

Genetikai változások víziszárnyasokból izolált influenza A vírusok *in vitro* adaptálódása során

TDK Dolgozat

Készítette: Oláh Barbara

Témavezetők:

Dr. Mészáros István

Tudományos főmunkatárs, Funkcionális Virologia
Témacsoport, Állatorvostudományi Kutatóintézet

Dr. Zádori Zoltán

Témacsoport vezető, Funkcionális Virologia Témacsoport,
Állatorvostudományi Kutatóintézet

Belső konzulens:

Dr. Tenk Miklós

Tanszékvezető, Járványtani és Mikrobiológiai tanszék

**ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM
ÁLLATORVOSI KAR**



TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK	3
1.0 BEVEZETÉS	5
2.0 IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	6
2.1 RENDSZERTAN	6
2.2 EPIDEMIOLOGIA	7
2.3 VIRION MORFOLÓGIA	8
2.4 KÓROKTAN	10
2.4.1 VIRION BEJUTÁSA A GAZDASEJTBE.....	10
2.4.2 vRNP BEJUTÁSA A SEJTMAGBA	11
2.4.3 A VIRÁLIS GENOM TRANSZKRIPCIÓJA ÉS REPLIKÁCIÓJA	11
2.4.4 A vRNP SEJTMAGBÓL TÖRTÉNŐ EXPORT	12
2.4.5 ÖSSZESZERELÉS ÉS KITÖRÉS A GAZDASEJT CITOPLAZMÁJÁBÓL.....	13
3.0 CÉLKITŰZÉS.....	14
4.0 ANYAG ÉS MÓDSZER.....	15
4.1 SEJTKULTÚRA KEZELÉSE ÉS SEJT TENYÉSZTÉS	15
4.2 VÍRUS IZOLÁLÁS	15
4.3 SOROZAT PASSZÁLÁS	16
4.4 IMMUNFLUORESCENCIA FESTÉS	16
4.5 NUKLEINSAV TISZTÍTÁS	17
4.6 SZEKVENÁLÁS	17
4.7 NEG8 ORF AMPLIFIKÁCIÓJA ÉS KLÓNOZÁSA.....	17
4.8 TRANSZFEKCIÓ.....	18
4.8 BIOINFORMATIKAI ELEMZÉSEK	18
5.0 EREDMÉNYEK.....	19
5.1 VÍRUS IZOLÁLÁS ÉS VÉGTITEREK VÁLTOZÁSA.....	19
5.2 STOCKOK JELLEMZÉSE.....	20
5.3 A QUASI SPECIES BELSŐ HETEROGENITÁSÁNAK VIZSGÁLATA	25
5.4 A NEG 8 FEHÉRJE VIZSGÁLATA.....	28
6.0 MEGBESZÉLÉS.....	29
7.0 ÖSSZEFOGLALÁS.....	33
8.0 SUMMARY.....	35
9.0 IRODALOMJEGYZÉK.....	37
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	40

RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

IAV	Influenza A vírus
HPAI	Magas patogenitású madárinfluenza
LPAI	Alacsony patogenitású madárinfluenza
HA	Hemagglutinin
NA	Neuraminidáz
NK	Nukleokapszid
PB2	Polimeráz B2
PB1	Polimeráz B1
PB1-F2	Polimeráz B1-F2
PA	Polimeráz A
PA-X	Polimeráz A-X
NP	Nukleoprotein
M1, M2	Mátrix fehérje 1,2
vRNP	Virális ribonukleoprotein
NS1	Nem struktúr fehérje 1
NEP	Export magfehérje
HA0	Hemagglutinin prekursor
HA1	Hemagglutinin receptor kötő alegység
HA2	Hemagglutinin fúziós peptidet tartalmazó alegység
NLS	Nuclear localization signal
RdRp	RNS dependens RNS polimeráz
mRNS	Messenger RNS
CRM1	Chromosomal region maintenance 1, exportin fehérje
Pol II	RNS polimeráz II
snRNSs	Kis sejtmagi RNS-ek
NS1-BP	Nukleoszóma kötő fehérje
CPF	Komplexhasítási és poliadenilációs specificitási faktor
PABPII	Poly(A)-kötő fehérje II
FFU	Fluorescent Focus Unit
IF	Immunfluoreszcens
DV	Desztillált víz
SNP	Single Nucleotid Polymorphism

ER	Endoplazmatikus retikulum
DuO	Duck ovarium
FBS	Fetal bovine serum
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
PBS	Phosphate buffered saline
TPCK	Tosyl phenylalanyl chloromethyl
MOI	Multiplicity of infection
ORF	Open reading frame
EDTA	Etilén-diamin-tetraecetsav
RT-PCR	Reverz transzkripció polimeráz láncreakció
LB	Luria-Bertani tápfolyadék
eGFP	Enhanced green fluorescent protein
p.i	Post infection, fertőzés után

1.0 BEVEZETÉS

A madárinfluenza az *Orthomyxoviridae* család, *Alphainfluenzavirus* genuszába tartozó Influenza A vírus. Európában endémiásan előforduló, elsősorban baromfi fajok, vadon élő és egzotikus valamint kedvtelésből tartott madárfajok gyakran tünetmentes, máskor magas lázzal, nagyfokú elesettséggel, légúti, esetenként idegrendszeri tünetekkel, vérzésekkel és hasmenéssel járó betegsége. A madárinfluenzát megbetegítő képessége alapján alacsony és magas patogenitású törzsekre lehet elkülöníteni. Az alacsony patogenitású (LPAI) törzsek légzőszervi megbetegedéseket míg a magas patogenitású törzsek (HPAI) többszervi elégtelenséget, idegrendszeri tüneteket és magas mortalitást okoznak. Magyarországon jelenlegi jogszabály szerint mind a LPAI és HPAI bejelentési kötelezettség alá tartozó betegség. A madárinfluenzával igazoltan fertőzött baromfitartó telepeken járvány igazgatásügyileg az állomány leölését vonja maga után, ezzel jelentős gazdasági károkat okozva. Közegészségügyi jelentősége sem elhanyagolható, egyes hemagglutinin alapján kialakított szubtypusokat (pl. H5, H7 és H9) zoonotikus vírusként tartanak számon, ugyanis adaptálódni valamint fertőzni képes az embert. A madárinfluenza vírusa melynek gazdasági jelentősége tehát nem elhanyagolható és rendkívül széleskörűen kutatott, mégis rejt újdonságokat. Jelen dolgozatomban azokra a kérdésekre keressük a válaszokat, hogy a madárinfluenza két különböző szerotípusa: a H3N8 és H5N9, hogyan adaptálódik két különböző eredetű sejtvonalhoz (DuO kacsa, Vero emlős), a folyamat közben hogyan alakul az *in vitro* fertőzőképességük és ez hogyan jár együtt a különböző lókuszon bekövetkező mutációkkal. Emellett vizsgáljuk a nyolcadik szegmens NEG8 fehérje sejten belüli lokalizációját és ezáltal következtetünk eddig ismeretlen funkciójára.

2.0 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 RENDSZERTAN

A dolgozatban kutatott *Alphainfluenzavirus influenzae* fajba tartozó, vírus rendszertanilag a *Riboviria* birodalom *Orthornavirnae* királyságába tartozik. *Negarnaviricota* törzsön belül, a *Polyploviricota* altörzs *Insthoviricetes* osztálynak, *Articulavirales* rendjébe. *Orthomyxoviridae* családon belül pedig az *Alphainfluenzavirus* nemzettségbe. (Murray et al., 2020)

Az influenzát négy típusba sorolják A, B, C, D. Az influenza A és B viriont morfológiailag nem lehet megkülönböztetni, ugyanakkor az influenza C hexagonálisan elhelyezkedő glikoprotein tüskéiről elkülöníthető. Az influenza A, B és C típust elsősorban antigén szinten, a nukleokapszid (NK) és mátrix (M) fehérje szinten lehet megkülönböztetni. Az influenza A típust további szubtypusokba sorolják felületi fehérjék alapján. (Mahy and Van Regenmortel, 2008) Az influenza A szubtypusba sorolása a hemagglutinin (HA) és neuraminidáz (NA) felületi fehérjék alapján történik. Jelenleg 18 HA (H1-H18) és 11 NA (N1-N11) szubtypus különíthető el. A HA és NA szerint több mint 130 influenza A kombinációt izoláltak elsősorban vadon élő madárfajokból. ("Influenza Type A Viruses and Subtypes," 2023) Az influenza A számos madárfaj és az ember mellett több emlősállatot is képes fertőzni köztük sertést, lovat, vadászgörényt, fókát, bálnát, nyércet, kutyát, macskát stb. (Dangi and Jain, 2012) A kórokozó HA és NA aminosav szekvenciái sokkal nagyobb variabilitást mutatnak, mint az influenza B ezzel megegyező szekvenciái. Az influenza A és B mind, nyolc RNS szegmenssel rendelkeznek míg az influenza C csak héttel. (Mahy and Van Regenmortel, 2008) Az influenza A és B felelősek elsősorban a szezonális humán járványokért. A madárinfluenza, akkor képes human pandémiát kialakítani, amikor egy új szerotípus vagy olyan mutáns keletkezik, ami hatékonyan képes az embert fertőzni. Az influenza B a természetben csak embert képes fertőzni, míg az influenza C igazoltan képes az ember mellett sertést is fertőzni. Az influenza C enyhébb megbetegedéseket alakít ki, de humán járványokat nem képes létrehozni az influenza A és B-vel ellentétben. Az influenza D elsősorban szarvasmarhát és kisebb hányadban egyéb emlősállatok fertőzésében lehet izolálni, de humán fertőzésben nem kimutatható. ("Influenza Type A Viruses and Subtypes," 2023).

2.2 EPIDEMIOLOGIA

Az első *Alphainfluenzavirust* 1918-ban a spanyolnáthának elnevezett madár eredetű H1N1 pandémiakor izolálták és írták le először Amerikában. Az 1918-1919 közötti, a történelem legnagyobb influenza járványa az egész világon elterjedt és becslések szerint a világ népességének egyharmadát érintette a vírus.(Taubenberger and Morens, 2006) A járványban 50-100 millió ember vesztette életét.(Johnson and Mueller, 2002) 1957-1958-ban Kelet Ázsiában az Ázsiai influenzára elnevezett H2N2 vírus által okozott pandémia 1,7 millió áldozatot szedett (Spreeuwenberg et al., 2018). A világjárványok közül a harmadik legnagyobb 1968-ban Hong Kong-ból indult ki, melyet egy korábbi madár eredetű H3 és egy humán eredetű H2N2 influenza törzsek reasszortáció következtében kialakuló H3N2 vírus okozott. A Hong Kong-i járványban körülbelül 1 millióan haltak meg. A H3N2 vírus a szezonális humán megbetegedésekben továbbra is recirkulál és génsodródással új törzseket alakít ki.(Jester et al., 2020)

Európában 2021. október és 2022. szeptember között vizsgált Madárinfluenzára vonatkozó járványügyi adatokat az Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság, Európai Betegségmegelőzési és Járványvédelmi Központ és az Európai Unió Madárinfluenza Referencia Laboratórium publikálta. Eszerint a fent említett időintervallumban az eddigi legnagyobb magas patogenitású (HPAI) madárinfluenza járványt tartják számon, összesen 2520 járványkitörés baromfiban, 227 fogságban tartott madarakban és 3867 eset ahol magas patogenitású madárinfluenzát detektáltak vadon élő madarakban. Az eseteket 37 európai országban jelentették az adott időszakban és a vírussal fertőzött állattartó telepeken 50 millió madár került leölésre vagy hullott el a betegségben ez idő alatt. 2022. szeptember 10 és 2022. december 2 között 1163 magas patogenitású (HPAI) madárinfluenza esetet jelentettek 27 európai országban a következő megoszlásban: baromfiban 398, fogságban tartott madarakban 151 és vadon élő madarakban 613. A 398 regisztrált baromfi esetet bejelentő országok közül is az első három helyen áll: az Egyesült Királyság (115), Franciaország (98) és Magyarország (69). A 2021-2022 epidemiológiai évben az összes eset 1,7-szer haladta meg a 2020-2021-ben regisztrált esetek számát, valamint 2,4-szer a 2016-2017-ben regisztráltakét. A járványügyi helyzet folyamatosan romló tendenciát mutat, ami előreláthatólag folytatódik a 2022-2023 évben is.

