növekszik az első 28 órában, majd a növekedés a következő 60 órában drasztikusan lelassul (5/B ábra).

Meglepő módon, a magas multiplicitású fertőzéskor lényegesen kisebb (egy nagyságrenden belüli) különbséget tapasztaltunk (4/B ábra) a kópiaszámok között. Mivel ebben az esetben az összes sejtet egyszerre fertőztük, a különbség két dologból következhet: (I) Az egyik vírus több utódvirust tud létrehozni, mint a másik, és/vagy (II) az egyik fertőzés esetén, adott időpontban több a lizáló sejt, így több vírus szabadul ki a fertőzött sejtekből. A korábbi (Zádori és mtsai., 2005) és a jelenlegi vizsgálataink (4. ábra) azt mutatták, hogy a vad típusú és a mutáns vírus végső kópiaszáma közel azonos. Ezzel szemben a felülúszókban mért LDH aktivitások között jelentős eltérést tapasztaltunk (több mint kétszeres különbség) a vad típusú vírus javára (5/A ábra) a 48-64. óra között, amely a második feltételezést támasztja alá. Ha a DNáz kezelés után maradt kópiaszámokat nézzük, akkor a legnagyobb különbséget szintén a fertőzés 48.

órájában láthatjuk (4/B ábra) (6,5×). Ekkor a vad típusú vírussal fertőzött sejteknek már a 95%-a levált a sejttenyésző lemezről, míg a SAT⁻ vírussal fertőzött sejteknek csak a 15%-a (5/B ábra). A 95% és a 15% jelentős különbség, ha a sejt számokat nézzük, viszont a kettő aránya csak 6,33, mely közel azonos a kópiaszámok között mért 6,5×-ös különbséggel. Ez szintén azt támasztja alá, hogy a SAT fehérje nem befolyásolja a keletkezett vírusok mennyiségét, hanem felgyorsítja a vírusok kiszabadulását a fertőzött sejtekből.

Logikus következtetés, hogy a SAT fehérje jelenlétében megfigyelt korábbi vírus felszabadulásnak együtt kell járnia a fertőzött sejtek korábbi pusztulásával, a sejtmembrán integritásának korábbi elvesztésével, és így a sejtek erősebb lízisével. A *Protoparvovirus* nemzetség több tagjáról ismert, hogy képesek apoptózist vagy nekrozist kiváltani a fertőzött sejtekben (Chen és Qiu, 2010). H-1PV-vel fertőzött HeLa és P1 sejteknél írták le, hogy a parvovírus fertőzés képes aktiválni az apoptózis korai lépéseit, de a folyamat nem játszódik le teljesen, és a sejtek végül nekrozisban pusztulnak el. A PPV YL törzsével fertőzött ST és PK-15 sejtekben a fertőzés késői szakaszában (60 órával a fertőzés után) 50% felett volt az apoptotikus sejtek száma (Zhang és mtsai., 2015; Zhao és mtsai., 2016). Ezzel szemben az általunk végzett vizsgálatok alapján, a PT sejtek Kresse törzssel történő fertőzéskor az apoptotikus magok száma végig alacsonyan maradt (8-15% körül, 5/D ábra), függetlenül a SAT fehérje jelenlététől. A pyknotikus és karyorrhektikus magok mellett pedig, meglepő módon, nem tapasztaltuk olyan fragmentálódott sejtmagok megjelenését, mint amelyeket Gupta és mtsai. (2016) figyeltek meg a PPV NS1 fehérjével transzfektált sejtekben, vagy amelyeket mi figyeltünk meg a CHOP fehérje transzfekciójakor (11. ábra). Mivel a vírus kapszidjának apró módosulása is képes megváltoztatni a vírus és a gazdasejt közötti interakciókat és a kiváltott citopatogén hatást (Bergeron és mtsai., 1996; Fernandes és mtsai., 2014), ezért további vizsgálatokat igényel annak meghatározása, hogy a korábbi és az általunk bemutatott eredmények közötti különbségek oka a vizsgált vírus törzs, vagy az alkalmazott sejtvonal különbözőségében keresendő.

A megduzzadt sejtmagok (5/E ábra), a propídium-jodid festés és a gyors LDH felszabadulás által jelzett sejtmembrán károsodások (5/A és 5/C ábra) mind arra utalnak, hogy a PPV-vel fertőzött PT sejtekben a sejthalál fő formája nem az apoptózis, hanem a nekrozis. Emellett az is megállapítható, hogy a SAT fehérje hiányában a fertőzött sejtek hosszabb ideig megőrzik integritásukat, csökken mind a lizáló, mind az apoptotikus, mind a nekrotikus sejtek száma, ami ahhoz vezet, hogy az érett virionok csak később képesek kiszabadulni a fertőzött sejtekből.

Érdekes eredmény, hogy a vad típusú vírussal fertőzött sejtekből több DNáz emésztésre érzékeny (nem virionba csomagolt, részleges) virális DNS szabadul fel, mint

a mutáns vírussal fertőzöttekből (4/B ábra). Ennek a DNS-nek a különböző DNS-érzékelő receptorokon keresztül jelentős immun-stimulátor hatása lehet (Herrada és mtsai., 2012), aminek az onkolitikus parvovírusok terápiás felhasználása szempontjából is komoly jelentősége van (Marchini és mtsai., 2015).

A PPV-vel közeli rokonságban álló MVM és H-1PV esetében leírták, hogy aktív transzporttal, vezikulákban jut el a sejtmagból a citoplazmába, majd szabadul ki a sejtől (Bär és mtsai., 2008). Vizsgálataink során sem a vad típusú, sem a SAT⁻ mutáns vírusfertőzéskor nem tapasztaltuk összeépült vírus kapszidok megjelenését a citoplazmában, csak miután az elsődlegesen fertőzött sejtekből elkezdtek kiszabadulni az érett vírusok, és másodlagosan megfertőzték a megmaradt sejteket. Ennek alapján úgy gondoljuk, hogy a PPV fertőzéskor (legalábbis a PT sejtvonalon) a vezikuláris transzport nem játszik lényeges szerepet a vírus sejtekből való kijutásában.

7.2 Az ER stresszválasz aktiválódása és hatása a PPV terjedésére

Már számos, különböző családba tartozó vírusról leírták, hogy ER stresszt indukálnak a fertőzött sejtekben (Jordan és mtsai., 2002; Zhang és Wang, 2012; Chan, 2014; Dash és mtsai., 2016; Zhou és mtsai., 2016). A PPV-vel fertőzött sejtekben megfigyelt perinukleáris csomók, hólyagok megjelenése (6. ábra) az ER hálózat morfológiájának megváltozására, feldarabolódására utal, ami az ER stressz általános jele (Terrinoni és mtsai., 2004; Hübener és mtsai., 2011; Ngoh és mtsai., 2012). Ez, kiegészülve az Xbp1 és a CHOP megjelenésével, igazolja az UPR aktiválódását (Schönthal, 2012).

A fertőzött sejtek nagyjából 95%-ában expresszáldott Xbp1 és legalább 41%-ában aktiválódott CHOP (7. ábra) azt igazolja, hogy a PPV fertőzés a SAT fehérje hiányában is képes kiváltani az ER stresszt. A fertőzés késői szakaszában (60. óra után) a túlélő SAT⁻ vírussal fertőzött sejtekben, az Xbp1 újbóli megjelenését (7/C ábra) valószínűleg az éhezés okozza (Iurlaro és Muñoz-Pinedo, 2016), amit az is alátámaszt, hogy a fehérje aktiválódása a nem fertőzött sejteknél is kimutatható.

Annak ellenére, hogy az UPR korai, a homeosztázist visszaállítani hivatott szakaszában nem fedezhető fel különbség a vad típusú és a SAT⁻ vírusfertőzés között, a késői, az apoptózis irányába mutató szakaszban már karakteres eltérések láthatóak. A vad típusú vírus által expresszált SAT fehérje szignifikánsan több sejtben képes aktiválni a CHOP fehérje kifejeződését, mint amennyiben a SAT⁻ vírusfertőzés képes (76% szemben a 41%-kal), valamint a SAT fehérje jelenléte képes befolyásolni a CHOP sejten belüli lokalizációját (7/B ábra). Yu és mtsai. (2010) eredményeik alapján feltételezték,

hogy a CHOP fehérje lokalizációja a sejtek állapotától és a stresszhatás erősségétől függ és, hogy a fehérje sejtmagi megjelenése az erősebb ER stressz jele. Így lehetséges, hogy a SAT fehérje hiányában a vírus gyengébb ER stressz kiváltására képes. A CHOP ráadásul az ER stressz által okozott sejthalál egyik legfontosabb szabályozó fehérjeje (Marciniak és mtsai., 2004; Schönthal, 2012). Aktiválja több pro-apoptotikus fehérje (pl. GADD34, DR5, Ero1 α) transzkripcióját, míg az anti-apoptotikus Bcl-2 átíródását gátolja (Sano és Reed, 2013; Urra és mtsai., 2013). Ezek arra utalnak, hogy kapcsolat van a vad típusú vírusterjedésnél megfigyelt erősebb ER stressz és erősebb citopatogén hatások között. Ezzel szemben Han és mtsai. (2013) kimutatták, hogy transzfektált egér embrionális fibroblaszt sejtekben a CHOP önmagában, vagy az ATF4-gyel közösen transzfektálva nem fokozza a sejthalálban szerepet játszó gének expresszióját, csak érzékenyebbé teszi őket az ER stressz által előidézett sejthalálra. A CHOP expressziója mellett fokozott fehérje szintézisre és oxidatív stresszhatásra volt szükség a sejthalál indukálásához. A mi vizsgálataink azt mutatták, hogy a PT sejtekben a CHOP expressziója az apoptózisra jellemző, fragmentálódott sejtmagok megjelenéséhez (11/B ábra) és a legtöbb transzfektált sejt halálához vezetett a transzfekció 48. órájára. Az ellentmondásos eredmények azt sugallják, hogy a CHOP aktiválódásának végkimenetele függhet a sejtek típusától és aktuális állapotától is.

