

Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar

Haluk Tibor

**Az Ictalurid herpesvirus 2 (IcHV-2)
genetikai analízise**

Témavezető: Dr. Doszpoly Andor PhD, tudományos
főmunkatárs

Magyar Tudományos Akadémia Agrártudományi
Kutatóközpont Állatorvos-tudományi Intézete

Belső konzulens: Dr. Mátis Gábor PhD, egyetemi adjunktus
Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar Élettani és
Biokémiai Tanszék

2015

Tartalomjegyzék

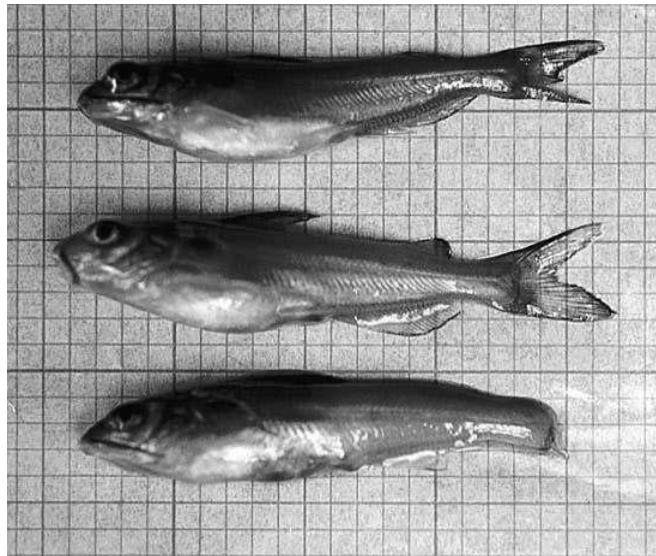
Tartalomjegyzék	1
Rövidítések jegyzéke	2
1. Bevezetés	3
2. Irodalmi áttekintés	5
2.1. A herpeszvírusok általános bemutatása	5
2.2. A herpeszvírusok genomja	6
2.3. A herpeszvírusok taxonómiája	6
2.4. Az <i>Alloherpesviridae</i> család	8
2.5. Az AciHV-2	9
2.6. Az IChV-1	10
2.7. Az IChV-2	11
2.8. Fogékony halfajok	11
2.8.1. A fekete törpeharcsa (<i>Ameiurus melas</i>) ismertetése	11
2.8.2. A csatornaharcsa (<i>Ictalurus punctatus</i>) ismertetése	12
2.9. Az IChV-2 okozta kórkép	13
2.10. Az IChV-2 genomja	14
3. Anyag és Módszer	15
3.1. A vizsgált minták	15
3.2. Víruszaporítás	15
3.3. DNS izolálás	16
3.4. Második generációs szekvenálás	17
3.5. Genom javítása és elemzése	17
4. Eredmények	20
4.1. Eredmények leírása	20
4.2. Eredmények megvitatása	27
5. Összefoglalás	30
6. Summary	31
Köszönetnyilvánítás	32
Irodalomjegyzék	33

Rövidítések jegyzéke

AciHV-1	Acipenserid herpesvirus 1
AciHV-2	Acipenserid herpesvirus 2
AngHV-1	Anguillid herpesvirus 1
CCVD	Channel Catfish Virus Disease
CPE	Citopathogenic Effect (citopatogén hatás)
CyHV-1	Cyprinid herpesvirus 1
CyHV-2	Cyprinid herpesvirus 2
CyHV-3	Cyprinid herpesvirus 3
EM	Eletronmikroszkóp
EPC	Epithelioma papulosum cyprini (sejtvonal)
FBS	Fetal Bovine Serum
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethánszulfonsav
IAA	Isoamyl alkohol
IcHV-1	Ictalurid herpesvirus 1
IcHV-2	Ictalurid herpesvirus 2
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
MEM	Minimum Essential Medium
MQ	Milli-Q (különleges tisztaságú víz)
ORF	Open Reading Frame (nyitott leolvasási keret)
PCR	Polymerase Chain Reaction (polimeráz-láncreakció)
RaHV-1	Ranid herpesvirus 1
RaHV-2	Ranid herpesvirus 2
RPM	Revolutions per minute (percenkénti fordulatszám)
SalHV-1	Salmonid herpesvirus 1
SalHV-2	Salmonid herpesvirus 2
SalHV-3	Salmonid herpesvirus 3
SDS	Nátrium-dodecil-szulfát
WSS-2	White Sturgeon Spleen (sejtvonal)

1. Bevezetés

Szakedolgozatomhoz kapcsolódó munkámat a Magyar Tudományos Akadémia Agrártudományi Kutatóközpont Állatorvos-tudományi Intézetének Molekuláris Virologia csoportjánál végeztem. A munkám során hal-herpeszvírusok kutatásával foglalkoztam, elsődlegesen a fekete törpeharcsa (*Ameiurus melas*) herpeszvírusának (Ictalurid herpesvirus 2; IchV-2) genetikai elemzésével. A törpeharcsafélék (*Ictaluridae*) családjába tartozó fekete törpeharcsa és csatornaharcsa (*Ictalurus punctatus*) állományokban nagyarányú morbiditással, valamint mortalitással járó megbetegedést okozó vírust 1996-ban izolálták (Alborali et al., 1996), és 2003-ban írták le mint új vírusfaj (Hedrick et al., 2003). A vírus által okozott megbetegedés tünetei láthatóak az 1. ábrán.



1. ábra Herpeszvírus okozta megbetegedés külső tünetei csatornaharcsa ivadéokban (forrás: <http://www.ag.auburn.edu/fish/mediagallery/files/2013/08/754.jpg>).

Az intézet hosszú ideje foglalkozik hal-herpeszvírusok molekuláris virológiai kutatásával, különösen tokfélék (*Acipenseridae*) és törpeharcsafélék herpeszvírusaival kapcsolatban. A szakdolgozatomhoz kapcsolódó munkám során e kutatásokba nyílt lehetőségem bekapcsolódni. Az IchV-2 genomjának eddig ismert szakaszait is az intézet molekuláris virológiai kutatásai fedték fel (Dospoly et al., 2008; Dospoly et al., 2011a).

A kutatás, amelybe bekapcsolódtam egy nagyobb kutatási projekt részét képezi, amelynek célja az IchV-2 génexpressziós vizsgálata illetve transzkriptóm-elemzése. Ezen kutatások eredményei lehetőséget biztosíthatnak az alacsonyabb rendű állatfajok herpeszvírusainak

pontosabb megismerésére és részletes információt szolgáltathatnak a vírusok sejten belüli működésével kapcsolatban. Ezen információkat a későbbiekben a tudomány további kutatásokhoz, valamint az állategészségügyi gyakorlat esetleg az adott vírus elleni védekezéshez használhatja. A projekt tudományos jelentősége abban rejlik, hogy bár a magasabbrendű fajok herpeszvírusait széles körben vizsgálják, a fent említett vizsgálatok elvégzésére az *Alloherpesviridae* családba tartozó vírusok körében mindeddig csupán egyszer volt példa az Anguillid herpesvirus 1 (AngHV-1) esetében (van Beurden et al., 2010).

Az első *Alloherpesviridae* családba tartozó vírus, amelynek a teljes genomját szekvenálták az Ictalurid herpesvirus 1 (IcHV-1) volt (Davison, 1992). Ezt a későbbiekben a Ranid herpesvirus 1 (RaHV-1) és Ranid herpesvirus 2 (RaHV-2) (Davison et al., 2006), a Cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3) (Aoki et al., 2007) majd az AngHV-1 (van Beurden et al., 2010) később a Cyprinid herpesvirus 1 (CyHV-1) és Cyprinid herpesvirus 2 (CyHV-2) (Davison et al., 2013) követte. További alloherpeszvírusok genomjából csak részleges szekvencia adatok találhatóak a génbankban (GenBank).

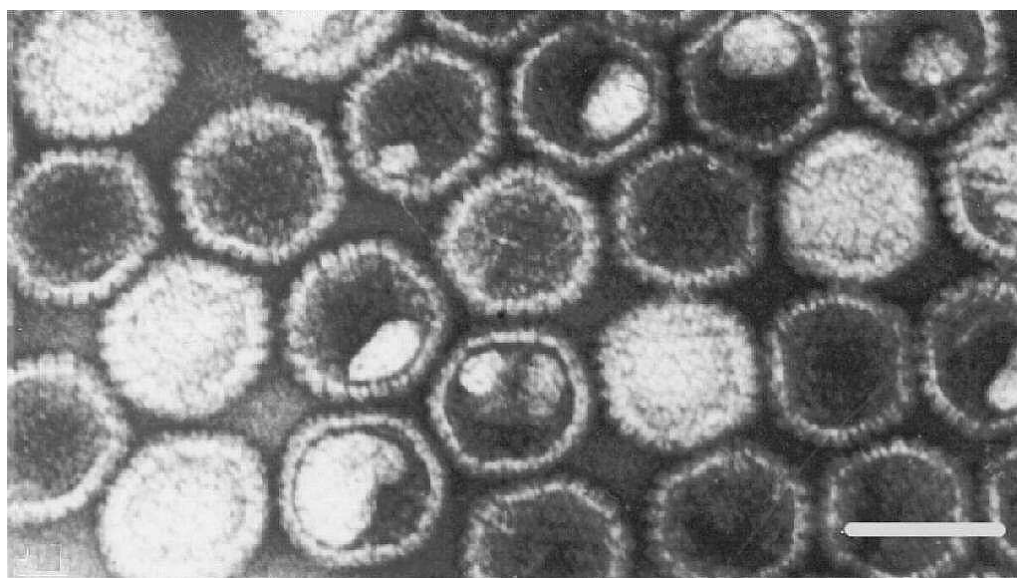
A munkám célja az IcHV-2 vírus teljes genomjának szekvenálása és elemzése volt, amely elengedhetetlen a későbbi transzkriptóm és génexpressziós vizsgálatokhoz.

