

**Válasz Prof. Dr. Minárovits János tanszékvezető egyetemi tanár Úr (az MTA doktora)
opponensi kérdéseire és megjegyzéseire**

Tisztelt Professzor Úr!

Először is szeretném megköszönni Önnek, hogy elvállalta Doktori értekezésem bírálatát. Köszönöm, hogy a munkát alkalmas tartja a nyilvános vitára.

Kérdéseire, felvetéseire az alábbi válaszokat tudom adni:

1. *„A módszerek között leírja, hogy a nukleotid összetétel elemzés alkalmas lehet egy ismeretlen vírusgenom lehetséges gazdaszervezetének azonosítására. Ezt a módszert alkalmazva egy új, dicistronos +ssRNS vírus genomot jellemez (129. oldal), melynek egyfajta hal lehet a gazdaszervezete. Mi okozhatja az egyes vírusok és gazdaszervezeteik genomjának hasonló dinukleotid eloszlását?”*

Jelen pillanatban ennek magyarázata nem ismert. A tapasztalatokra építve próbáljuk a megfigyelést használni. A számítások szerint egyes RNS vírusok genomjai gazdafajok szerint hasonló dinukleotid gyakorisággal jellemezhetőek. Például a gerinces eredetű egyszálú RNS vírusok CpG és UpA alulreprezentációval és CpA felülreprezentációval rendelkeznek. Jelenleg a gerincesek, a gerinctelenek (pl: rovarok) és a növényi vírusok elkülönítésére ad csak a módszer kellően megbízható eredményt (a gerinceseken belül például nem). Érdekes megfigyelés, hogyha mesterségesen növeljük a CpG és UpA dinukleotidok arányát az echovírus 7 genomban (enterovírus), akkor a vad vírus típushoz képes csökken a replikációja, ha csökkentjük, akkor viszont jelentősen növekszik in vitro a replikációja emberi rhabdomyosarcoma (RD) sejtvonalon. A hipotézis az, hogy az RNS vírusok (és egyes kisméretű DNS genommal rendelkező vírusok) igen erős evolúciós nyomásnak vannak kitéve, hogy csökkentsék a CpG és UpA dinukleotidok gyakoriságát, hogy kiterjenek egyelőre kevésbé ismert sejtes védelmi és transzlációs mechanizmusok elől, melyek az abnormális (idegen) nukleinsav összetételekre érzékenyen reagálnak. Ezek a szelekciós mechanizmusok pedig a nagy eukarióta gazdafajok csoportjaitól függően eltérőek vagy eltérő erősségűek lehetnek (Simmonds et al., BMC Genomics, 2013;14:610; Atkinson et al., Nucleic Acids Res., 2014,42(7):4527-4546.; Peter Simmonds személyes közlés). A Professzor Úr egyik kutatási területének a CpG-metilációk és egyéb epigenetika változások hatásainak a kérdéskörben szerepe lehet (Simmonds et al., BMC Genomics, 2013;14:610.). Természetesen a módszer eredményei, a sok kérdőjel miatt, jelenleg csak megfelelő kritikával fogadhatók el és a vírus/gazdafaj közti pontos kapcsolat bizonyítása más (például: in vitro és in vivo tenyésztéses) kísérleti módszerekkel kísérelhető meg.

2. *„Az értekezés számos virális RNS nem-transzlálódó régiójának másodlagos szerkezetét bemutatja. Hogyan lehetne igazolni e struktúrák kialakulását a vírussfertőzött sejtekben vagy a virionban.”*

