

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. Benkő Mária, az MTA doktora

Tisztelt Bíráló!

Nagyon szépen köszönöm, hogy megtisztelt azzal, hogy MTA doktori értekezésemet figyelmesen elolvasta, részletesen elemezte, feltárta hiányosságait és hibáit, ám összességében elismerő és támogató bírálatot adott! Köszönöm erre fordított idejét és energiáját; hálás vagyok érte! A bírálatban megfogalmazott észrevételek felhívják a figyelmemet arra, hogy még a legjobb szándékkal és fokozott figyelemmel elkészített munkáimban is bőven lehet javítani valót találni. A megállapítások túlnyomó többségével egyetértek; az alábbiakban néhányra szeretnék rövid magyarázatot adni.

Elnézést kérek az értekezés sivár szerkesztése miatt! A doktori munka elkészítésekor – a publikációk kéziratához hasonlóan – a tartalomra koncentráltam. (A tipográfia egy másik szakma. Magam részéről még a fejezetek négy szintű tagolását is túlzásnak tartottam.)

Azzal kapcsolatban nekem is kétségeim voltak, hogy melyik publikációk anyagát vegyem be az értekezésbe. Itt egyrészt az MTA Agrártudományok Osztályának doktori követelményrendszerében megfogalmazott szempontokat vettem figyelembe, amelyek előírják azt, hogy hány és milyen szerzői pozíciójú közleményre kell alapulnia az értekezésnek. Másrészt, az volt a célom, hogy az értekezés elkészítése ne csupán azért történjen, hogy doktori pályázatom indoklását alátámassza, hanem az esetleges érdeklődők számára magyar nyelven elérhető, átfogó és naprakész tudományos adatokkal szolgáljon a csípőszúnyogok által terjesztett flavivírusokról. Lehetséges, hogy egy rövidebb értekezés összeszedettebb és egységesebb lett volna, de esetleg olyan szempontok hiányoztak volna belőle, amelyek más szakértőkben (bírálóknak) hiányérzetet keltettek volna, és akkor arra irányult volna a kritika. Hozzá tartozik az is az igazsághoz, hogy a dolgozatban bemutatottak nem fedik le teljesen a két vírussal kapcsolatban az utóbbi 17 évben végzett kutatásainkat. A nem részletezett kutatási témák az értekezés 48. oldalán említésre kerülnek.

Elnézést kérek a gépelési és helyesírási hibákért! Sajnos abban az esetben, ha a hibásan leírt szónak egyébként van értelme, a helyesírás-ellenőrző program mit sem ér. Sajnos a kétujjas gépelés botlásainak felismerését olykor a szerzői szövegvaktság akadályozta. Feltárával jelleggel bevallom azt is, hogy az értekezés általam véglegesnek szánt formáját öt kollégám olvasta át és javította mind szakmai, mind helyesírási és nyelvtani szempontból. Mindegyiküknek volt bőven módosítási javaslata. Így elképzelhető, hogy milyen volt az eredeti munkám.

A „feltételezett nyitott leolvasási keret” kifejezést a „putative open reading frame” magyar fordításaként használtam. A szóhasználat logikája, hogy a +ssRNS vírusok nukleinsav-szekvenciát, a tripletek miatt, elméletileg háromféle keretben („frame”-ben) lehet leolvasni. Ezek közül az a keret, amiben a riboszómák felszínén a valóságban végbemegy a vírusfehérjék transzlációja a nyitott leolvasási keret. Kutatásaink során viszont a vírusfehérjék aminosav-szekvencia meghatározását nem végeztük el. Ennek megfelelően azt nem vizsgáltuk, hogy az általunk meghatározott vírusgenomokban valóban arról a transzlációs iniciációs pontról indul-e meg a vírus poliprotein prekursor szintézise, ahonnan mi az aminosav-szekvenciára fordítást végeztük. Ezt rokon flavivírusok nukleotid- és aminosav-szekvenciáinak azonossága alapján feltételeztük.

