

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**A HIV-1 és HIV-2 pszeudovirion transzdukció
összehasonlító transzkriptomikai és proteomikai elemzése a
vírusfertőzés korai szakaszában**

Linkner Tamás Richárd

Témavezető: Dr. Mahdi Mohamed



DEBRECENI EGYETEM

Molekuláris, Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

Debrecen, 2025

A HIV-1 és HIV-2 pszeudovirion transzdukció összehasonlító transzkriptomikai és proteomikai elemzése a vírusfertőzés korai szakaszában

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Linkner Tamás Richárd, okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Sejt- és Immunbiológiai doktori iskolája
keretében

Témavezető: Dr. Mahdi Mohamed Faisal.

Az értekezés bírálói:

Dr. Csoma Eszter, PhD
Dr. Pettkó-Szandtner Aladár, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Bácsi Attila, PhD, az MTA doktora
tagok: Dr. Tar Krisztina, PhD
Dr. Patai Árpád, PhD
Dr. Csoma Eszter, PhD
Dr. Pettkó-Szandtner Aladár, PhD

Az értekezés védésének helyszíne és időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati
Intézet A épület tanterem 2026.03.13. 13:00 óra

Bevezetés

HIV epidemiológia

Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) adatai szerint világszerte több mint 39 millió fertőzött ember él HIV-vel (HIV.gov, 2024). A fertőzések többségéért a HIV-1 felelős, de az összevont adatokban szerepelnek a HIV-2 által okozott fertőzések és a kettős HIV-1/2 fertőzések is. A HIV-2-fertőzés prevalenciájáról a mai napig nem áll rendelkezésre pontos statisztika; nagyon elavult becslések szerint körülbelül 2 millió fertőzött él, főként a nyugat-afrikai régióban, beleértve a HIV-1-gyel és HIV-2-vel fertőzött eseteket is (Gottlieb et al., 2008). A közelmúltban kimutatták, hogy a HIV-2-fertőzés előfordulása olyan országokra is kiterjed, amelyek jelentős gyarmati vagy társadalmi és gazdasági kapcsolatban állnak a nyugat-afrikai régióval, mint például Franciaország, Spanyolország és Portugália (HIV.uw.edu, 2024; Reeves és Doms., 2002; Campbell-Yesufu és Gandhi., 2011).

HIV genetikai felépítése

A HIV genomja egy egyszálú RNS két azonos másolatából áll, amelyek a fertőzés során a reverz transzkriptáz segítségével íródnak át DNS-é. A HIV-genom mindkét végén található egy úgynevezett long terminal repeat (LTR), valamint az 5'-végi régiók egy transzkripció promotert kódolnak. A *gag* gén, amelynek leolvasási kerete 5'-3' irányban van, a külső magmembrán fehérjéit, a kapszidfehérjét, a nukleokapszidot és egy kisebb, nukleinsavakat stabilizáló fehérjét kódol. Ezt követi a proteáz (PR), a reverz transzkriptáz (RT) és az integráz (IN) enzimeket kódoló *pol* gén. A *pol* gén mellett található az *env* leolvasási keret, amely a felszíni (SU) és a transzmembrán (TM) fehérjéket kódolja, melyeket burok glikoproteinekként is ismernek. A HIV genom számos szabályozó fehérjét kódol a szerkezeti fehérjéken kívül, mint például a Tat és a Rev, amelyek kulcsfontosságúak a HIV replikáció megindításában. Ezenkívül a HIV genom több kiegészítő fehérjét is kódol, mint például a Nef, Vif, Vpr és Vpu. A HIV-2 a Vpx-et kódolja Vpu helyett (German Advisory Committee Blood, 2016) (Li et al., 2005). A HIV-1 és HIV-2 genomja nukleotidszekvenciájukban mindössze 50-55%-os azonosságot mutat. A Gag aminosavszekvenciájában 54%-os, a Pol-ban 55%-os, míg az Env-fehérjékben 35%-os a hasonlóság (Li et al, 2015) (Motomura et al., 2008).

HIV életciklusa

A HIV életciklusa két szakaszra osztható: egy korai és egy késői fázisra. A korai fázis elején a vírus felszíni glikoproteinje a célreceptorhoz kötődik, ami kiváltja a vírusburok és a sejtmembrán fúzióját (Freed, 2015) (Chen, 2019) (Melikyan, 2014). A bejutást követően a vírúsmag a citoszkeletonon keresztül eljut a sejtmagba. A vírúsmag magában foglalja a kapszidot, a nukleokapszidot és a vírusfehérjéket, például az RT-t, PR-t és az IN-t. A citoszkeletális transzport során a vírus kapszidja szétesik egy uncoating-nak nevezett folyamatban, amely a reverz transzkripció befejezéséhez szükséges (Ambrose & Aiken, 2014). A reverz transzkripció a vírúsmag belsejében indul meg, miközben a citoszkeletonon keresztül szállítódik. A folyamatot az RT enzim közvetíti, amelynek során a vírus RNS-genomja kétszálú DNS-é íródik át (Goff, 2001) (Xavier Ruiz & Arnold, 2020). A sejtmag elérése után összeáll a pre-integrációs komplex (PIC), amely tartalmazza az átírt vírus-DNS-t, valamint vírus- és gazdafehérjéket (Goff, 2001) (Arhel, 2010) (Li, 2015). A legújabb adatok azt mutatják, hogy az uncoating és a reverz transzkripció a sejtmagba történő bejutást követően is folytatódik (Dharan et al., 2020) (Müller et al., 2022). A PIC a nukleopórus komplexen keresztül, importin/kariofilin függő módon jut be a sejtmagba. A sejtmagba való bejutásban részt vevő gazdafehérjék, mint a Vpr és az IN, a nukleáris lokalizációs szignáljukon keresztül kerülnek interakcióba a vírúsmaggal. Az IN kölcsönhatásba lép a nukleáris transzportgépezet tagjaival, és indukálja a PIC transzlokációját a sejtmagba (Jayappa et al., 2012) (Popov et al., 1998). A magba jutást követően a vírusgenom integrálódik a gazdasejt DNS-ébe, amelyet a virális IN közvetít (Hokello et al., 2024). Az integráció a HIV életciklusának korai szakaszából a késői szakaszba való átmenetet jelzi. A késői fázisban megkezdődik a vírus transzkripciója, amelynek során új vírusfehérjék szintetizálódnak, és új virionok épülnek fel (Freed, 2015). A fertőzött sejtekben az integrált vírus-DNS templátként működik a vírus mRNS- és genomiális RNS-szintézisében. A késői fázis kezdetén a vírus transzkripciója olyan celluláris faktoroktól függ, mint a nuclear factor kappa B (NF- κ B), egészen a Tat expressziójáig. A Tat kötődik a vírus trans-activator receptor (TAR) régiójához, amely után olyan sejtfehérjéket toboroz, mint a positive transcription elongation factor b (P-TEFb), amely cyclin dependent kinase 9-et (CDK9) és cyclin T1-et (CCNT1) tartalmaz. Ez lehetővé teszi a vírus számára, hogy teljes hosszúságú vírus RNS-t és különböző mRNS-termékeket szintetizáljon (Liu et al., 2014). A vírus mRNS transzportját a sejtmagból a citoplazmába a Rev fehérje irányítja (Hokello et al., 2024). A HIV-1 virion összeépülése a sejt plazmamembránján történik, és a folyamatot a Gag poliprotein közvetíti. A Gag toborozza az Env fehérjéket és a vírus genomiális RNS-ét a vírus összeszerelődésének helyére. A virion a plazmamembránból történő bimbózás során szerzi meg lipidburokját és az Env fehérje tüskéit. A Gag poliprotein először éretlen részecskékké áll össze,

amelyeket a bimbózást követően az aktivált vírus PR alakít át, új fertőző, érett vírusrészecskékké képezve (Sundquist & Kräusslich, 2012) (Ganser et al., 2012).

Lentivirális vektorok

A replikációra inkompetens lentivírusvektorok kényelmes és hatékony eszközként szolgálnak a gének stabil és produktív átviteléhez az emberi eredetű sejtekbe, így vonzó jelöltek a humán génterápia számára. Fő előnyük, hogy stabilan beépülnek célsejtjeik DNS-ébe, biztosítva a hosszú távú génexpressziót. A lentivírus-alapú vektorok jelentős előnyt jelentenek az oncoretrovirális rendszerekkel szemben, mivel képesek géneket juttatni nem osztódó sejtekbe is. Sikeres terápiairól számoltak be súlyos monogén rendellenességekben szenvedő betegeknél, mint például bőradhéziós rendellenesség, immunhiányos, neurometabolikus és hemoglobinopátiás betegségek kezelésében, amelyek vírusvektorokkal transzduktált szomatikus őssejteken alapulnak (Zufferey et al., 1998) (Tucci et al., 2021). Az első lentivírus-alapú vektorok a HIV-genom nagy részét tartalmazták. Burokfehérjeként a vesicular stomatitis vírus (VSV-G) G fehérjét alkalmazták. A VSV-G célreceptora egy alacsony sűrűségű lipoprotein (LDL) receptor, foszfatidilszerin vagy talán egyéb foszfolipidek, amelyek lehetővé tették a lentivírus-alapú vektorok számára, hogy sokféle sejtet megcélozzanak. A lentivektorok következő iterációjában a kiegészítő fehérjéket eltávolították, tovább javítva a konstrukciót. A vektorbiztonság további javítása érdekében a harmadik generációs rendszerekben a vírus genomját két plazmidra osztották, ami valószínűtlenebbé teszi rekombináns vírusok létrejöttét. A lentivírus-alapú vektorok azért váltak vonzóvá a klinikai felhasználás számára, mert képesek lassan vagy nem proliferáló sejteket transzduktálni, beleértve a CD34+ őssejteket is. Az olyan genetikai betegségeket, mint a metakromatikus leukodystrophia, Wiskott-Aldrich-szindróma, β -talaszémia és X-kapcsolt adrenoleukodystrophia sikeresen kezelték lentivírus-alapú vektorokkal (Milone & O'Doherty, 2018) (Dull et al., 1998) (Miyoshi et al., 1998). Vannak negyedik generációs lentivírusvektorok is, amelyekben módosították a csomagoló szekvenciákat, hogy elkerüljék a replikáció-kompetens részecskék kialakulását. Ezekben a vektorokban a HIV-1 ψ és RRE csomagolószekvenciák az öninaktiváló LTR-től lefelé helyezkednek el. A vírustermeléshez szükséges egyes víruskomponensek, például a strukturális és szabályozó gének a vektor képződése során rendelkezésre állnak, de kizárják őket a végső vírusgenomból. Ez összességében tovább javítja a vektorok biztonságát (Vink et al., 2017) (Berkhout, 2017).

HIV indukálta transzkriptomikai és proteomikai változások

A kutatók több olyan gént találtak, amelyek a HIV-fertőzés hatására eltérően szabályozódnak. Coelho és munkatársai kimutatták, hogy a fertőzött CD4+ T-sejtekben 208 gén felfelé szabályozódott, köztük a toll-like receptor 7 (*TLR7*), a beta-interferon 1 (*IFNB1*) és a TNF superfamily 4 (*TNFSF4*) (Coelho et al., 2021). Wu és munkatársai tanulmányukban azokra a génekre összpontosítottak, amelyek eltérően expresszálódnak a HIV-fertőzött betegek CD4+, CD8+ T-sejtjeiben és makrofágaiban. A proteaszómát, a protont szállító ATPáz komplexet, az aktin filamentumokat és a komplement aktiválását szabályozó gének emelkedett szintjét találták. Az olyan útvonalak, mint a betegség progressziójának mitokondriális jelei, valamint az energiatermeléshez, az apoptózishoz, a sejtciklus diszregulációjához és az anyagcseréhez kapcsolódó utak feldúsulását detektálták az elemzés során (Wu et al., 2011). Pollara et al. egycsejt alapú transzkriptom szekvenálást alkalmazott a HIV-1 fertőzéshez kapcsolódó elváltozások és sejtdinamika kimutatására, amelyek a terápia ellenére is megmaradhatnak. Azt találták, hogy a nem kezelt HIV-1-fertőzött betegek sejtlejében 45 gén lefelé, 96 pedig felfelé szabályozódott. Nevezetesen, a HIV-1 fertőzés proinflammatorikus állapotot indukált az összes megfigyelt immunsejt típusban, amelyet az interferon válasz gének fokozódása jellemez. Ezenkívül a szeronegatív egyénekhez képest 83 pozitívan és 31 negatívan szabályozott gént találtak antiretrovirális terápia alatt álló HIV-1-fertőzött egyénekben (Pollara et al., 2022). Számos tanulmány a HIV-fertőzés okozta proteomikai változásokra összpontosít. Chan és munkatársai munkájuk során 3255 sejtfehérjét mutattak ki HIV-1 fertőzött CD4+ T-sejtvonalból. A kimutatott fehérjék közül 344 pozitívan, 343 pedig negatívan szabályozódott a fertőzés után 36 órával. Ez az időpont a vírustermelés csúcsát jelöli. Az útvonal-analízisük azt mutatta, hogy ezen fehérjék a sejtciklus előrehaladásában, a citrátkör útvonalán, az ubiquitinációban és a nukleokariocitoplazmatikus transzportban játszanak szerepet. A HIV-1 fehérjével ismert kölcsönhatást mutató fehérjék szintjében is változást figyeltek meg (Chan et al., 2007). Egy másik tanulmányban Al-Mozaini és munkatársai több mint 314 egyedi perifériás vérplazmafehérjét azonosítottak, amelyek közül 100 szignifikánsan eltérően szabályozódott a HIV-1, HIV-2 és HIV-1 elit kontroller minták között. A két HIV-vírus között a fehérjeprofilok rendkívül hasonlóak voltak. E hasonlóságok ellenére azonban 6 fehérje szignifikáns különbséget mutatott a HIV-1 és HIV-2 fertőzött minták között, köztük a prohibitin-2 (PHB2), a calcineurin subunit B type 1 (PPP3R1), az electron transfer flavoprotein subunit beta (ETFB), a rhombotin-2 (LMO2), a protein S100-A9 (S100A9), valamint a virális Vif. A tanulmány arra

a következtetésre jutott, hogy ezek a különböző fehérjék felhasználhatók HIV-fertőzött egyének diagnosztizálására, és prognosztikai molekuláként szolgálhatnak. Mivel a single markerek használata nem feltétlenül szolgál pontos prognosztikai adatokkal, hatékonyabb betegség-specifikus fehérjepanel markerek alkalmazása javasolt, amelyek kiemelkedőbb információt nyújtanak (Al-Mozaini et al., 2021).

