

VÁLASZOK DR. LAKATOS LÓRÁNT KÉRDÉSEIRE

Köszönöm Dr. Lakatos Lóránt, hogy elvállalta disszertációm bírálatát, elismerő véleményét a dolgozat és eredményeink jelentőségéről, valamint azt, hogy eredeti tudományos teljesítményként értékelte és nyilvános vitára javasolta.

VÁLASZOK A BÍRÁLÓ KÉRDÉSEIRE

1. *Mi a magyarázata annak, hogy Vero sejtvonalat használtak a HSV-1 és számos RNS vírus esetében is?*

A Vero sejt vonal (származása: *Chlorocebus sabaeus* – zöld majom – vesesejtek) az egyik legszélesebb körben használt **modell a virológiában** (Ammerman és mtsai, 2008; Kiesslich és Kamen, 2020; Tatara, 2022), és több szempontból is indokolt volt a választása mind a HSV-1, mind pedig számos RNS-vírus esetében. Az alábbi okok miatt döntöttünk emellett:

- **Fenntarthatóság:** A Vero sejtek könnyen tenyésztethetők (Kiesslich és Kamen, 2020), stabilan fenntarthatók, és jól reprodukálható kísérleti környezetet biztosítanak (Shen és mtsai, 2019), így ideálisak virológiai vizsgálatokhoz. **Hiányzó interferonválasz:** A Vero sejt vonal I. típusú interferon (IFN) lokusza *deléciós mutáció* (Emeny és Morgan, 1979) miatt nem funkcionális, ezért az **I. típusú interferon válasz hiányzik**. Ez lehetővé teszi, hogy a vírusok szaporodjanak és magas titert érjenek el és így jelentős RNS-mennyiség legyen kinyerhető, ami előnyös sajátosság a transzkriptomikai vizsgálatoknál.
- **Modellként való sokoldalú alkalmazhatóság:** A sejt vonal többféle DNS- és RNS-vírus (pl. HSV-1, vakcina vírus, SARS-CoV-2, vesicularis stomatitis vírus) vizsgálatára alkalmas (Wu és mtsai, 2004; Paillet és mtsai, 2009; Kiesslich és Kamen, 2020). Ezáltal **azonos gazdasejt-háttérben összehasonlíthatók** különböző vírusok.

Összefoglalva: a Vero sejt vonal nemcsak technikailag praktikus, hanem biológiai tulajdonságai miatt is ideális választás volt a vizsgált vírusok széles körére nézve.

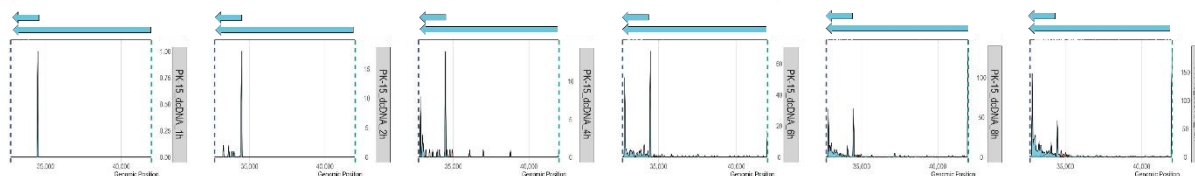
2. *81. oldal, Northern blot - Az ábrán azonosított két PRV transzkriptumot Northern blottal. Valamint egy kb 4000 bázis nagyságú alacsony abundanciájú transzkriptet is. Az LRS technikával sikerült-e ezt igazolni?*

A kérdéses, ~4000 bázis hosszúságú, alacsony abundanciájú transzkript valóban megjelent a korábbi Northern blot ábrán (Tombácz és mtsai, 2016), azonban hosszú olvasású szekvenálással (LRS) **nem sikerült egyértelműen megerősítenünk** a jelenlétét. Ez a publikáció a korai PacBio-kísérleteink egyikéről szólt (ahol még csak kb. 140 000 olvasat állt rendelkezésünkre), s ez nem igazolta vissza a Northern blottal kapott fragmenst. Mivel bizonytalanok voltunk a létezésében, így fogalmaztunk az eredeti publikációban: „...which **might** indicate a **putative** novel transcript”, illetve: „A low-abundance 4 kbp band has also been detected by using two non-overlapping probes, which **might** indicate the presence of a middle-sized truncated UL36 transcript. However, we **have not obtained PacBio reads** of this size therefore **further investigations are needed to confirm the existence of the putative RNA molecule**”.