Az RNS másodlagos szerkezetének kialakulását többféle módszerrel lehet vizsgálni. A DNS kettős szálhoz hasonlóan RNS esetén is a bázis-komplementaritás az alapja a másodlagos szerkezet kialakulásának csak itt a szál önmagával hurkolódik. Kisebb molekulák esetén az alapváz másodlagos szerkezetét *in silico* (szoftverekkel) is lehet vizsgálni az alternatív konformációk energiáinak becslésével és a legstabilabb szerkezet kiválasztásával. A nukleinsavak másodlagos szerkezetének kialakulását számos fizikai és kémiai módszerrel lehetne igazolni. Fizikai módszerek a röntgen-diffrakciós (röntgen krisztallográfia) módszer, a cryoelektron mikroszkópia vagy a mágneses magrezonancia spektroszkópia módszer. Az RNS másodlagos szerkezetének meghatározását kémiai módszerekkel is tanulmányozhatjuk, mint a hidroxil gyök jelölés; a DMS (dimetil-szulfát) alapú adenin/citozin metilálás; a CMCT (1-ciklohexil-(2-morfolinoetil) karbodiimid meto-p-toluol-szulfonát) alapú, de az uracilt/guanint érintő jelölés; a kethoxal (1,1-dihidroxil-3-etoxi-2-butanon) alapú guanint érintő jelölési módszer és a szelektív 2'-hidroxil aciláláson alapuló primer extenziós vagy röviden a SHAPE módszer.

Az általunk megadott RNS struktúrák *in silico* felrajzolását éppen az tette lehetővé, hogy a mások által korábban ezekkel a módszerekkel ténylegesen meghatározott alapstruktúrák konzervatív nukleotid motívumait és szerkezeti analógiáit kerestük.

3. „A virális RNS-ek elsődleges és másodlagos szerkezete alapján megjósolható-e, hogy milyen celluláris proteinek kapcsolódhatnak a nem-transzlálódó régiókhoz?”

Ha röviden szeretnék a kérdésre válaszolni, akkor valószínűleg igen. A konzervatív nukleotid motívumok jelenléte a kitüntetett helyeken és az analóg struktúrák már felismert másodlagos szerkezetekhez jelezhetik, hogy milyen (ismert) sejt fehérjék kapcsolódhatnak a virális nem átíródo régiókhoz. Hasonlással élve „egy zongoraverseny kottája megkívánja a zongora használatát”. Azonban minden eset más és valószínűleg még kevés esetben ismerjük az egymáshoz kapcsolódó molekulák teljes skáláját és a kapcsolódási sor dinamikáját sem, nem beszélve az éppen aktuális körülmények befolyásoló hatásáról. A valószínűsített kapcsolatok kísérletes bizonyítása természetesen elengedhetetlen.

4. „Mi az IRES elemek szerepe a picornavírusok életciklusában?”

Az IRES (internal ribosome entry site), magyarul belső riboszóma kötő hely, egy másodlagos és harmadlagos szerkezettel jellemzett RNS molekularész, mely a riboszómához való kötődés biztosításával a fehérje szintézis (transzláció) iniciációs lépésében játszik szerepet (5'-vég Cap-független mechanizmus). Ennek segítségével a picornavírusok transzlációja akkor is aktív, amikor a gazdaszervezet transzlációs folyamatai gátoltak. Az IRES-t 1988-ban a poliovírus esetében fedezték fel (Pelletier et al., Nature, 1998;334(6180):320-325.), de ma már RNS vírusok mellett ismert egyes emlős sejt eredetű mRNS esetében is (Hellen et al., Genes Dev, 2001;15(13):1593-1612.).

5. „Vannak-e adatok az egyes IRES régiók háromdimenziós szerkezetéről?”

Igen, vannak. Mint ahogy a 2. kérdésre adott válaszomban jeleztem az általunk megadott RNS struktúrák *in silico* felrajzolását éppen az tette lehetővé, hogy a mások által korábban különböző módszerekkel ténylegesen meghatározott alapstruktúrák konzervatív nukleotid motívumait és funkcionálisan fontos szerkezeti analógiáit kerestük, adott esetben a teljes IRES figyelembe vételével. Az IRES-ek közül (Beales et al., J Virol, 2003;77:6574-6579) az egyik legérdekesebb a IV-es típusú IRES, melyet a hepatitis C vírus esetében határozták meg

