

PhD DOLGOZAT

**ÚJ VIRÁLIS FUNKCIÓK FELISMERÉSE
SZEKVENCIA ELEMZÉSSEL**

Zádori Zoltán

Montreal 2005

Irodalmi áttekintés

Bevezetés

A parvovírusok a legkisebb, legegyszerűbb állati vírusok közé tartoznak. A virion kizárólag proteint és DNS-t tartalmaz, átmérője mindössze 18–26 nm (innen a név is, parvo latinul kicsit jelent). A kis méret és az egyszerű felépítés ellenére – vagy éppen emiatt – evolúciós értelemben a vírus család rendkívül sikeres. Parvovírusokat izoláltak – a halakat kivéve – a gerincesek szinte minden osztályából, valamint számos rovarfajból és rákokból is. Az emlősök között nem egy faj – beleértve az embert is – gazdaként szolgál több, evolúciósan távoleső parvovírus fajnak is (pl. humán B19 és humán adeno asszociált vírusok). A parvovírusok gazdaspecifitása fajtól függően változó, egytől néhány rokon fajig terjed és összességében inkább szűknek tekinthető. Például a humán B19 parvovírus csak néhány főemlőst fertőz, míg a kutya parvovírus (CPV) csak a kutyaféléket, a sertés parvovírus (PPV) csak a házi sertést és a vaddisznót fertőzi.

A parvovírusokat rendszertanilag két alcsaládba sorolják. A gerinceseket fertőzőek alkotják a *Parvovirinae* alcsaládot, míg az ízeltlábúakat fertőzőek a *Densovirinae* alcsaládot. A *Parvovirinae* alcsalád tagjai további öt, filogenetikailag jól elkülöníthető csoportot alkotnak, melyek mindegyike egy genusznak felel meg (Tattersall 2005, Tattersall et al. 2005).

A dependovírus genusz ismert tagjainak többsége ún. adeno asszociált vírus (AAV). Az AAV-k különleges csoportot alkotnak nemcsak a parvovírusok, de általában a vírusok között is, amennyiben szövettényezetben nem képesek önálló replikációra, és produktív szaporodásukhoz valamilyen más, magban replikálódó, ún. helper vírus (Adenovírus, Herpeszvírus, Papillóma vírus) segítségére szorulnak. Így, mivel nemcsak a gazdasejtet parazitálják hanem más vírusokat is, kétszeres parazitának tekinthetőek. Meg kell azonban jegyezni, hogy nincs egyértelmű

bizonyíték arra vonatkozóan, hogy természetes gazdában is helper vírussal való koinfekcióra lenne szükség az AAV szaporodásához és egyáltalán nem zárható ki az sem, hogy a természetes gazda bizonyos szöveteiben az AAV-k önállóan replikálódnak (Meyers et al. 2000).

A *Densovirinae* alcsalád filogenetikailag sokkal heterogénebb mint a *Parvovirinae* alcsalád. Míg az utóbbit csupa monoszensz (az összes fehérje egy DNS szárlól íródik le) vírus alkotja addig a densovírusok között mind monoszensz, mind ambiszensz (a DNS mindkét szárlól van transzláció) tagok találhatóak. A vírus csoport heterogenitása megmutatkozik abban is, hogy a négy genuszba sorolt faj mellett számos, mindezidáig genuszba be nem sorolható tagot is tartalmaz (Tattersall 2005, Tattersall et al. 2005).

Tekintettel arra, hogy az ízeltlábúak adják a földön élő fajok 60–90%-át (az ismert ízeltlábú fajok száma kb. 800 000) és mindegyik potenciális parvovírus gazdaként tekinthető, még óvatos becslés szerint is a parvovírus család tagjainak száma több tízezerre tehető. Azonban ezekből mindössze kb. 150 ismert valamilyen szinten a tudomány előtt, és csak mintegy 100-ról van legalább részleges szekvencia adat.

A virion és a vírus proteinek

A vírus tömege $4-6 \times 10^6$ dalton, melynek több mint nyolcvan százalékát teszi ki fehérje, a maradékért pedig az egyszálú DNS genom a felelős. A magas DNS:protein aránynak és a lipidek hiányának köszönhetően a virionok úszósűrűsége CsCl egyensúlyi gradiensén viszonylag magas, $1,39-1,42 \text{ g/cm}^3$ körül van.

A parvovírusok kapszidja proteáz és szerves oldószer rezisztens, továbbá rendkívül ellenálló más külső fizikai és kémiai hatásokkal szemben is. A virion stabil pH 3 és pH 10 között, és nem inaktiválható egy órás hőkezeléssel $56 \text{ }^\circ\text{C}$ -on. (Berns 1991).