Az ER stressz és a vírusterjedés összefüggésének vizsgálata során három kémiai anyagot használtunk (DTT, MG132, thapsigargin), melyek eltérő módon váltják ki az ER stresszt, viszont mindhárom képes az UPR aktiválására (Yoshida és mtsai., 2001; Kondratyev és mtsai., 2007; Hammadi és mtsai., 2013). A DTT ezt a fehérjékben található diszulfid kötések felbontásával éri el (Cleland, 1964), ami hibás térszerkezetű fehérjék felhalmozódásához vezet. Az MG132 a proteaszómák működését blokkolja, ezáltal képes gátolni az ubiquitinálódott fehérjék lebontását (Lee és Goldberg, 1998), míg a thapsigargin a szarkoendoplazmás retikulumban található Ca²⁺-ATPáz működését blokkolja, ez pedig a citoplazma Ca²⁺ koncentrációjának a növekedéséhez vezet (Ali és mtsai., 1985). A használt vegyszerek az alkalmazott koncentrációkban mind képesek voltak elindítani az Xbp1 és a CHOP expresszióját (8/B ábra), és 48 órán belül a kezelt sejtek pusztulásához vezettek. Boisvert és mtsai. (2010) kimutatták, hogy a PPV NADL-2 fertőzés korai szakaszában kezdődő, tartósan fennálló MG132 kezelés blokkolja a fertőzést. A fertőzés 0-20. órája közötti kezelés 100%-kal, míg a 8-20. óra közötti 50%-kal csökkentette a fertőzött sejtek számát. Mi is tapasztaltunk hasonló gátlást a hosszantartó, vagy magasabb koncentrációjú kezelésekkor, mind a három kémiai anyag esetén, valamint az alkalmazott koncentrációban a thapsigargin és a DTT még toxikusnak is bizonyult a sejtek számára. Viszont az alacsony multiplicitással fertőzött sejtek rövid időtartamú (öt, illetve két óras) kezelése pozitív hatással volt mind a vad

típusú, mind a SAT⁻ vírusok terjedésére (8/A ábra). Továbbá, a DTT és az MG132 kezelés növelte a magas multiplicitással fertőzött sejtekből kiszabaduló vírusok kópiaszámát és titerét is (a thapsigargin az észlelt erősebb gátlóhatása miatt nem vizsgáltuk) (9/A és 9/C ábra). Ez arra utal, hogy a vegyszerek fertőzés gátló hatásait az UPR aktiválódásából fakadó pozitív hatások teljes mértékben képesek ellensúlyozni.

A fenti eredmények azt az elképzelést támogatják, hogy az ER stressz, vagy a sejt által rá adott válasz, megkönnyíti az érett virionok kiszabadulását a sejtekből. A kezelések hossza és időzítése viszont alapvetően befolyásolja a kísérletek eredményét, ami jelzi a vegyi anyagoknak a fertőzési folyamatokra gyakorolt ellentétes hatásai közötti érzékeny egyensúlyt. Az, hogy a mesterségesen, különböző utakon kiváltott ER stressz képes volt a SAT fehérje hiányát ellensúlyozni, megerősíti, hogy kapcsolat áll fenn az ER stressz kialakulása és a vírus gyorsabb terjedése között, valamint arra enged következtetni, hogy a SAT fehérje funkciója nem korlátozódik kizárólag a CHOP hatásának befolyásolására, módosítására, hanem általánosabban kötődik az ER stresszválaszhoz.

Mivel a kísérleteink megmutatták, hogy az UV fény nem aktiválja sem az Xbp1, sem a CHOP expresszióját (8/B ábra), ezért alkalmas volt, hogy alternatív stresszfaktorként bevonjuk a vizsgálatba. Korábbi eredmények alapján ismert, hogy az UV stressz segíti az adeno-asszociált vírusok (AAV) replikációját (Yakobson és mtsai., 1987; Yakinoglu és mtsai., 1988). Mi azonban azt találtuk, hogy hatására nem növekedett sem a vad típusú, sem a SAT⁻ PPV vírusok kópiaszáma (9/B ábra), sőt (valószínűleg a megnövekedett mutációs ráta miatt) csökkent a fertőzőképes vírusok mennyisége (9/C ábra). H-1PV vizsgálatokor Cornelis és mtsai. (1981) kaptak hasonló eredményeket. Ők sem tapasztalták, hogy az UV stressznek szignifikáns hatása lenne a vírus replikációjára, és az alkalmazott dózistól függően megnövekedett mutációs rátát mértek. Ez az eredmény alátámasztja, hogy a vegyszerek kezelésekkor tapasztalt pozitív hatások specifikusan az ER stresszhez köthetőek, nem pedig a sejt általános stressz állapotának a következményei.

7.3 A SAT-DsRed és CHOP-DsRed fúziós fehérjék hatása

A transzfektált SAT expressziójának hatása a PT sejtekre támogatta azt az elméletet, hogy a fehérje a PPV fertőzés során befolyásolja a CHOP lokalizációját és az ER stresszválasz kimenetelét úgy, hogy fokozza a stresszhatás erősségét, amely a CHOP sejtmagi megjelenéséhez vezet és pro-apoptotikus, vagy más útvonalak aktiválásával felgyorsítja a fertőzött sejtek pusztulását.

A SAT expressziója a vírusfertőzéshez hasonló morfológiai változásokat okozott a transzfektált sejtek ER-jában, valamint indukálta az apoptózist (10. ábra), viszont

önmagában nem tudta sem közvetlenül aktiválni az Xbp1 és a CHOP expresszióját, sem befolyásolni a CHOP sejten belüli lokalizációját (11. ábra). Ezek alapján feltételezhető, hogy a SAT hatásának kialakulásához, más vírus fehérjék jelenlétére is szükség van. Ugyanakkor, a megfigyelések szerint a plazmidról expresszálandó CHOP legtöbbször (egyéb körülményektől függetlenül) a sejtmagba vándorol (Jauhainen és mtsai., 2012), valamint lehetséges, hogy a kísérletben a DsRed fúziós partner is befolyásolhatta a SAT funkcionális kölcsönhatásait. Viszont a SAT-DsRed konstrukció funkcióképességét alátámasztja, hogy a kotranszfekciós kísérletekben a fúziós fehérje képes volt pótolni a hiányzó SAT hatását (11/C ábra).

A CHOP expressziója és sejtmagi megjelenése nem tudta semlegesíteni a pSAT⁻ fertőző klónnál kialakuló „lassú terjedésű” fenotípust (11/C ábra), ami arra utal, hogy a fehérje önmagában nem képes kiváltani azokat a transzkripciós változásokat, melyek az erősebb lízishez és a vírusok gyorsabb terjedéséhez vezetnek. Ez a megfigyelés megerősíti, hogy a SAT fehérjének nem kizárólagos funkciója a CHOP expressziójának stimulálása.

Mivel az erős ER stresszhatás képes helyettesíteni a SAT fehérjét, nagyon valószínű, hogy a SAT úgy képes az ER-ban befolyásolni a fehérje-fehérje interakciókat, hogy az erős ingere az UPR-nek. Ez a folyamat a PERK-eIF2 α -ATF4-CHOP útvonal aktiváláshoz vezet, amely utána további alternatív útvonalakat is bekapcsol. A CHOP hatása ezeknek a további útvonalaknak/fehérjéknek a hatásával kiegészülve, együttesen vezet a korábbi sejthalálhoz. A másik lehetőség, hogy a SAT az UPR mellett más ER stresszválasz útvonalakat is aktivál (pl. ER overload response: EOR, ER túltöltési válasz), és ezek hatásai önmagukban, vagy egymással kiegészülve vezetnek a korábbi sejthalálhoz, a gyorsabb lízishez.

7.4 A pézsmaréce-eredetű sejtvonalak permisszivitásának vizsgálata

A vírusok kópiaszámát az átoltási sorozat végén, a fertőzött sejtek felülúszójából állapítottuk meg. Mivel az eredeti szervhomogenizátumokban a virális genom 10⁶-10⁸ db/ml kópiaszámban volt jelen, ezért a tizedik átoltás után (ahol minden átoltás egy 10 \times -es hígításnak is megfelelt), a vírusok replikációjának hiányában már nem lehetett volna kimutatni.

A DHAV-1 fertőzéskor erős citopatogén hatást tapasztaltunk a sejteken, és itt mértük a legmagasabb kópiaszámokat is (10⁸/ml, amely három nagyságrenddel magasabb, mint a szervhomogenizátumban). 2012-ben kacsza embrionális fibroblaszt sejtekből kifejezetten a DHAV-1 termelésére kifejlesztettek egy sejtvonalat (Fu és mtsai.,

2012). A fertőzés utáni 84. órában 10^4 - 10^5 TCID/ml mennyiségű vírust tudtak kimutatni a felülúszóban, ami nehezen összevethető a mi eredményeinkkel, de nagyjából hasonló értékek tekinthető.

Az alacsony multiplicitású fertőzés (MOI: 0,01) során, az idő előrehaladtával, a DHAV-1 kópiaszáma nagyon hasonlóan változott a sejtek felülúszójában, a fertőzött sejtvonaltól függetlenül (12. ábra). Továbbá, a fertőzés (MOI: 0,01) 72. órájánál kapott eredmények szinte megegyeztek az átoltási sorozat végén kapott kópiaszámokkal, pedig a kiindulási szervhomogenizátumok kópiaszámai (4. táblázat) alapján, a fertőzéseknek ott legalább egy körüli multiplicitása volt. Mindez magyarázható azzal, hogy a DHAV-1 fertőzés esetében, a termelődött vírusok mennyisége viszonylag független a fertőzés körülményeitől (alacsony vagy magas multiplicitás) és a fertőzött AGE1 sejtek típusától.

A DuCV fertőzéskor soha nem tapasztaltunk citopatogén hatást, és a mért kópiaszámok is alacsonyak maradtak (nagyjából 10^5 /ml), ezért annak ellenére, hogy a vírus replikálódott a sejtekben, úgy véljük, hogy az AGE1 sejtvonalak a DuCV fertőzés szempontjából szemi-permisszívek. A DuCV kimutatására kidolgoztak már PCR (Chen és mtsai., 2006), real-time PCR (Wan és mtsai., 2011) és ELISA (Liu és mtsai., 2010) alapú módszereket, ugyanakkor az említett publikációkban a szerzők mind kitérnek arra, hogy a diagnosztikai eljárások szempontjából hátrányos, hogy jelenleg nem áll rendelkezésre olyan sejtvonaltól, mely segítségével a vírus *in vitro* tanulmányozható lenne. Ezért úgy gondoljuk, hogy érdemes lenne további vizsgálatokat folytatni a permisszivitás tisztázása érdekében, mivel egy használható, immortalizált sejtvonaltól nem csak új diagnosztikai eljárásokat tenne lehetővé, hanem a további kutatásokat is nagyban segíthetné.

