

# **Mutáns Aujeszky-féle vírus törzsek analízise**

**PhD értekezés tézisei**

**Tóth Judit**

**Témavezető: Boldogkői Zsolt**

**Szegedi Tudományegyetem**

**Orvosi Biológiai Intézet**

**Szeged**

## 2011

### Bevezetés

Az **Aujeszky-féle vírus** (AyV) vagy más néven sertés herpeszvírus-1 (SHV-1) nevét felfedezőjéről, Aujeszky Aladár magyar állatorvosról kapta, aki 1902-ban izolálta és írta le a kórokozót.

Az AyV az Alphaherpesvirinae alcsaládba tartozó nagy, duplaszálú DNS genomú vírus, mely hasonló génelrendeződést és nagyfokú szekvencia homológiát mutat géntermékeiben a család más tagjaival, mint például a humán herpeszvírus 1 és 2 (HSV-1/2) vagy a varicella-zoster vírus (VZV).

Nem humánpatogén, valamint könnyen kezelhető volta miatt kiváló **modellorganizmus** vált, melynek segítségével az alcsalád többi tagjának megismerése is lehetőség nyílt.

A vírus életciklusából adódóan látens vagy produktív infekciót képes okozni. Lítikus infekció esetén a vírus **gének kaszkád**-szerűen íródnak le, először az azonnali korai (immediate early-IE) gének, melyek szabályozó funkciót látnak el, és beindítják a következő ún. korai (early-E) gének transzkripcióját, melyek a DNS szintézisért

felelősek. A harmadik, időben legkésőbb leíró gének a kései (late-L) gének, melyek a vírus szerkezeti elemeit kódolják. Az AyV szabályozó szerepet betöltő géneinek mutációja, valamint a fertőző vírus mennyiségének a fent említett génkaszkádra vonatkozó hatását eddig nem ismertük.

A SHV-1 látens állapotában egyetlen transzkriptum mutatható ki, a Latency Associated Transkript (LAT), mely egy az ep0 génről leíró mRNS-el komplementer, szabályozó szerepű ún. **antiszensz RNS**. Ezen transzkriptumok leíródása azonban a vírus bizonyos géneinek mutációja, illetve az alkalmazott vírusrésztartalom függvényében változik.

Munkánk folyamán kvantitatív Real-Time RT-PCR technikát alkalmaztunk, mellyel lehetőségünk nyílt kis kópiaszámban jelen lévő RNS molekulák detektálására is.

Az AyV rendelkezik azon tulajdonsággal, hogy a szinaptikus kapcsolatban lévő idegsejteket képes megfertőzni, ezért az utóbbi években a legnépszerűbb **neuronális nyomjelzővé** vált. Genomja nagyméretű DNS fragmentek befogadására és különböző sejtvonalakba juttatására képes, valamint különböző fluoreszcens

proteinek beépítésével a vírus funkcionálisan kapcsolt neuronok in vivo és in vitro jelölésére vált alkalmassá.

## **Célkitűzés:**

1. Az AyV gének expressziójának vizsgálata különböző kísérletes körülmények alkalmazásával:

- AyV antiszensz RNS-ek kinetikájának összehasonlítása kezeletlen mintákban, valamint fehérjeszintézis (cikloheximidin; CHX) és DNS replikáció gátlóval (foszfonoecetsav; PAA) kezelt PK-15 sejtek esetén

- A fertőzéskor alkalmazott vírushatóanyag hatásának vizsgálata a gének expressziójára

- *vhs* és *ep0* gének deléciós mutánsainak hatása a gének transzkripciójára

2. Rekombináns vírus törzsek készítése, melyek

- különböző érési idővel rendelkező fluoreszcens proteint, illetve aktivitás szenzort fejeznek ki, és segítségével különböző eredetű idegsejteken, szívizomsejteken végzett funkcionális vizsgálatok időtartama megállapítható

## **Módszerek**

**Vírusok, sejtek szaporítása:** Az AyV két törzsét, a vad típusú Kaplan (Ka) és az attenuált Bartha (Ba) törzseket, valamint ezek deléciós mutánsait használtuk. A vírusokat sertésvese (PK-15) sejtvonalon tartottuk fenn. A PK-15 sejteket DMEM tápoldatban, a kutya szívizomsejteket M199 tápoldatban (melyet kiegészítettünk kreatinnal, karnitinnel, taurinnal és inzulinnal) 37°C-n, 5% CO<sub>2</sub> termosztátban tartottuk fenn.