A vírus külső ikozaéder alakú burkát minden esetben 60 kapszomer építi fel. Densovírusokban a kapszidban található különböző méretű fehérjék (VP) száma – genusztól függően – 2 és 5 között van, míg a gerincesek parvovirusaiban 2 vagy 3. Ezen fehérjék minden parvovírus esetében egy olyan sorozatot alkotnak, amelyben az összes protein leszármaztatható a leghosszabb amino-terminális deléciójából, vagy másképpen a legrövidebb amino-terminális extenziójából. Általában a legrövidebb transzlált fehérje adja az összes kapszid proteinek 85-90%-át (major component, MACO), míg a hosszabb verziók adják a maradékot (minor components, MICO). A baculovírusal rovarsejtben expresszált fő vírus alkotó fehérje általában képes kapszidot formálni egyedül is (virus like particle (VLP)), ami immunológiailag és szerkezetileg megegyezik vagy nagyon hasonló a nativ kapszidhoz (Saliki et al. 1992, Martinez et al. 1992). Éppen ezért az ilyen részecskékkel immunizált gazdák általában védettek a parvovírus fertőzéssel szemben. Azonban vannak kivételek, a B19 esetében a protektív ellenanyagok kiváltásához VP1-et és VP2-t is tartalmazó VLP-re volt szükség. Valószínűleg sztérikus gátlás az oka, hogy a leghosszabb kapszid fehérje egyedül nem képes kapszid formálásra. A baktériumban expresszált fő komponens ugyancsak képtelen kapszidot alkotni, feltehetően a megfelelő hajtogatódáshoz szükséges chaperon fehérjék hiányában (Kajigaya et al. 1991).

A két alcsaládból összesen körülbelül 10-12 parvovírus szerkezete ismert (Tsao et al. 1991, Simpson et al. 1998). A nativ kapszidot a fő vírus alkotó fehérje és a MICO fehérjék ezzel megegyező része képezi. A MICO fehérjék egyedi aminoterminális extenziójának, valamint a MACO fehérje – fajtól függően – első 20-40 aminosavának szerkezete nem meghatározható röntgen diffrakcióval, mivel ezek nem rendezett pozíciót foglalnak el a kapszidban. Minden esetben egy – más vírusok kapszidfehérjeiben is gyakran előforduló (Chelvanayagam et al. 1992) – 8 szálú béta hordó alkotja a fehérje vázát, és a béta szálakat összekötő fehérje hurkok

képezik a virion külső és belső felszínét. Habár az alapvető szerkezeti egységek azonosak a két alcsalád tagjainak kapszid fehérjéi között, a parvovírus kapszid felszíne sokkal tagoltabb mint a densovírus kapszidé (1 ábra). A különbség kialakulása – általánosan elfogadott nézet szerint – a törzspejlődés során a gerinceseknél megjelenő ellenanyagok evolúciós nyomásának következménye lehet, mivel a tagolt felszín megnehezítheti vagy meg is akadályozhatja az antitestek kötődését (Rossmann 1993).

Számos, a vírus biológiai tulajdonságát alapvetően meghatározó régiót azonosítottak különböző parvovírusok kapszidjának felszínén. A kétszeres szimmetria tengely körüli mélyedést alkotó aminosavak felelősek a kutya parvovírus (CPV) kötődéséért a vírus elsődleges receptorához, a szialinsavhoz (Barbis et al. 1992). A CPV interakciójáért a másodlagos receptoraként szolgáló fehérjével – a transzferin receptorral (TfR) – a háromszoros szimmetria tengely körüli kiemelkedést alkotó aminosavak felelősek (Hueffer et al. 2003).

A gazda és szövetspecifitás, valamint a virulencia megváltozását is a kapszidfehérjék határozzák meg. A macska parvovírus (FPV) nem képes kutyát fertőzni, azonban 1978-ban egy rendkívül virulens, FPV-ből származó új kutya parvovírus (CPV) okozott világméretű járványt a kutyafélék között. A CPV specifitása mind *in vivo*, mind *in vitro* eltér az FPV-től, annak ellenére hogy genomjuk között a különbség minimális, kevesebb mint 1%. Genom szegment cserék és helyspecifikus mutációk megmutatták, hogy a kevés genomiális különbség közül is mindössze 3-4 aminosav megváltoztatása a kapszid felszínén elégséges a biológiai tulajdonságok megváltozásához (Parrish 1999). Hasonlóan csekély a genomiális különbség a sertés parvovírus avirulens (NADL-2) és virulens (Kresse) törzsei között. A kódoló régiókon belül található 12 nukleotid különbségből csak hat okoz aminosavcserét a VP proteineken, a többi csendes. A kapszid fehérjén található mutációk közül mindössze kettő cseréje elégséges ahhoz, hogy az

amúgy változatlan genomú Kresse-t avirulenssé, vagy az NADL-2-t virulenssé tegye (Bergeron et al. 1996).

Nagyon kevés adat ismert a különböző hosszúságú MICO fehérjék szerepéről a parvovírusok életciklusában. Egér parvovírusban (MVM) (Cotmore et al. 1999) és AAV2-ben a VP1 fehérje aminoterminális extenziója a nativ kapszidon belül (Kronenberg et al. 2005), míg a B19 esetében kívül helyezkedik el (Rosenfeld et al. 1992). A teljes B19 VP1 fehérjét reprezentáló, átfedő peptidekkel állatokat immunizálva azt találták, hogy a neutralizáló ellenanyagokat kiváltó lineáris epitopok a VP1 egyedi N-terminális részét folyamatosan, és a VP2 N-terminális első 20-40 aminosavát képviselik (Saikawa et al., 1993). B19 fertőzésben megbetegedett emberek vérének vizsgálata kimutatta hogy a rekonvaleszcens fázisban a VP1 egyedi N-terminálisa ellen termelt ellenanyagok szintje emelkedik, míg a VP2 ellenieké csökken. A VP1 nem játszik szerepet a kapszid összeállításában vagy a DNS pakolódásában. Hiánya (Tullis et al. 1993) vagy mutációja (Hermonat et al. 1984) azonban a vírus fertőzőképességének jelentős csökkenéséhez vagy elvesztéséhez vezet.