HPAI madárinfluenzát legalább 64 vadon élő madárfajban detektáltak. Ezek között Európában legalább 18 kacsafaj (407), 10 tengeri madárfaj (117), 12 ragadozó madárfaj (65) és 24 egyéb vadon élő madárfaj (82). A vadon élő madarak között a legnagyobb jelentősége a vírus terjedésének szempontjából a vízimadarak közül is a tőkés récének (*Anas platyrhynchos*)

van, mely a vírus fő rezervoárja és kulcs szerepet játszik a magas patogenitású influenza terjesztésében. A vírus recirkulációja a vadon élő rezervoár fajokban gyakori megbetegedéseket okoz a baromfi állományokban Európa szerte. (European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control, European Union Reference Laboratory for Avian Influenza et al., 2023)

2022. szeptember óta vizsgált fertőzésekben detektált madárinfluenza vírust 11 genotípusba sorolták ebből három már korábban a 2022. nyári hónapokban is előfordult. HPAI madárinfluenzát mutattak ki egyes vadon élő és haszonállat fajokban Európában és Észak Amerikában, ami a vírus adaptációját és replikációra való hajlamát jelenti az emlős fajokban. 2022. októberében Spanyolországban nyérc tenyészetet érintett a madárinfluenza H5N1 genotípusú vírusa. Azt feltételezik, hogy a fertőzőképesség változását ami lehetővé teszi a nyércek megbetegedését, a PB2 fehérje mutációja okozza, ami növeli az RNS polimeráz aktivitást emlősökben. Humánegészségügyi vonalon Spanyolországban két (H5N1), Kínában három (H5N1, H5N6, H9N2), Vietnamban egy NA-típus nélküli (H5) humán esetet írtak le. A vírus humán fertőzésre vonatkozó kockázata, a felmérések szerint, alacsony az átlagos emberekre nézve és közepes az adott szakterületen foglalkoztatottak körében. (European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control, European Union Reference Laboratory for Avian Influenza et al., 2023)

2.3 VIRION MORFOLÓGIA

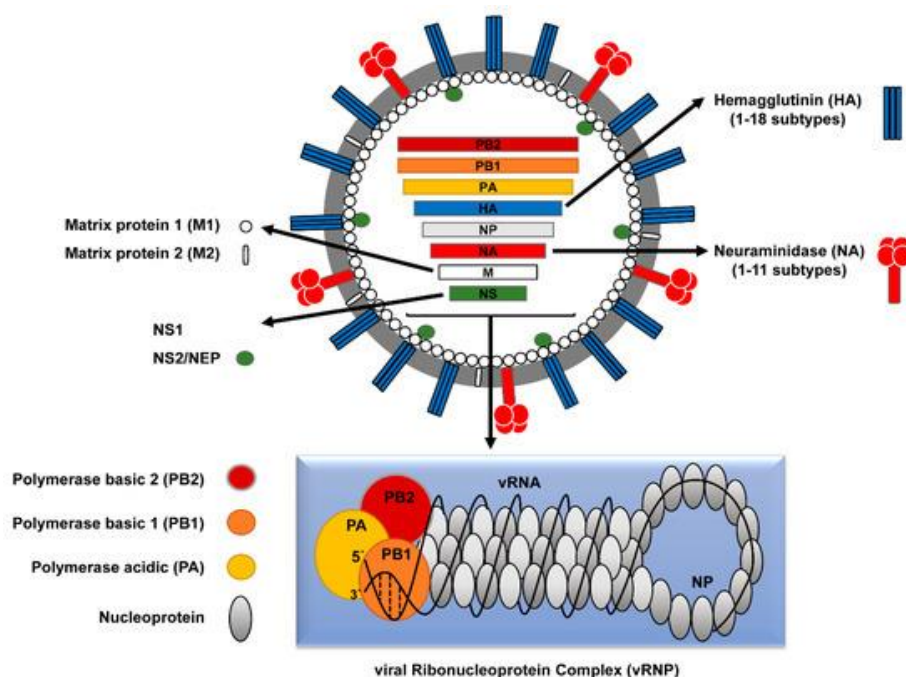
Az influenza A vírus genomját tekintve negatív, szimplaszálu, nyolc szegmensből álló RNS vírus. Az influenza A vírus genom mindössze 13588 bázis. A nyolc genom szegmens tíz esszenciális fehérjét kódol (Eisfeld et al., 2015). A fogékony gazdafaj szervezetében szelekciós nyomás hatására genetikai sodródással (mutációkkal) adaptálódik az életképesebb virion a kvázi speciesből, a szegmentált genom pedig lehetővé teszi a reasszortáció révén történő nagyobb genetikai változásokkal járó szelekciót is. Ezek a folyamatok okozzák a vírus nagyfokú diverzitását és a gazdaváltásra való képességét.

Az első szegmens az RNS polimeráz egyik alegységét a polimeráz B2 (PB2) fehérjét kódolja. A második szegmensről az RNS polimeráz egy másik alegysége, a polimeráz B1 (PB1) és a polimeráz B1-F2 (PB1-F2) fehérje íródik le. Utóbbi a fertőzött sejtek apoptózisában játszik szerepet. A harmadik szegmensről szintén az RNS polimeráz komplexbe tartozó alegység a polimeráz A (PA) fehérje és a polimeráz A-X (PA-X) fehérje íródik le, aminek a transzkripció terminációjában van szerepe. A negyedik szegmens a hemagglutinint kódolja, aminek meghatározó szerepe van a receptor kötésben és a vírus fertőző képességében. Az ötödik

szegmens kódolja a nukleoprotein (NP), a hatodik szegmens a neuraminidáz (NA), a hetedik szegmens két mátrix fehérjét a mátrix fehérje 1-et (M1) és mátrix fehérje 2-t (M2). A nyolcadik szegmensről a nem struktúr fehérje 1 (NS1), az export magfehérje (NEP), valamint az ismeretlen funkciójú, negatív szálról leíró NEG8 (Sabath et al., 2011) fehérje (Samji, 2009).

A humán influenza A vírus nyolcas szegmentjén a 2010-es években felfedeztek egy különösen hosszú nyitott leolvasási keretet a NEG8-at, mely érdekes módon a negatív szálon kódolódik (Sabath et al., 2011). A fehérje három transzmembrán doménnel rendelkezik és az expressziós kísérletek során a sejtek ER-jában halmozódik fel. Fertőzött egér sejtekben azonban nem sikerült IF festéssel, fertőzésen átesett állatok savójának a felhasználásával kimutatni, amiből arra következtettek, hogy vagy nagyon rövid a felezési ideje vagy kevésbé immunogén (Hickman et al., 2018; Vasin et al., 2014). A funkciója, a vírus életciklusában betöltött szerepe azonban még most is ismeretlen.

A virion átmérője 80-120 nm, változékony alakban fordul elő de leggyakrabban az ellipszis alakban lehet detektálni. (Noda, 2012) A gazdasejt eredetű lipid burkában három féle transzmembrán fehérje a HA, az NA és az M2 fehérje (1.ábra), fordul elő. A burok fehérje tartalmának nyolcvan százalékát a hemagglutinin, tizenhét százalékát neuraminidáz fehérje adja. A burok alatt az M1 mátrixot képező fehérjéhez kapcsolatosan található a virális ribonukleoproteinek (vRNP). Ezek a vRNP-ek a nukleoproteinek köré csavart negatív szálú RNS-ből és NEP-ből állnak. A vRNP végén a három polimeráz: PB1, PB2 és a PA alkotja a virális RNS polimeráz komplexet (Samji, 2009)(1.ábra). Az influenza A vírusokat a hemagglutinin és a neuraminidáz felületi fehérjék alapján sorolják szubtípusokba. Eddig tizennyolc különböző H antigént és tizenegy N antigént azonosítottak.



1. Ábra Az influenza A vírus (IAV) és a ribonukleoproteinek szerkezeti ábrája (Mostafa et al., 2018).

2.4 KÓROKTAN

2.4.1 VIRION BEJUTÁSA A GAZDASEJTBE

A hemagglutinin transzmembrán, homotrimer szerkezetű fehérje, tüskéket alkot a vírus felületén. Ezekkel a tüskékkel képes a virion a gazdasejt membrán felületén található szíálsavhoz kötődni (Skehel and Wiley, 2000). A HA prekursor (HA0) két alegységből épül fel, HA1 a receptor kötő alegység és a fúziós peptidet tartalmazó HA2. Az alegységek egymással diszulfid hidakkal kapcsolódnak össze (Huang et al., 2003). A gazda állatok szervezetében a szíálsav kétféle szerkezetben ($\alpha(2,3)$ és $\alpha(2,6)$) fordul elő, melyeket a különböző HA szerotípusok eltérő hatékonysággal képesek kötni, így a kötés befolyásolja a gazdafajhoz való specificitását is a vírusnak. Az $\alpha(2,3)$ kötés elsősorban emberekre, míg az $\alpha(2,6)$ kötés madarakra és lófélékre jellemző. A sertés átmenetet képez, ugyanis mind a két kötés típust mutató vírussal képes fertőződni. A sertésnek tehát nagy jelentősége van a madarat megbetegítő influenza emberre való adaptációjában (Skehel and Wiley, 2000). A gazdasejt felületén található szíálsavhoz való kapcsolódás után receptor mediált endocitózissal, endoszómába burkoltan jut be a gazdasejtbe. Az endoszóma alacsony 5-6 körüli pH-ja aktiválja a virális és endoszómális lipid burok fúzióját. Az alacsony pH konformáció változást indukál a HA0-ban, ezzel a HA2 fúziós peptidet szabaddá téve. A fúziós peptid beilleszkedik az endoszómális membránba, ezáltal kapcsolatot teremtve a virális és az endoszómális membránok között, amelyek fúziója elengedhetetlen a vRNP bejutásához a citoplazmába. Az

endoszóma savasabb pH-ja nemcsak a HA0 konformáció változása és ezáltal a virális és endoszómális kapcsolat létrejötte szempontjából, de az M2 ioncsatorna megnyitása szempontjából is fontos (Samji, 2009). Az M2 ioncsatorna egy III. típusú transzmembrán fehérje, ami tetramer szerkezetet alkot. Transzmembrán alegységei proton szelektív ioncsatornaként (Holsinger and Alams, 1991; Pinto et al., 1992) funkcionálnak. Az M2 ioncsatornák megnyitása révén csökken a pH a virion belsejében, a savasabb környezet hatására leválik a vRNP az M1-ről. A szabaddá váló vRNP így már képes bejutni a sejt citoplazmájába (Pinto et al., 1992).

2.4.2 vRNP BEJUTÁSA A SEJTMAGBA

Az influenza virális transzkripció és replikáció a sejtmagban lezajló folyamatok, amihez elengedhetetlen a vRNP citoplazmából a sejtmagba való vándorlása. A vRNP-t felépítő virális fehérjék az NP, NA, PB1 és a PB2. Ezek a fehérjék mind rendelkeznek nukleáris lokalizációs szignállal (NLS), amelyek kötődése nélkülözhetetlen a sejtmagba történő import folyamatokban résztvevő fehérjékhez. Jelenlegi tanulmányok szerint nem tisztázott melyik NLS a leginkább felelős az import mechanizmusokért. A sejtmagba történő import a CRM1 dependens útvonalon valósul meg számos kariopherinhez kapcsolódva, mint az importin α és a β (Samji, 2009).

2.4.3 A VIRÁLIS GENOM TRANSZKRIPCÍÓJA ÉS REPLIKÁCIÓJA

Az influenza virális genom negatív szálú RNS-ből épül fel, aminek pozitív szálú RNS-re kell átíródnia, hogy virális mRNS-ként szolgáljon. A replikációhoz nincs szükség primerre, a folyamatot az teszi lehetővé, hogy a virális genom 5' és 3' végei részleges inverz komplementaritást mutatnak és így az egymással kapcsolódó bázispárok hajtű struktúrákat alakítanak ki, melytől a virális RNS dependens RNS polimeráz (RdRp) kezdi meg az RNS szintézist.

A virális mRNS is 5'-sapkával és poly(A)-farokkal rendelkezik, de az 5'-sapka celluláris eredetű (Crow et al., 2004; Deng et al., 2006). Kutatások fényt derítettek arra, hogy a virális 5'-sapka a celluláris mRNS-ből származik (cap snatching). A virális RdRp három fehérjéből épül fel, a PB1, PB1 és PA. A fehérjék közül a PB2 rendelkezik endonukleáz aktivitással. A PB2 a celluláris mRNS 5' metilált sapkához kapcsolódik majd lehasítja onnan a sapkát és az azt követő 10-15 nukleotidot 3' irányba. A lehasított celluláris cap struktúra 3' vége bázispárosodás révén kölcsönhatásba lép a vRNS utolsó nukleotidjaival, mely ezután a virális mRNS szintézisének primereként szolgál.

A sejt saját mRNS-einek képződése során a celluláris RNS polimeráz II (Pol II) a DNS-hez kötődik és megkezd a transzkripciót. A transzkripció iniciáció alatt foszforilálódik a Pol II, mely aktiválja a celluláris sapka (cap) komplex szintézist. Megfigyelések szerint az influenza RdRp ezen időszak alatt nagyobb valószínűséggel kapcsolódik a Pol II ezen formájához, amiből következtetni lehet, hogy ebben az időszakban fordul elő a “cap-snatching” folyamata (Engelhardt et al., 2005).

A nyolc szegmens összesen tíz esszenciális és akár további hat járulékos fehérjét kódol az alternatív splicing folyamatának köszönhetően, melyhez a vírus a sejt saját splicing mechanizmusait használja (Engelhardt and Fodor, 2006). A folyamat fő irányítója az NS1 vírus fehérje, amely képes kötődni a spliceoszóma egyik komponenséhez, az U6 kis sejtmagi RNS-hez (snRNAs)(Lu et al., 1994; Wang and Krug, 1998) és ezzel a fertőzött sejtek magjába irányítja azt (Fortes et al., 1995). Ehhez hasonlóan az NS1 kötődése az NS1 kötő fehérjéhez (NS1-BP) az NS1-BP sejtmagba történő transzportjához vezet. Az NS1-BP feladata nem teljesen tisztázott, de az SC35 spliceoszómát építő faktorról való közeli lokalizációból következtetni lehet, hogy szintén splicing folyamatában vesz részt (Wolff et al., 1998). A spliceoszóma formációját befolyásoló és sejtmagból történő export folyamatokban résztvevő, UAP56 splicing faktort szintén összefüggésbe hozták az NP-vel való kötődésében, habár ennek jelentősége még vitatott. Momose et al., 2001).

A virális mRNS-ek poliadenilációs mechanizmusa rendkívül szokatlan folyamat. A sejtes mRNS-ek poliadenilációja a poliadenilációs jel (AAUAAA) hasításával kezdődik a hasítás- és poliadenilációs specificitási faktor által, majd a poly(A) faroknak az mRNS 3' végéhez történő hozzáadásával zárul. A virális mRNS-ek azonban nem tartalmazzák az ehhez szükséges templát szekvenciát; helyette minden virális szegmensnek a templát szálon van egy öt-hét U nukleotid hosszú szakasza, kb. 17 nukleotid távolságra az 5' végétől, és ez képezi a virális poliadenilációs jel alapját. (Robertson et al., 1981) A virális RdRp enzim a virális RNS templát 5' végén marad kötve, ami sztérikus blokádot képez. (Engelhardt and Fodor, 2006; Hagen et al., 1994). Ezért a virális mRNS-ek transzlációja megakad, ami miatt az RdRp előre-vissza mozog ezen U nukleotid szakaszon, ami a szintetizált szálon poly(A) farok kialakulásához vezet.

