

Az Aujeszky-féle vírus gének funkcionális analízise

PhD értekezés tézisei

Tombácz Dóra

Témavezető: Boldogkői Zsolt

**Szegedi Tudományegyetem
Orvosi Biológiai Intézet**

Szeged

2010

BEVEZETÉS

Az Aujeszky-féle vírus (AyV), az α -herpeszvírusok alcsaládjába tartozó, a sertések Aujeszky-féle betegségét okozó duplaszálú DNS vírus. A herpeszvírusok széleskörűen alkalmazott modellorganizmusa, „élő”, neuronális nyomjelzőként alkalmazzák idegpályák jelölésére és idegsejtek aktivitásának vizsgálatára.

Az α -herpeszvírusok életciklusa elsősorban a transzkripció szintjén szabályozott: először a szabályozó gének (IE; azonnali korai) íródnak le, amelyet a DNS szintézisben szerepet játszó E (korai) gének transzkripciója követ. Végül, a vírus szerkezeti elemeit kódoló L (kései) gének kifejeződése következik. A 70 AyV gén kinetikai osztályokba sorolása korántsem teljes, a gének több mint felét a rokon HSV gének alapján sorolták valamely csoportba.

A herpeszvírus genom alapvető sajátága, hogy a gének gyakran átfedő (*nested*) elrendeződésűek, a transzkriptumok 3' ko-terminálisban végződnek. Emellett jellemzőek a konvergensen, illetve a divergensen elrendeződő géncsoportok.

Az antiszensz RNS-ek a mRNS-sel komplementer, fehérjét nem kódoló, szabályozó RNS-ek. A neurotróp herpeszvírusoknál ismert, hogy látens állapotban, az ún. LAT (*Latency associated transcripts*) antiszensz RNS fejeződik ki, azonban a teljes genomot érintő cis-

antiszensz RNS transzkripcióról mostanáig nincsenek adatok. A β -herpeszvírusok alsaládját képviselő human cytomegalovirussal végzett kutatások azt bizonyítják, hogy a herpeszvírusoknál, sok gén antiszensz száláról is folyik transzkripció.

A Real-Time RT-PCR egy rendkívül érzékeny technika, mely lehetővé teszi, hogy rendkívül kevés kópiaszámú mRNS-t is detektálhassunk. Az α -herpeszvírus gének kinetikai osztályainak megállapítása mostanáig a hagyományos (Northern-, és Western-blot), illetve az alacsony kópiaszámú mRNS-ek detekciójára kevésbé alkalmas microarray módszerekkel történt. A Real-Time RT-PCR technikát csak két távoli rokon vírus (HHV-6B, RMR) esetében használták.

Az utóbbi években **az AyV a legnépszerűbb neuronális nyomjelzővé** vált, köszönhetően azon tulajdonságainak, hogy képes a szinaptikus kapcsolatban álló idegsejteket megfertőzni, illetve, hogy örökítő anyaga nagyméretű idegen DNS befogadására alkalmas. A fluoreszcens fehérjét kifejező AyV alkalmas eszköz a funkcionálisan kapcsolt idegsejtek jelölésére *in vivo* és *in vitro* egyaránt.

CÉLKITŰZÉSEK

(1) Az AyV gének funkcionális analízise

- a 70 AyV gén kinetikai osztályainak megállapítása és expressziós dinamikájuk összehasonlítása kezeletlen mintákban, valamint fehérjeszintézis (cikloheximidin; CHX) és DNS replikáció gátlóval (foszfonoecetsav; PAA) kezelt PK-15 sejtek esetén
- a teljes AyV genom antiszensz transzkripciójának vizsgálata

(2) Egyedi AyV gének funkciójának vizsgálata génkiütött (knock-out) vírusokban

- az *ul41* gén hatása a többi gén expressziójára
- egyedi AyV gének a vírus terjedési sajátosságaira kifejtett hatásának vizsgálata

(3) Transzgénikus vírusok fejlesztése, melyek

- aktivitás szenzort fejeznek ki, mellyel, az egymással kapcsolatban álló idegsejtek aktivitását vizsgálhatjuk
- különböző színű fluoreszcens fehérjéket kódolnak, s így alkalmasak a különböző agyi területek elkülönítésére
- alkalmasak szívizomsejtek funkcionális vizsgálatára

MÓDSZEREK

Vírusok, sejtek szaporítása: A különböző projektekhez az AyV két törzsét, a Kaplan (Ka) és az attenuált Bartha (Ba) törzseket és ezek knock-out 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% CO₂ termosztátban tartottuk fenn.

