

**Állatorvostudományi Egyetem
Állatorvostudományi Doktori Iskola**

**Magyarországról izolált PRRSV
törzsek szekvencia elemzése és a
PRRSV 7ap peptid biokémiai és
immunológiai jellemzése**

Doktori értekezés tézisei

Olasz Ferenc

2017

.....
Dr. Zádori Zoltán

Magyar Tudományos Akadémia, Agrártudományi
Kutatóközpont,
Állatorvos-tudományi Intézet
témavezető

1. Bevezetés

A sertések reprodukciós és légzőszervi szindrómáját (PRRS) először az USA-ban észlelték az 1980-as évek legvégén, mint egy ismeretlen új betegséget, amely súlyos szaporodási problémákat, légzőszervi megbetegedést, a malacok fejlődésbeli visszamaradását és megnövekedett mortalitást okoz. Végül 1992-ben sikerült azonosítani a kórokozót, amelynek első izolátumát VR-2332-nek nevezték el. Néhány évvel később egy hasonló betegséget és vírust írtak le Európában. A vizsgálatok kiderítették, hogy az európai és az észak-amerikai törzs ugyanannak a vírusnak genetikailag eltérő rokon változata.

A PRRS megjelenése után az egyik legnagyobb gazdasági károkat okozó fertőző betegséggé vált a sertéságazatban. Habár kereskedelmi forgalomban PRRSV fertőzés ellen többféle vakcina is elérhető, a kutatóintézetek és vakcinagyártók erőfeszítései ellenére továbbra sincs forgalomban olyan védőoltás, amely képes lenne teljes mértékű védelmet nyújtani a fertőzés ellen, legyen az inaktivált vírus vagy módosított élő vírus (MLV) alapú vakcina. A hatékony vakcina kifejlesztését több tényező is hátráltatja. Egyik legnagyobb probléma a

vírus nagyfokú genetikai diverzitása, amely szélsőséges antigén változékonyságot eredményez. Két törzs genom szekvenciája között akár 45% eltérés is lehet. Egy másik probléma az, hogy a virulenciát és patogenitást befolyásoló genom szakaszok helyzete és működése egyelőre nem teljesen tisztázott. A vírus gyenge immunválaszt vált ki a fertőzött állatokból, mert számos, immunszuppresszív hatású fehérjével rendelkezik.

Magyarországon a fertőzés az 1990-es évek közepén jelent meg, de csak a 2000-es évektől okozott komoly problémákat. Magyarországon az évek során genetikailag és virulenciáját tekintve is a nyugat-európai országoknál heterogénebb PRRSV populáció alakult ki, amelyek között európai, és észak-amerikai genotípusú törzsek is megtalálhatóak. A komoly gazdasági károk enyhítésére 2010-ben Magyarországon elfogadták a Nemzeti PRRS Mentésítési Programot.

2. Célkitűzés

- Két olyan PRRSV izolátum teljes genomszekvenciájának meghatározása, amelyekről azt feltételeztük, hogy egyedi genetikai tulajdonságokkal rendelkezhetnek.
- A gyorsan mutálódó PRRSV genom elemzése és új, eddig ismeretlen ORF-ek azonosítása
- Bizonyítani, hogy a vírushelyezés során az alternatív ORF-ekről fehérje fejeződik ki, és jellemezni termelődött fehérje biológiai tulajdonságait és funkcióit.
- Immunológiai tesztekkel vizsgálni a hipotetikus 7ap fehérje antigenitását a PRRSV fertőzésen átesett vagy immunizált sertések vérének felhasználásával. A 7ap ellen termeltetett ellenanyagok segítségével azonosítani a peptid sejten belüli lokalizálódását és a biológiai tulajdonságait.

3. Anyag és módszer

3.1 Vírustörzsek eredete, nukleotid szekvencia meghatározása és a filogenetikai elemzésük

Az egyik izolátum (PRRSV-2/Hungary/102/2012 (102HU)) Komárom-Esztergom megyéből, Ács közelében található 1-es genotípusú PRRSV-vel endémiásan fertőzött telepről, a másik izolátum (9625/2012) egy füzesgyarmati (Békés megye) nem vakcinázott, a járvány kitörése előtt PRRS-mentes hízósertés telepről származott. A PRRSV izolálása tüdőből és nyirokcsomóból történt. A szöveteket homogenizálták, majd a felülúszóból 100 µl-t a sertés alveoláris makrofágokat (PAM) tartalmazó tápoldatban pipettáztak. A virális RNS-t QIAamp Viral RNA Mini Kittel vontuk ki, majd ebből a cDNS-t T₂₀-as primer hozzáadásával Superscript III First-Strand Synthesis System kit segítségével készítettük el. A genomokat öt, illetve hat egymással átfedő darabban sokszorosítottuk. A kapott fragmenteket nukleotid sorrendjét újgenerációs szekvenálással határoztuk meg, a szekvenciák illesztését SeqMan Ngen szoftverrel végeztük. ORF5

szekvencián és teljes genom szekvencián alapuló filogenetikai törzsfa-rekonstrukciót MEGA szoftvercsomaggal hajtottuk végre. A 102HU helyzetét a fán maximum likelihood módszerrel, a 9625/2012 izolátumnál Kimura 2-paraméteres modellt alkalmazva neighbor-joining algoritmussal határoztuk meg.