Célkitűzések

Az eddigi közel 40 éves HIV-kutatás ellenére nagyon kevés tanulmány foglalkozott a HIV életciklusának korai szakaszának jellemzésével különböző sejtípusokban. Ezen túlmenően kevés cikk foglalkozott a HIV-2 generálta sejtes változásokkal HIV-1-hez hasonlítva. Emellett a lentivírus alapú vektorok folyamatos használatban vannak a génterápiában, és nagy erőfeszítéseket tesznek a biztonságuk és stabilitásuk javítására kutatásuk és fejlesztéseik során. Azonban a gazdasejt transzkriptumára és proteomjára gyakorolt hatásukat még nem vizsgálták. A HIV-1 és HIV-2 által generált proteomikai és transzkriptomikai változásokkal kapcsolatos ismereteink gyarapítása érdekében a következő célokat tűztük ki vizsgálatunkkal:

1. A HEK-293T sejtekben a HIV-1 és 2 alapú lentivirális vektorok által indukált proteo-transzkriptomikai változások elemzése a lentivírus transzdukció korai fázisában
2. A HIV-1 és HIV-2 közötti proteo-transzkriptomikai változások összehasonlító elemzése, kiemelve a HEK-293T és Jurkat sejtekben részt vevő útvonalak hasonlóságait és különbségeit.

A bemutatott tanulmányt 2018 és 2022 között végezték a Debreceni Egyetem Biokémia és Molekuláris Biológiai Intézetén, a Proteomics Core Facility és Center for Clinical Genomics and Personalized Medicine szolgáltatásait igénybe véve.

Anyagok és Módszerek

Felhasznált plazmidok

Második generációs lentivirális vektorrendszert alkalmaztunk a HIV-1, HIV-2 és kontrol pszeudovirionok termelésére. A HIV-1 pszeudovirionok előállításához a következő plazmidokat használtuk: pWOX-CMV-GFP transzfer vektor, amelyet módosítottunk, hogy a zöld fluoreszcens fehérje (GFP) helyett mCherry-t expresszáljon, psPAX2 csomagoló plazmidot (ajándék Dr. D. Tronótól, a Genfi Egyetemről) és pMDG.G-t, amely a vesicularis

stomatitis vírus (VSV) G fehérjét kódolja. A HIV-2 virionok generálásához a következő plazmidokat alkalmaztuk: CGP, egy ROD alapú HIV-2 fehérje expressziós vektor, CRUS5SINCGW transzfer vektor, amely egy CMV promóter szabályozása alatt álló GFP expressziós kazettával rendelkezik (mindkét plazmid ajándék Joseph P. Dougherty-tól a Robert Wood Johnson Medical School-tól), továbbá a pMD.G plazmidot. A kontrol pszeudovirionok előállításához pTY-EFeGFP plazmidot alkalmaztunk, amelyben egy EF1a promóter szabályozása alatt álló GFP expressziós kazetta található, és a már említett pMD.G vektort használtuk.

Sejt vonalak és fenntartásuk

Humán embrionális vesesejteket (HEK-293T) és Jurkat T sejteket az American Type Culture Collectiontól (ATCC) (Manassas, VA, USA) szereztük be. A HEK-293T sejteket 10% fetal bovine serum-mal (FBS), 1% L-glutamin-nal és 1% penicillin/streptomycin-nel kiegészített Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) közegben tenyésztettük. A sejtek passzálása során először eltávolítottuk a médiumot, majd a sejteket 1x foszfát pufferrel (PBS) mostuk. Ezt követően a sejteket 0,25%-os (w/v) tripszin-EDTA oldattal fellazítottuk, majd centrifugáltuk 100 g-n, 24°C-on, 5 percig. Ezután a sejteket friss DMEM-ben felfuszpendáltuk, és $0,5 \times 10^6$ és $1,5 \times 10^6$ közötti sejtmennyiséget juttattunk vissza a tenyésztő edénybe. Jurkat sejtek esetén a sejteket először centrifugáltuk 100 g-n, 24°C-on, 5 percig. Ezt követően a sejt pelletet friss Roswell Park Memorial Institute Medium-ban (RPMI) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) felfuszpendáltuk, és 1×10^6 sejtet oltottunk vissza a tenyésztő edénybe.

HIV-1, HIV-2 és kontrol pszeudovirion termelés

HIV-1 pszeudovirion termeléshez a pWOX-CMV-mCherry, psPAX2 és pMD.G plazmidokat 3:2:1 arányban alkalmaztuk. HIV-2 esetében 1:1:1 arányban használtuk a CGP-t, CRUS5SINCGW-t és pMD.G-t. Hasonlóképpen, a kontrol pszeudovirionok előállításához 1:1 arányban alkalmaztuk a pTY-EFeGFP és pMD.G plazmidokat. A transzfekciót megelőző napon a HEK-293T sejteket passzáltuk úgy, hogy körülbelül 70%-os konfluenciájúak legyenek a következő napon ($\sim 3 \times 10^6$ sejt/flaska (tenyésztési terület $75 \text{ cm}^2/\text{flaska}$)). A fent említett plazmid arányokat alkalmaztuk a viriontermeléshez, és a polyethylenimine (PEI) módszert használtuk. A folyamat végén a sejteket 5 órán keresztül inkubáltuk 37°C-on, 5% CO₂-t

tartalmazó inkubátorban, antibiotikummentes, 1%-os FBS-t tartalmazó DMEM-ben. Az inkubáció végén eltávolítottuk a médiumot, és kicseréltük 10%-os FBS-t, 1%-os L-glutamint és 1%-os penicillin/streptomycin-t tartalmazó DMEM-re. 24, 48 és 72 órával a transzfekció után összegyűjtöttük a virionokat tartalmazó médiumot, és átszűrtük egy 0,45 µm-es polivinylidene fluoride szűrőn (Merck Millipore, Darmstadt, Németország). A felülúszókat összegyűjtöttük, és ultracentrifugálással (100 000 x g, 2 óra 10 perc, 4°C) koncentráltuk. A virionokat tartalmazó pelletet felfuszpendáltuk PBS-ben, és -70°C-on tároltuk. Egy enzimhez kötött immunszorbens esszé (ELISA) alapú kolorimetriás módszert (Roche Applied Science, Mannheim, Németország) alkalmaztunk a termelt pszeudovirionok reverz transzkriptáz (RT) aktivitásának meghatározására. A pszeudovirionok transzdukciós egységeit (TU/ml) transzdukciós kísérletek segítségével határoztuk meg HEK-293T sejteken. Kísérleteinkben a kontrol mennyiségét a HIV-1 virionok reverz transzkriptáz aktivitásának ekvivalenciájára kalibráltuk. Ezzel biztosítottuk, hogy a transzdukciós kísérleteinkben azonos virion mennyiséget alkalmazzunk.

HEK-293T sejtek transzdukciója és RNS izolálás transzkriptomikai analízishez

A transzdukciót megelőző napon a HEK-293T sejteket 6 lyukú tenyésztőedényre oltottuk (5×10^5 sejt/well (tenyésztési terület $9,6 \text{ cm}^2/\text{well}$)) 10%-os FBS-t, 1%-os L-glutamint és 1%-os penicillin-streptomycin-t tartalmazó DMEM-be. A transzdukció napján eltávolítottuk a tápfolyadékot, és a sejteket transzduktáltuk 5 ng RT aktivitással egyenlő HIV-1/HIV-2 vagy kontrol pszeudovirionnal, szérum- és antibiotikummentes médiumban, amit 8 µg/ml polybrennel kiegészítettünk. Nulla, kettő, nyolc, tizenkét és huszonhat óránként az adott időponthoz tartozó mintákról eltávolítottuk a médiumot, és foszfát pufferrel mostuk őket. Ezt követően a sejteket felfuszpendáltuk TRIzol reagensben (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Az RNS izolálását a gyártó protokollja szerint végeztük. Az RNS minőségét az Agilent RNA 6000 Nano kit segítségével, az Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn, Németország) alkalmazásával ellenőriztük. A minták szekvenálását a Debreceni Egyetem Genomi Medicina és Bioinformatikai Szolgáltató Laboratóriumának munkatársai végezték, az MGIEasy RNA Library Prep Set és az MGI DNBSEQ G400 (MGI tech, Shenzhen, Kína) szekvenátor felhasználásával.

HEK-293T sejtek transzdukciója proteomikai analízishez

A transzdukciót megelőző napon a HEK-293T sejteket T-25 flasksba oltottuk $0,7-1 \times 10^6$ sejt/flaska (tenyésztési terület $25 \text{ cm}^2/\text{flaska}$) sűrűségben, 5 ml 10%-os FBS-sel, 1%-os L-glutaminnal és 1%-os penicillin-streptomycin-nel kiegészített DMEM-be. A következő napon a médiumot eltávolítottuk, és a sejteket transzduktáltuk 15 ng RT aktivitásnak megfelelő mennyiségű HIV-1/HIV-2 vagy kontrol pszeudovirionnal, 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ polybren-nel kiegészített, szérum- és antibiotikummentes médiumba. A sejteket $37 \text{ }^\circ\text{C}$ -on, 5% CO_2 -t tartalmazó közegben inkubáltuk nulla, kettő, nyolc, tizenkét és huszonhat órán keresztül. Az adott időpontokban a médiumot eltávolítottuk, és a sejteket PBS-be felkapartuk. Centrifugálást követően a sejteket analízisig $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ -on tároltuk.

Jurkat sejtek transzdukciója és RNS izolálás transzkriptomikai analízishez

A transzdukció napján a Jurkat sejteket 24 lyukú tenyésztőedényre oltottuk ($1,25 \times 10^5$ sejt/well (térfogat 0,5-1,0 ml/well)) 10%-os FBS-sel, 1%-os L-glutaminnal és 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ polybren-nel kiegészített RPMI médiumba. Ezt követően 250 000 transzdukciós egység/ml-nek (TU/ml) megfelelő HIV-1/HIV-2 vagy kontrol pszeudovirionnal transzduktáltuk a sejteket. Nulla, kettő, nyolc, tizenkét és huszonhat óránként az adott időponthoz tartozó mintát lecentrifugáltuk, egyszer mostuk PBS-sel, majd lizáltuk TRIzol reagens (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) használatával.

Az RNS izolálást a gyártó protokollja szerint végeztük. Az RNS minőségét az Agilent RNA 6000 Nano kit segítségével, az Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn, Németország) alkalmazásával ellenőriztük. A minták szekvenálását a Debreceni Egyetem Genomi Medicina és Bioinformatikai Szolgáltató Laboratóriumának munkatársai végezték, az Illumina NextSeq 500 szekvenátor (Illumina, CA, USA) felhasználásával.

