

Az Aujeszky-féle vírus gének funkcionális analízise

PhD értekezés tézisei

Tombác 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*

FÜGGETLEN KÖZLEMÉNY

I. Márton G, Tombác D, Tóth JS, Szabó A, Boldogkői Z, Dénes, Á, Hornyák Á, Nógrádi A: *In 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

Az értekezés alapját képező kísérletek a Magyar Tudományos Kutatási alaphól (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. Tombác 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, **Tombác 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, **Tombác 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, **Tombác 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

transcripts) antiszensz RNS fejeződik ki, azonban a teljes genomot érintő cis- antiszensz RNS transzkripcióról mostanáig nincsenek adatok. A β -herpeszvírusok alcsaládját 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 sajátságaira 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

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, Magyaré 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 (UK), valamint

az MTA-SE Neuromorfológiai és Neuroendokrin Kutató Laboratórium (Budapest) munkatársainak.

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 sajátosságait.

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) expresszálo AyV-alapú ampliton előállítása: A vírus replikációs origóját (*OriS*) és csomagoló és pakoló (*pac*) régióit, valamint egy fluoreszcens fehérje expresszálo 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 expresszálo 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.

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

koktéllal” transzfektáltuk: FP-t kifejező amplikonnal, egy másik szint kódoló plazmival, *TK*-expressziós kazettát tartalmazó plazmival és ΔTK vírussal. A ΔTK -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 vírus**okat fejlesztettünk ki, melyek számos, különböző színű FP-t fejeznek ki.

A **Timer vírus**ok 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 vírus**ok alkalmasnak bizonyultak a neuronok és szívizomsejtek működésének vizsgálatára.

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 *EPO* génre (*early protein 0*; transzaktivátor) fejt ki legerősebb gátló hatását. Feltételezzük, hogy a *VHS* az *EPO* 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 (*TK*: a DNS szintézisben szerepet játszó *timidin kináz* enzimet kódolja): Az idegsejtek ΔTK vírussal való fertőzés hatására megőrzi fiziológiai tulajdonságait, mely azt jelzi, hogy a ΔTK -vírus avirulens.

Az *RR* és az *EPO* 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 ΔRR , ΔEPO 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 génbevitelre.

Rekombináns vírusok használata idegpályák jelölésére, ideg-és szívizomsejtek működésének vizsgálatára: A ΔTK vírusok, valamint úgynevezett AyV-alapú *amplikonok* használatával olyan 4-komponensű rendszert dolgoztunk ki, mely a preszinaptikus neuronok jelölésére alkalmas. Az idegsejteket egy ún. „DNS-