3.2 Alternatív ORF-ek vizsgálati módszerei

Az ORF Finder tool programmal 46 darab, egymástól eltérő PRRSV törzs nukleotid szekvenciáját vizsgáltuk, hogy a genomban alternatív ORF-eket azonosítsunk. A talált ORF-ek származtatott aminosav szekvenciáit összeillesztettük, hogy tanulmányozzuk a hipotetikus peptidok konzerváltságát.

A nukleokapszid gén mindhárom leolvasási keretét a pEGFP-N1 vektorban az eGFP riporter génhez kapcsoltuk. A cDNS-ről a vizsgálandó ORF-et tartalmazó inzertet 7-es sg-mRNS transzkripciót szabályzó szekvenciájától (TRS-től) (leaky scanning lehetőségének figyelembe vétele miatt) a stopkodon előtti tripletig sokszorosítottuk. Majd az inzerteket restriktáz enzimekkel (*Xho*I és *Bam*HI) emésztettük és a korábban ugyanezekkel az enzimekkel hasított vektorral

egyesítettük. A FLAG-peptid fúziós rendszerek elkészítéséhez a pcDNA3-FLAG plazmidot használtuk. A konstrukciók létrehozásában ugyanazokat a protokollokat és enzimeket használtuk, mint az eGFP fúziós rendszerekben. A Flag-fehérje fúziós vektorral transzfektált sejteket 48 óra elteltével, formaldehiddel fixáltuk. A fúziós fehérjék jelenlétét indirekt immunfluoreszcenciával mutattuk ki, elsődleges ellenanyagként az egér anti-FLAG M2 monoklonális ellenanyagot használtuk. Összes konstrukciót PT sejtekbe transzfektáltuk, a képeket a Zeiss inverz fluoreszcens mikroszkóppal készítettük.

A tesztekhez két különböző PRRSV törzsből származó peptidet (Hu7ap és Wu7ap) rendeltünk CASLO ApS cégtől.

7ap-nek elnevezett peptiddel ELISA lemezeket vontunk be, majd a lemezekre hígított, különböző állatfajokban termeltetett, torna-peroxidázzal (HRP-vel) jelölt ellenanyagokat mértünk. Az eredményt ABTS-sel hívtuk elő, majd lemértük a fényelnyelési (optical density, OD) értékeket.

Következő teszt első lépéseként egy komplementkötési próbát állítottunk össze. Hígított, frissen elkészített, mosott juh vörösvértestet

összekevertünk hígított hemolizinnel (nyúl anti-juh vörösvértest IgG), majd tíz lépésben hígított tengerimalac komplementet adtunk hozzá. A komplementkötés gátlási próbában, teljes hemolízist (2%-os) okozó koncentrációnál 1%-kal magasabb (3%-os) komplement koncentrációt használtunk. Minden fehérjéből (spA, két különböző 7ap peptid), hat lépésben felező hígítást készítettünk és hozzáadtunk hemolizinhoz. Egy órás inkubáció letelte után hozzákevertük az optimális mennyiségű komplementet és juh vörösvértestet.

DNS és RNS gélretardációs tesztben a 7ap fehérjék kölcsönhatását vizsgáltuk különféle nukleinsavakkal. Az RNS próbát egy nukleokapszid leolvasási keretéhez fuzionáltatott Flag-fúziós vektorról transzkriptáltuk. Egyszálú DNS próbaként egy oligonukleotid primert használtunk, kétszálú DNS létrát a *PvuII* és *HindIII* restriktációs enzimmel emésztett pIRES-AcGFP1 plazmidból állítottuk elő. A teszt során egységnyi mennyiségű nukleinsavhoz (RNS esetén 1,3 µg, kétszálú DNS-nél 0,5 µg, egyszálú DNS-nél 200 ng) növekvő koncentrációban Wu7ap és Hu7ap peptidet adtunk. A mintákat felvittük 6%-os nem denaturáló poliakrilamid géltre, amelyet az Ornstein-Davis által

alkotott protokoll szerint öntöttük, majd 110V-on Tris-glicin pufferben futattuk. A nukleinsavakat GelRed Nucleic Acid Gel Stain-nel festettük. Fehérje-fehérje géltreardációs tesztben az ellenanyagok és a 7ap fehérjék kölcsönhatását vizsgáltuk. Két különböző állatból származó IgG-t használtunk, egy egér monoklonális IgG-t és sertés poliklonális IgG-t, ezenkívül sertés IgG Fc fragmentet és a sertés IgG (Fab')₂ fragmentet is bevontunk a vizsgálatba. 8-10 µg IgG vagy IgG fragmentekhez felező hígításban Wu7ap és Hu7ap fehérjét adtunk (legnagyobb 50 µg, a legkisebb hozzáadott mennyiség 2 µg volt). A végtérfogatot 14 µl-re állítottuk be, majd az ellenanyag és 7ap keveréket 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd Tris-glicin pufferben, nem denaturáló poliakrilamid gélen futattuk 120V-on. A gélt 0,1%-os Coomassie Brilliant Blue R250-nel festettük.

