

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

***AFRIKAI SERTÉSPESTIS VÍRUS
TANULMÁNYOZÁSA
SZÖVETLENYÉSZETBEN ÉS PRIMER
MAKROFÁGOKBAN***

Tamás Vivien Mária

Témavezető: Dr. Zádori Zoltán



ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM
Állatorvostudományi Doktori Iskola

Budapest, 2024

Témavezető:

.....

Dr. Zádori Zoltán Ph.D.

Állatorvostudományi Kutatóintézet

témavezető

.....

Tamás Vivien Mária

Bevezetés

Az afrikai sertéspestis (ASP) jelenleg az egyik legnagyobb gazdasági és állategészségügyi kártétellel járó vírus, amely a sertésállományt veszélyezteti. A vérzésekkel, lázas tünetekkel járó betegség kórokozója az afrikai sertéspestis vírusa (ASPV), amely házi sertésekben (*Sus scrofa domestica*) és vaddisznókban (*Sus scrofa*) akár 100%-os elhullást is okozhat.

Az ASPV elleni védelmet hátráltatja, hogy jelenleg nem rendelkezünk hatékony vakcinával, így az egyetlen védekezési lehetőség a megelőzés.

A kór terjedésének szempontjából fontos járványügyi vizsgálatok, a vírussal kapcsolatos egyéb kutatások, a létrehozott vakcinajelöltek ellenőrzése és a vakcinafejlesztés érdekében elengedhetetlen egy egyszerű és reprodukálható módszer fejlesztése az ASPV teljes genomjának szekvenálására. A nagy genomméret miatt a vírus szekvenciája leggyorsabban újgenerációs szekvenálási módszerekkel (NGS) határozható meg, azonban az ASPV teljes genomjának szekvenálását számos technikai probléma nehezíti.

Bár a vírus felfedezése után nem sokkal megkezdődtek a vakcinafejlesztési kísérletek, azonban a

hagyományos megközelítések nem hozták meg a kívánt sikert. A legjobb kísérleti eredményeket élő, attenuált vírusokkal érték el, de eddig sem a természetesen attenuált törzsek, sem pedig az egygénes deléciókat tartalmazó genetikailag módosított vírusok nem vezettek teljes sikerhez. A többgénes deléciókat tartalmazó vakcinajelöltekkel végzett kísérletek számos esetben biztató eredményeket mutattak, azonban még nem vezettek áttöréshez. A többgénes deléciót tartalmazó vakcinatörzsek előállításánál kihívást jelent, hogy számtalan ASPV-fehérje funkciója a mai napig ismeretlen. Az afrikai sertéspestis elleni egyik legígéretesebb vakcinajelölt egy, a természetben előforduló attenuált törzs, az Lv17/WB/Rie1 (Lv17), azonban mellékhatásai miatt a törzs jelenlegi formájában vakcinaként nem alkalmazható.

Az attenuált vakcinák fejlesztését, továbbá az ismeretlen funkciójú fehérjék vizsgálatát sok esetben homológ rekombináción alapuló célzott génmódosítással végzik. A rövid, fordított ismétlődésekkel elhatárolt szekvenciák genomi régiója/CRISPR-kapcsolt nukleáz 9 (CRISPR-Cas9) rendszer által indukált kettősszalú törések viszonylag nagy gyakoriságú rekombinációt indukálnak az ASPV és a transzfer plazmidok között,

illetve néhány közvetett bizonyíték is van arra, hogy a homológ rekombináció hozzájárul az ASPV evolúciójához, azonban az ASPV genomok közötti homológ rekombinációra vonatkozó kísérleti bizonyítékot még nem publikáltak.

A vakcina kifejlesztését nagymértékben hátráltatja, hogy sokáig nem állt rendelkezésre olyan gazdaeredetű sejtvonal, amelyen az ASPV nagy titerben és stabilan szaporítható lenne. Bár egyre több, ígéretesnek tűnő sejtvonalról szóló kutatás érhető el, a vírus genetikai stabilitását igénylő legtöbb kísérletet jelenleg sertés eredetű primer makrofágokon végzik. A makrofágokon történő munkát nehezíti, hogy a sejtek izolálása költséges, időigényes és a kísérletek nehezen reprodukálhatók. A természetben előforduló törzsek vagy vakcinajelöltek adaptálása immortalizált sejtenyészetre szinte mindig jelentős genetikai változásokkal jár, a vírusgenom nagymértékű módosulása és átrendeződése figyelhető meg, mely a parentális törzsek immunogén tulajdonságainak megváltozásával is járhat.

Célkitűzések

1) Céljaink között szerepelt egy olyan protokoll kidolgozása, amellyel az afrikai sertéspestis vírusának teljes genomja gyorsan és pontosan meghatározható újgenerációs szekvenáló (NGS) módszerekkel.

2) Másik fő célunk az Lv17 attenuációjának növelése és élővírusos vakcinatörzsek előállítása volt. Az Lv17 attenuációját kétféle úton terveztük elérni; egyrészt célzott génmódosításokkal, másrészt a törzs Cos7 szövettenyészetben való sorozatpasszálása során bekövetkező genetikai változások kihasználásával. Ezután a létrehozott vírusokat az általunk kifejlesztett szekvenálási módszer segítségével terveztük értékelni.