A későbbi több millió olvasatos ONT szekvenálásainkban sem jelent meg megbízható módon ez a transzkript, illetve a CAGE-Seq adataink sem mutatnak egyértelmű TSS-aktivációt ebben a pozícióban.

Egy TSS expressziót ábrázoló képen mutatom be (**1. ábra**), hogy, míg az *ul36.5* transzkript jelenlétét egy igen magas csúcs igazolja, addig a 4000 bp-os jelet adó feltételezett transzkript jeleit nem látjuk.

Összefoglalásként: bár a Northern blot jelezte egy alacsony szintű, ~4 kb hosszúságú transzkript jelenlétét, azonban **sem a LRS-adataink, sem a CAGE-seq nem erősítették meg**, ezért ezt az átiratot nem is vettük fel a hivatalos PRV transzkriptom-annotációba.



1. ábra A PRV UL36 gén régióját ábrázoló grafikon. A kék nyílak az UL36 és UL36.5 gént jelölik. A nyíl iránya megfelel a transzkripció irányának. Az alsó panelek az időfüggő transzkripciós aktivitást mutatják az UL36 régióban 1, 2, 4, 6, 8 és 12 órával a fertőzés után. A grafikonokon a fekete csúcsok a transzkripció starthelyeket (TSS) jelölik. A legdominánsabb csúcs az UL36.5 transzkript kezdőpontjának felel meg. Megfigyelhető, hogy az *ul36.5* transzkript kezdőpontja már 1 órás időpontban is detektálható, és folyamatosan jelen van egészen 12 óráig, jelezve, hogy a génexpresszió korán elindul és magas szinten fennmarad a fertőzés későbbi fázisaiban is

3. A gliasejtekben vajon miért szaporodik jobban a VSIV, annak ellenére, hogy a Vero sejtekben számos citokint kódoló gén deletált?

A jelen vizsgálatunk kifejezetten a génexpressziót célozta, nem a vírus produktív szaporodását. Vizsgálatainkban a Vero és a T98G (*humán glioblastoma eredetű, asztroglia-jellegű*) sejtvonalakat használtuk (Baez és mtsai, 2017), mivel ezek széles körben elfogadott modellek a vírusok sejttípus- és gazdafüggő replikációs mechanizmusainak tanulmányozására. A Vero sejtvonal klasszikus virológiai modell, különösen azért, mert hiányzik belőle a típus I interferon termelés, így lehetőséget ad interferonfüggetlen sejtválaszok nélküli vírusreplikáció vizsgálatára. A T98G sejtvonal ezzel szemben egy tumorsejtmodell (Stein, 1979), amely megőrzi a glia sejtek számos funkcionális jellemzőjét, és alkalmas neurotróp vírusok, így a VSIV tanulmányozására. Valóban azt találtuk, hogy a VSIV replikációja lényegesen hatékonyabb volt a T98G gliasejtekben.