A fertőzés korai fázisai

Különböző parvovírusok más-más sejtfelszíni molekulákhoz kötődnek és használnak receptorként. A humán B19 vírus kizárólag eritrocita őssejtekben replikálódik, és az eritrocita P antigén, egy globozid szolgál elsődleges receptoraként (Brown et al. 1993). A CPV és FPV specifikusan kötődik szialinsavhoz, azonban a vírusherpetéshez elengedhetetlen a TfR jelenléte. Az AAV2-ről kimutatták, hogy elsődleges receptora heparán-szulfát proteoglikán (HSPG), azonban ez nem elégséges a fertőzéshez, hanem az egyes számú fibroblaszt növekedési faktor

receptorra (FGFR1) is szükség van mint koreceptorra (Qing et al. 1999). Az AAV4 csak α 2-3 kapcsolt szialinsavhoz míg az AAV5 α 2-3 és α 2-6 kapcsolt szialinsavhoz is kötődik, és mindezekon kívül a PDGF receptort is képes használni mint saját receptort (Di Pasquale et al. 2003). Általánosságban elmondható hogy az AAV-k evolúciójuk során viszonylag nagy számú, különböző kémiai természetű receptor kötéséhez alkalmazkodtak, és receptor specifitásuk, kapszid mutációkkal és inszerciókkal viszonylag könnyen változtatható, ami megkönnyíti génterápiás vektorokként való használatukat.

A parvovírusok sejtfelszíni receptorokhoz kötődve valószínűleg klatrin burkos endoszomákon keresztül jutnak be a gazdasejtekbe, mivel a dinamin-2 egy domináns interferáló mutánsának expressziója gátolta a CPV és az AAV2 endocitózisát is. Mindkét vírus infekcióját blokkolni lehet lizoszomatrop ágensekkel (NH₄Cl, bafilomycin), ami arra utal hogy az alacsony pH-nak valamilyen szerepe van a késői endoszomákban vagy lizoszomákban a vírus aktiválásában és a fertőzés kialakulásában. A vírus felvétel viszonylag gyors folyamat. A CPV a sejtfelszínhez való kötődés után néhány órával a perinukleáris endoszomákban koncentrálnak. Az endoszomából való kiszabadulás mechanizmusa nem ismert, azonban az biztosnak tűnik, hogy nem teljes lízis, mert nyomkövetésre használt nagy molekulájú anyagok (pl. alfa-szarcin) nagy része a fertőzött sejt endoszomájában marad (Vihinen-Ranta et al. 2004). A kapszid mégis nagy valószínűséggel kilép a citoszolba, mert anti-CPV ellenanyagok citoplazmába injektálásával a CPV infekciót blokkolni lehet (Vihinen-Ranta et al. 2002). Proteoszomák szintén valamilyen szerepet játszhatnak a fertőzés folyamatában, mert proteoszoma inhibitorok gátolják az MVM infekcióját. Ez a szerep még tisztázásra vár; lehet direkt kimotripszin szerű vagy a kapszid ubikvitinációjával összefüggő aktivitás.

Microtubulusok és dinein transzportálhatják a kapszidot a nukleáris pórusokhoz, mivel nocodazol kezelés vagy anti-dinein ellenanyagok gátolják a CPV infekcióját, és a CPV kapszid koprecipitálódik a dineinnel, fertőzött sejtekből. Úgy tűnik, a nukleáris transzportért a VP1 fehérje amino-termnálisán lévő nukleáris lokalizációs szignál felelős a CPV esetében, mert változások a szekvenciájában vagy a régió elleni specifikus ellenanyagok injekciózása a citoplazmába gátolják a virális fertőzést (Vihinen-Ranta et al. 2000).

Nincs adat arra vonatkozóan, hogy a parvovírus kapszid a sejtmagban szétesne és az egyszálú DNS így válna szabaddá. A parvovírus kapszid rendkívül ellenálló, integritását igen erős hő- és kémiai kezelések után is megőrzi, azonban a virális DNS 3' vége olyan kezelésekkel hozzáférhetővé tehető amelyekről a kapszid nem dezintegrlódik (Cotmore et al. 1999). A szabad DNS vég a DNS polimeráz *in vitro* szubsztrátja. Ezek az adatok azt sugallják, hogy létezik olyan mechanizmus, amely a sejtfelszíntől a sejtmagig tartó úton hasonló módon szabaddá teszi a genom 3' végét, ami templátként szolgálhat az *in vivo* DNS szintézishez is.

Az mRNS-ek és a proteinek keletkezése

A virális mRNS-ek a már replikálódó duplaszálú genomról íródnak át. Az összes eddig ismert gerinces parvovírus két nagy kódoló régiót hordoz. A két kódoló régió azonos szálon, konvenció szerint a plusz szálon, általában átfedésmentesen, vagy minimális átfedéssel helyezkedik el. A baloldali régió kódolja a replikációhoz szükséges nem strukturális proteineket (NS vagy Rep), a jobboldali régió pedig a kapszid vagy más néven virális proteineket (VP). Az NS1 helikáz aktivitással rendelkezik, kötődik a gazda és a vírus DNS-éhez, kölcsönhatásban áll gazda fehérjékkel, apoptózist és sejt lízist indukál (Sol et al. 1999).