Két BALB/c egeret kétszer izomba adott 0,2 ml Hu7ap tartalmú emulzióval immunizáltunk. A két injekció közt két hét telt el. Negatív kontrollnak egy Hu7ap-hez hasonló méretű peptiddel, a K1p-vel immunizált BALB/c egeret használtunk. A másik immunizációs kísérletben két darab, 6 hetes korú, igazoltan PRRSV-mentes sertésállományból származó magyar nagyfehér

malacokat oltottunk 7ap tartalmú emulzióval. Az oltásokat kétszer végeztük, és két oltás közt mindkét állat esetén 17 nap telt el. Az állatokat 3 héttel a második oltás után feláldoztuk az Állatvédelmi Törvénynek megfelelő módon.

Autoellenanyagok kimutatására indirekt immunfluoreszcenciát alkalmaztunk. Elsődleges ellenanyagként az immunizált állatokból származó, több lépésben (20-szorostól 1000-szeresig) hígított vérsavót használtuk. Másodlagos ellenanyagként 1000-szeresre hígított CF594 kecske anti-egér és CF568 kecske anti-disznó IgG-t alkalmaztunk.

4. Eredmények

4.1 Magyarországi PRRSV minták (9625/2012 és PRRSV-2/Hungary/102/2012 izolátum) teljes genom szekvenciájának elemzése

A PRRSV 9625/2012 nukleotid szekvencia szinten 96%-os egyezést mutatott az Amervac MLV-vel (vakcinatörzs) és 95%-nyit Olot/1991-vel. A legnagyobb egyezést mutató törzsekhez illesztve, nem találtunk deléciót vagy inzerciót a szekvenciában. SimPlot elemzés eredménye alapján a genom nem tartalmazott

rekombinációt. A PRRSV 9625/2012 helyzetét a filogenetikai törzsfán teljes hosszúságú ORF5 szekvencia alapján határoztuk meg. A törzsfarekonstrukció eredménye alapján az 1-es genotípuson belül, az 1-es szubtípus „D” kládjába tartozott. Az 9625/2012 származtatott aminosav szekvenciáját a legnagyobb egyezést mutató két törzshöz, az Amervac MLV-hoz és az Olot/1991-hez illesztettük.

A GP2 fehérjén két ismert neutralizáló epitóp található, az egyikén kettőt, a másikon egy aminosav cserét figyeltünk meg. A nem-neutralizáló epitópokban, két-két aminosav változást találtunk. A fehérje nem antigénként viselkedő részében összesen öt változás történt.

A GP3-on két neutralizáló epitóp lokalizálódik. Rajtuk kettő, illetve három aminosav cserét sikerült azonosítanunk, a nem-neutralizálón összesen egy változást találtunk.

A GP4-n elhelyezkedő egyetlen ismert B-sejt epitóp hipervariábilis, négy darab szubsztitúciót figyeltünk meg, addig a szekvencia többi, nem immunogén részében csak három változást azonosítottunk.

A GP5-ön egy ismert neutralizáló epitóp található, amelyen összesen egy aminosav változás lokalizálódik. Ezen kívül még négy epitóp helyezkedik el a fehérjén, ebből kettő teljesen konzervált, a másik kettő egy-egy darab szubsztitúciót tartalmazott. Az aminosav változások nagy hányada a GP2, GP3 és GP4 antigénrégióban történt, ebből arra következtettünk, hogy az immunrendszer által gyakorolt szelekciós nyomásnak fontos szerepe lehetett a vírus szekvenciájának változásában.

A szekvencia összehasonlítások eredménye alapján a PRRSV-2/Hungary/102/2012 (102HU) egy teljesen új, 2-es genotípusú PRRSV törzs, amely nem mutat közeli rokonságot sem a VR-2332, sem az Ingelvac PRRSV MLV élő vakcina törzssel (5-ös vonal tagjaival). A legnagyobb szekvenciabeli hasonlóságot a VR-2385 izolátummal mutatta, a két izolátum között 13%-nyi különbséget azonosítottunk. A teljes ORF5 szekvencia adatok alapján felállított filogenetikai törzsfá a 102HU-t a 2-es genotípuson belüli 2-es vonalba helyezte. A tőle legkisebb filogenetikai távolságra levő GenBankból gyűjtött szekvenciáktól 8-9%-ban tért el. Az összes ismert, teljes PRRSV szekvenciát bevontuk a

rekombináció elemzésbe, azonban nem találtunk arra bizonyítékot, hogy a 102HU törzs ismert szekvenciák rekombinációjából jött volna létre.

A nukleotid szekvencia elemzése után az izolátumot aminosavszinten vizsgáltuk, hogy megállapítsuk, milyen egyedi mutációkat és változásokat hordoz. Az nsp2-ben két deléciót fedeztünk fel; egy 10 aminosavast és egy 9 aminosavast, amelyek nem találhatóak meg sem a VR-2332 prototípustörzsben, sem a magasan patogén kínai prototípustörzsben, a JXA1-ben, ezzel szemben találtunk egy inzerciót az nsp2-ben 795. és 803. aminosav pozíciók között, amely a korábban tárgyalt másik két törzsből hiányzott.

