

**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 tézisei

Mészáros István

2017

Állatorvostudományi Egyetem
Aujeszky Aladár Elméleti Állatorvostudományok
Doktori Iskola

Témavezető és témabizottsági tag:

Dr. Zádori Zoltán

témavezető

Magyar Tudományos Akadémia
Agrártudományi Kutatóközpont
Állatorvos-tudományi Intézet

Dr. Tuboly Tamás

témabizottság tagja

Állatorvostudományi Egyetem,
Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék

Bevezetés és célkitűzések

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. 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 keretekről néhány esetben bebizonyosodott, hogy fehérjéket kódolnak.

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 endoplazmatikus retikulumában (ER) halmozódik fel. A sertés parvovírus (porcine

parvovirus: PPV) attenuált NADL-2 törzsében a SAT teljes vagy részleges funkcióvesztése „lassan terjedő” mutáns törzsek létrejöttéhez vezetett. A feltételezések szerint ez a fehérje hiányából következő nagymértékű sejtlízis csökkenéssel magyarázható.

Munkánk kezdetekor nem tudunk 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.

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 kacsacirkovírus hepatitis A vírus 1 (duck hepatitis A virus type 1: DHAHV-1), a liba vérzéses polyomavírus (goose haemorrhagic polyomavirus: GHPV) és a liba

parvovírus (goose parvovirus: GPV) közös jellemzője, hogy gyengén vagy egyáltalán nem replikálódnak immortalizált sejtvonalakon, így vizsgálatukhoz legtöbbször primer sejtekre vagy embrionált tojásokra van szükség, amelyek előállítására és használatára 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, melyeket a humán adenovírus 5-ből származó E1A és E1B gének expressziójával immortalizáltak. A CR és CRpIX sejtvonal korábban már fogékonyak bizonyult módosított Ankara vakcína vírus, influenza A vírus és baromfipestis vírus fertőzésre. Feltételezésünk szerint ezek a pézsmaréce-eredetű sejtvonalak alkalmasak lehetnek az említett (víziszárnyasokat fertőző) vírusok kimutatására, vizsgálatára is.

Munkánk célja a SAT fehérje hatásának a vizsgálata volt a PPV Kresse törzs terjedésére, real-time PCR és immunfluoreszcens (IF) 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 sejtvonalakon.

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 sejtvonalakon.

Anyag és módszer

A SAT⁻ fehérje vizsgálata

A SAT⁻ mutáns vírust a pUC19 plazmidba klónozott patogén PPV Kresse törzs fertőző klónjából (pKresse) hoztuk létre. A módosítás során (T-2842→A és T-2845→C) egy STOP kodont illesztettünk a leolvasási keretbe, és megváltoztattuk az azt követő metionint kódoló tripletet, amely iniciációs kodonként funkcionálhatott volna. A változtatások a VP fehérjében nem okoztak aminosav cserét. Az így átalakított fertőző klónt pSAT⁻-nak neveztük. A következő lépésben, a vad típusú és a mutáns PPV Kresse törzstenyészetek előállításához a pKresse és a pSAT⁻ plazmidokat 75 cm²-es sejtenyésztő flaskában lévő, 50%-os konfluenciájú sertés here (PT) sejtekbe transzfektáltuk TurboFect Transfection Reagent használatával.

A törzstenyészetekkel 24-vájatú sejtenyésztő lemezre lerakott, 50%-os konfluenciájú PT sejteket fertőztünk alacsony és magas multiplicitással (MOI: 0,01 és 3). Két órával később a tápfolyadékot lecseréltük, majd a fertőzés 12. órájától 2 óránként

mintát vettünk a felülúszókból és a sejteket 3%-os formaldehiddel fixáltuk. Az első fertőzött sejtek és a másodlagos fertőzésekre utaló fluoreszcens fókuszok megjelenését IF festéssel, a vírusok replikációját real-time PCR segítségével követtük nyomon, amihez a felülúszókból tisztítottuk a vírus-nukleinsavat High Pure Viral Nucleic Acid Kit felhasználásával. A sejtlízis mértékét a magas multiplicitású fertőzésből származó felülúszókban lévő laktát-dehidrogenáz (LDH) enzim aktivitása alapján állapítottuk meg, Cytotoxicity Detection Kit segítségével. A halott és apoptotikus sejtek számát propídiám-jodid (PI) és Hoechst-festéssel is meghatároztuk.