A jelenség hátterében több tényező állhat:

- **A Vero sejtek interferonhiánya nem jelent automatikus előnyt:** Míg az antivirális válasz hiánya kedvező lehet a vírus számára, ez nem kompenzálja azt, ha egy sejtben általánosan alacsony a transzkripciós és transzlációs kapacitás, vagy hiányoznak a vírusspecifikus kofaktorok. A Vero sejtek például kevesebb olyan komponenst biztosíthatnak, amelyek a VSIV RNS-polimeráz működéséhez vagy a vírusfehérjék szintéziséhez szükségesek.
- **A VSIV saját immunelkerülő stratégiái:** A vírus M (matrix) fehérjéje globális transzkripciógátló hatással bír (Clinton és mtsai, 1978; Yuan és mtsai, 2001), illetve blokkolja a gazdasejt mRNS-einek kijutását is a citoplazmába (van Kobbe és mtsai, 2001), így interferonkompetens sejtekben is hatékonyan elnyomja a védekező válaszokat. Ez azt jelenti, hogy a Vero sejtek „előnye” (az interferonhiány) a VSIV esetében nem feltétlenül jelent számottevő többletet.

Összefoglalva: A T98G sejtvonal kiválasztása részben **a VSIV neurotróp jellegéhez illeszkedik**. A replikáció hatékonysága **nem csupán az interferonhiányos környezet determinálja**. A két sejtvonal összehasonlítása **éppen ezért volt különösen informatív**. A két sejttípus használata lehetővé tette annak feltárását is, hogy a vírus **sejttípus-függő módon szabályozza saját transzkripciós és replikációs programját**.

4. A VSIV hatására a DEG-eket tekintve glia és Vero sejtekben nagy volt a különbség. Adódhat-e abból, hogy a citokinhányos Vero sejtvonalban nem emelkedett meg a citokin-indukálható gének expressziója?

Igen, a glia- és Vero-sejtekben megfigyelt differenciál expressziós mintázat különbségének egyik fő oka éppen ez: a Vero sejtvonal genomjából hiányzik az *IFN* lokusz és több, a típus I interferon-válaszhoz kapcsolódó komponens (Desmyter és mtsai, 1968; Osada és mtsai, 2014). Emiatt ezek a sejtek nem képesek klasszikus antivirális választ kialakítani. A vírusfertőzés során így nem aktiválódnak az interferon-stimulált gének, sem más, citokin-indukálható gének, ami jelentősen csökkenti a fertőzésre adott transzkripció választ, és a DEG-ek számát és típusát is befolyásolja.

A glia sejtek ezzel szemben rendelkeznek ép interferon-jelátviteli (Das és mtsai, 2009) és patogén-érzékelő rendszerekkel (pl. RIG-I, MDA5, Zheng és mtsai, 2018), így a VSIV-fertőzés erőteljes antivirális génexpressziós választ vált ki. Ez nemcsak nagyobb számú DEG-et eredményez, hanem kvalitatív eltéréseket is hoz létre a két sejtípus válaszában. A megfigyelt különbségek tehát visszavezethetők a Vero sejtek genetikai defektusaira, és megerősítik a sejtvonal-specifikus vírus-gazda interakciók jelentőségét.

5. Mi lehet a szerepe a Vakcína vírus kaotikus régiójának a vírus működésében?

A vakcína vírus ún. „kaotikus régiói” olyan genomszakaszok, ahol rendkívüli mértékű transzkripció aktivitás figyelhető meg, jellemzően a vírusreplikáció késői szakaszában. Vizsgálataink során (Tombácz és mtsai, 2020) azt találtuk, hogy ezekben a régiókban szinte **minden genompozícióból indul és terminálódik is a transzkripció**, ahelyett, hogy néhány jól körülhatárolt TSS-hez és TES-hez kötődnének. Ez a **kiterjedt, rendkívül pervazív transzkripció** azt eredményezi, hogy az egyes leolvasások ritkán esnek egybe, a transzkriptek kezdő- és végpontjai szinte folyamatosan eltolódnak, így nagyon kevés fix TSS és TES figyelhető meg.

