

MTA doktori értekezés opponensi bírálatára adott válasz

Jelölt: dr. Bakonyi Tamás

Az értekezés azonosítója: dc_1462_17

Az értekezés címe: Csípőszúnyogok közvetítette flavivírus fertőzések Európában

Hivatalos bíráló: Dr. Kónya József, az MTA doktora

Tisztelt Bíráló!

Először is szeretném megköszönni értekezésem bírálatát és az opponensi véleményben leírt elismerő szavait! Elnézését kérem, hogy helyenként nem részleteztem a kutatást során alkalmazott módszereket olyan mértékben, mint ahogy az alapozó közleményekben szerepel! Mivel az MTA Agrártudományok Osztálya a doktori mű terjedelmét 80-150 oldalban határozza meg, értekezésem hossza már így is a maximumhoz közelít. Az értekezéssel kapcsolatos észrevételeire és kérdéseire a következő válaszokat szeretném adni:

Az első európai USUV izolátumra valóban többféle jelöléssel hivatkoztam a dolgozatban. A „939/01” a bécsi virológiai laboratóriumba 2001 őszén érkezett, feketerigó agyvelőminta iktatószáma (939. sorszám). Ebből a mintából izolálták a vírust, így a jelölés a visszavezethetőség szempontjából volt fontos. Az AT2001 vagy Vienna2001 jelölések általában a törzsfákon szerepelnek, ahol – az áttekinthetőség miatt – célszerűen rövidítéseket használtunk, a minta földrajzi eredete és a gyűjtés éve feltüntetésével. Az AY453411 a vírustörzs genomszekvenciájának az Amerikai Egyesült Államok Nemzeti Egészségügyi Intézete (National Institute of Health, NIH) által üzemeltetett Nemzeti Biotechnológiai Információs Központ (National Center for Biotechnology Information, NCBI) nyilvános genetikai adattárába (GenBank) elhelyezett, annotált szekvencia nemzetközi azonosítója (International Nucleotide Sequence Database Collaboration [INSDC] code). Ez alapján az azonosító alapján az együttműködő fenntartó intézmények (a DNA Data Bank of Japan [DDBJ], az European Molecular Biology Laboratory - European Bioinformatics Institute [EMBL-EBI] és az NCBI) génbanki adatbázisaiban kereshető és hozzáférhető a szekvencia. Az NC_006551 az NCBI által a fenti szekvenciából készített, az USUV referencia-genomként elismert (RefSeq) genom azonosítója.

Az USUV genetikai változatosságával és quasispecies jellegével kapcsolatban feltett kérdésére Benkő doktor kérdéseire adott válaszában részben kitértem. Egy vírusfaj genetikai vonalainak kijelölésekor (különösen DNS vírusok esetében) olykor valóban felismerhetők olyan jellegzetes, közös eltérések („genetikai vonal determináns nukleotid pozíciók”) amelyek alapján a szekvenciák könnyebben sorolhatók leszármazási csoportokba. Az általunk meghatározott és vizsgált USUV genomszekvenciák illesztéseit követően fel lehet ismerni szekvencia-csoportokat, amelyekben vannak közös nukleotid pozíciók. Ám kutatásaink során nem foglalkoztunk behatóan ezeknek az elemzésével. Amennyiben

csak néhány szekvenciát hasonlítottunk össze, nincs sok értelme genetikai vonalak elkülönüléséről beszélni. Nagyszámú szekvencia illesztésekor viszont a szekvenciák közötti hasonlóságok mértékének pontosabb meghatározása szükséges. Éppen erre szolgálnak a különböző filogenetikai analízisekhez használt biomatematikai – statisztikai modellek. A genetikai vonalakat a törzsfá-rekonstrukciós vizsgálatok eredményei alapján tudtuk elkülöníteni. A törzsfák elágazásai a vírustörzs evolúciója szempontjából fontos eseményeket jelölik. A genetikai vonalak – bár segíthetnek a vírus evolúciójának és földrajzi terjedésének nyomon követésében – nem taxonómiai kategóriák. Az egyes kutatók (önkéntesen vagy konszenzusosan) jelölik ki azokat az evolúciós folyamatok pontosabb jellemzéséhez.