A munkám során a vírust sejtenyészeten elszaporítottuk, a virális DNS-t izoláltuk, majd második generációs szekvenálás alkalmazásával hozzájutottunk a vírus genomjának nyers nukleotid-szekvenciájához. A hiányzó genom részeket PCR segítségével amplifikáltuk, majd szekvenáltuk, így jutva a teljes virális genom birtokába. A későbbiekben a szekvenciát elemeztük és összevetettük génbanki adatokkal, amely hozzájárult a genom jobb megismeréséhez, megnyitva ezzel az utat a további kutatásokhoz.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A herpeszvírusok általános bemutatása

A herpeszvírusok világszerte elterjedt, nagyméretű (150-200 nm átmérőjű), duplaszálú DNS genommal rendelkező vírusok. A kapszidjuk ikozaéder szimmetriájú, amelyet 20 egyenlő oldalú háromszög határol. A kapszid átmérője 100-125 nm mérettartományba esik. Sejtmembrán eredetű burokkal (envelop) rendelkeznek. A herpeszvírusok elektronmikroszkópos (EM) képe a 2. ábrán látható. A herpeszvírusok jellemzően erősen gazdafaj-specifikusak, és jellemző rájuk, hogy fertőzött gazdában életem át tartó látens fertőzöttséget képesek okozni. A gazdasejtbe való bejutásuk során a herpeszvírusok burkának fehérjéi a sejt felületén található receptorokhoz kapcsolódnak, majd a vírus burka a gazdasejt citoplazma-membránjával fuzionál és a nukleokapszid bejut az intracelluláris térbe, majd a sejtmagba transzportálódik. A herpeszvírusokra jellemző az erős citopatogén hatás (CPE), amely a sejtenyészetben való szaporításuk során magzárványok, szincíciumok és óriássejtek képződésében nyilvánul meg (Davison et al., 2005).



2. ábra Herpeszvírusok EM képe
(Forrás: <http://ictvdb.bio-mirror.cn/Images/Fenner/herpe2.jpg>).

Egyes herpeszvírusok igen nagy állat-egészségügyi jelentőséggel bírnak (pl. Aujeszky betegség, Marek betegség, lovak járványos vetélése, lovak rhinopneumonitise, szarvasmarha fertőző rhinotracheitise), gazdasági jelentőségük kiemelkedő, mások elsődlegesen közegészségügyi hatásuk miatt jelentősek (humán herpeszvírusok).

2.2. A herpeszvírusok genomja

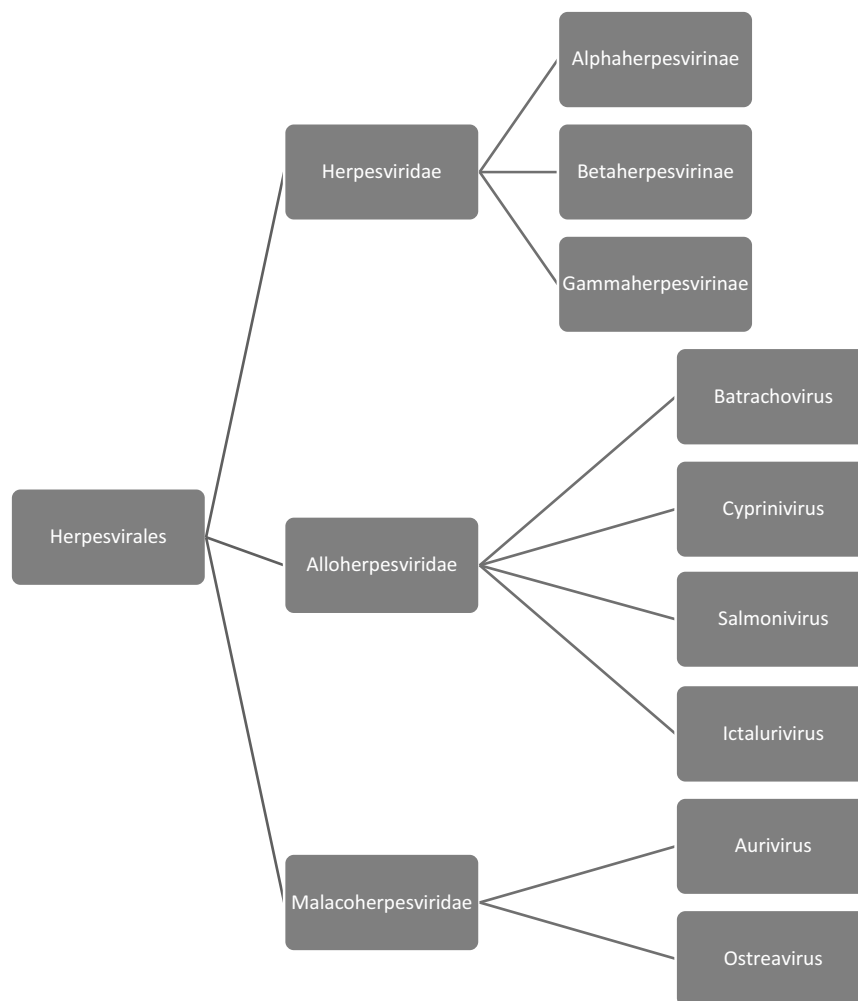
A herpeszvírusok lineáris duplaszálú DNS-genommal rendelkeznek, amelynek mérete 125-295 ezer bázispár között mozog. A genom végét terminális ismétlődő szakaszok (terminal repeat) alkotják. A genom 70-200 fehérjét kódol. A géneket a fertőzött sejtben való expressziójuk alapján három csoportba sorolják. A virális nukleinsav sejtmagba jutásakor azonnal megkezdődik az azonnali korai (immediate early) gének expressziója, amelyek a korai (early) gének transzkripcióját szabályozzák. Ez utóbbiak jellemzően a DNS-replikációhoz szükségesek valamint a gazdasejt metabolizmusának megváltoztatásában játszanak szerepet. A késői (late) gének elsődlegesen a vírus struktúrfehérjéit kódolják (Davison et al., 2005).

A magasabbrendű gerincesek herpesz-vírusainak genomjában mintegy 43 homológ gén található. Ezen homológ gének alapján végzett filogenetikai számítások segítik a vírusok pontosabb taxonómiai besorolását. Az alacsonyabbrendű fajok herpesz-vírusainak genomjában azonban csupán néhány olyan gént ismerünk (pl.: DNS-függő DNS-polimeráz, termináz ATP-áz alegysége), melyek egyértelmű homológiát mutatnak a magasabbrendű gerincesek herpesz-vírusainak génjeivel. Ezen vírusok besorolása a *Herpesviridae* családba elsődlegesen morfológiai alapon történt (Davison et al., 2009).

2.3. A herpeszvírusok taxonómiája

A herpeszvírusokat a *Herpesvirales* rend három családjába sorolják. (A 3. ábrán a rend vázlata látható). A magasabbrendű állatok herpeszvírusai a *Herpesviridae* családba tartoznak, amely három alcsaládot (*Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae*, *Gammaherpesvirinae*) foglal magába. Az alacsonyabbrendű gerincesek (halak, kételtűek) herpesz-vírusainak besorolása az *Alloherpesviridae* családba, a puhatestűekben előforduló herpeszvírusok besorolása a *Malacoherpesviridae* családba történik (Davison et al., 2009).

A kutatásaink során a fekete törpeharcsa herpeszvírusával (IcHV-2) foglalkoztunk, amelyet az *Alloherpesviridae* családba sorolnak. A vírus megnevezésére egyes szakirodalmi forrásokban az Ameiurine herpesvirus 1 vagy fekete törpeharcsa vírus (black bullhead virus) megnevezés is használatos (Lepa et al., 2012). Az *Alloherpesviridae* családot 2008-ban hozta létre a Nemzetközi Vírusrendszertani Bizottság (International Committee on Taxonomy of Viruses ICTV), besorolva ide azon magzatburok nélküli fajok (*Anamnia*) herpeszvírusait, amelyek a korábbi rendszertan szerint a *Herpesviridae* családban be nem sorolt státuszban voltak (Davison et al., 2009).



3. ábra A *Herpesvirales* rend vázlata (saját ábra Doszpoly, 2011 alapján).

A folyamatosan bővülő ismeretek segítségével a család tagjainak száma évről évre nő és a vírusok genomjának egyre szélesebb körű megismerésével lehetőség nyílik azok egyre precízebb taxonómiai besorolásra. A családba jelenleg a halak és kétéltűek herpeszvírusai tartoznak (Davison et al., 2009). Az eddig ismert hal herpeszvírusok közül legalább 11 jelentős károkat képes okozni akvakultúrákban. Ezek a következők: ICHV-1, ICHV-2 melyek a törpeharcsafélék, a CyHV-1, CyHV-2, CyHV-3 melyek a ponty (*Cyprinus carpio*), az ezüstkárász (*Carassius auratus gibelio*) és az aranyhal (*Carassius auratus auratus*), az AngHV-1, amely az európai angolna (*Anguilla anguilla*), az Acipenserid herpesvirus 1 (AciHV-1) és Acipenserid herpesvirus 2 (AciHV-2) amelyek a tok (*Acipenser* fajok), valamint a Salmonid herpesvirus 2 (SalHV-2), Salmonid herpesvirus (SalHV-3) és Salmonid herpesvirus 4 (SalHV-4), amelyek a lazac (*Salmo salar*) és pisztráng (*Salmo trutta* és más pisztrángfajok) kultúrákban okozhatnak jelentős károkat (Doszpoly et al., 2011b; Waltzek et al., 2009). A legnagyobb jelentőséggel a CyHV-3 bír, amely kimagasló nagyságú károkat képes okozni világszerte és az általa okozott megbetegedés szerepel a Nemzetközi

Állatjárványügyi Hivatal (Office International des Epizooties; OIE) bejelentési kötelezettség alá tartozó betegségeinek sorában (<http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2015/>).