A különböző vírusfajoknál az alternatív splicing útján és/vagy különböző promoterekről keletkező NS és VP proteinek száma egymástól eltérő lehet. Például az AAV2 négy NS proteint és három VP proteint (Trempe et al. 1988), míg a PPV három NS és két VP proteint kódol (Bergeron et al., 1993). A promoterek száma szintén fajonként eltérő, az AAV-2 például négy promoterral rendelkezik (Hermonat et al. 1999) míg a B19 csak eggyel (Blundell et al. 1987). A PPV, csakúgy mint a parvovírus genusz minden tagja, két promoterral rendelkezik. A P5-ről átíródó mRNS-ek kódolják a három NS proteint. Ezek az RNS-ek mind policisztronosak, azonban az eukarióta RNS-ekre jellemzően csak az első cisztronok fordítódnak le fehérjévé. A P40 promoterről íródnak át a VP1 és VP2-t kódoló mRNS-ek. A VP3 a virion érése során, a már DNS-t tartalmazó kapszidon, a VP2 proteolitikus hasításával keletkezik (2. ábra).

A két nagy ORF-en kívül kisebb ORF-eket is azonosítottak néhány parvovírusban. A B19 parvovírusban például két kisméretű ORF található. Egyik az NS, a másik a VP ORF-jének 3' végével fed át. Mindkettőről bizonyították, hogy nagy mennyiségű poliadenilált RNS íródik át róluk, amelyekről kis 7,5 és 11,5 KD méretű fehérjék fordítódnak le (Luo et al. 1993, Fan et al. 2001). Az AAV2-ben szintén kimutattak egy viszonylag kisméretű ORF-et amely a 3922. és a 4388 (Hermonat 1999) nukleotidok között helyezkedik el és mRNS-sé íródik át. A parvovírusok között sok tekintetben egyedinek számító Aleutian disease virus (ADV) is tartalmaz két, egymással átfedő, rövid kódoló régiót a két nagy ORF-je között. Ezen ORF-ek funkciója kevésbé vagy egyáltalán nem ismert, sőt még funkciójuk létezése sem általánosan elfogadott a terület minden kutatója által.

Célkitűzés

Az ismert szekvenciájú parvovírusok viszonylag nagy száma lehetővé teszi, hogy összehasonlító szekvencia analízist használva tanulmányozzuk genomjukat, és jobban megértsük, hogyan képesek kijátszani a gazda védelmi rendszerét, korlátozott kódoló kapacitásuk ellenére. Ez a módszer alkalmas olyan közös genetikai tulajdonságok feltárására, amelyek egyelen vagy néhány vírus kísérletes megfigyelése során szükségszerűen rejtve maradnak, még az egyedi vírusukat legjobban ismerő kutatók számára is. PhD munkám során azt a célt tűztem ki, hogy feltárjak a parvovírusokra jellemző, még eddig fel nem ismert, közös genetikai bélyegeket, megismerjem, hogy mely tulajdonságok jellemzik a parvovírusok egyes taxonjait, és különböztetik meg őket másoktól. Sőt tovább menve ennél, megpróbáltam feltárni, hogy néhány evolúciósan konzervált szekvencia milyen biológiai funkciót takar.

Eredmények és megbeszélésük

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 Ca^{2+} 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 genuszból 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 ($(k_{cat}/k_M)_{app} = (71.9 \pm 9.4) \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$) volt aktívabb mint a B19 VP1_{up} ($(2.5 \pm 0.2) \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$) és közel négy nagyságrenddel mint a GmDENV VP1_{up} ($(0.4 \pm 0.03) \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$). 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 szignálként szolgáló első 10 aminosav deléciója a kalcium kötő hurok előtt minimális PLA2 aktivitás vesztéssel járt. Hasonló eredményt kaptunk az AAV2 VP1up-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 deléciós 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 VP1up kivételesen nagy PLA2 aktivitása lehetővé tette, hogy a kapszid fehérjékből közvetlenül mérjünk enzim aktivitást, és ezzel bizonyítsuk, hogy nem csak az expresszált VP1up de a natív VP1 protein is rendelkezik PLA2 aktivitással. Mivel a PPV VP1up 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 pontmutációkban 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 μM tetracaine és 13 μM 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 pakolásához a virionba. 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 sejbe. Annak tisztázására, hogy a virális foszfolipáz játszik-e szerepet ezekben a folyamatokban, két PPV mutánst jelöltünk S^{35} 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 laktátdehidrogenázzal 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 endoszómális 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 10⁴ feleslegben PLA2- mutánshoz adott 0,4 µM kígyó vagy méh méreg foszfolipáz, sem 1 µM *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 hírvivő 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 VP1_{up} régióval (2586-2831 nukleotid a V9 parvovírusban, Genbank azonosító: NC_004295.1) a *Dependovirus* genuszban a VP2_{up}-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 predikciós programok membránproteinek 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) inszertáltuk 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 fuzionáltatva, 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 calreticulin 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 változatlanul hagyva, valamint kideletáltuk a teljes helixet. Már 5 aminosav csere is kis mennyiségű SAT fehérje nukleáris megjelenéséhez vezetett, míg nagyobb mértékű cserék és a deléción teljesen megváltoztatták a SAT elhelyezkedését.