**A génexpressziós vizsgálat:** Az AyV gének transzkripcióanalízisét reverz transzkripciót követően Real-Time PCR technikával vizsgáltuk. A reverz transzkripcióhoz gén- és szál-specifikus primereket alkalmaztunk. A reakcióhoz SuperScriptIII (Invitrogen) enzimet használtunk. A Real-Time PCR reakciókat Rotor-Gene 6000 (Corbett) készülékkel végeztük. A kétszálú cDNS-eket SYBRGreen (Thermo Scientific) interkalálódó festékkel mutattuk ki. Adataink kiértékeléséhez a relatív expressziós arányt (R; relatív kópiaszám) használtuk, mely révén megállapíthattuk a gének expressziós kinetikáját. A gének expressziós dinamikájának összehasonlítását a Pearson-féle korrelációs koefficiens számításával.

**Rekombináns „targeting” plazmidok előállítása:** Adott plazmid, meghatározott virális DNS szekvenciát tartalmazó régiójába (mely határoló szekvenciaként szolgál) riporter fehérjét kódoló marker gént ültettünk be.

**Rekombináns vírusok előállítása:** A különböző fluoreszcens proteineket, aktivitás markereket expresszáló vírusokat a Ka-, vagy Ba vírustörzsek és rekombináns „targeting” plazmidok közötti homológ rekombinációval valósítottuk meg. A rekombináns vírusokat a riporter gén kifejeződése alapján szelektáltuk.

## Eredmények és diszkusszió

Az AyV gének expressziójának vizsgálata

Eredményeinket PAA és CHX kezelt, valamint kezeletlen minták Real-Time RT-PCR vizsgálatával megállapítottuk, hogy az AyV egyetlen IE génje az IE180 gén, mely cikloheximidin kezelést követően magas expressziós szintet mutatott, mely a saját transzkripciójának gátlásáért is felelős IE180 protein gátló hatásának hiánya miatt jött létre. A PAA kezelés alapján elmondható, hogy az egyes kinetikai osztályokba tartozó gének közé nem húzható éles határvonal, a kinetikai csoportok egy folyamatos átmenetet képeznek. Az AST és LAT antiszensz RNS-ekről megállapítottuk, hogy nem lehet kinetikai hovatartozásukat egyedül a PAA és CHX kezelés alapján megállapítani, mert egyedi expressziós kinetikát mutattak a vizsgálatok során, ami azt valószínűsíti, hogy más szabályozás is hat rájuk. Alacsony (0,1 MOI- multiplicity of infection) és magas (10 MOI) vírustiterrel való fertőzés hatását vizsgáltuk 37 génre. Megállapítottuk, hogy a gének többsége az infekció kezdeti fázisában alacsonyabb szinten fejeződtek ki a kis titer fertőzéskor, mint a nagy titer esetén, ez a trend 6 órával a fertőzést követően több mint a gének felénél megfordult.

Kimutattuk, hogy a nagy titer fertőzéskor számos gén transzkripciója 4 és 6 óra között visszaesik, mely alacsony titer esetén csak egyetlen, az *us3* gén esetében volt megfigyelhető. Megfigyeltük, hogy magas titer fertőzéskor az *IE180* gén antiszensz párja, az *AST* transzkriptum mennyisége nagymértékben visszaesik. Ez az eredmény rámutat arra a szabályozó mechanizmusra, hogy magas titer fertőzéskor a vírus lítikus ciklusba kezd, míg alacsony titer fertőzést követően a vírus dönt arról, hogy látens vagy produktív ciklusba lépje e be.

A génexpressziós analízist *ul41* (*virion host shutoff; vhs*; az endoribonukleáz aktivitású fehérjét kódolja) mutáns vírustörzsön is elvégeztük. Eredményeink azt mutatják, hogy az *ul41* gén a korai (E) génekre, ezen belül is az *ep0* génre van hatással, a VHS fehérje hiányában ezen gének transzkripció szintje megemelkedett. Ez az eredmény arra utal, hogy a VHS fehérje csökkenti az *EPO* fehérje mennyiségét, ezáltal közvetlen gátolja más E gének transzkripcióját.

Eredményeink szerint az *ep0* génre (*early protein 0*; transzaktivátor) fejti ki legerősebb gátló hatását. Feltételezzük, hogy az *ep0* gén az *ie180* génnel együtt szabályozza a gének átíródását.