A HEK-293T transzdukció azonnali és korai fázisához tartozó transzkriptomikai adatok elemzése

A Trimmomatic v0.36 használatával az RNA-seq nyers FASTQ adatok adaptereltávolításon és minőségi szűrésen mentek keresztül (phred score 30) (Bolger et al., 2014). A trimmelt szekvenciák minimális hosszát 36 bp-ban határoztuk meg. A minőségellenőrzés a FastQC v0.11.9 segítségével történt (Andrews, S. FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data). A leolvasott adatokat a GRCh38 Human Genome Assembly referenciagenomhoz a HISAT2 v2.1.0 segítségével illesztettük (Langmead et al., 2009, Kim et al., 2015). A referencia genom indexfájlokat a Bowtie v.1.2.2 (Langmead et al., 2009)

szoftverrel hoztuk létre. Az illesztett leolvasásokat a FeatureCounts v2.0.1 segítségével számszerűsítettük (Liao et al., 2014, Yates et al., 2016). A kapott számlálási mátrixot az R v4.2.3-mal elemeztük (The R Development Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing). Az arányok mediánja módszerrel kapott normalizált számokat használtuk a differenciális expresszió (DE) becslésére a DESeq2 v1.38.3 segítségével (Love et al., 2014). A fold change becslések pontosságának javítása érdekében az „Adaptive Shrinkage” csomag 2.2–63-as verzióját alkalmaztuk (Stephens, 2017). Az azonnali korai fázisú időpontokból (0 és 2 óra) származó minták esetében a 0,05-nél alacsonyabb korrigált p-értékkel és 0,58-nál nagyobb abszolút log₂ változással (abs(LFC)) rendelkező transzkriptumokat tekintettük szignifikánsan változottaknak. A későbbi időpontokból (8, 12 és 26 óra) származó transzkriptumok esetében a korrigált p-értékek azonosak voltak, de az (abs(LFC)) értéket >1-re állítottuk be. A transzkriptumok génontológiai (GO) dúsítási analizisét a clusterProfiler csomag segítségével végeztük (Yu et al., 2012).

GeLC-MS/MS analízis

A HIV-1, HIV-2 és kontrol transzduktált sejtek feltárását 100 µl lízispufferben (50 mM Tris pH 8,3, 1 mM EDTA, 17 mM β-merkaptóetanol, 0,5 % (v/v) Triton-X100) végeztük. három fagyasztás-olvasztás cikluson keresztül. A fehérjekoncentráció meghatározására a Bradford-módszert alkalmaztuk, minden esetben 100 µg fehérjét gélben emésztettünk, majd folyadékkromatográfiás-tandem tömegspektrometriás (GeLC-MS/MS) analízist végeztünk (Dzieciatkowska et al., 2014). A mintákat 5%-os SDS-poliakrilamid gélen futtattuk 100 V-os feszültséggel 20 percig. A fehérjéket PageBlue Protein Staining oldattal (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) megfestettük, a megfestett géldarabokat kivágtuk, három egyenlő részre osztottuk és tripszin felhasználásával gélben emésztést végeztünk. A tripszines emésztés előtt a mintákat 20 mM ditiotreitollal (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 1 órán át 56 °C-on redukáltuk, majd 55 mM jódacetamiddal (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 45 percig szobahőmérsékleten sötétben alkiláltuk. A tripszin emésztést egy éjszakán át 37 °C-on végeztük stabilizált MS-minőségű TPCK-kezelt szarvasmarha-tripszin (ABSciex, Framingham, MA, USA) felhasználásával. Az emésztett peptideket extraháltuk és vákuum koncentrátorban beszáritottuk (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), majd a peptideket 33 µl 1%-os hangyasavban (VWR Ltd., Radnor, PA, USA) újra feloldottuk az LC-MS/MS analízis előtt. A minták peptid koncentrációjának meghatározására bicinchoninic acid assay (BCA) módszert alkalmaztunk. A tömegspektrometriás analizisek előtt a mintákhoz azonos mennyiségű „Indexed retention time”

(iRT) peptidkeveréket (Biognosys, Schlieren, Svájc) adtunk, és a mintákat duplikátumban elemeztük. A tömegspektrometriás elemzés előtt a peptideket 180 perces víz/acetonitril gradienssel választottuk el Easy nLC 1200 nano UPLC (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) készüléssel. A peptidkeverékeket ACQUITY UPLC Symmetry C18 oszlopon (20 mm × 180 µm, 5 µm részecskeméret, 100 Å pórusméret, Waters, Milford, MA, USA) sómentesítettük, majd Acclaim PepMap RSLC C18 analitikai oszlopon elválasztottuk (150 mm × 50 µm × 2 µm részecskeméret, 100 Å pórusméret, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). A kromatográfias elválasztás során a B oldószer arányát 5 perc alatt 5%-ról 7%-ra emeltük, majd 50 perc alatt 15%-ra emeltük. Ezt követően 60 perc alatt 35%-ra emeltük amint egy 40%-ra emelés követett 28 perc alatt. Ezután a B oldószert 5 perc alatt 85%-ra emeltük és 10 percig 85%-on tartottuk, majd a rendszert 1 perc alatt visszaállítottuk 5% B oldószerre és további 16 percen keresztül regeneráltuk. Az A oldószer 0,1% hangyasav LC vízben (Sigma, St. Louis, MO, USA); a B oldószer 95% LC-MS acetonitril (Sigma, St. Louis, MO, USA) volt, amely 0,1% hangyasavat tartalmazott. Az áramlási sebességet 300 nl/perc értékre állítottuk be. Az adatfüggő elemzéseket Orbitrap Fusion tömegspektrométerrel (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) végeztük. Az MS/MS-elemzésekhez a 14 legnagyobb mennyiségben előforduló, többszörösen töltött pozitív iont választottuk ki minden egyes pásztázó MS spektrumból (mérési tartomány: 350-1600 m/z, Orbitrap analizátor felbontása: 60 000, AGC-target: $4,0 \times 10^5$, profil üzemmódban rögzítve). Az ütközés-indukált disszociációs (CID) fragmentációt a lineáris ioncsapdában végeztük 35%-os normalizált ütközési energiával (AGC-target: $2,0 \times 10^3$, centroid módban rögzítve). Az adatgyűjtési ciklusok során dinamikus kizárást alkalmaztunk (kizárási idő: 45 s).

Tömegspektrometriai adatok elemzése

Az LC-MS/MS adatokból a fehérjék azonosítására a MaxQuant 1.6.2.10 szoftvert alkalmaztuk (Cox & Mann, 2008) a Human SwissProt adatbázis (kiadás: 2020.02, 20 394 szekvencia bejegyzés), a HIV-1 és HIV-2 SwissProt adatbázisok (kiadás: 2020.02, 381 szekvencia bejegyzés a HIV-1-hez és 109 szekvencia bejegyzés a HIV-2-höz), valamint a MaxQuant szoftver által biztosított gyakori szennyezők adatbázisa használatával. A Cys-karbamidometilációt, a Met-oxidációt és az N-terminális acetilezést variábilis módosításként állítottuk be, a kihagyott hasítóhelyek számát kettőre maximalizáltuk. Az eredményeket a Scaffold 4.8.9 szoftverbe importáltuk (ProteomeSoftware Inc., Portland, OR, USA). A fehérjéket legalább 3 azonosított peptid esetén fogadtuk el találatként, 1%-os fehérje false discovery rate (FDR) és 0,1%-os peptid FDR mellett. A jelölés nélküli kvantitáláshoz a normalizált teljes prekursor intenzitást használtuk, és az azonosított fehérjék mennyiségi

értékeit az iRT keverék kvantitatív értékeire, valamint a mintákban lévő peptidek BCA módszerrel meghatározott emésztés utáni koncentrációjára normalizáltuk. A vizsgált csoportok között szignifikánsan eltérő fehérjemennyiségek kiválasztására minden egyes kvantitált fehérje esetén ANOVA-modelleket alkalmaztunk. A mintákat és az analízis ismétléseket véletlenszerű hatásként, míg a csoportokat fix hatásként modelleztük (Oberge & Vitek, 2009). A lineáris modellillesztést követően post-hoc tesztek alkalmaztunk a csoportkülönbségek p-értékeinek meghatározására, és az $FDR < 0,05$ kritériumnak megfelelő szignifikáns eredményeket tartottuk meg.

A lentivirális transzdukción korai fázisához tartozó minták proteomikai analízise

Az azonosított fehérjék listáját az intenzitásértékekkel együtt kiexportáltuk a Scaffold programból, majd R környezetben dolgoztuk tovább (v4.3.1) (The R Development Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing; R Foundation for Statistical Computing). Az adatok normalizálásához a minták fehérjekoncentrációját (amelyet emésztés után BCA-módszerrel határoztunk meg), az injektált térfogatokat és a minták összfehérje-intenzitását használtuk fel. A vizsgált csoportok közötti statisztikailag szignifikáns különbségek vizsgálatára kevert hatású ANOVA-modelleket alkalmaztunk, mindegyik fehérjéhez egyet-egyét. A minta- és analízisismétléseket véletlenszerű hatásként kezeltük, míg a csoportokat fix hatásként modelleztük (Oberge & Vitek, 2009). A számítások elvégzéséhez az emmeans (v1.8.8) és lme4 (1.1.34) csomagokat használtuk (Bates et al., 2015). A lineáris modellillesztést követően post-hoc tesztek alkalmaztunk a csoportkülönbségek p-értékeinek meghatározására, és a szignifikáns eredményeket $FDR < 0,05$ kritériummal fogadtuk el. A fehérjék kódoló transzkriptum annotációkat a naponta frissített „gene_info” és „gene2go” fájlokból szereztük be, amelyek elérhetők az NCBI FTP webhelyén (<https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/gene/DATA/>, hozzáférve 2023. november 15-én), és saját készítésű szkriptek segítségével átrendeztük. A GO dúsulási analízist a topGO R csomaggal (v2.52.0) végeztük egy egyedileg generált gén-GO lekeresési fájl segítségével (Alexa et al., 2006). Az elemzéseket a teljes 26 órás transzdukción időszak alatt azonosított fehérje adathalmazon végeztük (807 fehérje); a fehérje-univerzum a fehérjék teljes halmazából (807) állt, amelyeket a transzdukción követő 26 órában kimutattak. A szignifikánsan változott fehérjéket $FDR < 0,05$ küszöbérték szerint határoztuk meg. A topGO algoritmusban az alapértelmezett „weight01” módszert választottuk a Kolmogorov–Smirnov statisztikai teszttel, és kiválasztottuk azokat a feldúsult GO terminusokat, amelyek FDR-módosított p-értéke $< 0,05$. Az adatok vizualizálására a következő R-csomagokat használtuk: ggplot2 (v3.4.3), ggrepel (v0.9.3), ggpubr (v0.6.0), GOplot (v1.0.2) (Elio Campitelli:

Ggnewscale: Multiple Fill and Colour Scales in 'ggplot2'. R Package Version 0.4.9.), ggnewscale (v0.4.9), VennDiagram (v1.7.3).

Jurkat sejtek transzdukciójának korai fázisához tartozó transzkriptomikai minták analízise

A nyers szekvenálási adatokat a GRCh38 verziójú humán referencia genomhoz illesztettük a Hisat2 v2.1.0 illesztő program alkalmazásával (Langmead et al., 2009). Az illesztés során generált BAM-fájlokat a StrandNGS szoftverben elemeztük. A normalizált génexpressziós értékek generálása a programba integrált DESeq algoritmussal történt. Az egyes kezelési csoportok között eltérően szabályozott transzkriptumok meghatározásához moderált T-tesztet használtunk. Azokat a transzkriptumokat tekintettük eltérően szabályozottnak, amelyek átmertek a szignifikanciaszűrőn (korrigált p-érték ($p_{adj.} < 0,05$), valamint a változás mértékét tekintve teljesítették a > 1 abszolút \log_2 változást (abs. \log_{FC}). A többszörös tesztelésből származó hibák korrigálására Benjamini-Hochberg FDR analízist végeztünk.

A szignifikánsan változó transzkriptumok listáin GO elemzést végeztünk, hogy meghatározzuk a listákban felülreprezentált GO kategóriákat. A GO elemzés a CytoScape 3.4.0 programban, a ClueGO v2.3.5 alkalmazás használatával történt. Az elemzés során kétoldalas hipergeometriai teszttel és Bonferroni korrekcióval határoztuk meg a felülreprezentált biológiai folyamatokat.

Eredmények:

HIV-1 transzdukció azonalli és korai fázisához tartozó transzkriptomikai adatok elemzése

A kontroll vektorral transzduktált sejtekhez képest a HIV-1 nulla óránál 2676 transzkriptum kifejeződését befolyásolta, amelyek közül 1533 felül-, 1143 pedig alul szabályozódott. A felülszabályozott transzkriptumok közül 1256 fehérjéket, 226 nem-kódoló RNS-t, 1 mitokondriális RNS-t, 42 pszeudogént és 8 ismeretlen terméket kódolt. Az alulszabályozott transzkriptumok közül 710 fehérjét, 294 nem-kódoló RNS-t, 11 mitokondriális RNS-t, 94 pszeudogént, 2 ribozimot és 32 ismeretlen transzkriptumot kódolt.

Két órával a transzdukció után a HIV-1 4551 transzkriptum expressziójára volt hatással, ezek közül 2366 transzkriptum felülszabályozódott. Ezen transzkriptumok közül 1616 fehérjét, 98 pszeudogént és 334 nem-kódoló RNS-t kódolt. Továbbá 18 transzkriptum nem kategorizált génterméket kódolt. 2185 transzkriptum alulszabályozott 2 órával a HIV-1 transzduktált

sejtekben. Ezek között 1634 transzkriptom fehérjét, 153 pszeudogént, 363 nem-kódoló RNS-t, 18 mitokondriális RNS-t, 1 ribozimot és 16 ismeretlen génterméket kódolt.