Ezek a kaotikus régiók a vakcína vírus genom **középső szakaszán** helyezkednek el, főként intermedier és **késői (late) géneket** tartalmaznak. E gének közül sok membránfehérjéket, morfogenezisben részt vevő fehérjéket, valamint belépéshez és korai transzkripcióhoz szükséges faktorokat kódol. A „kaotikusság” tehát **időfüggő jelenség**, amely jellemzően a fertőzés késői fázisában válik dominánssá, valószínűleg a transzkripció és terminációs mechanizmusok fokozatos fellazulása miatt.

A kaotikus régió biológiai jelentősége. Egyrészt, a kaotikus transzkripció **növeli az expressziós diverzitást**, például alternatív TSS/TES variánsok, antiszensz és poligén transzkriptek révén. Másrészt, e szakaszok **lehetséges szabályozó szereppel** is bírhatnak, például más gének expresszióját modulálhatják interferáló hatás révén.

Ezzel párhuzamosan a proteomikai elemzések is új aspektusokat tártak fel (Yang és Moss 2015) riboszóma-profilozással végzett vizsgálataik alapján **a vakcína vírus genom több mint 600 új, eddig nem jelzett translációs start helyet tartalmaz**, köztük **csontolt ORF-eket, antiszensz szálon elhelyezkedő ORF-eket**, illetve **5'-UTR-be ágyazott upstream ORF-eket**. A legtöbb ilyen kis fehérje (<65 aminosav) korábban kívül esett a klasszikus annotáció határain, mégis van közöttük olyan, amely **elengedhetetlen a vírus penetrációhoz** (pl. egy mindössze 35 aminosavas protein).

A kaotikus régiók tehát nemcsak az RNS-átírás, hanem **a fehérjeszintézis szintjén is hozzájárulnak a vírus funkcionális komplexitásához**, és valószínű, hogy közülük több kis ORF **regulációs vagy strukturális szerepet tölt be**. Evolúciós szempontból ezek a régiók a poxvírusok genetikai **plaszticitását** is szolgálhatják: segíthetnek új gének kipróbálásában, esetleg **horizontálisan szerzett szekvenciák** expressziójában, és hozzájárulhatnak a gazdaspektrum vagy a patogenitás módosulásához.

A vizsgálatok azt is kimutatták, hogy az egyes gének gyakran intermedier és késői promóter elemeket egyaránt tartalmaznak (Yang és mtsai, 2011), ami tovább növeli a transzkripció komplexitást.

Összefoglalásként:

A vakcína vírus kaotikus régiói a kódoló kapacitás és expressziós rugalmasság központi elemei. A szabályozatlan transzkripció és az ebből fakadó fehérje-diverzitás evolúciós előnyt jelenthet a vírus számára.

Bízom benne, hogy a bíráló a válaszaimat megfelelőnek találja és elfogadja.

Szeged, 2025. május 30.