Magas multiplicitással (MOI: 3) fertőzött sejteket ER-stresszt kiváltó kémiai anyagokkal (MG132, thapsigargin és dithiothreitol (DTT)) kezeltük és a vírusok replikációját real-time PCR-rel követtük nyomon. A fertőzött sejtekben (MOI: 3) IF festéssel követtük az ER-stressz markerek (anti-Xbp1 és anti-CHOP ellenanyagok) expresszióját, illetve az ER (anti-kalretikulín) morfológiai változásait. Az eredményeinket összevetettük 5, 10 és 20 perces UV-stressz hatásával.

A SAT és a sertés CHOP fehérjének a génjeit DsRed-Monomer-N1 plazmidba klónoztuk és TurboFect transzfekciós reagens segítségével PT sejtekbe transzfektáltuk. A transzfekció után 16 és 48 óra között 4 óránként 3%-os formaldehiddel fixáltuk a sejteket és IF festés segítségével vizsgáltuk a CHOP és az Xbp1 fehérjék aktiválódását, a CHOP fehérje lokalizációját, valamint az ER-ban bekövetkező morfológiai változásokat.

Kotranszfekciós kísérletekben a CHOP-DsRed plazmidot a pKresse, a pSAT⁻, vagy a SAT-DsRed plazmiddal kotranszfektáltuk, majd 12, 16, 24, 32, 40, 48 és 96 órával a transzfekció után fixáltuk a sejteket. A vírusok terjedését, a CHOP sejten belüli lokalizációját és az ER stressz markerek aktivációját IF festéssel követtük nyomon.

Víziszárnyas vírusok vizsgálata

A vizsgált vírusokat (DuCV, DHAV-1, GHPV, GPV) a Nemzeti Élelmiszerlánc Biztonsági Hivatal Állatorvosi Diagnosztikai Igazgatóságából kapott szervmintákból nyertük, mely során a szervmintákat dörzsmozsár segítségével homogenizáltuk, 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 kiküszöböljünk.

Az AGE1.CR, az AGE1.CRpIX és az AGE1.CS sejteket 75 cm³-es flaskában növesztettük, 11 ml tápfolyadékban (DMEM high Glucose 4,5 g/l, 10% Fetal Bovine Serum Gold, 5% penicillin-streptomycin és 5% nátrium piruvát oldat), 37 °C-on, 5%-os CO₂ szint mellett. A fertőzés 24-vájatú sejtenyészti lemezen, 100 µl vírusos felülúszóval történt. Három nappal a fertőzés után a sejtek felülúszójából leszívtunk 100 µl-t és átmértük frissen lerakott sejtekre. Ezt a lépést összesen tízszer ismételtük meg, majd High Pure Viral Nucleic Acid Kit használatával kitisztítottuk a vírus nukleinsavakat a felülúszókból és a kópiaszámokat real-time és reverz transzkripció real-time PCR segítségével meghatároztuk. Pozitív kontrollként az eredeti vírusmintából tisztított nukleinsavat használtuk.

Az ismert kópiaszámú mintákkal megfertőztük az AGE1 sejtvonalakat alacsony multiplicitással (MOI: 0,1), majd a felülúszókból a fertőzés utáni 4., 24., 48. és 72. órában mintát vettünk és

meghatároztuk bennük a vírusok kópiaszámát. Ezek ismeretében felrajzoltuk a vírusok szaporodási görbéjét a különböző sejtvonalakon. A vírusok terjedését IF festés segítségével is nyomon követtük, vírus specifikus savók használatával (a DuCV esetében nem állt ilyen rendelkezésre).

A vírusok ciklusidejének meghatározásához 24-vájatú sejtenyészítő 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 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 sejtenyésztő lemezen növesztett AGE1.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.

Eredmények

A vad típusú és SAT⁻ mutáns PPV Kresse törzsek terjedése

Az alacsony multiplicitású fertőzések során a fertőzés utáni 12. órában tudtuk kimutatni az első fertőzött sejteket. A vad típusú vírussal fertőzött sejteknél először a 20. órában jelentek meg másodlagos fertőzésre utaló fluoreszcens fókuszok, míg a mutáns vírussal fertőzött vájatokban a 24. órában. A különbség a két fertőzés között fokozatosan nőtt. A kapott eredmények jól egybevágtak vírusok a kópaiszámának és a titerének változásaival. A vad típusú vírusról mért értékek a fertőzés 48. órája után lényegesen már nem változtak, míg a SAT⁻ vírusról mért értékek a 88. óráig folyamatosan növekedtek.