3) A célzott génmódosításokhoz először egy eddig ismeretlen funkciójú multigén családba (MGF) tartozó gén, az MGF 110-11L eltávolítását tűztük ki célul CRISPR-Cas9 rendszer segítségével. Az általunk létrehozott mutáns törzs (Lv17/d110-11L) felhasználásával az MGF 110-11L gén biológiai tulajdonságait kívántuk tanulmányozni sertés alveoláris makrofágokon (PAM), és tesztelni akartuk a módosított Lv17 vírus virulenciára és replikációra gyakorolt hatását.

4) Célunk volt továbbá három, már jól tanulmányozott, az ASPV virulenciájában szerepet játszó fehérjét (9GL, 8-CR, CD2v) kódoló gén együttes eltávolítása víruskeresztezéssel az Lv17 genomjából. Szándékunkban állt a gének eltávolításával, majd a homológ rekombinációs események által kiváltott változásokat szintén PAM sejteken vizsgálni.

5) Végül pedig az Lv17 törzs Cos7 szövettenyészetben való sorozatpasszálása során bekövetkező genetikai változásokat terveztük vizsgálni.

Anyag és módszer

Sertés alveoláris makrofágok (PAM) előkészítése és fenntartása

A munkánkhoz használt PAM-okat a WOAH kézikönyve szerint izoláltuk, majd -72 °C-on tároltuk. A sejtek fenntartásához 1% antibiotikum-antimikotikum oldattal, 10% magzati szarvasmarha szérummal, és 2mM L-glutaminnal kiegészített RPMI tápoldatot használtunk. A fertőzés előtt a sejteket 24 órán át 37 °C-on, 5% CO₂ mellett inkubáltuk.

Újgenerációs szekvenálási módszer kidolgozása

A szekvenálási protokoll kidolgozásához az ÁTKI Funkcionális Virologia Csoportja által izolált ASFV_HU_2018 izolátumot használtuk, melyet PAM-on szaporítottunk.

Első lépésként az ASPV fogékonyságát és fertőzési dinamikáját vizsgáltuk PAM sejteken és standardizáltuk a fertőzést. A fogékonyság vizsgálata során a szélesztés után 2 óránként fertőztük a sejteket 24 órán át, illetve egy hosszabb kísérlet során 144 órán át. A fertőzést immunfluoreszcens mikroszkóp segítségével detektáltuk.

A szekvenálási protokoll kidolgozásakor először az ASPV genom dúsítását és a DNS mintákban a szennyező gazdagenom mennyiségének csökkentését végeztük el. Ennek első lépéseként Virotype kit segítségével meghatároztuk a kiindulási mintáink gazda és vírus DNS-ének mennyiségét. Ezután a szennyező gazdaszervezet DNS tartalmának minimalizálását végeztük el DNáz kezelés segítségével. A vírus DNS-t a High Pure Viral Nucleic Acid Kit-el tisztítottuk. A DNS abszolút mennyiségének növelése érdekében az NGS mintaelőkészítési protokollokhoz teljes genom amplifikációt (WGA) végeztünk a REPLI-g Mini Kit felhasználásával. A REPLI-g mintákat a NucleoSpin Gel and PCR clean-up Kit segítségével tisztítottuk. A DNS koncentrációját NanoDrop 2000 készülékkel mértük. A gazda és vírus DNS arányának meghatározását a mintáinkban a DNáz kezelés és a WGA amplifikáció után is elvégeztük.

A DNáz és WGA kezelés után a mintákat Iontorrent és Illumina módszer segítségével szekvenáltuk. Az így nyert szekvenálásokat a Geneious Prime segítségével dolgoztuk fel. A readeket a sertésgenomhoz mappeltük a gazdaszervezet DNS-szennyeződésének

meghatározása és kiszűrése érdekében. Az így kapott – már csak virális readeket tartalmazó – readeket az ASPV Belgium 2018/1 törzséhez illesztettük és ez alapján határoztuk meg a konszenzus szekvekciát.

Három nehezen meghatározható régiót Sanger-módszerrel szekvenáltunk, mely szakaszok amplifikálásához PCR reakciót terveztünk.

Módosított vírusok előállítása

Az Lv17/d110-11L konstrukció előállítása

Az Lv17/d110-11L konstrukciót az Lv17 törzsből az MGF 110-11L gén CRISPR-Cas9-el történő deléciójával hoztuk létre. A 110-11L gént az afrikai sertéspestis vírus p72 promóterének szabályozása alatt álló zöld fluoreszkáló fehérjére (eGFP) cseréltük. A CRISPR-Cas9 rendszerhez szükséges rekombináns transzferplazmid létrehozásához a pUC19 vektort használtuk gerincként. A transzferplazmid létrehozásához szükséges primereket a SnapGene programmal terveztük.

