

Feline adenovirus izolátum molekuláris és biológiai vizsgálata

Tézisfüzet

Tarcsai Katalin Réka

Semmelweis Egyetem
Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Ongrádi József, CSc., ny. egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Varga Marina, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Tiszlavicz Zoltán, Ph.D., laboratóriumvezető-
helyettes

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Ujjpál Márta, med. habil., Ph.D., egyetemi docens

Tagok: Dr. Barcs István, CSc., ny. tanszékvezető főiskolai tanár

Dr. Újhelyi Eszter, Ph.D., biológus, laboratórium vezető

Budapest
2023

1. Bevezetés

Az adenovírusok (AdV) széles körben előfordulnak gerincesekben, így az emberben is. Hét speciesre oszlanak, amelyek különböző megbetegedéseket okoznak, de az egyes csoportokhoz tartozó fajok által okozott betegségek és tünetek hasonlóak.

Közepes méretű (70-100 nm), burok nélküli, ikozaéder alakú partikulák, örökítőanyaguk kettős szálú, lineáris DNS. 11 strukturális fehérjével rendelkeznek, a hexon, a penton bázis és a fiber a fő kapszid fehérjék közé sorolhatók. A legtöbb adenovírus esetén a Cocksachie-adenovírus receptor (CAR) az elsődleges kötőhely, de egyes típusok más receptorhoz (pl. CD46, desmoglein-2) kötnek. Az AdV-ok α_V (leggyakrabban az $\alpha_V\beta_3$ és az $\alpha_V\beta_5$) integrineket használnak másodlagos receptorként a sejtbe jutáshoz. AdV fertőzésre adott immunválaszként többek között citokinek (pl. IL-10) szabadulnak fel, amelyek koncentrációja összefüggésben van a fertőzés súlyosságával. Cseppfertőzéssel, torok- és szemváladékkal, vizelettel, faecalis-orális úton, valamint szennyezett tárgyak felületéről kerülhet a szervezetbe, de a látens vírus is képes reaktiválódni és klinikai tüneteket

okozni. Az AdV-ok gazdaspecificitása általában szűk, azonban a szakirodalom több esetben is beszámolt már fajok közötti terjedésről vagy adaptációról, így az AdV-okat, mint a fajok közötti járványkitörések lehetséges okait, szigorúan figyelemmel kell kísérni.

Immunkompetens egyéneknél a fertőzés általában tünetmentes, vagy enyhe tünetekkel jár, míg immunhiányos egyéneknél (pl. transzplantáltaknál, humán immundeficiencia [HIV] fertőzötteknél) legtöbbször súlyos lefolyású.

Az AdV-ok hagyományosan pl. vírusizolálással, a direkt és indirekt antigén kimutatással, a szövettani vizsgálatokkal detektálhatók. Bár a sejt kultúrákon történő AdV vizsgálatok még mindig „gold standard”-nek tekinthetők, ez és a többi hagyományos módszer időigényes és korlátozott érzékenységgű, ezért a laboratóriumok áttértek a molekuláris technikákra, mint pl. a polimeráz láncreakció (PCR) és a szekvenálás.

Az AdV fertőzés ellen jelenleg nincs engedélyezett, specifikus terápia. Egyes gyógyszerek hatásosnak bizonyulnak a vírus ellen, mellékhatásaik miatt azonban csak indokolt esetben alkalmazzák ezeket. A kezelés során

érdeemes lehet az immunrendszer helyreállítását célzó terápiák megfontolása, pl. Avemar alkalmazása.