A „kontrollhoz hasonlóan, 8 órával a transzdukció után a HIV-1 158 transzkriptum expresszióját befolyásolta, melyek közül 115 felülszabályozódott, 43 pedig alul. A felülszabályozottak közül 71 fehérjét, 23 nem-kódoló RNS-t, 5 mitokondriális RNS-t, 12 pszeudogént és 4 ismeretlen génterméket kódoltak. Az alulszabályozottak között 32 fehérjét, 7 nem-kódoló RNS-t és 4 pszeudogént kódoló transzkriptum található. 114 transzkriptum kifejeződése változott 12 órával a HIV-1 transzdukciót követően, melyek közül 18 expressziója pozitívan, 96-é pedig negatívan változott. A pozitívan befolyásoltak közül 11 fehérjét, 6 nem-kódoló RNS-t és 1 pszeudogént kódoltak. A negatívan szabályozódottak közül 59 fehérje, 27 nem-kódoló RNS, 5 mitokondriális RNS és 1 pszeudogén kódoló transzkriptum volt. A transzdukciót követő 26. órában 380 transzkriptum kifejeződése változott, melyek közül 48 felül-, 332 pedig alul szabályozódott. A pozitívan befolyásoltak közül 26 fehérjét, 14 nem-kódoló RNS-t, 7 pszeudogént és 1 ismeretlen génterméket kódoltak. A 322 alul szabályozott transzkriptum közül 264 fehérje, 56 nem-kódoló RNS, 8 pszeudogén és 4 ismeretlen eredetű transzkriptum található.

HIV-1 által befolyásolt transzkriptumok a transzdukció azonalli korai fázisában

Nulla óránál a HIV-1 felülszabályozta az insulin receptor substrate 4 (*IRS4*), host cell factor C1 (*HCF1*), heparan sulfate proteoglycan 2 (*HSPG2*), CD109 molecule, 2'-5'-oligoadenylate synthetase 3 (*OAS3*), nidogen 1 (*NID1*), lysine methyltransferase 2D (*KMT2D*), SRY-box transcription factor 5 (*SOX5*), RNA polymerase II subunit A (*POLR2A*) és FRY microtubule binding protein (*FRY*) transzkriptumok expresszióját. A H4 clustered histone 3 (*H4C3*), argininosuccinate synthase 1 (*ASS1*) immunoglobulin superfamily member 6 (*IGSF6*), pleckstrin homology like domain family A member 3 (*PHLDA3*), interleukin 3 receptor subunit alpha (*IL3RA*), apolipoprotein E (*APOE*), ankyrin repeat domain 18A (*ANKRD18A*), cholinergic receptor nicotinic gamma subunit (*CHRNA3*), major facilitator superfamily domain containing 4B (*MFSD4B*) és mannosidase alpha class 1A member 2 (*MAN1A2*) pedig negatívan szabályozódott HIV-1 transzduktált sejtekben.

Két órával a transzdukció után pozitívan változott a solute carrier family 7 member 11 (*SLC7A11*), assembly factor for spindle microtubules (*ASPM*), saccin molecular chaperone (*SACS*), CD109 molecule, zinc finger and BTB domain containing 41 (*ZBTB41*), BRCA2 DNA

repair associated (*BRCA2*), testis expressed 15, meiosis and synapsis associated (*TEX15*), zinc finger with KRAB and SCAN domains 8 (*ZKSCAN8*), chaC glutathione specific gamma-glutamylcyclotransferase 1 (*CHAC1*) és protein prenyltransferase alpha subunit repeat containing 1 (*PTARI*) transzkriptumok kifejeződése. Ezzel szemben a HIV-1 transzdukciónak negatívan hatott a H4 clustered histone 3 (*H4C3*) epithelial membrane protein 3 (*EMP3*), pleckstrin homology like domain family A member 3 (*PHLDA3*), argininosuccinate synthase 1 (*ASS1*), inhibitor of DNA binding 1, és 3 HLH protein (*IDI3*), ribosomal protein L39 like (*RPL39L*), SHC adaptor protein 2 (*SHC2*), syntaxin 8 (*STX8*) és regulator of G protein signaling 16 (*RGS16*) transzkriptumok expressziójára.

HIV-1 által befolyásolt transzkriptumok a transzdukciónak korai fázisában

A nyolc órás időpontnál a HIV-1 pozitívan befolyásolta a leucine rich repeats and IQ motif containing 1 (*LRRIQ1*), centromere protein E (*CENPE*), A-kinase anchoring protein 9 (*AKAP9*), ankyrin repeat domain 12 (*ANKRD12*), coiled-coil domain containing 88A (*CCDC88A*), biorientation of chromosomes in cell division 1 like 1 (*BOD1L1*), GRIP and coiled domain containing 2 (*GCC2*), ankyrin repeat domain 26 (*ANKRD26*), structural maintenance of chromosomes 4 (*SMC4*) és dopamine receptor D4 (*DRD4*) transzkriptumok expresszióját. Ezzel párhuzamosan a WD repeat domain 38 (*WDR38*), fos proto-oncogene AP-1 transcription factor subunit (*FOS*), bola family member 2B (*BOLA2B*), cyclin dependent kinase inhibitor 1A (*CDKN1A*), inhibitor of DNA binding 3, HLH protein (*ID3*), H4 clustered histone 3 (*H4C3*), collagen type XI alpha 1 chain (*COL11A1*), epithelial membrane protein 3 (*EMP3*), RELB proto oncogene NF-kB subunit (*RELB*) és pleckstrin homology like domain family A member 3 (*PHLDA3*) kifejeződése csökkent. 12 órával a transzdukciónak után a secretogranin III (*SCG3*), forkhead box D4 (*FOXD4*), neuregulin 4 (*NRG4*), leucine rich repeat and coiled-coil and coiled centrosomal protein 1 (*LRRCC1*), nucleosome assembly protein 1 like 2 (*NAPIL2*), BRCA2 DNA repair associated (*BRCA2*), nibrin (*NBN*), taste 2 receptor member 20 (*TAS2R20*), cytochrome c oxidase assembly factor COX20 (*COX20*) és transmembrane protein 145 (*TMEM145*) expressziója emelkedett HIV-1 hatására. E mellett a H4 clustered histone 3 (*H4C3*), collagen type XI alpha 1 chain (*COL11A1*), transmembrane protein 132E (*TMEM132E*), calcium/calmodulin dependent protein kinase ID (*CAMK1D*), SH2 domain containing 3C (*SH2D3C*), tetraspanin 11 (*TSPAN11*), programmed cell death 11 (*PDCD11*), NOP9 nucleolar protein (*NOP9*), early growth response 1 (*EGR1*) és kinesin family member 1A (*KIF1A*) kifejeződése csökkent. A 26 órás időpontnál a heme oxygenase 1 (*HMOX1*), oxidative stress induced growth inhibitor 1 (*OSGIN1*), VGF nerve growth factor

inducible (*VGF*), NAD(P)H quinone dehydrogenase 1 (*NQO1*), nucleosome assembly protein 1 like 2 (*NAPIL2*), heat shock protein family A (Hsp70) member 1A (*HSPA1A*), dehydrogenase/reductase 2 (*DHRS2*), ETS variant transcription factor 4 (*ETV4*), metallothionein 2A (*MT2A*) és glutamate-cysteine ligase modifier subunit (*GCLM*) transzkriptumok expressziója emelkedett. Párhuzamosan a H4 clustered histone 3 (*H4C3*), kelch domain containing 7B (*KLHDC7B*), inositol polyphosphate-5-phosphatase D (*INPP5D*), glutamate ionotropic receptor kainate type subunit 3 (*GRIK3*), transmembrane protein 132E (*TMEM132E*), ATP binding cassette subfamily G member 1 (*ABCG1*), AT-hook transcription factor (*AKNA*), dehydrogenase/reductase 3 (*DHRS3*), hes family bHLH transcription factor 5 (*HES5*) és ABI family member 3 binding protein (*ABI3BP*) transzkriptumok kifejeződése csökkent.

HIV-2 transzdukció azonalli és korai fázisához tartozó transzkriptomikai adatok elemzése

Nulla óránál a HIV-2 szignifikánsan befolyásolta 4075 transzkriptum expresszióját, melyek közül 2015 kifejeződése emelkedett, 2060-é pedig csökkent. Az emelkedett kifejeződésű transzkriptumok közül 1672 fehérjét, 240 nem-kódoló RNS-t, 92 pszeudogént, 1 Ig-V gént és 10 pedig ismeretlen génterméket kódolt. A csökkent szabályozású transzkriptumok közül 1646 fehérjét, 273 nem-kódoló RNS-t, 12 mitokondriális RNS-t, 106 pszeudogént, 2 ribozimet és 12 pedig ismeretlen génterméket kódolt.

A 2 órás időpontban 3422 transzkriptum szabályozódott eltérő módon a kontrollhoz képest. 2114 transzkriptum felülszabályozódott, melyek közül 1716 fehérjét, 128 pszeudogént, 261 nem-kódoló RNS-t és 9 ismeretlen génterméket kódolt. Továbbá a HIV-2 1308 transzkriptum expresszióját alul szabályozta. Ezen transzkriptumok közül 875 fehérjét, 306 nem-kódoló RNS-t, 16 mitokondriális RNS-t, 83 pszeudogént, 1 ribozimet és 27 ismeretlen transzkriptumot kódolt.

HIV-2 esetében 8 órával a transzkripció után 283 transzkriptum kifejeződése változott, melyek közül 211 felülszabályozódott, 72 pedig alul szabályozódott. A felülszabályozott transzkriptumok között 99 fehérjét, 31 nem-kódoló RNS-t, 3 mitokondriális RNS-t, 75 pszeudogént és 3 nem kategorizált transzkriptumot kódolt. A negatívan szabályozódottak csoportjában 43 fehérje, 27 nem-kódoló RNS, 2 pszeudogén terméket kódoló transzkriptum található. A transzdukciót követő 12. órában 299 transzkriptum kifejeződése változott HIV-2

hatására. Ezek közül 225 emelkedett, 74 pedig csökkent expressziót mutatott. A pozitívan szabályozódottak között 107 fehérjét, 26 nem-kódoló RNS-t, 91 pszeudogént, 1 pedig nem osztályozott génterméket kódolt. A negatívan befolyásoltak csoportja 46 fehérje, 24 nem-kódoló RNS, 1 mitokondriális, 2 pszeudogén, 1 pedig nem kategorizált kódoló transzkriptumot tartalmazott. A 26 órás időpontban a HIV-2-vel történő transzdukció 182 transzkriptum kifejeződését változtatta meg, melyek közül 121 felülszabályozódott, 61 pedig alul szabályozódott. A pozitívan befolyásoltak közül 35 fehérjét, 8 nem-kódoló RNS-t, 78 pedig pszeudogént kódolt. A negatívan szabályozódottak között 35 fehérje, 21 nem-kódoló RNS, 4 mitokondriális és 1 nem osztályozott terméket kódoló transzkriptum volt.

HIV-2 által befolyásolt transzkriptumok a transzdukció legkorábbi fázisában

A nulla órás időpontnál a HIV-2 pozitívan befolyásolta a collagen type I alpha 2 chain (*COL1A2*), keratin 5 (*KRT5*), collagen type VI alpha 3 chain (*COL6A3*), keratin 7 (*KRT7*), decorin (*DCN*), S100 calcium binding protein A2 (*S100A2*), collagen type III alpha 1 chain (*COL3A1*), thrombospondin 1 (*THBS1*), keratin 14 (*KRT14*) és S100 calcium binding protein A6 (*S100A6*) transzkriptumok kifejeződését. E mellett a H4 clustered histone 3 (*H4C3*), argininosuccinate synthase 1 (*ASS1*), pleckstrin homology like domain family A member 3 (*PHLDA3*), ankyrin repeat domain 36B (*ANKRD36B*), ankyrin repeat domain 36C (*ANKRD36C*), src kinase associated phosphoprotein 1 (*SKAP1*), serine dehydratase like (*SDSL*), epithelial membrane protein 3 (*EMP3*), mannosidase alpha class 1A member 2 (*MAN1A2*) és family with sequence similarity 133 member B (*FAM133B*) transzkriptumok expressziója csökkent.

Két óránál a HIV-2 megemelte a collagen type I alpha 2 chain (*COL1A2*), collagen type VI alpha 3 chain (*COL6A3*), thrombospondin 1 (*THBS1*), keratin 7 (*KRT7*), keratin 5 (*KRT5*), collagen type III alpha 1 chain (*COL3A1*), keratin 14 (*KRT14*), chaC glutathione specific gamma-glutamylcyclotransferase 1 (*CHAC1*), S100 calcium binding protein A2 (*S100A2*), és insulin receptor substrate 4 (*IRS4*) transzkriptumok sejtbéli szintjét. Ezzel párhuzamosan a HIV-2 negatívan befolyásolta a H4 clustered histone 3 (*H4C3*), ankyrin repeat domain 36C (*ANKRD36C*), cholinergic receptor nicotinic gamma subunit (*CHRNA3*), ankyrin repeat domain 36B (*ANKRD36B*), ankyrin repeat domain 18A (*ANKRD18A*), ankyrin repeat domain 36 (*ANKRD36*), immunoglobulin superfamily member 6 (*IGSF6*), family with sequence similarity 133 member B (*FAM133B*), WD repeat domain 38 (*WDR38*), és lysine rich nucleolar protein 1 (*KNOP1*) expresszióját.