2.4. Az *Alloherpesviridae* család

A család aktuális felépítése a következő (Dospoly et al., 2011b alapján):

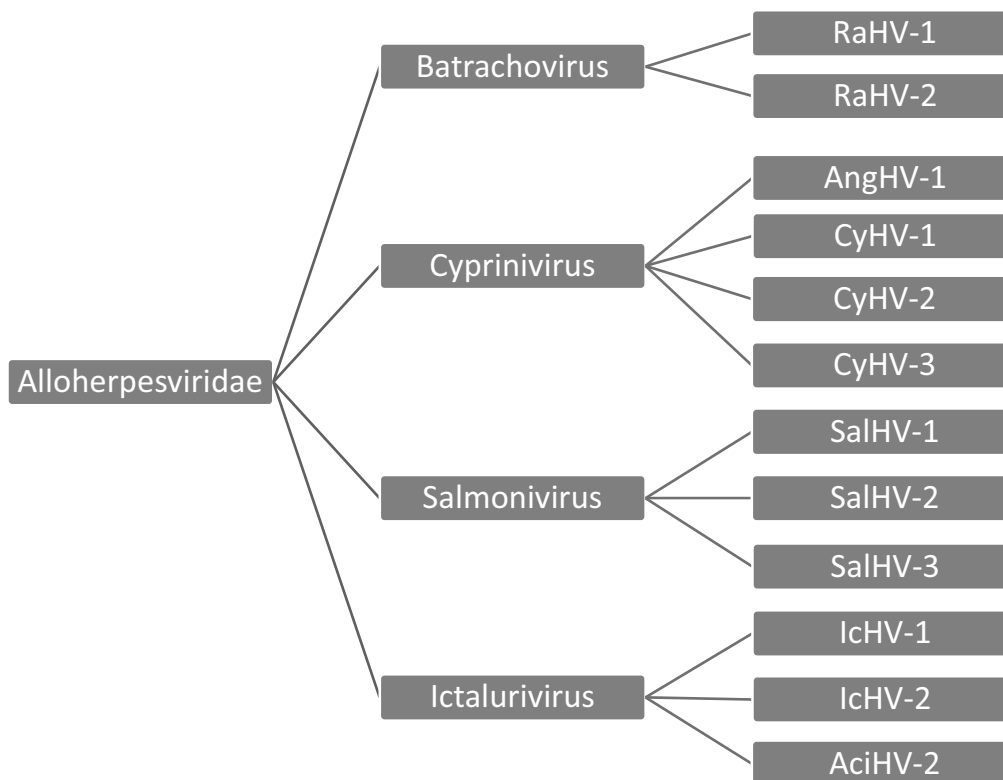
-*Batrachovirus* genus: két béka herpeszvírust tartalmaz (RaHV-1 és RaHV-2)

-*Cyprinivirus* genus: három pontyfélékből (*Cyprinidae*) izolált vírust valamint az angolna herpeszvírusát (AngHV-1) tartalmazza.

-*Salmonivirus* genus: lazacfélék (*Salmonidae*) 3 herpeszvírusát tartalmazza.

-*Ictalurivirus* genus: törpeharcsafélék és tokfélék herpeszvírusait foglalja magába.

A család felépítésének vázlatát az 4. ábra szemlélteti.



4. ábra Az *Alloherpesviridae* család felépítése (saját ábra Dospoly et al., 2011b és <http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp> alapján).

A családba nagyszámú, nemzetségekre be nem sorolt vírus is tartozik. Ezen vírusok nagy részét nem sikerült eddig izolálni. Az alloherpeszvírusok közé való besorolásuk alapvetően

morfológiai bélyegek, valamint a genom jól megőrzött szakaszaira irányuló PCR vizsgálatok során nyert DNS-szakaszok szekvenciája alapján történt (Doszpoly, 2011).

Az alloherpeszvírusok kórtani szerepe erősen változó, virulencia alapján, négy csoport állítható fel (Doszpoly et al., 2011b alapján):

I. Magas virulenciájú vírusok amelyek, akut, szisztémás, gyakran nagy mortalitással járó megbetegedéseket okoznak. Pl.: IcHV-1, CyHV-2

II. Alacsony virulenciájú vírusok, amelyek krónikus, szisztémás megbetegedést okoznak. Pl.: SalHV-1

III. Magas virulenciájú vírusok, amelyek akut, elsősorban bőrtünetekkel járó, nagy mortalitással kísért megbetegedéseket idéznek elő. Pl.: AciHV-1 és AciHV-2

IV. Alacsony virulenciájú vírusok, amelyek enyhe vagy jóindulatú bőrelváltozásokat okoznak. Pl. AngHV-1

Az aktuális rendszerezés szerint az IcHV-2 vírus az *Ictalurivirus* genusba tartozik, amely genusba jelenleg a következő vírusok tartoznak: Acipenserid herpesvirus 2, Ictalurid herpesvirus 1 és Ictalurid herpesvirus 2.

2.5. Az AciHV-2

A vírust először 1995-ben Watson és mtsai. izolálták egészséges fehér tok (*Acipenser transmontanus*) ovariális folyadékából vett mintából, fehér tok lép sejtvonalon (WSS-2) (Watson et al., 1995). A vírust később kimutatták rövidorrú tokból (*Acipenser brevirostrum*) (Kelley et al., 2005; Kurobe et al., 2008; LaPatra et al., 2014) és tavi tokból is (*Acipenser fulvescens*) (Waltzek és Doszpoly, nem publikált). Később jelentős elhullásokat okozott Oroszországban lénai tok (*Acipenser baeri*) gazdaságokban (Shchelkunov et al., 2009). Juvenilis halak mesterséges fertőzése során 80%-os mortalitás volt tapasztalható (Watson et al., 1995). A halak körében elsősorban az úszási viselkedés rendellenességei, valamint letargia és mucoid bőr-, valamint kopolyúléziók voltak láthatóak (Watson et al., 1995).

A vírus teljes genomja még nem ismeretes, azonban mintegy 60 ezer bázispár már publikálásra került (Doszpoly et al., 2008, 2011).

2.6 Az IcHV-1

A vírust először 1968-ban izolálták juvenilis csatornaharcsából, egy jelentős mortalitással járó vérzéses jellegű megbetegedés okozta járvány kitörésekor (Channel Catfish Virus Disease; CCVD) (Fijan et al. 1970). A betegség jelentős mortalitással jár, a halak csökkent növekedését okozza és gyakoriak a másodlagos bakteriális fertőzések is, amely tovább növeli az elhullást a beteg állományban (Plumb, 1978). Természetes körülmények között leginkább az egy évnél fiatalabb állatok betegszenek meg, de előfordul a megbetegedés az idősebb halak esetében is (Hedrick et al., 1987). A fertőzött állatok életre szólóan hordozók maradnak. A horizontális terjedés mellett kimutatták a vírus vertikális transzmisszióját is (Plumb, 1973). A betegség tünetei elsődlegesen úszási zavarok, függőleges testtartás, vérzések a kopoltyú bázisánál, exophthalmia és megnövekedett hasi térfogat. A kórbonctani vizsgálat alapján a fertőzést követően elsőként a posterior vesében jelentkeznek az elváltozások (ödéma, gyulladás és necrosis). Ezt követi a fokális necrosis, ödéma és vérzések megjelenése a májban, gastrointestinalis traktusban, valamint a hasnyálmirigy szövetének necrosis, bővérűség a lépben és vérzések megjelenése az izomzat állományában (Plumb et al., 1974; Wolf et al., 1972). A vírus által okozott bőrelváltozás az 5. ábrán látható.



5. ábra Multifokális bőrléziók CCVD következtében (forrás: <http://ag.ansc.purdue.edu/courses/aq448/images/ccvd.jpg>).

Az IcHV-2-től való elkülönítés igen fontos, ugyanis utóbbi virulensebb lehet a csatornaharcsára nézve (Hedrick et al., 2003). Az IcHV-2-t Észak-Amerikában mindeddig nem mutatták ki. Az elkülönítés a klinikai tünetek, kórbonctani elváltozások segítségével, de alapvetően virológiai módszerekkel történik. Az IcHV-2 CPE-t okoz Epithelioma Papulosum Cyprini (EPC) és BF2 (Bluegill fibroblast-2) sejtvonalon, az IcHV-1 azonban nem (Alborali et al., 1996). A két vírus PCR-el különíthető el legbiztosabban.

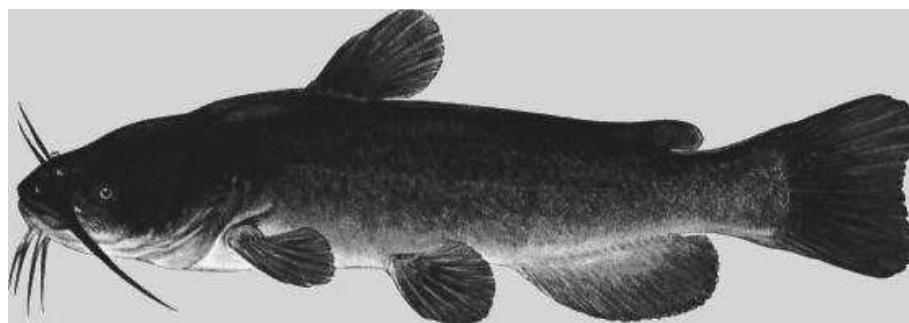
2.7 Az IcHV-2

Az IcHV-2-t (black bullhead virus) Olaszországban mutatták ki fekete törpeharcsából 1996-ban (Alborali et al., 1996), és 2003-ban írták le mint új vírus faj (Hedrick et al., 2003). A vírus által okozott járványkitörés jelentős hatással volt az olaszországi fekete törpeharcsa tenyésztésre (Roncarati et al., 2014).

2.8 Fogékony halfajok

Az IcHV-2-re két halfaj fogékonyágát mutatták ki eddig. A vírus által okozott kórképet eddig fekete törpeharcsában, valamint csatornaharcsában figyelték meg (Hedrick et al., 2003). Mindkét faj a törpeharcsafélék családjába tartozik.

2.8.1. A fekete törpeharcsa (*Ameiurus melas*) ismertetése



6. ábra Fekete törpeharcsa (forrás: <http://www.fishinginfo.eu/NL/vissen/zwartedwergmeerval.htm>).

A faj aktuális taxonómiai besorolása a következő (<http://itis.gov> alapján):

Ország: Állatok (*Animalia*)

Törzs: Gerinchúrosok (*Chordata*)

Altörzs: Gerincesek (*Vertebrata*)

Főosztály: Csontos halak (*Osteichthyes*)

Osztály: Sugarasúszójú halak (*Actinopterygii*)

Rend: Harcsaalakúak (*Siluriformes*)

Család: Törpeharcsafélék (*Ictaluridae*)

Nem: *Ameiurus*

Faj: *Ameiurus melas*

A faj eredeti élőhelye Észak-Amerika, mára azonban már több Európai országban, így hazánkban is jelen van. Édesvízi hal, amely igen jól tolerálja az alacsony oxigénkoncentrációt, a magas hőmérsékletet és a vízszennyezést is, ezáltal megél olyan

körülmények között is, amelyeket más fajok nem tolerálnak. Alapvetően a csendesebb vizeket részesíti előnyben, a gyorsabb mozgású vizeket nem kedveli. 1-3 méter mélységben táplálkozik.