először elektronmikroszkópos módszerrel (Beales et al., RNA, 2001;7:661-670; Spahn et al., Science, 2001;291(5510):1959-1962.), részleteit pedig NMR (Lukavsky et al., Nature Struct Biol, 2000;7:1105-1110; Collier et al., Nature Struct Biol, 2002;9:375-380.) és röntgen krisztallográfia módszerekkel (Kieft et al., Nature Struct Biol, 2002;9:370-374.). Ez az IRES típus jelen van a pestivírusok (Fletcher et al., J Virol, 76(10):5024-5033.) és egyes – növekvő számú – picornavírusok (Hellen et al., J Virol, 2007;81:5850-5863) 5'UTR régiójában is, jelezve a IV-es típusú IRES moduláris rekombinációjának lehetőségét a különböző vírussaládokban (Hellen et al., J Virol, 2007;81:5850-5863).

6. *„Munkája során recombináns enterovírus genomokat azonosított. Vannak-e rekombinációs „forró pontok” a picornavírus genomokban? Ha igen, szekvencia motívumhoz vagy egy bizonyos másodlagos szerkezet kialakulásához köthető valamely régióban a gyakori rekombináció?”*

Az egyes genomrégiók moduláris kicserélődését a rekombináció mechanizmusai segítik elő (mely tulajdonképpen egyfajta „szexuális szaporodás”-nak felel meg), mely a picornavírusok körében egyre több és érdekesebb formája kerül leírásra. Ismertek mind intraspecies (ezek gyakoribbak), mind interspecies rekombináns enterovírusok, picornavírusok. Az interspecies enterovírusok közé tartozik a humán enterovírus 109 és az ugyancsak a munkacsoportunk által elsőként állatból leírt interspecies rekombináns enterovírus (Boros et al., J Gen Virol, 2012;93:1941-1951.). Az RNS genommal rendelkező picornavírusoknál homológ és nem-homológ rekombináció típusok lehetnek. A homológ rekombináció típusok a hasonló vagy közeli rokon RNS szekvenciák átkeresztződéséből létrejött rekombinációk. A nem-homológ rekombináció az egymással szekvencia hasonlóságot nem mutató RNS szekvenciák között jön létre. A rekombináció mechanizmusát tekintve a nem-replikatív modell („törés-újrendeződés”) és a replikatív (pl.: szál-váltó, copy-choice) modell (pl.: a másodlagos RNS szerkezet megakasztja a negatív RNS genom szál átírását) szerint rekombinálódhat a két RNS szál. Az ismert rekombinációk helyei a picornavírus fő genom részeinek határaitra esnek, így az 5'UTR/kódoló (L vagy P1), P1/P2, illetve a P3/3'UTR régiók. A nem-szerkezeti fehérjéket kódoló génrégiók közötti homológ rekombinációk, valamint az 5'UTR és VP4 kapszid fehérje vagy 5'UTR és L fehérje határokon bekövetkező homológ rekombinációk a leggyakoribbak.

Összefoglalva, a rekombináció gyakori jelenség a picornavírusok körében, amely a szelekciós hatásokra adott válaszlépés és mindenképpen az evolúciós nyomás eredménye. Ezzel a jelenséggel az RNS vírusok képesek túlélni a környezetükben, képesek megújulni, - és feltételezésünk szerint - ezzel új gazdasejteket, gazdafajokat is meghódítani.

7. *„Megfigyelései szerint egyes picornavírusok, vagy picornavírus nukleinsavat tartalmazó minták nem mutattak citopátiás hatást szövettenyésztésben. Léteznek-e apatogén vírusok?”*

Hogy pontosak legyünk, volt olyan picornavírus (például a hunnivirus), melyet a picornavírusok tenyésztésére leggyakrabban használt Vero (African green monkey kidney) sejtvonalon tenyésztve citopátiás hatást és virális RNS replikációt sem tapasztaltunk. De ez önmagában messzemenő következtetést nem tesz lehetővé, hiszen a minta minőségén kívül (pl. jelen van-e replikációra képes partikula?) a tenyésztési körülmények és megfelelő sejtvonal megtalálása esetén akár sikerre is vezethetne a tenyésztés.