2.4.4 A vRNP SEJTMAGBÓL TÖRTÉNŐ EXPORT

A sejtmagból csak a negatív szálú vRNP-k exportálódnak (Shapiro et al., 1987), mely folyamat feltehetően a CRM1 dependens útvonalon, a nukleáris membrán pórusokon keresztül történik. Az M1 fehérjéről ismert, hogy közvetlenül kapcsolatba kerül a vRNP-vel a fehérje C-terminális végénél, míg az N-terminálisán egy NLS található, amely potenciálisan részt vesz a

vRNP-k sejtmagi importjában. Kimutatták, hogy az M1 N-terminális része képes kötődni a NEP-hez, ezzel elfedve az NLS-t, továbbá, hogy a NEP kötődik a CRM1-hez. Utóbbi kötés GTP hidrolízisével jár, amely általában CRM1-függő export-import útvonalon történő export folyamatokra jellemző. Ezért azt feltételezik, hogy mivel az M1 kötődik a negatív szálú vRNP-khez és a NEP-hez az NEP pedig kötődik a CRM1-hez, ennek a kaszkád komplexnek segítségével exportálódnak a vRNP-k a magból (Akarsu, 2003; Baudin et al., 2001; Shapiro et al., 1987).

2.4.5 ÖSSZESZERELÉS ÉS KITÖRÉS A GAZDASEJT CITOPLAZMÁJÁBÓL

Miután a vRNP-k elhagyták a magot, a fertőzési ciklus utolsó lépése a virionok kialakítása és a sejtől való kilépés. Az influenza a gazdasejt plazmamembránját használja fel a vírusrészecskék kialakításához, amelyek elhagyják a sejtet, és áttérjednek a szomszédos sejtekre. A vRNP-k jelenléte nem feltétele a vírus vagy vírusszerű részecskék kialakulásának, de a HA, NA és M2 fehérjéknek jelen kell lenniük lipid kettős membránban ezek keletkezéséhez. Az HA, NA és M2 fehérjék a sejt apikális membránjában halmozódnak fel, a vírusrészecskék innen törnek ki a polarizált sejtekből (Nayak et al., 2009).

Mutációs elemzések során kimutatták, hogy az M2 farokrésze rendkívül fontos a vírusrészecskék kialakításában. Azok a vírusok, amelyeknél az M2 farokrészét törölték vagy részben mutálták, elnyújtott virionokat termeltek (Iwatsuki-Horimoto et al., 2006). Az M1, amely a lipid kettős membrán alatt található, fontos a vírusrészecske zárásának és leválásának végső lépéseiben (Hagen et al., 1994; Iwatsuki-Horimoto et al., 2006), mely folyamatban több gazda faktor is szerepet játszik (Chen and Lamb, 2008; Iwatsuki-Horimoto et al., 2006). Az egyik utolsó lépés, mielőtt az újonnan létrehozott virion lefűződik a plazmamembráról, a szialsav maradék leválása a glikoproteinekből és glikolipidekből, melyet az NA fehérje végez. Ennek a lépésnek a hiányában a vírusrészecske nem képes lefűződni a plazmamembránból.

Jelenleg két modellel magyarázzák a vírusgenom szegmenseinek csomagolását a virionba: a véletlenszerű csomagolási modell (Bancroft and Parslow, 2002; Enami et al., 1991) és a specifikus csomagolási modell (Smith and Hay, 1982). Az első azt jósolja, hogy a vírusgenom szegmensek véletlenszerűen kerülnek csomagolásra a vírusrészecskébe; míg az utóbbi azt, hogy a genom szegmensekben olyan szignálok találhatóak, amelyek meghatározzák, szabályozzák a kapszidáció folyamatát. Néhány vírus szegmens 5' és 3' nem kódoló és kódoló régiójában azonosítottak ilyen potenciális csomagolási jeleket, ami a specifikus csomagolási modellt teszi valószínűbbé (Fujii et al., 2005, 2003; Liang et al., 2005; Muramoto et al., 2006; Watanabe et al., 2003).

3.0 CÉLKITŰZÉS

Vizsgálataink célja a madárinfluenza vírus *in vitro* sejtvonalhoz adaptációjának vizsgálata víziszárnyas és emlős sejtekben. Illetve az ismeretlen funkciójú NEG8 fehérje vizsgálata.

Ennek érdekében, Első lépésben megvizsgáljuk a kacsza eredetű DuO sejtvonal fogékonyságát különböző szerotípusú, víziszárnyasokból izolált madárinfluenza törzsekre.

Ezután két kiválasztott törzssel sorozatpasszálást végzünk DuO sejteken, mely során nyomon követjük a vírusok biológiai tulajdonságaiban (titer, citopatogén hatás, növekedési görbe) bekövetkező változásokat és új generációs szekvenálással vizsgáljuk a virális kvázispecies heterogenitását.

Meghatározzuk az influenza NEG8 fehérjének a sejten belüli lokalizációját fertőzött és nem fertőzött víziszárnyas, illetve emlős sejtekben.

4.0 ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1 SEJTKULTÚRA KEZELÉSE ÉS SEJT TENYÉSZTÉS

A vizsgálatainkat DuO és Vero (ATCC azonosító: CCL-81) sejtvonalon folytattuk. A DuO egy házi kacsza eredetű sejtvonal, melyet ovárium sejtekből hoztak létre (Mészáros et al., 2019) és fogékonyak bizonyult influenza A vírus fertőzésre.

A sejteket 10% Fetal Bovine Serummal (FBS), 1% antibiotikum-antimikotikum oldattal (Sigma Aldrich, 100×) illetve 1% nátrium-piruváttal (Lonza, 100mM) kiegészített DMEM (Lonza, with 4.5 g/L Glucose, with L-Glutamine) szövettenyésztő oldatban tartottuk fenn. A sejteket heti kétszer, 100%-os konfluenciánál passzáltuk. A folyamat során a felülúszó eltávolítása után a sejteket kétszer átmostuk 1×-es töménységű tripszinnel (Lonza). A tripszines mosás után a sejteket tartalmazó szövettenyésztő flaskát visszahelyeztük a sejtek leválásáig a termosztátba, 37 °C-ra. A sejteket ezután a fent leírt protokoll alapján elkészített 5 ml DMEM-el lemostuk és az 1/10-ed részét hagytuk a 75 cm²-es sejttenyésztő flaskában a sejtkultúra fenntartása céljából. A sejtes tápfolyadékot 11 ml-re egészítettük ki friss DMEM hozzáadásával. A további kísérletekhez a passzálásból megmaradt sejteket 10×-es hígításban használtuk (~1×10⁵ sejt/ml). A fertőzésig a sejteket 37 °C-on, 5% CO₂ szint mellett tartottuk. A sejteket 90-95%-os konfluenciánál fertőztük, amely a DuO és Vero növekedési jellemzői alapján nagyjából 20 órával a szélesztés után vált lehetővé.

4.2 VÍRUS IZOLÁLÁS

A vírus minták (1. táblázat) influenza A vírus fertőzésben elhullott állatok szerveiből származtak és a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal Állatorvosi Diagnosztikai Igazgatóságától Dr. Bálint Ádám bocsátotta őket a rendelkezésünkre.

A vírusok izolálását DuO sejtvonalon végeztük. A kapott mintákat első lépésben 1×-es PBS-sel felhígítottuk (Capricorn Scientific), majd 0,2 µM átmérőjű szűrőn átszűrtük. A 96 vájatú sejttenyésztő lemezre szélesztett sejteken lecseréltük a fenntartó tápfolyadékot, 0,9% FBS-t és 2 µg/ml TPCK tripszint tartalmazó fertőzési médiumra, amibe 10-10 µl-t mértünk a szűrletekből. Egy óra, 37 °C-on történő inkubálás után a fertőzési médiumot lecseréltük és a fertőzés után (p.i.) 24 órával a sejteket 3%-os formaldehiddel fixáltuk, majd a fertőzött sejteket immunfluoreszcens (IF) festéssel detektáltuk.

Azoknál a mintáknál, melyekből fertőzött sejteket tudunk kimutatni, a fenti módszerrel megismételtük a fertőzést, szintén DuO sejteken és 3 nappal később begyűjtöttük a felülúszókat, melyből meghatároztuk a vírusok fertőző titerét fluorszcens fókusz egységben (fluorescent focus unit - FFU/ml) megadva.

4.3 SOROZAT PASSZÁLÁS

A vírus stock készítéséhez 25 cm²-es sejtenyésző flaskában lévő, legalább 90%-ban összenőtt DuO és Vero sejteket használtunk. A flaskákban lévő 5 ml fenntartó médiumot leszívtuk a sejtekről, majd kétszer átmostuk 1x PBS-el és fertőzési médiumra cseréltük. A fertőzéshez 100µl vírust tartalmú oldatot mértünk a flaskába, majd visszahelyeztük a termosztátba. A fertőzési folyamatot fénymikroszkóp alatt ellenőriztük naponta. A vírus tartalmú felülúszót a fertőzés követő 3. napon begyűjtöttük. A stockok fertőző titerét IF festéssel állapítottuk meg.

A H5N9 szerotípus esetében az 1., 5., 10. és 15. passzázsokkal DuO sejteket fertőztünk ~0.01 multiplicitással (MOI), a fenti fertőzési protokollt követve. A felülúszókat 1 óra múlva lecseréltük, majd a fertőzést követő (post infection: p.i.) 72 óráig 8 óránként leszívtuk a felülúszókat és fixáltuk a sejteket. A felülúszókat visszatitálva nyomon követtük a fertőző titer változását, a fixált sejtekkel IF festést végezve pedig jellemeztük a fertőzött és apoptotikus sejtek arányának változása. A H3N8 szerotípussal ugyanezeket a vizsgálatokat végeztük el az 1. és az 5. passzázsokkal. Ezen felül mind a két szerotípussal a Vero sejtvonalon is elvégeztünk egy passzázási lépést, amit a kvázispecies heterogenitásának vizsgálatokor használtunk fel.

A fertőzésekről készült fotókat felhasználva az ImageJ program segítségével állapítottuk meg a fertőzött és apoptotikus sejtek számát, valamint az összsejt számot. (Arena et al., 2017; Helmy and Abdel Azim, 2012)

4.4 IMMUNFLUORESZCENS FESTÉS

A sejteket 3%-os formaldehid oldattal 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd 100µl IF (5 g/l BSA és 1x PBS-ben) pufferrel kétszer átmostuk. 50 µl 1%-os Triton-X hozzáadásával permeabilizáltuk a sejtmembránt, majd 15 perces inkubációt követően újból kétszer átmostuk a sejteket. Az aspecifikus kötőhelyek lefedése érdekében 30 percig 5%-os lószérumban inkubáltuk a sejteket, majd újabb mosások után 500×-osra hígított anti-influenza ellenanyagot mértünk rájuk (Anti-influenza A virus Nucleoprotein Antibody C43, Abcam). Egy óra múlva a sejteket kétszer átmostuk és 1000×-esre hígított másodlagos ellenanyagot (CF488A anti-mouse IgG, 2 mg/ml, Biotium) és 1µg/ml-es koncentrációjú Hoechst-reagenst (Hoechst 33342, Thermo Fischer Scientific) tartalmazó oldatot mértünk rájuk, majd egy óráig sötétben inkubáltuk a lemezeket. Újabb kétszeri mosás után az eredményeket egy Zeiss UV-mikroszkóppal értékeltük ki.

4.5 NUKLEINSAV TISZTÍTÁS

Egy Eppendorf-csőbe 100 µl vírus stockból származó mintához hozzámértünk 20 µl Fast Digest puffer-t (Thermo Fischer Scientific), 40 µl MgCl₂-t (20 mM végkoncentráció) (Thermo Fischer Scientific), 25 U DNáz I oldatot (Thermo Fischer Scientific). Az Eppendorf cső tartalmát kiegészítettük 200 µl-re ultratiszta desztillált vízzel. A kész mintát 1 órán keresztül inkubáltuk 37 °C-on. 1 óra elteltével a DNáz aktivitást leállítottuk 10 µl 0,5 M-os EDTA-val (Thermo Fischer Scientific). Az elkészült DNáz-al kezelt, 200 µl végtérfogatú mintát Qiagen QIAamp® Viral RNA kittel tisztítottuk a gyártó utasításait követve.

4.6 SZEKVENÁLÁS

A teljes genom szekvenáláshoz a szegmentek amplifikálását a Thermo Fischer Scientific SuperScript IV One-Step RT-PCR System segítségével végeztük a gyártó utasításait követve. Az RT-PCR reakciót Zhou és mtsai. (2009) alapján végeztük a hőprofilon változtatva. Az általunk végzett reakcióban 55 °C-on 1 óráig zajlott a reverz transzkripció, amit egy 95 °C-os, 15 perc-es denaturáció követett. Ezután egy 5 ismétléses ciklusban 95 °C következett 30 másodpercig, 45 °C 30 másodpercig, majd 72 °C 4 percig. Ezt egy 31 alkalommal ismétlődő ciklus követte, amiben 95 °C következett 30 másodpercig, 57 °C 30 másodpercig, végül 72 °C 4 percig. A reakciót egy végső elongációs lépés zárta 72 °C-on, 5 percig.

Az amplifikált DNS-t a NucleoSpin Gel and PCR clean-up KIT-tel (Macherey-Nagel) tisztítottuk ki. A szekvenálást a Novogene cég végezte Illumina platformon, 150 PE leolvasással, összesen egymillió readdal. A DuO és Vero sejtvonalon az 1. és a 3. passzázsokról rendelkezünk szekvencia adatokkal.

4.7 NEG8 ORF AMPLIFIKÁCIÓJA ÉS KLÓNOZÁSA

A NEG8 ORF és a eGFP-N1 plazmid szekvenciája alapján primereket terveztünk a NEG8 szakasz amplifikációjához és plazmidba klónozásához. Mind a forward (NEG8 SacI F: 5'-ACAGAGCTCATGAGGACCCCAATTGC-3') mind a reverse primer (NEG8 BamHI R: 5'-AAAGGATCCATCCTAACTGACATGACTCTTG-3') tartalmazott a plazmidba illesztést lehetővé tevő endonukleáz hasító helyeket.