A kifejlett példányok átlagosan 21 centiméteres nagyságot érnek el és megközelítőleg 0,7-1,43kg-ot, de egyes példányok elérhetik a 35 cm-t és 3,63 kg-ot is. Morfológiája a törpeharcsafélék családjára jellemző. A fej széles és lapos, hosszú bajusszalakkal (4 pár) rendelkezik. A színe jellemzően sötétbarna és fekete között változik a háton és sárga valamint fehér között a hason az élőhely függvényében. Évente egyszer szaporodnak, amely ivási időszak jellemzően május és július közé esik. Az ivarérettséget mindkét nem 1 és 3 év között éri el. Az átlagos élettartam 5 év a vadon élő példányoknál és fogságban tartott állatok esetén is (<http://animaldiversity.org>).

Tömeges elszaporodása a horgásztavakban kedvezőtlen és a horgászok által kevésbé kedvelt halfaj, ezért napjainkban egyes tavak esetében kifejezetten célként tűzik ki a tóból való eltávolítását. Gazdasági jelentősége kicsi, de egyes országokban (pl. Olaszországban) üzemi körülmények között tenyésztik. Az állat képe a 6. ábrán látható.

2.8.2. A csatornaharcsa (*Ictalurus punctatus*) ismertetése

A faj aktuális taxonómiai besorolása a következő (<http://itis.gov> alapján):

Ország: Állatok (*Animalia*)

Törzs: Gerinchúrosok (*Chordata*)

Altörzs: Gerincesek (*Vertebrata*)

Főosztály: Csontos halak (*Osteichthyes*)

Osztály: Sugarasúszójú halak (*Actinopterygii*)

Rend: Harcsaalakúak (*Siluriformes*)

Család: Törpeharcsafélék (*Ictaluridae*)

Nem: *Ictalurus*

Faj: *Ictalurus punctatus*

A faj Észak-Amerikából származik, azonban ma már a világ több országában előfordul. Gazdasági jelentőségét jelzi, hogy az USA-ban és más országokban, köztük hazánkban is tenyésztik.



7. ábra Csatornaharcsa (forrás: http://www.scotcat.com/factsheets/ictalurus_punctatus.htm).

Zárt üzemi körülmények között szaporítják, tavainkban azonban a megtelepedés esélye csekély, mert a hideget nem jól tűri. Természetes élőhelyén édesvízben fordul elő, azonban megél sós, valamint brakkvízben is. Állóvizekben és folyókban egyaránt előfordul. Jellemzően éjszaka táplálkozik, nap közben az aljzaton található mélyebb lyukakba vonul. Morfológiájában hasonlít a fekete törpeharcsára. Színe fekete és olajzöld színtől a kék színig terjed az élőhely függvényében. Monogám halfaj, átlagosan mindkét nem 2-3 évesen válik ivaréretté. Természetes élőhelyén jellemzően májustól júliusig zajlik a szaporodás. Vadon élő állatok esetében átlagosan 14, fogságban átlagosan 16 évig élnek, de 40 éves példány is ismert.

Átlagosan 0,9-1,8 kg-os tömeget érnek el és 36-53 cm-es testhosszt, azonban lényegesen nagyobb (10 kg körüli) példányok is előfordulnak természetes élőhelyén. A tavakba itthon az üzemi körülmények között szaporított és nevelt halakat telepítik, a horgászok körében kedvelt faj. Gazdasági jelentősége lényegesen nagyobb, mint a fekete törpeharcsáé. (<http://animaldiversity.org>). Az állat képe a 7. ábrán látható.

2.9. Az IchV-2 okozta kórkép

A vírus első kimutatásakor Olaszországban két fekete törpeharcsa farmon tört ki nagy morbiditással illetve nagy mortalitással járó IchV-2 járvány (Alborali et al., 1996). Az IchV-2 által okozott kórkép nagy hasonlóságot mutat az IchV-1 okozta megbetegedéssel. Az érintett halaknál vérzések jelennek meg elsődlegesen a kopoltyú bázisánál, a bőrön, valamint a belső szervek felületén (különösen a vesék állományában) és a halaknál spirális úszás figyelhető meg. A vírusra a fekete törpeharcsa és a csatornaharcsa ivadécai és kifejlett példányai is érzékenyek ezért a vírus nagy veszélyt jelenthet az üzemi csatornaharcsatenyészetekre (Hedrick et al., 2003; Lepa et al., 2012).

2.10. Az ICHV-2 genomja

Az *Alloherpesviridae* családba tartozó vírusok genomjában 12 erősen konzervált gén ismeretes (van Beurden et al., 2010). Ezen gének megőrzött szakaszai használhatóak fel konszenzus primerek tervezéséhez, amely primereket az új alloherpeszvírusok génszakaszainak amplifikációjához illetve szekvenálásához használnak (Hanson et al., 2006; Kelley et al., 2005; Waltzek et al., 2009). E géneknek az egyes vírusokra jellemző szekvenciáit összehasonlítva Waltzek és mtsai. 2009-ben az *Alloherpesviridae* családon belül két monofiletikus kládot írt le, besorolva az első kládba az AngHV-1, CyHV-1, CyHV-2, és CyHV-3 vírusokat és a második kládba az ICHV-1, ICHV-2, AciHV-1, AciHV-2, SalHV-1, SalHV-2, SalHV-3, RaHV-1 és RaHV-2 vírusokat (Waltzek et al., 2009). Későbbi kutatások a RaHV-1 és RaHV-2 egyediségét kimutatva egy harmadik alcsalád létrehozását javasolták (Dospoly et al., 2011a).

Az ICHV-2 genomjával kapcsolatban, az ICHV-1-től való elkülönítést követően (Hedrick et al., 2003) évekig nem állt rendelkezésre adat. Az első néhány-ezer bázispárt 2008-ban publikálták (Dospoly et al., 2008). A későbbiekben egy 7982 bázispár hosszúságú szakasz került felerősítésre, a DNS-polimeráz és a termináz ATP-áz alegység gének közötti szakaszon. A szekvenált szakasz elemzése során a talált ORF-ek az ICHV-1 ORF(57+58), ORF59, ORF60, ORF61 és ORF62 homológjai (Dospoly et al., 2011a).

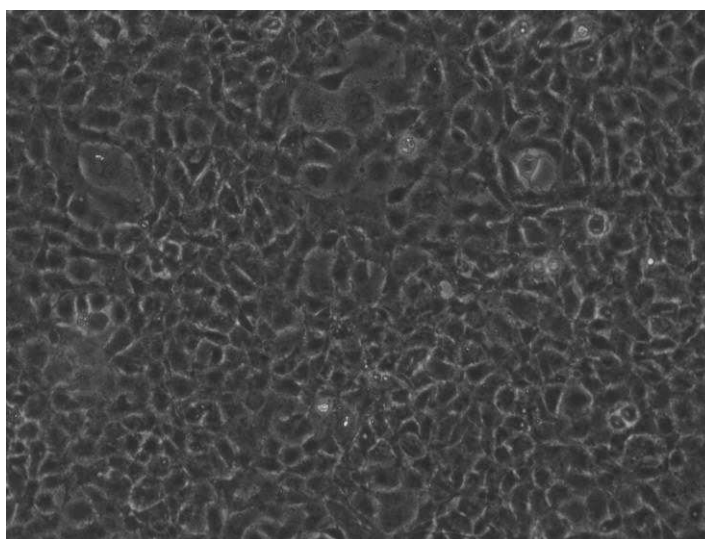
3. Anyag és Módszer

3.1. A vizsgált minták

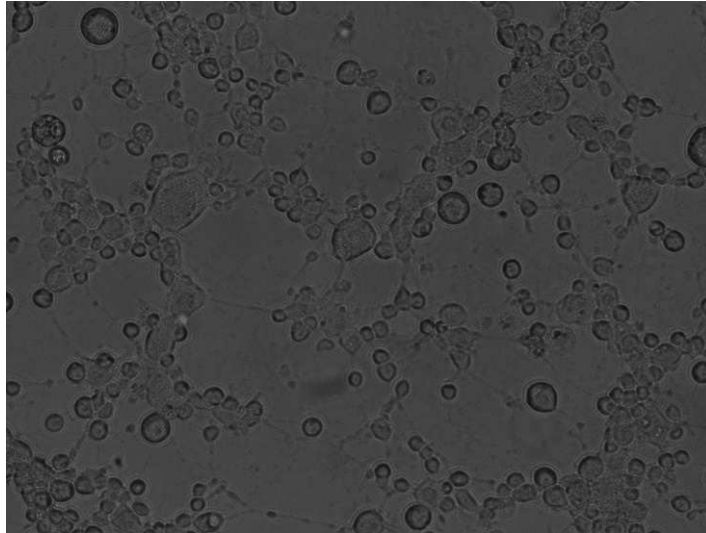
A vizsgálatainkhoz használt mintát Olaszországból kapta a Kutató Intézet 2008-ban és korábban a már említett 7982 bázispár hosszúságú, a DNS-polimeráz valamint a termináz ATP-áz alegységének génje között helyeződő szakasz felerősítéséhez és szekvenálásához használták (Dospoly et al., 2011a). A mintákat -80°C -on tárolták a vizsgálatok megkezdéséig.

3.2. Víruszaporítás

A szekvenáláshoz szükséges nagy mennyiségű vírus-DNS előállításához a vírust sejtenyészeten szaporítottuk. Ehhez EPC (Fjian et al., 1983) sejtvonalat használtuk. Az EPC sejtekhez Minimum Essential Mediumot (MEM) (HyClone) használtunk, amelyhez 10% Fetal Bovine Serum-ot (FBS) (HyClone), 1% HEPES puffert (HyClone), valamint 1% Penicillin-Streptomycin antibiotikum keveréket (HyClone) adtunk. A sejteket 25°C -on inkubáltuk, és 6-8 naponta passzáltuk 1:4 arányban. A sejtek fertőzése, a passzálást követő 2.-3. napon (80%-os monolayer) történt T25-ös flasksokban. A sejteket az Olaszországból kapott sejtenyészet felülúszóval inkubáltuk 25°C -on 1 órán át, majd 5 ml mediumot (2% FBS) adtunk hozzá, a továbbiakban naponta ellenőriztük a sejtek állapotát. Citopatogén hatást (CPE) a 3. napon észleltünk (szincíciumok) a fertőzött sejtenyészetekben. Az 5-7. napra a vírus gyakorlatilag teljesen elpusztította a sejteket. A sejtenyészet a vírushatást megelőzően a 8. ábrán, a vírushatást követően a 9. ábrán látható. Az így nyert, magas virionszámú nyészetet lefagyasztottuk a későbbi vizsgálatokhoz.



