

A Pseudorabies vírus transzkriptom
vizsgálata: a virális gének szelektíven
szabályozódnak

Ph.D. értekezés tézisei

Póka Nándor

Biokémia, Biofizika, Molekuláris és sejtbiológia
doktori program

Szegedi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar Orvosi Biológiai
Intézet

Szakvezető: Prof. Dr. Boldogkői Zsolt

Szeged, 2017

Bevezetés

A Pseudorabies vírus (taxonómiai nevén: Suid herpes virus I – SuHV-I) a Herpesvírusok családján belül az alfa-herpeszvírusok közé tartozik. Először 1902-ben Ajueszky Aladár magyar állatorvos írta le (Ajueszky, 1902). A vírus a sertések egyik kórokozója, amely komoly gazdasági károkat képes okozni. Emellett közeli rokonságot mutat a humán herpeszvírusokkal, valamint természetes módon képes szinaptikusan összekapcsolt neuronokat fertőzni (anterográd irányban), így kiválóan alkalmazható neuronhálózatok feltérképezésére és neuronok aktivitásának mérésére (Boldogkoi *et al.*, 2009). A vírus életciklusát egy precíz transzkripciókaskád irányítja, melyhez a génekifejeződés pontos időbeli szabályozására van szükség. A géneket annak függvényében, hogy a fertőzés után mikor a legmagasabb az expressziójuk, 4 (korábban 3) osztályba soroljuk (ún. kinetikai osztályok): azonnal kifejeződő (immediate early – IE), korai (early – E), átmeneti (early-late – E/L) illetve kései (late – L). Kutatásunk célja a vírus transzkriptomjának és a virális génextpresszió szabályozásának pontosabb megismerése volt.

Kutatásunk célkitűzései

1. Hogyan befolyásolja az us1 gén kiütése a globális géneexpresszió szinteket?
2. Újgenerációs szekvenálási módszerekkel (NGS) a transzkriptom minél pontosabb feltérképezése.
3. Miként hat a gE/gI heterodimer fehérjekomplex (us8/us7 gének) kiütése a globális géneexpressziós szintekre?

Anyagok és módszertan

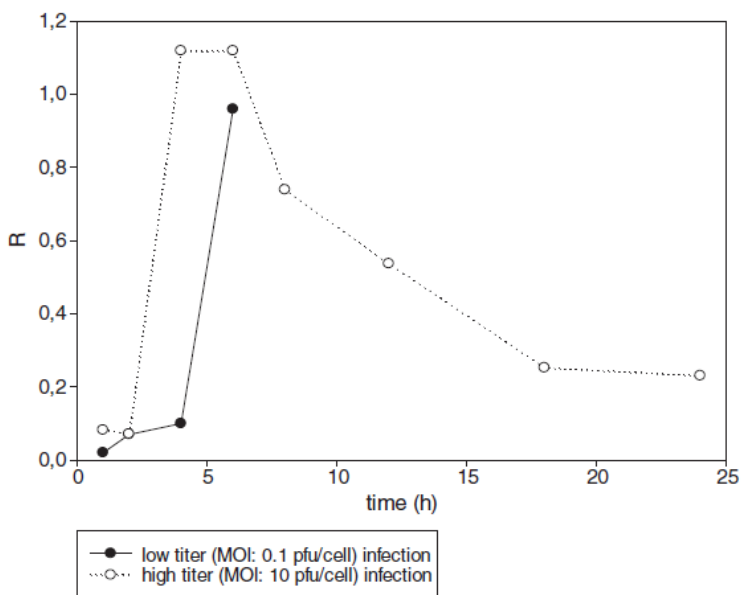
Kutatásunkhoz a PRV Kaplan törzsét használtuk. Kísérleteink során minden esetben PK-15 sertés vese epitheliális sejteket használtunk gazdasejtként. Táptalajnak DMEM-t használtunk 5% FBS és 80ug/ml gentamicinnel kiegészítve. Az inkubálást 37 °C-on 5% CO₂ mellett végeztük.

A kísérletekben használt mutáns vírus törzseket a molekuláris biológia bevett eszköztárát (restrikciós emésztés, molekuláris klónozás, kotranszfekeció) alkalmazva hoztuk létre.