Tombácz Dóra

Referenciák

- Ammerman NC és mtsai. Growth and maintenance of Vero cell lines. *Curr Protoc Microbiol.* 2008 Nov;Appendix 4:Appendix 4E. doi: 10.1002/9780471729259.mca04es11.
- Baez E és mtsai. 4'-Chlorodiazepam Protects Mitochondria in T98G Astrocyte Cell Line from Glucose Deprivation. *Neurotox Res.* 2017 Aug;32(2):163-171. doi: 10.1007/s12640-017-9733-x.
- Clinton GM, Little SP, Hagen FS, Huang AS. The matrix (M) protein of vesicular stomatitis virus regulates transcription. *Cell.* 1978 Dec;15(4):1455-62. doi: 10.1016/0092-8674(78)90069-7.
- Das A és mtsai. Molecular mechanisms of the combination of retinoid and interferon-gamma for inducing differentiation and increasing apoptosis in human glioblastoma T98G and U87MG cells. *Neurochem Res.* 2009 Jan;34(1):87-101. doi: 10.1007/s11064-008-9669-x.
- Desmyter J és mtsai. Defectiveness of interferon production and of rubella virus interference in a line of African green monkey kidney cells (Vero). *J Virol.* 1968 Oct;2(10):955-61. doi: 10.1128/JVI.2.10.955-961.1968.
- Emeny JM, Morgan MJ. Regulation of the interferon system: evidence that Vero cells have a genetic defect in interferon production. *J Gen Virol.* 1979 Apr;43(1):247-52. doi: 10.1099/0022-1317-43-1-247.
- Hastie E és mtsai. Understanding and altering cell tropism of vesicular stomatitis virus. *Virus Res.* 2013 Sep;176(1-2):16-32. doi: 10.1016/j.virusres.2013.06.003.
- Kiesslich S, Kamen AA. Vero cell upstream bioprocess development for the production of viral vectors and vaccines. *Biotechnol Adv.* 2020 Nov 15;44:107608. doi: 10.1016/j.biotechadv.2020.107608.
- Osada N és mtsai. The genome landscape of the african green monkey kidney-derived vero cell line. *DNA Res.* 2014 Dec;21(6):673-83. doi: 10.1093/dnares/dsu029.
- Paillet C és mtsai. Suspension-Vero cell cultures as a platform for viral vaccine production. *Vaccine.* 2009 Oct 30;27(46):6464-7. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.06.020.
- Shen CF és mtsai. Development of suspension adapted Vero cell culture process technology for production of viral vaccines. *Vaccine.* 2019 Nov 8;37(47):6996-7002. doi: 10.1016/j.vaccine.2019.07.003.
- Stein GH. T98G: an anchorage-independent human tumor cell line that exhibits stationary phase G1 arrest in vitro. *J Cell Physiol.* 1979 Apr;99(1):43-54. doi: 10.1002/jcp.1040990107.
- Tatara AM. Modeling viral infection with tissue engineering: COVID-19 and the next outbreaks. *Tissue Engineering.* 2022;647-67. doi: 10.1016/B978-0-12-824064-9.00015-0.
- Tombácz D és mtsai. Full-Length Isoform Sequencing Reveals Novel Transcripts and Substantial Transcriptional Overlaps in a Herpesvirus. *PLoS One.* 2016 Sep 29;11(9):e0162868. doi: 10.1371/journal.pone.0162868.
- Tombácz D és mtsai. Long-read assays shed new light on the transcriptome complexity of a viral pathogen. *Sci Rep.* 2020 Aug 14;10(1):13822. doi: 10.1038/s41598-020-70794-5.
- von Kobbe C és mtsai. Vesicular stomatitis virus matrix protein inhibits host cell gene expression by targeting the nucleoporin Nup98. *Mol Cell.* 2000 Nov;6(5):1243-52. doi: 10.1016/S1097-2765(00)00120-9.
- Wu SC és mtsai. Optimization of microcarrier cell culture process for the inactivated enterovirus type 71 vaccine development. *Vaccine.* 2004 Sep 28;22(29-30):3858-64. doi: 10.1016/j.vaccine.2004.05.037.

Yang Z és mtsai. Expression profiling of the intermediate and late stages of poxvirus replication. *J Virol.* 2011 Oct;85(19):9899-908. doi: 10.1128/JVI.05446-11.

Yang Z, Moss B. Decoding poxvirus genome. *Oncotarget.* 2015 Oct 6;6(30):28513-4. doi: 10.18632/oncotarget.5892.

Yuan H és mtsai. Inhibition of host transcription by vesicular stomatitis virus involves a novel mechanism that is independent of phosphorylation of TATA-binding protein (TBP) or association of TBP with TBP-associated factor subunits. *J Virol.* 2001 May;75(9):4453-8. doi: 10.1128/JVI.75.9.4453-4458.2001.

Zheng Z és mtsai. Tick-Borne Encephalitis Virus Nonstructural Protein NS5 Induces RANTES Expression Dependent on the RNA-Dependent RNA Polymerase Activity. *J Immunol.* 2018 Jul 1;201(1):53-68. doi: 10.4049/jimmunol.1701507.