8. ábra EPC monolayer a vírushatást megelőzően



9. ábra A sejtenyészet ICHV-2 vírussal való fertőzést követően (5. nap)

3.3. DNS izolálás

Miután megfelelő mennyiségű vírust tartalmazó tenyészethez jutottuk, a lefagyasztott mintákat felolvasztottuk. A flaskák háromszori ismételt fagyasztásával-felolvasztásával roncsoltuk a sejteket, lehetőséget biztosítva arra, hogy a sejten belül található virionok is kiszabaduljanak az extracellularis térbe.

A mintákat ezek után 30 percen keresztül 4°C-on 2500 g-vel centrifugáltuk (Eppendorf centrifugával, Centrifuge 5417C), majd a leülepedő sejtörmeléket eltávolítottuk és a felülúszóval dolgoztunk tovább. A felülúszót ultracentrifugáltuk, amelynek során a mintában lévő virionok leülepedtek így azok pellet formájában megjelentek a csövek alján. Az ultracentrifugálást SW25.2 rotorral 24.000-as fordulatszámmal (RPM) 90 percen át végeztük 4°C-on (BECKMAN XL-90 ultracentrifugával). A 4 csövet 50 µl TE pufferben 4°C-on egy éjszakán át állni hagytuk, majd az alábbiak szerint a DNS-t feltártuk.

A vírus-szuszpenzióhoz hozzáadtunk 5,4 µl 20%-os nátrium-dodecil-szulfátot (SDS) (HyClone) és 2 µl Proteináz K-t (HyClone) és 50 °C-os inkubátorba helyeztük 1 órán át. Ezek után hozzáadtunk 35 µl 5M-os NaCl oldatot, amely lépést egy éjszakán tartó inkubáció követett 4°C-on.

A következő napon a csöveket 15 percen át centrifugáltuk Eppendorf 5417C centrifugával, 14 000 RPM-el, majd a felülúszó eltávolítása után a precipitátumhoz 400µl Milli-Q-t (MQ) adtunk. 1 egység fenol/Cloroform/Isoamyl alkohol (IAA) hozzáadását követően alaposan elkevertük és 15 percen át centrifugáltuk maximális RPM-el, majd a felülúszót új csöbe

töltöttük és megismételtük a fenol/Clorofom/IAA hozzáadását és a centrifugálást. 0,1 egység 3 M-os Nátrium-Acetátot (pH:5,2) adtunk hozzá, majd 2,5 egység etanolt és 1 órán át inkubáltuk -80°C-on.

A csövet 15 percen át 14 000 RPM-el centrifugáltuk (Eppendorf 5417C centrifugával) 4°C-on. Eltávolítottuk a felülúszót és hozzáadtunk 500 µl 70%-os etanolt, amelyet ismételt 15 perces centrifugálás követett 14 000 RPM-el 4°C-on. A felülúszó eltávolítása után a pelletet levegőn száradni hagytuk majd a DNS újbóli beoldásához MQ-t használtunk.

3.4. Második generációs szekvenálás

A feltárt DNS-t második generációs szekvenálásra küldtük a BGI-Tech solutions Co., Ltd szolgáltató céghez. Az eredményként kapott nyers adat 3643748 reading-ből állt, amelyek átlagosan 100 bázispár hosszúságúak voltak. Ezen adatok elemzéséhez először szükség volt a readingek összekapcsolására, amelyet a CLC Genomics Workbench 6 program (CLC bio) segítségével végeztünk el.

3.5. Genom javítása és elemzése

A genom hiányzó szakaszaihoz PCR segítségével jutottunk. A hiányzó szakaszokhoz közeli ismert szekvencia alapján Primer Designer Version 2.0 programmal (Scientific and Education Software) primereket terveztünk. A primer tervezéséhez alkalmas szakasz kiválasztásánál, olyan szakaszt szükséges választani, amelynek az olvadáspontja a választott PCR technika szempontjából optimális (megfelelő GC aránnyal rendelkező szakasz szükséges). Kizárólag olyan szakasz alkalmas primer tervezésére, amely nem alkot hurkot önmagával, valamint a primer molekulái nem kapcsolódnak össze egymással, illetve az amplifikáció során alkalmazott másik primerrel. Ezen szekvenáló-primerek segítségével PCR-el felerősítettük, illetve szekvenáltuk a hiányzó szakaszokat.

A PCR reakciókat PTC-200 DNA Engine Gradient Cyler (MJ Research Inc.) gépekkel végeztük. A reakciókhoz Phusion DNS-polimeráz (Finnzyme Ltd.) enzimet használtunk. A reakcióelegyet az 1. táblázatban foglaltak szerint állítottuk össze. Az alkalmazott PCR program paramétereit a 2. táblázat mutatja be. A reakciót követően a keletkező PCR termékeket 1%-os agaróz gél-elektroforézissel vizsgáltuk. Azon esetekben, ahol a DNS amplifikáció sikeres volt, a keletkezett terméket a gélből QIAquick Gel Extraction Kit-tel (Qiagen Ltd.) tisztítottuk, majd szekvenáltuk.

1. táblázat PCR reakcióelegy

34 µl	MQ
10 µl	Phusion puffer (Finnzyme Ltd.)
1,5 µl	dNTP (10mM)
2x1 µl	Primerek (50pmol/ µl)
0,5 µl	Phusion DNS-polimeráz enzim (Finnzyme Ltd.)
2 µl	IcHV-2 minta DNS
50 µl végtérfogat	

2. táblázat PCR program

Szakasz	Hőmérséklet	Időtartam	Ciklusok száma
Kezdeti denaturáció	98°C	5 perc	1
Denaturáció	98°C	30 másodperc (mp)	
Primer tapadás	Primertől függően	30–60 mp	45
Szintézis	72°C	1–6 perc	
Terminális szintézis	72°C	3–10 perc	1

A PCR termékeket a PCR primerekkel közvetlenül szekvenáltuk, a nagyobb inszertek teljes szekvenálásához "primer walking" módszert használtunk. A már megismert szakaszokra új, specifikus szekvenáló primereket terveztünk, és így két oldalról megszekvenáltuk a teljes DNS-szakaszt több lépésben. Az elektroforézist automata DNS-szekvenálón (ABI Prism® 3100; Applied Biosystems Ltd., Warrington, Egyesült Királyság) az MTA Szegedi Biológiai Központban végezték, és az eredményeket elektronikus levélben kaptuk meg.

A genomvégek amplifikálásához 5'3' RACE Kit-et (Roche) használtunk majd ezeket is szekvenáltuk. A Sanger féle szekvenálással kapott eredményeket a Bioedit programmal ellenőriztük, javítottuk (Hall, 1999).

A teljes genom elemzésének első lépéseként a nukleotid-sorrendet aminosav-sorrendre fordítottuk és megállapítottuk a nyitott leolvasási keretek (ORF) helyét a genomban

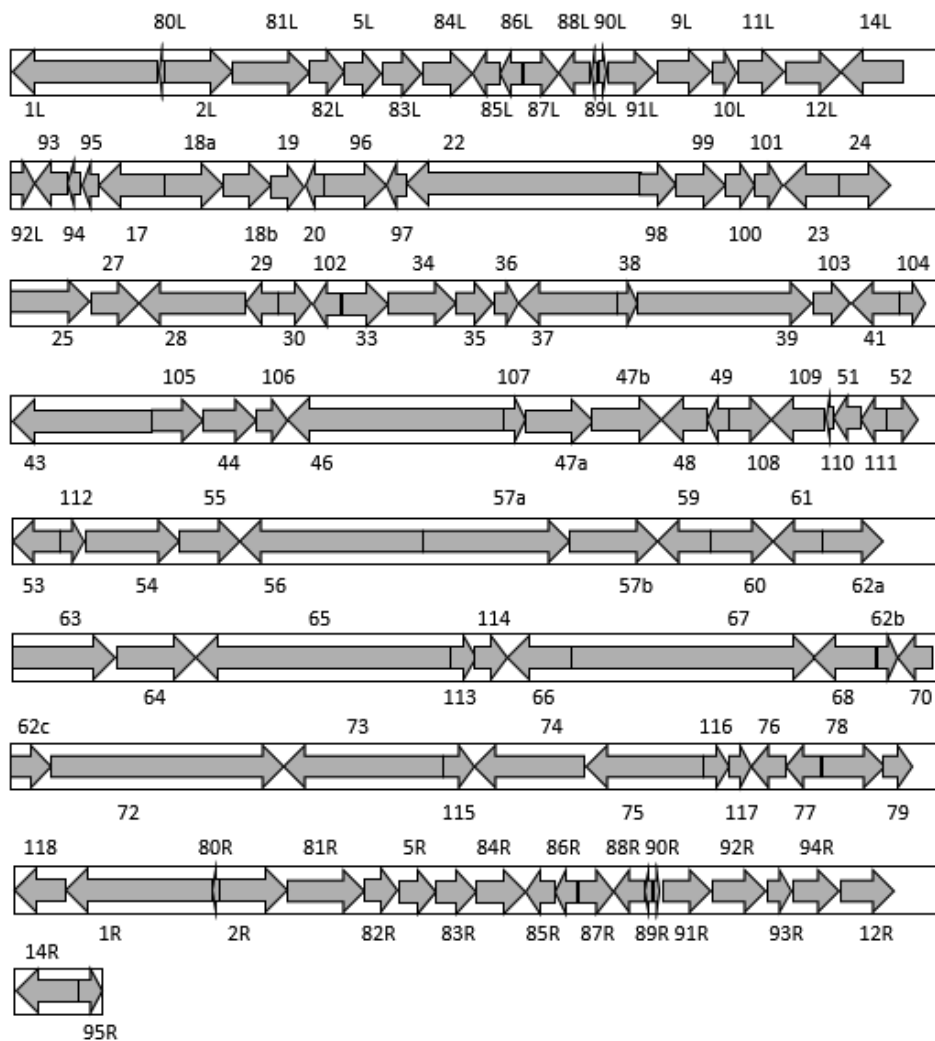
(FgenesV program segítségével) (Softberry). A program által felismert szakaszok metioninnal megfelelő kóddal kezdődnek és stop-kodonnal végződnek. Mivel az egyes szakaszokról nem ismeretes, hogy kódolnak-e valóban fehérjét, nem nevezhetők teljes bizonyossággal génnek. A kapott ORF-ek alapján kapott aminosav-sorrendet BLASTP program (NCBI) segítségével elemeztük, amely során a program felkutatta az adatbázisban található fehérjék közül azokat, amelyek homológiát mutatnak a megadott aminosav-sorrenddel, majd ezeket sorba rendezte.