Rekombináns vírus törzsek alkalmazása ideg- és szívizomsejtek funkcionális vizsgálatára

Idegpálya jelölésre valamint különböző idegen gének célba juttatására használt vírusoknak, három kritériumnak (specifikus és retrográd terjedés, valamint alacsony citotoxicitás) kell megfelelnie, melyeket a vírus genom meghatározott génjeinek kiütésével értünk el. Létrehoztunk ún. **Timer vírusokat**, melyek két különböző érési idejű fluoreszcens fehérjét kódolnak. Ezen vírusok segítségével pre- és poszt-szinaptikus neuronok elkülönítése vált lehetővé. A troponin expresszázó, ún. **Aktivitás szenzor vírusok** alkalmasnak bizonyultak a neuronok működésének vizsgálatára. A **kombinált vírusok** előbbi két vírus tulajdonságait ötvözi, mely a fertőzött sejt állapotáról, elektrofiziológiai mérések kivitelezhetőségének időintervallumáról ad információt. Aktivitás szenzort expresszázó vírusok szívizomsejtek állapotának vizsgálatára is alkalmas. Eredményeink rámutattak, hogy az általunk használt vírusok humán embrionális sejtvonalon is alkalmazhatóak.

## Köszönetnyilvánítás

Hálás vagyok témavezetőmnek, Boldogkői Zsoltnak, hogy mind anyagilag, mind szakmailag lehetőséget adott a kutatások

kivitelezéséhez, valamint támogatott a kísérletek elvégzése, valamint az adatok kiértékelése során. Köszönöm, hogy esélyt adott betekinteni az Egyetem oktatói munkájába. Emellett köszönöm a sok-sok élményt, amit Neki köszönhetek.

Szeretném megköszönni a „Boldogkői-csoport” két tagjának, Tombácz Dórának és Takács Irmának a munkáját. Köszönöm Tombácz Dórának támogatását és barátságát.

Köszönetemet szeretném kifejezni az Orvosi Biológiai Intézet összes munkatársának, akik szakmailag nyújtottak segítséget és baráti légkört teremtettek.

Hálás vagyok végül, de nem utolsósorban a német oktatásban részt vevő oktatói gárdának, hogy megismerhettem őket, és számomra megannyi önfelelt, boldog pillanatot szereztek.

A disszertáció alapját képező projektek részben szakmai együttműködés keretei között valósultak meg. Köszönetemet fejezem ki:

a Friedrich Miescher Institute (Basel, Svájc), az SZTE ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet (Szeged), a SZTE ÁOK Szemészeti Klinika, Neuromorfológiai Laboratórium és az MTA-SE Neuromorfológiai, Neuroendokrin Kutató Laboratórium (Budapest) munkatársainak.

Az értekezés alapját képező kísérletek a Magyar Tudományos Kutatási alapból (OTKA T049171), nemzetközi pályázati forrásból: a Human Frontiers Science Program Young Investigator Grant (RGY0073/2006), és az SZTE ÁOK PhD Hallgatói Képzési Program anyagi támogatásával készültek.

## **A tézis alapjául szolgáló közlemények**

I. **Tóth JS**, Tombácz D, Takács IF, Boldogkői Z: The effects of viral load on pseudorabies virus gene expression. BMC Microbiol 2010, **IF: 2,890**

II. Tombácz D, **Tóth JS**, Boldogkői Z: The Virion Host Shutoff Gene of Pseudorabies Virus Plays a Critical Role in the Transition from the Early to Late Phase of Viral Infection *submitted for publication*

III. Márton G, Tombácz D, **Tóth JS**, Szabó A, Boldogkői Z, Dénes Á, Hornyák Á, Nógrádi A: Ex vivo infection of human embryonic spinal cord neurons prior to transplantation into adult mouse cord. *BMC Neurosci* 2010, 11:65. **IF: 2,744**

IV. Tombácz D, **Tóth JS**, Petrovszki P, Boldogkői, Z: Global analysis of pseudorabies virus gene expression by Real-time Quantitative RT-PCR assay. *BMC Genomics* 2009, 10:491 **IF: 3,759**

V. Boldogkői Z, Bálint K, Awatramani GB, Balya D, Busskamp V, Viney TJ, Lagali PS, Duebel J, Pásti E, Tombácz D, **Tóth JS**, Takács IF, Scherf BG, Roska B: Genetically timed, Activity sensor and Rainbow transsynaptic viral tools. *Nature Methods* 2009, 6, 127 – 130 **IF: 16,874**

VI. Prorok J, Kovács PP, Kristóf AA, Nagy N, Tombácz D, **Tóth SJ**, Ördög B, Jost N, Virágh L, Papp GJ, Varró A, Tóth A,

Boldogkői Z: Herpesvirus-mediated delivery of a genetically encoded fluorescent Ca<sup>2+</sup> sensor to primary adult canine cardiomyocytes. *J Biomedicine and Biotechnology* 2009, 361795  
**IF: 1,750**

VII. Tóth IE, Banczerowski P, Boldogkői Z, **Tóth JS**, Szabó A, Gerendai I: Cerebral neurones involved in the innervation of both the adrenal gland and the ovary: a double viral tracing study. *Brain Res Bull* 2008, 77, 306-311 **IF: 2,184**

**Cummulative impact factor: 30,201**