Eukariótákban általában az első AUG kodon iniciálja a transzlációt, 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 transzlációs 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 promoter 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 fehérjéket 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 transzlációjának 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-ről 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 transzlációra. Ez arra utal, hogy a két különböző méretű SAT fehérje egyetlen iniciációs kodonról transzlálódik és a különböző méret valószínűleg poszttranszlációs 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 szerin eredményez a VP2 második aminosavának helyén. Amikor a szerin kodonját AGT-ről TCA-ra cseréltük (M9), a SAT transzlációja nem változott, amikor azonban a szerin alaninra változtattuk (AGT-GCT csere (M7)), drámaian csökkent a SAT transzlációja, 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 vezettünk 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

vírúst eredményezett, azt bizonyítva, hogy a SAT legalábbis szövettenyészetben 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 transzfekciója után negyven órával viszonylag nagy kiterjedésű fertőzött plakkok találhatóak a szövettenyészetben. Ezzel szemben a mutánsok esetében ezek kiterjedése sokkal kisebb csak néhány sejtre korlátozódik. Amikor SAT⁻ mutáns infektív klónokat kotranszformáltunk SAT expresszázó 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 fehérjékkal, és valószínűleg egymagában is toxikus a sejtekre, mivel nem voltunk képesek stabil SAT expresszázó 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 enzimatikus 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 távolieső 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 aminosav 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 szövettényészetben nem eszenciális, de szerepet játszik a vírus kiszabadulásában a sejtől. Hiánya jelentősen lassítja a sejt lízist és a vírus terjedését.

Összefoglalás

21 gerinces parvovírus VP1 egyedi régiójának (VP1_{up}) 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* genusba sorolt ADV. Noha az ízeltlábúak parvovírusainak fő kapszidalkotó fehérjéi felismerhető homológiát nem mutatnak a gerincesek parvovírusainak hasonló fehérjéivel, ez a konzervált szakasz szintén megtalálható szinte minden Densovírus VP1_{up}-ján a *Brevidensovirus* genusz tagjainak kivételével.

Ez az evolúciós mértékkel mérve viszonylag nagyfokú stabilitás arra utalt, hogy ennek a szekvenciának valamilyen fontos biológiai szerepe lehet. Protein adatbankokból százas nagyságrendben találtunk szekretált foszfolipáz A2 enzimeket (sPLA2) amelyek gyenge homológiát mutattak ehhez a régióhoz.

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 *Escherihia Coli*-ban kifejeztettük fúziós proteinként 3 különböző genuszbol származó gerinces parvovírus (PPV, B19, AAV2) és egy denzovírus (GmDNV) VP1 egyedi régióját, majd megmértük PLA2 ativitásukat. Mind a négy protein katalitikusan aktívnek bizonyult. 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 GmDNV VP1_{up} ($(0,4\pm 0,03)\times 10^4 M^{-1}s^{-1}$).

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. A PPV kapszidot hővel vagy NaOH-val denaturálva a PLA2 domén hozzáférhetővé vált és szintén PLA2 aktivitást mutatott.

Az enzimaktivitás és a vírus fertőzőképessége is drámaian csökkentek amikor elmutáltattuk a katalitikus centrum aminosavjait (H41, D42 és D63). A PPV pontmutánsokban az enzimaktivitás csökkenése egyenes arányban állt a vírus fertőzőképességének csökkenésével ($R^2 = 0.898$). Tetracain és OP foszfolipáz inhibitorok szintén jelentősen gátolták a vírus fertőzést.

S^{35} -tel jelölt vírusokkal és immunohisztokémiai kísérletekkel bizonyítottuk hogy a virális foszfolipáz nem szükséges sem a PPV, sem az AAV2 endocitózisához, hanem valahol a késői endoszóma/lizoszóma és a mag közötti úton hat. Komplementációs kísérletek igazolták, hogy a PLA2 nem másodlagos hírvivő utak aktiválásával *transz* hat, hanem a virális DNS-nek *cisz* helyzetben kell lennie a vírus kapszidon lévő PLA2-vel a hatékony fertőzéshez.

A PLA2 domén többé-kevésbé az egész *Parvoviridae* családra jellemző. Azonban a genuszokon belül olyan genetikai bélyegek találhatóak, amelyek kizárólag csak az adott csoportra jellemzőek. Egy kis méretű ORF található a *Parvovirus* genus tagjainak genomjában, amely átfed a VP2 fehérje ORF-jének 5' végével. Ezt a kis ORF-et SAT-nak neveztük el. A SAT fehérjék elsődleges szekvenciája nem különösebben konzervált, azonban különböző topológia predikciós programok membránproteineknek jósolták őket.

Fúziós konstrukciókkal a GFP-t és FLAG-et a SAT leolvasási keretébe inszertálva bizonyítottuk, hogy a PPV SAT valóban keletkezik és az ER-ban lokalizálódik. Mutációkkal és deléciókkal bizonyítottuk, hogy a hidrofób α -helix a meghatározó faktor a SAT lokalizációjában.