Az AdV típusok kialakulása fajon belüli és akár fajok közötti rekombináció és a mutáció eredményei. A rekombinációk feltételezhetően befolyásolják a vírus patogenezisét és virulenciáját. Az AdV-ok jól használhatók onkolitikus vírusként, génalapú vakcinaként vagy génterápiás vektorként. A vírus tanulmányozására nincs ideális állatmodell. Mivel a házimacskák több humán homológ vírust, baktériumot és gombát hordozhatnak, valamint a macska az emberi AIDS egyetlen természetes kisállatmodellje, az AdV pedig képes transzaktiválni a HIV-et, így felmerült az igény a macskákon végzett AdV vizsgálatok iránt. Sikerült is egy macska adenovírust (FeAdV) izolálni, amely bizonyíték lehet arra, hogy az AdV macskákat is fertőzhet. A FeAdV izolátummal végzett korábbi klasszikus és molekuláris vizsgálatok alapján feltételezhető, hogy közeli rokonságban áll a human adenovírus (HAdV)-1 típusal, amely felveti a zoonózis kockázatát, ezért fontos az izolátum részletesebb karakterizálása.

2. Célkitűzések

1. Macskából elsőként izolált, mások által bizonyítottan emberi fertőzésre is képes adenovírus (FeAdV) hexon és fiber génszekvenciájának összehasonlítása egyéb humán és macska eredetű hexon és fiber génekkel.

2. Macska adenovírus filogenetikai elemzése és főbb biológiai karakterizálása a megfelelő rendszertani helyre történő beilleszthetőség céljából.

3. Macska adenovírus szaporodását befolyásoló főbb fizikai, kémiai, környezeti tényezők és antivirális szerek hatásának vizsgálata.

4. A daganatellenes tulajdonságairól ismert fermentált búzacsírákivonat, az Avemar hatásának meghatározása macska adenovírusra és macska immundeficiencia vírusra (FIV).

5. Macska adenovírus immunmoduláns hatásainak vizsgálata és annak meghatározása, hogy az izolátum alkalmas-e génterápiás vektorként történő alkalmazásra.

6. Annak a feltérképezése, hogy a FeAdV ugyanazokon a receptorokon keresztül képes-e a sejtekbe bejutni és ott fertőzést okozni, mint az adenovírusok nagy része.

3. Módszerek

3.1. Felhasznált sejtek és vírusok

Humán cervicalis carcinoma (HeLa), Crandell-Rees macska vese epitheliális (CrFK), humán embrionális vese (HEK-293), valamint macska T-sejt eredetű MBM és macska limfoid FL-4 sejtvonalakkal dolgoztunk.

Vizsgálatainkban macska adenovírus (FeAdV), kaliforniai FIV-Pet (Clade A) és európai FIV Pisa-M2 (FIV-M2, Clade B) izolátumot használtuk.

3.2. Sejt- és vírusmunkák munkák

A sejteket fenntartás és szaporítás céljából hetente kétszer passzáltuk, hosszútávon -80°C -on vagy folyékony nitrogénben tartottuk. A FeAdV-t ViraBind™ Adenovírus Purification Mega Kittel koncentráltuk és QuickTiter™ Adenovirus Titer Immunoassay Kittel titráltuk. A FIV-Pet és FIV-M2 titerét citopátiás hatás alapján követtük.

3.3. Génösszehasonlítás

A FeAdV hexon és fiber génszekvenciáit egy másik FeAdV izolátum, egy közép-európai (holland) klinikai mintából származó HAdV-1 izolátum és a HAdV-1 referencia genom hexon szekvenciájával illesztettük, majd

BioEdit 7.2 és GeneDoc 2.7 szoftverek segítségével kielemeztük a különbségeket nukleotid és aminosav szinten.

3. 4. Filogenetikai elemzés

A FeAdV hexon és fiber génszekvenciáit összehasonlítottuk a GenBank adatbázisában elérhető olyan hexon és fiber szekvencia részletekkel, majd Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) szoftver 7.0 verziójával ún. *neighbor-joining* klaszterező módszerrel filogenetikai fát készítettünk (Kimura 2 paraméteres modell, 1000 ismétléses *bootstrap*).

3. 5. FeAdV ellenállóképességének vizsgálata

3. 5. 1. Fiziko-kémiai hatások

Az alkalmazott behatási időket és koncentrációkat a szakirodalom alapján gyűjtöttük össze, elsősorban a HAdV-1, -2 és -5 típusokkal történő kutatások szolgáltak referenciaként. A FeAdV-t 0-30 perc között kezeltük 56°C-os hővel és 253,7 nm-es hullámhosszú, 50,5 mW/m² teljesítményű UV fényvel. A vírust pH 1-14-es kémhatású oldatoknak, valamint 40 g/l-es nátrium-hipoklorit (NaClO) és 650 mg/l-es 65,5% etanolban oldott 0,4%

alkil-dimetil-benzil-ammonium klorid tartalmú higiénés kézfertőtlenítő szer hígítási sorainak tettük ki 5 percig.