Összehasonlítottuk és részletesen elemeztük a glikozilációban és az antigénrégiókban történő aminosav változásokat a GP2, GP3, GP4 és GP5 fehérjéken belül. Jóllehet, a mutációk többsége a GP2-ön és GP3-on nem epitópon lokalizálódott, de az elhelyezkedésük mégsem bizonyult véletlenszerűnek. A mutációk többségét a GP3-ban a szignálpeptiden és a GP4-gyel átfedő, TM régió utáni C-terminális végén találtuk, valamint az átfedés miatt a GP4 fehérje N-terminális végében.

A GP4-en található epitóp AR₅₁₋₆₅ hipervariábilis, a referenciatörzsekhez képest öt darab aminosav változást

tartalmazott. A két T-sejt epitóp közül az egyikén három, a másikon kettő aminosav csere történt. A referenciatörzsekhez képest eggyel több, összesen öt darab N-glikozilációs helyet találtunk, ötödik hely az AR₅₁₋₆₅-n helyezkedett el.

A GP5 hat B-sejt epitóp közül, az N-terminális végen elhelyezkedők (AR₁₋₁₅ és AR₂₇₋₃₅) szekvenciája variábilisnak, addig a többi négy régió konzervatívnak bizonyult. A GP5 fehérjén elhelyezkedő három T-sejt epitóp szekvenciája konzervált. A GP5 fehérjén öt darab potenciális N-glikozilációs helyet találtunk. Két hely, az N44 és az N57 egy konzervatív epitópon, a másik három hely az erősen változó AR₂₇₋₃₅-ön helyezkedett el.

4.2 A PRRSV ORF7 alternatív leolvasási keretéről leíró peptidek immunológiai és biokémiai jellemzése

Az elemzésünk egy jól konzervált ORF-et tárt fel a nukleokapszid fehérjét kódoló ORF7-en belül. Ezt a rövid ORF-et, ORF7a-nak neveztük el. Az ORF7a +2-es leolvasási keretben helyezkedett el, és teljesen átfedett a nukleokapszid génnel. A róla leíró peptidek közül az egyiket 7ap-nek neveztük el, amelynek

szekvencia hosszúsága genotípustól függően 26 és 53 aminosav közöttinek bizonyult.

A legegyszerűbb magyarázat az ORF7a konzerváltságára, hogy fehérje íródik le róla. Az ORF7 génből három konstrukciót készítettünk: pozitív kontrollként az N fehérjét az eGFP leolvasási keretéhez fuzionáltuk, negatív kontrollként ahhoz a leolvasási kerethez kapcsoltuk az eGFP riportergént, amelyben nincsen ORF. A harmadik konstrukciónál a hipotetikus 7ap-t kódoló leolvasási keretet egyesítettük az eGFP fehérjével.

A nukleokapszid-eGFP fúziós fehérjét kódoló pozitív kontrollnál erőteljes zöld fluoreszcens jelet tapasztaltunk. A +2-es leolvasási kerethez kapcsolt eGFP konstrukció is pozitívnak bizonyult, az észlelt fluoreszcens jel intenzitása alacsonyabb volt a pozitív kontrollhoz képest. A FLAG-fúziós fehérje leíródását indirekt immunfluoreszcenciával a +1-es és +2-es leolvasási keretre tervezett konstrukciónál is kimutattuk. Így *in vitro* körülmények közt igazoltuk a 7ap átíródását. Az eredményeink alapján a 7ap 20 óra után sejtmagban lokalizálódik, majd 48 óra múlva a sejt citoplazmájában is kimutatható.

Ha a fertőzés során leíródo 7ap immunogén tulajdonságú, akkor ellene a sertés szervezetében antitestek termelődhetnek. Az ELISA teszt eredménye alapján nemcsak a PRRSV pozitív állatok széruma, hanem a PRRSV-negatív mintával kezelt lyukak is pozitívnak bizonyultak, továbbá szérumot nem tartalmazó, de másodlagos ellenanyaggal kezelt részek is magas fényelnyelési értéket (OD) adtak. A 7ap erősen köti az összes vizsgált emlősből (sertés, egér, kecske, nyúl) származó IgG-t és ez a kötődés teljesen független a HRP-től. Ebből arra következtettünk, hogy legalább egy, „aspecifikus” antigén felismerőhely található a 7ap peptiden, amely független az ellenanyag antigénkötő tulajdonságától.

A fehérje-fehérje gél retardációs teszttel terveztük megerősíteni az ELISA-val kapott eredményeket és meghatározni a 7ap kötőhelyét az IgG fehérjén. Eredményeink azt mutatták, hogy mindkét törzsből származó 7ap képes volt blokkolni bizonyos koncentráció felett a monoklonális egér IgG és poliklonális sertés IgG futását a gélben. Kötőhelyének azonosításához a 7ap kölcsönhatásait vizsgáltuk különböző IgG fragmentekkel (IgG (Fab')₂-vel és IgG Fc-vel). A hozzáadott 7ap nem blokkolta teljesen a sertés

poliklonális IgG (Fab')₂ futását gélben, addig az IgG Fc fragmentét igen. Ezek a kísérletek azt mutatták, hogy a 7ap peptidek genotípustól függetlenül képes a sertés poliklonális és az egér monoklonális ellenanyag kötésére, és a fő kötőhelyük az IgG Fc részén található.