A PAM sejteket 6 vájatú sejttenyésztő lemezre (5×10^6 /vajat) szélesztettük a fent leírtak szerint. Minden egyes vájatot 3 MOI (multiplicity of infection) Lv17 ASPV törzssel fertőztünk. A transzfekcióhoz tápfolyadékban

összekevertünk a transzfer plazmidot és gRNS plazmidot, majd 10 µl Fugene HD transzfekciós reagenssel elvégeztük a transzfekciót. Szobahőmérsékleten történő 10 perces inkubálás után a keveréket a fertőzött PAM-okhoz adtuk. A transzfectált PAM sejteket 37 °C-on, 5% CO₂ tartalom mellett inkubáltuk 24 órán keresztül.

Az Lv17/dCD-dGL konstrukció előállítás

A homológ rekombináció vizsgálatát mCherry markergént tartalmazó Lv17/dGL (9GL kódoló régió deletált) és eGFP markergént hordozó Lv17/dCD (CD2v és 8-CR fehérjekódoló régió deletált) mutáns vírusokkal való koinfekcióval végeztük. A konstrukciókat az ÁTKI Funkcionális Virologia Csoport munkatársai tervezték és izolálták az Lv17/d110-11L vírusról alkalmazott módszer szerint. A PAM-okat 3-3 MOI-val fertőztük a két vírusizolátummal. Az 1 órás inkubáció után a felülúszót friss PAM-fenntartó tápfolyadékra cseréltük. A felülúszót 3 nap elteltével összegyűjtöttük. Az így létrehozott piros és zöld fluoreszcenciát mutató rekombináns Lv17/dCD-dGL vírusokat tartalmazó sejteket manuálisan tisztítottuk fluoreszcens mikroszkóp alatt.

Az Lv17/ d24 konstrukció előállítása

Az ASPV Lv7/d24 izolátumot sorozatpasszázs útján hoztuk létre. Az első 8 passzázst 80-100% konfluenciát mutató Cos7 sejtekben végeztük. A Cos7 sejteket 3 MOI Lv17 törzsszel fertőztük. Minden passzázsban 7 nap elteltével 200 µl felülúszót vittünk át új Cos7 sejtekre. A nyolcadik passzázs után a következő 3 passzázst PAM-okon végeztük. Minden 3. nap után 200 µl felülúszót átvittünk friss PAM-okra. Végül még 3 passzázst végeztünk PAM-okon a megfelelő tisztaságú minta biztosítása érdekében.

A vírusok izolálása

A mutáns vírusokat fluoreszcens mikroszkóp alatt izoláltuk manuálisan, úgy, hogy a fluoreszcensen világító (markergént tartalmazó mutáns vírussal fertőzött) sejteket pipetta segítségével elkülönítettük a nem fluorszecensen világító sejtektől. Az izolált, tehát mutáns vírussal fertőzött sejteket feltárás céljából háromszor lefagyasztottuk és felolvasztottuk. 96 vajatú lemezre szélesztett PAM-okat fertőztünk az izolált vírussal, majd 37 °C-on inkubáltuk 24 órán át. Ezt az eljárást addig ismételtük, amíg az adott

markergént kifejező fertőzött sejtek aránya elérte a 100%-ot.

Immunfluoreszcens festés (IF), titer és kópiaszám-meghatározás

A vizsgálatokhoz szükséges IF festéseket sertés anti-ASPV poliklonális antitesttel és anti-sertés másodlagos antitesttel 1000-szeres hígításban végeztük el.

Annak vizsgálatára, hogy a mutáns vírusok hogyan szaporodnak *ex vivo*, PAM-okat az Lv17/d110-11L, Lv17/dCD-dGL és Lv17/d24 vírusokkal, valamint kontrollként Lv17 vírussal fertőztük 0,01 MOI-val és különböző időpontokban (0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96 és 108 órával) a fertőzés után (hpi)) mintát vettünk a felülűszóból. Ezután a begyűjtött mintákat PAM-okon titráltuk, majd qPCR-t alkalmaztunk az aliquotokban lévő víruskópiaszámok meghatározására. Az titert IF festés alkalmazásával a legmagasabb hígítási foknak és a fertőzött sejtek számának ismeretében állapítottuk meg, fluoreszcens fókuszegység (FFU) alapú meghatározással.

Az ASPV különböző génmódosított izolátumainak kópiaszámának meghatározásához használt reakciót az

ASPV konzervatív p72 génjének egy 328 nukleotid hosszú régiójára terveztük. A fertőzött PAM sejtek hígított felülúszója 72 °C-on történő, 20 perces hőkezelés után közvetlenül templátként került felhasználásra a reakcióban. A qPCR specifitását olvadási görbeelemzéssel ellenőriztük. A víruskópiaszámokat a tisztított amplikon 10-szeres hígításával készült standard görbe segítségével számoltuk ki. A titerek és a kópiaszámok különbségeit statisztikai módszerekkel is elemeztük az R programmal.

