

**Az *us1* gén mutáció hatása a  
pseudorabies vírus génexpressziójára**

**PhD értekezés tézisei**

**Dr. Takács Irma**

**Témavezető: Prof. Boldogkői Zsolt**

**Szegedi Tudományegyetem**

**Orvosi Biológiai Intézet**

**Szeged**

**2014**

## Bevezetés

A pseudorabies vírust (PRV, más néven Aujeszky-féle vírus) 1902-ben Aujeszky Aladár állatorvos különítette el a valódi rabiéstól. A PRV a herpeszvírusok családjába, az alfa herpeszvírusok alcsaládjába tartozik. A PRV nem humán pathogén, viszont a rokonai között több embert fertőző vírus is megtalálható, ezek közül a legfontosabbak a varicella zoster és az 1- és 2- típusú herpes simplex. A hasonlóság, a széles gazdaspektruma és könnyű kezelhetősége miatt vált a herpeszvírusok modell organizmusává.

A vírus látens és litikus formában is fertőzhet, látens forma esetén sokáig bújnak meg a szervezetben, majd külső behatásra aktiválódnak, ekkor szaporodnak. Ez a fázis a litikus fázis. Örökítő anyaga kettős szálú DNS, 70 génjének átíródása kaszkádszerűen történik. Legelőször az azonnali korai gén (*ie180*) fejeződik ki, ez indítja el a többi gén expresszióját. Ezután a korai gének fejeződnek ki, melyek főleg a nukleotid metabolizmushoz és DNS

replikációhoz szükséges proteinek kódolják. A kései gének a vírus strukturális elemeit alkotó fehérjéket fejezik ki. A vírusnak 4 transzkripciót szabályozó génje van: *ie180*, *ep0*, *us1* és *ul54*. Ezek homológjai megtalálhatók az összes alfa herpeszvírusnál. Az irodalomból ismert, hogy az *ie180* nélkül a PRV nem tud szaporodni. Csoportunk megvizsgálta, hogy az *ep0* knock-out mutáció hogyan befolyásolja a PRV tulajdonságait. Eddig azonban még nem készítették *us1* és *ul54* knock-out mutánst, és így nem is térképezték fel a tulajdonságaikat. Ezért munkám során az *us1* gén funkcióját szüntettem meg, majd megvizsgáltam az így kapott vírus génexpressziós tulajdonságait, és hogy az *us1* hogyan befolyásolja a DNS replikációt.

Az utóbbi évtizedekben egyre nagyobb hangsúlyt kapott az idegrendszeri kutatás, hiszen annak ellenére, hogy a tudomány ismeri az idegrendszer anatómiai viszonyait, pontos működéséről még keveset tudunk. Nagyon fontos az egyes neuronok kapcsolatainak ismerete, amelyhez elsősorban jelölő vírusokat használunk. A két leginkább alkalmazott vírus a rabies és alfa-herpeszvírusok. Az alfa-herpeszvírusokat szenzoros neuronok vizsgálatára

használják, aminek vannak hátrányai (neuronok gyors degradációja), de ehhez alkalmazkodva, alacsony kópiaszámú vírussal fertőzve és rövid inkubációs időt alkalmazva kitűnően használhatók.

A fentebb említett vírusokba fluoreszcens proteint kódoló gének klónozásával kapunk jelölő rendszert. A legelső és széles körben alkalmazott fluoreszcens protein a zöld fluoreszcens protein (GFP), amelynek számos módosítása ismert (cián és citrin FP). Ezen kívül a piros színű DsRed is elterjedt. A GFP módosításából kapott ciánt és citrint gyakran használják fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FRET) jelenség előidézéshez, mely során az egyik bizonyos frekvenciával gerjesztett molekula átadja az energiáját a másik molekulának, azaz gerjeszti, így az egy másik hullámhosszú fényt bocsát ki. Ez csak bizonyos fizikai közelség esetén valósul meg, ehhez használhatunk troponin molekulát, amely  $\text{Ca}^{2+}$  hatására konformációt vált, így közel kerül a két fluoreszcens protein egymáshoz.

## **Célkitűzések**

Célunk volt megismerni a PRV *us1* génjének és az általa kódolt fehérjének a funkcióját, valamint a virális génextpresszióra ill. a DNS replikációra gyakorolt hatását.

Továbbá kíváncsiak voltunk, hogy az eltérő mennyiségű vírussal történő fertőzés milyen hatással van a gének kifejeződésére.

