

B4169

PhD DOLGOZAT



ÚJ VIRÁLIS FUNKCIÓK FELISMERÉSE SZEKVENCIA ELEMZÉSEL

Zádori Zoltán

Montreal 2005

PLA2 domén parvovírusokban

21 gerinces parvovírus VP1 egyedi régiójának (VP1up) protein szekvencia összehasonlítása feltárt egy kb. 80 aminosavra kiterjedő rendkívül konzervált szakaszt. A motívumot szinte minden ismert gerinces parvovírus tartalmazza az egyetlen kivétel az *Amdovirus* genuszba sorolt ADV. A 80 aminosavból kb. 20 teljes konzerváltságot mutatott, míg másik kb. 40 valamilyen fizikokémiai tulajdonságában volt hasonló. A motívumon belüli teljesen konzervált aminosavak száma közelítőleg annyi volt, mint a teljes hosszúságú VP2 fehérjén (kb. 700 aminosav) található konzervált aminosavak száma. Noha az ízeltlábúak parvovírusainak MACO fehérjéi felismerhető homológiát nem mutatnak a gerincesek parvovírusainak hasonló fehérjéivel, ez a konzervált szakasz szintén megtalálható szinte minden densovirus VP1up-ján a *Brevidensovirus* genusz tagjainak kivételével.

Ez az evolúciós mértékkel mérve viszonylag nagyfokú stabilitás azt sugallta, hogy ez a szekvencia valamilyen fontos biológiai funkciót kódol. Protein adatbankokban megpróbáltunk olyan fehérjéket találni, amelyeknek funkciója ismert, valamilyen hasonlóságot mutatnak ehhez a szakaszhoz, és az ismert funkció alapján következtetni lehet a parvovírusokban homológ rész funkciójára. Szigorú paraméterekkel végzett (stringent) keresések nem eredményeztek hasonló fehérjéket, a kevésbé specifikusak pedig több ezer fehérjét, nagyon gyenge homológiával.

A nagy számú indifferens protein között, azonban százas nagyságrendben tűntek fel különböző eredetű, szekretált foszfolipáz A2 enzimek (sPLA2-k). PLA2-k a foszfolipidek hidrolízisét katalizálják – a 2-acilészter (sn-2) pozícióban – lizofoszfolipiddé és szabad zsírsavvá. A PLA2-k olyan enzim szuperfamiliát alkotnak, amelynek tagjai kulcszerepet játszanak különböző fiziológiás és patológiás folyamatokban, mint például a zsírbontás, membrán anyagcsere, szignáltranszdukció, gyulladás és autoimmun betegségek (Dennis 1997).

A szekretált foszfolipázok minden esetben 3-7 diszulfid kötést tartalmaznak, és nagyfokú homológiát mutatnak egymáshoz. Katalitikus mechanizmusuk viszonylag jól ismert: egy disztális aszparaginsav (D99) által polarizált hisztidin (H48) deprotonál egy víz molekulát, amely hidrolizálja a foszfolipid-észtert. A tranzíciós állapot stabilizálásában fontos szerepet játszik még egy Ca²⁺ atom amelyet egy proximális aszparaginsav (D49) β-karboxil csoportja és az ún. kalcium kötő hurok három másik aminosavának (Y28, G30, and G32) karbonil oxigénje együtt koordinatív kötéssel pozícionál (Dijkstra et al. 1981).

A parvovírusokban található konzervált aminosavak némelyike pontosan megegyezett az sPLA2-kben konzervált a katalízisért felelős

aminosavakkal, ami azt sugallta, hogy a parvovírus VP1 foszfolipáz aktivitással rendelkezhet. Ennek bizonyítására *Escherichia coli*-ban kifejeztettük fúziós proteinként 3 különböző genusból származó gerinces parvovírus (PPV, B19, AAV2) és egy denzovírus (GmDENV) VP1 egyedi régióját, majd megmértük PLA2 aktivitásukat. A méréshez a mixed micelles assay (Manjunath et al., 1994) módszerét alkalmaztuk. Mind a négy protein katalitikusan aktívnak bizonyult, azonban jelentős különbségek mutatkoztak az enzim aktivitások között. A PPV VP1_{up} közel három nagyságrenddel ($(k_{cat}/kM)_{app}=(71.9 \pm 9.4) \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$) volt aktívabb mint a B19 VP1_{up} ($(2.5 \pm 0.2) \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$) és közel négy nagyságrenddel mint a GmDENV VP1_{up} ($(0.4 \pm 0.03) \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$). PPV VP1_{up} elleni ellenanyag szignifikánsan gátolta annak aktivitását, bizonyítva, hogy a reakció specifikus.