A szakasz amplifikálásához a templát RNS-t az előzőleg leírtaknak megfelelően tisztítottuk, majd a PCR reakciót a OneStep RT-PCR KIT-tel végeztük (Qiagen) a gyártó utasításait követve. A reverz transzkripció 55 °C-on történt, egy óráig, amit egy 15 perc hosszúságú 95 °C-os inaktiválás követet. Ezután egy 35 ismétléses ciklusban 95 °C következett 30 másodpercig, majd 60 °C 30 másodpercig, végül egy 72 °C-os, 30 másodperc hosszúságú

elongációs lépés. A keletkezett termékeket 1%-os agaróz gélen választottuk el és NucleoSpin Gel and PCR clean-up KIT-tel (Macherey-Nagel) tisztítottuk ki.

Az amplifikált termékeket és a plazmidot FastDigest BamHI és SacI (Thermo Fischer Scientific) enzimekkel hasítottuk, majd egy újabb tisztítás után T4 DNA Ligase (Thermo Fischer Scientific) segítségével ligáltuk őket és kompetens sejtekbe transzformáltuk (SoloPack® Gold Competent Cells - Stratagene).

A baktériumokat kanamycin tartalmú táptalajra (25 µg/ml) szélesztettük, majd egy éjszakán át 37 °C-on inkubáltuk. Másnap a baktérium telepeket kanamycin tartalmú folyékony LB-be oltottuk át és újabb egy éjszakán át, 37 °C-on növesztettük őket. Másnap a GeneJET Plasmid Miniprep KIT (Thermo Fischer Scientific) segítségével tisztítottuk ki a plazmidokat a gyártó utasításait követve.

4.8 TRANSZFEKCIÓ

A DuO sejteket 70-90%-os konfluenciánál transzfektáltuk, melyhez a TurboFect Transfection Reagent kittet (Thermo Scientific) használtuk, a gyártó utasításait követve. Az eredményeket 24 óra múlva értékeltük ki.

Amikor fertőztük is a sejteket, akkor a fertőzés 1 órával transzfekciót követően történt, a fentebb leírtak alapján. A fertőzött sejteket IF festéssel tettük láthatóvá a fentebb leírt protokolt követve, annyi különbséggel, hogy az elsődleges ellenanyagként influenza A vírussal fertőzött csirke savóját használtuk 200×-os hígításban, míg a másodlagos ellenanyag CF594 donkey anti-chicken (Biotium) ellenanyag volt. Az endoplazmatikus retikulumot egér anti-calreticulin ellenanyaggal (Invitrogen) és Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Cyanine5 (Thermofischer Scientific) ellenanyaggal jelöltük.

4.8 BIOINFORMATIKAI ELEMZÉSEK

A szekvencia adatokat a Geneious program segítségével elemeztük. A kapott leolvasatokat (read) az első passzázs esetében nukleotid szekvencia adatbázis referencia szekvenciát felhasználva illesztettük össze, a későbbiekben az első passzázs szekvenciáját használtuk referenciaként. A folyamat során az érzékenységet közepesre állítottuk be öt iterációval. A lefedettség megállapítását, a gének annotációját és az SNP-k (small nuclear polymorphism) helyét és arányának meghatározását a leolvasásokban szintén a Geneious program végezte. Az SNP-ket olyan variáns pozíciónak tekintettük, amely egy adott mintán belül a leolvasások több mint 20%-ánál azonos volt. A konszenzus szekvenciák illesztését a MultAlin program segítségével végeztük (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>).

5.0 EREDMÉNYEK

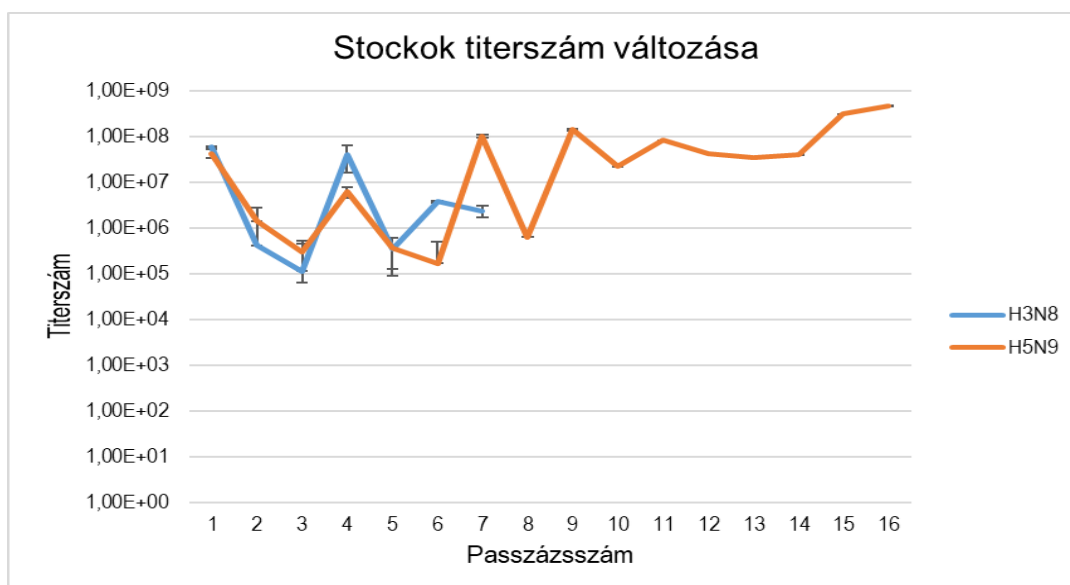
5.1 VÍRUS IZOLÁLÁS ÉS VÉGTITEREK VÁLTOZÁSA.

A kapott tíz mintából (1. táblázat), hetet sikeresen izoláltunk DuO sejtvonalon. Az izolátumok közül a H5N9-es szerotípusú, $7,3 \times 10^7$ FFU/ml végtiterű törzset választottuk ki a DuO sejtvonalon végzett sorozatpasszálási kísérlethez. Később, az összehasonlíthatóság érdekében a H3N8-as szerotípusú, $1,1 \times 10^8$ FFU/ml végtiterű törzset is bevontuk a vizsgálatokba, valamint az izolátumokkal három passzálást végeztünk Vero sejtvonalon is.

Izolálás éve	Azonosító	Gazda	Szerotípu	Patogenitás	Titer
2017	5879	hattyú	H5N5	HPAI	NA
2017	43748/168	vadmadár	H5N2	LPAI	NA
2017	43748/175	vadmadár	H6N2	LPAI	NA
NA	398-V	kacsa	H10N4	NA	5E+07
NA	06/13 12	NA	H7N1	NA	2E+07
NA		NA	H3N8	LPAI	1E+08
NA	S10	MDCK	H5N9	LPAI	7E+07
NA	277	NA	H5N2	NA	5E+06
NA		NA	H5N1	NA	3E+06
NA		NA	H1N1	NA	2E+07

1. táblázat. DuO és Vero sejtvonalon tesztelt törzsek listája. Zöld színnek jelöltük a további vizsgálatokhoz kiválasztott törzseket.

Minden passzálás végén az adott stockot visszatitráltuk és meghatároztuk a fertőző vírus partikulumok számát (FFU/ml). A kapott titerekből látszik, hogy az sorozat passzálás során a H5N9 stockok végtitere a harmadik passzázsra csökkent ($\sim 10^5$ FFU/ml), majd a 9. passzázsra 10^5 - 10^6 FFU/ml között ingadozott. Ezután fokozatosan növekedett, majd a 15. passzázs után elérte a 10^8 FFU/ml-es titert (2. ábra). A H3N8 szerotípussal jelenleg a 7. passzálásnál tartunk és hasonló változásokat tapasztaltunk, mint a H5N9 esetében. Ebben az esetben is a 3. passzázsra egy jelentősebb csökkenést (10^7 -ről 10^5 FFU/ml) tapasztaltunk, amit egy 10^5 - 10^6 FFU/ml közötti ingadozás követett (2. ábra).

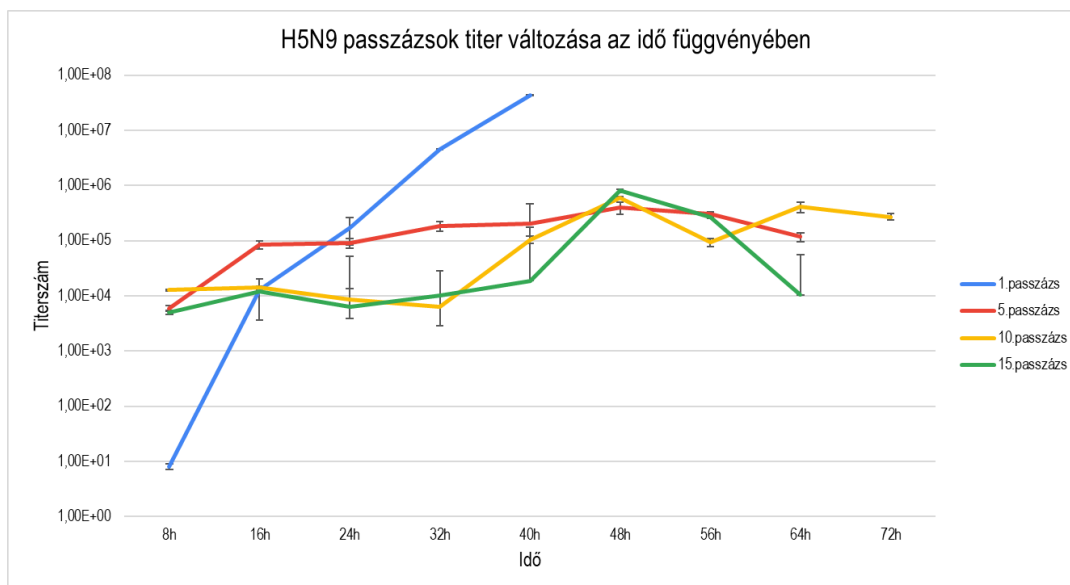


2. Ábra. DuO sejtvonalon passzált H3N8 és H5N9 stockok végtiterszám változása (FFU/ml).

5.2 STOCKOK JELLEMZÉSE

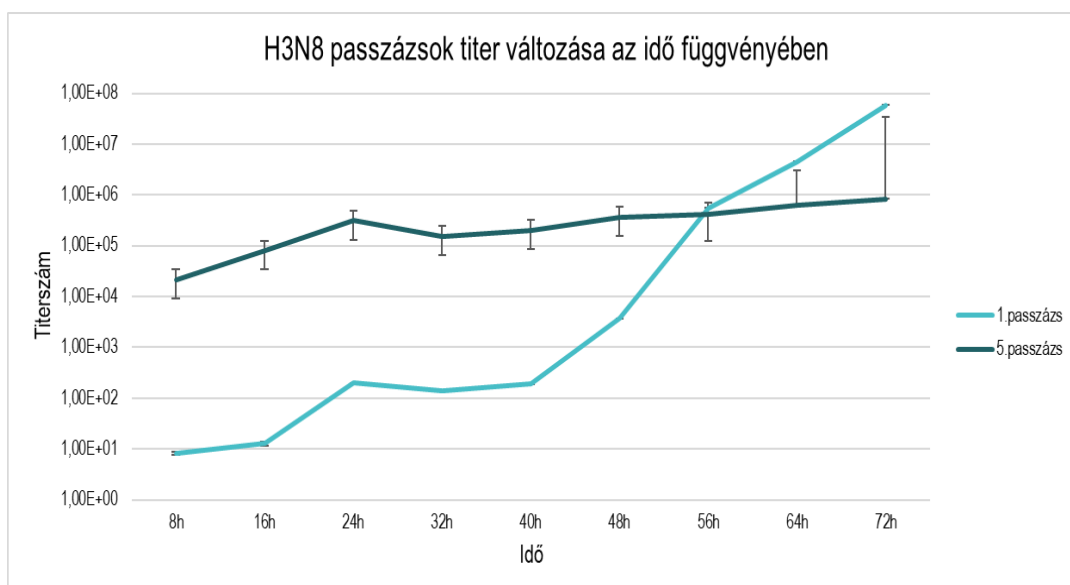
Minden 5. passzázsszámú stockot részletesen jellemeztünk a releváns biológiai tulajdonságaik (apoptotikus és fertőzött sejtek aránya, fertőző titer, növekedési görbe) alapján DuO sejtvonalon, nyomon követve a biológiai tulajdonságaikban bekövetkező változásokat.

A fertőzött sejtek felülűszojában 72 órán keresztül követtük nyomon a H5N9 szerotípus titer változását, nyolc órás időintervallumokban (3. ábra). Az 1. passzázsnál gyors növekedést figyeltünk meg a titerben, mely a fertőzés 40. órájára elérte a maximumát. Az 5. passzázsnál a növekedés kezdetben (16 óráig) gyorsabb volt, majd lelassult és nagyjából a 48. óráig tartott. Ezzel szemben a 10. és 15. passzázsnál hasonló lefutást tapasztaltunk. A kezdeti titer ingadozás (8 és 24 óra között) után tapasztaltunk gyorsabb növekedést, ami 48 órára érte el maximumát, utána a titer stagnált vagy csökkent.



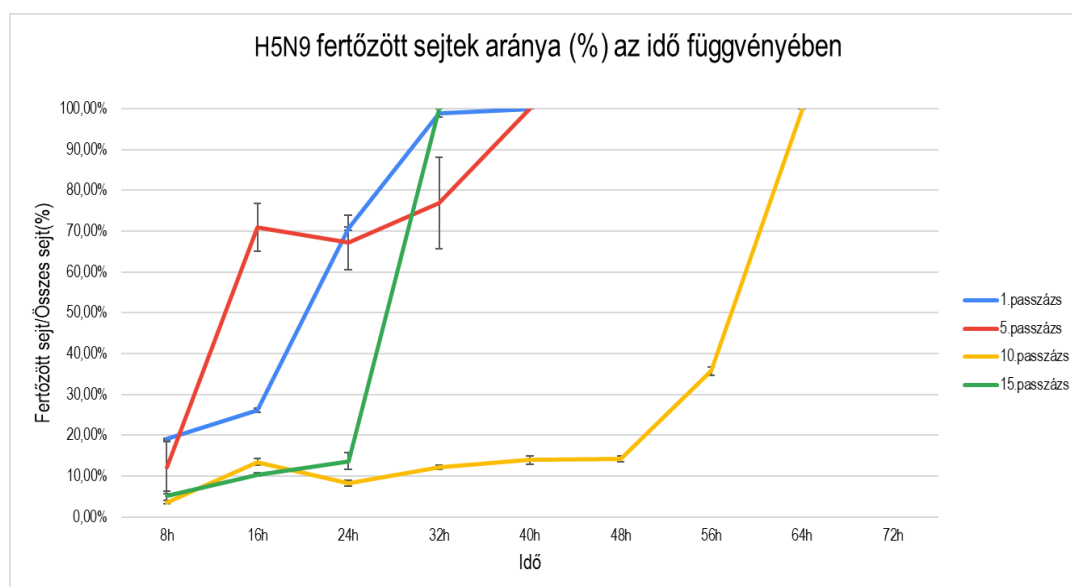
3. Ábra. Fertőző titer változása a H5N9 szerotípussal fertőzött DuO sejtek felülúszójában.