3. 5. 2. Antivirális gyógyszerek

Az AdV okozta megbetegedésekben leggyakrabban alkalmazott gyógyszerek hatását vizsgáltuk. Ribavirin 50 mg/ml-es, cidofovir és stavudin 10 mg/ml-es törzsoldatából felező hígítási sort készítettünk és 1,5 órával a fertőzés előtt, valamint 2 és 24 órával fertőzés után kezeltük a sejteket a különböző töménységű gyógyszerekkel.

3. 5. 3. Avemar antivirális hatásainak vizsgálata

Különböző koncentrációjú Avemar oldattal (0-1000 µg/ml) kezeltünk HeLa, CrFK, MBM és FL-4 sejteket a különböző vírusokkal történő fertőzések előtt és után, hogy vizsgáljuk a szer antivirális hatását.

3. 6. Gazdasejt receptorainak és koreceptorainak gátlása

HeLa, CrFK és HEK-293 sejtek CAR és $\alpha v\beta_3$, $\alpha v\beta_5$ integrin receptorait 2 µg/ml végkoncentrációjú anti-CAR poliklonális antitesttel, valamint 3 µg/ml

végkoncentrációjú anti- $\alpha_v\beta_3$ és anti- $\alpha_v\beta_5$ integrin monoklonális antitestekkel (Sigma-Aldrich, ZooMAb[®]) blokkoltuk, majd megvizsgáltuk a különböző antitest kombinációk hatását a FeAdV sejtekbe történő bejutására.

3. 7. FeAdV fertőzött HeLa sejtek citokin termelésének vizsgálata

Fertőzetlen és fertőzött HeLa sejtek felülúszójából 2, 4, 6, 8, 10, 24, 48, 72, 96 és 168 óra után mintát vettünk és a FeAdV fertőzés hatására felszabaduló citokinek közül az interleukin-10 (IL-10) és a transzformáló növekedési faktor béta-1 (TGF- β 1) termelődését vizsgáltuk DuoSet[®] ELISA kittel.

3. 8. Statisztikai analízis

Minden kísérlet során egyidejűleg három párhuzamos vizsgálat készült (n=3). Az adatokat standard hiba feltüntetésével ábráztuk. Kétmintás T próbával $p < 0,05$ (*) és $p < 0,001$ (**) értékeket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

4. Eredmények

4. 1. Génösszehasonlítás

A FeAdV hexon génje egy korábban részlegesen szekvenált szakaszhoz képest négy nukleotid különbséget tartalmazott, amelyek közül egy aminosav változást is eredményezett. A közép-európai HAdV-1 D11 izolátumhoz képest három csendes mutációt tapasztaltunk, aminosav változás nélkül. A HAdV-1 referencia szekvencia esetén egy aminosav változást nem okozó nukleotid csere történt.

A fiber szekvenciát a HAdV-1 D11 izolátumhoz hasonlítva összesen 12 különbséget találtunk, ebből 3 bázis a *shaft* régióban helyezkedett el, mindegyik esetében aminosav változás is történt, ráadásul 2 aminosav töltése meg is változott. A FeAdV fiber *knob* doménjében kilenc nukleotid különbséget tapasztaltunk, négy esetben aminosav változással, egy aminosav esetén pedig töltésváltozással is járt. A csere a fiber AB hurok régiójában helyezkedik el, amely a CAR-hoz való kötődésben jelentős szerepet játszik. A HAdV-1 referencia genomhoz képest 3 nukleotid változást tapasztaltunk, amely aminosav cserét nem eredményezett.