Eredmények

Újgenerációs szekvenálási módszer kidolgozása

A PAM-ok fertőzhetőségi vizsgálata azt mutatta a rövidebb, 24 óráig tartó kísérletben, ahol 2 óránkénti fertőzéseket végeztünk, hogy bár 4-8 óránál kissé megugrik a fertőzhetőség, de a legnagyobb fogékonyságot a sejtek a szélesztés után 24 órával mutatják az ASPV-re. Ezt az eredményt a hosszabb, 108 óráig tartó fertőzési kísérlet is alátámasztja, ahol 8, 18, 72, 96, 120, 140 óránként végeztünk fertőzést a szélesztés után. 18 órával a szélesztés után jelentősen magasabb a PAM-ok fertőzhetősége, mint a kísérlet többi időpontjában.

A szekvenáláskor a legnagyobb probléma a vírus DNS csekély mértékű mennyisége, ezért protokoll kifejlesztésénél az ASPV genom dúsítására és a DNS mintákban a szennyező gazdagenom mennyiségének csökkentésére koncentráltunk a rendelkezésünkre álló legegyszerűbb eszközökkel. Három mintából indultunk ki és az eredmények függvényében dolgoztunk velük tovább. A mintáink gazda és vírus DNS-ének kezdeti meghatározása után a szennyező gazdaszervezet DNS tartalmának minimalizálására koncentráltunk, amit DNáz

kezelések hatékonyságának növelésével értük el. A kiindulási 3 mintából 3-3 párhuzamos kezelést végeztünk. A vírus DNS detekciója során a legtöbb esetben minimális növekedést (Ct +1-2) észleltünk a kezeletlen és a DNáz I-el kezelt minták Ct-értékei között. A gazdaszervezet DNS-ének mennyisége ezzel szemben jelentősen csökkent, azonban a csökkenés mértéke mintánként eltérő volt. A DNS abszolút mennyiségének növelése érdekében végzet teljesgenom amplifikálás (WGA) azt mutatta, hogy a WGA-reakciót követően a vírus DNS-tartalom ~1000-szeres növekedését lehetett detektálni a qPCR segítségével. A gazdaszervezet DNS-ét ezzel szemben nem lehetett kimutatni.

Az ASPV NGS szekvenálásához a leghatékonyabb megoldás megtalálása érdekében két ASPV-mintát futtattunk két platformon (Illumina és IonTorrent). A szekvencia adatok elemzése azt mutatta, hogy a virális readok száma mind a négy mintában meghaladta a szennyező nukleinsavak readjeinek számát, tehát kijelenthető, hogy az előbbieken bemutatott módszer sikeresen alkalmazható a szennyező genomok mennyiségének minimalizálására. Az Ion Torrent platformon szekvenált minták homopolimer szakaszaiban

a referencia szekvenciához képest számos (~131) nem egyértelműen meghatározható nukleotidot találtunk, főként egy- és két nukleotidos indelek formájában. Ezen felül a platformon a virális readok száma és az átlagos lefedettség is jóval alacsonyabbnak bizonyult az Illumina módszerrel kapott eredményekhez képest. Az Illumina platform eredményeiben sokkal ritkábban fordultak elő nem meghatározható nukleotidok. Ezek az egyik minta adatainak feldolgozása után (~7 millió virális read) már csak a három leghosszabb homopolimer régióra korlátozódtak, amelyek több mint 10 C/G nukleotidot tartalmaztak. Így az vírus pontos szekvenciájának meghatározásához ezt a három régiót Sanger-módszerrel kellett vizsgálni. A poliC/G traktusok méretét és a körülöttük lévő tényleges szekvenciát az ellentétes szálak leolvasásainak összehasonlításával és elemzésével határoztuk meg.

Módosított vírusok előállítása és jellemzése

Az Lv17/d110-11L konstrukció előállítása és jellemzése

Az MGF-110 11L gén funkciója jelenleg ismeretlen, vizsgálataink során egyedi jellemzői miatt esett

választásunk erre a génre. Az MGF-110 11L gén a különböző törzsekben genetikai szinten rendkívül változatos tulajdonságokkal rendelkezik, homopolimer G/C (hpG/C) régiót tartalmaz, amelynek hossza igen nagyfokú variabilitást mutat. A GenBankból nyert adatokból az MGF-110 11L szekvenciák összehasonlítása alapján 4-től egészen 19 bázis hosszúságú szakaszokat találhatunk a homopolimer régióban. Bár a régió szerepe az ASPV esetében nem tisztázott, de más vírusokban és sejtes szervezetekben fontos szabályozó szerepet tölt be.

Az MGF-110 11L delécióját CRISPR/Cas9 rendszer indukált intercelluláris homológ rekombináció segítségével valósítottuk meg. A gén nagy részét (a 825 bp ORF-ből 760 eltávolításra került) egy ASPV eredetű p72 promóter által szabályozott eGFP riporter génre cseréltük. Az izolálás után a rekombináns, fluoreszcens mikroszkóp alatt a riporter génre homogénnek tűnő vírustenyészetet titrálva azt találtuk, hogy a mutáns vírus titere (3×10^6 FFU/ml) megközelítette a szülői vírusét ($7,2 \times 10^6$ FFU/ml). A korábban bemutatott szekvenálási módszert alkalmazva azt találtuk, hogy a szülői genomhoz képest tizennégy új, nem tervezett

pontmutációt találtunk az Lv17/d110-11L vírus különböző régióiban. Két mutáció a szabályozó régiókat érintette, egy szinonim mutáció volt, négy aminosavcserét okozott, három korai fehérjelánc-terminációt, és négy helyen nem tudtuk pontosan meghatározni az adott helyen lévő nukleotidot, ami kvázispecies vírusok jelenlétére utal az izolátumban.