HIV-2 által befolyásolt transzkriptumok a transzdukció korai fázisában

Nyolc órával a HIV-2 transzdukció után a collagen type I alpha 2 chain (*COL1A2*), keratin 5 (*KRT5*), serpin family E member 1 (*SERPINE1*), keratin 14 (*KRT14*), S100 calcium binding protein A6 (*S100A6*), keratin 7 (*KRT7*), decorin (*DCN*), thrombospondin 1 (*THBS1*), ETS variant transcription factor 5 (*ETV5*) és collagen type VI alpha 3 chain (*COL6A3*) transzkriptumok sejtbeli szintje emelkedett. Ezzel párhuzamosan a H4 clustered histone 3 (*H4C3*), inhibitor of DNA binding 3, HLH protein (*ID3*), ectodysplasin A2 receptor (*EDA2R*), AHNAK nucleoprotein (*AHNAK*), transmembrane protein 132E (*TMEM132E*), inhibitor of DNA binding 1, HLH protein (*IDI*), AHNAK nucleoprotein 2 (*AHNAK2*), paralemmin 3 (*PALM3*), hes family bHLH transcription factor 5 (*HES5*) és ArfGAP with dual PH domains 1 (*ADAPI*) transzkriptumok expressziója csökkent.

A 12 órás időpontnál a collagen type I alpha 2 chain (*COL1A2*), keratin 7 (*KRT7*), decorin (*DCN*), alanyl aminopeptidase, membrane (*ANPEP*), dermatopontin (*DPT*), integrin subunit beta like 1 (*ITGBL1*), keratin 5 (*KRT5*), transforming growth factor beta induced (*TGFBI*), S100 calcium binding protein A6 (*S100A6*) és fatty acid binding protein 4 (*FABP4*) emelkedett kifejeződést mutatott. Továbbá a H4 clustered histone 3 (*H4C3*), ATP binding cassette subfamily G member 1 (*ABCG1*), inhibitor of DNA binding 3, HLH protein (*ID3*), ankyrin repeat domain 36C (*ANKRD36C*), transmembrane protein 132E (*TMEM132E*), tetraspanin 11 (*TSPAN11*), ankyrin repeat domain 18A (*ANKRD18A*), regulating synaptic membrane exocytosis 3 (*RIMS3*), pleckstrin homology like domain family A member 3 (*PHLDA3*) és calcium/calmodulin dependent protein kinase ID (*CAMK1D*) transzkriptumok kifejeződése negatívan változott HIV-2 hatására.

26 órával a transzdukció után a HIV-2 pozitívan befolyásolta a collagen type I alpha 2 chain (*COL1A2*), keratin 7 (*KRT7*), keratin 5 (*KRT5*), keratin 14 (*KRT14*), decorin (*DCN*), S100 calcium binding protein A6 (*S100A6*), serpin family E member 1 (*SERPINE1*), S100 calcium binding protein A2 (*S100A2*), SLX1 homolog B, structure-specific endonuclease subunit (*SLX1B*), és thrombospondin 1 (*THBS1*) szintjét. E mellett a H4 clustered histone 3 (*H4C3*), early growth response 1 (*EGR1*), kelch domain containing 7B (*KLHDC7B*), RELB proto-oncogene NF- κ B subunit (*RELB*), ATP binding cassette subfamily G member 1 (*ABCG1*), transmembrane protein 132E (*TMEM132E*), SHC adaptor protein 2 (*SHC2*), dehydrogenase/reductase 3 (*DHRS3*), tetraspanin 11 (*TSPAN11*) és AT-hook transcription factor (*AKNA*) kifejeződése csökkent.

Gén ontológiai elemzés a HEK-293T sejtekben szignifikánsan változott transzkriptumokból a transzdukciónál korai fázisában

Annak érdekében, hogy tovább kategorizáljuk a detektált transzkriptek biológiai funkcióját, GO dúsítási analízist végeztünk. Az elemzésbe csak azokat a fehérje-kódoló transzkriptumokat vettük fel, amelyek szignifikáns expressziót ($p > 0,05$, $\log_2FC > 0,58$) mutattak a 2 órás időpontban a HIV-1 és HIV-2 fertőzött sejtekben, a kontrol transzduktálokhoz képest. Az adatok azt mutatták, hogy mindkét HIV típus hasonlóan befolyásolta a fehérje szerin/threonin kináz aktivitás, riboszóma strukturális alkotóeleme, GTPáz aktivátor aktivitás, nukleozid-trifoszfátáz regulátor, és ubikvitin-szerű fehérje-transzferáz aktivitás GO csoportokba tartozó transzkriptumokat. A csak HIV-1 által szabályozott GO csoportok közé az rRNS és tau fehérje kötődés, tau-fehérje kináz aktivitás, és katalitikus aktivitás, amely a DNS-re hat tartozott. A csak HIV-2 által befolyásolt transzkriptumok pedig a Rho GTPáz kötődés, DNS-kötő transzkripciós faktor kötődés, transzkripciós koaktivátor aktivitás, és RNA polimeráz II-specifikus DNS-kötő transzkripciós faktor kötődés GO csoportokba tartoztak.

Gén ontológiai elemzés a HEK-293T sejtekben szignifikánsan változott transzkriptumokból a transzdukciónál korai fázisában

A transzdukciónál legkorábbi fázisához hasonlóan GO elemzést végeztünk a nyolc, 12 és 26 órás időpontokban szignifikánsan megváltozott ($p < 0,05$, $\log_2FC > 1$) fehérje-kódoló transzkriptumokból HIV-1 és HIV-2 transzduktált sejtekből. Az elemzés további különbségeket tárt fel a két lentivírus között a kontrolhoz képest. A nyolc órás időpontban a HIV-1 olyan transzkriptumokat befolyásolt, amelyek a sejtciklus, RNS anyagcsere folyamatok pozitív szabályozása és anyagcsere folyamatok pozitív szabályozása GO csoportokhoz tartoznak. Ezzel párhuzamosan a HIV-2 a szövetfejlődés, extracelluláris mátrix szerveződése és sejt tapadás GO csoportokba tartozó transzkriptumok kifejeződésére gyakorolt hatást. 12 órával a transzdukciónál után a HIV-1 nem volt hatással egyetlen GO csoportra sem. Ezzel szemben a HIV-2 befolyásolta a sejt differenciálódás, sejtadhézió és sejt migráció csoportokba tartozó transzkriptumok kifejeződését. A 26 órás időpontban a HIV-1 hatást gyakorolt a homeosztatikus folyamatok, válasz mérgező anyagokra és válasz az oxidatív stresszre GO csoportokba tartozó transzkriptumok expressziójára. A HIV-2 ugyanebben az időpontban a peptid keresztkötés, sejt migrációjának negatív szabályozása és sejtmobilitás negatív szabályozása kategóriákba sorolható transzkriptumok kifejeződésére gyakorolt hatást.

A HIV-1 és HIV-2 pszeudovirionok által generált proteomikai változások a transzdukció azonali korai fázisában

A transzdukciót követően több mint 1000 fehérjét azonosítottunk a gazdasejt proteomjának elemzésével. A false discovery rate elemzését követően hét fehérje mutatott statisztikailag szignifikáns negatív szabályozást a kontrollhoz képest. Figyelemre méltó, hogy öt fehérje szintje csökkent a HIV-1 transzduktált sejtekben, és további két fehérje csökkent expressziót mutatott a HIV-2-vel transzduktált sejtekben a kontrollhoz képest. Mind a HIV-1, mind a HIV-2 csökkentette a mitochondrial 60kDa heat shock protein (HSPD1), non-POU domain-containing octamer binding protein (NONO), heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (hnRNPA1), serine/arginine-rich splicing factor 6 (SRSF6) és histone H1.4 (H1-4) fehérjék sejtbeli szintjét. Továbbá a complex protein 1 subunit theta (CCT8) és FK506-binding protein (FKBP4) csak a HIV-2 transzduktált sejtekben mutattak szignifikáns csökkenést a HIV-1-hez képest.

A hét szignifikánsan negatívan szabályozott fehérje azonosítását követően a Cytoscape 3.8.1 (Shannon et al., 2003) segítségével interakciós hálózat- és biológiai folyamatdúsítási elemzéseket végeztünk. Az integrált STRING adatbázist használtuk a fizikai interakciós hálózat generálására, 0,7–100 első shell interaktor megbízhatósági szintjével, a génontológia dúsításhoz pedig a Cytoscape ClueGO v2.5.7 verziójú plugint alkalmaztuk (Bindea et al., 2009). Az összesen 107 fehérjét tartalmazó dúsított hálózat GO elemzése során először a GO terminusok funkcionális klasztereit generáltuk le. A ClueGO a kifejezések hasonlóságát használja több kifejezés funkcionális csoportjainak meghatározására. Elemzésünkben a kezdeti csoportméretet három tagra állítottuk (kettő az alapértelmezett érték), és a csoportegyesítés százalékos értéket az alapértelmezett 50%-on hagytuk. Továbbá a 72 eredményül kapott GO kifejezésből 33-at hat funkcionális klaszterbe csoportosítottunk, a többi, összesen 39 nem érte el a csoportegyesítési küszöböt. Azonban ezek között szerepelt a GO kifejezés mRNS splicing (GO:00000398), amely 97 fehérjét tartalmazott a dúsított hálózatban. A klaszterekben a GO kifejezések redundanciája miatt hét biológiai folyamatot választottunk ki, amelyek a Bonferroni step-down módszerrel korrigált p-értékeik szerint a legreprezentatívabbak és legjelentősebbek voltak ($p < 0,05$). Összesen 105 fehérjét fedtek le ezek a biológiai folyamatok az interakciós hálózatban. Ezen túlmenően, ebből a 105 fehérjéből 77-et az MS/MS is kimutatott, ami egy szélesebb interakciós hálózatra utal, amely a jelentősen lecsökkent fehérjék köré összpontosul. Mindazonáltal ebből a 77 fehérjéből csak 67 rendelkezett megfelelő minőségű adatokkal a

statisztikai elemzés lehetővé tételéhez, mivel ezeket az ismételt mérések némelyikében nem lehetett számszerűsíteni.

HIV-1 és HIV-2 generált proteomikai változások a transzdukció korai fázisában

Minden egyes vizsgált időpontban összesen 1058 fehérjét azonosítottunk tömegspektrometriai analízissel: 871 fehérjét nyolc, 817-et 12 és 810-et 26 órával a transzdukció után. Nyolc óra elteltével a proteomikai analízis nem mutatott szignifikáns változást a sejt proteomjában. Azonban 12 óra elteltével 17 fehérjét észleltünk, amelyek expressziójukban különbséget mutattak: 5-öt HIV-1, 4-et HIV-2, és 8-at mindkét vírus eltérően szabályozott a kontrollhoz képest. A HIV-1 által befolyásolt fehérjék között szerepelt az ATP-synthase F1 β subunit (ATP5F1B), a valosin-containing protein (VCP) és a synaptotagmin-binding cytoplasmic RNA interacting protein (SYNCRIP). A HIV-2 szignifikánsan megváltoztatta a non-SMC condensin I complex subunit H (NCAPH), a phosphoribosylformylglycinamide synthase (PFAS), a valyl-tRNA synthetase 1 (VARS1) és a proline-rich coiled-coil 2A (PRRC2A). Mindkét vírus által befolyásolt fehérjék közé tartozott a Zyxin (ZYG), az arginyl-tRNA synthetase 1 (RARS1), a heat shock protein family A member 1A (HSPA1A), a nucleophosmin 1 (NPM1) és a deoxyuridine triphosphatase (DUT).

26 óra elteltével összesen 117 fehérje szabályozódott eltérően a HIV-vel való transzdukciót követően. A HIV-1 25 fehérje expresszióját változtatta meg szignifikánsan, míg a HIV-2 39 fehérjét befolyásolt. Ezen kívül mindkét vírus 48 fehérje expresszióját változtatta meg a kontrollhoz képest. Továbbá 5 fehérje kizárólagosan szabályozódott a HIV-2 és HIV-1 összehasonlításában. A HIV-1 megváltoztatott fehérjéi közé tartozik az insulin-like growth factor 2 receptor (IGF2R), a DEAD-box helicase 3 X-linked (DDX3X), a protein disulfide isomerase family A member 3 (PDIA3), a HIV-1 Tat Specific Factor 1 (HTASF1), a lysyl-tRNA synthetase 1 (KARS1), a proteasome 20S subunit alpha 2 (PSMA2), és az ATPase Family AAA Domain Containing 3A (ATAD3A). A HIV-2-nek sikerült befolyásolnia a nucleolin (NCL), az eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1 (EEF1A1) és a serine and arginine-rich splicing factor 1 (SRSF1) fehérjék sejtbeli szintjét. Mindkét vírus hatással volt a heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 (HNRNPA2B1), a heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (HNRNPK), a serine and arginine-rich splicing factor 2 (SRSF2), a dynein cytoplasmic 1 light intermediate chain 1 (DYNC1LI1) és az eukaryotic translation initiation factor 2B subunit delta (EIF2B4) expressziójára. Amikor a HIV-2-t HIV-1-gyel

hasonlították össze, 17 fehérje megváltozott expressziót mutatott, beleértve a transferrin receptor (TFRC), a heat shock protein family A members, a ribosomal protein L23a (RPL23A) és a RAN binding protein 1 (RANBP1) fehérjéket.