A géneexpresszió időbeli változásának nyomon követésére a mutáns törzsekkel történt fertőzéseket az következő időpontokban szakítottuk meg: 0.5 (csak az US1-nél), 1, 2, 4, 6, 8, 12, 18 és 24 h. A munkánk során 3 biológiai párhuzamost használtunk.

A génexpressziót vizsgálatát reverz-transzkripcióval kapcsolt real-time PCR segítségével végeztük el, amelyhez a mintákból a szükséges RNS-t NucleoSpin RNA II Kit használatával vontuk ki, a gyártó előírásainak megfelelően. A reverz-transzkripciót SuperScript III enzimmal végeztük, míg a real-time PCR-hoz Absolute QPCR SYBR Green Mix-et, valamint Corbett Roto-Gene 6000-es gépet alkalmaztunk.

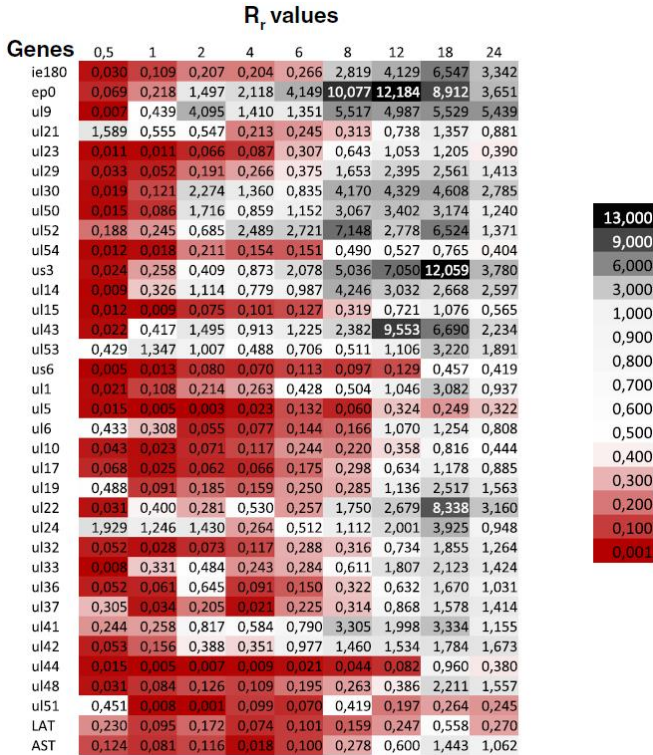
A szekvenálási kísérletünkhöz két külön cDNS könyvtárat készítettünk: random hexamer primer alapú totál RNS könyvtárat a 100 bp-os paired end szekvenáláshoz, valamint egyedi oligoT10(VN) horgonnyal ellátott primereken alapuló könyvtárat a polyA-szekvenáláshoz. A szekvenálást külső partner végezte Illumina HiScanSQ platformon. Az adatfeldolgozást a bioinformatikában általánosan használatos szoftverekkel végeztük (FastQC, Tophat, HOMER, Bowtie 2, IGV v2.2), valamint az aktuálisan elérhető referencia genomokat használtuk. Az génexpressziós adatok kiértékeléséhez a relatív expresszió arányát mérő ún. R-értéket és ennek további származtatott variánsait használtuk.



1. ábra. A us1 gén expressziós kinetikája kis (0,1 pfu/sejt) és nagy (10 pfu/sejt) titerű fertőzések esetén vad típusú vírusban. Kis titer esetén 6-8 óra után másodlagos fertőzés lép fel az újonnan termelődött vírusrészecskék által, amelyek jelentősen torzítják az expressziós adatokat, így kis titerű fertőzésnél csak az első 6 óra adatait lehet felhasználni. Hasonló titerfüggő expressziós kinetikát más gének esetében eddig nem tapasztaltunk.