A szekvencia „hasonlóság” és „azonosság” szak kifejezések vonatkozásában sajnos nem voltam arra tekintettel, hogy ezek már a magyar szóhasználatban is olyan egyértelműen elkülönülnek, mint az angolban. Az aminosav-szekvenciáknál, ennek megfelelően, az értekezésben valójában azonosság értékek szerepelnek. Az aminosavak jelölésénél valóban mindhárom írásmód előfordul, viszont az adott szövegkörnyezetben egyértelmű, hogy miről van szó. Úgy vélem, hogy a Nemzetközi Elméleti és Alkalmazott Kémiai Szövetség (International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC) aminosavak rövidítésére használt kódjai olyan általános biokémiai ismeretek, amelyek joggal várhatók el az értekezés olvasóitól; ezért nem tartottam indokoltnak a kódokat magyarázó táblázat szerepeltetését az értekezésben.

A vírusfajok hivatalos neveit (dőlt betűvel, angolul) és elfogadott rövidítéseit az 1. táblázatban soroltam fel. Ezt a rövidítések jegyékénél jeleztem.

Az Irodalmi áttekintés fejezetbe elsősorban azért nem helyeztem flavivírust ábrázoló elektronmikroszkópos képet, mert saját kutatásaink során ilyen nem készült, és nem szerettem volna azzal szerzői jogokat sérteni, hogy valaki más képét szerepeltetem, még a forrás feltüntetése mellett sem. Nem mellesleg, a flavivírusok elektronmikroszkópos képe nem túl látványos. Remélem, hogy a nyilvános vita előadása kárpótolja Bírálómat az értekezésben hiányolt ábrák vonatkozásában.

Az eredmények ismertetése során határozott célom volt az, hogy egyértelműen köthetők legyenek a megalapozó közleményekre. Ezért az ábrákat és táblázatokat gyakran az eredeti közleményekből vettem át. A kutatások éveit alatt egyre több és több információt gyűjtöttünk, és azok gyakran szervesen egymásra épültek. A törzsfa-rekonstrukciós ábrák mindig az adott szakaszban tárgyalt szekvenciákat emelik ki a vizsgálatok idején ismert további szekvenciákhoz viszonyítva. Az „egy, nagy, közös fa” koncepciót sajnos azért sem lehetett volna alkalmazni, mert olykor teljes genomok, máskor pedig – különböző genomszakaszok alapján készített – részleges szekvenciák számításaira alapultak a törzsfa-rekonstrukciók. Egyes törzsfákon valóban láthatók identikus szekvenciák. Ezeknek a szerepeltetésével kétféle célunk volt. Bizonyos esetekben azt kívántuk bemutatni, hogy a filogenetikai számítás olyan genomterület szekvenciája alapján történt, ahol a genetikai változatosság viszonylag csekély, és ezért azoknak a vírusoknak a szekvenciái, amelyek a teljes genom alapú törzsfákon egyértelműen elkülönülnek, a vizsgált területen identikusak (pl. 5. vs. 4. ábra). Más

esetekben azt szeretnénk volna kihangsúlyozni, hogy a vizsgált szekvenciák – bár különböző időpontban, földrajzi helyen vagy gazdafajból kerültek kimutatásra – azonosak, így valószínűsíthető köztük a járványtani kapcsolat (tehát az esetek nem egymástól független behurcolások eredményei) (pl. 26. és 27. ábra).

Az USUV genomszerkezetét, a származtatott aminosav-szekvenciákban a diszulfid hidak kialakításában résztvevő cisztein reziduumok, valamint az egyes enzim motívumok, továbbá a két vírustörzs aminosav-eltéréseinek helyeződését a szövegben ismertettem. Az ábra csak a szöveg illusztrálását szolgálja. Eredetileg jóval nagyobb méretben és felbontásban készült (3471×1006 képpont), ám a több mint 10.000 nukleotid méretű genom áttekintése A4-es lapszélességen valóban kihívásokat támaszt az olvasóval szemben.