A GHPV kópiaszámai viszonylag nagy szórást mutattak (10^4 - 10^7 /ml), ami összevetve azzal, hogy ennél a vírussal tapasztaltuk a legnagyobb eltérést a szaporodási görbékben a sejtvonalak között (12. ábra) arra utal, hogy a GHPV érzékenyebb a gazdasejtek közötti apró, biológiai különbségekre, mint a többi vizsgált vírus. Ugyanakkor a fertőzéskor megjelenő citopatogén hatások jelenléte, vagy hiánya nem volt egyértelműen köthető egyik sejtvonaltól sem, ez pedig a fertőzés egyéb körülményeinek (multiplicitás, sejtek állapota) fontosságára utal. Gelfi és mtsai. (2010) speciálisan a GHPV termelésére optimalizált körülmények között, primer vese sejtek felülúszójában 5×10^{11} /ml-es kópiaszámot mértek. Mivel a pézsmaréce természetes körülmények között ellenálló a GHPV okoztateteggel szemben (Guérin, 2008; Corrand és mtsai., 2011), ezért szaporodása az AGE1 sejtvonalakon előre vetíti az expresszált adenovírus gének szerepét a sejtvonalak permisszivitásában. Mivel a vírust korábban csak embrionált tojásokban vagy elsődleges sejtekben sikerült szaporítani

(Guérin és mtsai., 2000; Bernáth és mtsai., 2006), így ezek az első immortalizált sejtvonalak, amelyek permisszívnek bizonyultak a GHPV fertőzés számára.

A GPV fertőzés az összes sejtvonalon citopatogén hatások megjelenéséhez vezetett. Míg a legmagasabb kópiaszámokat a CS sejtvonalnál kaptuk, addig a szaporodási görbék vizsgálata azt mutatta, hogy a CRpIX sejtek felülúszójában növekszik leggyorsabban a virális nukleinsav mennyisége (12. ábra). Ugyanakkor a szaporodási görbék egy alacsony multiplicitású fertőzésnél (MOI: 0,01) határoztuk meg, míg az átoltások során inkább magas multiplicitást alkalmaztunk. Könnyen lehetséges (a PPV vizsgálatok mi is tapasztaltuk), hogy a magas és alacsony multiplicitású fertőzés szaporodási görbéje eltér egymástól, legalábbis a CS sejtvonala esetében.

Mivel GPV replikációját már bizonyították adenovírus 5-tel transzformált HEK sejtekben (Malkinson és Winocour, 2005), várható volt, hogy az adenovírus géneket kifejező AGE1 sejtekben is képes lesz szaporodni. Malkinson és Winocour. (2005) magas multiplicitással fertőzték a sejteket, és a termelődött vírusok mennyisége közel azonos volt azzal, amit mi az alacsony multiplicitású fertőzés 72. órájában mértünk a CS és a CR sejtek felülúszójában.

Az eredmények azt mutatták, hogy a DuCV, a DHAV-1, a GHPV és a GPV képes replikálódni az AGE1 sejtvonalakon. Az utóbbi három vírus esetén IF festéssel igazolni tudtuk a virális fehérjék megjelenését is a fertőzött sejtekben (13. ábra). Úgy gondoljuk tehát, hogy a fertőzés és a környezeti körülményektől függetlenül, az AGE1 sejtvonalak permisszívek a DHAV-1, a GHPV és a GPV számára. Ezzel szemben a DuCV esetében, az IF festéssel történt megerősítés hiánya és az alacsony kópiaszám miatt szemi-permisszíveknek tartjuk őket. Az is látható, hogy a termelődött GHPV és a GPV mennyisége erősen függött a fertőzés multiplicitásától és a sejtípustól. Megfelelően optimalizált körülmények alkalmazásával tehát magasabb kópiaszámok is elérhetőek lehetnek.

7.5 Az AGE1 sejtvonalak fogékonysága a fertőzésre és a vírusok ciklusideje a CRpIX sejtvonalon

A vírusok ciklusidejét magas és alacsony multiplicitású fertőzések (MOI: 2 és 0,01) kombinált használatával állapítottuk meg. Általánosan megfigyelhető volt, hogy az alacsony multiplicitású fertőzéskor az első fertőzött sejteket két órával későbbi időpontban tudtuk csak detektálni, mint a magas multiplicitáskor, ami ismételt igazolása annak, hogy a vírusok mennyiségétől függően eltérő lehet a fertőzés lefolyása. Felvetődik továbbá az a lehetőség is (különösen az önálló replikációra nem képes DNS

vírusoknál), hogy a sejtciklus megfelelő fázisában lévő sejtek alacsonyabb aránya a vírusok mennyiségéhez képest is felelős lehetett a fertőzött sejtek későbbi megjelenéséért.

Utóbbi megerősíti az is, hogy az RNS genomját a sejt replikációs mechanizmusaitól függetlenül lemásolni képes DHAV-1-nek volt a legrövidebb a ciklusideje (10-14 óra), illetve a legmagasabb a fertőzőképessége. A CRpIX sejtvonalon 55 vírus elégséges volt egy fertőzött sejt megjelenéséhez (14. ábra), ami a legalacsonyabb mért érték volt, bár nagy eltéréseket (hasonlóan a szaporodási görbe alakjához) nem észleltünk a különböző sejtvonalak között. Összefoglalva azt mondhatjuk, hogy a DHAV-1 sejtciklustól független replikációja, a gyorsabb ciklusideje és a magas fertőzőképessége, a szaporodási görbéjének a meredekséget (12. ábra) és a felülúszóban mért magasabb kópiaszámát (4. táblázat) is magyarázhatja.

A saját polimeráz enzimmel nem rendelkező GHPV és GPV ciklusideje nagyon hasonló volt (12-16 óra), viszont a GHPV esetében két órával későbbre tolódott mind az első fertőzött sejtek, mind a másodlagosan fertőzött sejtek megjelenése (16. illetve 30. óra). A két vírus fertőzőképessége a CS és a CRpIX sejtvonalon közel azonos volt, viszont a GHPV fertőzésre a CR sejtvonal bizonyult a legfogékonyabbnak. Ugyanakkor éppen a CR sejtvonalon volt a legalacsonyabb a termelődött vírusok mennyisége, ezért mi a vizsgált sejtvonalak közül a GHPV szaporítására is a CRpIX-et tartjuk a legalkalmasabbnak.

A fertőzőképességi vizsgálatoknál kapott eredményeket úgy is értelmezhetjük, mint annak a meghatározását, hogy az egyes sejtvonalak fertőzésekor mennyi vírus az IF festés kimutatási határa. Így az elvégzett kísérlet elegáns bemutatása annak, hogy a real-time és az IF módszerek közös használatával nyert eredmények mind az alap kutatás, mind a diagnosztika számára értékesek lehetnek. Az általunk alkalmazott SYBR Green alapú real-time PCR módszer érzékenysége (a kimutatási határ 24-154 kópia között volt) fél-egy nagyságrenddel magasabb volt, mint az, amelyet az IF festéssel el tudunk érni. Ez a különbség viszont még kifinomultabb PCR technikák (pl. TaqMan módszer) használatával (Zhang és mtsai., 2008; Blanchard és mtsai., 2014) tovább fokozható.

Felmerül a kérdés, hogy az alapvetően humán vakcinavírusok termeltetésére kifejlesztett (Jordan és mtsai., 2009) AGE1 sejtvonalak, miért bizonyultak alkalmasnak a DHAV-1, DuCV, GHPV és GPV szaporítására? Mindhárom sejtvonal stabilan expresszálja a humán adenovírus 5-ből származó E1A és E1B géneket, amelyekről már ismert, hogy képesek befolyásolni a gazdasejt géneinek expressziós mintázatát és előidézni a sejtciklus előrehaladását (Sears és Nevins, 2002). A DuCV, GHPV és GPV kisméretű DNS vírusok, melyek saját DNS polimeráz hiányában erősen függenek az

osztódó sejtek replikációs mechanizmusaitól. Viszont önmagában az aktív celluláris replikációs gépezet jelenléte nem képes megmagyarázni az AGE1 sejtvonalak permisszivitását, hiszen több esetben primer sejtek vagy immortalizált sejtvonalak (hiába voltak osztódó képesek) sem támogatták az említett vírusok szaporodását.

A CR, CRpIX és CS sejtvonalak stabilan expresszálják az E1A szabályozó fehérjét, amelyről korábbi vizsgálatok már kimutatták, hogy módosítja a fertőzött sejtben kialakuló antivirális választ (Anderson és Fennie, 1987; Leonard és Sen, 1997). A CRpIX sejtvonala, amely eredményeink alapján a legalkalmasabb volt a vizsgált vírusok szaporítására, a IX jelű fehérjét is kifejezi. Ismert, hogy a IX-es adenovírus fehérje egy többfunkciós protein, mely egyedül vagy az E1A fehérjével közösen befolyásolja egyes gének transzkripcióját (Lutz és mtsai., 1997), szabályozza az apoptózist (Quignon és mtsai., 1998; Zhong és mtsai., 2000), módosítja az antivirális folyamatokat (Chee és mtsai., 2003) és indukálja a hősokk chaperone-ok működését (Jordan és mtsai., 2009). Feltételezhető tehát, hogy az adenovírus fehérjék befolyása a veleszületett immunrendszer és az antivirális gének jelátviteli útvonalaira is hozzájárul a sejteknél megfigyelt permisszivitáshoz. Ezt megerősíti az a több esetben leírt megfigyelés, hogy az RNS genomját a gazdasejt DNS polimerázától függetlenül lemásoló DHAV-1 vagy influenza vírus képes szaporodni adenovírus fehérjéket kifejező sejtvonalakon (Gooding és mtsai., 1991; Hashimoto és mtsai., 1991; White és mtsai., 1992; Debbas és White, 1993).