A szerológiára vonatkozó kérdésre adott válaszomban elsőként azt szeretném leszögezni, hogy a flavivírusok antigénszerkezetével és az ellenanyagok működésével kapcsolatos ismereteink – évtizedek kitartó és részletes kutatási ellenére – még mindig hiányosak. Azt régóta tudjuk, hogy a flavivírusoknak az E burokképlete a legfontosabb felszíni antigénje. Egyes kutatások eredményei arra utalnak, hogy az E-fehérje specifikus ellenanyagok funkcionálisan két csoportra oszthatók. Az egyik csoporthoz a homológ vírust és azzal közeli antigén-rokonságban álló vírusokat neutralizáló hatású ellenanyagok tartoznak. A „közeli antigén rokonság” kb. 60-70%-os E fehérje aminosav-szekvencia azonosságot jelent. A másik csoportba sorolható ellenanyagok gátolják a haemagglutinációt, és a kevésbé hasonló (akár <40% aminosav-szekvencia azonosságú) E fehérjék esetében is keresztreakálnak (szerocsoport-specifikus ellenanyagok). Az utóbbiak viszont nem mutatnak jelentős vírusneutralizáló aktivitást (Stiasny et al., 2006). A flavivírusok neutralizációja nem csupán abból áll, hogy az ellenanyagok gátolják a vírusreceptor sejt-receptorhoz kötődését. Az ellenanyagok szerepet játszanak az endocitózis gátlásában és az endoszómában bekövetkező E fehérje konformációs folyamatok megzavarásán át a membránfúzió megakadályozásában is (Pierson és Diamond, 2008; Heinz és Stiasny, 2017). A sikeres neutralizációhoz különböző típusú ellenanyagok keverékének a „kritikus mennyisége” szükséges (Pierson et al., 2007). Emiatt a kétféle szerológiai próba során igazából nem ugyanazokat az ellenanyagokat mutatjuk ki illetve határozzuk meg a mennyiségüket. Ezért nincs sok értelme annak, hogy a két módszer során kapott titerértékeket nominálisan egymáshoz hasonlítsuk. Az immunválasz fő jellemzői és tendenciái hasonlíthatók össze; például ha több savót vizsgálunk, az a savó amelyik az egyik módszerrel magasabb titerűnek mérhető a többinél, általában a másik módszerrel is magasabb ellenanyag-titerű. Továbbá, a szerokonverzió során mindkét módszernél megfigyelhető a legalább két kitevőnyi titeremelkedés. De a határértékek meghatározása és az eredmények interpretálása mindkét rendszerben önállóan, megfelelő pozitív és negatív kontroll savók alkalmazásával lehetséges.

Az USUV genomszekvencia meghatározásához a következő módszert / sémát alkalmaztam:

1. A JEV-szerokomplex vírusainak 2002-ben hozzáférhető genomszekvenciáit (WNV, JEV, MVEV) illesztettem egymáshoz. Kerestem olyan szakaszokat, ahol a három szekvencia megegyezett, vagy csak néhány nukleotidban tért el.