Az USUV patogenitásának meghatározására irányuló, szopósegerekben, házityúkban és házilúdiban végzett kísérletek eredményeinek ismereténél valóban röviden ismételtem az Anyag és módszer fejezetben leírtakat. Ezt azért tartottam indokoltnak, hogy az olvasó könnyebben megértse a különböző kísérleti beállításokat, ne kelljen visszalapoznia korábbi fejezethez. Az egérkísérletben feltárt ellentmondások tisztázására ellenőriztem az eredeti jegyzőkönyveket. A kísérletet 2003. 03. 20.-án indítottuk, amikor 28 szopósegeret fertőztünk fejenként 1000 TCID₅₀ vírussal és 14-et oltottunk vírusmentes tápfolyadékkal. Jellegzetes idegrendszeri tüneteket először 03. 26.-án (DPI 6) láttunk; viszont a kórszövettani és immunhisztokémiai vizsgálatok már a 25.-én (DPI 5) feldolgozott, fertőzött egerek agyában is kimutattak elváltozásokat és vírusszaporodást. Az utolsó fertőzött egér 04. 01.-én (DPI 12) került feldolgozásra. A spontán elhullások időpontjait valóban hibásan, egy nappal korábbiként adtuk meg. Sajnos, több mint 15 év elteltével, már nem tudom felidézni, hogy mi lehetett ennek az oka.

Sajnálom azt is, hogy az értekezés elektronikus változata nem állt Bírálóm rendelkezésére. Az MTA doktori szabályzatának megfelelően minden dokumentumot elektronikus formában is feltöltöttem a doktori eljárás internetes rendszerébe. (Ez a pályázat egyik formai követelménye volt.) Emellett, ha értesültem volna a problémáról, szívesen Bírálóm rendelkezésére bocsátottam volna az elektronikus verziót is, a további hibák feltárásának elősegítésére. (Bár már az eddig felsorolt hibák is meggyőzően bizonyítják Bírálóm figyelmességét és magam slendriánságát.)

A hiányosságok között kerül említésre, hogy a csirkeembrió-oltási kísérlet leírása nem szerepel az Anyag és módszer és Megbeszélés fejezetekben. Tekintettel arra, hogy a hatályos állatvédelmi szabályok szerint az embriók nem minősülnek állatnak, az említett módszert a 2.5 Vírusizolálás fejezetben ismertettem, kilenc soron át. A Megbeszélés fejezetben a 127. oldalon a következő mondat szerepel: „Az USUV izolálására vizsgálataink alapján a csirkeembriók nem alkalmasak, a libaembriók viszont igen.” A beoltott csirkeembriók későbbi RT-PCR vizsgálatai pozitív eredménnyel zárultak. De ezt az eredményt nem lehetett egyértelműen elbírálni, hiszen magunk oltottuk be a vírust a tojásokba, és mivel a kutatás időpontjában még nem rendelkezünk kvantitatív, real-time PCR módszerrel, nem tudtuk azt megállapítani, hogy reziduális oltóvírust mutattunk-e ki, vagy volt vírusszaporodás. A

publikációban valóban hibásan szerepel a mértékegység. Ellenőriztem a 2005. január 4.-én visszaküldött proof-ot. Abban még a helyes mértékegység szerepelt. Így a hiba már hatókörünkön kívül történt. Azt viszont, hogy melyik liba pusztult el a környezetgazdagító játékba akadva, valóban én fordítottam hibásan.