A pathogenitás az élősködő életmódot folytató mikrobák (vírusok, baktériumok vagy eukarióták) megbetegítő vagy betegséget okozó képessége. A pathogén vagy kórokozó pedig a megfertőzött gazdaszervezetben betegség kialakítására képes. Az apathogén mikroba az adott szervezetben – tudomásunk szerint – nem okoz tünetet, betegséget. Vagy nem tudja megfertőzni a szervezetet vagy megfertőzi a sejteket, de nem károsítja. A vírusok

sokszínűségét csak most kezdjük feltérképezni. Konzervatív becslések szerint 100 millió vírusfaj (benné 1 millió gerinces vírusfaj) létezhet. Jelenleg ugyanakkor csak ~2500 vírusfajt ismerünk, ezek döntő többsége pathogén, de pusztán csak azért, mert eddig a kutatások - a „feltűnő” - a klinikai tünetekkel, betegséggel járó vírusokkal foglalkoztak. Azt se felejtjük el, hogy egy pathogén mikroba az evolúció során apathogénné is alakulhat, alakítható (pl.: gyengített vírust tartalmazó oltóanyagok). Az eddig ismert és a valószínűsített vírusfajok arányából nagyon is elképzelhető, hogy létezhetnek természetes apathogén vírusok. (Megjegyzés: a válasz második bekezdése Pankovics Péter volt PhD hallgatóm védése (PTE, 2014) során a Professzor Úr által feltett hasonló kérdésre adott írásos válasszal egyezik. Az akkori témavezetői felügyelettemmel megszületett válasznál most sem tudom jobban összefoglalni a lényegét.)

8. *„Úgy találta, hogy a hepatitis E vírusok genomja az adott földrajzi régióra jellemző. Van-e különbség a sertés és a humán genom dinukleotid eloszlása, illetve a sertés és humán eredetű hepatitis E vírus törzsek genomjának dinukleotid eloszlása között?”*

A kérdésre azt tudom válaszolni, hogy a sertés és humán eredetű hepatitis E vírus törzsek genomjának dinukleotid eloszlására nem végeztünk vizsgálatokat és az irodalomban sem találtam erre adatot. (Az értekezésben is csak részleges és nem teljes hepatitis E vírus genomok szerepelnek, utóbbira lenne szükség az elemzéshez.) Másrészt egyedül a humán genom CpG dinukleotid eloszlására (G+C=38%; CpG=0,9%) találtam irodalmi adatot (Saxonov et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2006;103(5):1412-1417).

9. *„Okoznak-e betegséget a szarvasmarha és sertés norovírusok, illetve fertőznek-e embereket?”*

Az in vivo fertőzési kísérletek azt mutatják, hogy a szarvasmarha norovírusok vizes diarrhéát okoznak újszülött borjakban (Otto et al., J Virol, 2011;85:12013-12021.). A sertés norovírus (18-as genotípus) enyhe diarrhéát okoz gnotobiotikus malacokban (Wang et al., Emerg Infect Dis, 2005;12:1874-1881). A fordítottját is érdemes megemlíteni: gnotobiotikus szarvasmarhák és sertések sikeresen fertőzhetők emberi GII.4 norovírossal, melyekben gastroenteritist okoznak (Cheetham et al., J Virol, 2006;80:10372-10381; Souza et al., J Virol, 2008;82:1777-1786).