2. Ezekre a szakaszokra tapadó (gyakran degenerált) primereket terveztem, hogy a teljes genom területét lefedő, és egymással átfedő termékeket képezzenek a PCR-ek során („JEV-komplex specifikus” primerek).
3. Elvégeztem a PCR-eket az USUV törzseken; ahol képződött termék, annak meghatároztam a szekvenciáját.
4. A szekvenciák BLAST azonosítása után a flavivírushoz hasonlókat (USUV-specifikusakat) a referencia WNV szekvenciához illesztettem.
5. Ahol az USUV szekvenciák nem fedtek át, további primereket terveztem, az USUV már meghatározott szakaszai alapján. (Az egyik szekvencia 3' végéhez közel genomikus [forward], az azt követő szakasz 5' végéhez közel komplementer [reverz] primert.) Ezeket neveztem „USUV-specifikus” primereknek.
6. Az USUV-specifikus primerekkel képzett PCR termékek szekvenciáját is meghatároztam és a WNV referenciához, valamint a már meghatározott USUV szakaszokhoz illesztve alakítottam ki az átfedő szakaszok alapján összeállított, teljes szekvenciát.
7. Ahol a PCR termék mérete miatt nem lehetett a végekből kiinduló primerekkel, két független szekvenáló reakcióban megállapítani a szekvenciát, ott vagy a már meghatározott szakaszok alapján szekvenáló primereket terveztem és azokkal végeztem további szekvenálásokat (pl. e-f jelű primerek a 2. táblázatban), vagy rövidebb szakaszokat amplifikáltam és utána határoztam meg a szekvenciáikat. Ritkán, de az is előfordult, hogy ugyanabban az irányban ismételten meghatároztam a szekvenciát a verifikációhoz.
8. Amennyiben primerek az USUV valamelyik törzsének genomjához nem tapadtak, vagy nem lehetett a terméket szekvenálni, az 5.-7. pontban leírt lépések szerint, az adott törzs specifikus szekvenciái alapján tervezett, további primerekkel erősítettem fel majd határoztam meg a hiányzó szekvenciákat.

Összességében az értekezésben bemutatottnál jóval több primert terveztem és próbáltam ki, de csak azokat ismertettem a publikációkban és az értekezésben, amelyek tapadtak az USUV genomra és szekvenálható termékeket eredményeztek. Ugyanezt a módszert használtam a különböző WNV szekvenciák meghatározásához is (gyakran a JEV-komplex specifikus primereket bevonásával).

Egyetértek Bírálóm megjegyzésével, hogy ezzel a módszerrel, szigorú értelemben véve nem lehet a teljes genomot meghatározni, mivel a szélső primerek szekvenciáit magunk jelöljük ki és adjuk a rendszerhez. A flavivírusok esetében a genom terminális, nem kódoló szekvenciáinak különös jelentősége van. Az 5' végen a vírus NS5 fehérjéjének N-terminális részén helyezkedő, metiltranszferáz aktivitású katalitikus központja 1-es típusú (m7GpppAmG) metilsapkát alakít ki, ami a gazdasejt mRNS-éhez teszi hasonlatossá a vírusgenomot és ezzel válik lehetővé a közvetlen transzláció. A genom 3'-végi része az NS5 fehérje C-terminális részén helyezkedő, RdRp enzimje számára iniciációs pont, ami a genom replikációhoz szükséges. Emiatt a flavivírus genomok terminális szerkezete megtartott és szekvenciái még a különböző vírusfajokban is nagyon hasonlóak. A teljes

vírusgenomhoz (11064 nt) viszonyítva a szekvenálási módszerrel pontosan meg nem határozott végi szakaszok hossza (2×20 nt) elenyésző, ezért tekintettük a szekvenciákat teljes genomszekvenciáknak. A végi részek meghatározására pl. a RACE módszert (rapid amplification of cDNA ends) lehetett volna alkalmazni, de nekünk erre nem volt lehetőségünk. Előfordult olyan helyzet is, hogy – ismételt próbálkozások ellenére – hosszabb végi szakaszokat sem tudtunk meghatározni, mivel nem tapadtak a terminális primerek. Ilyenkor a teljes kódoló szakasz („coding-complete”) megnevezéssel helyeztük el a szekvenciát a génbankban és így hivatkoztunk rá a közleményekben. Elméletileg nem lehet azt kizárni, hogy az USUV genomja hosszabb, mint amit mi leírtunk. Ugyanakkor, egyrészt a korábban említett, szerkezeti sajátosságok miatt ennek kicsi a valószínűsége; másrészt, más kutatócsoportok, tőlünk függetlenül és más módszerek (pl. RACE) segítségével határozták meg további USUV-k genomszekvenciáit, és ők sem számoltak be az általunk leírtakon „túlnyúló” szekvenciákról.