A SAT⁻ vírusfertőzéskor (MOI:3) a kópaiszámok növekedése csak a 22-24. óra között kezdődött meg, a vad típusú vírusról viszont már a 18-20. óra között elindult. A mutáns vírus kópaiszáma végig a vad típusú vírusról mért értékek alatt maradt és a különbség nem emelkedett egy nagyságrend fölé (a fertőzés utáni 22. órában és 46-

48 óra között volt a legmagasabb). 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 vírusnál).

A vad típusú és SAT⁻ mutáns PPV Kresse törzsek citopatogén hatásai

A vad típusú vírussal fertőzött sejtek felülúszójában mért LDH aktivitás gyorsan növekedett 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 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.

Míg a vad típusú vírussal történt fertőzéskor 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 vírusfertőzéseknel látott sejtszám (4% és 10%).

A sejteken végzett PI festés megmutatta, hogy a SAT⁻ vírussal fertőzött sejtek tovább megőrzik sejtmembránjuk integritását, mint azok, amelyek a vad típusú vírussal voltak fertőzve. Az apoptotikus sejtmagok aránya végig a PI pozitív sejtek aránya alatt maradt, és csak enyhe emelkedést mutatott a fertőzés során. 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 ($p < 0,046$).

Az ER morfológiai változása és az ER stresszválasz aktiválása PPV fertőzéskor

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

Az Xbp1 fehérjét mind a két vírustörzssel 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, majd meredeken csökkeni kezdett, és a 20. órában már csak a fertőzött sejtek közel 5%-ában volt kimutatható.

A CHOP a vad típusú vírussal fertőzött sejtekben a 22. órában volt először kimutatható, nagyjából a fertőzött sejtek 20%-ának a sejtmagjában 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.

ER stressz kiváltása kémiai anyagokkal és hatásuk a PPV fertőzésre

A 10 mM DTT, 20 μ M MG132 vagy a 10 μ M thapsigargin kezelés hatására az alacsony multiplicitással (MOI: 0,01) fertőzött sejteknél a fertőzés 20. órájában már nem csak a vad típusú, hanem a SAT⁻ vírusfertőzéskor is lehetett másodlagos fertőzésekre utaló fluoreszcens fókuszokat detektálni. A legerősebb pozitív hatást a fertőzés utáni 3-8. órás MG132 kezeléssel tudtuk elérni.

Mindegyik kémiai anyaggal történt kezelés növelte (MOI:3) a vírusok felülúszóban mért kópiaszámát és kis mértékben a titerét. A fertőzés 7.

órájában indult DTT kezelésnek volt a legerősebb pozitív hatása a vad típusú vírus kópiaszámára (4,41×-es növekedés), míg a fertőzés 3-8. órája közötti MG132 kezelés hatására kaptuk a legmagasabb kópiaszámot (71,67× magasabb, mint a kezeletlen sejteknél) és titert a SAT⁻ vírussal történt fertőzésekor. A vegyszerekkel kiváltott ER stressz hatására a mutáns vírus kópiaszáma majdnem minden esetben magasabb lett, mint a vad típusú vírusnál mért értékek. Az UV-C sugárzás nem vezetett sem az Xbp1, sem a CHOP aktiválódásához, hatása a vad típusú és a mutáns vírus kópiaszámára enyhén, a vírusok titerére erősen negatív volt.

A SAT és CHOP transzfekciója fertőzött sejtekben

A 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. Megjelenése a magban már viszonylag korán (a transzfekció 18. órájától) apoptózisra jellemző, fragmentálódott

sejtmagok kialakulásához vezetett 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 gyorsította volna a vírus terjedését.

Víziszárnyas vírusok kópiaszáma pézsmaréce-eredetű sejtvonalakon

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. 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, 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. A

GPV fertőzéskor 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.

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

A DuCV szaporodási görbéje nagyjából megegyezett mind a három vizsgált sejtvonalon. 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. 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. 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

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

A vírusok ciklusidejének és a sejtvonalak fogékonyságának meghatározása

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. 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 megfigyelhetők. Ezek alapján a DHAV-1 ciklusideje 10-14 óra közé tehető. A GHPV és GPV fertőzéskor erősen festődő sejtmagokat láttunk, a vírusok replikációjának bizonyítékeként. Az első fertőzött sejtek a GHPV esetében a fertőzés (MOI: 2) 16. órájában, míg a GPV esetében a 14. órában voltak észlelhetők (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.

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. Mindhárom sejtvonal a DHAV-1 fertőzésre bizonyult a legfogékonyabbnak, a kapott értékek pedig nagyon hasonlóak voltak. A GHPV-ből 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.