Eredményeink

- Az us1 mutáns vírus kis és nagy titerű (0,1 és 10 pfu/sejt – pfu = plaque forming unit, plakk formáló egység) fertőzésének összehasonlítása során megfigyeltük, hogy kis titer esetén a génkifejeződés felfutása és maximuma mintegy két órával későbbre tolódik a nagy titerű fertőzéshez képest. (1. ábra)

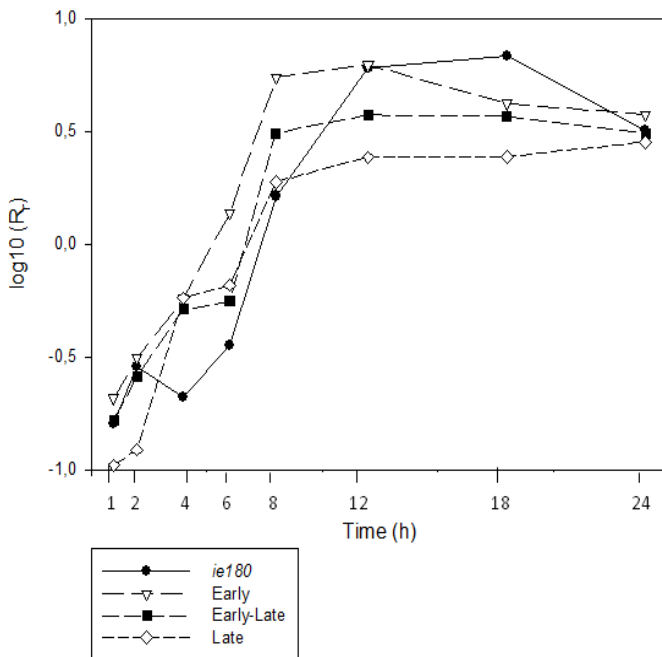


2. ábra. Az us1 kísérletben vizsgált gének mutánsban és vad típusban mért expressziójának az arányainak heat-map szerű ábrázolása. A vörös szín árnyalatai jelzik, ha a mutánsban az adott gén expressziója az adott időpontban elmarad a vad típusétól, a fehér az azonos mennyiséget jelöli, míg a szürke és árnyalatai a vad típust meghaladó expressziót jelzik. Jól látható, hogy az E osztály génei túltermelődnek a vad típushoz képest a fertőzés 6. órája után.

- Az us1 mutánsban IE, E és E/L osztályok génjeinek átlagos expressziója a fertőzés 6. órája után meghaladja a vad típus hasonló értékeit, szemben a L osztály génjeivel, amelyek átlagos relatív expressziója a 18 órás minta kivételével

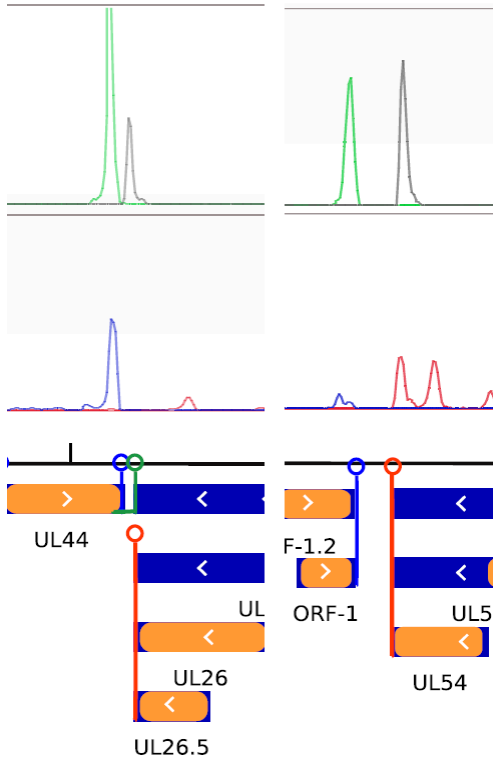
végig a vad típus értékei alatt marad (2. ábra).

- Az us7/us8 mutáns esetében a fertőzés korai szakaszában az átlagos génexpresszió minden kinetikai osztály esetén alacsonyabb a vad típushoz képest, ugyanakkor a fertőzés előrehaladtával ennek fordítottja figyelhető meg. A legnagyobb overexpresszió az ep0-nál figyelhető meg (majd 24-szeres túlermelődés) (3. ábra).
- Az us7/us8 deléció a L osztály génjeire hat a legjobban a fertőzés első óráiban, később viszont az IE és E osztály génjei a leginkább érintettek.
- Az us7/us8 mutáns vírusban az egyes génosztályok dinamikája is eltérést mutat a vad típushoz képest, kivéve az L osztály génjeit. (3. ábra).
- Az us7/us8 mutánsban a korábban megfigyelthez hasonlóan az ie180 gén expressziója erősen korrelál a többi gén expressziójával – Pearson korreláció r értékei: $r=0,330$ a vad típusnál, és $r=0,893$ a mutánsnál.
- RNS szekvenálással kimutattuk, hogy a vírus majd minden génje aktívan átíródik. A rövid intergenikus repeat régiók kettő kivételével nem voltak aktívak. A két kivételt az ul44-ul26 és az ul35-ul36 gének közötti szakaszok jelentik, ahol transzkripciós túlírás figyelhető meg. (4. ábra).