Köszönöm Bírálómnak, hogy figyelmembe ajánlotta a három közleményt! Ezek közül kettő a WNV egyes genetikai vonalhoz tartozó törzseinek szaporodási és quasispecies tulajdonságait ismerteti. A Dridi és munkatársai által írt közleményben a WNV egy Izraelben izolált törzséből előállított fertőző klónból kifejezett vírus szaporodását és genetikai változatosságát vizsgálták kormos varjak (*Corvus corone*) kísérletes fertőzésével. A kísérlet négy napja alatt gyűjtött vérmintákból kimutatott vírusok nukleotid sorrendjeit új generációs szekvenálással határozták meg. Megállapították, hogy az eredeti klón szekvenciája nagyobb változatosságot mutatott a varjak s.c. fertőzését követően, mint naposcsirkék intracerebrális oltásakor. Grubaugh és munkatársai a korábbi közleményben használttal közeli rokonságban álló, amerikai WNV izolátumból származó, fertőző klónból kifejezett vírus quasispecies képződését vizsgálták rövidcsőrű varjúban (*Corvus brachyrhynchos*), házi verébben (*Passer domesticus*) és vándorrigóban (*Turdus migratorius*). Több passzázs, új generációs szekvenálásának összehasonlításával eltéréseket találtak a különböző gazdafajokban a vírus genetikai változatosságának mértékében. Ezek a kutatások rámutatnak arra, hogy a különböző madárfajokban a WNV fertőzés nem csak a szaporodás intenzitásában és a viraemia időtartamában, hanem az utódvírusok genetikai változatosságában is eltér. Ez is alátámasztja, hogy szükséges volna a természetes gazdafajok körének és jelentőségének minél pontosabb megismerése. Sajnos nekünk nem álltak rendelkezésre eszközök és források ilyen jellegű kísérletek elvégzésére. Viszont – az értekezésben nem ismertett kutatásaink eredményeképpen – már hozzáférhető a hazai izolálású WNV törzséből előállított, fertőző klón, amellyel ennek a vírusnak a quasispecies tulajdonságait is vizsgálni lehetne. Az Iyer és Kousoulas által írt közlemény a WNV elleni vakcina-fejlesztési törekvéseket összefoglaló szemleciikk. Mivel, WNV vakcina-fejlesztéssel kapcsolatos saját kutatásaink nem szerepelnek az értekezésben, valamint az értekezés írása során törekedtem arra, hogy a szemleciikk helyett az eredeti publikációkra hivatkozzak, ez a hivatkozás valóban nem került be az irodalomjegyzékbe.

Az USUV *in vitro* gazdasejt spektrumának meghatározására irányuló vizsgálatainkkal kapcsolatos kritikával annyiban egyetértek, hogy valóban lehetett volna még több passzázzsal, még pontosabban jellemezni azt, hogy a vírus milyen sejtekben, milyen intenzitással szaporodik. Mentségül azt hozom fel, hogy a vizsgálatok idején (2004-ben) még nagyon kevés tudományos adat állt rendelkezésre az USUV tulajdonságaival kapcsolatban. A publikáció célja az volt, hogy támpontot adjunk a diagnosztikai laboratóriumoknak, hogy milyen sejtvonalak / szövettényészetek fertőzésével van a legnagyobb esélye a vírus sikeres izolálásának. Felhívtuk a figyelmet arra is, hogy az egymást követő passzázsokban a vírus citopatogén hatása csökken, akár el is tűnik, bár a vírusszaporodás fennmarad. Ez nem jelenti azt, hogy az említett sejtek ne lennének alkalmasak az izolálásra, csupán arra hívja fel a

figyelmet, hogy a fenntartásra, vírusneutralizációs próba végzésére, vagy nagyobb mennyiségű vírusszuspenzió előállítására csak bizonyos sejttípusok alkalmasak. Az MOI 3 magyar megfelelőjeként használt „háromszoros mennyiségével” valóban pontatlan, mivel nem fejezi ki, hogy a sejtek számához viszonyítottan adtuk háromszoros mennyiségben a vírusokat; vagyis hogy egy sejtet (átlagosan) három vírus fertőzött. Bár a javasolt „háromszoros intenzitásával” változatot sem érzem sokkal találóbbnak vagy kifejezőbbnek.

Az USUV kimutatására alkalmas, klasszikus virológiai, molekuláris biológiai és szerológiai alapú diagnosztikai módszerek kifejlesztésével kapcsolatos kutatások eredményeinek eltávolítása az új tudományos eredmények közül számomra elfogadható, hiszen ezek igazából csak mások által korábban kifejlesztett technikák adott vírusra adaptálását jelentették. Azt azért megjegyezném, hogy ezek a kutatások alapozták meg az USUV specifikus diagnosztikáját, és ami 15 év távlatából oly egyszerű folyamatnak tűnik, az akkoriban, egy lényegében ismeretlen kórokozó első jellemzéseként, tartogatott kihívásokat és szakmai örömeket is.