4. Eredmények

4.1 Eredmények leírása

A vírus genomja 142 925 bázispár hosszúságú. A genom GC aránya 53,8%. A herpeszvírusokra jellemző terminális ismétlődő szakaszok együttes hossza 41404 bázispár, az egyedi szakasz hossza 101521 bázispár. A GC arány a terminális ismétlődő szakaszokban 54,9% az egyedi szakaszban 53,3%, a két arány nem mutat jelentős eltérést. Az ismétlődő szakaszok az ORF1L és ORF92L közötti szakon valamint az ORF1R és ORF92R közötti szakaszon találhatóak, mindkét szakasz 21 ORF-et foglal magába.

125 ORF került azonosításra, ezek közül 28-at tudtunk ismert fehérjecsaldába besorolni. A genom térképe a 10. ábrán látható.



10. ábra Az ICHV-2 genomjának térképe Az egyes nyilak hossza az ORF nukleotid-szekvenciájának hosszával arányos, a nyíl iránya a + vagy - szálát jelöli, a nyilakhoz tartozó számok az ORF számát jelölik.

Az ICHV-2 genomjában talált ORF-ek adatait, valamint az *Alloherpesviridae* családba tartozó vírusok ismert DNS-szakaszaival való összehasonlítás adatait az 3. táblázat tartalmazza. Az ICHV-2 ORF-einek elnevezése az alábbiak alapján történt: azon esetekben ahol az adott ORF homológja megtalálható az ICHV-1 genomjában, az elnevezés az ICHV-1 ORF-ének száma alapján történt. Az ICHV-1 ismert DNS szakaszaival a génbank adatai alapján homológiát nem mutató ORF-eket a genom 5' végétől kezdve 80 feletti számozással jelöltük (az ICHV-1 genomja 79 ORF-et tartalmaz). A genom terminális ismétlődő szakaszain található ORF-eket a genom bal oldalán L a jobb oldalon R jelzéssel láttuk el. A 3. táblázat mutatja be, hogy az ICHV-2 genomjában található ORF-ek mely szálon találhatóak, milyen hosszúságúak és hogy mely egyéb alloherpeszvírusokban található ORF-ekkel mutatnak homológiát, ezek hasonlóságának mértékét (alignment score), a szignifikanciát jelző expect értéket és az aminosav azonosságuk százalékát. A táblázatban a BLASTP program által adott legmagasabb pontszámú ORF-eket tüntettem fel. Ahol több ORF is homológiát mutatott, ott a két legnagyobb alignment score-al rendelkezőt tüntettem fel. Azon esetekben, ahol az adott ORF nem mutatott homológiát génbankban szereplő ORF-el, a „nincs” megjelölést használtam.

3. táblázat

ORF neve	Szál	DNS szakasz hossza (bp)	Homológ gének	Alignment score	Expect érték	Aminosav azonosság (%)
ORF1L	-	2816	ORF1 ICHV-1	469	2E-151	38%
ORF80L	-	107	Nincs			
ORF2L	+	1307	ORF2 ICHV-1	338	6E-113	48%
ORF81L	+	1466	Nincs			
ORF82L	+	647	Nincs			
ORF5L	+	698	ORF5 ICHV-1	195,8	1E-62	49%
ORF83L	+	764	Nincs			
ORF84L	+	947	Nincs			
ORF85L	-	539	Nincs			

ORF86L	-	422	Nincs			
ORF87L	+	674	Nincs			
ORF88L	-	575	Nincs			
ORF89L	-	137	Nincs			
ORF90L	+	116	Nincs			
ORF91L	+	938	Nincs			
ORF9L	+	1034	ORF9 IcHV-1	60,8	3E-12	37%
ORF10L	+	458	ORF10 IcHV-1	66,2	3E-15	41%
ORF11L	+	866	ORF11 IcHV-1	73,6	2E-16	30%
ORF12L	+	1049	ORF12 IcHV-1	147	3E-42	32%
ORF14L	-	1220	ORF14 IcHV-1	284	1E-92	40%
			ORF16 IcHV-1	204	7E-62	39%
ORF92L	+	428	Nincs			
ORF93	-	626	Protein ORF112 AngHV-1	120	2E-33	47%
ORF94	-	275	Nincs			
ORF95	-	329	Nincs			
ORF17	-	1274	ORF17 IcHV-1	121	3E-32	31%
ORF18a	+	1133	ORF18 IcHV-1	129	3E-35	32%
ORF18b	+	908	ORF18 IcHV-1	117	2E-31	33%
ORF19	+	623	ORF19 IcHV-1	60,1	2E-12	30%
ORF20	-	362	ORF20 IcHV-1	137	3E-43	62%
ORF96	+	1223	Nincs			
ORF97	-	404	Nincs			
ORF22	-	4487	ORF22 IcHV-1	375	8E-109	26%
ORF98	+	704	Nincs			
ORF99	+	926	Nincs			
ORF100	+	572	Nincs			
ORF101	+	524	Nincs			
ORF23	-	1055	ORF23 IcHV-1	285	3E-93	47%

ORF24	+	998	ORF24 IcHV-1	392	8E-137	58%
			ORF24 AciHV-2	200	2E-62	44%
ORF25	+	1544	ORF25 IcHV-1	659	0.0	96%
			ORF25 AciHV-2	529	0.0	96%
ORF27	+	923	ORF27 IcHV-1	438	5E-156	72%
			ORF27 AciHV-2	295	8E-100	47%
ORF28	-	2033	ORF28 IcHV-1	545	0.0	53%
			ORF28 AciHV-2	357	2E-114	36%
ORF29	-	644	ORF29 IcHV-1	261	2E-88	62%
			ORF29 AciHV-2	160	3E-50	51%
ORF30	+	626	ORF30 IcHV-1	321	1E-112	75%
			ORF30 AciHV-2	229	1E-76	55%
ORF102	-	551	ORF80 AciHV-2	31168	8E-22	29%
ORF33	+	878	ORF33 IcHV-1	375	3E-131	62%
			ORF33 AciHV-2	202	6E-64	35%
ORF34	+	1322	ORF34 IcHV-1	639	0.0	68%
			ORF34 AciHV-2	465	8E-162	54%
ORF35	+	692	ORF35 IcHV-1	228	3E-75	48%
			ORF35 AciHV-2	125	8E-36	28%
ORF36	+	473	ORF36 IcHV-1	155	2E-49	54%
			ORF36 AciHV-2	71,2	3E-17	38%
ORF37	-	1919	ORF37 IcHV-1	928	0.0	70%
			ORF37 AciHV-2	544	0.0	45%
ORF38	+	365	ORF38 IcHV-1	135	2E-42	56%
			ORF38 AciHV-2	59,3	4E-13	31%
ORF39	+	3371	ORF39 IcHV-1	1601	0.0	68%
			ORF39 AciHV-2	1121	0.0	48%
ORF103	+	713	ORF81 AciHV-2	156	5E-43	40%
ORF41	-	923	ORF41 IcHV-1	353	7E-118	56%
			ORF41 AciHV-2	202	5E-59	36%

ORF104	+	515	Nincs			
ORF43	-	2675	ORF43 IcHV-1	1082	0.0	57%
			ORF43 AciHV-2	685	0.0	41%
ORF105	+	1004	Nincs			
ORF44	+	1001	ORF44 IcHV-1	493	6E-172	67%
			ORF44 AciHV-2	326	4E-106	44%
ORF106	+	593	Nincs			
ORF46	-	4154	ORF46 IcHV-1	1155	0.0	45%
			ORF46 AciHV-2	531	7E-161	42%
ORF107	+	425	Nincs			
ORF47a	+	1292	ORF47 IcHV-1	253	1E-80	42%
			ORF47 AciHV-2	249	6E-79	42%
ORF47b	+	1325	ORF47 IcHV-1	69,3	5E-14	25%
			ORF47 AciHV-2	68,6	8E-14	26%
ORF48	-	869	ORF48 IcHV-1	226	3E-73	42%
			ORF48 AciHV-2	66,6	1E-14	32%
ORF49	-	431	ORF49 IcHV-1	181	4E-59	62%
			ORF49 AciHV-2	116	5E-33	41%
ORF108	+	800	Nincs			
ORF109	-	1013	Nincs			
ORF110	-	134	Nincs			
ORF51	-	515	ORF51 IcHV-1	166	4E-53	54%
ORF111	-	503	Nincs			
ORF52	+	599	ORF52 IcHV-1	222	2E-72	53%
			ORF52 AciHV-2	119	6E-34	33%
ORF53	-	932	ORF53 IcHV-1	413	8E-146	63%
			ORF53 AciHV-2	218	4E-69	40%
ORF112	+	446	Nincs			
ORF54	+	1823	ORF54 IcHV-1	766	0.0	61%
			ORF54 AciHV-2	467	7E-158	39%