A H3N8 szerotípussal történt fertőzéskor már az 1. passzáznál is lassabb növekedést tapasztaltunk a titerben, mint a H5N9 szerotípus esetében (4. ábra). A titer a fertőzés 40. órájáig csak mérsékelten növekedett és a maximumát csak a 72. órára érte el. Az 5. passzázs esetében (hasonlóan a H5N9-es törzsnél tapasztaltakkal) ennél a szerotípussal is lassulást tapasztaltunk és a 72 órás titer is közel két nagyságrendet csökkent ($\sim 10^8$ -ról 10^6 FFU/ml).



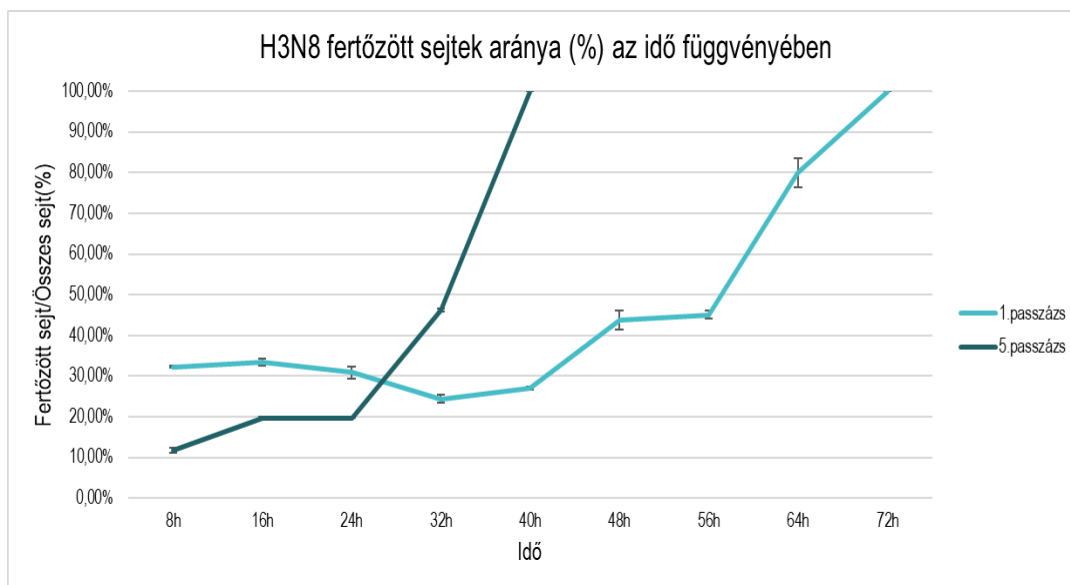
4. ábra. Fertőző titer változása a H3N8 szerotípussal fertőzött DuO sejtek felülúszójában.

A fertőző titer változásával párhuzamosan nyomon követtük az összes fertőzött és az apoptotikus sejtek számának változását 72 órán keresztül. A H5N9 szerotípusnál a titer változásokkal összhangban azt tapasztaltuk, hogy a fertőzött sejtek száma a korai passzázsoknál (1. és 5.) viszonylag gyorsan növekedett és már a 40 órában az összes sejt fertőzött volt (5. ábra). Közben a sejtek pusztulásával összhangban az összsejtszám fokozatosan csökkent. A fertőzés 40. órájában már az összes megmaradt sejt fertőzött volt, miközben az összsejtszám nagyjából a negyedére csökkent. Ahogyan a későbbi passzázsoknál a végtiter is csökkent, ezzel párhuzamosan a fertőzött sejtek arányának a növekedése is előbb lassult. A 10. passzáznál csak a fertőzés után 48 és 72 óra között észleltünk gyors növekedést (5. ábra). A 15. passzáznál viszont (a végtiter visszanövekedésével párhuzamosan) a fertőzés után 40. órára újra az összes sejt már fertőzött volt.



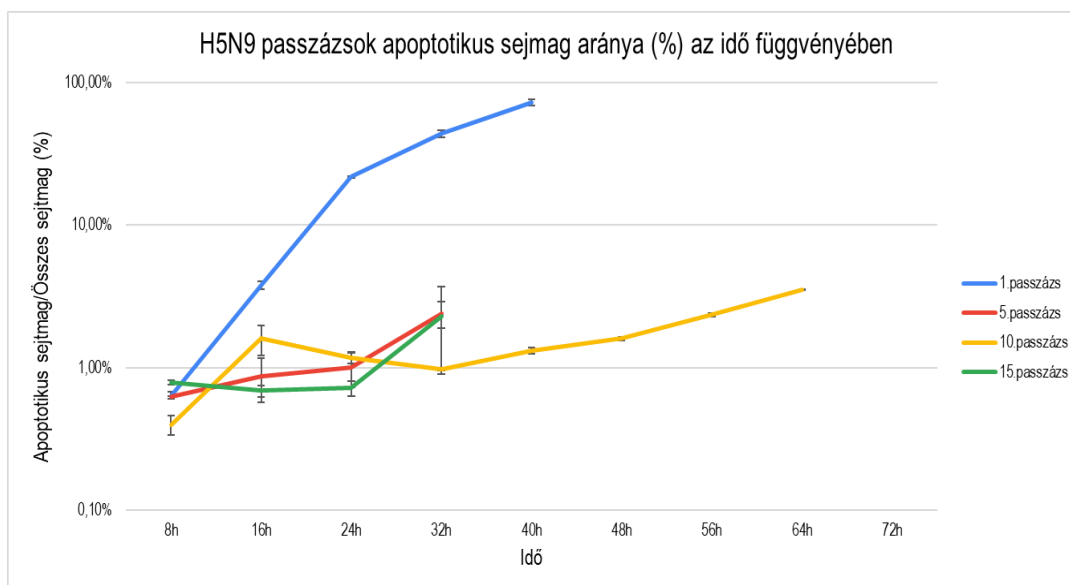
5. ábra. A fertőzött sejtek arányának változása a H5N9 szerotípussal fertőzött DuO sejtek között.

A H3N8-as szerotípusnál is lassulást tapasztaltunk a fertőzött sejtek arányának növekedésében (6. ábra). Az első passzáznál ebben az esetben is egy gyors növekedést detektáltunk, ami már a 40 óránál elérte a maximumát. Ekkora az összes megmaradt sejt fertőzött volt, míg az 5. passzáznál a csak a 40. óráig 30% körül stagnál a fertőzött sejtek száma (az összsejtszám ebben az esetben is fokozatosan csökken), majd a 40. óra után kezdődik egy gyorsabb növekedés és csak a fertőzés utáni 72. órában láttuk azt, hogy a megmaradt sejtek 100% fertőzött volt (6. ábra).



6. ábra. A fertőzött sejtek arányának változása a H3N8 szerotípussal fertőzött DuO sejtek között.

A fertőzött sejtek számának változása mellett nyomon követtük az apoptotikus sejtek számának a változását is. A H5N9 szerotípusú vírus esetében a fertőzési kísérleteknél jelentős változásokat tapasztaltunk a vírus citopatogén hatásának tekintetében (7. ábra).



7. Ábra. Az apoptózist mutató DuO sejtek arányának változása a H5N9 fertőzés során.

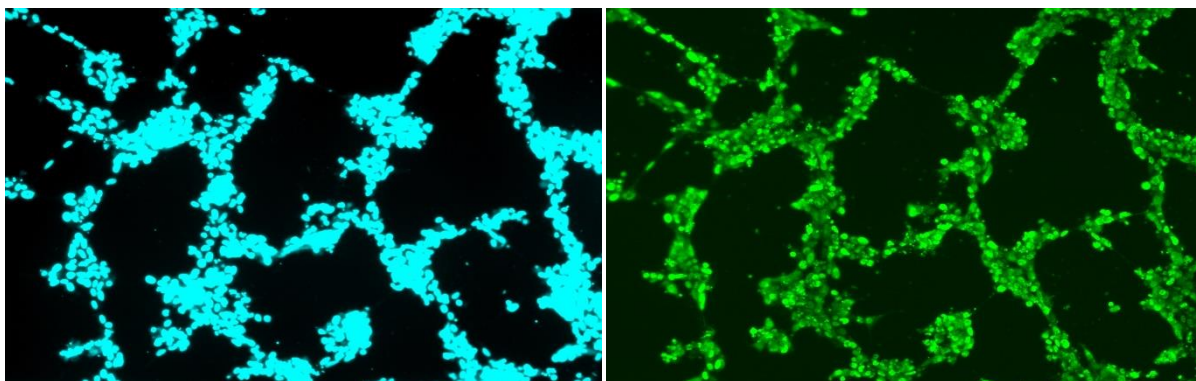
Az első passzázsánál a fertőzött sejtek jelentős része apoptózisban pusztult el (feldarabolódott, kisméretű, erősen festődő sejtmagok), aminek az időbeli lefutása hasonló volt a fertőzött sejtek számának növekedéséhez (6. ábra). Ebben az esetben is a fertőzés 40. órájában érte el a görbe a csúcsát (73%), amikor a még élő sejtek 100% fertőzött volt már. Későbbi passzázsoknál radikálisan csökkent az apoptotikus magok száma (10% alatt maradt a fertőzés

teljes idején) és érdekes módon a végtiter növekedésével és a fertőzött sejtek arányának gyorsabb növekedésével szemben, a 15. passzázsánál sem tapasztaltuk, hogy visszaállt volna a kezdeti erősebb citopatogén hatás (7. ábra). A sejtek 100%-os fertőzésnél is mindössze a sejtek 2,3%-a mutatta apoptózis jeleit.

A H5N9 1. passzázsához hasonlóan erős apoptotikus hatást a H3N8 törzsnél nem tapasztaltunk (8. ábra), pedig ennek a törzsnek a 72 órás titere magasabb volt, mint a H5N9 esetében (4. ábra). Az első és az ötödik passzázs között lényegében nem változott az apoptotikus sejtek aránya, annak ellenére, hogy az 5. passzázsánál már a fertőzés 48. órájában nem maradtak élő sejtek (ezért ér véget a görbe a 40. óránál) és a 40. órában már az összes megmaradt sejt fertőzött volt (9. ábra).



8. Ábra. Az apoptózist mutató DuO sejtek arányának változása a H3N8 fertőzés során.



9. ábra. H3N8 szerotípusú influenza A vírussal fertőzött DuO sejtek a fertőzés 40. órájában. Kékkel a Hoechst-reagenssel festett sejtmagok láthatóak, zölddel a fertőzött sejtek egér anti-influenza elsődleges és CF488A anti-egér IgG ellenanyaggal jelölve.

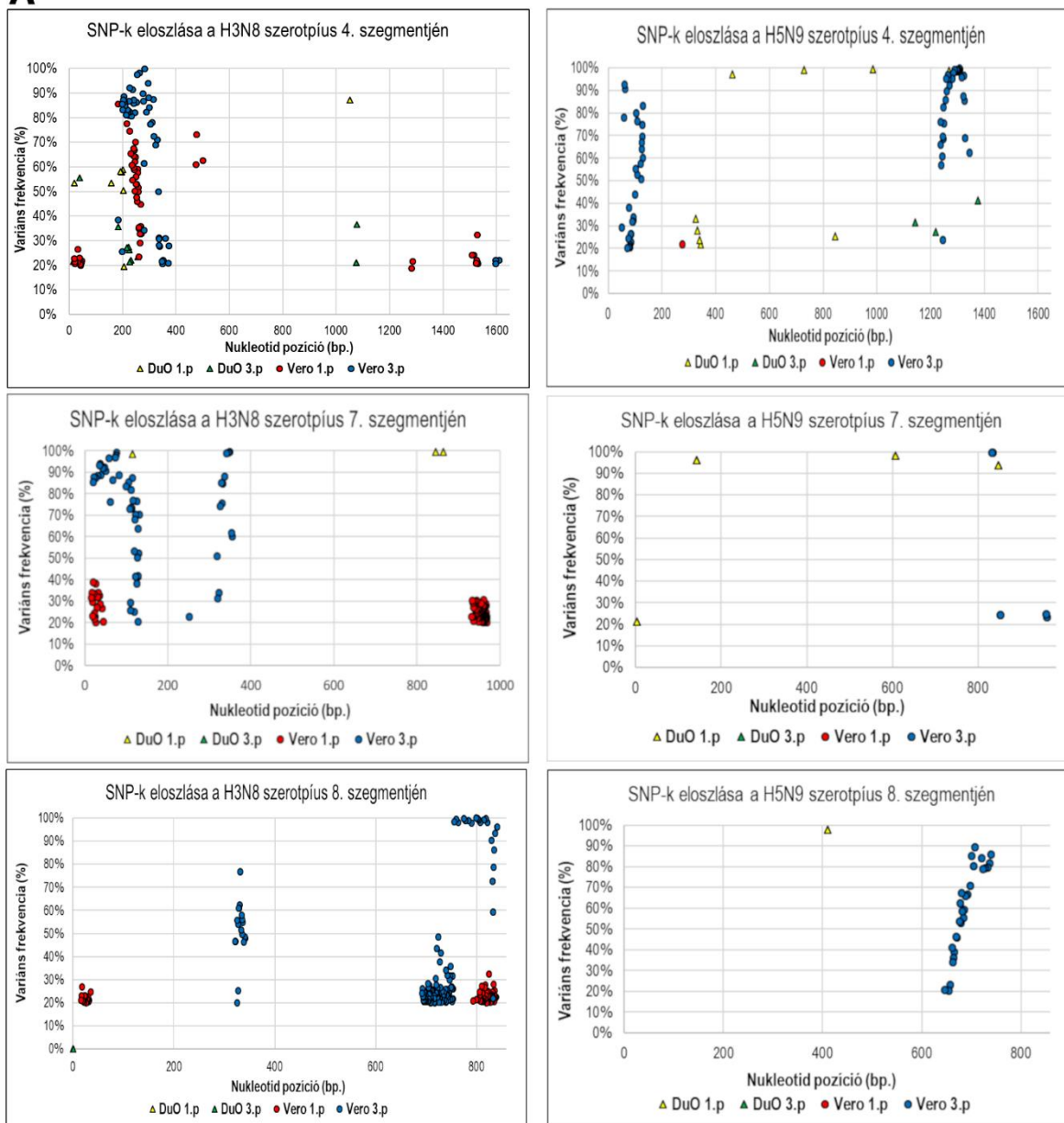
5.3 A QUASI SPECIES BELSŐ HETEROGENITÁSÁNAK VIZSGÁLATA

A passzálások során kapott szekvencia adatokat Geneious bioinformatikai programmal elemeztük. A szekvenciákat legalább 100-as lefedettségénél fogadtuk el, míg az SNP-ket olyan variáns pozíciónak tekintettük, amely egy adott mintán belül a leolvasások több mint 20%-ánál azonos volt, mely valamivel szigorúbb volt, mint a szakirodalomban alkalmazott 15% (hivatkozás).