Ismételten köszönöm Bírálómnak értekezésem részletes elemzését és a jobbitó szándékú megjegyzéseket, feltárt hiányosságokat! Itt ragadnám meg arra is az alkalmat, hogy köszönetet mondjak azért a sok-sok szakmai segítségért és emberi támogatásért, amit virológusi pályám kezdete óta tőle kaptam. Tanácsai nagy szerepet játszottak virológiai szemléletem formálódásában. Köszönöm, hogy bírálóként is a legmagasabb színvonalon, tanácsaival segítette kutatómunkám értékelését és támogatta pályázatom nyilvános vitára bocsátását!

A bírálatban feltett kérdéseire a következő válaszokat adom:

1.: Az RNS vírusok „quasispecies” jellege széles körben elfogadott nézet. A fogalom megértéséhez először talán a vírusfaj meghatározására van szükség. A Nemzetközi Virustaxonómiai Bizottság (ICTV) definíciója szerint: “a virus species is a polythetic class of viruses that constitute a replicating lineage and occupy a particular ecological niche”, vagyis a vírusfaj a vírusoknak olyan, közös jellemzőkre alapuló (politetikus) csoportja, amelynek tagjai leszármazási vonalat képeznek és sajátos ökológiai teret foglalnak el. Már ebből a definícióból is kitűnik, hogy a vírusfaj tagjai nem egységesek. (Ahogy az emberi fajhoz tartozó egyedek sem egységesek.) Így nyilván nem lehet őket egyetlen genomszekvenciával jellemezni. Amit a mintából (akár csak egyetlen vírushordozó sejtől) kimutatunk, az virionok és vírusgenomok sokasága. Az RdRp enzim viszonylagos pontatlansága miatt mindegyik replikáció során előfordulnak mutációk. Az általunk használt nukleinsav-sokszorozó eljárás (RT-PCR) a kevert víruspopuláció nukleinsavát szaporítja fel. A felszaporítás – leszámítva a primerek tapadási helyén bekövetkező mutációk miatti gyengébb tapadást – önmagában nem szelektív. A Sanger-féle szekvenálási módszernél az adott pozícióban előforduló nukleotid-változatok közötti mennyiségbeli eltérésekre leginkább a kapilláris gélelektroforézis során kapott kromatogram hullámainak tanulmányozásával tudunk következtetni. Ha hasonló méretű hullámokat tapasztalunk, az arra utal, hogy a vizsgált mintában, az adott ponton különböző nukleotidok voltak a szekvencia-keverékben. Ez a filogenetikai vizsgálatok céljára végzett szekvencia-meghatározások során inkább

zavaró tényező, ezért ilyenkor a „domináns” nukleotidot (a legmagasabb hullámnak megfelelőt) szokás kiválasztani. Kutatói pályám során foglalkoztam már olyan vírussal (a mézelő méh szárnydeformitását okozó vírus, *Deformed wing virus*, *Iflaviridae*, *Iflavirus*) amely esetében számos minta szekvenálása során, jellegzetes lókuszokon dimorfizmust találtunk (egyenlő magasságú hullámok a kromatogramban), olyannyira, hogy „domináns” nukleotidot nem lehetett meghatározni. Kutatásaink során USUV szekvenciák százait ellenőriztem. Természetesen, gyakran fordultak elő olyan esetek, hogy a domináns hullám „alatt” más nukleotidokra utaló hullámokat is láttam a kromatogramon. De ezeknek az elemzésére nem fordítottam külön figyelmet, mivel a domináns nukleotidtypust az esetek túlnyomó többségében egyértelműen meg lehetett határozni. A figyelmembe ajánlott közlemények leírnak olyan módszert, amellyel a vírus quasispecies tulajdonságát hatékonyabban lehet vizsgálni. Amennyiben sikerül ilyen kutatásra támogatást szerezni, illetve az USUV fertőző klónját előállítani, minden bizonnyal ennél a vírussal is pontosabban lehet jellemezni a quasispecies jelet.