Megbeszélés

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

A SAT a hiányában bekövetkező „lassú terjedés” fenotípus kialakulása általános jelenségnek tekinthető a PPV törzseknél. A vad típusú és a SAT⁻ Kresse törzsszel végzett *in vitro* fertőzési kísérletek azt mutatták, hogy az első fertőzött sejtek, a fertőzés utáni 12. órától mutathatóak ki a kapszid-specifikus ellenanyagokkal. 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.

Alacsony multiplicitású fertőzéskor jelentős különbség mérhető a vad típusú és a mutáns vírusok kópiaszáma és titere között a fertőzés 40-64. órájában. Ez a különbség jól magyarázható a SAT⁻ vírus felszabadulás kezdetének a 3-4 órával későbbre tolódásával, amely az újrafertőzések során, a vírus további replikációs ciklusában, tovább halmozódik, valamint a parvovírusok

szaporodásához nélkülözhetetlen osztódó sejtek számának csökkenésével. A magas multiplicitású fertőzéskor lényegesen kisebb különbséget tapasztaltunk a kópiaszámok között. Vizsgálataink azt mutatták, hogy a vad típusú és a SAT⁻ vírus végső kópiaszáma közel azonos, viszont a felülúszókban mért LDH aktivitások között jelentős eltérést tapasztaltunk a vad típusú vírus javára, amit feltételezhetően az okoz, hogy magasabb a lizáló sejtek száma, így több vírus szabadul ki a sejtekből. Ha a DNáz kezelés után maradt kópiaszámokat nézzük, akkor a legnagyobb különbséget a fertőzés 48. órájában láthatjuk (6,5×). Ekkor a vad típusú vírussal fertőzött sejteknek már a 95%-a levált a sejtenyészti lemezről, míg a SAT⁻ vírussal fertőzött sejteknek csak a 15%-a. A kettő aránya 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.

Az általunk végzett vizsgálatok alapján, a PT sejtek Kresse törzzsel történő fertőzéskor az apoptotikus magok száma alacsonyan maradt (8-

15% körül), függetlenül a SAT fehérje jelenlététől. Az apoptotikus magok mellett nem tapasztaltuk olyan fragmentálódott sejtmagok megjelenését, mint amilyeneket a CHOP fehérje transzfekciójakor figyeltünk meg. A propídium-jodid festés és a gyors LDH felszabadulás által jelzett sejtmembrán károsodások arra utalnak, hogy a PPV-vel fertőzött PT sejtekben a sejthalál fő formája a nekrozis. 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 szabadulnak ki a fertőzött sejtekből.

Az ER stresszválasz aktiválódása és hatása a PPV terjedésére

A fertőzött sejtek nagyjából 95%-ában expresszáldott Xbp1 és legalább 41%-ában aktiválódott CHOP azt igazolja, hogy a PPV fertőzés a SAT fehérje hiányában is képes kiváltani az ER stresszt. Viszont 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. Szakirodalmi adatok alapján feltételezhető, 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 fehérjéje, ami arra utal, hogy kapcsolat van a vad típusú vírusfertőzésnél megfigyelt erősebb ER stressz és erősebb citopatogén hatások között.

Az ER stressz és a vírusterjedés összefüggésének vizsgálata során használt vegyszerek (DTT, MG132, thapsigargin) az alkalmazott koncentrációkban mind képesek voltak elindítani az Xbp1 és a CHOP expresszióját, és 48 órán belül a kezelt sejtek pusztulásához vezettek. Az alacsony multiplicitással fertőzött sejtek rövid időtartamú (öt, illetve két órás) kezelése pozitív hatással volt mind a vad típusú, mind a SAT⁻ vírusok terjedésére. Továbbá, a DTT és az MG132 kezelés növelte a magas multiplicitással fertőzött sejtekből kiszabaduló vírusok kópiaszámát és titerét is. Ez

arra utal, hogy a vegyszerek fertőzés gátló hatásait az UPR aktiválódásából fakadó pozitív hatások teljes mértékben képesek ellensúlyozni. Eredményeink alapján az ER stressz, vagy a sejt által rá adott válasz, megkönnyíti az érett virionok kiszabadulását a sejtekből. 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, és arra enged következtetni, hogy a SAT fehérje funkciója nem korlátozódik a CHOP hatásának befolyásolására, hanem általánosabban kötődik az ER stresszválaszhoz.