Az *ex vivo* növekedési vizsgálatoknál PAM sejteket fertőztünk az Lv17/d110-11L mutáns vírussal, kontrollként pedig Lv17/WB/Rie1 vírustörzset használtunk. A mutáns és a szülői vírusok növekedési kinetikájában 108 hpi-ig nem volt szignifikáns különbség, bár az Lv17/d110-11L fertőző vírustitere minimálisan a szülői törzsé alatt maradt. 108 hpi-nél hirtelen ugrásszerű növekedést tapasztaltunk az Lv17/d110-11L fertőző titerében, a vírusrészecske mennyiség 12-szeresen meghaladta az Lv17 vírusét. A vírus specifikus fertőzőképességében (SI) (kópiaszám/titer) viszont nem találtunk változást a kísérlet időtartama alatt.

Az Lv17/dCD-dGL konstrukció előállítás és jellemzése

A homológ rekombináció vizsgálatát kettő, korábban a laborunk által CRISPR-Cas9 rendszerrel létrehozott, markergént tartalmazó vírussal végeztük el. Az első konstrukció egy eGFP markergént tartalmazó vírus, amelyből eltávolítottuk a CD2v és 8-CR fehérjéket kódoló géneket. A CD2v homológ a T-sejtek CD2 fehérjéjével és részt vesz a vörösvértestek hemadszorpciójában a fertőzött makrofágok felé. A 8-CR fehérje egy C-típusú lektin domént tartalmaz és részt vesz a vírus CD2v fehérje és sejtreceptora közötti kölcsönhatás stabilizálásában, illetve ez a fehérje is szükséges a hemadszorpcióhoz. A 9GL fehérje- és DNS-szinten erősen konzervált bármely vírusizolátumban. A 9GL által kódolt fehérje részt vesz a normális virionérésben és a vírus növekedésében *in vitro*, és befolyásolhatja a virulenciát *in vivo*. A 9GL gén deléciója az ASFV-törzstől függően különböző mértékű gyengülést eredményezett.

A koinfekciót követő izolálás és a fertőzés folyamatának ötszöri megismétlésével olyan homogén izolátumot kaptunk, amelyben minden fertőzött sejt piros és zöld fluoreszcenciát mutatott. Az NGS szekvenálás is

megerősítette a vírusállomány homogenitását, nem találtunk olyan readet, amely szülői szekvencia jelenlétére utalt volna. A két szülői törzshez képest hat új mutáció fordult elő a bal oldali variábilis régióban. Az Lv17/dGL egyedi szekvencia markereinek eltűnése és az Lv17/dCD egyedi markerének megjelenése a rekombináns Lv17/dCD-dGL genomjában arra utal, hogy a kialakulás során legalább két átkereszteződés történt, az egyik a két fluoreszcens marker végpontjai között, a másik pedig a genom végén.

A mutáns vírus lassabb növekedési sebességet mutatott, mint az Lv17 törzs, és végtitere ($6,9 \times 10^3$ FFU/ml) is 108 hpi-nál jelentősen alacsonyabb volt, mint az Lv17-é ($1,8 \times 10^6$ FFU/ml). Nyilvánvaló, hogy a mutáns vírus genetikai módosításai gyengítették a PAM-ban való replikációs képességét, ahogy azt specifikus fertőzőképesség értékei is jelzik. Az Lv17/dCD-dGL SI-je a kísérlet ideje alatt végig egy nagyságrenddel meghaladta a szülői Lv17 vírusét, ami valószínűleg nagyrészt a fertőzőképesség csökkenésének köszönhető.

Az Lv17/d24 konstrukció előállítása és jellemzése

Az Lv17 stabilitásának vizsgálatához Cos7 sejteket fertőztünk a vírussal, majd az 5. és 8. passzázs után mintát vettünk (Lv17_cos5, Lv17_cos8) és jellemztük a vírusokat. Ezután 3 passzázst PAM sejteken végeztünk el (Lv17_cos8_pam3). Az így kapott mintákat NGS szekvenáltuk. A három állomány szekvenciaelemzése kimutatta, hogy az Lv17 genomja jelentős átrendeződéseket szenvedett el a bal oldali változó régióban (LVR) nagy indelek formájában, illetve ezen felül három pontmutációt lehetett kimutatni a vizsgált passzázsokban. Az Lv17_cos5 és Lv17_cos8 állományokban a kvázi-species fő vírusösszetevője egy olyan vírusgenom volt, ami több mint 40 kb-t (1-40568) veszített a bal terminális régiójából, amely szakasz 52 kódoló régiót tartalmazott. A hiányzó régió helyén egy, a genom jobb terminális régiójából származó, közel hasonló méretű (38780 bp, 51 gént kódoló) vírusfragmentum található. Az Lv17_cos5 és Lv17_cos8 állományokban viszonylag kis számú vírusváltozat (907 és 3 read) még mindig mappelhető volt a genomnak a fordítottan ismétlődő régió proximális végpontja és a deléciós töréspont közötti régiója között (2352 és 40568),