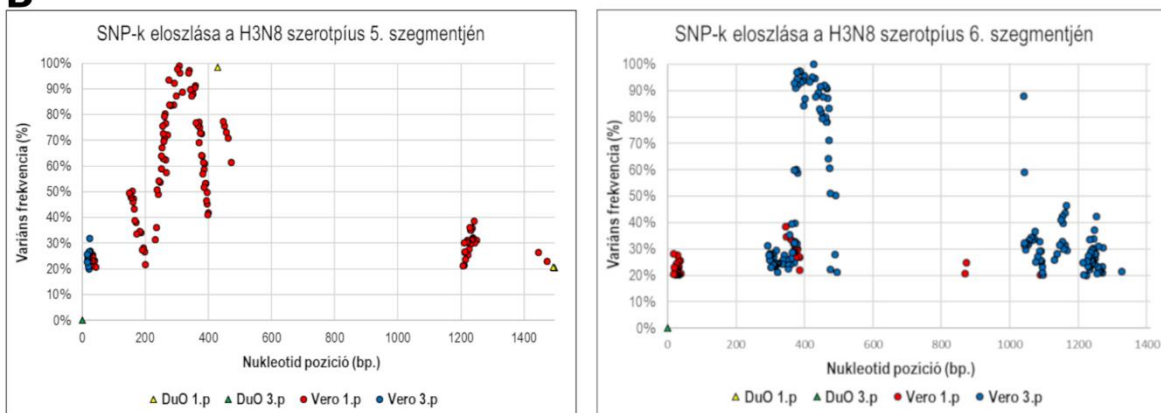
Általánosan az volt a megfigyelésünk, hogy a master szekvenciában a DuO sejtvonalon végzett passzálások során nem tapasztaltunk változást, annak ellenére, hogy több olyan SNP-t azonosítottunk, amely a kisebbségben lévő variánsokban eltért a master szekvenciától és ezek némelyike aminosav cserét is eredményezett. Ugyanakkor azt is megfigyeltük, hogy egyrészt csökkent a heterogén pozíciók száma a passzálások során, másrészt a meglévő heterogén régiókban csökkent a változatok gyakorisága (variant frequency), ami a minták homogenizálódására utal (10. A és B ábra, háromszög jelölések).

Szintén általános jelenség volt, hogy a Vero sejteken passzált törzsek nagyobb heterogenitást mutattak, mint ugyanazok a passzázszzámok a DuO sejteken (10. A és B ábra, kör jelölések).

A

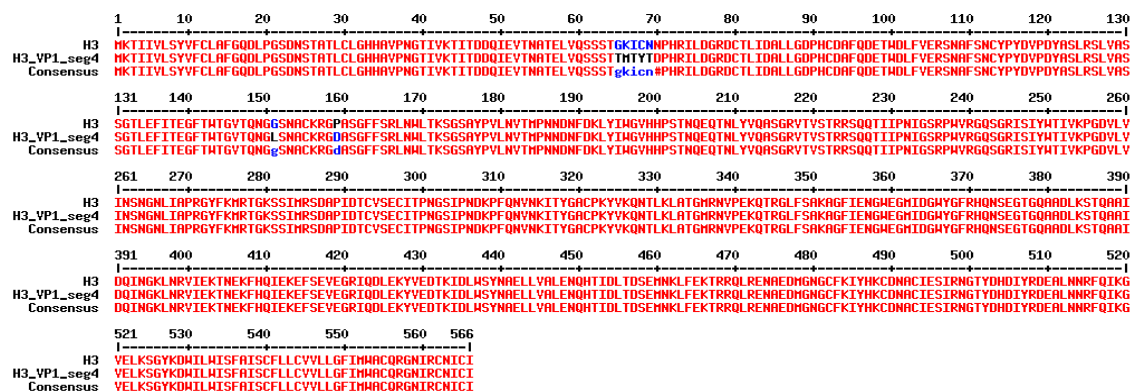


B



10. ábra. Az SNP-k eloszlása DuO és Vero sejteken passzált H3N8, H5N9 vírusok genomjában.

Szintén érdekes jelenség, hogy míg a DuO sejtvonalon történő izolálást követő passzálások a DuO sejtvonalon nem eredményeztek változást a master szekvenciában, addig, ha Vero sejteken végeztünk egy passzálást, akkor a H3N8 szerotípus esetében az 4. és az 5. szegmenben is aminosav cserét eredményező változások tudunk kimutatni a DuO és Vero sejtekről származó szekvenciák között (11. ábra)



11. ábra. Részlet a H3N8-as szerotípusú influenza A vírus hemagglutinin fehérjéjének aminosav szekvenciájából az első DuO passzálás (felső sor) és az első Vero passzálás (alsó sor) után.

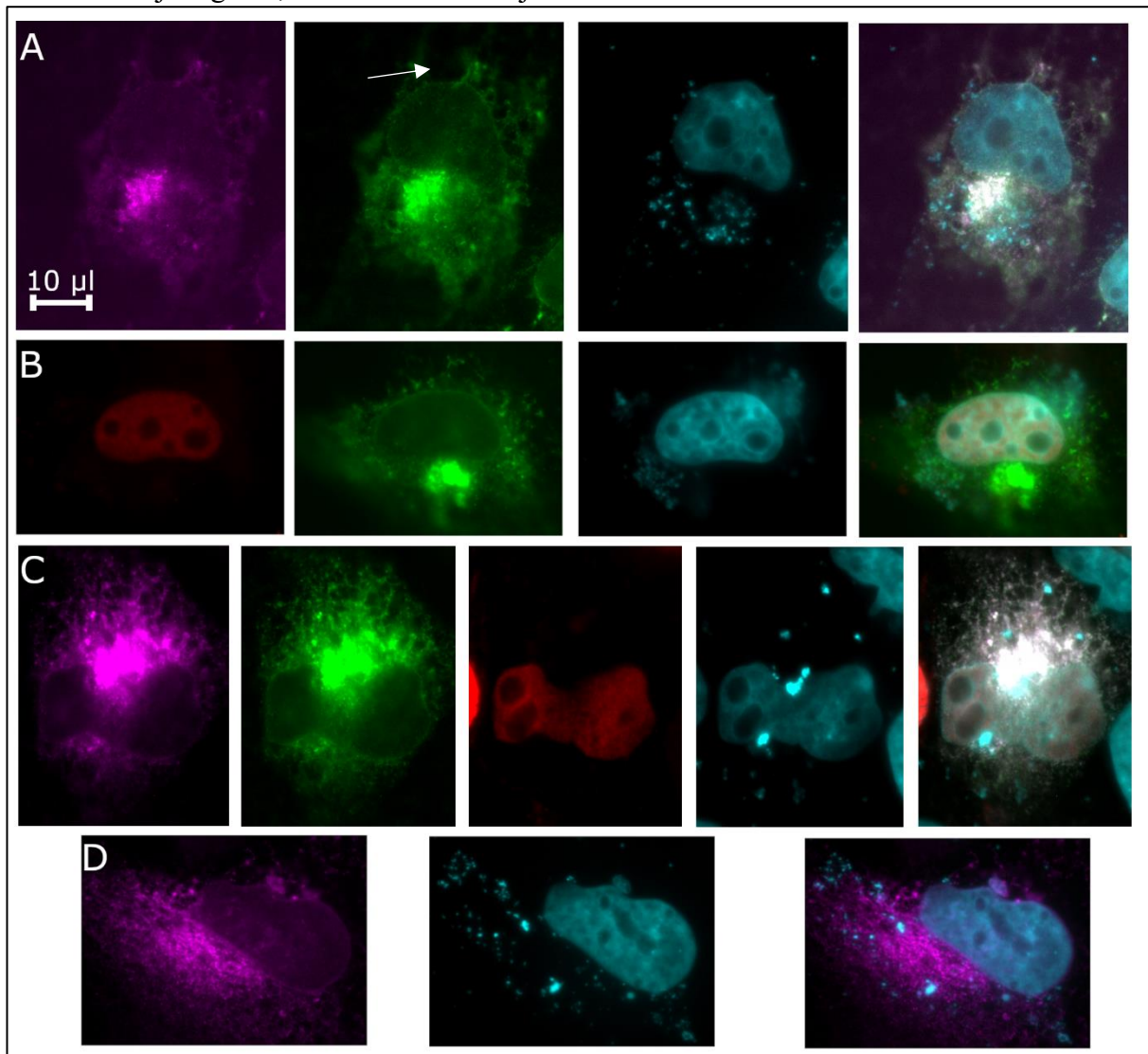
Ráadásul az aminosav cserék olyan pozíciókban történtek, amik a DuO sejteken passzált mintákban is heterogénnek bizonyultak (2. táblázat)

Lokalizáció	Aminosav csere	Változás	Lefedettség	Polimorfizmus típusa	Variánsok aránya
H3 4.szegment					
205-208	N -> T	AAC -> ACA	206 -> 335	Substitution	19.4% -> 26.9%
203-204	C -> Y	GC -> AT	387 -> 442	Substitution	50.4% -> 55.9%
200	I -> T	T -> C	461	SNP (transition)	58.8%
197-198	K -> M	AA -> TG	477 -> 485	Substitution	57.9% -> 58.8%
192-195	TG -> TT	AGGG -> GACC	498 -> 541	Substitution	58.0% -> 58.6%
158-160	TN -> N	=-CTA	894 -> 915	Deletion	53.4% -> 54.7%
H3 5.szegment					
342-344	E->H	GAG -> TTC	4871 -> 5033	Substitution	89.7% -> 89.9%
338-339	GE->AH	GG -> CT	5276 -> 5359	Substitution	97.3% -> 97.4%
336	E->Y	A -> G	5459	SNP (transition)	96.3%
318-332	LRRRRR->RYAHTL	TAGAAGGAGAGACGG	5605 -> 5922	Substitution	88.7% -> 89.8%
310-316	PIL->LPR	CCAATCT -> TTGCCGC	5774 -> 5859	Substitution	96.3% -> 96.4%
307-308	T->V	GG -> AA	5712 -> 5760	Substitution	98.9%
305	D->G	C->T	5408 -> 5597	Substitution	97.7% -> 97.8%
291	P->K	C -> T	4857	SNP (transition)	92.3%
289	P->K	-G	4547	Deletion	83.8%
289	P->K	-G	4547	Deletion	83.8%
266-268	ET->GA	AAG -> GGC	1375 -> 1550	Substitution	57.5% -> 61.2%

2. táblázat. Nukleotid pozíciók heterogenitása a DuO sejteken passzált influenza A vírus 4. és 5. szegmentjében. A táblázatban csak azokat a nukleotidokat jelöltük, amelyeknél aminosav szintű eltérést tapasztaltunk a Vero sejteken passzált vírusok szekvenciáiban.

5.4 A NEG 8 FEHÉRJE VIZSGÁLATA

A transzfektált sejtekben a NEG8 fehérje egyértelműen kolokalizálódott az ER-ral (12./A ábra), valamint csomókat, rögöket hozott létre benne (12./A, B és C ábra), ami A fertőzés hatására a fehérje lokalizációja nem változott meg (12./B ábra), ugyanakkor megfigyeltük, hogy a transzfektált sejtek (az influenza fertőzés nélkül is) gyakran citopátiás elváltozásokat mutattak (12./A ábra). Gyakran láttunk széthullott, apoptotikus sejteket, deformált sejtmagokat, vakuolumokat a sejtekben.



12. ábra. A NEG8 fehérje lokalizációja DuO sejtekben. (A) A NEG8 és a kalretikulin fehérje kolokalizációja. Lilával látható az ER-ban felhalmozódó, Cy5 jelölt ellenanyaggal kalretikulin fehérje, zölddel az eGFP fuzionáltatott NEG8, késsel a Hoechst-reagenssel festett sejtmagok. A nyíl a sejtben kialakult vakuolumot mutatja. (B) A NEG8 fehérje lokalizációja fertőzött sejtekben. Piros színnel látható a CF594 másodlagos ellenanyaggal festett, H5N9 madárinfluenza A vírussal fertőzött sejtek magja. (C) A NEG8 és a kalretikulin kolokalizációja fertőzött sejtekben. (D) Nem transzfektált és nem fertőzött sejtek ER-ja anti-kalretikulin ellenanyaggal jelölve.