A gének kifejeződésének vizsgálata: Az AyV gének expressziós analízisét reverz transzkripciót követő Real-Time PCR technikával valósítottuk meg. A reverz transzkripcióhoz gén- és szál-specifikus primereket használtunk a nagyobb specifitás és az antiszensz transzkriptumok detektálása érdekében. A reakcióhoz SuperScriptIII (Invitrogen) enzimet használtunk. A Real-Time PCR reakciókat Rotor-Gene 6000 (Corbett) készülékben végeztük. A kétszálú cDNS-eket SYBRGreen (Thermo Scientific) interkalálódó festék alkalmazásával mutattuk ki. A relatív expressziós arányt (R; relatív kópiaszám) egy új módszerrel határoztuk meg, mely révén megállapíthattuk a gének expressziós kinetikáját. Egy olyan Real-Time RT-PCR-on alapuló módszert dolgoztunk ki, mellyel (a hagyományos PAA és CHX kezelés mellett) a vírusgének kinetikai

osztályozása kezeletlen minták esetén is lehetővé vált. A gének expressziós dinamikájának összehasonlítását a Pearson-féle korrelációs koefficiens számításával és hierarchikus klaszterezéssel (Cluster 3.0 szoftver) végeztük, s Java TreeView programmal ábráztuk.

Fluoreszcens protein (FP) expresszáló AyV-alapú amplicon előállítása: A vírus replikációs origóját (*OriS*) és csomagoló és pakoló (*pac*) régióit, valamint egy fluoreszcens fehérje expresszáló kazettát építettünk be a pKS plazmidba.

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

Rekombináns vírusok előállítása: A különböző fluoreszcens proteineket, aktivitás markereket expresszáló vírusokat a Ka-, vagy Ba vírustörzsek és rekombináns plazmidok közötti homológ rekombinációval valósítottuk meg.

A DNS - és RNS izolálás, a DNS szekvenálás, PCR, az elektroforézis, a transzfekció, valamint a klónozás során jól ismert módszereket használtunk.

EREDMÉNYEK és DISZKUSSZIÓ

Az AyV genom expressziós analízise

A Real-Time RT-PCR technika érzékenysége, valamint az általunk kidolgozott matematikai modell használatával sikerült mind a 70 AyV gén kinetikai osztályait megállapítanunk kezeletlen minták esetén. Eredményeinket PAA és CHX kezelt minták expressziós analízisével is megerősítettük. Megállapítottuk, hogy az AyV egyetlen IE génje az *ie180*. Eredményeink alapján elmondható, hogy az egyes kinetikai osztályokba tartozó gének közé nem húzható éles határvonal, a kinetikai csoportok egy folyamatos átmenetet képeznek, a gének IE, E és L osztályokba sorolása valójában egy túlzott leegyszerűsítés. A Pearson-féle korrelációs koefficiens alkalmazva a géneket tíz csoportba osztottuk, melyek megfeleltethetők a hierarchikus klaszterezéssel kapott eredményeknek. Az LLT1 és LLT2 antiszensz RNS-ekről megállapítottuk, hogy expressziós dinamikájuk a velük komplementer mRNS-ekhez (EP0 és IE180) képest ellentétes. Az AyV minden génjénél detektáltunk kisebb-nagyobb mértékű antiszensz expressziót. Kimutattuk, hogy bizonyos genomi régiókban jelentős, akár a mRNS mértékét is meghaladó az antiszensz RNS-ek képződése. Azt tapasztaltuk, hogy a *nested* gének