A kutatásaink során kifejlesztett TaqMan real-time RT-PCR módszerek előnye a hagyományos, gél-alapú RT-PCR-hez képest a specifikusság, a gyorsaság és a kvantifikálhatóság. Nagy hasznát vettük például a szúnyogminták USUV vagy WNV fertőzöttségének vizsgálatakor. A hagyományos, különösen a „JEV-szerokomplex specifikus” (degenerált) primerekkel ugyanis a szúnyogmintáknál nagy számban képződtek aspecifikus amplifikációs termékek. Emiatt nehéz volt az eredmények egyértelmű elbírálása. (A termékeket sokszor nem lehetett kellő mennyiségben és/vagy tisztaságban kinyerni a gélből, és így szekvencia-meghatározásuk sem járt sikerrel.) Mivel a TaqMan eljárásnál alkalmazott próba DNS tapadása nagyon specifikus (már néhány szubsztitúció esetén sem tapad), csak a specifikus vírus-nukleinsav jelenlétét mutatja ki. Emellett a módszer olyan esetekben használtuk, amikor célzottan az USUV RNS jelenlétét kívántuk kimutatni. Például az univerzális primerekkel pozitív mintákat szimultán vizsgáltuk USUV és WNV specifikus, TaqMan valós idejű RT-PCR módszerrel a kórokozó fajsztípus azonosítására. A módszert sikerrel alkalmaztuk archivált kórszöveti mintákon is a vírus RNS kimutatására. Az Olaszországban, 1996-ban tapasztalt tömeges feketerigó-elhullások során gyűjtött szervmintákat formalinnal fixálták, majd paraffinba ágyazottan tárolták. Több mint 15 év után nyílt lehetőségünk a minták vizsgálatára. Ennyi idő alatt általában a nukleinsav jelentős része töredezik, degradálódik. A real-time PCR egyik további előnye, hogy viszonylag rövid, a mi esetünkben 74 bp méretű terméket amplifikál, így a töredezett nukleinsavat is nagyobb eséllyel mutatja ki. Ilyen rövid terméket hagyományos, gél alapú PCR-rel nehezebb egyértelműen kimutatni, mivel ebben a mérettartományban gyakran képződhetnek nem specifikus, pl. primerek spontán összekapcsolódásával képződő DNS fragmentumok is.

Azt, hogy melyik módszert használjuk a diagnosztikában, elsősorban a minta jellege és a vizsgálat célja határozza meg. Gyors, célzott és/vagy kvantitatív vizsgálatra a real-time módszert ajánlanám. Ha a mintában egyaránt előfordulhat USUV és WNV fertőzés, az univerzális primerek alkalmazása a szerencsésebb választás. Persze, minél többféle diagnosztikai módszert használunk, annál nagyobb a pontos diagnózis felállításának esélye.

Köszönöm idejét, szaktudását és figyelmét, amelyet értekezésem szakmai bírálatának szentelt és tisztelettel kérem válaszaim elfogadását!

Köszönettel és üdvözléssel,



Bakonyi Tamás
doktorjelölt

Az opponensi bírálatára adott válaszban hivatkozott irodalom:

- Heinz FX, Stiasny K. (2017) [The Antigenic Structure of Zika Virus and Its Relation to Other Flaviviruses: Implications for Infection and Immunoprophylaxis](#). Microbiol Mol Biol Rev. 81(1). pii: e00055-16.
- Pierson TC, Diamond MS. (2008) [Molecular mechanisms of antibody-mediated neutralisation of flavivirus infection](#). Expert Rev Mol Med. 10:e12
- Pierson TC, Xu Q, Nelson S, Oliphant T, Nybakken GE, Fremont DH, Diamond MS. (2007) [The stoichiometry of antibody-mediated neutralization and enhancement of West Nile virus infection](#). Cell Host Microbe. 1(2):135-145.
- Stiasny K, Kiermayr S, Holzmann H, Heinz FX. (2006) [Cryptic properties of a cluster of dominant flavivirus cross-reactive antigenic sites](#). J Virol. 80(19):9557-9568.