Heterológ promoter szabályozása alatt pCDNA3.1 eukarióta expressziós vektorban fejeztettük ki a PPV VP1 és VP2 mRNS-ét és a termékeket Western blot-on tanulmányozva igazoltuk, hogy a

SAT a VP2 mRNS-ről íródik le. A SAT és a VP2 termelődésének 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-ről iniciálódik, egyenként elmutáltuk a három start kodont. Míg az első ATG kodon mutációja mindkét csík elvesztéséhez vezetett, addig a másik kettő megváltoztatása semmilyen hatással nem volt a transzlációra. Ez arra utal, hogy a két különböző méretű SAT fehérje egyetlen iniciációs kodonról transzlálódik és a különböző méret valószínűleg poszttranszlációs modifikáció eredménye.

A SAT PPV életciklusában betöltött szerepének vizsgálatára olyan mutáns vírusokat készítettünk, amelyek nem, vagy csökkentett mértékben expresszálták a SAT-ot. Ezek a mutánsok később lizálták a sejteket és sokkal lassabban terjedtek mint a vad típus. Annak igazolására, hogy a lassú fenotípus valóban a SAT elvesztése miatt alakul ki, komplementációs kísérletet végeztünk. A vad típusú SAT *trans* szolgáltatva komplementálta a mutáns vírusok fenotípusát, ami egyértelműen alátámasztja, hogy a lassú terjedés a SAT hiányának következménye.

Összefoglalásként elmondható, hogy a parvovírusok összehasonlító szekvencia és genom elemzése egy új enzimikus 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. Az enzimaktivitás eszenciális a vírus fertőzéshez, míg a SAT a sejtlízist és a vírus terjedést segíti elő. A dolgozatban tárgyalt felfedezések és kísérletek hozzájárulnak a parvovírusok jobb tudományos megismeréséhez, és jelentősen befolyásolják a területen jelenleg és jövőben folyó kutatásokat.

Summary

Sequence analysis of 21 *Pavovirinae* members revealed that they contain a 80 aminoacid conservative region in their VP1up. This domain also can be found on Densovirinae's VP1ups even though they have no homology to the Parvovirinae members in their major capsid component. This remarkable stability suggested that this region can be responsible for some kind of biological function.

Searching of protein databanks resulted hundreds of secreted phospholipase A2 (sPLA2) with weak homology to the region. However, the catalytically important amino acids in sPLA2 matched some of the conservative amino acids of the VP1up, which suggested that the parvoviral VP1 might have a PLA2 activity. Four VP1up polypeptides of parvoviruses (PPV, *GmDNV*, AAV and B19) from distant genera were expressed in order to demonstrate PLA2 activity. All the four had PLA2 activity though with remarkable differences. PPV VP1up showed almost three order higher activity ($(k_{cat}/kM)_{app}=(71.9\pm 9.4)\times 10^5 M^{-1}s^{-1}$) than B19 VP1up ($(2,5\pm 0,2)\times 10^4 M^{-1}s^{-1}$) and almost four order higher than *GmDNV* VP1up ($(0,4\pm 0,03)\times 10^4 M^{-1}s^{-1}$).

The core 80 amino acid domain did not show optimal activity, and an additional 30 amino acids outside of the conserved domain had a large impact on the PPV VP1up catalytic efficiency. Mutations in the catalytic amino acids reduced both the enzyme activity and the viral infectivity in a directly proportional manner ($R^2 = 0.898$). PLA2 inhibitors also inhibited the viral infection. Experiments with S35 and immunohistochemically labeled viruses proved that the viral PLA2 is not necessary for the binding or the entry into the cell, but act somewhere between the late endosome/lysosome and the nucleus. Complementation experiments showed that active viral PLA2 and infectious DNA are required in *cis* to obtain infection.

The PLA2 domain more or less a common genetic characteristics of the *Parvoviridae* family, however exclusive genetical features can be found in every genus. Genome analysis revealed a small, conserved alternative ORF overlapping the amino-terminal portion of the VP2 ORF of all members of the *Parvovirus* genus. We designated this ORF as small alternatively translated protein (SAT)-ORF.

The primary sequence of SAT proteins is not particularly conserved. However, all SAT proteins were predicted by different topology prediction programs to be membrane proteins. Insertion of GFP and FLAG into the SAT ORF demonstrated that PPV SAT protein is de facto translated from the ORF and is localised in the ER.

Mutations and deletions confirmed that a hydrophobic α -helix is the main determining factor of the confinement of SAT in the ER. Separate expression of the VP1 and VP2 mRNA of PPV fusion constructs under a heterolog promoter proved that SAT is translated from the VP2 mRNA. The ratio of the alternative translation of SAT was around 60% of the VP2 proteins.

Three methionines can be found in the PPV SAT-ORF and two different versions of SAT can be distinguished on the Western blot. These three methionines were mutated to investigate whether the SAT proteins are initiated at different AUGs. Mutation of the second and third AUG did not have any visible effect. However, mutation of the first AUG completely eliminated all protein translation from the SAT frame. This suggested that the multiple bands might be the result of posttranslational modifications rather than multiple initiations.