azonos, míg a konvergens gének ellenkező (E és L) kinetikai osztályokba sorolhatók. Úgy véljük, hogy a DNS egyik száláról történő transzkripció negatív hatással van a másik szálról való leíródásra, s e szabályozás hátterében a transzkripció túlíródása (read-through) áll, s az antiszensz RNS-ek tk. e mechanizmus eredményei. Adataink alapján javasoljuk a libikóka (Seesaw) hipotézist, mely azt állítja, hogy a konvergens géncsoportok tagjai a transzkripció folyamán a gén átírását követően tovább folytatják az RNS szintézist, s ezen a módon szinkronizálják a géncsoportok átíródását. A génexpressziós analízist *ul41* (*virion host shutoff*; *vhs*; az endoribonukleáz aktivitású VHS fehérjét kódolja) mutáns vírustörzsön is elvégeztük. Eredményeink azt mutatják, hogy az *ul41* gén a fertőzés korai szakaszában (1 órával a fertőzést követően) nincs hatással a vírusgének expressziójára, később azonban jelentős mértékben gátolja azt. Eredményeink szerint az *ep0* génre (*early protein 0*; transzaktivátor) fejt ki legerősebb gátló hatását. Feltételezzük, hogy a *vhs* az *ep0* szabályozása révén közvetetten fejt ki hatását a többi vírusgénre.

A gE és gI gének hatása a vírus terjedési tulajdonságaira: A gE és gI glükoproteinek által alkotott heterodimer komplex a vírus anterográd irányú terjedéséért felel, a gE és gI gének kiütésével kapott mutáns vírusok kizárólag retrográd módon terjednek.

A TK gén hatása (a DNS szintézisben szerepet játszó *timidin kináz* enzimet kódolja): Az idegsejtek Δ TK vírussal való fertőzés hatására megőrzik fiziológiai tulajdonságaikat, mely azt jelzi, hogy a Δ TK-vírus avirulens.

Az rr és az ep0 génekben valamint az ASP régióban bekövetkező mutáció hatása a vírus működésére (rr: a DNS szintézisben szerepet játszó *ribonukleotid reduktáz* enzimet kódolja; ASP: *antiszensz promóter*): A Δ rr, Δ ep0 vírusok kevésbé virulensek, mint a vad típusú Ka vírustörzs, ezek együttes mutációja egy olyan attenuált törzset eredményezett, mely „megerősítve” az ASP régióban kivitelezett mutációval, alkalmas szívizomsejtekbe való génbevételre.

Rekombináns vírusok használata idegpályák jelölésére, ideg-és szívizomsejtek működésének vizsgálatára: A Δ TK vírusok, valamint úgynevezett AyV-alapú *amplikonok* használatával olyan 4-komponensű rendszert dolgoztunk ki, mely a preszinaptikus neuronok jelölésére alkalmas. Az idegsejteket egy ún. „DNS-koktéllal” transzfektáltuk: FP-t kifejező amplikonnal, egy másik szint kódoló plazmiddal, TK-expressziós kazettát tartalmazó plazmiddal és Δ TK vírussal. A Δ TK-vírus az úgynevezett posztmitotikus (nem-osztódó) sejtekben, pl. idegsejtekben nem képes replikálódni, a TK enzimet a TK expressziós kazettát hordozó

plazmid szolgáltatja, mely azonban nem terjed a vírussal, s így a következő sejtben a vírus replikációja abbamarad. A különböző agyi régiók megkülönböztetésre ún. **Rainbow vírusok**at fejlesztettünk ki, melyek számos, különböző színű FP-t fejeznek ki. A **Timer vírusok** két, különböző színű FP-t (piros és zöld) fejeznek ki. A piros FP a fertőzés korai fázisában detektálható, a zöld pedig később s így a fertőzés idejéről és a fertőzött sejt állapotáról ad információt. A troponin expresszázó, ún. **Aktivitás szenzor vírusok** alkalmasnak bizonyultak a neuronok és szívizomsejtek működésének vizsgálatára.