A komplementkötés gátlási teszt eredményei alapján a Hu7ap az IgG CH2 doménjával lép interakcióba, és ez részben vagy teljesen átfedhet a C1q kötőhelyével.

A 7ap-hez hasonlóan a nukleinsav kötő fehérjék is pozitívan töltöttek a sejten belül, így feltételeztük, hogy nukleinsav kötő tulajdonsággal is rendelkezhet. Ahhoz, hogy ezt a hipotézist igazoljuk, nukleinsav-7ap gél retardációs tesztet végeztünk. Az eredményekből azt következtetést vontuk le, hogy genotípustól függetlenül a 7ap legnagyobb affinitással a duplaszálú DNS-t köti, legkisebb affinitással az egyszálú DNS-t.

A Hu7ap jelenlétét a PRRSV-vel fertőzött Marc 145 sejtekben 7ap-vel immunizált állatok szérumával terveztük bizonyítani. ELISA tesztel nem sikerült kimutatnunk különbséget az immunizált és nem immunizált állatok szérumai közt. Azonban immunizált állatok széruma a sejtmagokkal (anti-nukleáris antitestek) reagált és ez a reakció a két állatfajban eltért

egymástól. A sertésszérum a nem osztódó sejtek magjában egy úgy nevezett finom foltos festődést okozott, és nem reagált az osztódó sejtek kromoszómáival. Az immunizált egerek széruma az osztódó sejtek kromoszómáját festette, amely duplaszálú DNS-kötő ellenanyagok jelenlétére utalhat.

5. Következtetések

5.1 PRRSV 9625/2012 törzs jellemzése

A PRRSV két genotípusa közt a nukleotid szekvenciában akár 30-45%-nyi különbség is lehet. Egy konzervatív becslés a mutációs rátát évi 1,8 és 7×10^{-3} /nukleotid közé teszi, és ez alapján a PRRSV az egyik legváltozékonyabb RNS vírus. A 4%-nyi különbség a 9625/2012 és az Amervac MLV genomja közt 4-8 évnnyi változásnak feleltethető meg. 2004 óta több, Amervac MLV-vel 98-99%-nyi nukleotid egyezést mutató törzset izoláltak Magyarországon található sertéstelepekről. A 9625/2012-nál megfigyelt nagy szekvenciális eltérés legvalószínűbb magyarázata az lehet, hogy az izolátum egy olyan 2004 és 2008 közt Magyarországra került Amervac vagy egy Olot/1991-gyel rokon törzs leszármazottja, amely 2012-ig észrevétlen maradt.

A származtatott aminosav szekvencia elemzés viszonylag nagy eltérést (9% és 7%) tárt fel az nsp1 és nsp2 régióban a 9625/2012 és a referenciatörzsek között. Ennek az lehet az oka, hogy ez a két fehérje fontos szerepet játszik a veleszületett immunválasz egyik fontos részének, az 1-es típusú interferon (IFN- α és β) szintézisének és szignalizációs útvonalának a gátlásában. A neutralizáló ellenanyagok hatását a vírus szekvenciájára a három törzs GP2, GP3, GP4 és GP5 szerkezeti fehérjéinek összehasonlító elemzésével állapítottuk meg, mivel ezek a fehérjék tartalmazzák a neutralizáló ellenanyagok fő célpontjait.

Míg a GP2 fehérjén a neutralizáló hatású epitópok két egyedi aminosav cserét tartalmaztak, addig a nem neutralizálókon összesen négy változást figyeltünk meg. A szekvencia többi részén öt különbség volt, ebből az ötből két aminosav változás az epitóptól upstream irányba helyezkedett el. Mivel az aminosav változások többsége az antigénrégiókban található, így azt gondoltuk, hogy a mutációk az immunszelekció miatt bekövetkező antigénsodródás vagy „antigén drift” következményei.

A GP3 fehérjén található 14 mutációból 6 ismert antigénrégiókra esik, így a mutáció létrejöttében az

immunrendszer által gyakorolt szelekciós nyomásnak lehetett szerepe. A GP4 egyetlen antigénrégiójában három aminosav változást találtunk. Ez megerősíti, hogy az epitóp ellenanyag-közvetítette szelekciós nyomás alatt áll.

A GP5 N-terminális végén levő két epitóp határa között, a 36-38-as aminosav pozíciókban szubsztitúciók lokalizálódnak, így az epitópok közelsége miatt feltételeztük, hogy erre a három aminosavra is szelekciós nyomást gyakorolhat az immunrendszer.

A sertésállományban a 9625/2012-es törzs komoly klinikai tünetekkel járó fertőzést okozott. A fertőzött telepről származó szérummintákból és az elpusztult állatokból a PRRSV mellett szerológiai vizsgálatokkal *Mycoplasma hyopneumoniae* jelenlétét is kimutatták. A két korokozó, PRRSV és *Mycoplasma hyopneumoniae* együttes jelenléte sokkal komolyabb tüneteket okoz, súlyosbítják a kialakuló tüdőgyulladást.