ami más genotípus-változatok jelenlétére utal. Az Lv17_cos8_pam3 mintában az Lv17 egy szintén nagy deléciót tartalmazó változata lett a fő variáns, amit addig nem tudtunk kimutatni. Ez egy rövidebb deléciót tartalmazott, amely a genom 187 és 26554 bp-ja közötti régiót érintette és 42 gén deléciójával járt. Az így kapott vírusváltozat tartalmazott egy olyan régiót (26555-40569), amelyet sem az Lv17_cos5-ben, sem pedig az Lv17_cos8-ban nem tudtunk kimutatni, kizárólag az Lv17-ben volt eddig detektálható. Mivel a deletált régióhoz még mindig 63 readet lehetett mappelni, még három véghígítási és passzázsciklust végeztünk, az így kapott Lv17/d24 vírust szintén szekvenáltuk és állatkísérletekhez továbbküldtük.

Az Lv17/d24 vírus növekedési kinetikájában változásokat tapasztaltunk. Lassabb növekedési sebességet mutatott, mint az Lv17, és a végtitere ($2,5 \times 10^5$ FFU/ml) alacsonyabb volt, mint a szülői vírusé, ($1,8 \times 10^6$) 108 hpi-nál. Az Lv17/d24 SI-értékei szinte mindig meghaladták az Lv17-ét, bár értékei kissé a szignifikanciahatár felett maradtak.

Megbeszélés

Újgenerációs szekvenálási módszer kidolgozása

A PAM sejtek fogékonyságával kapcsolatos eredményeink egyértelműen azt mutatták, hogy ezekkel a sejtekkel végzett munka, bár a sejtvonalakhoz képest nem túl jól, mégis elfogadható mértékben standardizálható, viszont a fertőzhetőség gyorsan, akár 2 órán belül is jelentősen meg tud változni. A sejtek a lerakás utáni 24. óra körül mutatják a legnagyobb fogékonyságot az ASPV-re.

A nukleáz kezelés megfelelő alkalmazása, a teljes genom amplifikálása, és ami a legfontosabb, a mintaelőkészítés különböző fázisainak folyamatos ellenőrzése és értékelése lehetővé tette, hogy teljes mértékben kihasználjuk az NGS előnyeit az ASPV genom szekvenálásához. A technika segítségével alapvető laboratóriumi eszközök használatával, Illumina platformon és esetlegesen mindössze három Sanger szekvenálás alkalmazásával gyorsan és pontosan meghatározható az afrikai sertéspestis vírusának teljes genom szekvenciája.

Módosított vírusok előállítása és jellemzése

Az Lv17/d110-11L konstrukció előállítása és jellemzése

Az élővírusos vakcinafejlesztések során felmerülő problémák megoldása érdekében deletáltunk egy MGF-110 géncsaládba tartozó gént; ettől azt vártuk, hogy a változás mérsékelt hatással jár az Lv17 virulenciájára, és nem gyengíti túlzottan a vírust. Azt feltételeztük, hogy az MGF-110 11L gén eltávolítása pleiotróp hatások révén jelentős attenuációt okozhat, egyrészt a fehérje, másrészt a poliC/G traktus potenciális szabályozó funkciójának megszüntetésével. Valóban tapasztaltunk attenuációt, azonban nem a várt mértékben.

Kevés kivételtől eltekintve az ASPV-ben a génkiütések nem járnak nagyszámú mutáció megjelenésével a genomban. Az izolálás után azonban az Lv17/d110-11L szekvenálása váratlanul nagy számú mutációt mutatott ki a vírusgenomban a deléciós régió kivül. Számos mutálódott gén olyan folyamatokhoz köthető, amelyek potenciálisan befolyásolhatják az immunrendszert és a vírus virulenciáját.

Az *ex vivo* növekedési vizsgálatok eredményeiből arra következtettünk, hogy bár a géndeletált vírus titerében csak 108 órára detektáltunk jelentős változást, de a vírusok specifikus fertőzőképessége az utolsó 24 órában nem változott jelentősen, ezért ez a különbség az Lv17/d110-11L lassabb növekedésének és potenciálisan nagyobb vírushozamának következménye lehet.

Az Lv17/dCD-dGL konstrukció előállítása

Annak ellenére, hogy egyes vírusizolátumok szekvenciája és a rekombináns vírusok előállítására használt technikák sikeressége egyértelműen arra utal, hogy a különböző ASPV-törzsek között homológ rekombináció történik, ASPV-ben nagyon keveset tudunk erről a jelenségről. Tudomásunk szerint a mi munkánk az első, amely közvetlen tapasztalati bizonyítékot szolgáltat arra, hogy az ASPV homológ rekombinációja makrofágokban megtörténik. Munkánk során könnyűszerrel izolálni tudtuk a rekombináns vírust, amely két fluoreszcens markert hordozó vírus keresztezéséből keletkezett, ez pedig arra utal, hogy amennyiben koinfekció történik, a homológ rekombináció viszonylag nagy gyakorisággal történhet a vírustörzsek között is. Az a tény, hogy az egyedi szülői genetikai markerek alapján

legalább két rekombinációs esemény egyértelműen kimutatható a rekombináns vírus génállományában erősen alátámasztja az előző állítást.