6.0 MEGBESZÉLÉS

A sorozatpasszálások során, a korai passzázsszámoknál jelentős (nagyjából két nagyságrend) végtiter csökkenést tapasztaltunk (2. ábra), ami feltehetően annak a következménye, hogy az élő állatból (víziszárnyasból) származó vírus izolátumok egy új, *in vitro* környezetbe kerültek. Az új környezethez való adaptáció folyamatának elején nem szokatlan a vírus fertőző titerének változása (hivatkozás), mert az addig más szöveten és környezetben szelektált változatok fitnessze eltérő lehet az új körülmények között. Úgy gondoljuk, hogy a végtiter kezdeti csökkenése utáni ingadozás (5. és 10. passzázs számok között) része a quasi speciesben történő mutánsok szelekciós változásának. A 15. passzáig tartó fokozatos növekedés pedig a legjobban adaptálódott változat kisselektálódásának a következménye.

Ezen szelekció tetten érhető a fertőzött sejtek arányának növekedésében is (5. és 6. ábra), ami az 1. passzázsoknál a fertőzés nagyon gyors terjedését mutatta, aminek következtében, mind a H3N8, mind a H5N9 szerotípus esetében a fertőzés utáni 40. órára az összes sejt fertőzött volt. Ez a gyors terjedés az 5. és 10. passzázsoknál lassulást mutatott, ami azonban a H5N9-es szerotípus esetében 15. passzázsra visszaállt a kezdeti terjedési sebességre. Mivel a 48. órára már nem maradt túlélő sejtek ez nem csak a terjedés sebességére utal, hanem valamilyen citopatogén hatásra, valószínűleg sejtlízisre is. A fertőzött sejtek gyorsabb lízise ugyanis megmagyarázná a gyorsabb terjedést és a titer gyorsabb növekedését is (3. és 4. ábra), ugyanakkor a végtiterekben mért eltérésekre nem feltétlen ad magyarázatot. Más vírusoknál már igazolták, hogy a fertőzött sejtek lassabb lízise lassabb terjedéshez és a titer lassabb növekedéséhez vezet, miközben a végtiter változatlan maradt.(Mészáros et al., 2017; Zádori et al., 2005)

Mivel a sorozatpasszálas során, a H5N9-es szerotípusú törzs esetében jelentősen, több mint egy nagyságrenddel csökkent az apoptotikus sejtmagok aránya (7. ábra) és ez a csökkenés a terjedés gyorsulásával és a végtiter növekedésével is fennmaradt, ezért jelenleg úgy gondoljuk, hogy az apoptotikus sejtek kezdeti magas aránya (73% az első passzázsánál, DuO sejteken) a sejtek vírusfertőzésre adott védekezési mechanizmusával magyarázható. A virális kvázispecies adaptálódása során kisselektálódtak azok a változatok, amelyek képesek voltak ezt a védekezési mechanizmust kikerülni és ez vezethetett a végtiter növekedéséhez és az apoptotikus sejtek arányának csökkenéséhez a késői passzázsoknál. (hivatkozás arról, hogy az apoptózis csökkentheti a títert).

Az új generációs szekvenálással kapott szekvencia adatok elemzése is a vírusok adaptálódására enged következtetni. A DuO sejtvonalon végzett passzálások azt mutatták, az 1. és a 3. passzázsok között csökkent a virális quasispeciesen belüli heterogenitás, csökkent a heterogén helyek száma és a variánsok frekvenciája is (10. A és B ábra). Érdekes módon ez úgy következett be, hogy a master szekvenciában közben nem tapasztaltunk változást.

A Vero sejteken történt passzálások után lényegesen nagyobb heterogenitást tapasztaltunk, mint a DuO sejteknél (10. A és B ábra), ami véleményünk szerint annak a következménye, hogy a víziszármazból származó mintákat DuO (madár) sejteken izoláltuk, majd átkerültek egy emlős eredetű sejtvonalra. Szintén érdekes eredmény, hogy amikor összehasonlítottuk a DuO és Vero sejteken passzált vírusok szekvenciáit, akkor aminosav szintű különbségeket tudtunk kimutatni hemagglutinin és NS fehérjék szekvenciáiban (11. ábra). Mikor megvizsgáltuk az SNP-k jelenlétét ezeknél a pozícióknál, azt tapasztaltuk, hogy a DuO sejteken passzált vírus mutáns spektrumában is jelen vannak azok a változatok, amik a Vero sejtekben a master szekvenciát adják (tehát többségben vannak), illetve a Vero sejtek mutáns spektrumában pedig azok a változatok vannak jelen, melyek a DuO sejten passzált vírusnál a master szekvencia által reprezentál többséget képviselik (2. táblázat). Ez arra enged minket következtetni, hogy a két sejtvonalon történt passzálás után tapasztalt szekvencia beli különbségek nem új mutációk eredményei, hanem már az élő állatból izolált vírustörzs quasi speciesében is jelenlévő változatok adott sejtvonalon érvényesülő szelekciós előnyének a következményei. Ez felveti annak a lehetőségét, hogy a különbséget mutató régiók (különösen a hemagglutinin fehérje 65-69-es aminosavjai) szerepet játszhatnak az emlős-madár gazdához történő adaptálódásban.

A szekvenálási eredményeinket összevetve *in vitro*, MDCK sejtekhez adaptált és *in vivo*, egérben passzált influenza A vírus törzsek teljes genom szekvenálási eredményeivel elmondható, hogy jellemzően kevés a master szekvenciában megjelenő mutációk száma (Barnard et al., 2021; Brown et al., 2001). Ugyanakkor, a belső heterogenitás növekvő frekvenciája ezeknél a kutatásoknál is megfigyelhető volt a 4. szegment 200.-400. és a 1200.-1400. nukleotid közötti régiójában (Barnard et al., 2021). Az *in vivo* adaptálási kísérlet során az 5;6;7;8 szegmentekben az általunk is heterogénnek azonosított régiókban figyelték meg SNP frekvenciájának növekedését (Brown et al., 2001).

A HA 65-69-es aminosav régióján kívül, több olyan pozícióban azonosítottunk heterogenitást a quasi speciesen belül, amelyekről a szakirodalomból ismert, hogy milyen biológiai hatásuk van a vírus életciklusára (3. táblázat).

Szerotípus	Sejtvonal	Szegment	Pozíció (bp.)	Csere	Variáns frekvencia	Ismert funkció, amit befolyásol
H3N8	Vero	4	246-249	TTCT -> AGGG	82,0%	α 2,6 szilánsav kötés
			330	T -> C	71,0%	levegőben történő terjedés
			474	G -> T	60,9%	α 2,6 szilánsav kötés, terjedés
			477	G -> A	73,0%	α 2,6 szilánsav kötés, letalitás
		5	271-274	CATC -> TGAA	72,1%	polimeráz aktivitás emlős sejtekben
			296-297	+AATC	87,2%	levegőben történő terjedés
			310-316	CAATCT -> TGCCGC	96,3%	csirkékben mutatott virulencia
			325-327	GAG -> CAC	88,7%	polimeráz aktivitás, vírus replikáció és virulencia csirkékben
		6	348	T -> A	34,5%	antivirális szerek elleni érzékenység
			349-351	TTG -> GAA	37,9%	
			355-357	TAA -> GGC	35,0%	
			406-408	CTC -> TAT	86,8%	
			449-450	GG -> CC	82,0%	
			455-456	GG -> AC	87,7%	
	DuO	8	222	T -> G	22,3%	polimeráz aktivitás emlős sejtekben
			225	G -> T	26,2%	
H5N9	Vero	8	666	G -> T	39,0%	vírus replikáció madár és emlőssejtekben
			669	G -> T	46,10%	
			671	A -> T	45,80%	
			676	A -> T	53,50%	
			677	T -> G	62,30%	
			679	G -> C	52,80%	
			680	A -> C	67,20%	
			682	T -> C	58,50%	
			685	G -> A	55,40%	
			686	A -> C	59,10%	
			688	G -> A	65,90%	

3. táblázat. Heterogénnek bizonyult régiók, melyek ismert biológiai funkciót befolyásolnak (Suttie et al., 2019) alapján.

A madárinfluenza törzsekben is megtalálható a NEG8 ORF, a prediktált fehérje azonban lényegesen rövidebb (93 aminosav), mint a humán influenza törzseknél és csak egyetlen transzmembrán domént tartalmaz. A kísérleteink megmutatták, hogy a H5N9-es szerotípusú madárinfluenza törzs NEG8 fehérjéje expressziós plazmidban kifejeztetve a DuO sejtek ER-jában halmozódik fel (12. ábra). A fertőzött sejtek transzfekciójából az is kiderült, hogy más vírusfehérjék jelenléte nem változtatja meg a fehérje lokalizációját. A NEG8 pazmiddal transzfektált sejtek ER-jában szinte minden esetben csomókat, rögöket lehetett látni (12./A, B és C ábra), melyek feltehetően az ER-járatainak kiöblösödései. Ezek az elváltozások gyakori jelei a sejtekben fellépő ER-stressznek (Mandl and Bánhegyi, 2007).

Az endoplazmás retikulum (ER) mint metabolikus kompartment funkciói meghatározók az intracelluláris homeosztázis fenntartásában, a belső és külső környezet zavaraihoz történő alkalmazkodásban. A legkülönbözőbb stresszhelyzetek (intracelluláris kalciumegyensúly változása, hypoglycaemia, hypoxia, redox homeosztázis zavara,

vírusfertőzés stb.) érinthetik az ER luminális kompartmentumban zajló fehérje érés folyamatát, aminek eredményeképpen nem megfelelően feltekert, hibás térszerkezetű fehérjék halmozódnak fel (hivatkozás). A stresszhatás az UPR (unfolded protein response) útvonalak aktiválásához vezet, ami a homeosztázis visszaállításához, apoptózishoz vagy autofágiához vezethet (Mandl and Bánhegyi, 2007).

Jelenlegi hipotézisünk szerint a NEG8 a madárinfluenza-törzsek járulékos fehérjéje, amely az endoplazmatikus retikulumában felhalmozódva ER stresszválaszt indukál a fertőzött sejtekben, ami hozzájárulhat a vírusfertőzés által kiváltott citopatogén hatásokhoz.

7.0 ÖSSZEFOGLALÁS

Az influenza A vírus Európában endémiásan előforduló, elsősorban baromfi fajok, vadon élő madarak és egzotikus, kedvtelésből tartott madárfajok gyakran tünetmentes, máskor magas lázzal, nagyfokú elesettséggel, légúti, esetenként idegrendszeri tünetekkel, vérzésekkel és hasmenéssel járó betegsége. A madárinfluenzával igazoltan fertőzött baromfitartó telepeken az állomány leölésével védekeznek, ezzel a vírus jelentős gazdasági károkat okoz minden évben. Mivel egyes szerotípusai képesek zoonótikus fertőzést kialakítani, ezért közegészségügyi jelentősége sem elhanyagolható. Magas mutációs rátája és széles gazda specifikációja miatt madár és emlősfajok széles körét képes megfertőzni és hozzájuk adaptálódni, melynek jobb megértése hozzá segíthet minket a hatékonyabb védekezéshez.

Vizsgálataink célja a madárinfluenza vírus *in vitro* adaptációjának, valamint a madárinfluenzában korábban egyáltalán nem tanulmányozott, ismeretlen funkciójú NEG8 fehérjéjének a vizsgálata volt.

Első lépésben megvizsgáltuk a kacsza eredetű DuO sejtvonal fogékonyságát hét különböző szerotípusú madárinfluenza törzssre. Kiválasztottunk két különböző szerotípusú H3N8 és H5N9) izolátumot, melyeknek részletesen jellemeztük a releváns biológiai tulajdonságait (citopatogén hatás, fertőző titer (fluorescent focus unit (FFU)/ml), növekedési görbe, kópiaszám) és sorozat passzálást végeztünk velük DuO sejtvonalon, nyomon követve a biológiai tulajdonságaikban bekövetkező változásokat.

Az adaptálódás során a H5N9 stockok végtitere a harmadik passzázsra csökkent (10^5 FFU/ml), majd a 9. passzázsra 10^5 - 10^6 FFU/ml között ingadozott. Ezután 10^7 FFU/ml-re nőtt majd a 15. passzázs után elérte a 10^8 FFU/ml-es titert. A H3N8 szerotípussal jelenleg a 7. passzálásnál tartunk és hasonló adataink vannak a végtiter változásáról. Ebben az esetben is 3. passzázsra egy jelentősebb csökkenést (10^7 -ről 10^5 FFU/ml) tapasztaltunk, amit egy 10^5 - 10^6 FFU/ml közötti ingadozás követett. A végtiterének változásával együtt a vírus növekedési görbéjének lefutásában és a fertőzés hatására megjelenő apoptotikus sejtmagok számában is lényeges változásokat tapasztaltunk (73%-ról 2,3%-ra csökkent).

Az új generációs (Illumina) szekvenálással kapott, nagy lefedettségű szekvencia adataink azt mutatták, hogy passzálások során mind a két szerotípus esetén csökkent az SNP-k (single nucleotide polymorphism) frekvenciája a vírus mintákban, ami a kvázispecies homogenizálódására utal és véleményünk szerint a kevésbé adaptálódott változatok kisselektálódásának következménye. Több esetben észleltük a kvázispecies belső

heterogenitását olyan aminosavak tripletjeiben melyekről ismert, hogy a virulenciát, patogenitást, gazda specificitást befolyásolhatják (pl. hemagglutinin fehérje 126., 138. és 159. aminosavja).

A negatív szálú nyolcas szegmensről leíró, NEG8 fehérje szerepe a vírus fertőzési ciklusában jelenleg ismeretlen és eddig csak humán vonalon szerepelt a kutatásokban. Az *in silico* elemzéseink egy transzmembrán domén jelenlétét tárták fel a fehérjében, majd transzfekciós vizsgálataink igazolták a fehérje endoplazmás retikulumban történő lokalizációját, mely a fertőzött sejtekben (más vírus fehérjék jelenlétében) sem változott. Egyes eredményeink arra utalnak, hogy a fehérje expressziója sejthalált indukál a transzfektált sejtekben, de ez még további megerősítésre szorul.

8.0 SUMMARY

Influenza A virus is an endemic disease in Europe, mainly in poultry, wild birds and exotic pet birds. Often asymptomatic but sometimes associated with high fever, severe lethargy, respiratory and sometimes neurological symptoms, hemorrhage and diarrhea. Poultry farms with confirmed cases of avian influenza are controlled by culling causing significant economic losses each year. As some serotypes are capable of zoonotic infection, its public health significance is not negligible. Due to its high mutation rate and broad host specificity, it can infect and adapt to a wide range of bird and mammalian species. Better understanding of this process may help a more effective control.