5.2 102HU törzs jellemzése

A 2-es típusú PRRSV törzsek főleg Észak-Amerikában fordulnak elő. A PRRSV-2/Hungary/102/2012 az első Európából származó 2-es

genotípusú teljes nukleotid szekvencia, amely nem mutat rokoni kapcsolatot az Ingelvac vakcinatörzsszel. A GenBankban elérhető teljes szekvenciákhoz hasonlítva 13%-nyi különbséget figyeltünk meg, amely megerősíti a vizsgált törzs egyedi jellegét. Teljes ORF5 szekvenciájával végzett filogenetikai vizsgálatok eredményei alapján a 2-es genotípus 2-es vonalába sorolható, de nagy hasonlóságot mutat több 1-es vonalú szekvenciával is. A legnagyobb egyezést a teljes ORF5 szekvenciákból felállított törzsfán 2000-es években izolált amerikai és kanadai törzsekkel mutatta. Az 1-es és a 2-es vonal Kanadából származik, ebből azt feltételeztük, hogy PRRSV-2/Hungary/102/2012 őse Kanadából kerülhetett Kelet-Európába 10-15 évvel ezelőtt, ám megbízható szállítmányozási adatok hiányában nem lehet azonosítani a fertőzés forrását. A magyar határhoz közel, Szlovákiában található komáromi járásból egy PRRSV-2/Hungary/102/2012-vel nagy egyezést mutató törzset izoláltak. A határ közelsége elképzelhetővé teszi, hogy Szlovákiából került hozzánk a vírus, de a fordítottja is lehetséges. A nagyfokú hasonlóság a szlovák és a magyar izolátumok között, és minden más európai szekvenciától való

határozott eltérés megerősíti azt a feltételezést, hogy egy közös forrásból származnak.

A GP2 fehérje antigén régiói viszonylag konzervatívak. Azt gondoljuk, hogy a fehérje olyan funkcionális részeiben található, amelyek az aminosav-sorrendben történő változásokat nem, vagy csak kis mértékben tolerálják. A mutációk többségét az N-terminálison (GP2₁₋₄₀) és a C-terminálison (GP2₂₄₀₋₂₅₆) figyeltük meg.

A GP3 epitópok – az AR₁₃₇₋₁₅₉ kivételével – kevés mutációt tartalmaznak: ennek magyarázata hasonló lehet, mint a GP2-nél.

A GP4-en az AR₅₁₋₆₅ egy különösen változékony epitóp. Az 1-es genotípusú PRRSV fertőzésben az ellene termelődő ellenanyagok bizonyítottan neutralizáló hatásúak.

A glikoproteinek TM régiója konzervatív, ám a velük átfedő fehérje szignálpeptidje hipervariábilis, mutációkban gazdag. A szekvencia változatosság ellenére a szignálpeptid funkció fennmarad. Erre az a magyarázat, hogy az aminosav összetétel tág határok között változhat. A transzmembrán régió szekvenciája is elméletileg variábilis lehetne, a transzmembrán (TM) hélix funkció (hélix hidrofób aminosavakkal) nem

indokolja konzerváltságot. Feltételezésünk alapján a TM hélix konzervációja egy eddig ismeretlen, járulékos funkció (például fehérje-fehérje interakció) következménye lehet. A 102HU GP4 fehérjéje az AR₅₁₋₆₅-ben eggyel több glikozilációs helyet (N57) tartalmaz a referenciatörzsekhez képest. Egy neutralizáló epitóp glikozilációja csökkenti a fehérje immunogenitását, és megakadályozhatja a gyors és hatékony immunválasz létrejöttét: ezt a jelenséget hívják „glycan shieldnek”. A GP5 fehérjén az AR₂₇₋₃₅ valószínűleg „csali epitópként” funkcionálhat, szekvenciája gyorsan változik, és az ellene termelődő ellenanyagoknak nincs neutralizáló hatása. Egy másik tanulmány kimutatta, hogy ugyanezen az epitópon a 32, 33 és 34 pozícióban levő aminosavak erős pozitív szelekció alatt állnak. A N30, az N34 és az N35 kívül még két konzervált N-glikozilációs hely (N44 és N51) található a GP5-ön, és ez az öt hely egy nagyon ritka glikozilációs mintázatot alkot, amely 2-es genotípusú PRRSV-k csak 1%-ában található meg. Mivel a GP4-ben és a GP5-ben az aminosav változások többsége az antigénrégiókban találhatóak, így azt gondoljuk, hogy a törzs evolúciójában fontos szerepet játszhatott az immunrendszer által gyakorolt szelekciós nyomás.

5.3 7ap fehérje jellemzése

A PRRSV genomban a magas mutációs ráta ellenére több olyan nukleotid szekvencia található, amely egynél több fehérjét kódol. Az ORF2b teljesen átfed az ORF2a-val és az ORF5 és ORF5a esetén is hasonló átfedés tapasztalható.