8. Új tudományos eredmények

1. Bizonyítottuk, hogy SAT hiányában a PPV Kresse törzsben is kialakul a „lassú terjedés” fenotípus, amely a SAT⁻ PPV törzsek általános tulajdonságának tűnik, és oka, hogy a SAT fehérje hiányában a sejtek hosszabb ideig megőrzik integritásukat, a fertőzés korai szakaszában csökken a sejtlízis mértéke.
2. Kimutattuk, hogy a PPV Kresse vírussal fertőzött PT sejtekben, a SAT jelenlététől függetlenül aktiválódik az ER stresszválaszban szerepet játszó Xbp1, illetve a SAT hiányában szignifikánsan kevesebb fertőzött sejtben aktiválódik a sejthalál kiváltásában szerepet játszó CHOP, és megváltozik a sejten belüli lokalizációja.
3. Az ER stresszválasz kémiai anyagokkal (DDT, MG132, thapsigargin) való kiváltásával igazoltuk, hogy az ER stressz kialakulása a fertőzött sejtekben együtt jár a PPV Kresse vírus gyorsabb terjedésével.
4. PT sejtekben expresszált SAT vizsgálatok arra a következtetésre jutottunk, hogy a fehérje önmagában nem képes sem az Xbp1, sem a CHOP fehérje transzkripciójának aktiválására, illetve a CHOP expressziója és sejtmagi lokalizációja önmagában nem magyarázza a vad típusú vírus gyorsabb terjedését.
5. Vizsgálataink során bizonyítottuk, hogy az AGE1.CR, AGE1.CRpIX és AGE1.CS sejtvonalak permisszívek a DHAV-1, a GHPV és a GPV fertőzésre és szemi-permisszívek a DuCV számára.
6. Mindhárom sejtvonalon meghatároztuk a DuCV, DHAV-1, GHPV és GPV szaporodási görbéjét, és kimutattuk, hogy a DHAV-1 és GPV fertőzésre a CRpIX, míg a GHPV fertőzésre a CR sejtvonal a legfogékonyabb.

9. Irodalomjegyzék

Alexandrov, M., Alexandrova, R., Alexandrov, I., Zacharieva, S., Lasarova, S., Doumanova, L., Peshev, R., Donev, T.: **Fluorescent and electron-microscopy immunoassays employing polyclonal and monoclonal antibodies for detection of goose parvovirus infection**, J. Virol. Methods, 79. 21–32, 1999.

Ali, H., Christensen, S.B., Foreman, J.C., Pearce, F.L., Piotrowski, W., Thastrup, O.: **The ability of thapsigargin and thapsigarginin to activate cells involved in the inflammatory response**, Br. J. Pharmacol., 85. 705–712, 1985.

Anchun, C., Mingshu, W., Hongyi, X., Dekang, Z., Xinran, L., Haijue, C., J. Renyong, J., Miao, Y.: **Development and application of a reverse transcriptase polymerase chain reaction to detect Chinese isolates of duck hepatitis virus type 1**, J. Microbiol. Methods, 77. 332–336, 2009.

Anderson, K.P., Fennie, E.H.: **Adenovirus early region 1A modulation of interferon antiviral activity**, J. Virol., 61. 787–795, 1987.

Asplin, F. D.: **An attenuated strain of duck hepatitis virus**, Vet. Rec., 70. 1226–1230, 1958.

Asplin, F.D.: **Notes on epidemiology and vaccination for virus hepatitis of ducks**, Off. Int. Epizoot. Bull., 56. 793–800, 1961.

Banda, A., Galloway-Haskins, R.I., Sandhu, T.S., Schat, K.A.: **Genetic analysis of a duck circovirus detected in commercial Pekin ducks in New York**, Avian Dis., 51. 90–95, 2007.

Bao, Y., Howell, S.H.: **The unfolded protein response supports plant development and defense as well as responses to abiotic stress**, Front. Plant. Sci., 8. 344, 2017.

Bär, S., Daeflner, L., Rommelaere, J., Nüesch, J.P.: **Vesicular egress of non-enveloped lytic parvoviruses depends on gelsolin functioning**, PLoS Pathog., 4. e1000126, 2008.

Bergeron, J., Hébert, B., Tijssen, P.: **Genome organization of the Kresse strain of porcine parvovirus: identification of the allotropic determinant and comparison with those of NADL-2 and field isolates**, J. Virol., 70. 2508–2515, 1996.

Bergeron, J., Menezes, J. and Tijssen, P.: **Genomic organization and mapping of transcription and translation products of the NADL-2 strain of porcine parvovirus**, Virology, 197. 86–98, 1993.

Bernáth, S., Farsang, A., Kovács, A., Nagy, E., Dobos-Kovács, M.: **Pathology of goose hemorrhagic polyomavirus infection in goose embryos**, Avian Pathol., 35. 49–52, 2006.

Berridge, M.J., Lipp, P., Bootman, M.D.: **The versatility and universality of calcium signalling**, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 1. 11–21, 2000.

Blanchard, P., Guillot, S., Antùnez, K., Köglberger, H., Kryger, P., de Miranda, J.R., Franco, S., Chauzat, M.P., Thiéry, R., Ribière, M.: **Development and validation of a real-time two-step RT-qPCR TaqMan® assay for quantitation of Sacbrood virus (SBV) and its application to a field survey of symptomatic honey bee colonies**, *J. Virol. Methods*, 197. 7–13, 2014.

Boisvert, M., Fernandes, S., Tijssen, P.: **Multiple pathways involved in porcine parvovirus cellular entry and trafficking toward the nucleus**, *J. Virol.*, 84. 7782–7792, 2010.

Braakman, I., Bulleid, N.J.: **Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum**, *Annu. Rev. Biochem.*, 80. 71–99, 2011.

Brown, K.E., Green, S.W., Young N.S.: **Goose parvovirus – an autonomous member of Dependovirus genus?**, *Virology*, 210. 283–91, 1995.

Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J.H., Hubbard, S.R., Harding, H.P., Clark, S.G., Ron, D.: **IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA**, *Nature*, 415. 92–96, 2002.

Cao, J., Ou, X., Zhu, D., Ma, G., Cheng, A., Wang, M., Chen, S., Jia, R., Liu, M., Sun, K., Yang, Q., Wu, Y., Chen, X.: **The 2A2 protein of Duck hepatitis A virus type 1 induces apoptosis in primary cell culture**, *Virus Genes*, 52. 780-788, 2017.

Cartwright, S.F., Lucas, M., Huck, R.A.: **A small haemagglutinating porcine DNA virus. I. Isolation and properties**, *J. Comp. Pathol.*, 79. 371–377, 1969.

Chan, S.W.: **The unfolded protein response in virus infections**, *Front. Microbiol.*, 5. 518, 2014.

Chang, P.C., Shien, J.H., Wang, M.S., Shieh, H.K.: **Phylogenetic analysis of parvoviruses isolated in Taiwan from ducks and geese**, *Avian Pathol.*, 29. 45–49, 2000.

Chee, A.V., Lopez, P., Pandolfi, P.P., Roizman, B.: **Promyelocytic leukemia protein mediates interferon-based anti-Herpes simplex virus 1 effects**, *J. Virol.*, 77. 7101–7105, 2003.

Chen, A.Y., Qiu, J.: **Parvovirus infection-induced cell death and cell cycle arrest**. *Future Virol.*, 5. 731–743, 2010.

Chen, C.L., Wang, P.X., Lee, M.S., Shien, J.H., Shien, H.K., Ou, S.J., Chen, C.H., Chang, P.C.: **Development of a polymerase chain reaction procedure for detection and differentiation of duck and goose circovirus**, *Avian Dis.*, 50. 92–95, 2006.

Chen, X., Shen, J., Prywes, R.: **The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi**, *J. Biol. Chem.*, 277. 13045–13052, 2002.

Choi, C.S., Molitor, T.W., Joo, H.S., Gunther, R.: **Pathogenicity of a skin isolate of porcine parvovirus in swine fetuses**, *Vet. Microbiol.*, 15. 19–29, 1987.

Cleland, W.W.: **Dithiothreitol, a new protective reagent for SH groups**, *Biochemistry*, 3. 480–482, 1964.

Corazzari, M., Gagliardi, M., Fimia, G.M., Piacentini, M.: **Endoplasmic reticulum stress, unfolded protein response, and cancer cell fate**, *Front. Oncol.*, 7. 78, 2017.

Cornelis, J.J., Su, Z.Z., Ward, D.C., Rommelaere, J.: **Indirect induction of mutagenesis of intact parvovirus H-1 in mammalian cells treated with UV light or with UV-irradiated H-1 or simian virus 40**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 78. 4480–4484, 1981

Corrand, L., Gelfi, J., Albaric, O., Etievant, M., Pingret, J.L., Guerin, J.L.: **Pathological and epidemiological significance of goose haemorrhagic polyomavirus infection in ducks**, *Avian Pathol.*, 40. 355-360, 2011.

Dash, S., Chava, S., Aydin, Y., Chandra, P.K., Ferraris, P., Chen, W., Balart, L.A., Wu, T., Garry, R.F.: **Hepatitis C virus infection induces autophagy as a prosurvival mechanism to alleviate hepatic ER-stress response**, *Viruses*, 8. pii: E150, 2016.

Daeffler, L., Horlein, R., Rommelaere, J., Nuesch, J.P.: **Modulation of minute virus of mice cytotoxic activities through site-directed mutagenesis within the NS coding region**, *J. Virol.*, 77. 12466–12478, 2003.

Debbas, M., White, E.: **Wild-type p53 mediates apoptosis by E1A, which is inhibited by E1B**, *Genes Dev.*, 7. 546–554, 1993.

Demirtas, L., Guclu, A., Erdur, F.M., Akbas, E.M., Ozcicek, A., Onk, D., Turkmen, K.: **Apoptosis, autophagy & endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus**, *Indian J. Med. Res.*, 144. 515–524, 2016.

Derzsy, D.: **A viral disease of goslings. I. Epidemiological, clinical, pathological and aetiological studies**, *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.*, 17. 443–448, 1967.

Derzsy, D., Drén, C., Szedö, M., Surján, J., Tóth, B., Iró, E.: **Viral disease of goslings. 3. Isolation, properties and antigenic pattern of the virus strains**, *Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae*, 20. 419–428, 1970.

Fabricant, J., Rickard, C.G., Levine, P.P.: **The pathology of duck virus hepatitis**, *Avian Dis.*, 1. 256–275, 1957.

Fels, D.R., Koumenis, C.: **The PERK/eIF2 α /ATF4 module of the UPR in hypoxia resistance and tumor growth**, *Cancer Biol. Ther.*, 5. 723–728, 2006.

Fernandes, S., Boisvert, M., Szelej, J., Tijssen, P.: **Differential replication of two porcine parvovirus strains in bovine cell lines ensues from initial DNA processing and NS1 expression**, *J. Gen. Virol.*, 95. 910–921, 2014.