4. 2. Filogenetikai elemzés

A hexon és fiber gének szekvenciáit összehasonlítottuk a GenBank adatbázisban közölt HAdV-1 hexon és fiber szekvenciákkal és azt találtuk, hogy a hexon gén egy 2014-ben izolált francia HAdV-1 típusal, a fiber gén pedig az 1953-as, első AdV izolátummal áll a legközelebbi rokonságban.

4. 3. FeAdV ellenállóképességének vizsgálata

4. 3. 1. Fiziko-kémiai hatások

56°C-os hőhatásnak kitéve, 1 perces hőkezelés 54%-kal, a 2 perces hőhatás pedig már több mint 90%-kal szorította vissza a vírusszaporodást. Immunhisztokémiai módszerrel a 3 percig tartó hőkezelés esetén már nem tudtunk fertőzött sejtet kimutatni. 10 perces UV besugárzás után már nem találtunk FeAdV szaporodásra utaló jeleket. Savas pH tartományban pH 1 és pH 2 között teljes inaktiválódást tapasztaltunk, majd egy szignifikáns növekedés volt észlelhető a vírus fertőzőképességében a semleges tartomány eléréséig. Az izolátum pH 7 és pH 10 között bizonyult a legstabilabbnak, sőt eredményeink alapján a pH 9 még serkentő hatással is volt a vírusszaporodásra. A

11-es és 12-es pH értékek között egy hirtelen, nagymértékű (közel 80%-os) fertőzéscsökkenést tapasztaltunk. A nagyon lúgos tartományban (pH 13-pH 14) pedig a savas tartományhoz hasonlóan, teljes inaktiválódást láttunk. 5 percig tartó 5 g/l (0,067 mol/l) NaClO és 65 mg/l (1,412 mol/l) alkil-dimetil-benzil-ammónium-klorid tartalmú etil-alkohol oldatos kezelés teljes mértékben inaktiválta a FeAdV-t.

A FeAdV fiziko-kémiai hatásokkal szembeni érzékenysége hasonló a szakirodalomban leírt egyéb HAdV típusokhoz. Például HAdV-1, -2 és -5 típusok 5 perces 56°C-os hőkezelés, a 8-as típus 10 perces UV besugárzás hatására teljesen inaktiválódtak, a HAdV-1, -2, -3 és -4 pH érzékenysége szinte teljesen azonos volt az általunk tapasztaltakkal. HAdV-2 és -5 pedig már néhány másodperc alatt elpusztult 0,2 mg/l szabad klór és 45-95 tömegszázalékos (m/m%) etanolos oldatok hatására.

4. 3. 2. Antivirális gyógyszerek

1,5 óráig előkezelt sejtek FeAdV-vel történő fertőzése során 50%-os gátló hatást tapasztaltunk 0,625 mg/ml ribavirin és cidofovir, illetve 0,3125 mg/ml stavudin

esetén. Ha a FeAdV fertőzést követően 2 órával kezeltük a sejteket az egyes gyógyszerekkel, ugyanezeket az eredményeket kaptuk. 24 órával a fertőzés után már csak 25 mg/ml ribavirin, 1,25 mg/ml cidofovir és 0,625 mg/ml stavudin volt képes 50%-ban gátolni a FeAdV-t. A vírus antivirális szerekekkel szemben ellenállóbbnak bizonyult az egyéb HAdV típusokhoz képest. Például HAdV-2 és -5 típusokat kb. 0,03 mg/ml ribavirin, kb. 5-6 µg/ml cidofovir, HAdV-19 és -37 típusokat kb. 5 µg/ml stavudin 50%-ban gátolta.

4. 3. 3. Avemar antivirális hatásainak vizsgálata

Az Avemar pulvis hatása a FeAdV replikációra HeLa és CrFK sejtekben

CrFK sejtek nagyobb (moi 10) vírushatózóval történő fertőzése során a fertőzött sejtek száma az alkalmazott Avemar koncentrációtól függően az elő és utókezelések során is csökkenő tendenciát mutatott. A dózisfüggő gátlás jelentősebb volt, amikor a sejteket Avemar előkezelésnek tettük ki a FeAdV fertőzés előtt 24 órával. HeLa sejteken sem az elő, sem pedig az utókezelés nem befolyásolta jelentősen a FeAdV hexon antigéntermelődést.