A SAT-DsRed és CHOP-DsRed fúziós fehérjék hatása

A SAT expressziója a vírusfertőzéshez hasonló morfológiai változásokat okozott a transzfektált sejtek ER-jában, valamint indukálta az apoptózist, viszont önmagában nem tudta sem közvetlenül aktiválni az Xbp1 és a CHOP expresszióját, sem befolyásolni a CHOP sejten belüli lokalizációját.

A CHOP expressziója és sejtmagi megjelenése nem tudta semlegesíteni a pSAT⁻ fertőző klónnál kialakuló „lassú terjedés” fenotípust, 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, 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 a hatásával kiegészülve vezet a korábbi sejthalálhoz. A másik lehetőség, hogy a SAT az UPR mellett más ER stresszválasz útvonalakat is aktivál és ezek hatásai önmagukban, vagy egymással kiegészülve korábbi sejthalálhoz, gyorsabb lízishez vezetnek.

A pézsmaréce-eredetű sejtvonalak permisszivitásának vizsgálata

A DHAV-1 fertőzéskor erős citopatogén hatást tapasztaltunk a sejteken, és itt mértük a legmagasabb kópiaszámokat is (10^8 /ml). Az alacsony multiplicitású fertőzés során a DHAV-1 kópiaszáma nagyon hasonlóan változott a sejtek felülúszójában, a fertőzött sejtvonaltól függetlenül. Továbbá, a fertőzés 72. órájánál kapott eredmények szinte megegyeztek az átoltási sorozat végén kapott kópiaszámokkal, pedig a kiindulási szervhomogenizátumok kópiaszámai alapján, a fertőzéseknek ott magas multiplicitása volt. Mindez magyarázható azzal, hogy a DHAV-1 fertőzés esetében, a termelődött vírusok mennyisége viszonylag független a fertőzés multiplicitásától és az AGE1 sejtek típusától.

A DuCV fertőzéskor nem tapasztaltunk citopatogén hatást, és a mért kópiaszámok is alacsonyak maradtak (nagyjából 10^5 /ml), ezért úgy véljük, hogy az AGE1 sejtvonalak a DuCV fertőzés szempontjából szemi-permisszívek.

A GHPV kópiaszámai viszonylag nagy szórást mutattak (10^4 - 10^7 /ml), ami összevetve azzal, hogy

ennél a vírusnál tapasztaltuk a legnagyobb eltérést a szaporodási görbékben a sejtvonalak között 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 sejtvonalhoz sem, ez pedig a fertőzés egyéb körülményeinek (multiplicitás, sejtek állapota) fontosságára utal.

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. Ugyanakkor a szaporodási görbék egy alacsony multiplicitású fertőzésnél határoztuk meg, míg az átoltások során inkább magas multiplicitást alkalmaztunk.

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

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. Ezt megerősíti az is, hogy a genomját a sejt replikációs mechanizmusaitól függetlenül lemásolni képes DHAV-1-nek volt a legrövidebb ciklusideje (10-14 óra), illetve a legmagasabb fertőzőképessége. A CRpIX sejtvonalon 55 vírus elégséges volt egy fertőzött sejt megjelenéséhez, bár nagy eltéréseket nem észleltünk a különböző sejtvonalak között. A DHAV-1 sejtciklustól független replikációja, gyorsabb ciklusideje és magas fertőzőképessége, a szaporodási görbéjének a meredekséget és a felülúszóban mért magasabb kópiaszámát is magyarázhatja.

A saját polimeráz enzimmal 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 sejtvonalon 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. 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.

Mindhárom sejtvonalon stabilan expresszálja a humán adenovírus 5-ből származó E1A és E1B géneket, amelyekről már ismert, hogy képesek befolyásolni a gazdasejt génjeinek expressziós

mintázatát és előidézik a sejtciklus előrehaladását. 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. A CRpIX sejtvonala 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, szabályozza az apoptózist, módosítja az antivirális folyamatokat és indukálja a hősokk chaperone-ok működését. Feltételezhető tehát, hogy az adenovírus fehérjék befolyása a veleszületett

immunrendszer és az antivirális gének jelátviteli útvonalaira is hozzájárul a sejteknél megfigyelt permisszivitáshoz.

Új tudományos eredmények

1. Bizonyítottuk, hogy SAT hiányában a PPV Kresse törzsben is kialakul a „lassú terjedéses” 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 vizsgálatokor 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.

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.

A doktori kutatás eredményeinek közlése

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, doi: 10.1128/JVI.00627-17, 2017.

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.

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

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.

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.

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

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.