Valamint olyan rekombináns vírustörzseket szerettünk volna létrehozni, amelyekkel ki tudjuk mutatni a funkcionális kapcsolatokat, és meg tudunk határozni egy időtartamot, amelyen belül a neuronok biztonságosan vizsgálhatók, a sejtek fiziológiai állapotát megtartva. Továbbá célunk volt, hogy a neuronok aktivitását láthatóvá tudjuk tenni a  $Ca^{2+}$  szint változásának detektálásán keresztül.

## **Anyagok és módszerek**

**Állatok, sejtek, vírusok** A kísérleteket BALB/C és immunszupprimált CBA/J egértörzsekkel végeztük. Mind a rekombináns vírusok létrehozásához, mind pedig a

vírusfertőzés tulajdonságainak vizsgálatához a pseudorabies vírus Kaplan (Ka) törzsét használtuk. Sertésvese sejtvonalat (PK-15) használtunk a vírusok szaporításához és az expressziós kísérletek elvégzéséhez. A sejteket 5% CO<sub>2</sub> mellett 37 °C-os termosztátban, DMEM tápfolyadék hozzáadásával szaporítottuk.

**Rekombináns vírus előállítása** Fluoreszcens proteint kódoló expressziós kazettát tartalmazó, genetikailag módosított plazmidot használtunk a vírusok előállításához szükséges homológ rekombinációhoz. Az *us1* mutáns vírus bázissorrendjét DNS szekvenálással ellenőriztük.

**Génexpressziós vizsgálat** PK-15 sejteket fertőztünk vírusokkal, majd a fertőzést adott időpontokban (0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 18 és 24 óra múlva) leállítottuk. A sejtekből össz-RNS-t és DNS-t nyertünk, majd az mRNS-eket szálspecifikus primerek használatával, reverz transzkripcióval cDNS-sé alakítottuk. Ezek után real-time PCR technika segítségével megállapítottuk az mRNS mennyiségét, valamint a DNS replikáció mértékét.

**Statisztika** A relatív expressziós arányt (R érték) egy, csoportunk által korábban kidolgozott módszerrel számoltuk ki, amely a hagyományos számolási módszerek

mellett (küszöbfluoreszcencia), figyelembe veszi a PCR hatékonyságát is. A DNS replikáció vizsgálatához is ezt a módszert alkalmaztuk. Ezen kívül egy új tényezőt is bevezettünk, amikor az RNS R értékeket a hozzájuk tartozó DNS R értékéhez hasonlítottuk, így megkaptuk az adott gén mRNS expresszióját DNS szálinként (nR érték).

## **Eredmények**

***Us1* mutáns vírus vizsgálata** Munkám során a PRV *us1* génjét változtattam meg úgy, hogy inszerciós mutációt hajtottam végre, amely során egy GFP-t kifejező expressziós kazettát klónoztam a gén kódoló régiójába. Ezek után vizsgáltam a virális DNS replikációt és 32 gén expressziójának változását a vad típusú vírushoz hasonlítva.

A vad vírusról a DNS replikációja 30 percnél kicsit magasabb volt, mint 1 és 2 óránál, viszont jelentősen megemelkedett 2 és 4 óra között, majd stagnált 6 óráig, majd megint emelkedett 12 óráig. Ezek után esés következett be, valószínűleg mivel az érett virionok távoztak a sejtéből. Az *us1* mutánsnál a DNS replikáció

dinamikája hasonlított a vad típusú víruséra, ám fontos különbség, hogy a DNS replikáció sokkal később, 6 és 8 óra között indult el. Ez 4 órás késést jelent. Ezek alapján arra következtettünk, hogy az *us1* gén megfelelő működése elengedhetetlen a DNS replikáció időben történő elindításához.

A génexpresszió vizsgálata során olyan mintázatot figyeltünk meg, miszerint az *ie180*, a korai, a korai-kései és a kései gének eltérő módon változnak az *us1* mutáció hatására. Az *ie180* expressziója 4 órával később kezdődött az *us1* mutáns esetén, mint a vad vírusnál. Az expresszió a maximumot is később érte el (6 órás csúszás), viszont az R érték kétszerese volt a vad vírusénak. Amennyiben az nR értéket nézzük, a vizsgált gének expressziója fél órával később kezdődött, a csúcst pedig 2 órával később érte el (a csúcs nagyságában nem volt jelentős különbség). A késések valószínűleg annak köszönhetőek, hogy az US1 fehérje megtalálható a tegumentben, és ennek hiányában bekapcsol ugyan a vírus expressziós rendszere, de később valamint megváltozott formában.