A virális PLA2 enzimatiskus tulajdonságai

A PPV VP1 esetében a nukleáris lokalizációs szignállként szolgáló első 10 aminosav deléciója a kalcium kötő hurok előtt minimális PLA2 aktivitás vesztéssel járt. Hasonló eredményt kaptunk az AAV2 VP1_{up}-val is mikor egy indifferens peptidet (L14) inszertáltunk a kalcium kötő hurok elé. Ezek az adatok azt támasztják alá, hogy a konzervált kalcium kötő hurok előtti szekvenciák nincsenek hatással a vírus PLA2 aktivitására. Azonban, további deléziós konstrukciók enzim aktivitásának mérésével a PPV esetében bizonyítottuk, hogy a konzervált 80 aminosavas domén magában nem elégséges a maximális enzimaktivitáshoz. Ehhez a karboxi-terminálison még egy kb 30 aminosavas extenzióra van szükség, mivel ennek elvesztése kb. százszoros aktivitás csökkenéshez vezet.

Amint az várható volt a kalcium koncentráció jelentősen befolyásolta a foszfolipáz aktivitást, az enzim optimuma a milimoláris intervallumban helyezkedik el és EDTA vagy EGTA adása a reakció elegyhez a katalízis teljes gátlásához vezet. A PPV PLA2 enzim pH optimuma pH(8) körül van. A B19 és a PPV PLA2 nem mutattak jelentős szubsztrát preferenciát, mivel nem volt szignifikáns különbség a zwitter-ionos foszfatidil-kolinon és foszfatidil-etanolaminon vagy az anionos foszfatidil-inozitolon mért aktivitások között.

A PPV VP1_{up} kivételesen nagy PLA2 aktivitása lehetővé tette, hogy a kapszid fehérjékből közvetlenül mérjünk enzim aktivitást, és ezzel bizonyítsuk, hogy nem csak az expresszált VP1_{up} de a natív VP1 protein is rendelkezik PLA2 aktivitással. Mivel a PPV VP1_{up} és a rajta levő enzim a kapszidon belül helyezkedik el az intakt vírusban, ezért a tisztított virionból nem lehetett PLA2 aktivitást mérni. Azonban a kapszidot hővel vagy NaOH-val denaturálva az enzim hozzáférhetővé vált és az expresszált proteinhez hasonló specifikus aktivitást mutatott, igazolva hogy a virion valóban

rendelkezik PLA2 aktivitással, amely valószínűleg jól szabályozott és csak bizonyos körülmények között, a VP1up kitettsége után nyilvánul meg.

Számos sPLA2 szerkezete ismert, legtöbbjük az ún I/II-es szerkezeti csoportba, míg néhány a III-as szerkezeti csoportba sorolható (Dennis 1997). Mindkét csoport tagjai azonosan négy fő másodlagos szerkezeti elemből épülnek fel, három alfa helixből és egy kalcium kötő hurokból. Közöttük a fő különbséget az ún. membrán kötő helix pozíciója adja, amely az I/II-es csoportban az aminoterminálison a kalcium kötő hurok előtt, míg a III-as csoportban a karboxi-terminálison a két katalitikus helix után helyezkedik el. A szekvencia összehasonlítások alapján a gerinces parvovírusok PLA2-je inkább a III-as csoporthoz mutatott szerkezeti hasonlóságot, tehát a membrán kötő helix az enzim karboxi-terminálisán helyezkedik el.