Avemar és FIV fertőzés együttes vizsgálata macska eredetű sejteken

Mivel az adenovírusok képesek transzaktiválni a HIV-et, ezért a retrovírus fertőzésekben is érdemes lehet kiegészítő terápiaként alkalmazni.

Avemarral történő előkezelés hatására lényegesen lecsökkent a FIV replikációja akut fertőzés modellezésére alkalmas MBM sejtekben, az idő elteltével pedig, ahogy a sejtek fokozatosan pusztultak, a felülúszók vírustartalma növekedett.

Az Avemar kezelés dózis- és időfüggő módon befolyásolta a krónikus FIV fertőzés modellezésére használt FL-4 sejtek életképességét és morfológiáját. Titrálási eredményeink azt mutatták, hogy a töményebb, 25-250 µg/ml-es Avemarral kezelt felülúszók kis mennyiségű vírust tartalmaztak, 500-1000 µg/ml-es töménységnél pedig a sejtlyázatok esetén tapasztaltuk a vírus mennyiségének csökkenését.

4.4. Gazdasejt receptorainak és koreceptorainak gátlása

A HeLa sejteken az egyes antitesteket egyenként vizsgálva, különböző mértékben, de mindegyik receptor gátlása hatással volt a vírusszaporodásra. CAR és a koreceptorok együttes blokkolása esetén moi 0,1 arányú FeAdV-vel történő fertőzés során közel 40%-kal csökkent a fertőzött sejtek száma. Moi 1 arányú fertőzésnél kiugró változást egyik gátlási kombinációnál sem tapasztaltunk, a fertőzött sejtek számának csökkenése 18-27% között volt. CrFK sejtek moi 1-gyel történő fertőzése során a CAR és az $\alpha_v\beta_3$ együttes gátlása esetén tapasztaltuk a legnagyobb mértékű csökkenést fertőzött sejtek számában. A három vizsgált receptor együttes antitest blokkolása szintén jelentős eltéréseket mutatott. Nagyobb arányú (moi 10) vírusnak kiteve a CAR, $\alpha_v\beta_3$ és $\alpha_v\beta_5$ receptorok egyidőben történő gátlása volt a legnagyobb gátló hatással a fertőzött sejtek számára, de a másik három gátlási variáció mindegyike akadályozta a FeAdV sejtbe jutását, közel hasonló mértékben.

Kis mennyiségű (moi 0,1) FeAdV inokulummal fertőzött HEK-293 sejtekben 11,5%-os csökkenés volt a legnagyobb, amelyet a CAR és $\alpha_v\beta_3$ vagy $\alpha_v\beta_5$ receptorok együttes gátlása révén értünk el. Nagyobb mennyiségű

(moi 1) vírusfertőzés estében látványosan kevesebb fertőzött sejtet tudtunk kimutatni abban az esetben, ha mindhárom receptort együttesen, vagy amikor csak az integrin receptorokat gátoltuk. A sejtek anti-CAR és anti- $\alpha V\beta 3$ ellenanyagokkal történő kezelése során szintén viszonylag nagymértékű csökkenést láttunk.

4. 5. FeAdV fertőzött HeLa sejtek citokin termelésének vizsgálata

A tanulmányozott citokinek termelése a vizsgálati időtartományon belül ingadozást mutatott. Az IL-10 csúcsmaximuma fertőzetlen HeLa sejtekben 72 óra után, míg fertőzött sejtek esetén a fertőzést követően 48 órával kb. feleakkora mértékben alakult ki.

A nem fertőzött HeLa sejtek TGF- $\beta 1$ termelése az első 10 órában intenzív ingadozást mutatott, a maximumot 72 óra után tapasztaltuk. Fertőzés hatására a TGF- $\beta 1$ termelés az első néhány órában jelentős csökkenésnek indult, majd 8 óra után növekedni kezdett és 24 óra elteltével érte el maximumát. A FeAdV tehát jelentős immunmoduláló hatással rendelkezik.