ORF55	+	1163	ORF55 IcHV-1	474	3E-167	57%
			ORF55 AciHV-2	197	2E-59	32%
ORF56	-	3536	ORF56 IcHV-1	1651	0.0	66%
			ORF56 AciHV-2	1187	0.0	49%
ORF57a	+	2840	ORF57 IcHV-1	1489	0.0	74%
			ORF57+ORF58 AciHV-2	1166	0.0	60%
ORF57b	+	1703	ORF57 IcHV-1	825	0.0	69%
			ORF57+ORF58 AciHV-2	542	8E-178	45%
ORF59	-	1031	ORF59 IcHV-1	456	1E-161	61%
			ORF59 AciHV-2	157	2E-45	32%
ORF60	+	1193	ORF60 IcHV-1	507	6E-180	61%
			ORF60 AciHV-2	263	5E-85	42%
ORF61	-	941	ORF61 IcHV-1	359	3E-124	55%
			ORF61 AciHV-2	153	2E-44	33%
ORF62a	+	1163	ORF62 IcHV-1	439	2E-170	84%
			ORF62 AciHV-2	375	2E-127	59%
ORF63	+	1985	ORF63 IcHV-1	798	0.0	59%
			ORF63 AciHV-2	453	6E-151	41%
ORF64	+	1511	ORF64 IcHV-1	577	0.0	55%
			ORF64 AciHV-2	406	3E-137	41%
ORF65	-	4889	ORF65 IcHV-1	680	0.0	47%
			ORF65 AciHV-2	320	7E-90	31%
ORF113	+	485	Nincs			
ORF114	+	641	Nincs			
ORF66	-	1226	ORF66 IcHV-1	383	6E-131	48%
			ORF66 AciHV-2	167	1E-47	30%
ORF67	+	4676	ORF67 IcHV-1	1759	0.0	55%
			ORF67 AciHV-2	824	0.0	33%

ORF68	-	1217	ORF68 IcHV-1	382	7E-132	60%
			ORF68 AciHV-2	312	4E-103	42%
ORF62b	+	401	ORF62 IcHV-1	250	2E-80	85%
			ORF62 AciHV-2	172	4E-53	72%
ORF70	-	683	ORF70 IcHV-1	319	3E-111	63%
ORF62c	+	764	ORF62 IcHV-1	417	1E-142	77%
ORF72	+	4478	ORF72 IcHV-1	896	0.0	44%
ORF73	-	3047	ORF73 IcHV-1	729	0.0	39%
ORF115	+	611	Nincs			
ORF74	-	2120	ORF74 IcHV-1	628	0.0	47%
ORF75	-	1259	ORF75 IcHV-1	335	1E-111	41%
ORF116	+	488	Nincs			
ORF117	+	437	Nincs			
ORF76	-	671	ORF76 IcHV-1	151	1E-45	44%
			ORF77 IcHV-1	147	4E-44	39%
ORF77	-	665	ORF77 IcHV-1	189	1E-60	59%
			ORF76 IcHV-1	162	5E-50	53%
ORF78	+	1199	ORF78 IcHV-1	403	5E-139	54%
ORF79	+	569	ORF79 IcHV-1	145	2E-44	49%
ORF118	-	992	Nincs			
ORF1R	-	2816	ORF1 IcHV-1	469	2E-151	38%
ORF80R	-	107	Nincs			
ORF2R	+	1307	ORF2 IcHV-1	338	6E-113	48%
ORF81R	+	1466	Nincs			
ORF82R	+	647	Nincs			
ORF5R	+	698	ORF5 IcHV-1	195	1E-62	49%
ORF83R	+	764	Nincs			
ORF84R	+	947	Nincs			
ORF85R	-	539	Nincs			
ORF86R	-	422	Nincs			

ORF87R	+	674	Nincs			
ORF88R	-	575	Nincs			
ORF89R	-	137	Nincs			
ORF90R	+	116	Nincs			
ORF91R	+	938	Nincs			
ORF92R	+	1034	ORF9 IChV-1	60,8	3E-12	37%
ORF93R	+	458	ORF10 IChV-1	66,2	3E-15	41%
ORF94R	+	866	ORF11 IChV-1	73,6	2E-16	30%
ORF12R	+	1049	ORF12 IChV-1	147	3E-42	32%
ORF14R	-	1220	ORF14 IChV-1	284	1E-92	40%
			ORF16 IChV-1	204	7E-62	39%
ORF95R	+	428	Nincs			

4.2 Eredmények megvitatása

A vizsgálatok megkezdése előtt rendelkezésre álló genomszakasz alapján az IChV-2-nek az *Ictalurivirus* genus tagjaival (az IChV-1-el valamint az AciHV-2-vel) való közeli genetikai rokonsága állapítható meg. A vizsgálataink során is ezen genomokkal való nagyfokú hasonlóságot vártunk.

A vírus genomjának mérete (142 925 bázispár) az alloherpeszvírusoknál megszokott mérettartományba esik. Az ismert genomok közül legrövidebb genommal a családban az IChV-1 bír 134 226 bázispár hosszúságú DNS-el, amely 79 gént kódol (Davison, 1992). A legnagyobb genommal a családban a CyHV-3 rendelkezik 295 ezer bázispárral és 155 génnel (Aoki et al., 2007; Davison et al., 2013).

A 3. táblázatból látszik, hogy várakozásunknak megfelelően az IChV-2 genomjában talált ORF-ek jelentős része a vírus jelenlegi taxonómiai besorolása alapján hozzá legközelebb álló IChV-1 és az AciHV-2 ORF-eivel mutat homológiát.

A genom hossza és GC aránya az IChV-1-hez hasonló, az IChV-1 ORF-jeivel homológiát mutató ORF-ek irányultsága valamint pozíciója megegyezik azokéval. A két vírus egymással homológ ORF-ei méretük tekintetében is nagy hasonlóságot mutatnak. Az IChV-2 genomja nagyfokú kolinearitást mutat az IChV-1 genomjával, 75 ORF-e mutatott homológiát az IChV-1 ORF-eivel és 41 az AciHV-2 vírus ismert ORF-eivel. A 125

azonosított ORF közül 49 esetében a génbankban nem volt homológiát mutató gén. Ezen ORF-ek jelentős része igen rövid, feltehetően csak egy részükről képződik valós géntermék a vírus intracellularis multiplikációja során.

A kutatásunk megkezdése előtt publikált genomrészletek (Dospoly et al., 2008; 2011a) az 77744.-86825. bázispár közötti (ORF57a és ORF62a között) a 102032.-102433. bázispár közötti (ORF62b) és a 104156.-108634. bázispár közötti (ORF72) genomszakaszon találhatóak meg.

Az *Herpesviridae* családba tartozó vírusok esetében nagyszámú (43) jól megőrzött homológ gén ismert, az *Alloherpesviridae* család esetében csupán 12 (van Beurden et al., 2010). Ezen jól megőrzött gének az *Alloherpesviridae* család minden olyan vírusának genomjában megtalálhatóak, amelynek teljes genomját (vagy a genom jelentős részét pl. AciHV-2) ismerjük (Dospoly, 2011). Az ICHV-2 genomjában mind a 12 gén megtalálható volt. Ezen gének közül több gén funkciója ismeretes: termináz (ORF62, ORF69, ORF71), primáz (ORF63), DNS-helikáz (ORF25), proteázok (ORF28), kapszidfehérjék (ORF27, ORF39, ORF53) és DNS-polimeráz (ORF57a, ORF57b), a többi funkciója ismeretlen (Dospoly, 2011).

Az ORF62, ORF69 és ORF71 feltehetően egy gén (feltételezhetően a termináz enzim) 3 exonja. Az *Alloherpesviridae* családba tartozó vírusok körében megőrzött szekvenciájú DNS-függő DNS-polimeráz génje 2 exonból áll (ORF57a és ORF57b).

Az egyes gének pontos működésének megismeréséhez további vizsgálatok szükségesek, amelyekhez a teljes genom pontos szekvenciájának ismerete elengedhetetlen. Az ORF-ek nukleotid-szekvenciájának aminosav-szekvenciájára való fordítását követően azonban a homológia-felismerő programok segítségével egyes ORF-ek esetében olyan szakaszokat azonosítottunk, amelyek homológiát mutatnak más vírusok ismert funkciójú fehérjéinek aminosav-szekvenciájával. Az azonos, vagy hasonló funkciót ellátó fehérjéket fehérjeszupercsaládokba sorolják (protein superfamily). Ismert funkcióval rendelkező fehérjeszupercsaládokra jellemző aminosav-szekvencia szakasz volt felismerhető a következő ORF-ek feltételezett génterméke esetében: ORF5L és ORF5R (NK superfamily, nukleozid illetve nukleotid kináz funkcióval bíró enzimek), ORF84L és ORF84R (DD superfamily, sejten belüli szignálfunkciókat ellátó fehérjék), ORF14L, ORF14R, ORF73, ORF74 (PKc_like superfamily, protein kináz funkciókat ellátó enzimek), ORF93 és ORF94 (MCLC family, kloridion-csatorna fehérjék), ORF25, ORF30, ORF76, ORF77 (P-loop_NTPase

superfamily, nukleozid-trifoszfát hidrolázok), ORF27 (PHA03260 superfamily, kapszidfehérjék), ORF46 (PHA03332 superfamily, membrán glycoproteinek), ORF47a (Peptidases_S8_S53 superfamily, proteázok), ORF49 (trimeric_dUTPase superfamily UTPáz funkcióval bíró fehérjék), ORF54 (H3TH_Stru superfamily, nukleáz enzimek), ORF57a (POLBc family, B típusú DNS polimerázok), ORF63 (PHA03330 Superfamily, feltehetően primáz funkciójú enzimek), ORF62c (TIR_2 superfamily, bakteriális Toll_like receptorok szupercsaládja), ORF75 (PHA03371 superfamily, virális polypeptidek szupercsaládja).

Az adatok alapján kijelenthető, hogy jelenlegi tudásunk szerint a vírus genetikailag az aktuális besorolásban azonos genusba (*Ictalurivirus* genus) tartozó két vírussal (IcHV-1 és AciHV-2) áll legközelebbi rokonságban.

Az IcHV-2 genomjának birtokában a lehetőségünk van a vírus működésének pontosabb megismerésére, és az egyes gének funkciójának felderítésére. A magasabbrendű állatfajok vírusainak kutatásában már széles körben elterjedt génexpressziós vizsgálatokra az alloherpeszvírusok esetében munkánk kezdetéig csupán egy esetben került sor (van Beurden et al., 2010). A későbbiekben, a kutatásunk során megismert ORF-ekről képződő géntermékek funkciójának megismerésére *in vitro* és *in vivo* kísérletekre kerülhet sor, amelyek során a kísérleti állatok fertőzését követően követhetjük nyomon a virális genomról képződő mRNS alapján a gének expresszióját. A teljes genom szekvenciájának ismeretében lehetőség nyílik azonosítani a képződő mRNS-t és ez alapján felderíthető, hogy a vírusfertőzés mely szakaszában (pl. látencia idején) mely gének válnak aktívvá, és képződik róluk géntermék. A teljes genom-szekvencia birtokában lehetőség nyílt a vírus által okozott betegség diagnosztikájában használható új diagnosztikai primerek tervezésére, amelyek segíthetik a vírus kimutatását. Az IcHV-1 és IcHV-2 által okozott megbetegedések tünetei nem mutatnak olyan szignifikáns eltéréseket, amelyek alapján a makroszkópos patológia segítséget nyújtana a két vírus által okozott betegségek elkülönítésében. Az IcHV-2 genomjának ismeretében a közeli rokon IcHV-1-től jelentősebben különböző szakaszok alapján készített primerek felhasználása segítheti az IcHV-1-től való biztosabb elkülönítést, amelynek nagy epidemiológiai jelentősége van.