Flamment, M., Hajduch, E., Ferré, P., Fougère, F.: **New insights into ER stress-induced insulin resistance**, *Trends Endocrinol. Metab.*, 23. 381-90, 2012.

Fringuelli, E., Scott, A.N., Beckett, A., McKillen, J., Smyth, J.A., Palya, V., Glavits, R., Ivanics, E., Mankertz, A., Franciosini, M.P., Todd, D.: **Diagnosis of duck circovirus infections by conventional and realtime polymerase chain reaction tests**, *Avian Pathol.*, 34, 495–500, 2005.

Fu, Y., Chen, Z., Li, C., Liu, G.: **Establishment of a duck cell line susceptible to duck hepatitis virus type 1**, *J. Virol. Methods*, 184. 41–45, 2012.

Fujisaki, Y., Ichihara, T., Sasaki, N.: **Field trials on inactivated porcine parvovirus vaccine for prevention of viral stillbirth among swine**, *Natl. Inst. Anim. Health Q. (Tokyo)*, 18. 185, 1978.

Gelfi, J., Pappalardo, M., Claverys, C., Peralta, B., Guérin, J.L.: **Safety and efficacy of an inactivated Carbopol-adjuvanted goose haemorrhagic polyomavirus vaccine for domestic geese**, *Avian Pathol.*, 39. 111–116, 2010.

Georgen, J.L., Marc, A., Engasser, J.M.: **Determination of cell lysis and death kinetics in continuous hybridoma cultures from the measurement of lactate dehydrogenase release**, *Cytotechnology*, 11. 189–195, 1993.

Golubnich, V.P., Tishchenko, G.P., Korolkov, V.I.: **Preparation of tissue culture antigens of duck hepatitis virus**, *Vet. Nauk. Proiz. Tr. (Minsk)*, 14. 88–90, 1976.

Gooding, L.R., Aquino, L., Duerksen-Hughes, P.J., Day, D., Horton, T.M., Yei, S., Wold, W.S.M.: **The E1B-19K protein of group C adenoviruses prevents cytolysis by tumor necrosis factor of human cells but not mouse cells**, *J. Virol.*, 65. 3083–3094, 1991.

Gough, R. E., Spackman, D.: **Studies with a duck embryo adapted goose parvovirus vaccine**, *Avian Pathol.*, 11. 503–10, 1982.

Guérin J.L.: **Hemorrhagic nephritis enteritis of geese**. In: *Disease of Poultry*. Szerk.: Saif, Y.M., Fadly, A.M., Glisson, J.R., McDougald L.R., Nola, L.K., Swayne D.E. Ames: Blackwell Publishing, 2008. p. 393–396.

Guérin, J.L., Gelfi, J., Dubois, L., Vuillaume, A., Boucraut-Baralon, C., Pingret, J.L.: **A novel polyomavirus goose hemorrhagic polyomavirus is the agent of hemorrhagic nephritis enteritis of geese**, *J. Virol.*, 74. 4523–4529, 2000.

Gupta, S.K., Sahoo, A.P., Rosh, N., Gandham, R.K., Saxena, L., Singh, A.K., Harish, D.R., Tiwari, A.K.: **Canine parvovirus NS1 induced apoptosis involves**

mitochondria, accumulation of reactive oxygen species and activation of caspases, *Virus Res.*, 213. 46–61, 2016.

Hammadi, M., Oulidi, A., Gackière, F., Katsogiannou, M., Slomianny, C., Roudbaraki, M., Dewailly, E., Delcourt, P., Lepage, G., Lotteau, S., Ducreux, S., Prevarskaya, N., Van Coppenolle, F.: **Modulation of ER stress and apoptosis by endoplasmic reticulum calcium leak via translocon during unfolded protein response: involvement of GRP78**, *FASEB J.*, 27. 1600–1609, 2013.

Han, J., Back, S.H., Hur, J., Lin, Y.H., Gildersleeve, R., Shan, J., Yuan, C.L., Krokowski, D., Wang, S., Hatzoglou, M., Kilberg, M.S., Sartor, M.A., Kaufman, R.J.: **ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death**, *Nat Cell Biol.*, 15. 481–490, 2013.

Hanson, L. E., Tripathy, D.N.: **Oral immunization of ducklings with attenuated duck hepatitis virus**. *Dev. Biol. Standardization*, 33. 357–363, 1976.

Harding, H.P., Zhang, Y., Bertolotti, A., Zeng, H., Ron, D.: **Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response**. *Mol. Cell*, 5. 897–904, 2000.

Hashimoto, S., Ishii, A., Yonehara, S.: **The E1B oncogene of adenovirus confers cellular resistance to cytotoxicity of tumor necrosis factor and monoclonal anti-Fas antibody**, *Int. Immunol.*, 3. 343–351, 1991.

Hattermann, K., Schmitt, C., Soike, D., Mankertz, A.: **Cloning and sequencing of duck circovirus (DuCV)**, *Arch. Virol.*, 148. 2471–2480, 2003.

Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., Mori, K.: **Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress**, *Mol. Biol. Cell.*, 10. 3787–99, 1999.

Healy, S.J.M., Gorman, A.M., Mousavi-Shafaei, P., Gupta, S., Samali, A.: **Targeting the endoplasmic reticulum-stress response as an anticancer strategy**, *Eur. J. of Pharmacol.*, 625. 234–246, 2009.

Hermonat, P.L., Santin, A.D., De Greve, J., De Rijcke, M., Bishop, B.M., Han, L., Mane, M., Kokorina, N.: **Chromosomal latency and expression at map unit 96 of a wild-type plus adeno-associated virus (AAV)/Neo vector and identification of p81, a new AAV transcriptional promoter**, *J. Hum. Virol.*, 2. 359–368, 1999.

Herrada, A.A., Rojas-Colonelli, N., González-Figueroa, P., Roco, J., Oyarce, C., Ligtenberg, M.A., Lladser, A.: **Harnessing DNA-induced immune responses for improving cancer vaccines**, *Hum. Vaccin. Immunother.*, 8. 1682–1693, 2012.

Hlinak, A., Muller, T., Kramer, M., Mühle, R.U., Liebherr, H., Ziedler, K.: **Serological survey of viral pathogens in bean and white-fronted geese from Germany**, *J. Wildl. Dis.*, 34. 479–86, 1998.

Hoekstra, J., Smit, T., Van Brakel, C.: **Observations on host range and control of goose virus hepatitis**, *Avian Pathol.*, 2. 169–78, 1973.

Hohdatsu, T., Baba, K., Ide, S., Tsuchimoto, M., Nagano, H., Yamagami, T., Yamagishi, H., Fujisaki, Y., Matumoto, M.: **Detection of antibodies against porcine parvovirus in swine sera by enzyme-linked immunosorbent assay**, *Vet. Microbiol.*, 17. 11–19, 1988.

Hristov, M., Erl, W., Linder, S., Weber, P.C.: **Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro**. *Blood*, 104. 2761–2766, 2004.

Hughes, P.J., Stanway, G.: **The 2A proteins of three diverse picornaviruses are related to each other and to the H-rev107 family of proteins involved in the control of cell proliferation**, *J. Gen. Virol.*, 81. 201–207, 2000.

Hurtley, S.M., Bole, D.G., Hoover-Litty, H., Helenius, A., Copeland, C.S.: **Interactions of misfolded influenza virus hemagglutinin with binding protein (BiP)**, *J. Cell. Biol.*, 108. 2117–26, 1989.

Hübener, J., Vauti, F., Funke, C., Wolburg, H., Ye, Y., Schmidt, T., Wolburg-Buchholz, K., Schmitt, I., Gardyan, A., Driessen, S., Arnold, H.H., Nguyen, H.P., Riess, O.: **N-terminal ataxin-3 causes neurological symptoms with inclusions, endoplasmic reticulum stress and ribosomal dislocation**, *Brain*, 134. 1925–1942, 2011.

Hwang, J.: **Susceptibility of poultry to duck hepatitis viral infection**. *Am. J. Vet. Res.*, 35. 477–479, 1974.

Iurlaro, R., Muñoz-Pinedo, C.: **Cell death induced by endoplasmic reticulum stress**, *FEBS J.*, 283. 2640–52, 2016.

Jauhiainen, A., Thomsen, C., Strömbom, L., Grundevik, P., Andersson, C., Danielsson, A., Andersson, M.K., Nerman, O., Rökvist, L., Ståhlberg, A., Åman, P.: **Distinct cytoplasmic and nuclear functions of the stress induced protein DDIT3/CHOP/GADD153**, *PLoS One*, 7. e33208, 2012.

Jäger, R., Bertrand, M.J., Gorman, A.M., Vandenabeele, P., Samali, A.: **The unfolded protein response at the crossroads of cellular life and death during endoplasmic reticulum stress**, *Biol. Cell*, 104. 259–270, 2012.

Jenkins, C.E.: **An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of porcine parvovirus in fetal tissues**, *J. Virol. Methods*, 39. 179–84, 1992.

Johnson, R.H., Collings, D.F.: **Experimental infection of piglets and pregnant gilts with a parvovirus**, *Vet. Rec.*, 85. 446–447, 1969.

Joo, H.S., Donaldson-Wood, C.R., Johnson, R.H.: **Observations on the pathogenesis of porcine parvovirus infection**, *Arch. Virol.*, 51. 123–9, 1976.

Joo, H.S., Johnson, R.H.: **Serological responses in pigs vaccinated with inactivated porcine parvovirus**, *Aus. Vet. J.*, 53. 550–552, 1977.

Jordan, I., Vos, A., Beilfuß, S., Neubert, A., Breul, S., Sandig, V.: **An avian cell line designed for production of highly attenuated viruses**, *Vaccine*, 27. 748–756, 2009.

Jordan, I., Northoff, S., Thiele, M., Hartmann, S., Horn, D., Höwing, K., Bernhardt, H., Oehmke, S., von Horsten, H., Rebeski, D., Hinrichsen, L., Zelnik, V., Mueller, W., Sandig, V.: **A chemically defined production process for highly attenuated poxviruses**, *Biologicals*, 39. 50–58, 2011.

Jordan, R., Wang, L., Graczyk, T.M., Block, T.M., Romano, P.R.: **Replication of a cytopathic strain of bovine viral diarrhea virus activates PERK and induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis of MDBK cells**, *J. Virol.*, 76. 9588–9599, 2002.