ÖSSZEFOGLALÁS

GÉNEXPRESSZIÓS ANALÍZIS

1. Egy új, az α -herpeszvírusok globális expressziós vizsgálatához és az AyV gének kinetikai osztályozásához, még nem alkalmazott, reverz transzkripciót követő Real-Time PCR technikát dolgoztunk ki és alkalmaztunk. **2.** Új matematikai modellt dolgoztunk ki, melynek révén meghatároztuk az egyes gének relatív expressziós arányát (relatív kópiaszámát), s mely lehetővé tette, hogy a 70 AyV gén expressziós dinamikáját meghatározzuk. **3.** A módszer alkalmasnak bizonyult knock-out vírusok transzkripció analízisére és a teljes vírusgenomról leíródo antiszensz RNS-ek detektálására is. **4.** A modell alkalmazható bármely ehhez hasonló, időben trendszerűen változó rendszer génexpressziós analízisére

VIRÁLIS NYOMJELZÉS

1. Olyan, AyV-alapú, aktivitás szenzort kifejező vírusokat fejlesztettünk, melyek a szinaptikus kapcsolatban álló idegsejteket jelölik meg, s adnak információt a neuronok aktivitásáról. **2.** A Timer vírusok két különböző színű FP-t expresszálnak egymáshoz képest időben késleltetett módon, s így fertőzés stádiumáról adnak információt. **3.** Olyan, úgynevezett Rainbow vírusokat fejlesztettünk, melyek a különböző agyi területek, ill. agyi magvak finomszerkezetének térképezésére alkalmasak. **4.** Mutáns Ka és a Ba vírustörzsekkel olyan rendszert dolgoztunk ki, mely alkalmas a fertőzött idegsejttel egyetlen szinapszis távolságra lévő neuronok detektálására. **5.** A piros fluoreszcens fehérjét expresszáló Ba vírustörzs és egy korábban leírt, zöld fluoreszcens proteint kódoló vírus kombinált használata alkalmas eszköznek bizonyult meghatározott agyi területek elkülönítésére.

AYV-ALAPÚ GÉNBEVITEL SZÍVIZOMSEJTEKBE

Olyan AyV-alapú génbeviteli rendszert dolgoztunk ki, mely alkalmas szívizomsejtekbe való transzgének bevitelre úgy, hogy a szívizomsejtek megtartják normális elektrofiziológiai és morfológiai sajátágaikat.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném kifejezni köszönetemet témavezetőmnek, Prof. Dr. Boldogkői Zsoltnak a folyamatos szakmai támogatásáért, segítségéért és a baráti hangulatért.

Köszönettel tartozom a „Boldogkői-csoport” egykori és jelenlegi tagjainak: Tóth Juditnak, Petrovszki Pálnak, Ördög Balázsnak és Takács Irmának a közös munkáért.

Köszönöm a segítőkészségét Szilágyiné Teleki Gabriellának, Révész Andrásnének, Kisapáti Edénének, Magyarné Papdi Csillának és az Orvosi Biológiai Intézet összes munkatársának.

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 Medical School, University of Birmingham (Birmingham, UK), és
az MTA-SE Neuromorfológiai és 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. Tombácz D, Tóth JS, Petrovszki P, Boldogkői, Z: Whole-genome analysis of pseudorabies virus gene expression by real-time quantitative RT-PCR assay. *BMC Genomics* 2009, 10:491. **IF:** 3.926

II. 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:** 13.651

III. 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 Ca²⁺ sensor to primary adult canine cardiomyocytes. *J Biomed Biotech* 2009, 361795. **IF:** 2.563

IV. Rezek Ö, Boldogkői Z, **Tombácz D**, Kővágó C, Gerendai I, Palkovits M, Tóth IE: Location of parotid preganglionic neurons in the inferior salivatory nucleus and its relation to the superior

salivatory nucleus of rat. Transneuronal labeling by pseudorabies viruses. *Neurosci Lett* 2008, 440(3): 265-269. **IF: 2.200**

FÜGGETLEN KÖZLEMÉNY

I. Márton G, Tombácz D, Tóth JS, Szabó A, Boldogkői Z, Dénes, Á, Hornyák Á, Nógrádi A: *vivo* infection of human embryonic spinal cord neurons prior to transplantation into adult mouse cord, *BMC Neuroscience* 2010, *conditionally accepted for publication* **IF: 2.850**

KUMULATÍV IF: 25.190