5. Következtetések

Eredményeink tovább erősítik azt a feltételezést, miszerint szoros rokonsági kapcsolat van a HAdV-1 és a macskából izolált FeAdV között, amely felveti a zoonózis, vagy a reverz zoonózis kérdését. A FeAdV-vel végzett korábbi kísérletek, a filogenetikai és génösszehasonlítási eredményeink, valamint számos publikáció azt sugallják, hogy a FeAdV egy önálló biológiai egység, amely az egész világon elterjedt és potenciálisan megfertőzheti az embert. Kutatásunk során a FeAdV karakterizálásához nélkülözhetetlen információkat kaptunk. Fiziko-kémiai vizsgálataink segítségével feltártuk azokat a körülményeket, amelyek gátolják a FeAdV szaporodását, vagy teljesen elpusztítják a vírust. Meghatároztuk az izolátum antivirális gyógyszerekkel szembeni érzékenységét, adatokat szolgáltatva ezzel a legmegfelelőbb gyógymód eléréséhez. Receptor és koreceptor blokkolási eredményeink segítségével feltártuk, hogy a FeAdV alternatív útvonalakon is képes lehet a sejtbe jutni és fertőzést indukálni, ezeknek a pontos meghatározása azonban további kutatásokat igényel. Nyomon követtük két fontos, pleiotróp hatású citokin

termelődésének változását FeAdV hatására, így világossá vált, hogy a vírus feltételezhetően erős immunmoduláló tulajdonságokkal rendelkezik. A FeAdV ilyen mértékű jellemzése alapvető információkat ad az izolátum génterápiás vektorként való alkalmazhatóságáról is. Munkacsoportunk elsőként vizsgálta az Avemar gyógyhatású készítmény antivirális tulajdonságait. Kísérleteink során azt láttuk, hogy a szer képes csökkenteni a FIV és a FeAdV kibocsátását különböző sejtekből, érdemes tehát megfontolni HIV fertőzés során kiegészítő kezelésként történő alkalmazását.

A FeAdV-vel végzett korábbi vizsgálatok és jelenlegi eredményeink együttesen azt támasztják alá, hogy a macskák képesek lehetnek adenovírussal fertőződni, ráadásul potenciálisan átadhatják azt az arra fogékony embereknek is. A jövőben további szerológiai, molekuláris biológiai és összehasonlító vizsgálatokra van szükség, hogy a FeAdV patomechanizmusát a lehető legjobban feltárjuk és megértsük macskákban és emberekben egyaránt, valamint indokolt lenne specifikus diagnosztikai módszerek, eszközök kidolgozása is.

6. Saját publikációk jegyzéke

6. 1. Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények listája:

1. Ongrádi J, Chatlynne LG, Tarcsai KR, Stercz B, Lakatos B, Pring-Åkerblom P, Gooss D Sr, Nagy K, Ablashi DV. Adenovirus Isolated From a Cat Is Related to Human Adenovirus 1. Front Microbiol. 2019 Jun 25;10:1430. **IF: 4,236**

2. Tarcsai KR, Kapran I, Hidvégi M, Stercz B, Nagy K, Ongrádi J. (2020). Fermentált búzacsíra-kivonat(Avemar) antivirális hatásának vizsgálata macska AIDS modellben. Magy. állatorv. L. 2020;142(12), 731-741. **IF: 0,220**

3. Tarcsai KR, Hidvégi M, Corolciuc O, Nagy K, Abbas AA, Ablashi DV, Kövesdi V, Ongrádi J. The effects of Avemar treatment on feline immunodeficiency virus infected cell cultures. Vet Med Sci. 2023 Jul;9(4):1446-55. **IF: 1,7**

**6. 2. Egyéb, nem az értekezés témájában meg jelent
eredeti közlemények listája:**

1. Nagy A, Nagy O, Tarcsai K, Farkas Á, Takács M. First detection of tick-borne encephalitis virus RNA in clinical specimens of acutely ill patients in Hungary. Ticks Tick Borne Dis. 2018 Mar;9(3):485-489. **IF: 3,055**