Kardi, V., Szegletes, E.: **Use of ELISA procedures for the detection of Derzsy's disease virus of geese and of antibodies produced against it**, *Avian Pathol.*, 25. 25–34, 1996.

Kelemen, M., Nagy, J., Erdei, J.: **A Derzsy-betegség megelőzésének lehetőségei**, *Magy. Allatorvosok*, 119. 732–36, 1997.

Kim, M.C., Kwon, Y.K., Joh, S.J., Lindberg, A.M., Kwon, J.H., Kim, J.H., Kim, S.J.: **Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1 reveals a novel lineage close to the genus Parechovirus in the family Picornaviridae**, *J. Gen. Virol.*, 87. 3307–3316, 2006.

Kim, M.C., Kwon, Y.K., Joh, S.J., Kwon, J.H., Kim, J.H., S. J. Kim, S.J.: **Development of one-step reverse transcriptase-polymerase chain reaction to detect duck hepatitis virus type 1**, *Avian Dis.*, 51. 540–545, 2007.

Kisary, J.: **Immunological aspects of Derzsy's disease in goslings**, *Avian Pathol.*, 6. 327–34, 1977.

Kisary, J.: 1993. **Haemorrhagic nephritis and enteritis of geese**. In: *Virus Infection of Birds*. Szerk.: McFerran, J.B., McNulty, M.S. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1993. p. 513–514.

Kisary, J.: **Derzsy's disease of geese**. In: *Virus Infection of Birds*. Szerk.: McFerran, J.B., McNulty, M.S. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1993. p. 157–62.

Kisary, J., Derzsy, D.: **Viral disease of goslings. IV. Characterization of the causal agent in tissue culture system**, *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.*, 24. 287–92, 1974.

Kisary, J., Derzsy, D., Mészáros, J.: **Attenuation of the goose parvovirus strain B. Laboratory and field trials of the attenuated mutant for vaccination against Derzsy's disease**, *Avian Pathol.*, 7. 397–406, 1978.

Kisary, J., Tóth, K.: **Humorális ellenanyagválasz felnőtt libákban és utódaikban a RecobiVac-S vakcina hatására**, *Magy. Allatorvosok*, 119. 94–96, 1997.

Kondratyev, M., Avezov, E., Shenkman, M., Groisman, B., Lederkremer, G.Z.: **PERK-dependent compartmentalization of ERAD and unfolded protein response machineries during ER stress**, *Exp. Cell Res.*, 313. 3395–407, 2007.

Koonin, E.V., Dolja, V.V.: **Evolution and taxonomy of positive-strand RNA viruses: implications of comparative analysis of amino acid sequences**, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 28. 375–430, 1993.

Korzeniewski, C., Callewaert, D.M.: **An enzyme-release assay for natural cytotoxicity**, *J. Immunol. Methods*, 64. 313–320, 1983.

Kresse, J.I., Taylor, W.D., Stewart, W.W., Eernisse, K.A.: **Parvovirus infection in pigs with necrotic and vesicle-like lesions**, *Vet. Microbiol.*, 10. 525–31, 1985.

Lacroux, C., Andreoletti, O., Payre, B., Pingret, J.L., Dissais, A., Guerin, J.L.: **Pathology of spontaneous and experimental infections by Goose haemorrhagic polyomavirus**, *Avian Pathol.*, 33. 351-8358, 2004.

Lee, D.H., Goldberg, A.L.: **Proteasome inhibitors cause induction of heat shock proteins and trehalose, which together confer thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae***, *Mol. Cell. Biol.*, 18. 30–38, 1998.

Lee, K., Tirasophon, W., Shen, X., Michalak, M., Prywes, R., Okada, T., Yoshida, H., Mori, K., Kaufman, R.J.: **IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response**, *Genes Dev.*, 16. 452–66, 2002

Legrand, C., Bour, J.M., Jacob, C., Capiaumont, J., Martial, A., Marc, A., Wudtke, M., Kretzmer, G., Demangel, C., Duval, D.: **Lactate dehydrogenase (LDH) activity of the cultured eukaryotic cells as marker of the number of dead cells in the medium**, *J. Biotechnol.*, 25. 231–243, 1992.

Leon, O., Corrand, L., Bich, T.N., Le Minor, O., Lemaire, M., Guérin, J.L.: **Goose Hemorrhagic polyomavirus detection in geese using real-time PCR assay**. *Avian Dis.*, 57. 797-799, 2013.

Leonard, G.T., Sen, G.C.: **Restoration of interferon responses of adenovirus E1A-expressing HT1080 cell lines by overexpression of p48 protein**, *J. Virol.*, 71. 5095–5101, 1997.

Levine, P.P., Fabricant, J.: **A hitherto-undescribed virus disease of ducks in North America**, *Cornell Vet.*, 40. 71–86, 1950.

Li, X., Zhao, R., Lin, W., Li, C., Zhang, T., Meng, F., Liu, M., Zhang, Y.: **Evidence of VP1 of duck hepatitis A type 1 virus as a target of neutralizing antibodies and involving receptor-binding activity**, *Virus Res.*, 227. 240-244, 2017.

Liu, C.Y., Wong, H.N., Schauerer, J.A., Kaufman, R.J.: **The protein kinase/endoribonuclease IRE1alpha that signals the unfolded protein response has a luminal N-terminal ligand-independent dimerization domain**, *J. Biol. Chem.*, 277. 18346–18356, 2002.

Liu, S.N., Zhang, X.X., Zou, J.F., Xie, Z.J., Zhu, Y.L., Zhao, Q., Zhou, E.M., Jiang, S.J.: **Development of an indirect ELISA for the detection of duck circovirus infection in duck flocks**, *Vet. Microbiol.*, 145. 41–46, 2010.

Lohr, V., Rath, A., Genzel, Y., Jordan, I., Sandig, V., Reichl, U.: **New avian suspension cell lines provide production of influenza virus and MVA in serum-free media: Studies on growth, metabolism and virus propagation**, *Vaccine*, 27. 4975–4982, 2009.

Lohr, V., Genzel, Y., Jordan, I., Katinger, D., Mahr, S., Sandig, V., Reichl, U.: **Live attenuated influenza viruses produced in a suspension process with avian AGE1.CR.pIX cells**, *BMC Biotechnology*, 12. 79, 2012.

Lutz, P., Rosa-Calatrava, M., Keding, C.: **The product of the adenovirus intermediate gene IX is a transcriptional activator**, *J. Virol.*, 71, 5102–5109, 1997.

Ma, K., Vattem, K.M., Wek, R.C.: **Dimerization and release of molecular chaperone inhibition facilitate activation of eukaryotic initiation factor-2 kinase in response to endoplasmic reticulum stress**, *J. Biol. Chem.*, 277. 18728–18735, 2002.

Malkinson, M., Winocour, E.: **Adeno-associated virus type 2 enhances goose parvovirus replication in embryonated goose eggs**, *Virology*, 336. 265–273, 2005.

Marchini, A., Bonifati, S., Scott, E.M., Angelova, A.L., Rommelaere, J.: **Oncolytic parvoviruses: from basic virology to clinical applications**, *Virol. J.*, 12. 6, 2015.

Marciniak, S.J., Ron, D.: **Endoplasmic reticulum stress signaling in disease**, *Physiol. Rev.*, 86. 1133–1149, 2006.

Marciniak, S.J., Yun, C.Y., Oyadomari, S., Novoa, I., Zhang, Y., Jungreis, R., Nagata, K., Harding, H.P., Ron, D.: **CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum**, *Genes Dev.*, 18. 3066–3077, 2004.

Martinez, C., Dalsgaard, K., Lopez de Turiso, J.A. Cortés, E., Vela, C., Casal, J.I.: **Production of porcine parvovirus empty capsids with high immunogenic activity**, *Vaccine*, 10. 684–90, 1992.

Mató, T., Péntzes, Z., Rueda, P., Vela, C., Kardi, V., Zolnai, A., Misák, F., Palya, V.: **Recombinant subunit vaccine elicits protection against goose haemorrhagic nephritis and enteritis**, *Avian Pathol.*, 38. 233-237, 2009.

Mengeling, W.L.: **Porcine parvovirus: properties and prevalence of a strain isolated in the United States**, *Am. J. Vet. Res.*, 33. 2239–48, 1972.

Mengeling, W.L.: **Porcine Parvovirus**. In: *Diseases of Swine*. Szerk.: Leman, A.D., Straw, B.E., Mengeling, W.L., D’Allaire, S., Taylor, D.J. Ames: Iowa State University Press, 1992. p. 299–311.

Mengeling, W.L., Cutlip, R.C.: **Pathogenesis of in utero infection: experimental infection of five-week-old porcine fetuses with porcine parvovirus**, *Am. J. Vet. Res.*, 36. 1173–7, 1975.

Mengeling, W. L., Cutlip, R. C.: **Reproductive disease experimentally induced by exposing pregnant gilts to porcine parvovirus**, *Am. J. Vet. Res.*, 37. 1393–400, 1976.

Mengeling, W.L., Lager, K.M., Vorwald, A.C.: **The effect of porcine parvovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus on porcine reproductive performance**, *Anim. Reprod. Sci.*, 60–61. 199–210, 2000.

Mengeling, W.L., Paul, P.S.: **Interepizootic survival of porcine parvovirus**, *J. Am. Vet. Med. Asso.*, 188: 1293–5, 1986.

Mengeling, W.L., Paul, P.S., Brown, T.T.: **Transplacental infection and embryonic death following maternal exposure to porcine parvovirus near the time of conception**, *Arch. Virol.*, 65. 55–62, 1980.

Michalak, M., Corbett, E.F., Mesaeli, N., Nakamura, K., Opas, M.: **Calreticulin: One protein, one gene, many functions**, *Biochem. J.*, 344. 281–292, 1999.

Miksch, K., Grossmann, E., Köhler, K., Johne, R.: **Detection of goose haemorrhagic polyomavirus (GHPV) in flocks with haemorrhagic nephritis and enteritis of geese in southern Germany**, *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.*, 115. 390–394, 2002.

Morimoto, T., Fujisaki, Y., Ito, Y., Tanaka, Y.: **Biological and physicochemical properties of porcine parvovirus recovered from stillborn piglets**, *Natl. Inst. Anim. Health Q. (Tokyo)*, 12. 137–44, 1972.