Korai gének esetén inkább az expresszió mértékében mutatkozott változás, *us1* mutánsnál az R érték csúcsa



négyszerese volt a vad típusnak, az nR érték pedig kétszerese. Tehát az *us1* gátló szereppel bír a korai génekre, és hiányában a korai gének nagyobb mennyiségben fejeződnek ki, ha csak az egy DNS szálra jutó génexpressziót vesszük figyelembe. nR értékeket nézve az expresszió kezdete egy órát, míg az expresszió csúcsa két órát késett az *us1* mutánsnál a vad vírushoz képest.

Az *us1* mutáció hatása hasonló volt a korai-kései géneknél. Az R érték maximuma háromszor nagyobb volt az *us1* mutánsnál, mint a vad vírusnál, és késés sem mutatkozott. Az nR értéket tekintve mindkét vírusnál ugyanakkor kezdődött az expresszió, viszont az *us1* mutánsnál a csúcst két órával később érte el, és az nR maximuma kétszeres volt. Ebből arra következtethetünk, hogy az *us1* gén terméke hasonlóan befolyásolja a korai-kései géneket.

A kései géneknél az expresszió kezdete és maximuma is késett, viszont nagysága ugyanakkora volt (R értékeket tekintve). Az nR értékeknél, hasonlóan az R értékekhez, csúszás következett be az expresszió maximumában. Ellentétben viszont a korai és korai-kései génekkel, az

expresszió maximuma magasabb a vad típus esetén, mint az *us1* mutánsnál, ebből arra következtethetünk, hogy a kései gének kifejeződését segíti az US1 fehérje.

Fontos megemlíteni egy, a kései gének átíródására vonatkozó megfigyelést. Összehasonlítottuk a DNS replikáció beindulásának időpontját, valamint a kései gének expressziójának kezdetét. Ebből kiderült, hogy a kései gének átíródása hamarabb kezdődik, mint a DNS replikáció, tehát a korábbi elképzeléssel szemben nem a DNS replikáció a triggere a kései gének expressziójának.

**A vírus titer hatása a fertőzés lefolyására** Másik munkánkban vizsgáltuk azt, hogy a vírus fertőzés esetén a fertőző virionok száma hogyan befolyásolja a génexpressziót. Kísérletünkben 0,1 és 10 multiplicity of infection (MOI) mennyiségű vírust használtunk. Majdnem az összes PRV gén esetén magasabb volt a génexpresszió magas számú vírussal történő fertőzésnél az 1 és 2 órás időpontban. Az *ie180* expressziója végig alacsonyabb volt nagy titerű fertőzésnél. Az AST expressziója ellentétesen alakult, nagy titerű fertőzésnél volt magasabb a szintje. Ha az *ie180* és AST szintjét hasonlítottuk egymáshoz, észrevettük, hogy nagy titerű fertőzésnél az *ie180* szintje

sokkal magasabb volt az AST szintjénél. Kis titernél viszont az *ie180* és AST szintje ugyanazon tartományban volt, bár időben ellentétesen változtak. Ebből arra következtettünk, hogy kis titer esetén az *ie180* és AST szabályozza egymás szintjét, ezzel befolyásolva, hogy a vírus látens vagy litikus ciklusba lép-e be. Nagy titer esetén pedig az *ie180* expressziója egyértelműen magasabb, így litikus irányba viszi a fertőzést. A szabályozó gének (*ep0*, *us1* és *ul54*) szintje magasabb volt az első két órában a nagy titerű fertőzésnél, és az *us1* és *ul54* szintje későbbi időpontokban (4 és 6 óra) is. Ennek valószínűleg az az oka, hogy a nagyobb mennyiségű DNS replikációhoz több szabályozó fehérje szükséges.

**Neuron jelölés** Munkánk során olyan vírusokat hoztunk létre, amellyel nyomon követhetők az adott neuron funkcionális kapcsolatai. Ezen felül a vírus kijelöl egy olyan periódust, amelyen belül a neuron még élettanilag ép, a vírus nem károsítja, így elektrofiziológiai vizsgálatok biztonsággal végezhetők velük. Ez a vírus kétféle fluoreszcens proteint fejez ki, az egyik a DsRed, a másik pedig a GFP. A GFP hamarabb jelenik meg, a DsRed

pedig 7 órával utána, ez alatt az idő alatt lehet biztonsággal elektrofiziológiai vizsgálatokat végezni.

A másik új vírus típus a neuronok aktivitását jelzi. A vírus kifejez egy ún. troponin molekulát, amely két fluoreszcens molekulát tartalmaz, melyet troponin köt össze. A troponin érzékeny a Ca<sup>2+</sup>-milió változására, megköti azt, így konformációváltozás következik be. Ennek hatására a két fluoreszcens molekula (cián és citrin) közel kerül egymáshoz, és bekövetkezik a FRET jelenség: a molekula sárga fényt bocsát ki.