The aim of our studies was to investigate the *in vitro* adaptation of the avian influenza virus and the unknown function of the NEG8 protein, which has not been previously studied in avian influenza.

As a first step, we investigated the susceptibility of the duck-derived cell line DuO to seven different serotypes of avian influenza strains. We selected two isolates of different serotypes (H3N8 and H5N9), characterized in detail their relevant biological properties (cytopathogenicity, infectious titer (fluorescent focus unit (FFU)/ml), growth curve, copy number) and performed serial passages on the DuO cell lines, monitoring the changes in their biological properties.

During adaptation, the final titer of H5N9 stocks decreased until the third pass (10^5 FFU/ml) and then fluctuated between 10^5 - 10^6 FFU/ml until the ninth pass. It then increased to 10^7 FFU/ml and reached 10^8 FFU/ml after the 15th pass. With the H3N8 serotype, we are currently in the 7th passage and have similar data on the change in final titer. In this case, we also observed a significant decrease (from 10^7 to 10^5 FFU/ml) until pass 3, followed by a fluctuation between 10^5 and 10^6 FFU/ml. Along with the change in the titer, we also observed significant changes in the slope of the viral growth curve and the number of apoptotic nuclei that appeared as a result of infection (from 73% to 2,3%).

Our high-coverage sequence data obtained by new-generation (Illumina) sequencing showed that the frequency of SNPs (small nuclear polymorphisms) in virus samples decreased in both serotypes during passages, suggesting homogenization of quasi species and a selection of better adapted variants. In several cases we observed intrinsic quasi species heterogeneity in triplets of amino acids known to influence virulence, pathogenicity and host specificity (e.g. amino acids 126, 138 and 159 of the hemagglutinin protein).

The role of the NEG8 protein in the viral infection cycle is currently unknown and has only been investigated in human studies. Our *in silico* analyses revealed the presence of a transmembrane domain in the protein, and our transfection assays confirmed the localization of the protein in the endoplasmic reticulum, which was unchanged in infected cells (in the presence of other viral proteins). Some of our results suggest that expression of the protein induces cell death in transfected cells, but this requires further confirmation.

9.0 IRODALOMJEGYZÉK

- Akarsu, H., 2003. Crystal structure of the M1 protein-binding domain of the influenza A virus nuclear export protein (NEP/NS2). *The EMBO Journal* 22, 4646–4655. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg449>
- Arena, E.T., Rueden, C.T., Hiner, M.C., Wang, S., Yuan, M., Eliceiri, K.W., 2017. Quantitating the cell: turning images into numbers with IMAGEJ. *WIREs Developmental Biology* 6, e260. <https://doi.org/10.1002/wdev.260>
- Bancroft, C.T., Parslow, T.G., 2002. Evidence for Segment-Nonspecific Packaging of the Influenza A Virus Genome. *J Virol* 76, 7133–7139. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.14.7133-7139.2002>
- Barnard, K.N., Wasik, B.R., Alford, B.K., Hayward, J.J., Weichert, W.S., Voorhees, I.E.H., Holmes, E.C., Parrish, C.R., 2021. Sequence dynamics of three influenza A virus strains grown in different MDCK cell lines, including those expressing different sialic acid receptors. *J of Evolutionary Biology* 34, 1878–1900. <https://doi.org/10.1111/jeb.13890>
- Baudin, F., Petit, I., Weissenhorn, W., Ruigrok, R.W.H., 2001. In Vitro Dissection of the Membrane and RNP Binding Activities of Influenza Virus M1 Protein. *Virology* 281, 102–108. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0804>
- Brown, E.G., Liu, H., Kit, L.C., Baird, S., Nesrallah, M., 2001. Pattern of mutation in the genome of influenza A virus on adaptation to increased virulence in the mouse lung: Identification of functional themes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 6883–6888. <https://doi.org/10.1073/pnas.111165798>
- Chen, B.J., Lamb, R.A., 2008. Mechanisms for enveloped virus budding: Can some viruses do without an ESCRT? *Virology* 372, 221–232. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.11.008>
- Dangi, T., Jain, A., 2012. Influenza Virus: A Brief Overview. *Proc. Natl. Acad. Sci. Sect B. Biol. Sci.* 82, 111–121. <https://doi.org/10.1007/s40011-011-0009-6>
- Eisfeld, A.J., Neumann, G., Kawaoka, Y., 2015. At the centre: influenza A virus ribonucleoproteins. *Nat Rev Microbiol* 13, 28–41. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3367>
- Enami, M., Sharma, G., Benham, C., Palese, P., 1991. An influenza virus containing nine different RNA segments. *Virology* 185, 291–298. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90776-8](https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)90776-8)
- Engelhardt, O.G., Fodor, E., 2006. Functional association between viral and cellular transcription during influenza virus infection. *Rev. Med. Virol.* 16, 329–345. <https://doi.org/10.1002/rmv.512>
- Engelhardt, O.G., Smith, M., Fodor, E., 2005. Association of the Influenza A Virus RNA-Dependent RNA Polymerase with Cellular RNA Polymerase II. *J Virol* 79, 5812–5818. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.9.5812-5818.2005>
- European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control, European Union Reference Laboratory for Avian Influenza, Adlhoch, C., Fusaro, A., Gonzales, J.L., Kuiken, T., Marangon, S., Niqueux, É., Staubach, C., Terregino, C., Aznar, I., Guajardo, I.M., Baldinelli, F., 2023. Avian influenza overview September – December 2022. *EFS2* 21. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.7786>
- Fujii, K., Fujii, Y., Noda, T., Muramoto, Y., Watanabe, T., Takada, A., Goto, H., Horimoto, T., Kawaoka, Y., 2005. Importance of both the Coding and the Segment-Specific Noncoding Regions of the Influenza A Virus NS Segment for Its Efficient Incorporation into Virions. *J Virol* 79, 3766–3774. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.6.3766-3774.2005>

- Fujii, Y., Goto, H., Watanabe, T., Yoshida, T., Kawaoka, Y., 2003. Selective incorporation of influenza virus RNA segments into virions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 2002–2007. <https://doi.org/10.1073/pnas.0437772100>
- Hagen, M., Chung, T.D., Butcher, J.A., Krystal, M., 1994. Recombinant influenza virus polymerase: requirement of both 5' and 3' viral ends for endonuclease activity. *J Virol* 68, 1509–1515. <https://doi.org/10.1128/jvi.68.3.1509-1515.1994>
- Helmy, I.M., Abdel Azim, A.M., 2012. Efficacy of ImageJ in the assessment of apoptosis. *Diagn Pathol* 7, 15. <https://doi.org/10.1186/1746-1596-7-15>
- Holsinger, L.J., Alams, R., 1991. Influenza virus M2 integral membrane protein is a homotetramer stabilized by formation of disulfide bonds. *Virology* 183, 32–43. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90115-R](https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)90115-R)
- Huang, Q., Sivaramakrishna, R.P., Ludwig, K., Korte, T., Böttcher, C., Herrmann, A., 2003. Early steps of the conformational change of influenza virus hemagglutinin to a fusion active state. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1614, 3–13. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(03\)00158-5](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(03)00158-5)
- Influenza Type A Viruses and Subtypes, 2023. URL <https://www.cdc.gov/flu/avianflu/influenza-a-virus-subtypes.htm>
- Iwatsuki-Horimoto, K., Horimoto, T., Noda, T., Kiso, M., Maeda, J., Watanabe, S., Muramoto, Y., Fujii, K., Kawaoka, Y., 2006. The Cytoplasmic Tail of the Influenza A Virus M2 Protein Plays a Role in Viral Assembly. *J Virol* 80, 5233–5240. <https://doi.org/10.1128/JVI.00049-06>
- Jester, B.J., Uyeki, T.M., Jernigan, D.B., 2020. Fifty Years of Influenza A(H3N2) Following the Pandemic of 1968. *Am J Public Health* 110, 669–676. <https://doi.org/10.2105/AJPH.2019.305557>
- Johnson, N.P.A.S., Mueller, J., 2002. Updating the Accounts: Global Mortality of the 1918-1920 “Spanish” Influenza Pandemic. *Bulletin of the History of Medicine* 76, 105–115. <https://doi.org/10.1353/bhm.2002.0022>
- Liang, Y., Hong, Y., Parslow, T.G., 2005. *cis* -Acting Packaging Signals in the Influenza Virus PB1, PB2, and PA Genomic RNA Segments. *J Virol* 79, 10348–10355. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.16.10348-10355.2005>
- Mahy, B.W.J., Van Regenmortel, M.H.V., 2008. *Encyclopedia of virology*, 3rd ed. ed. Elsevier/Academic Press, Amsterdam.
- Mandl, J., Bánhegyi, G., 2007. Endoplasmic reticulum stress – common pathomechanism of different diseases? *Orvosi Hetilap* 148, 1779–1785. <https://doi.org/10.1556/oh.2007.28166>
- Mészáros, I., Tóth, R., Olasz, F., Tijssen, P., Zádori, Z., 2017. The SAT Protein of Porcine Parvovirus Accelerates Viral Spreading through Induction of Irreversible Endoplasmic Reticulum Stress. *J Virol* 91, e00627-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.00627-17>
- Mostafa, A., Abdelwhab, E., Mettenleiter, T., Pleschka, S., 2018. Zoonotic Potential of Influenza A Viruses: A Comprehensive Overview. *Viruses* 10, 497. <https://doi.org/10.3390/v10090497>
- Muramoto, Y., Takada, A., Fujii, K., Noda, T., Iwatsuki-Horimoto, K., Watanabe, S., Horimoto, T., Kida, H., Kawaoka, Y., 2006. Hierarchy among Viral RNA (vRNA) Segments in Their Role in vRNA Incorporation into Influenza A Virions. *J Virol* 80, 2318–2325. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.5.2318-2325.2006>
- Nayak, D.P., Balogun, R.A., Yamada, H., Zhou, Z.H., Barman, S., 2009. Influenza virus morphogenesis and budding. *Virus Research* 143, 147–161. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.05.010>
- Noda, T., 2012. Native Morphology of Influenza Virions. *Front. Microbio.* 2. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00269>

- Pinto, L.H., Holsinger, L.J., Lamb, R.A., 1992. Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell* 69, 517–528. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90452-I](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90452-I)
- Robertson, J.S., Schubert, M., Lazzarini, R.A., 1981. Polyadenylation sites for influenza virus mRNA. *J Virol* 38, 157–163. <https://doi.org/10.1128/jvi.38.1.157-163.1981>
- Sabath, N., Morris, J.S., Graur, D., 2011. Is There a Twelfth Protein-Coding Gene in the Genome of Influenza A? A Selection-Based Approach to the Detection of Overlapping Genes in Closely Related Sequences. *J Mol Evol* 73, 305–315. <https://doi.org/10.1007/s00239-011-9477-9>
- Samji, T., 2009. Influenza A: understanding the viral life cycle. *Yale J Biol Med* 82, 153–159.
- Shapiro, G.I., Gurney, T., Krug, R.M., 1987. Influenza virus gene expression: control mechanisms at early and late times of infection and nuclear-cytoplasmic transport of virus-specific RNAs. *J Virol* 61, 764–773. <https://doi.org/10.1128/jvi.61.3.764-773.1987>
- Skehel, J.J., Wiley, D.C., 2000. Receptor Binding and Membrane Fusion in Virus Entry: The Influenza Hemagglutinin. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 531–569. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.531>
- Smith, G.L., Hay, A.J., 1982. Replication of the influenza virus genome. *Virology* 118, 96–108. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(82\)90323-3](https://doi.org/10.1016/0042-6822(82)90323-3)
- Spreeuwenberg, P., Kroneman, M., Paget, J., 2018. Reassessing the Global Mortality Burden of the 1918 Influenza Pandemic. *American Journal of Epidemiology* 187, 2561–2567. <https://doi.org/10.1093/aje/kwy191>
- Suttie, A., Deng, Y.-M., Greenhill, A.R., Dussart, P., Horwood, P.F., Karlsson, E.A., 2019. Inventory of molecular markers affecting biological characteristics of avian influenza A viruses. *Virus Genes* 55, 739–768. <https://doi.org/10.1007/s11262-019-01700-z>
- Taubenberger, J.K., Morens, D.M., 2006. 1918 Influenza: the Mother of All Pandemics. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 15–22. <https://doi.org/10.3201/eid1209.05-0979>
- Watanabe, T., Watanabe, S., Noda, T., Fujii, Y., Kawaoka, Y., 2003. Exploitation of Nucleic Acid Packaging Signals To Generate a Novel Influenza Virus-Based Vector Stably Expressing Two Foreign Genes. *J Virol* 77, 10575–10583. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.19.10575-10583.2003>
- Zádori, Z., Szelei, J., Tijssen, P., 2005. SAT: a Late NS Protein of Porcine Parvovirus. *J Virol* 79, 13129–13138. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.20.13129-13138.2005>

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani Dr. Zádori Zoltánnak, az Állatorvostudományi Kutatóintézet, Funkcionális virológia témacsoport vezetőjének, hogy támogatta a tudományos munkám és biztosította a kutatásunkhoz szükséges feltételeket. Hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Mészáros Istvánnak, az Állatorvostudományi kutatóintézet, Funkcionális virológia témacsoport, tudományos főmunkatársának, aki nélkül nem készülhetett volna el ez a dolgozat. Köszönöm, hogy szívesen fogadtak, időt és fáradságot nem sajnálva bármikor is szükségem volt rájuk, a segítségemre voltak, és támogatták, segítettek részvételemet a laboratóriumi munkában. Köszönetet szeretnék mondani Dr. Tenk Miklósnak az Állatorvostudományi Egyetem, Járványtani és mikrobiológiai tanszék vezetőjének az előadás során nyújtott sok segítségért és szakmai támogatásáért. Végül szeretném megköszönni családomnak és barátaimnak, hogy minden nehézségben mellettem álltak és segítettek, ahogyan csak tőlük tellett.