Közvetlen bizonyíték (azaz víruskimutatás) még nem támasztja alá, hogy a szarvasmarha vagy a sertés norovírusok fertőznek-e embereket (a tünetekkel járó emberi fertőzés pedig megint egy másik kérdés), de figyelemre méltók a közvetett adatok:

Szarvasmarha norovírusok esetén: holland állatorvosok körében 28%, az átlag emberi populációban 20%-ban kimutattak ellenanyagokat rekombináns GIII.2 szarvasmarha norovírossal szemben (Widdowson et al., J Med Virol, 2005;76:119-128.). Ugyanez a szeroprevalencia a svéd véradók körében 26,7% volt rekombináns GIII.2 szarvasmarha norovírossal (Vildevall et al., J Med Virol, 2010;82:1241-1246.). A keresztreakció lehetősége nem eldől, vannak tanulmányok melyek találtak (Batten et al., 2006; Oliver et al., 2006b) és amelyek nem találtak (Han et al., J Clin Microbiol, 2005; Vildevall et al., J Med Virol, 2010;82:1241-1246.) keresztreakciót a szarvasmarha GIII.2 norovírus és a humán GI és GII norovírusok között.

Sertés norovírusok esetén: seroepidemiológiai vizsgálat emberek körében - jelen tudásom szerint - még nem készült.

Összefoglalva, még számos darab hiányzik a képzeletbeli kirakóból, hogy egyértelmű választ tudjunk adni a Professzor Úr kérdésére.

10. „*Tapasztalta-e a pándémiás GII.4 Sidney norovírus törzs megjelenését Magyarországon? Miben különböznek a pandémiát okozó és a pandémiát nem okozó norovírusok?*”

Igen, a GII.4-2012 Sydney pandémiás norovírust először 2012 júliusában mutattuk ki hazánkban és ahogy várható volt kiszorította a korábbi GII.4-2010-es klónt. A 2012/2013-as norovírus szezonban a GII.4 genotípushoz köthető norovírus járványok még csak 25%-át (8/32 járvány), a 2013/2014-es szezonban már a 95%-át (21/22 járvány) és eddig (2014. december) a 2014/2015-ös szezonban a 100%-át (14/14 járvány) a GII.4-2012 Sydney vírus okozta.

Az elegendően nagyszámú és nemzetközi összehasonlító vizsgálataink világítottak arra rá az elmúlt egy évtizedben, hogy az eddig ismert 25 emberben előforduló prototípus norovírus genotípus közül 1) a GII.4 norovírus genotípust lehet a leggyakrabban (70-80%-ban) a norovírus járványokból világszerte kimutatni (a többi 24 emberi genotípus egyike sem éri el önmagában a 10%-os arányt); 2) jellegzetesen ez a genotípus okozza minden évben a téli-kora tavaszi hónapokban a norovírus járványok számának megemelkedését (azaz a „calicivírus”/norovírus szezont); 3) eddig csak erről a genotípusról bizonyított vizsgálataink által, hogy az antigén drift segítségével kisselektált klónjai pandémiát (azaz több kontinensre kiterjedő járványt) is képesek okozni 2-4 évente.