## Összefoglalás

Munkám során a PRV vírus egyik szabályozó génjének funkcióját vizsgáltam. Megállapítottuk, hogy az US1 fehérje szerepet játszik a génexpressziós kaszkád elindításában, gátolja a korai és korai-kései gének, valamint serkenti a kései gének kifejeződését. Nagyon fontos megemlíteni egy, a vad típusnál és *us1* mutánsnál is észlelt, DNS replikációra és kései gének kapcsolatára vonatkozó jelenséget. Ellentétben a korábbi hipotézissel, a kései gének kifejeződése nem követte a DNS replikáció

beindulását, tehát nem a virális replikáció a kései gének leíródásának elindítója.

A vírusfertőzésnél az eredeti mennyiség befolyásolja a génexpressziót. Ha nagyobb mennyiségű vírussal történik a fertőzés, akkor közel az összes gén expressziója magasabb, így az *ie180* és többi szabályozó fehérje is erősebben fejeződik ki. A litikus vagy látens ciklusba történő belépést az *ie180* és AST aránya határozza meg.

Létrehoztunk egy olyan PRV alapú rendszert, amellyel neuronokat tudunk megjelölni. Azonban nemcsak morfológiailag tudjuk feltérképezni a neuronhálózatokat, hanem a Timer vírusok segítségével meg tudjuk állapítani, hogy milyen időintervallumban lehet elektrofiziológiai vizsgálatokat végezni. Ezek a vírusok ugyanis kijelölnek egy 7 órás periódust (piros majd zöld szín megjelenése), amikor a vírus még nem károsította a sejtet, de már megjelölte. Egy másik PRV alapú vírussal pedig a neuronok aktivitását tudjuk detektálni úgy, hogy a sejtbe áramló kalcium mennyiségének változását FRET jelenséget kihasználó troponin molekulát tartalmazó vírus jelzi.

## **Köszönetnyilvánítás**

Mindenekelőtt szeretném hálámat kifejezni Prof. Boldogkői Zsoltnak a PhD tanulmányaim és a kutatás során nyújtott folyamatos támogatásáért, türelméért és tudásáért.

Témavezetőm mellett szeretném megköszönni a hasznos tanácsokat és a munkámhoz nyújtott segítséget munkatársaimnak, Tombáczy Dórának, Tóth Juditnak, Prazsák Istvánnak, Petrovszki Pálnak, Pásti Emesének, és Póka Nándornak. Továbbá szeretném köszönetemet kifejezni Berta Beátának, szakdolgozómnak az idejéért és lelkesedéséért.

Nagyon hálás vagyok az intézetben dolgozó asszisztenseknek, Révészné Kati néninek, Papdi Csillának és Kisapáti Edénének a türelmükért és megbízhatóságukért. Segítségük felbecsülhetetlen értékű. Az intézet titkárnöje, Teleki Gabriella pedig az élet adminisztratív oldalát tette sokkal könnyebbé számomra.

A disszertáció alapját képező projektek részben szakmai együttműködés keretei között valósultak meg,

köszönetemet fejezem ki a Friedrich Miescher Institute (Basel, Svájc), munkatársainak.

## **A tézis alapjául szolgáló közlemények**

I. Takács IF, Tombácz D, Berta B, Prazsák I, Póka N, Boldogkoi Z

The ICP22 protein selectively modifies the transcription of different kinetic classes of pseudorabies virus genes

BMC MOLECULAR BIOLOGY 14: pp. 1-12. (2013)

IF: 2.796

II. Boldogkoi Z, Balint K, Awatramani GB, Balya D, Busskamp V, Viney TJ, Lagali PS, Duebel J, Pasti E, Tombacz D, Toth JS, Takacs IF, Scherf BG, Roska B

Genetically timed, activity-sensor and rainbow transsynaptic viral tools

NATURE METHODS 6:(2) pp. 127-130. (2009)

IF: 16.874

III. Toth JS, Tombacz D, Takacs IF, Boldogkoi Z

The effects of viral load on pseudorabies virus gene expression

BMC MICROBIOLOGY 10: pp. 1-11. (2010)

IF: 2.960

## **Független közlemény**

Aguilar-Valles A, Vaissiere T, Griggs EM, Mikaelsson MA, Takacs IF, Young EJ, Rumbaugh G, Miller CA  
Methamphetamine-Associated Memory Is Regulated by a  
Writer and an Eraser of Permissive Histone Methylation.  
BIOLOGICAL PSYCHIATRY (ISSN: 0006-3223)  
(2013)

IF: 9.247

Kumulatív impakt faktor: 31.877