2. Az USUV fertőzési kísérletek során valóban csak néhány madárból és alacsony titerben lehetett ellenanyagokat kimutatni HAG próbával. Egy csirkénél és egy libánál kaptuk azt az eredményt, hogy az első minta 1:40-es a második 1:20-as titert mutatott. Ez a gyakorlatban azt jelentette, hogy a savók 1:10-es alaphígítását követően készített felező hígítási sor első kettő, illetve első hígításainál lehetett haemagglutináció gátlást megfigyelni. Ilyen alacsony titerenél ez még a módszer hibahatárán belüli eltérésnek tekinthető. A szerokonverzió feltétele a legalább négyszeres titeremelkedés. A vizsgált savók esetében ilyen egyértelműen nem tapasztaltunk, ezért arra a következtetésre jutottunk, hogy a vírusok nem szaporodtak olyan mértékben a madarakban, hogy az jelentős humorális immunválaszt váltott volna ki.

3. Az állatkísérletekben használt oltóvírus mennyiségének meghatározásakor csak fenntartásokkal lehet abból kiindulni, hogy a szúnyogcsípés során milyen mennyiségű vírus jut be a gazdába. Több kutatás is kimutatta, hogy a szúnyogsejtekben szaporodó flavivírusokban eltér az E burokfehérje glikozilációs mintázata a gerinces sejtekben szaporítottéhoz képest, és a szúnyogsejtekben képződött vírusok fertőzőképessége jelentősen magasabb. Más kutatások azt ismerték fel, hogy a szúnyogok nyála tartalmaz olyan összetevőket, amelyek fokozzák a flavivírusok fertőzőképességét. Ezeken túl, a szúnyogcsípés során a vírusok az elsődleges szaporodási helyként funkcionáló bőr Langerhans-sejtek közelébe jutnak, amit az oltás alkalmával nehéz reprodukálni. Összességében tehát a szúnyogcsípés sokkal hatékonyabban képes fertőzést kiváltani, mint a kísérletes oltás. Sajnos a kísérleti körülményeink nem tették azt lehetővé, hogy fertőzött szúnyogok csípéseivel fertőzzük az állatokat. Ezért a fertőző dózis meghatározására kétféle módszert használtunk. Az egérkísérletnél előkísérletekkel állapítottuk meg az optimális fertőző dózist (ld. 3.1.3.2 fejezet). A madárkísérletek esetében állatvédelmi és elhelyezési szempontok miatt nem volt módunk előkísérletek végzésére. Ezért ott a nyugat-nílusi vírushoz való hasonlóság és összehasonlíthatóság céljából a szakirodalomban közölt adatokra hagyatkoztunk. A csirke kísérlet során Senne és mtsai. (2000) „Pathogenicity of West Nile virus in chickens” (*Avian Diseases*, 44 , 642-649) és Langevin és mtsai, (2001). „Experimental

infection of chicken as candidate sentinels for West Nile virus.” (Emerg. Infect. Dis. 7, 726-729.) közlemények alapján határoztuk meg a fertőző dózist. A libakísérletnél Swayne és mtsai (2001) „Fatal encephalitis and myocarditis in young domestic geese (*Anser anser domesticus*) caused by West Nile virus” (Emerg. Infect. Dis. 7, 751–753.) című közleményben leírtak alapján jártunk el. Az eredményekből tehát azt lehet egyértelműen állítani, hogy az USUV a WNV-nél kevésbé képes szaporodni ezekben a baromfi fajokban.

Köszönöm Bírálóm kérdéseit és remélem, hogy kielégítő és elfogadható válaszokat tudtam adni rájuk.

Tisztelettel,



Bakonyi Tamás
pályázó