Az Lv17/d24 konstrukció előállítás és jellemzése

Lv17 genetikailag instabil a Cos7 sejtekben, az állományok nem homogének, a vírusok többsége mindössze öt passzázs során körülbelül 40 kb-t veszít a genomjából. Azonban még a kisebb genetikai változatok, amelyek nem detektálhatók vagy nehezen eltávolíthatók is fennmaradhatnak az alacsony hígítású passzázsokban az adaptáció során és néhány passzázsban, különböző tenyésztési körülmények között, ebben az esetben PAM sejtekben, a fő változattá válhatnak.

A szakirodalomban számos példa található arra, hogy az ASPV sejtvonalakon történő sorozatpasszálása nagy deléciókat eredményezhet a vírus genomjában, leggyakrabban a bal és jobb oldali variábilis régióban fordulnak elő ezek a változások. A sorozatpasszálás után legtöbbször pedig a vírus elveszíti az eredeti célsejteken (makrofágok) való replikációs képességét. Cos7 sejteken eddig még nem vizsgálták az Lv17 vírus stabilitását.

Az alkalmazott szekvenálási technika nyilvánvalóan alkalmas az egy nukleotidot érintő változások, vagy akár a polimorfizmusok kimutatására is, ha azok dominánsak a kvázispeciesben. A teljes genom amplifikáció additív torzító hatásai, valamint az NGS-eljárásban rejlő szisztematikus torzítások és egyenetlenségek miatt nagyon nehéz megbecsülni a fő genetikai komponensek arányát a különböző mintákban. Ennek az aránytalanságnak a következménye, hogy általában nem lehet abszolút bizonyossággal meghatározni, hogy egy adott víruspopuláció genetikailag homogén-e (vagy sem), mivel kisebb számú komponensekre jellemző readok nagy valószínűséggel nem mutathatók ki a mintában. Az ilyen readok bármilyen kis számban történő kimutatása azonban egyértelműen jelzi a genetikai variánsok jelenlétét a kvázispeciesben.

In vivo kísérletek

Egy olaszországi együttműködés keretében lehetőségünk nyílt az említett három törzs *in vivo*, házisertéseken való tesztelésére is. A 110-11L géndeletált vírustörzs a patogénitás és letalitás egyértelmű csökkenését mutatta a szülői vírustörzshöz képest, de számos klinikai tünet volt megfigyelhető, ami

miatt vakcinaként jelen formában nem használható. Az Lv17/d24 és Lv17/dCD-dGL törzsekkel való fertőzéskor eredményeink egybeváltak az *in vitro* eredményekkel, *in vivo* is a vírusok replikációs képességének csökkenését tapasztaltuk. Továbbá sertések enyhe klinikai tüneteket (láz, hasmenés, étvágytalanság, bevérzések a fülön) mutattak annak ellenére, hogy az ASPV-t nem lehetett kimutatni a vérükben az Armenia/07 törzsszel való ráfertőzésig. Sajnos a ráfertőzést követő elfogadhatatlanul magas elhullási arány megerősíti, hogy ezek a vírusok jelenlegi formájukban nem alkalmasak vakcinaként való felhasználásra.

Új tudományos eredmények

1) Munkánk során kifejlesztettünk egy újgenerációs szekvenálási technikát, amellyel egyszerűen és pontosan meghatározható az ASPV teljes genomja.

2) Három különböző rekombinációs technikával előállítottunk három különböző ASPV vírust az Lv17/WB/Rie1 törzsből (Lv17/d110-11L, Lv17/d24, Lv17/dCD-dGL). Először CRISPR-Cas9 technikával eltávolítottuk az MGF 110-11L gént az attenuált Lv17/WB/Rie1 törzs genomjából, majd jellemeztük a vírust.

3) Bebizonyítottuk, hogy a különböző ASPV törzsek PAM sejteken történő koinfekciója során homológ rekombinációs események következnek be, és az így keletkezett vírusok izolálhatóak.

4) Megállapítottuk, hogy az Lv17 Cos7 sejteken való passzálásakor is jelentős változások következnek be az vírus genomjában.

5) Az előállított vírusok jelenlegi formájukban vakcinának nem alkalmasak, viszont bebizonyítottuk,

hogy az Lv17 nemkívánatos mellékhatásai további mutációkkal a védőképesség jelentős csökkenése nélkül enyhíthetők.

Tudományos publikációk

Az értekezés témájához kapcsolódó lektorált publikációk:

Mészáros I, Olasz F, Tamás V, Bálint Á, Zádori Z. **Az Afrikai Sertéspestis Vírusának Biológiája - Irodalmi összefoglaló.** Magyar Állatorvosok Lapja. 2019, 144./55-62.