Ezen szerkezeti modell alapján megvizsgáltuk az enzimaktivásban potenciálisan kritikus aminosavak szerepét. Ugyanakkor a PPV fertőző klónja lehetővé tette, hogy tanulmányozzuk a PLA2 aktivitás és a vírus fertőzőképessége közötti összefüggést. Mindkettő, azaz az enzimaktivitás és a vírus fertőzőképessége is drámaian csökkent, amikor elmutáltattuk a katalitikus centrum aminosavait (H41 és D42). A predikció alapján a D63 megfelel az sPLA2-ben a hisztidint polarizáló D99-nek. Helyettesítése alaninnal (D63A) vagy aszparaginnal (D63N) szintén erősen redukálták a virális fertőzőképességet és a PLA2 aktivitást, ami a modell helyességét támasztotta alá. A P21 – amely konzervált a VPLA2-k kalcium-kötő hurokjában de sohasem fordul elő a szekretált foszfolipázokban – mutációja szintén csökkentette az enzimaktivitást és a vírus fertőzőképességét is. Az ismeretlen szerepű K88, amely a gerincesek parvovirusaiban és a méh méreg III-as csoportú foszfolipázának membrán kötő helixében konzervált, ugyancsak elengedhetetlennek tűnik, mivel mutációja jelentősen csökkentette az enzimaktivitást. Összességében elmondhatjuk, hogy a pontmutánsokban az enzimaktivitás csökkenése egyenes arányban állt a vírus fertőzőképességének csökkenésével ($R^2 = 0,898$).

Tetracaine és oleyloxyethylphosphorylcholine (OP) foszfolipáz inhibitorokat használtunk annak megerősítésére, hogy a foszfolipáz aktivitás gátlása a fertőzés csökkenésével jár. $34,6 \mu\text{M}$ tetracaine és $13 \mu\text{M}$ OP felére csökkentette a 20 óra után mért fertőzött sejtek számát.

A PLA2 szerepe a vírus fertőzésben

A vad típusú és a PLA2 mutáns fertőző klón egyforma hatékonysággal hoz létre érett, nukleinsavat tartalmazó vírusokat. Ez azt mutatja, hogy a PLA2 nem szükséges a vírus replikációjához és a DNS pakolódásához a virionban. Mivel az egyszálú parvovírus genom konverziója duplaszálúvá normális

fertőzés során a magban történik, celluláris DNS polimerázok segítségével, ezért a virális foszfolipáz valószínűleg a fertőzés korai szakaszában, még a DNS magban való hozzáférhetősége előtt szükséges.

A vírus fertőzés két legkorábbi fázisa a receptor kötés és a vírus felvétele a sebbe. Annak tisztázására, hogy a virális foszfolipáz játszik-e szerepet ezekben a folyamatokban, két PPV mutánszt jelöltünk S³⁵ metioninnal és meghatároztuk sejthez való kötődésük és sejtbeli belépésük relatív hatékonyságát a vad típushoz viszonyítva. Egyik vizsgálattal sem tudtunk megállapítani jelentős különbséget a mutáns és a vad vírusok között. Hasonló eredményre jutottunk AAV2 PLA2⁻ pont és deléciós mutánsokkal (76HD/AN és ΔXX) is különböző sejtvonalakon (A431 és HeLa). Ezek az adatok egyértelműen bizonyították, hogy a foszfolipáz nem játszik szerepet sem a kötődésben, sem a vírus felvételében.

Két órával a belépés után a vad típusú PPV és a mutánsok is a perinukleáris vezikulumokban akkumulálódnak. A vírus részecskék minden esetben nagymértékben kolokalizáltak a LAMP-2 lizoszóma/késői endoszóma markerrel. A kolokalizáció mértéke a vad típus és a mutánsok esetében hasonló volt, ami arra utal, hogy a virális foszfolipáz nem szükséges a vírus késői endoszóma/lizoszóma kompartmentbe való jutásához sem, hanem valahol a késői endoszóma/lizoszóma és a nukleusz között hat.