Gén ontológiai elemzés a HIV-1 és HIV-2 transzduktált HEK-293T sejtekben detektált fehérjékből 12 és 26 órával a transzdukció után

A transzduktált sejtekben észlelt proteomikai változások jobb megértése érdekében GO dúsítási analízist végeztünk a HIV-1 és HIV-2 fertőzött mintákból 12 és 26 órával a transzdukció után. A kontrollhoz képest 12 óra elteltével a HIV-1 változásokat indukált az ubiquitin fehérje ligáz kötődése, az ATP anyagszere folyamatok és az mRNS hasítás a spliceoszómán keresztül csoportokhoz tartozó fehérjék expressziójában. Eközben a HIV-2 jelentősen megváltoztatta a lokalizáció szabályozása, sejtes válasz szabályozása stresszre és makromolekula bioszintetikus folyamatainak negatív szabályozása kategóriákkal kapcsolatos fehérjék expresszióját. A 26 órás időpontban a HIV-1 befolyásolta az RNS polimeráz II transzkripciós szabályozó komplex, vírus genetikai állományának replikációja és válasz a vírusra csoportokhoz kapcsolódó fehérjék sejtbéli szintjét. Ezenkívül a HIV-2 befolyásolta a vírus genom replikációja, vírus genom replikációjának szabályozása, és a spliceoszomális kis nukleáris ribonukleoprotein (snRNP) komplex csoportokkal kapcsolatos fehérjéket.

A transzdukció korai fázisában eltérően szabályozódott gének Jurkat sejtekben

Nem észleltünk szignifikánsan megváltozott transzkriptumot a nulla és két órás időpontokban. A transzdukció után nyolc órával a HIV-1 39 transzkriptum expressziójára volt hatással. A 39-ből 38-at csökkentett, míg csak 1-et, egy nem kódoló RNS-t szabályozott felfelé. A lefelé szabályozott transzkriptumok közül 29 fehérjét, 3 pszeudogént és 6 különféle RNS-transzkriptet kódolt. A negatívan szabályozott transzkriptumok között megtalálható az argininosuccinate synthase 1 (*ASS1*), a cyclin G2 (*CCNG2*) és a protein phosphatase, Mg²⁺/Mn²⁺ dependent 1K (*PPM1K*). Tizenkét óra elteltével a HIV-1 45 transzkriptumot szabályozott eltérően a kontrol transzduktált Jurkat sejtekhez képest. A 45-ből 43 lefelé, 2 pedig felfelé szabályozott. A csökkent szabályozású transzkriptumok közül 35 fehérjét, 2 pszeudogént és 6 különféle RNS-terméket kódolt. Emellett a felfelé szabályozott transzkriptumok között két nem kódoló RNS volt található. A negatívan szabályozott transzkriptumok közé tartozik a methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) és a spondin 2 (*SPON2*). A 26 órás időpontban 42 transzkriptum expresszióját változtatta meg a HIV-1, 40-et

lefelé, 2-t pedig felfelé szabályozott géntermékkel. A negatívan szabályozott transzkriptumok közül 36 fehérjét, 1 pszeudogént és 3 RNS-terméket kódolt. Ezen kívül 1 fehérjét és 1 pszeudogént kódoló transzkriptumot a HIV-1-el történő transzdukció pozitívan szabályozott. A fehérjét kódoló negatívan szabályozott transzkriptumok közé tartozott a cluster of differentiation 300a (*CD300a*), a laminin subunit gamma 2 (*LAMC2*) és a serine peptidase inhibitor, Kazal type 2 (*SPINK2*). Nyolc órával a transzdukció után a HIV-2 15 transzkriptum expresszióját változtatta meg, ebből 12 csökkent, 3 pedig növekedett. A szignifikánsan lefelé szabályozott transzkriptumok közül 10 fehérjét, 1 pszeudogént és 1 RNS-terméket kódol. Ezen kívül 1 pszeudogén és 2 különféle RNS-termék pedig pozitívan szabályozódott. A 8 órás időpontban a pszeudogéneken és egy RNS-terméken kívül nem volt egyedi gén, amelyet csak a HIV-2 szabályozott volna, összehasonlítva az kontrol transzduktált sejtekkel. 12 órával a transzdukció után a HIV-2 23 gén expresszióját befolyásolta, amelyek közül 21 csökkent, 2-t pedig felfelé szabályozott. A negatívan szabályozódottak közül 19 fehérjét, 2 pedig különféle RNS-transzkriptumot kódolt. Emellett 1 fehérje kódoló és 1 nem kódoló RNS-transzkriptumot pozitívan befolyásolt. A HIV-2 által a 12 órás időpontban eltérően szabályozott gének közé tartozott a cysteine rich angiogenic inducer 61 (*CYR61*) és az ubiquinol-cytochrome c reductase complex assembly factor 3 (*UQC3*). A 26 órás időpontban a HIV-2 36 transzkriptum expresszióját változtatta meg, ebből 33 lefelé, 3 pedig felfelé szabályozódott. A negatívan befolyásoltak közül 31 fehérjét, 2 pedig különféle RNS termékeket kódolt. A pozitívan szabályozódottak közül 1 fehérjét, 2 pedig pszeudogént kódolt. A csökkentett kifejeződésű transzkriptumok közé tartozott az early growth response 1 (*EGR1*) és a TOX high mobility group box family member 2 (*TOX2*).

Gén ontológiai analízis a Jurkat sejtekben 26 órával a transzdukció után szignifikánsan változott transzkriptumokból

A GO-analízist a szignifikánsan megváltozott transzkriptumokon végeztük a transzdukció után 26 órával. Elemzésünk kimutatta, hogy a HIV-1 megváltoztatta a szteroid bioszintetikus folyamat, koleszterin bioszintetikus folyamat és izoprenoid bioszintetikus folyamat csoportokhoz kapcsolódó transzkriptumok expresszióját. Eközben a HIV-2 csak azokat a transzkriptumokat érintette, amelyek részt vesznek a koleszterin bioszintetikus folyamatban. Ez azt jelzi, hogy a HIV-1 nagyobb hatással van a gazdasejtre 26 órával a transzdukció után, mint a HIV-2 ugyanabban az időpontban.

Diszkusszió

E disszertáció írásakor a HIV több mint 40 millió embert érint világszerte. A fertőzések többségéért a HIV-1 felelős, azonban az esetek jelentős részéért a HIV-2 is felel. Számos hasonlóság van a két HIV-vírus között, például átviteli módszerük és patogenezisük tekintetében. Azonban több különbség is van a fertőzés replikációs dinamikájában. A HIV-2 fertőzés korai stádiumában a kezdeti fokozott vírustermelési fázist egy hosszú látens periódus követ. Ezenkívül a HIV-1-hez képest a HIV-2 csökkent vírusreplikációt és lassú betegség előrehaladást mutat az AIDS kialakulása felé (Campbell-Yesufu és Gandhi, 2011; MacNeil et al., 2007; Bock és Markovitz, 2001). A HIV-2 egyedi replikációs dinamikájához és hosszú látens periódusához hozzájáruló tényezők, valamint az ezekre ható faktorok még nem teljesen ismertek.

Számos tanulmány taglalja a HIV-1 sejtszintű hatásait, azonban nagyon kevés foglalkozik a HIV-2-vel. Ezenkívül a lentivírus alapú vektorok értékes klinikai és kutatási jelentőséggel bírnak, ezért a vektorok gazdasejtre gyakorolt celluláris hatásának megértése fontos a biztonságos és célzott alkalmazásukhoz. Célul tűztük ki a HIV-1 és HIV-2 alapú lentivírus vektorok sejtranszkriptomra és proteomra gyakorolt hatásának elemzését a transzdukciónak a korai fázisában, 5 különböző időpontra összpontosítva. Elsőként a HIV-1 és HIV-2 transzduktált sejtek génexpressziójában bekövetkezett változások meghatározására RNA-seq analízist végeztünk. A HIV transzdukciónak a legkorábbi fázisában mindkét vírus több ezer transzkriptum expressziós profilját befolyásolta. 4551 transzkriptumot szabályozott eltérően a HIV-1, és 3422 transzkriptumot a HIV-2. A HIV-1 és HIV-2 transzduktált sejtek között szignifikáns különbségeket észleltünk a 10 legjobban felfelé és lefelé szabályozott transzkriptum között. A HIV-2-vel összehasonlítva a HIV-1 által szabályozott transzkriptumok sokkal változatosabbak voltak.

Két órával a transzdukciónak után a HIV-1-nek sikerült megváltoztatnia a sejtranszportban (*SCL711A*), a DNS-javításban (*TEX15*, *BRCA2*) és a chaperon funkciókban (*SACS*) részt vevő transzkriptumok expresszióját. Érdekes módon a HIV-2 transzdukciónak által érintett transzkriptumok többsége az intra- és extracelluláris mátrixhoz kapcsolódik. Olyan fehérjéket kódoló transzkriptumok kifejeződését, mint például a *COL1A2*, *COL6A3*, *COL3A1*, *KRT14*, *KRT7* és *KRT5*, a HIV-2 a transzdukciónak után 2 órával felfelé szabályozta. Annak érdekében, hogy a transzdukciónak után 2 órával több információt gyűjtsünk az érintett transzkriptomról, GO-elemzést végeztünk. Mindkét vírus a GTPáz szabályozó aktivitás, GTPáz aktivátor aktivitás, fehérje szerin/threonin kináz aktivitás, fehérje feldolgozás, riboszóma szerkezeti összetevője és

nukleozid-triphoszfátáz szabályozó aktivitás kapcsolatos transzkriptumok expressziójában idézett elő változásokat. A HIV-1 transzduktált sejtek esetében az vas-kén komplex kötés, fém komplex kötés, tau fehérje kötődés, rRNS kötő képesség és tau-protein kináz aktivitás szerepet játszó fehérjéket kódoló transzkriptumok változásait figyeltük meg. Ezen túlmenően, a HIV-2 transzduktált sejtekből származó fehérjét kódoló transzkriptumok az RNS polimeráz II-specifikus DNS-kötő transzkripciós faktor kötődés, DNS-kötő transzkripciós faktor kötődés, foszfatidilinozitol kötődés, Rho GTPáz kötő képesség és guanyl-nukleotid csere faktor aktivitás folyamatokkal társultak.

A sejt transzkriptomjában a HIV-alapú vektorok által okozott változások további feltárásához későbbi időpontok vizsgálatát végeztük, egészen pontosan 8, 12 és 26 órás időpontokban. A HIV-1 transzdukciót követően a HEK-293T sejtek dinamikus ingadozást mutattak a transzkriptumok számában: a 8 órás időpontban 158-ról, 114-re csökkent a 12 órás időpontban, és végül 380-ra emelkedett 26 órával a transzdukció után. Ezzel szemben a 8 órás időpontban a HIV-2 283 transzkriptum eltérő szabályozását mutatta, ami szignifikánsan magasabb szám, mint a HIV-1 transzduktált sejtekben, ugyanabban az időpontban. 12 óra elteltével a HIV-2 299 transzkriptum expressziójában változást idézett elő, amely 26 órára 182-re csökkent. A HIV-2 által a kezdeti időpontokban befolyásolt transzkriptumok megnövekedett száma a transzduktált sejtre gyakorolt változatosabb hatásra utal, amelyet 26 óra elteltével egy plató követ, ellentétben a HIV-1-gyel, amely folyamatosan változtatta a transzduktált sejt transzkriptomját. A HIV-1 által befolyásolt transzkriptumok 8 órával a transzdukció után tartalmazták az AKAP9 fehérjét, amely részt vesz a cAMP által közvetített jelátvitelben (Tröger et al., 2012). Egy másik fehérjét kódoló transzkriptum, amelyet a HIV-1 megváltoztatott, a GCC2 volt, amely szerepet játszik az major histocompatibility complex-I (MHCI) Nef által közvetített leszabályozásában (Kumari et al., 2019). A HIV-1 a transzdukció után 12 órával szintén megnövelte a COX20 sejtbeli szintjét, amely a citokróm C oxidáz tagja és a IV. mitokondriális légzési lánc komplex szerves része (Li et al., 2022). A HIV-1 uncoating során felszabadul a p2 peptid, amely aktiválja a citokróm C oxidázt, ezáltal fokozza az ATP termelést, amely szükséges a hatékony reverz transzkripcióhoz és a PIC nukleáris importjához (Ogawa et al., 2015). 26 órával a transzdukció után a HIV-1 az oxidatív stresszválaszhoz kapcsolódó fehérjét kódoló transzkriptumok felszabályozását indukálta. A HIV-1 képes fokozni a reaktív oxigénfajták termelődését, ami az oxidatív stressz-útvonalak megzavarásához és a mitokondriális diszfunkció kiváltásához vezet (Ivanov et al., 2016). Az NQO1-et, HMOX1-et és OSGIN1-et kódoló transzkriptumok sejtbeli szintjét a HIV-1 növelte, ami a generált oxidatív stressz elleni aktív védekezést jelzi.