E megfigyelések magyarázatával azonban adósak vagyunk, bár számos elmélet vetődött fel (például: a GII.4 genotípus hatékonyabb replikációja a sejtekben; a GII.4 nagyobb kópiaszáma a székletben; a GII.4 kisebb fertőző dózisa; a GII.4 stabilabb virion szerkezete és környezeti túlélése más genotípusokhoz képest stb.). Valójában nem tudjuk GII.4 genotípus sikerességének a pontos okát/okait. Valószínűleg nem önmagában a kórokozó, hanem a kórokozó-gazdaszervezet kapcsolata (egymásra hatása és evolúciója) és egyben együttes vizsgálata vihetne közelebb minket a megoldáshoz. Nagy hátrány, hogy 40 éves erőfeszítés ellenére mind a mai napig nem tudtuk az emberi norovírusokat in vitro körülmények között tenyészteni, vizsgálni. Megfigyelték, hogy a GII.4 genotípus kapszidjának immundomináns felszíne azonban – az erős immunszelekció ellenére – „széles hangterjedelemben képes játszani” az emberi szöveti és vércsoport antigének (histo-blood group antigen, HBGA), mint a legvalószínűbb receptorokon. Úgy néz ki, hogy a GII.4 virális kapszid szénhidrát-kötő doménjének változása (szelekciója) tág határok között tolerált, mert a mukózális sejtfelszíneken nagy számban vannak jelen a hasonló, de mégis különböző szénhidrát receptor variánsok is, ugyanakkor az immunrendszer a megváltozott kapszid antigént már nem ismeri fel, így a fertőzés továbbra is (vagy ismételten) eredményes marad. Nagyon hasonló a szituáció – a jobban ismert - influenza vírusok esetéhez. Itt a sokféle influenza vírus közül csak a már „humanizálódott” (azaz az emberi, a galaktóz 2,6-kötésű szialsav (N-acetilneuraminsav) receptorhoz kötődő) influenza vírusok képesek eredményesen megbetegedést okozni és emberről-emberre terjedni, ezek pedig időről-időre élnek az antigén drift nyújtotta előnyökkel. Igazi izgalmas szemléletformáló áttörést jelenthet az eddigi/fenti nézethez képest, hogy 2014 novemberben a Science-ben (Jones et al., Science, 2014;346(6210):755-759.) amerikai kutatók arról számoltak be, hogy in vitro körülmények között az emberi B-sejtek norovíussal (GII.4-Sydney 2012) fertőzhetők és ehhez szükség van a bélhuzam mikrobiota alkotó és szöveti és vércsoport antigének (HBGA) termelő enterális baktériumaira (*Enterobacter cloacae* H-típusú HBGA)! Az elmélet szerint a baktérium-karbohidrát-vírus komplex transzcitózissal jut át az epiheliális sejteken és jut el a B-sejtekhez. In vivo egér kísérletben, pedig az egér norovírus replikáció csökkenthető volt – az

intestinalis mikrobiotára ható - orális antibiotikum adásával. Ez nem csak azért izgalmas, mert a norovírus célsejtje (talán) mégsem az epithelsejt, hanem a B-sejt, de azt is jelenti, hogy eddig nem felismert ko-operáció van a norovírusok és a bélbaktériumok között. Azaz a bélbaktériumok szénhidrát-kötő doménjei szelektálhatnak a norovírusok között! (Miura et al., J Virol, 2013;87(17):9441-9451).

P.s.: germanizmusok és elírások a szövegben:

23. és 24. oldal, „lett besorolva”, „lett meghatározva”.

Javítás: A vírusszekvenciákat család, nemzetség és gazdafaj szerint soroltuk be. Az egyes szekvenciák mono- és dinukleotid gyakoriságát „Composition Scan” (SSE version 1.0) programmal határoztuk meg.

102. oldal utolsó előtti mondat – nem érthető pontosan.

Javítás: A nyolc PCR-termékből hét kobuvírus szekvencia volt (Lásd: ovine kobuvírus fejezet), egy azonban nem a kobuvírusra, hanem 85%-os aminosav hasonlóságot mutatott a bovine hungarovírus (BHuV1/2008/HUN) 3D fehérjéréséhez.

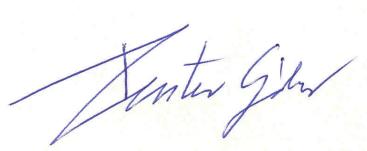
168. oldal, „...jobban leírható.” – ez kiegészítendő, nem világos, hogy mihez képest.

Javítás: Vizsgálatnak azt mutatják, hogy az astrovírusok ORF1b/ORF2 régiójának határa, az ORF2 promotor régiója az UUUGGAGNGGNGGACCNAAN₄₋₁₁AUGNC nukleotid képlettel jobban leírható, mint az UUUGGAGNGGNGGACCNAAN₅₋₈AUGNC képlettel (Méndez E, Arias CF. *Astroviridae*. In: Knipe DM, Howley PM (ed) *Fields Virology*, 5th edn, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2007, pp 981-1000.).

Még egyszer nagyon köszönöm a Professzor Úr munkáját és kérdéseit! Remélem, hogy a kérdésekre és a bírálatokra adott válaszaimat el tudja fogadni.

Pécs, 2014. december 15.

Tisztelettel és Köszönettel,



Dr. Reuter Gábor