Nagy, Z., Derzsy, D.: **A viral disease of goslings. II. Microscopic lesions**, *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.*, 18. 3–17, 1968.

Ngoh, G.A., Papanicolaou, K.N., Walsh, K.: **Loss of mitofusin 2 promotes endoplasmic reticulum stress**, *J. Biol. Chem.*, 287. 20321–20332, 2012.

Nishitoh, H.: **CHOP is a multifunctional transcription factor in the ER stress response**, *J. Biochem.*, 151. 217–219, 2012.

Nishitoh, H., Matsuzawa, A., Tobiume, K., Saegusa, K., Takeda, K., Inoue, K., Hori, S., Kakizuka, A., Ichijo, H.: **ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats**, *Genes Dev.*, 16. 1345–1355, 2002.

Ojha, R., Amaravadi, R.K.: **Targeting the unfolded protein response in cancer**, *Pharmacol. Res.*, 120. 258–266, 2017.

Okda, F.A., Yassein, S., Ahmed, A.R., Soufy, H., Nasr, S.M.: **Some haematological and biochemical investigations on duck virus hepatitis following administration of glycyrrhizin**, *ISRN Pharmacol.*, 2013. 849412, 2013.

Oraveerakul, K., Choi, C.S., Molitor, T.W.: **Tissue tropisms of porcine parvovirus in swine**, *Arch. Virol.*, 130. 377–89, 1993.

Palya, V., Ivanics, E., Glávits, R., Dán, A., Mató, T., Zarka, P.: **Epizootic occurrence of haemorrhagic nephritis enteritis virus infection of geese**, *Avian Pathol.*, 33. 244-50. 2004.

Paul, P.S., Mengeling, W.L., Brown, T.T.Jr.: **Replication of porcine parvovirus in peripheral blood lymphocytes, monocytes, and peritoneal macrophages**, *Infect. Immun.*, 25. 1003–7, 1979.

Paul, P.S., Mengeling, W.L.: **Oronasal and intramuscular vaccination of swine with a modified live porcine parvovirus vaccine: multiplication and transmission of the vaccine virus**, *Am. J. Vet. Res.*, 45. 2481–5, 1984.

Qiu, J., Cheng, F., Yoto, Y., Zádori, Z., Pintel, D.: **The expression strategy of goose parvovirus exhibits features of both the dependovirus and parvovirus genera**, *J. Virol.*, 79, 11035–11044, 2005.

Quignon, F., De Bels, F., Koken, M., Feunteun, J., Ameisen, J.C., de Thé, H.: **PML induces a novel caspase-independent death**, *Nat. Genet.*, 20. 259–265, 1998.

Rayet, B., Lopez-Guerrero, J.A., Rommelaere, J., Dinsart, C.: **Induction of programmed cell death by parvovirus H-1 in U937 cells: connection with the tumor necrosis factor alpha signalling pathway**, *J. Virol.*, 72. 8893–8903, 1998.

Reimar, J., Hermann, M.: **The genome of goose hemorrhagic polyomavirus, a new member of the proposed subgenus Avipolyomavirus**, *Virology*, 308. 291-302, 2003.

Richter, W. R., Rozok, E.J., Moize, S.M.: 1964. **Electron microscopy of virus-like particles associated with duck viral hepatitis**, *Virology*, 24. 114–116, 1964.

- Ron, D., Hubbard, S.R.: **How IRE1 reacts to ER stress**, *Cell*, 132. 24–26. 2008.
- Roszkowszky, J., Gazdzinski, P., Kozaczyński, W., Bartoszcze, M.: **Application of the immunoperoxidase technique for detection of Derzsy's disease virus antigen in cell culture and goslings**, *Avian Pathol.*, 2. 179–93, 1982.
- Samali, A., Fitzgerald, U., Deegan, S., Gupta, S.: **Methods for monitoring endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response**, *Int. J. Cell. Biol.*, 830307, 2010.
- Sano, R., Reed, J.C.: **ER stress-induced cell death mechanisms**, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1833. 3460–3470, 2013.
- Sauter, D., Unterweger, D., Vogl, M., Usmani, S.M., Heigele, A., Kluge, S.F., Hermkes, E., Moll, M., Barker, E., Peeters, M., Learn, G.H., Bibollet-Ruche, F., Fritz, J.V., Fackler, O.T., Hahn, B.H., Kirchhoff, F.: **Human tetherin exerts strong selection pressure on the HIV-1 group N Vpu protein**, *PLoS Pathog.*, 8. e1003093, 2012.
- Schettler, C.H.: **Goose virus hepatitis in the Canada Goose and Snow Goose**, *J. Wildl. Dis.*, 7. 147–48, 1971a.
- Schettler, C.H.: **Virus hepatitis of geese II. Host range of goose hepatitis virus**, *Avian Dis.*, 15. 809–23, 1971b.
- Schettler, C.H.: **Demonstration of the vertical transmission of goose hepatitis virus**, *Dtsch. Tieraerztl. Wochenschr.*, 79. 202–203, 1972.
- Schettler, C.H.: **Virus hepatitis of geese 3. Properties of the casual agent**, *Avian Pathol.*, 2. 179–93, 1973.
- Schettler, C. H.: **Clinical picture and pathology of haemorrhagic and enteritis in geese**, *Tier. Prax.*, 8: 313–320, 1980.
- Schönthal, A.H.: **Endoplasmic reticulum stress: its role in disease and novel prospects for therapy**, *Scientifica (Cairo)*, 857516, 2012.
- Sears, R.C., Nevins, J.R.: **Signaling networks that link cell proliferation and cell fate**, *J. Biol. Chem.*, 277. 11617–11620, 2002.
- Shah, K. V.: **Polyomaviruses**. In: *Fields Virology*. Szerk.: Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M. Philadelphia: Lippincott-Ravett Publishers, 1996. p. 2027–2043.
- Shah, S.Z.A., Zhao, D., Hussain, T., Yang, L.: **The role of unfolded protein response and mitogen-activated protein kinase signaling in neurodegenerative diseases with special focus on prion diseases**, *Front. Aging. Neurosci.*, 9. 120, 2017.
- Shen, J., Chen, X., Hendershot, L., Prywes, R.: **ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals**, *Dev. Cell.*, 3. 99–111, 2002.
- Sirivan, P., Obayashi, M., Nakamura, M., Tantaswasdi, U., Takehara, K.: **Detection of goose and Muscovy duck parvoviruses using polymerase chain**

reaction-restriction enzyme fragment length polymorphism analysis, *Avian Dis.*, 42. 133–39, 1998.

Soike, D., Albrecht, K., Hattermann, K., Schmitt, C., Mankertz, A.: **Novel circovirus in mulard ducks with developmental and feathering disorders**, *Vet. Rec.*, 154. 792–793, 2004.

Sol, N., Le Junter, J., Vassias, I., Freyssinier, J.M., Thomas, A., Prigent, A.F., Rudkin, B.B., Fichelson, S., Morinet, F.: **Possible interactions between the NS-1 protein and tumor necrosis factor alpha pathways in erythroid cell apoptosis induced by human parvovirus B19**, *J. Virol.*, 73. 8762–8770, 1999.

Sommer, T., Jarosch, E.: **BiP binding keeps ATF6 at bay**, *Dev. Cell*, 3. 1–2, 2002.

Sozen, E., Ozer, N.K.: **Impact of high cholesterol and endoplasmic reticulum stress on metabolic diseases: An updated mini-review**, *Redox Biol.*, 12. 456–461, 2017.

Sriburi, R., Jackowski, S., Mori, K., Brewer, J.W.: **XBP1: a link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis, and biogenesis of the endoplasmic reticulum**, *J. Cell. Biol.*, 167. 35–41, 2004.

St. Amand, J., Astell, C.R.: **Identification and characterization of a family of 11-kDa proteins encoded by the human parvovirus B19**, *Virology*, 192. 121–131, 1993.

Stoll, R., Luo, D., Kouwenhoven, B., Hobom, G., Müller, H.: **Molecular and biological characteristics of avian polyomaviruses: isolates from different species of birds indicate that avian polyomaviruses form a distinct subgenus within the polyomavirus genus**, *J. Gen. Virol.*, 74. 229–237, 1993.

Sukumaran, P., Sun, Y., Schaar, A., Selvaraj, S., Singh, B.B.: **TRPC Channels and Parkinson's Disease**, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 976. 85–94, 2017.

Takehara, K., Nakata, T., Takizawa, K., Limn, C.K., Mutoh, K., Nakamura, M.: **Expression of goose parvovirus VP1 capsid protein by a baculovirus expression system and establishment of fluorescent antibody test to diagnose goose parvovirus infection**, *Arch. Virol.*, 144. 1639–45, 1999.

Takehara, K., Saitoh, M., Kiyono M, Nakamura M.: **Distribution of attenuated goose parvoviruses in Muscovy ducklings**, *J. Vet. Med. Sci.*, 60. 341–44, 1998.

Tattersall, P. **Parvoviruses: General features**. In: *Encyclopedia of Virology*. Szerk.: B.W.J. Mahy, B.W.J., van Regenmortel, M.H.V. Elsevier Academic Press, Amsterdam: 2008. p. 90-97.

Terrinoni, A., Ranalli, M., Cadot, B., Leta, A., Bagetta, G., Vousden, K.H., Melino, G.: **p73-alpha is capable of inducing scotin and ER stress**, *Oncogene*, 23. 3721–3725, 2004.

Tirasophon, W., Welihinda, A.A., Kaufman, R.J.: **A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells**, *Genes Dev.*, 12. 1812–1824, 1998.

Todd, D., McNulty, M.S., Adair B.M., Allan, G.M.: **Animal circoviruses**, *Adv. Virus Res.*, 57. 1–70, 2001.

Tóth, T.E., Norcross, N.L.: **Humoral immune response of the duck to duck hepatitis virus: virus-neutralizing vs. virusprecipitating antibodies**, *Avian Dis.*, 25. 17–28, 1981.

Tseng, C.H., Knowles, N.J., Tsai, H.J.: **Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1 indicates that it should be assigned to a new genus**, *Virus Res.*, 123. 190–203, 2007.

Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H.P., Ron, D.: **Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1**, *Science*, 287. 664–666, 2000.

Urrea, H., Dufey, E., Lisbona, F., Rojas-Rivera, D., Hetz, C.: **When ER stress reaches a dead end**, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1833. 3507–3517, 2013.