To investigate the role of SAT in the PPV life cycle, mutant viruses were created by introducing mutations which reduced or abolished SAT expression. These mutants lysed the cells later and spread slower than the wild type virus. Complementation experiments were done to test whether the “slow-spreading” phenotype of the SAT- mutants was really due to the loss of the

SAT. The SAT supplied in *trans* could complement the phenotype of the mutant virus demonstrating that the impaired spreading is the consequence of the loss of SAT.

The comparative sequence and genome analysis of the parvoviruses led to the discovery of a novel enzymatic domain and a novel protein among these viruses. The PLA2 is characteristic for almost the whole virus family while the SAT protein is an exclusive feature of the *Parvovirus* genus. The enzyme activity, the existence of SAT and their biological significance was proven experimentally. The viral PLA2 is essential for the productive virus infection, while the SAT facilitates the cell lysis and viral spreading. The discoveries and experiments discussed in this thesis contribute to the better understanding of the parvoviruses and have a high impact on the present and future research on the field.

Idézett irodalom

- Barbis, D. P., Chang, S. F., Parrish C. R. 1992 Mutations adjacent to the dimple of the canine parvovirus capsid structure affect sialic acid binding. *Virology*. **191**, 301-8.
- Bergeron, J., Hebert, B., Tijssen, P. 1996 Genome organization of the Kresse strain of porcine parvovirus: identification of the allotropic determinant and comparison with those of NADL-2 and field isolates. *J Virol*. **70**, 2508-15.
- Bergeron, J., Menezes, J., Tijssen, P.. 1993 Genomic organization and mapping of transcription and translation products of the NADL-2 strain of porcine parvovirus. *Virology*. **197**, 86-98.
- Berns K 1991 Parvoviridae and their replication in *Fundamental virology* second edition edited by Fields B.N. Knipe D. M. et al. Raven Press Ltd New York 815-37
- Blundell, M. C., Astell, C. R. 1989 A GC-box motif upstream of the B19 parvovirus unique promoter is important for in vitro transcription. *J Virol* **63**, 4814-23.
- Brown, K. E., Anderson, S. M., Young N. S. 1993 Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B19 parvovirus. *Science*. **262**, 114-7.
- Chelvanayagam, G., Heringa, J., Argos, P. 1992 Anatomy and evolution of proteins displaying the viral capsid jellyroll topology. *J Mol Biol*. **228**, 220-42.
- Cotmore, S. F., D'abramo, A. M. Jr, Ticknor, C. M., Tattersall P. 1999 Controlled conformational transitions in the MVM virion expose the VP1 N-terminus and viral genome without particle disassembly. *Virology*. **254**, 169-81.
- Dennis, E.A. 1997 The growing phospholipase A2 superfamily of polysignal transduction enzymes. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 1-2.
- Dijkstra, B.W., Drenth, J., and Kalk, K.H. 1981 Active site and catalytic mechanism of phospholipase A2. *Nature* **289**, 604-606.
- Di Pasquale, G., Davidson, B. L., Stein, C. S., 2003 Identification of PDGFR as a receptor for AAV-5 transduction. *Nat Med* **9**, 1306-12
- Fan, M. M., Tamburic, L., Shippam-Brett, C., et al. 2001 The small 11-kDa protein from B19 parvovirus binds growth factor receptor-binding protein 2 in vitro in a Src homology 3 domain/ligand-dependent manner. *Virology* **291**, 285-91
- Hermonat, P. L., Labow, M. A., Wright, R., et al 1984 Genetics of adeno-associated virus: isolation and preliminary characterization of adeno-associated virus type 2 mutants. *J Virol*. **51**, 329-39.
- Hermonat, P. L., Santin, A. D., De Greve, J., et al. 1999 Chromosomal latency and expression at map unit 96 of a wild-type plus adeno-associated virus (AAV)/Neo vector and identification of p81, a new AAV transcriptional promoter. *J Hum Virol*. **2**, 359-68
- Hueffer, K., Parker, J. S., Weichert, W. S., et al. 2003 The natural host range shift and subsequent evolution of canine parvovirus resulted from virus-specific binding to the canine transferrin receptor. *J Virol*. **77**, 1718-26.
- Kajigaya, S., Fujii, H., Field, A., et al. 1991 Self-assembled B19 parvovirus capsids, produced in a baculovirus system, are antigenically and immunogenically similar to native virions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **88**, 4646-50.
- Kozak, M. 1995. Adherence to the first-AUG rule when a second AUG codon follows closely upon the first. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 2662-2666.
- Kozak, M. 1999 Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* **234**, 187-208.