Az a tény, hogy kb. 1000 vírus partikulum kell a PPV fertőzéshez valamint a LAMP-2-vel végzett kolokalizációs kísérletek arra utaltak, hogy még vad típusú fertőzés során is a sejtbe felvett fertőzőképes virionoknak csak kis része éri el a sejtmagot. Ezért a nagyobb szenzitivitás érdekében S³⁵ jelölt vad típusú és PLA2- mutánsok bejutását vizsgáltuk a nukleuszba. Nem találtunk szignifikáns különbséget a vad vírus és a mutánsok között. A nukleuszban mért radioaktivitás mértéke minden esetben 0,5% alatt maradt és megegyezett a laktátdehidrogenázal mért citoszol szennyezés mértékével a nukleáris extraktban. Ami újra csak megerősítette, hogy a sejtbe lépő viszonylag nagy mennyiségű vírus fehérjéiből, csak egy nagyon kis – a jelenleg rendelkezésünkre álló technikák detekciós limitje alatti – mennyiség, ha egyáltalán valami, jut el a nukleuszig.

In situ DNS hibridizációs kísérleteket végeztünk annak eldöntésére, hogy vajon PLA2⁻ mutáns vírusok képesek-e ugyanolyan hatékonysággal eljuttatni a DNS-üket a sejtmagba, mint a vad típusú vírus. Nyolc órával a fertőzés kezdete után a vírus DNS mindenesetben a perinukleáris endoszóma/lizoszóma kompartmentben helyezkedett el. A DNS replikáció 12 óra után indult el a nukleuszban a vad típusú vírus esetében. Az, hogy nem tudtunk replikációt detektálni a mutánsok esetében közvetetten arra utal, hogy a DNS a PLA2- vírusokból nem volt képes a nukleuszba penetrálni és hogy a

virális PLA2 nélkülözhetetlen a vírus DNS transzferjéhez az endoszomális kompartmentből a nukleuszba.

Annak eldöntésére, hogy a virális DNS és a virális foszfolipáz ugyanazon a vírus partikulumon belül helyezkedik-e el, komplementációs kísérleteket végeztünk. Sem a 10^4 feleslegben PLA2- mutánshoz adott $0,4 \mu\text{M}$ kígyó vagy méh mérge foszfolipáz, sem $1 \mu\text{M}$ *E. coli* expresszált PPV VP1up nem volt képes a mutáns vírus mentésére és nem emelte a fertőzött sejtek számát. β -propiolakton kezelt DNS inaktivált vad típusú vírus, aktív foszfolipázzal, tízszeres fölöslegben adva szintén nem volt képes komplementálni a PLA2⁻ mutánst. Vad típusú AAV2 szintén nem volt képes komplementálni koinfekció során az 76HD/AN mutációt hordozó, a LacZ gént expresszáló rekombináns AAV-t. Mindezek azt támasztják alá, hogy a vPLA2 nem másodlagos hírvívő utak aktiválásával *transz* hat, hanem a virális DNS-nek *cisz* helyzetben kell lennie a vírus kapszidon lévő PLA2-vel a hatékony fertőzéshez.

Alternatív ORF-ek parvovírusokban

A PLA2 domén egy olyan genetikai bélyeg, amely az egész *Parvoviridae* családra általánosságban jellemző. Munkám során azonban arra is kíváncsi voltam, hogy mik azok a genetikai tulajdonságok amelyek csak parvovírusok evolúciósan elkülönült csoportjaira – genuszokra – jellemzőek és egyértelműen megkülönböztetik őket más csoportoktól.

A parvovírusok genom szerveződését tanulmányozva feltűnt, hogy kis méretű, a csoportra specifikus ORF-ek találhatóak minden genuszban. Az *Erythrovirus* genuszban például egy ORF átfed a VP1up régióval (2586-2831 nukleotid a V9 parvovírusban, Genbank azonosító: NC_004295.1) a *Dependovirus* genuszban a VP2up-val és a VP3 5' végével (2717-3340 nukleotid AAV2-ben, Genbank azonosító: AF043303.1).