Az ORF7 régióra tervezett eGFP és Flag fúziós konstrukciókkal megerősítettük a transzlációt az ORF7-tel átfedő ORF7a-ról. A különböző PRRSV törzsekben az ORF7a metioninja konzervált pozícióban helyezkedik el, így azt gondoljuk, hogy az összes PRRSV törzsben megtörténhet a 7ap átírása.

Nukleokapszid génnel átfedő alternatív ORF-ek jelenlétét több víruscsaládban bizonyították. A *Nidovirales* rendbe, a *Betacoronavirus* nemzetségbe sorolt SARS vírus, szarvasmarha koronavírus és egér hepatitisz vírus (MHV) nukleokapszid génjében is találtak olyan alternatív ORF-et, amelyről fehérje íródik át.

A PRRSV 7ap biokémiai jellegzetességei immunszuppresszív tulajdonságra utalnak. A 7ap képes kötődni az emlős IgG Fc részéhez és gátolni a komplement aktivációt. A komplement aktiváció klasszikus útvonalának első komponense a C1q

komplex. A globuláris feje az antitest CH2 doménjéhez kötődik. Azt gondoljuk, hogy a nagyszámú arginin a 7ap-ben lehetővé teszi CH2 doménhez való kapcsolódást, így gátolva az Fc rész és C1q közti kölcsönhatást.

Több vírustörzsben (Poxviridae, Retroviridae, Herpesviridae) fedeztek fel már olyan virális fehérjéket, amelyek a komplement fehérjékkel kölcsönhatva gátolták a vírusneutralizációt. Több vírusfajban (HCV, HHV-5, MCMV) találtak Fc receptor-szerű fehérjéket, amelyek IgG Fc részéhez kötődve megakadályozta az Fc receptortól függő aktivációt. Tudomásunk szerint a PRRSV 7ap az első olyan leírt vírusfehérje, amely a komplement aktivációt az IgG Fc részhez való közvetlen kötődéssel gátolta.

A 7ap nemcsak ellenanyagot köt, hanem a nukleinsavakkal is képes kölcsönhatásba lépni. A többszörös pozitív töltés hordozása nem magyarázza a nukleinsav kötő tulajdonságát, mivel több olyan bázikus fehérje létezik, amely pozitív töltései ellenére sem kötődik nukleinsavhoz. Azt gondoljuk, hogy a 7ap fehérje nukleinsav kötő képessége a funkciójának következménye, és nem a pozitív töltéséből eredő járulékos tulajdonság. Elméletünket az is támogatja, hogy két egymástól eltérő aminosav szekvenciájú 7ap

peptid is rendelkezett erős duplaszálú DNS és RNS kötő tulajdonsággal.

A 7ap lokalizációból több lehetséges funkciót lehet feltételezni. Ám azt is elképzelhetőnek tartjuk, hogy a sejtmagból a sejtplazmába kerülve kölcsönhatásba lép mRNS-ekkel és befolyásolja a fehérjék transzlációját. A nukleinsavakon kívül a sejtben található fehérjékkel való kölcsönhatást sem lehet kizárni. A legtöbb fehérje sejtben belül negatív töltéssel rendelkezik. A HIV-1-ben a Tat egy transzkripciót befolyásoló nukleinsav kötő fehérje, amely a 7ap-hez hasonlóan rövid és bázikus. Újabb kutatások megállapították, hogy nemcsak nukleinsav kötő tulajdonsággal rendelkezik, hanem egy argininben különösen gazdag résznek köszönhetően a citoplazmában található I κ B- α fehérjéhez is képes kötődni.

A Hu7ap-vel immunizált állatok szérumában nem mutattunk ki 7ap-vel szemben specifikusan termelődő ellenanyagot. Az eredmény nem volt teljesen váratlan, mivel az immunizáció kisméretű virális fehérjék ellen gyakran jár sikertelenül. A szérumok tesztelése során az összes immunizált állat vérsavójából sejtmag elleni autoantitesteket mutattunk ki, PRRSV fertőzés után autoantitesteket jelenlétét már korábban is leírták.

Feltételezésünk szerint a 7ap idézheti elő, vagy legalábbis részben felelős lehet az autoantigének elleni immuntolerancia meggyengüléséért. Az egészséges szervezetben több olyan mechanizmus található, amely megakadályozza az autoantigének elleni immunreakció kialakulását. Egyik lehetséges magyarázat ennek sérülésére és a sejtmag ellenes autoantitestek megjelenésére, hogy a Hu7ap önmagában nem immunogén, de hozzákötődik a fertőzés során elpusztult sejtekből, vagy az immunizáció esetén a mechanikai sérülés, és az adjuváns okozta nekrozis, apoptózis során kiszabadult DNS-hez és nukleoproteinekhez. Ha elpusztult sejtek maradványait a belső tisztító mechanizmust közvetítő szérumban amyloid P és C reaktív protein valami miatt nem tudja eltávolítani, például a Hu7ap hozzájuk kötődött, akkor lehetséges lesz az autoreaktív B-sejtek aktiválódása.