Walter, P., Ron, D.: **The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation**, *Science*, 334. 1081–1086, 2011.

Wan, C., Huang, Y., Cheng, L., Fu, G., Shi, S.H., Chen, H., Peng, C., Lin, F., Lin, J.: **The development of a rapid SYBR Green I-based quantitative PCR for detection of Duck circovirus**, *Virol. J.*, 8. 465, 2011.

Wang, X.Z., Harding, H.P., Zhang, Y., Jolicoeur, E.M., Kuroda, M., Ron, D.: **Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses**, *EMBO J.*, 17. 5708–5717, 1998.

Westenbrink, F., Veldhuis, M.A., Brinkhof, J.M.: **An enzymelinked immunosorbent assay for detection of antibodies to porcine parvovirus**, *J. Virol. Methods*, 23. 169–78, 1989.

White, E., Sabbatini, P., Debbas, M., Wold, W.S.M., Kusher, D.I., Gooding, L.: **The 19-kilodalton adenovirus E1B transforming protein inhibits programmed cell death and prevents cytolysis by tumor necrosis factor alfa**, *Mol. Cell. Biol.*, 12. 2570–2580, 1992.

Woods, L.W., Latimer K.S.: **Circovirus Infection of Pigeons and Other Avian Species**. In: *Disease of Poultry*. Szerk.: Saif, Y.M., Fadly, A.M., Glisson, J.R., McDougald L.R., Nola, L.K., Swayne D.E. Ames: Blackwell Publishing, 2008. p. 236–249.

Woolcock, P. R., Chalmers, W.S., Davis, D.: **A plaque assay for duck hepatitis virus**, *Avian Pathol.*, 11. 607–610, 1982.

Woolcock, P.R.: **An assay for duck hepatitis virus type I in duck embryo liver cells and a comparison with other assays**, *Avian Pathol.*, 15. 75–82, 1986.

Woolcock, P.R.: **Duck Hepatitis**. In: *Disease of Poultry*. Szerk.: Saif, Y.M., Fadly, A.M., Glisson, J.R., McDougald L.R., Nola, L.K., Swayne D.E. Ames: Blackwell Publishing, 2008. p. 373–384.

Wrathall, A.E., Wells, D.E., Cartwright, S.F., Frerichs, G.N.: **An inactivated, oil-emulsion vaccine for the prevention of porcine parvovirus-induced reproductive failure**, *Res. Vet. Sci.*, 36. 136–43, 1984.

Wu, X., Li, X., Zhang, Q., Wulin, S., Bai, X., Zhang, T., Wang, Y., Liu, M., Zhang, Y.: **Identification of a conserved B-cell epitope on duck hepatitis A type 1 virus VP1 protein**, *PLOS One*, 10. e0118041, 2015

Xiang, Q.W., Wang, X., Xie, Z.J., Sun, Y.N., Zhu, Y.L., Wang, S.J., Liu, H.J., Jiang, S.J.: **ORF3 of duck circovirus: a novel protein with apoptotic activity**, *Vet. Microbiol.*, 159. 251–256, 2012.

Yakinoglu, A.O., Heilbronn, R., Burkle, A., Schlehofer, J., zur-Hausen, H.: **DNA amplification of adeno-associated virus as a response to cellular genotoxic stress**, *Cancer Res.*, 48. 3123–3129, 1988.

Yakobson, B., Koch, T., Winocour, E.: **Replication of adeno-associated virus in synchronized cells without the addition of a helper virus**, *J. Virol.*, 61. 972–981, 1987.

Yamamoto, K., Sato, T., Matsui, T., Sato, M., Okada, T., Yoshida, H., Harada, A., Mori, K.: **Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6 α and XBP1**, *Dev. Cell*, 13. 365–376, 2007.

Yang, M., Cheng, A., Wang, M., Xing, H.: **Development and application of a one-step real-time Taqman RT-PCR assay for detection of duck hepatitis virus type 1**, *J. Virol. Methods*, 153. 55–60, 2008.

Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., Mori, K.: **XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor**, *Cell*, 107. 881–891, 2001.

Zádori, Z., Stefancsik, R., Rauch, T., Kisary, J.: **Analysis of the complete nucleotide sequences of goose and muscovy duck parvoviruses indicates common ancestral origin with adeno-associated virus 2**, *Virology*, 212. 562–73, 1995.

Zádori, Z., Szelei, J., Tijssen, P.: **SAT: a late NS protein of porcine parvovirus**, J. Virol., 79. 13129–13138, 2005.

Zádori, Z., Szelei, J., Lacoste, M.C., Gariépy, S., Raymond, P., Allaire, M., Nabi, I.R., Tijssen, P.: **A viral phospholipase A2 is required for parvovirus infectivity**, Dev. Cell, 1. 291–302, 2001.

Zhang, H., Huang, Y., Du, Q., Luo, X., Zhang, L., Zhao, X., Tong, D.: **Porcine parvovirus infection induces apoptosis in PK-15 cells through activation of p53 and mitochondria-mediated pathway**, Biochem. Biophys. Res. Commun., 456. 649–655, 2015.

Zhang, L., Wang, A.: **Virus induced ER stress and the unfolded protein response**. Front. Plant. Sci., 3. 293, 2012.

Zhang, X., Wang, X., Zhou, G. **A one-step real time RT-PCR assay for quantifying rice stripe virus (RSV) in rice and in the small brown planthopper (*Laodelphax striatellus* Fallen)**, J. Virol. Methods, 10. 181–187, 2008.

Zhao, X., Phillips, R.M., Li, G., Zhong, A.: **Studies on the detection of antibody to duck hepatitis virus by enzyme-linked immunosorbent assay**, Avian Dis., 35. 778–782, 1991.

Zhao, X., Xiang, H., Bai, X., Fei, N., Huang, Y., Song, X., Zhang, H., Zhang, L., Tong, D. **Porcine parvovirus infection activates mitochondria-mediated apoptotic signaling pathway by inducing ROS accumulation**, Virol. J., 13. 26, 2016.

Zhong, S., Salomoni, P., Ronchetti, S., Guo, A., Ruggero, D., Pandolfi, P.P. **Promyelocytic leukemia protein (PML) and daxx participate in a novel nuclear pathway for apoptosis**, J. Exp. Med., 191. 631–640, 2000.

Zhou, Y., Qi, B., Gu, Y., Xu, F., Du, H., Li, X., Fang, W. **Porcine circovirus 2 deploys PERK pathway and GRP78 for its enhanced replication in PK-15 cells**, Viruses. 8. pii: E56, 2016.

Zielonka, A., Gedvilaite, A., Ulrich, R., Lüscho, D., Sasnauskas, K., Müller, H., Johne, R.: **Generation of virus-like particles consisting of the major capsid protein VP1 of goose hemorrhagic polyomavirus and their application in serological tests**, Virus Res., 120. 128–37, 2006.

10. A doktori kutatás eredményeinek közzélése

10.1 Lektorált tudományos folyóiratban megjelent publikációk

Mészáros, I., Tóth, R., Olasz, F., Tijssen, P., Zádori, Z.: **The SAT protein of porcine parvovirus accelerates viral spreading through irreversible ER stress induction**, Journal of Virology, 91(16). pii: e00627-17. doi: 10.1128/JVI.00627-17, 2017.

IF: 4,606

Mészáros, I., Tóth, R., Bálint, Á., Dán, Á., Jordan, I., Zádori, Z.: **Propagation of viruses infecting waterfowl on continuous cell lines of Muscovy duck origin**, Avian Pathology, 43(4). 379–386, 2014.

IF: 1,639

Mészáros, I., Tóth, R., Bálint, Á., Thuma, Á., Zádori, Z.: **Víziszárnyas-parvovírusok**, Magyar Állatorvosok Lapja, 136. 599–609, 2014.

IF: 0,185

10.2 Konferencia összefoglalók

Mészáros, I., Tóth, R., Tijssen, P., Zádori, Z.: **The SAT protein of ungulate protoparvovirus-1 accelerate viral spreading through irreversible ER stress induction**. XVI. International Parvovirus Workshop. France, Ajaccio, 2016.

Zádori, Z., Tóth, R., Bálint, Á., Dán, Á., Jordan, I., Mészáros, I.: **Propagation of viruses infecting waterfowl on continuous cell lines immortalized by adenoviral genes**. International Union of Microbiological Societies Congresses. Canada, Montreal, 2014.

10.3 A doktori disszertáció témájához nem kapcsolódó publikációk

Cságola, A., Zádori, Z., Mészáros, I., Tuboly, T.: **Detection of porcine parvovirus 2 (Ungulate tetraparvovirus 3) specific antibodies and examination of the serological profile of an infected swine herd**, PLoS One, 11(3). e0151036, doi: 10.1371/journal.pone.0151036, 2016.

IF: 2,806

Tóth, R., Mészáros, I., Farsang, A., Zádori, Z.: **Az állatorvosi vakcinák adjuvánsainak hatásmechanizmusai**, Magyar Állatorvosok Lapja. 138. 31–46, 2016.

IF: 0,189

Tóth, R., Mészáros, I., Stefancsik, R., Bartha, D., Bálint, Á., Zádori, Z.: **CpG distribution and methylation pattern in porcine parvovirus**, PLoS ONE, 8(12). e85986, doi:10.1371/journal.pone.0085986, 2013. IF: 3,534

11. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Zádori Zoltánnak, aki oroszlánrészt vállalt a kutatási terv kidolgozásában és a munkám irányításában. Hálás vagyok támogatásáért és türelméért.

Köszönöm Dr. Bálint Ádámnak, a kutatás során adott tanácsait és segítségét, a tőle kapott szervmintákat és savókat. Dr. Dán Ádámnak a rendelkezésünkre bocsájtott primereket. Dr. Tuboly Tamásnak, hogy mindig volt hozzám néhány biztató, kedves szava, tanácsa.

Köszönet illeti a Funkcionális Virologia témacsoportban valamennyi hajdani és jelenlegi kollégámat, Kádár-Hürkecz Enikőt, Olasz Ferencet, Tóth Renátát és Viszovszki Andreát, akiknek mindig számíthattam a segítségére és a jókedvére. Köszönettel tartozom Dr. Doszpoly Andornak, Ujvári Barbarának, valamint az MTA ATK ÁOTI valamennyi munkatársának, akik segítették a munkámat.

Hálásan köszönöm szüleimnek és családomnak, hogy mindig támogattak céljaim elérésében.