Egy kis méretű ORF található a *Parvovirus* genus tagjainak genomjában is, amely átfed a VP2 fehérje ORF-jének 5' végével. Az ORF 50-60 aminosavat kódol, egy ATG kodonnal kezdődik, amely legtöbbször 4 nukleotiddal a VP2 startkodonja mögött helyezkedik el. Az egyetlen kivétel a PPV, amelynél az ATG 7 nukleotiddal a VP2 iniciációs kodonja mögött van. Ezt a kis ORF-et SAT-nak (small alternatively translated protein) neveztük el.

A PPV SAT tulajdonságai

A SAT fehérjék elsődleges szekvenciája nem különösebben konzervált, azonban különböző topológia predikációs programok membránproteinnek jósolták őket. Minden SAT protein egyetlen transzmembrán α -helixet tartalmaz nagyjából ugyanabban a pozícióban.

Annak bizonyítására, hogy a fehérje létezik, *E. coli*-ban expresszáltuk a PPV SAT ORF-jét és állatokat immunizáltunk vele. Azonban nem voltunk képesek specifikus ellenanyagot előállítani a fehérje ellen. Habár ez csalódást keltő esemény, de nem ritka a kis hidrofób fehérjék esetében.

Ezért annak demonstrálására, hogy a fehérje valóban leíródik, fúziós konstrukciókat készítettünk. GFP-t (green fluorescent protein) inszertáltunk a PPV infekzív klónjának 5 különböző pozíciójába, mind a három leolvasási keretbe, és a 15 különböző konstrukciót PT sejtekbe transzfektáltuk. Mind az 5 konstrukció, amelyben a GFP a VP leolvasási kerethez volt fuzionáltva, GFP pozitív sejteket eredményezett. GFP-t lehetett detektálni a nukleuszban és a citoplazmában is.

Az az öt konstrukció, amelyekben a GFP-t a SAT leolvasási keretébe inszertáltuk, szintén GFP-re pozitívnak bizonyult, azonban a GFP sejten belüli eloszlása a SAT fúziós partner hosszától függött. Abban a két konstrukcióban, amelyekben a GFP-t az α -helix elé fuzionáltattuk hasonló eloszlást kaptunk, mint a VP proteinhez fuzionált GFP esetében.

A másik három esetben, amikor a GFP-t a hidrofób helix után inszertáltuk, a GFP-t csak a citoplazmában és a nukleáris membránban tudtuk detektálni, míg a nukleuszban és a sejtmembránban nem. Annak demonstrációjára, hogy ez a lokalizáció nem műtermék, egy másik konstrukciót készítettünk, ahol egy dupla FLAG markerrel helyettesítettük a GFP-t a teljes hosszúságú SAT proteinen. Ez a fehérje ugyanazt az eloszlást mutatta, mint a GFP-fúziós fehérje. Az, hogy a fehérje a citoplazmában jellegzetes mintázatot mutatott, valamint a nukleáris membránban is megtalálható volt, arra utalt, hogy a SAT az endoplazmatikus retikulum (ER)/nukleáris membrán rendszerben helyezkedik el. A FLAG-fúziós SAT teljes kolokalizációja a calreticulín ER/nukleáris membrán markerrel, megerősítette ezt a feltételezésünket.

Az, hogy a rövid, α -helix csonkolt SAT változatok nem az ER-ban helyezkednek el, azt sugallta hogy ez a helix a meghatározó faktor a SAT lokalizációjában. Ennek tanulmányozására olyan konstrukciókat készítettünk ahol részlegesen vagy teljesen megváltoztattuk a helix aminosav sorrendjét a VP aminosav szekvenciáját változtatlanul hagyva, valamint kideletáltuk a teljes helixet. Már 5 aminosav csere is kis mennyiségű SAT fehérje nukleáris megjelenéséhez vezetett, míg nagyobb mértékű cserék és a delécio teljesen megváltoztatták a SAT elhelyezkedését.