A HIV-2-vel történő transzdukció minden megfigyelt időpontban szignifikánsan megnövelte a DCN-t kódoló transzkriptum sejtbéli szintjét, amely fehérje részt vesz a sejtproliferációban és az intracelluláris kommunikációban. A DCN fokozott expressziója apoptózist indíthat el a kaszpáz-3-on keresztül, és sejtciklus-leállást okozhat a G0-G1 fázisban a p21 felszabályozása révén (Wu et al., 2008) (Ständer et al., 1999). A korábbi időpontokhoz hasonlóan a HIV-2-vel történő transzdukció növelte az intra- és extracelluláris mátrix komponenseit kódoló transzkriptumok expresszióját, ideértve a KRT4-et, KRT5-öt, KRT8-at, COL1A2-t és COL6A3-at. Ugyanakkor a HIV-1 csak a kollagének kifejeződését tudta befolyásolni, mint például a COL1A1-et. Mindkét HIV-nek sikerült hatnia az *EGR1* sejtbéli szintjére, amely egy transzkripciós faktor, és részt vesz a Tat-függő HIV génexpresszióban. Az EGR1 kiemelkedő szerepet játszik a "kick and kill" nevű terápiás stratégiában, amelyben a látens fertőzött sejteket úgynevezett „látenciafordító” ágenseknek vetik alá, hogy újraaktiválják a nyugvó HIV genomot. Különböző szerekekkel végzett kezelést követően kimutatták, hogy az EGR1 felszabályozódik, és megállapították, hogy az EGR1 közvetlenül kölcsönhatásba lép a HIV-1 promotérével, ezáltal provirális transzkripciót indukál (Woodson és Keen-Hall, 2022) (Wong et al., 2022).

Adataink azt mutatták, hogy a pszeudogének szabályozása az összes megfigyelt időpontban mindkét HIV-fertőzésnél eltérő, ami valóban figyelemre méltó eredmény. Új bizonyítékok arra utalnak, hogy a saját eredetű mRNS-ek, beleértve a pszeudogéneket is, döntő szerepet játszanak a vírusok és daganatok elleni immunválasz szabályozásában (Han et al., 2021). A HIV-1-gyel transzduktált sejtek minimális változást mutattak a pszeudogének számában a kontrol transzduktált kontrollokhoz képest, míg a HIV-2 transzduktált sejtek szignifikánsan több, eltérően szabályozott pszeudogéneket mutattak a HIV-1-hez és a kontrollhoz képest. A HIV-2 transzduktált sejtekben a transzdukció után 8 órával 77 pszeudogén mutatott eltérő szabályozást, ez a szám 93-ra nőtt 12 óránál, és 78-ra csökkent 26 órára. Mivel a pszeudogéneket hagyományosan a génexpresszió negatív szabályozójaként ismerik, a különböző pszeudogén expressziójában megfigyelt eltérő szabályozás hozzájárulhat a HIV-2 egyedülálló hatásához a gazdasejtre.

A korábbi időpontokhoz hasonlóan GO-analízist alkalmaztunk a HIV-1-gyel és HIV-2-vel transzduktált sejtek közötti különbségek felderítésére. 8 óra elteltével a HIV-1 hatást gyakorolt a sejtanyagcserére, amint azt olyan GO csoportok mutatják, mint például a pozitív szabályozás az RNS anyagcsere folyamatokban, a primer anyagcsere folyamatok szabályozása és a

metabolikus folyamatok pozitív szabályozása. Ezzel szemben a HIV-2 elsősorban olyan transzkriptumokat befolyásolt, amelyek a keratinociták differenciálódása, extracelluláris mátrix szerveződése vagy sejtadhézió folyamatokhoz kapcsolódnak. A megnövekedett metabolikus aktivitás, amit a HIV-1 váltott ki, képes növelni a vírus replikációját és fertőzőképességét, mivel ismert, hogy a glikolízis gátlása a reverz transzkripció egyidejű gátlásához vezet (Taylor és Palmer, 2020) (Kang és Tang, 2020).

Meglepő módon nem észleltünk szignifikáns GO kifejezéseket a 12 órás időpontban a HIV-1-gyel transzduktált sejtekből. A HIV-1-el fertőzött HEK-293T sejtekből a többi időponthoz képest 12 óra elteltével észleltük a legalacsonyabb számú megváltozott transzkriptumot. Eközben 12 óra elteltével a HIV-2 befolyásolta az állati szervfejlődés, rendszerfejlődés és sejt differenciálódás csoportokhoz tartozó transzkriptumokat. A 26 órás időpontban a HIV-1 eltérően szabályozott olyan transzkriptumokat, amelyek a méregtelenítési válaszhoz, sejtválaszhoz toxikus anyagokkal szemben és oxidatív stressz folyamatokhoz kapcsolódnak. Ezzel szemben a HIV-2 kevésbé befolyásolta a sejt környezetet, elsősorban olyan transzkriptumokat érintett, amelyek a bőrfejlődés, sejt vándorlás negatív szabályozása és sejt mobilitás negatív szabályozása kapcsolódnak.

A transzkriptomikai analízis során észlelt változások további tisztázására proteomikai vizsgálatot is végeztünk. Elemzésünkéből kiderült, hogy a transzdukció első két órájában mindkét vírus sikeresen megváltoztatta a hnRNPA1, NONO, H1-4, HSPD1 és SRSF6 expresszióját. Ezenkívül a HIV-2 csökkentette az FKBP4 és a CCT8 kifejeződését is. A hnRNPA1 a ribonukleoprotein komplexek családjába tartozik, és fontos szerepet játszik az újonnan szintetizált sejt mRNS-ek transzkripciójában, stabilitásában és szállításában. Kimutatták, hogy az újonnan szintetizált transzkriptum specifikus helyeihez való kötődés révén a HIV-1 *tat* mRNS splice inhibitoraként működhet az integrált provirális genomból történő expresszió esetén (Tange et al., 2001). A Tat erősen apoptotikus természetéről ismert, így ez a gátlás előnyös lehet a vírus számára a Tat túlzott expressziójának megakadályozásával. Továbbá, a Rev stimulációjával a hnRNPA1 elősegíti a vírus mRNS transzportját a sejtmagból a citoplazmába (Hallay és mtsai, 2006).

A NONO nukleáris fehérje szerepet játszik a transzkripció szabályozásában és az RNS splicingben. Kimutatták, hogy HIV-fertőzés során reverz transzkripcióval és PIC-kel társul (Schweitzer et al., 2013) (St Gelais et al., 2015). A NONO túlzott expressziója a HIV-1 fertőzőképességének csökkenéséhez vezet, ami negatívan befolyásolja a reverz transzkripciót

és a virális génexpressziót Jurkat sejtekben. Feltételezték, hogy a reverz transzkripció leszabályozását vagy a reverz transzkriptáz komplexszel való közvetlen érintkezés, vagy a komplex más komponenseivel való közvetett kölcsönhatás révén érik el. A pontos mechanizmus azonban továbbra is tisztázatlan (St Gelais et al., 2015). A STRING és GO kifejezések használatával sejt folyamatok bonyolult hálózatát vizualizáltuk, amelyekben az eltérően szabályozott fehérjék vesznek részt. A GO kifejezések magukban foglalták a celluláris stressz válasz, fehérjék folding, mRNS stabilitás és mRNS splicing csoportokat. Érdeemes megemlíteni, hogy a kezdeti alacsony fehérjeszint a fertőzés előrehaladtával, későbbi időpontokban felülbíráható. A transzkriptomikai elemzéshez hasonlóan a későbbi időpontokból származó proteomikai adatok elemzését is elvégeztük. Adatainkból kiderült, hogy a megváltozott fehérjék jelentős része mRNS-feldolgozáshoz, proteasóma- és chaperon funkcióhoz kapcsolódik. A transzdukciót követő 8 órában nem találtunk szignifikánsan szabályozott fehérjét, azonban elemzésünk azt mutatta, hogy mindkét HIV 17, illetve 117 különböző fehérje expresszióját befolyásolta a transzdukció 12. és 26. órájában.

A HSPA1A, a hnRNPK, a PA2G4 és a Zyx kifejeződése a transzdukció után 12 órával mindkét HIV által transzduktált sejtben megváltozott. Az aktin polimerizációján és fokális adhézión kívül a Zyx az intracelluláris jelátvitelben is részt vesz (Rauskolb et al., 2011). A sejt növekedésben, apoptózisban és differenciálódásban való részvétele mellett a PA2G4-et a HIV-1 Vpr is leszabályozza, ami G2 fázisban történő leállást és apoptózist eredményez U87MG sejtekben (Zhang et al., 2014). Csak a HIV-1 szabályozta le a hnRNPQ expresszióját, amely egy olyan fehérjecsald tagja, amely részt vesz az mRNS transzkripciójában, splicingjében, exportjában, stabilitásában és translációjában. A Rev fehérjével való kölcsönhatás révén a hnRNPQ részt vesz a HIV-1 provirális transzkripciójában is. Továbbá szerepet játszik a Hepatitis C vírus mRNS stabilitásában, splicingjében és RNS-replikációjában is (Vincendeau et al., 2013). Ezenkívül a HIV-2 képes volt csökkenteni a RANBP1 sejtbeli szintjét a HIV-1-hez képest. A RANBP1 rendelkezik egy nuclear export signal (NES) doménnel, amely mind funkciójában, mind szerkezetében analóg a HIV Rev-ben található doménnel, ami arra utalhat, hogy a RANBP1 megoszthat egy lépést a Rev-vel a poszttranszkripció útjában (Audia et al., 2023). A RANBP1 HIV-2 általi negatív szabályozása felvet kérdéseket e fehérje szerepéről a provirális transzkriptumok szállításának akadályozásában.

Hasonlóképpen, a nagyon korai időpontokhoz hasonlóan GO csoport-analízist végeztünk a differenciálisan szabályozott fehérjékből, hogy tovább mélyítsük a két pszeudovírus közötti

különbségeket. Mindkét HIV esetében a transzdukciót követő 12 órában csak kisszámú GO kifejezés volt érintett. A 26 órás időpontban azonban mindkét vírus megváltoztatta a génexpresszió poszt-transzkripciós szabályozása, DNS-templált transzkripció hosszabbításának szabályozása és alternatív mRNS splicing szabályozása a spliceoszóma révén csoportokkal kapcsolatos fehérjék expresszióját. Ezenkívül a két vírus között különbséget figyeltünk meg a 26 órás időpontban. A HIV-1 esetében olyan GO kifejezések voltak jelen, mint az apoptotikus folyamatok pozitív szabályozása, génexpresszió szabályozása és sejtválasz a denaturálódott fehérjékre. Eközben a HIV-2 megváltoztatta olyan fehérjék expresszióját, amelyek szerepet játszanak a transzláció pozitív szabályozása, a fehérjék ubiquitinációjának negatív szabályozása és DNS metabolikus folyamatainak negatív szabályozása folyamatokban.

Annak érdekében, hogy több információt gyűjtsünk a HIV-alapú pszeudovírusok gazdasejtekre gyakorolt hatásáról, transzkriptomikai analízist végeztünk Jurkat T-sejteken. Megállapítottuk, hogy a HEK-293T sejtekhez hasonlóan a HIV-1 nagyobb hatást gyakorolt a sejtekre, amit a HIV-2-höz képest nagyobb számú befolyásolt transzkriptum jellemez. 39-et 8, 45-öt 12, és 42-t észleltünk a 26 órás időpontban a HIV-1 transzduktált Jurkat sejtekből. Ezzel szemben a HIV-2 csak 15 transzkriptum expresszióját változtatta meg 8, 23-ét 12 és 36-ét 26 órával a transzdukció után. A HIV-1 eltérően szabályozta az insulin induced gene 1 (*INSIG1*) expresszióját. A kutatások kimutatták, hogy az *INSIG1* a HIV-1 fertőzés során pozitívan szabályozott, és órszemként működik, reagálva a HIV replikációjára, és gátolja a HIV-1-et a gag fehérje lebomlásának felgyorsításával (Zhang et al., 2019). Mivel a transzdukciót követő 8 órában kimutattuk az *INSIG1* negatív szabályozását, lehetséges, hogy a fertőzés korai szakaszában még feltáratlan szerepe van ezen fehérjének a vírus életciklusában.