2. ábra. Az us7/us8 mutáns vírus génoztályainak R_r értékeinek 10-es alapú logaritmusra $R_r = R_{\text{mutáns}} / R_{\text{vad típus}}$. Az R_r esetén az 1-nél nagyobb szám túltermelődést, az 1-nél kisebb szám pedig alultermelődést jelent a mutánsban a vad típushoz képest.

- Kimutattunk egy új nem-kódoló RNS-t, a CTO-t.
- Az elméletben megjósolt ORF1.2 szekvenciát is sikerült kimutatnunk, de a pontos transzkripció startot nem sikerült megállapítani.



3. ábra Példa a transzkripció túlírásra
 Jelmagyarázat: narancs: kódoló régiók, kék: transzkriptumok, kék körök: polyA hely + szálon, piros kör: polyA hely a - szálon, zöld kör: alternatív polyA hely a + szálon. Középen és felül, lefedettség/bp, felül: PA-szekvenálás, zöld: + szál lefedettsége, fekete: - szál lefedettsége, középen: totál RNS szekvenálás, kék: + szál lefedettsége, vörös: - szál lefedettsége.

Következtetések

Az us1 gén titerfüggő expresszióját korábban nem publikálták. Közel rokon vírusokban mutattak már ki hasonló jelenséget és hogy az us1 génről több RNS is átíródhat (Holden *et al.*, 1992), ugyanakkor a szekvenálás során nem találtunk új, ebből a régióból származó RNS-t, így ennek a jelenségnek az oka egyelőre ismeretlen. Az eredmények arra engednek következtetni, hogy az us1 által kódolt ICP22 fehérje serkenti globális génexpressziót a fertőzés korai szakaszában. A génexpresszió serkentése közvetlen a virális promoterekre hatva vagy azon gazdagének gátlásán keresztül is megvalósulhat, amelyek terméke megemésztené a virális RNS-eket. HSV-1-ben már kimutatták, hogy az ICP22 képes kölcsönhatásba lépni ciklin-dependens kinázokkal, s ezen keresztül képes gátolni a gazdasejt génjeinek kifejeződését. Mindkét mechanizmushoz szükséges, hogy a fehérje jelen legyen a fertőzés korai szakaszában, és ennek megfelelően kimutatták, hogy az ICP22 megtalálható a vírus tegumentjében (Kramer *et al.*, 2011), így a vírus nucleo-kapszidjával együtt bejut a fertőzött sejtbe.

A gE/gI heterodimer génszabályozásban játszott szerepe eddig nem igazán volt ismeretes. A mutáns vírusban az ep0 gén (a vírus egyik transzkripciósfaktora, amelynek szerepe

lehet a génextpresszió szinkronizálásában is (Tombác, Tóth and Boldogkői, 2012)) jelentős overexpressziója és a tény, hogy az ie180 (a PRV fő transzaktivátora) kifejeződése nagyban korrelál többi gén expressziójával, megmagyarázhatja, hogy bár az egyes génosztályok kifejeződésének mértéke jelentősen eltér, a fertőzés alatt mutatott dinamikájuk azonban mégis nagyon hasonló. Az elméletünk szerint a gE/gI heterodimer egy eddig még nem ismert hatást gyakorol az ep0 transzkripciójára, amely cserébe befolyásolja az ie80 és/vagy más gének aktivitását. Mivel az us7/us8 mutánsokról tudjuk, hogy a DNS-replikációjuk nem sérült, és az eredményeink sem mutatnak ebben eltérést, ezért azt feltételezzük, hogy nem a DNS-replikáció változásai okozzák az us7/us8 mutáns vírusban tapasztaltakat.