6. Új tudományos eredmények

1. Meghatároztuk és elemeztük a PRRSV 9625/2012 izolátum teljes genomszekvenciáját, valamint a filogenetikai helyét.
2. PRRSV-2/Hungary/102/2012 szekvenciája az első olyan 2-es genotípusú teljes genom Európában, amely nem Ingelvac MLV eredetű.
3. PRRSV-ben a GP2 és a GP3 fehérje transzmembrán doménjait ugyanazok a nukleotid szekvenciák kódolják, mint a GP3 és GP4 szignálpeptidjeit. A transzmembrán régió konzervált, ám a vele átfedő szignálpeptid minden esetben hipervariábilis.
4. Bioinformatikai módszerekkel bizonyítottuk egy új ORF jelenlétét (ORF7a) a vírus genomjában, és fúziós konstrukciókkal igazoltuk, hogy az ORF7a-ról fehérjetermék íródik le.
5. Az ORF7a egy rövid, erősen pozitív töltésű peptidet kódol (7ap). A PRRSV 1-es és 2-es genotípusából származó 7ap IgG, DNS és RNS kötő képességgel rendelkezik, a 7ap kötőhelye az IgG-n az Fc rész CH2 doménján található.

6. Az 1-es genotíusból származó 7ap fehérje az egérben és a sertésben képes sejtmag ellenes autoantitestek termelését indukálni.

Tudományos publikációk

Bálint Á, Balka G, Horváth P, Kecskeméti S, Dán Á, Farsang A, Szeredi L, Bányai K, Bartha D, Olasz F, Belák S, Zádori Z.: **Full-length genome sequence analysis of a Hungarian porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolated from a pig with severe respiratory disease**, Arch. Virol., 160. 417-422, 2015. I.F: 2,058

Balka G., Wang, X., Olasz F., Bálint Á., Kiss I., Bányai K., Rusvai M., Stadejek, T., Marthaler, D., Murtaugh, M.P., Zádori Z.: **Full genome sequence analysis of a wild, non-MLV-related type 2 Hungarian PRRSV variant isolated in Europe**, Virus Res., 200. 1-8, 2015. I.F: 2,628

Olasz F, Dénes B, Bálint Á, Magyar T, Belák S, Zádori Z.: **Immunological and biochemical characterisation of 7ap, a short protein translated from an alternative frame of ORF7 of PRRSV**, Acta Vet. Hung., 64. 273-287, 2016. I.F: 0,871

Olasz F, Dénes B, Bálint Á, Magyar T, Belák S, Zádori Z.: **Characterisation of the nucleic acid binding features of the PRRSV 7ap and its ability to induce antinuclear antibodies**, Acta Vet. Hung., 65. 124-134, 2017. I.F: 0,871

Olasz F., Bálint Á., Balka G., Kádár-Hürkecz E., Zádori Z.: **A sertés reprodukciós zavarokkal és légzőszervi tünetekkel járó szindrómája (PRRS) és a betegséget okozó vírus biológiája**, Magy. Állatorv. Lapja, 138. 523-540, 2016. I.F: 0,212

Mészáros I, Tóth R, Olasz F, Tijssen P, Zádori Z.: **The SAT protein of porcine parvovirus accelerates viral spreading through irreversible ER stress induction**, J. Virol., doi:10.1128/JVI.00627-17, 2017. I.F: 4,606

Olasz F., Kádár-Hürkecz E., Bálint Á., Lakatos B., Zádori Z.: **A macskák fertőző hashártyagyulladás (FIP) és az azt okozó vírus biológiája. Irodalmi összefoglaló**, Magy. Állatorv. Lapja, 139. 523-540, 2017. I.F: 0,212

Köszönetnyilvánítás

Elsőként szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Zádori Zoltánnak a lehetőséget, hogy doktori tanulmányaimat a témacsoportjában végezhettem a PRRSV témában. Köszönöm az Funkcionális Virologia témacsoport minden jelenlegi és volt tagjának, Mészáros Istvánnak, Tóth Renátának és Horváth Péternek a sok elméleti és gyakorlati segítséget.

Köszönettel tartozom Dr. Balka Gyulának (Állatorvostudományi Egyetem, Patológiai Tanszék) és Dr. Kecskeméti Sándornak (NÉBIH ÁDI Debrecen), hogy rendelkezésünkre bocsájtották a megfelelő mintákat, valamint Dr. Hornyák Ákosnak és Dr. Bálint Ádámnak (NÉBIH ÁDI Budapest), hogy rendelkezésünkre bocsájtották a szövetmintákból izolált vírusokat.

Hálásan köszönöm Dr. Bányai Krisztiánnak (MTA ATK ÁOTI, Új kórokozók felderítése témacsoport) és munkatársainak, Forró Barbarának és Marton Szilviának az izolátumok szekvenálásában végzett munkát, és a szekvenciák összeillesztésében nyújtott segítségüket.

Köszönet illeti Dr. Dénes Bélát (NÉBIH ÁDI Budapest) és munkatársait, hogy segítettek összeállítani a komplementkötés gátlási tesztet, és rendelkezésemre

bocsájtották az ehhez szükséges eszközöket és anyagokat.

Külön köszönettel tartozom Dr. Farkas Szilviának és Mészáros Istvánnak dolgozatom gondos átolvasásáért és hasznos tanácsaikért.

A munka anyagi háttérét az OTKA-K108607 számú pályázata biztosította.