Adataink azt mutatták, hogy mind a HIV-1, mind a HIV-2 képes csökkenteni az aldolase, fructose biphosphate C (*ALDOC*) expresszióját 26 órával a transzdukció után, a kontrol transzduktált sejtekhez hasonlítva. A metabolikus útvonalak HIV általi leszabályozása a HIV látencia jele, és a vírus reaktivációja során az anyagcserére gyakorolt negatív hatás visszafordul, mivel a hatékony vírusreplikációhoz fokozott glikolízis szükséges (Shytaj et al., 2021) (Barrero et al., 2013). Érdekes felfedezés volt olyan transzkriptumok eltérő szabályozása, amelyek termékei a mevalonát útvonalhoz kapcsolódnak. Az olyan transzkriptumok, mint a 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (*HMGCR1*), *HMGCSI* és mevalonate diphosphate decarboxylase (*MVD*), kifejeződését minden megfigyelt időpontban befolyásolta mind a HIV-1, mind a HIV-2. A HIV-1 tovább változtatta a mevalonate kinase (*MVK*) expresszióját 12

órával a transzdukció után. A mevalonát útvonal nagymértékben hozzájárul az immunitás kialakulásához, ezért feltételezzük, hogy a mevalonát szintézisben szerepet játszó transzkriptek expressziójának megfigyelt csökkenése hozzájárul a HIV által generált immundiszfunkcióhoz (Mu et al., 2024). A sztatinoknak nevezett HMG-CoA reduktáz enzim gátlóiról ismert, hogy csökkentik a HIV-vel összefüggő társbetegségeket, például a HIV-vel kapcsolatos szív- és érrendszeri betegségeket (CVD) és a non-Hodgkin limfómát (Grinspoon et al., 2019) (Grinspoon et al., 2023) (Chao et al., 2011). A transzduktált HEK-293T sejtekhez hasonlóan GO analízist is végeztünk az érintett biológiai folyamatok további feltárására. Mindkét HIV jelentősen megváltoztatta a cholesterol biosynthetic process (koleszterin szintézisének folyamata) nevű folyamatban résztvevő transzkriptumok kifejeződését.

Nagyon kevés olyan transzkriptum volt, amelyet a HEK293T és a Jurkat sejtekben egyformán szabályozott a HIV-1 és a HIV-2. A detektált transzkriptumok többsége az adott sejtvonalra jellemző volt. Az egyik kivétel az arginosuccinate synthase 1 (*ASS1*), amelyet mind a HIV-1, mind a HIV-2 csökkentett 8 órával a transzdukció után HEK293T sejtekben, és a HIV-1 is csökkentette 8 órával a Jurkat sejtekben. Ennek a transzkriptumnak a terméke részt vesz az arginin de novo szintézisében, és a Herpes simplex vírus 1 (HSV-1) fertőzéssel összefüggésben is leírták, mivel az *ASS1* hiánya fokozza a vírus replikációját (Grady és mtsai, 2013). Arról azonban nincs információ, hogy az *ASS1* részt vesz-e a HIV életciklusában. Ezen túlmenően a korábban leírt *CDKN1A* szintén eltérően szabályozódott 26 órával a HIV-1 transzdukciója után mind a HEK293T, mind a Jurkat sejtekben. Ezenkívül a HIV-2 a transzdukció után 26 órával csökkentette a korábban tárgyalt *EGR1* és *HMGCS1* expresszióját mindkét sejtvonalban. Összefoglalva, a HIV-1 és HIV-2 transzdukció azonnali korai és korai időpontjainak elemzése jelentős különbségeket mutatott ki a két HIV-alapú pszeudovirion között. Ezek a megfigyelések hozzájárulhatnak a lentivirális vektor transzdukcióval kapcsolatos patomechanizmusok jobb megértéséhez. Ezenkívül eredményeink potenciális betekintést nyújtanak a HIV-2 replikációs ciklusának sajátosságaiba, ami egy olyan terület, amely további vizsgálatokat igényel. A jövőbeli kutatások számára más sejtvonalakat, például monocita alapúakat is bevonó kutatások jó kiegészítést jelenthetnek a HIV által generált proteo-transzkriptomikai változásokkal kapcsolatos tudásbázishoz. Ezenkívül egy primer sejteket, például CD4+ T-sejteket bevonó vizsgálat további információkkal szolgálhat a lentivirális transzdukció korai fázisáról.

Összefoglalás

Kutatásunk célja az volt, hogy elemezzük HIV-1 és HIV-2 pszeudovirionok a sejt transzkriptomjára és proteomjára gyakorolt hatását a fertőzés korai fázisára összpontosítva. Továbbá szerettük volna tanulmányozni a HIV-2 fertőzés karakterisztikáját mivel nem sok erre fókuszáló kutatás létezik.

A HIV transzdukció nagyon korai fázisában jelentős változásokat észleltünk HIV-1 és HIV-2 fertőzött HEK293T sejtek között. A HIV-1 számos transzkriptum expresszióját képes volt megváltoztatni beleértve DNS javító fehérjéket, transzportereket és chaperonokat. Ezzel szemben a HIV-2 okozta változások kevésbé voltak sokfélék és főleg az extra és intracelluláris mátrix tagjait kódoló transzkriptumokat érintették. Ezeket a változásokat későbbi időpontokban is megfigyeltük, ahogy a HIV-1 folyamatosan befolyásolta a sejt transzkriptomját a HIV-2-vel szemben, ami a korai időpontokban változatos hatást gyakorolt a transzkriptumokra de a transzdukció után 26 órával elért egy platót. A HIV-1 által befolyásolt transzkriptumok termékei többek között részt vesznek a szignalizációban, transzportban és oxidatív stresszben. Ezzel szemben a HIV-2 által megváltoztatott expressziójú transzkriptumok fontos szerepet játszanak a lipid homeosztázisban. Továbbá ahogy a korai időpontokban is észleltük a HIV-2 szignifikáns hatást gyakorolt az extra és intracelluláris mátrixot alkotó keratinokra és kollagénekre. A fehérje kódoló transzkriptumokat felhasználva gén ontológiai elemzést végeztünk, ami felfedett számtalan HIV-1 és HIV-2 által egyaránt befolyásolt útvonalat. Továbbá jelentős különbségeket is felfedeztünk a két vírus között, mint például az oxidatív stressz szabályozásában szerepet játszó fehérje kódoló transzkriptumok HIV-1 általi eltérő szabályozását.

Egy érdekes felfedezés volt a HIV vírusok hatása a pszeudogének szabályozására. HIV-1-hez hasonlítva a HIV-2 nagyobb hatást gyakorolt a pszeudogéneket kódoló transzkriptumok sejt béli szintjére. A pszeudogéneket a gén expresszió negatív szabályozóinak tartják, szóval a hatás amit a HIV-2 mutatott a kifejeződésükre talán hozzájárulhat a HIV-2 fertőzés egyedi sajátosságainak megértéséhez.

Hogy további adatokra tegyünk szert a HIV vírusok sejtjeire gyakorolt hatásáról proteomikai elemzést végeztünk a transzkriptomikai analízis mellett. A nagyon korai fázisban detektált fehérjék közül öt proteint mind a HIV-1 és HIV-2 képes volt szabályozni, további kettőt csak a HIV-2 befolyásolt. Az eltérő szabályozású fehérjék többek között részt vettek az mRNS splicingban és fehérje foldingban. Nyolc órával a transzdukció után nem detektáltunk további szignifikánsan befolyásolt fehérjéket. Azonban 12 órával a HIV-1 és HIV-2 transzdukció után

összesen 17 fehérje kifejeződése változott. Ezen fehérjék szerepet játszanak az intracelluláris jelátvitelben, apoptózisban és mRNS splicingban. Továbbá az 26 órás időpontnál mindkét vírus szignifikánsan befolyásolta 117 fehérje kifejeződését, többek között mRNS splicingban, sejt proliferációban és fehérje foldingban szerepet játszó fehérjék szintje változott.

A szignifikánsan változott fehérjék gén ontológiai elemzése további hasonlóságokat és jelentős különbségeket fedett fel a két HIV vírus között. Mindkét vírus képes volt befolyásolni a post translational regulation of gene expression és regulation of alternative mRNA splicing via the spliceosome funkciókban szerepet játszó fehérjék expresszióját. Azonban csak a HIV-1 volt hatással a cellular response to unfolded protein-ben részt vevő fehérjék kifejeződésére. Ezzel szemben a HIV-2 szignifikánsan befolyásolta a negative regulation of protein ubiquitination-ben szerepet játszó fehérjék expresszióját.

A transzduktált Jurkat sejtek elemzése további különbségeket tárt fel a két HIV között. Megállapítottuk, hogy a HIV-1 a HIV-2-höz képest több és változatosabb transzkriptumokat tudott megváltoztatni a fertőzött sejtekben. Mindkét vírus hatással volt a koleszterin bioszintézis folyamataiban részt vevő transzkriptumok expresszióját olyan érintett génekkel, mint a HMGCR és az MVD.

Mindent összevetve reméljük, hogy az eredményeinkkel segíthetünk megérteni a HIV-1 és HIV-2 és a belőlük létrehozott lentivirálsi vektorok által generált komplex változásokat. Továbbá reméljük, hogy tanulmányunkkal közelebb kerülhetünk ahhoz, hogy megértsük a HIV-2 egyedi tulajdonságait.

A Kenézy Élettudományi Könyvtár által készített hivatalos publikációs lista



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/10/2025.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Linkner Tamás Richárd
Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Linkner, T. R.**, Ambrus, V. A., Kunkli, B., Szojka, Z., Kalló, G., Csósz, É., Kumar, A., Emri, M., Tózsér, J., Mahdi, M.: Comparative Analysis of Differential Cellular Transcriptome and Proteome Regulation by HIV-1 and HIV-2 Pseudovirions in the Early Phase of Infection. *Int. J. Mol. Sci.* 25 (1), 1-26, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms25010380>
IF: 4.9 (2023)
2. **Linkner, T. R.**, Ambrus, V. A., Kunkli, B., Szojka, Z., Kalló, G., Csósz, É., Kumar, A., Emri, M., Tózsér, J., Mahdi, M.: Cellular Proteo-Transcriptomic Changes in the Immediate Early-Phase of Lentiviral Transduction. *Microorganisms.* 9 (11), 1-21, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms9112207>
IF: 4.926





További közlemények

3. Miltner, N., **Linkner, T. R.**, Ambrus, V. A., Al-Muffti, A. S., Ahmad, H., Mótyán, J. A., Benkő, S., Tózsér, J., Mahdi, M.: Early suppression of antiviral host response and protocadherins by SARS-CoV-2 Spike protein in THP-1-derived macrophage-like cells.
Front. Immunol. 13, 999233, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2022.999233>
IF: 7.3

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 17,126

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
9,826**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2025.01.16.



Köszönetnyilvánítás

Először is szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Mohamed Mahdinak az útmutatását, mérhetetlen türelmét, segítségét és támogatását PhD hallgatói éveim alatt.

Ezenkívül szeretném megköszönni Tózsér József professzornak, hogy befogadott a munkacsoportjába, és lehetőséget biztosított számomra, hogy a tudomány területén dolgozhassak.

Hálás vagyok Dr. Szojka Zsófiának, aki megtanított a molekuláris biológiai laboratóriumban való munkára és a vírusok kezelésére.

Szeretném megköszönni a Retrovirális Biokémia laboratórium dolgozóinak: Dr. Golda Máriának, Dr. Szabó Andrásnak, Dr. Mótyán János Andrásnak, Miltner Noéminek, Almuffti Aya Shamal Abdullahnak, Kiarie Irene Wanjirunak, Dr. Toldi Vandának és Dr. Miczi Máriónak a segítségüket és a kellemes beszélgetéseket, amelyeket a laborban folytattunk.

Külön köszönetet szeretnék mondani Kiarie Irene Wanjirunak a transzdukált Jurkat minták előállításában nyújtott segítségével. Szeretném megköszönni Ambrus Viktor Attilának és Kunkli Balásznak a bioinformatika területén szerzett hatalmas tudásukat, valamint a transzkriptomikai, illetve proteomikai adatok elemzésében nyújtott munkájukat.

Köszönetet mondok nagyszerű laboratóriumi asszisztensünknek, Janics-Pető Szilviának a laboratóriumi munkában nyújtott segítségével és támogatásáért.

Hálás vagyok Dr. Kalló Gergőnek, Dr. Ajneesh Kumarnak, Dr. Emri Miklósnak valamint a Proteomikai Központ munkatársainak és kollégáinak a tömegspektrometriás mérésekben és a proteomikai adatok elemzésében nyújtott segítségükért.

Hálás vagyok Dr. Póliska Szilárdnak és a Genomikai Medicina és Bioinformatikai Központ munkatársainak a transzkriptomikai adatok szekvenálásában és elemzésében nyújtott segítségükért.

Végül szeretném megköszönni szüleimnek és hugomnak a folyamatos támogatásukat a PhD-éveim alatt, és hogy a nehezebb hónapokban is támogattak.