Eukariótákban általában az első AUG kodon iniciálja a translációt, azonban sok kivétel van e szabály alól (Kozak 1999). Egyike az ismert kivételeknek mikor két AUG csak néhány nukleotid távolságra helyezkedik el egymástól (Kozak 1995). Ebben az esetben mindkettő translációs iniciátorként funkcionálhat. A SAT és a VP2 start kódjának közelsége (hét

nukleotid) arra utalt, hogy a két fehérje ugyanarról a mRNS-ről fordítódik le. Ennek vizsgálatára néhány GFP konstrukció VP1 és VP2 mRNS-ét egy heterológ promóter szabályozása alatt pCDNA3.1 eukarióta expressziós vektorban fejeztettük ki. Ezekben a konstrukciókban a GFP-t vagy a SAT, vagy a VP ORF-hez fuzionáltattuk. A konstrukciókat PT sejtbe transzfektáltuk és a GFP fúziós fehérjét immunprecipitáció után Western blot-tal tanulmányoztuk. Amikor a VP-GFP fúziós konstrukció VP1 mRNS-ét expresszáltuk, egyetlen, a VP1 fúziós fehérje nagyságának megfelelő csíkot detektáltunk. Nem volt kimutatható GFP fúziós fehérje amikor a GFP a SAT ORF-be volt inszertálva. Amikor a VP2 mRNS-t expresszáltuk mind a SAT, mind a VP ORF-ekről leíródott GFP fúziós fehérje, bizonyítva, hogy a SAT valóban a VP2 mRNS-ről íródik le. Denzitometriás mérés alapján a SAT és a VP2 translációjának aránya a VP2 mRNS-ről kb. 60% volt.

Három start kodon található a SAT ORF-ben és két különböző méretű SAT fehérjét azonosítottunk a Western blot-on. Annak tanulmányozására, hogy vajon a két különböző méretű SAT fehérje két különböző AUG-ról iniciálódik, egyenként elmutáltuk a három start kodont. Az első start kodon mutációja mindkét csík elvesztéséhez vezetett, míg a második kettő mutációja semmilyen hatással nem volt a translációra. Ez arra utal, hogy a két különböző méretű SAT fehérje egyetlen iniciációs kodonról translálódik és a különböző méret valószínűleg posztranszlációs modifikáció eredménye.

Az N-terminális régiója sem a VP2-nek, sem a SAT-nek nem kifejezetten konzervált parvovírusokban. Ennek ellenére a VP2 kódoló szekvenciájának első nyolc nukleotidja majdnem teljesen konzervált (ATGAGTG/AA), és egy teljesen konzervált szerint eredményez a VP2 második aminosavának helyén. Amikor a szerin kodonját AGT-ről TCA-ra cseréltük (M9), a SAT translációja nem változott, amikor azonban a szerint alaninra változtattuk (AGT-GCT csere (M7)), drámaian csökkent a SAT translációja, valószínűleg a VP2 optimálist így jobban közelítő Kozak szekvenciája miatt.

A SAT funkciója

A SAT PPV életciklusában betöltött szerepének vizsgálatára mutáns vírusokat készítettünk, hat helyen elmutáltattuk a PPV infektív klónját. Három mutánsban a SAT szekvenciájába stop kodonokat vezetünk be (SAT⁻¹⁻³), a negyedikben kiütöttük a SAT start kodonját (M11), a maradék kettő pedig a fentebb említett szerin mutációkat hordozta (M7, M9). A mutációk közül csak M7 járt a VP2 aminosav szekvenciájának változásával (S2A). Mind a hat mutáns életképes vírust eredményezett, azt bizonyítva, hogy a SAT legalábbis szövettenyésztésben nem esszenciális. Nem volt jelentős különbség a vad típusú

vírus és a mutánsok között a specifikus infektivitásban (genom ekvivalens/fluoreszcens fókusz egység) vagy a vírustörzsek fertőzőképességében. Azonban, azok a mutánsok amelyek nem vagy alul expresszálták a SAT fehérjét, (SAT⁻1-3, M11, M7) később lizálták a sejteket és sokkal lassabban terjedtek mint a vad típus, ami a növekedési görbéjük elnyújtott lag-fázisában is megmutatkozott. Alacsony multiplicitású fertőzésnél a vad vírus esetében 40 órával a fertőzés kezdete után 99%-a a sejteknek már fertőzötté vált, míg a mutánsok esetében ez kb. 10% maradt.