A transzkriptom szekvenálás során kimutatott új nem-kódoló RNS funkciója egyelőre ismeretlen, de figyelemre méltó, hogy igen nagy mennyiségben volt jelent a mintánkban. További vizsgálatok szükségesek a funkció és a pontos kinetika megismeréséhez. A transzkripciós túlírás kimutatása két génpár esetében szintén fontos bizonyíték lehet a transzkripciós interferencia hálózat elméletének alátámasztására. A szekvenálás azt is megmutatta, hogy az általunk használt törzsben nincsenek új, a laborkörnyezet által indukált mutációk,

így ezek nem okozhatták az általunk tapasztaltakat.

Összefoglalás

Kutatásunk főbb eredményei az alábbi pontokban összegezhetők:

- Az us1 gén expressziója függ a fertőzés titerétől
- Az us1 gén deléciója eltérően befolyásolja az egyes kinetikai osztályokba tartozó géneket
- A fertőzés késő szakaszában minden kinetikai osztályban magasabb volt az átlagos génexpresszió az us7/us8 mutáns vírusban a vad típushoz képest
- Az us7/us8 gén pár deléciója eltérően hat a különböző kinetikai osztályokra
- Az us7us8 mutáns vírusban az iel80 gén expressziója korrelál a többi gén expressziójával
- A PRV transzkriptom nagy felbontású profiljának rövid összegzése (ezen eredmények részletes bemutatása egy másik doktori disszertáció részét képezi).

Irodalmi hivatkozások

Ajueszky, A. (1902) “A contagious disease, not readily distinguishable from rabies, with unknown origin,” *Veterinarius*, 12, pp. 387–396.

Boldogkoi, Z. *et al.* (2009) “Genetically timed, activity-sensor and rainbow transsynaptic viral tools.,” *Nature methods*, 6(2), pp. 127–30.

Holden, V. R. *et al.* (1992) “ICP22 homolog of equine herpesvirus 1: expression from early and late promoters.,” *Journal of virology*. American Society for Microbiology (ASM), 66(2), pp. 664–73.

Kramer, T. *et al.* (2011) “Proteomic Characterization of Pseudorabies Virus Extracellular Virions,” *Journal of Virology*, 85(13), pp. 6427–6441.

Tombácz, D., Tóth, J. S. and Boldogkői, Z. (2012) “Effects of deletion of the early protein 0 gene of pseudorabies virus on the overall viral gene expression,” *Gene*, 493(2), pp. 235–242.

A disszertáció alapját képező cikkek

I. Takács, I.F., Tombácz, D., Berta, B., Prazsák, I., **Póka, N.**, and Boldogkői, Zs., 2013. The ICP22 protein selectively modifies the transcription of different kinetic classes of pseudorabies virus genes. *BMC molecular biology*, 14, p.2. IF: 2,057

II. Oláh, P., Tombácz, D., **Póka, N.**, Csabai, Zs., Prazsák, I., and Boldogkői, Zs., 2015. Characterization of pseudorabies virus transcriptome by Illumina sequencing. *BMC Microbiology*, 15(1), p.130. IF: 2,96

III. **Póka, N.**, Csabai, Zs., Pásti, E., Tombácz, D., and Boldogkői, Zs., 2017. Deletion of the us7 and us8 genes of pseudorabies virus exerts a differential effect on the expression of early and late viral genes. *Virus Genes*, pp.1–10. IF: 1,431

Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezem ki Boldogkői Zsoltnak a témavezetésért és hogy segített eljutnom idáig. Az itt bemutatott eredmények mindegyike csoportos munka gyümölcse, amelyért szeretnék köszönetet mondani Tombácz Dórának, Csabai Zsoltnak, Oláh Péternek, és Takács Irmának. Külön köszönet illeti Duda Ernőt, Szabad Jánost, Filkor Katát és Magyarné Papdi Csillát a tanulságos beszélgetésekért és baráti segítségükért. Emellett köszönettel tartozom az Boldogkői-csoport tagjainak: Belec Istvánnak, Prazsák Istvánnak, Ábrahám Mariannak, Teleki Gabriellának, Seprényi Györgynek, és Mai Antalnak a közösen eltöltött kellemes évekért.

A kutatásokat az alábbi pályázatokból kerültek finanszírozásra:

TÁMOP-4.2.1.B- 09/1//KONV, TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0012, Swiss-Hungarian Cooperation Programme grant SH/7/2/8 és a Bolyai János Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences: 2015-18.