Olasz F, Mészáros I, Tamás V, Bálint Á, Bruczynska M, Wozniakowski G, Zádori Z. **Az Afrikai Sertéspestis járványtana és a védekezés lehetőségei.** Magyar Állatorvosok Lapja. 2019, 141./101-115.

Olasz F, Mészáros I, Marton S, Kaján GL, Tamás V, Locsmáncsi G, Magyar T, Bálint Á, Bányai K, Zádori Z. **A Simple Method for Sample Preparation to Facilitate Efficient Whole-Genome Sequencing of African Swine Fever Virus.** *Viruses*. 2019 Dec 6;11(12):1129. doi: 10.3390/v11121129.

Tamás V, Righi C, Mészáros I, D'Errico F, Olasz F, Casciari C, Zádori Z, Magyar T, Petrini S, Feliziani F. **Involvement of the MGF 110-11L Gene in the African Swine Fever Replication and Virulence.** *Vaccines*, 2023 Apr 14;11(4):846. doi: 10.3390/vaccines11040846.

Franzoni G, Petrini S, Mészáros I, Dei Giudici S, Righi C, Olasz F, Zinellu S, Tamás V, Pela M, Gallardo C, Zádori Z, Oggiano A, Feliziani F. **Evaluation of Haematological and Immunological Parameters of the ASFV Lv17/WB/Rie1 Strain and its Derived Mutant Lv17/WB/Rie1/d110-11L against ASFV Challenge Infection in Domestic Pigs.** *Vaccines*. 2023; 11(7):1277. doi.org/10.3390/vaccines11071277.

Petrini S, Righi C, Mészáros I, d'Errico F, Tamás V, Pela M, Olasz F. Gallardo C, Fernandez-Pinero J, Göttl E, Magyar T, Feliziani F Zádori Z. **The production of recombinant ASFV Lv17/WB/Rie1 strains and their characterizations as vaccine candidates.** *Vaccines*. 2023, 11(12): 1860. doi:10.3390/vaccines11121860

Egyéb lektorált publikációk:

Olasz F, Tombácz D, Torma G, Csabai Z, Moldován N, Dörmő Á, Prazsák I, Mészáros I, Magyar T, Tamás V, Zádori Z, Boldogkői Z. **Short and Long-Read Sequencing Survey of the Dynamic Transcriptomes of African Swine Fever Virus and the Host Cells.** *Front*

Genet. 2020 Jul 28;11:758. doi:
10.3389/fgene.2020.00758.

Kiss I, Szigeti K, Homonnay ZG, Tamás V, Smits H, Krejci R. **Maternally Derived Antibody Levels Influence on Vaccine Protection against PCV2d Challenge.** *Animals (Basel)*. 2021 Jul 29;11(8):2231. doi:
10.3390/ani11082231.

Tombácz D, Kakuk B, Torma G, Csabai Z, Gulyás G, Tamás V, Zádori Z, Jefferson VA, Meyer F, Boldogkői Z. **In-Depth Temporal Transcriptome Profiling of an Alphaherpesvirus Using Nanopore Sequencing.** *Viruses*. 2022 Jun 13;14(6):1289. doi:
10.3390/v14061289.

Tamás V, Mészáros I, Olasz F, Kiss I, Homonnay ZG, Mortensen P, Zádori Z. **Allele-Specific Dual PCRs to Identify Members of the 27a Cluster of PPV.** *Viruses*. 2022 Jul 8;14(7):1500. doi: 10.3390/v14071500.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Zádori Zoltánnak, hogy lehetőséget biztosított kutatásaimhoz. Köszönöm értékes javaslatait és szakmai támogatását, amelyek alapvetően hozzájárultak a munkám megfelelő minőségben történő elvégzéséhez, illetve disszertáció és a tudományos publikációk megszületéséhez. Köszönöm Dr. Bálint Ádámnak a rendelkezésünkre bocsátott mintákat. Köszönettel tartozom a HUN-REN Állatorvostudományi Kutatóintézet Új Kórokozók Csoport tagjainak a szekvenálásban nyújtott segítségért és a Légzőszervi Bakteriológia Csoport tagjainak a PAM-ok izolálását.

Köszönöm továbbá a HUN-REN Állatorvostudományi Kutatóintézet Funkcionális Virologia Témacsoport tagjainak (Dr. Mészáros István, Dr. Olasz Ferenc), hogy hasznos tanácsokkal láttak el munkám során, és kérdéseimmel bármikor hozzájuk fordulhattam.

Köszönettel tartozom barátaimnak, akik türelmesek voltak hozzám amikor ideges voltam, és akiknek mindig volt hozzám egy-két jó szavuk. Külön köszönöm Csizovszky Ferencnek, hogy mindig jókedvre derített

amikor szükség volt rá, és mellettem állt a nehéz időszakokban.

Végül pedig szeretném megköszönni a családomnak, hogy tanulmányaim alatt támogattak. Külön köszönöm Édesapámnak, aki sajnos már nem lehet közöttünk, hogy megtanított arra, hogy kitartással bármilyen cél megvalósítható.

A munka anyagi háttérét a H2020-VACDIVA, ÚNKP-20-3 és a KDP-2020 pályázatok biztosították.