Annak igazolására hogy a lassú fenotípus valóban a SAT elvesztése miatt alakul ki komplementációs kísérletet végeztünk. A PPV életciklusa kb. 20-24 óra PT sejtekben. Vad típusú infektív klón transzfekeciója után negyven órával viszonylag nagy kiterjedésű fertőzött plakkok találhatóak a szövettényészetben. Ezzel szemben a mutánsok esetében ezek kiterjedése sokkal kisebb csak néhány sejtre korlátozódik. Amikor SAT⁻ mutáns infektív klónokat kotranszformáltunk SAT expresszálló de VP deletált konstrukciókkal nagy kiterjedésű plakkokat detektáltunk. Vagyis a vad típusú SAT, *transz* szolgáltatva, komplementálni képes a mutáns vírusok fenotípusát, ami egyértelműen alátámasztja, hogy a lassú terjedés a SAT elvesztésének következménye.

SAT az ER-ban helyezkedik el, nem kolokalizál sem a virális kapszid, sem az NS fehérjékkel, és valószínűleg egymagában is toxikus a sejtekre, mivel nem voltunk képesek stabil SAT expresszálló sejtvonalat létrehozni. Mindezek arra utalnak, hogy sejtízisben és a vírus terjedésében betöltött szerepét az NS fehérjétől függetlenül egy más molekuláris mechanizmus által – valószínűleg ER stressz választ indukálva – fejtí ki.

Összefoglalásként elmondható, hogy a parvovírusok összehasonlító szekvencia és genom elemzése egy új enzimátikus domén és egy eddig ismeretlen fehérje felismeréséhez vezetett. A PLA2 domén a vírus család tagjainak nagy többségére, míg a SAT fehérje a parvovírus genusz minden tagjára jellemző. Mind az enzim aktivitást, mind a fehérje létét kísérletesen bizonyítottuk, biológiai funkciójukat tanulmányoztuk. A dolgozatban tárgyalt felfedezések és kísérletek hozzájárulnak a parvovírusok jobb tudományos megismeréséhez, és jelentősen befolyásolják a területen jelenleg és jövőben folyó kutatásokat.

Legfontosabb eredményeim és megállapításaim

1. A parvovírusok többsége hordoz egy kb 80 aminosav hosszúságú konzervált szakaszt a VP1 egyedi régiójában.
2. A doménon található konzervált aminosavak némelyike pontosan megegyezik a szekretált PLA2-kben konzervált, a katalízisben szerepet játszó aminosavakkal.
3. A PPV kapszidból PLA2 aktivitás mérhető. Különböző, egymástól evolúciósan távolos parvovírusok *E. coli* expresszált VP1 egyedi régiója PLA2 aktivitást mutat, amely kalcium függő.
4. A PLA2 enzimaktivitás nélkülözhetetlen a hatékony vírus fertőzéshez. A katalízisben fontos aminosavak mutációja a PPV VP1 egyedi régiójában jelentősen csökkenti az enzim aktivitást, és vele egyenesen arányosan a vírus fertőző képességét is.
5. A PLA2 valahol a késői endoszomától a nukleuszig vezető úton hat.
6. Minden parvovírus genuszban, kis méretű a csoportra specifikus ORF-ek találhatóak amelyek átfednek VP kódoló régiójával. A parvovírus genuszban ez az ORF a VP2 amino-terminálisát kódoló részre esik.
7. PPV-ben egy kis 69 aminosav hosszúságú fehérje íródik le erről az ORF-ről, amit SAT-nek nevezünk el.
8. SAT ugyanarról a mRNS-ről íródik le mint a VP2 és iniciációs kodonja a VP2 start kodonja után hét nukleotiddal helyezkedik el. A proteint egy hidrofób helix az ER-ban lokalizálja.
9. SAT szövettanilag nem eszenciális, de szerepet játszik a vírus kiszabadulásában a sejtől. Hiánya jelentősen lassítja a sejt lízist és a vírus terjedését.