- Kronenberg, S., Bottcher, B., von der Lieth, C. W., et al. 2005 A conformational change in the adeno-associated virus type 2 capsid leads to the exposure of hidden VP1 N termini. *J Virol.* **79**, 5296-303.
- Luo, W., Astell, C. R. A novel protein encoded by small RNAs of parvovirus B19. 1993 *Virology.* **195**, 448-55
- Manjunath, P., Soubeyrand, S., Chandonnet, L., and Roberts, K.D. 1994 Major proteins of bovine seminal plasma inhibit phospholipase A2. *Biochem. J.* **303**, 121-128
- Martinez C, Dalsgaard K, Lopez de Turiso JA et al. 1992 Production of porcine parvovirus empty capsids with high immunogenic activity. *Vaccine.***10**, 684-90.
- Martz, E. 2002 Protein Explorer: Easy Yet Powerful Macromolecular Visualization. *Trends in Biochemical Sciences*, **27**, 107-109
- Meyers, C., Mane, M., Kokorina, N., et al. 2000 Ubiquitous human adeno-associated virus type 2 autonomously replicates in differentiating keratinocytes of a normal skin model. *Virology* **272**, 338-46.
- Parrish C. R. 1999 Host range relationships and the evolution of canine parvovirus. *Vet Microbiol.* **69**, 29-40.
- Qing, K., Mah, C., Hansen, J et al. 1999 Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2. *Nat Med.* **5**, 71-7
- Reddy, Natarajan, P., Okerberg, B., et al, (2001). Virus Particle Explorer (VIPER), a Website for virus capsid structures and their computational analysis. *J. Virol.* **75**, 11943-11947
- Rosenfeld, S. J., Yoshimoto, K., Kajigaya, S., et al. 1992 Unique region of the minor capsid protein of human parvovirus B19 is exposed on the virion surface. *J Clin Invest.* **89**, 2023-9.
- Rossmann M. G. 1993 The viral canyon. *Curr Biol.* **3**, 566.
- Saikawa, T., Anderson, S., Momoeda, M., et al. 1993 Neutralizing linear epitopes of B19 parvovirus cluster in the VP1 unique and VP1-VP2 junction regions. *J Virol.* **67**, 3004-9.
- Saliki, J.T., Mizak, B., Flore, H.P., et al. 1992 Canine parvovirus empty capsids produced by expression in a baculovirus vector: use in analysis of viral properties and immunization of dogs. *J Gen Virol.* **73** 369-74.
- Simpson, A. A., Chipman, P. R., Baker, T. S., et al. 1998 The structure of an insect parvovirus (*Galleria mellonella* densovirus) at 3.7 Å resolution. *Structure* **6**, 1355-67.
- Simpson, A. A., Hebert, B., Sullivan, G. M., et al. 2002 The structure of porcine parvovirus: comparison with related viruses. *J Mol Biol.* **315**, 1189-98.
- Sol, N., Le Junter, J., Vassias, I., 1999 Possible interactions between the NS-1 protein and tumor necrosis factor alpha pathways in erythroid cell apoptosis induced by human parvovirus B19. *J Virol.* **73**, 8762-70.
- Tattersall, P. (2005) The evolution of parvoviral taxonomy. In "*The Parvoviruses*", Kerr, J., Cotmore, S.F., Bloom, M.E., Linden, R.M., & Parrish, C.R., eds., Hodder Arnold, London, 2005, in press.
- Tattersall, P., Bergoin, M., Bloom, M. E., Brown, K. E., Linden, R. M., Muzyczka, N., Parrish, C. R., and Tijssen, P. (2005). Parvoviridae. In "*Virus Taxonomy, VIIIth Report of the ICTV*" (C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, and L. A. Ball, Eds.). Elsevier/Academic Press, London.
- Trempe, J. P., Carter, B. J. 1988 Alternate mRNA splicing is required for synthesis of adeno-associated virus VP1 capsid protein. *J Virol.* **62**, 3356-63.
- Tsao, J., Chapman, M. S., Agbandje, M., et al. 1991 The three-dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications. *Science* **251**, 1456-64.

Tullis, G. E., Burger, L. R., Pintel, D. J. 1993 The minor capsid protein VP1 of the autonomous parvovirus minute virus of mice is dispensable for encapsidation of progeny single-stranded DNA but is required for infectivity. *J Virol.* **67**, 131-41.

Vihinen-Ranta, M., Suikkanen, S., Parrish, C. R. 2004 Pathways of cell infection by parvoviruses and adeno-associated viruses. *J Virol.* **78**, 6709-14.

Vihinen-Ranta, M., Wang, D., Weichert, W. S., Parrish, C. R. 2002 The VP1 N-terminal sequence of canine parvovirus affects nuclear transport of capsids and efficient cell infection. *J Virol.* **76**, 1884-91.

Vihinen-Ranta, M., Yuan, W., Parrish, C. R. 2000 Cytoplasmic trafficking of the canine parvovirus capsid and its role in infection and nuclear transport. *J Virol.* **74**, 4853-9

A dolgozat alapját képező közlemények

Girod, A., Wobus, C. E., Zádori, Z., Ried, M., Leike, K., Tijssen, P., Kleinschmidt, J. A., Hallek, M. 2002 The VP1 capsid protein of adeno-associated virus type 2 is carrying a phospholipase A2 domain required for virus infectivity. *Journal of General Virology*. **83**, 973-8.

Zádori, Z., Szelei, J., Lacoste, M. C., Li, Y., Gariépy, S., Raymond, P., Allaire, M., Nabi, I. R., Tijssen, P. A viral phospholipase A2 2001 is required for parvovirus infectivity. *Developmental Cell*. **1**, 291-302.

Zádori, Z., Szelei, J., Tijssen, P. 2005 Identification and characterization of a novel porcine parvovirus protein. *Journal of Virology*. **79**, Issue 20

**A DOLGOZAT ALAPJÁT KÉPEZŐ
KÖZLEMÉNYEK**