5. Összefoglalás

Az Ictalurid herpesvirus 2 (IcHV-2) genetikai analízise

Szakedolgozatomhoz kapcsolódó munkám során az Ictalurid herpesvirus 2 (IcHV-2) teljes genomjának szekvenálásában és elemzésében vettem részt. A kutatás egy nagyobb projekt részét képezi, amelynek célja az említett vírus transzkriptóm-elemzése és génexpressziójának részletes megismerése. Ezen kutatásokhoz elengedhetetlen a genom pontos ismerete, amelynek felderítése vált a szakedolgozatom témájává. Az IcHV-2-t 1996-ban izolálták és 2003-ban írták le mint új vírus fajt. A vírust a *Herpesvirales* renden belül az *Alloherpesviridae* család *Ictalurivirus* genusába sorolják. A vírus nagyarányú morbiditást és mortalitást okoz csatornaharcsa (*Ictalurus punctatus*), valamint fekete törpeharcsa (*Ameiurus melas*) állományokban. Az IcHV-2 genomjának egy rövid szakaszát korábban publikálták, amely az *Ictalurivirus* genusba tartozó vírusokkal (IcHV-1 és AciHV-2) mutatott nagy hasonlóságot. Munkám során a vírust EPC sejtvonalon elszaporítottuk, majd a víruspartikulákat ultracentrifugálással koncentráltuk, majd kivontuk a vírus DNS-ét. A DNS-t egy szolgáltató céghez küldtük második generációs szekvenálásra, majd a kapott adatokat összeillesztve hozzájutottunk a vírus genomjának nukleotid-szekvenciájához. A genomot elemeztük és összehasonlítottuk a génbankban található adatokkal. A genom mérete és GC aránya az IcHV-1-éhez nagyon hasonlóan mutatkozott. A vírus genomjában 125 ORF-et tudunk azonosítani, melyek közül 21 a genom mindkét végén megtalálható a terminális ismétlődő szakaszokban. 75 ORF mutatott egyértelmű homológiát az *Ictalurivirus* genus másik két tagjának (IcHV-1 és AciHV-2) génjeivel. Ezen ORF-ek irányultságukban, pozíciójukban és méretükben megegyeztek illetve hasonlítottak az előbb említett vírusokéival. Munkám gyakorlati jelentősége abban rejlik, hogy teljes genom ismerete lehetőséget ad diagnosztikai PCR-ek kifejlesztésére, illetve megteremtette az alapot a további kutatásokhoz, melyekkel a vírus génexpressziós mintázatát tervezzük megfejteni.

6. Summary

The genetic analysis of Ictalurid herpesvirus 2 (IcHV-2)

For the topic of my thesis, the complete genome sequencing and analysis of the Ictalurid herpesvirus 2 (IcHV-2) was chosen. This work is a part of a larger research project, which aims the transcriptome and gene expression analysis of the IcHV-2. For this purpose it is indispensable to know the full genome sequence of the virus. IcHV-2 was first isolated in 1996, and it was described as a novel virus species in 2003. The virus belongs to the genus *Ictalurivirus* within the family *Alloherpesviridae* under the order *Herpesvirales*. IcHV-2 causes disease with high morbidity and mortality in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and black bullhead (*Ameiurus melas*) populations. A shorter section of the genome was already published showing high similarity to that of the other members of the genus *Ictalurivirus* (IcHV-1 and AciHV-2). The virus was propagated on EPC cell line, subsequently the virions were concentrated by ultracentrifugation and the viral DNA was extracted and sent to a commercial sequencing company for second-generation sequencing. After assembling the full genome, we analyzed and compared it to the sequences of the GenBank. The size and the GC content of the genome is similar to that of the IcHV-1. 125 ORFs were identified, of which 21 are located on both ends of the genome in the terminal repeat regions. 75 ORFs showed clear homology to the genes of the other members of the genus (IcHV-1, AciHV-2). The position, orientation and size of these ORFs are the same or similar in the genomes of the formerly mentioned viruses. The practical importance of our results is that based on the complete genome sequence diagnostic PCR method could be elaborated. The results also provide the basis for the future investigations to characterize the transcriptome and the genome-wide gene expression of the virus.

Köszönetnyilvánítás

Mindenek előtt szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Doszpoly Andornak, hogy bevezetett a molekuláris virológia rejtelmeibe, valamint a rengeteg segítséget és támogatást, amivel lehetővé tette, hogy ez a dolgozat megszülethessen.

Külön köszönet illeti Borzák Rékát a laborban nyújtott segítségéért.

Köszönöm Dr. Benkő Máriának és Dr. Harrach Balázsnak, valamint az intézet dolgozóinak, név szerint Iva Podgorskinak, Péntes Juditnak, Ballmann Mónikának, Papp Tibornak, Vidovszky Mártonnak, Görföl Tamásnak, és Tarján Zoltánnak, akik a laborban töltött idő alatt mérhetetlen sok segítséget nyújtottak számomra és mindig rendelkezésemre álltak, ha segítségre volt szükségem.

Köszönöm Dr. Mátis Gábornak, hogy elvállalta a belső konzulens szerepét, illetve a dolgozat végső javításában való segítséget.

Köszönöm menyasszonyomnak Wasenszky Ildikónak a sok türelmet és megértést, ami nélkül ez a szakdolgozat nem készülhetett volna el.

Irodalomjegyzék

- Alborali, L., Bovo, G., Lavazza, A., Cappellaro, H., Guadagnini, P.F., 1996: **Isolation of a herpesvirus in breeding catfish (*Ictalurus melas*)**, Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol., 16. p. 134-137.
- Aoki, T., Hirono, I., Kurokawa, K., Fukuda, H., Nahary, R., Eldar, A., Davison, A.J., Waltzek, T.B., Bercovier, H., Hedrick, R.P., 2007: **Genome sequences of three koi herpesvirus isolates representing the expanding distribution of an emerging disease threatening koi and common carp worldwide**, J. Virol., 81. p. 5058-5065.
- Davison, A.J., Cunningham, C., Saurbier, W., McKinnell, R.G., 2006: **Genome sequences of two frog herpesviruses**, J. Gen. Virol., 87. p. 3509-3514.
- Davison, A.J., Eberle, R., Ehlers, B., Hayward, G.S., McGeoch, D.J., Minson, A.J., Pellett, P.E., Roizman, B., Studdert, M.J., Thiry, E., 2005: **Family *Herpesviridae***. In: *Virus Taxonomy*. VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Szerk.: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A. London: Elsevier, Academic Press p. 193-212.
- Davison, A.J., Eberle, R., Ehlers, B., Hayward, G.S., McGeoch, D.J., Minson, A.C., Pellett, P.E., Roizman, B., Studdert, M.J., Thiry, E., 2009: **The order *Herpesvirales***, Arch. Virol., 154. p. 171-177.
- Davison, A.J., 1992: **Channel catfish virus: a new type of herpesvirus**, Virology, 186. p. 9-14.
- Davison, A. J.; Kurobe, T; Gatherer, D; Cunningham, C; Korf, I; Fukuda, H; Hedrick, R. P.; Waltzek, T. B., 2013: **Comparative genomics of carp herpesviruses**. Journal of Virology, Vol. 87, No. 5, 03. p. 2908-2922.
- Doszpoly A., Benkő M., Bovo, G., LaPatra, S.E., Harrach B., 2011a: **Comparative analysis of a conserved gene block from the genome of the members of the genus *Ictalurivirus***, Intervirology., 54. p. 282-289.
- Doszpoly A., Benkő M., Csaba G., Dán Á., Láng M., Harrach B., 2011b: **Az *Alloherpesviridae* család bemutatása: pontyfélék herpeszvírusainak első molekuláris kimutatása Magyarországon**, Magy Állatorvosok., 133. p. 174-181.

- Doszpoly A., Kovács E.R., Bovo, G., LaPatra, S.E., Harrach B., Benkő M., 2008: **Molecular confirmation of a new herpesvirus from catfish (*Ameiurus melas*) by testing the performance of a novel PCR method, designed to target the DNA polymerase gene of alloherpesviruses**, Arch. Virol., 153. p. 2123-2127.
- Doszpoly A.: **Tokhal-adenovírus és hal-herpeszvírusok genetikai elemzése**, PhD értekezés, Budapest SZIE Állatorvos-tudományi Doktori Iskola. 2011. Megtekintve: 2015.11.17.
- Fijan, N.N., Wellborn, T.L., Naftel, J.P., 1970: **An acute viral disease of channel catfish**. US Fish Wildl. Serv. Tech. Pap., 43. p. 1-11.
- Hall, T.A., 1999: **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT**, Nucl. Acids Symp. Ser., 41. p. 95-98.
- Hanson, L.A., Rudis, M.R., Vasquez-Lee, M., Montgomery, R.D., 2006: **A broadly applicable method to characterize large DNA viruses and adenoviruses based on the DNA polymerase gene**. Virol J 3, 28.
- Hedrick, R.P., Groff, J.M., McDowell, T., 1987: **Response of adult channel catfish to waterborne exposures of channel catfish virus**. Prog Fish Cult 49, p. 181-187.
- Hedrick, R.P., McDowell, T.S., Gilad, O., Adkison, M., Bovo, G., 2003: **Systemic herpes-like virus in catfish *Ictalurus melas* (Italy) differs from Ictalurid herpesvirus 1**, Dis. Aquat. Organ., 55. p. 85-92.
- <http://ag.ansc.purdue.edu/courses/aq448/images/ccvd.jpg> Megtekintve: 2015.11.10.
- http://animaldiversity.org/accounts/Ameiurus_melas/ Megtekintve: 2015.11.10.
- http://animaldiversity.org/site/accounts/information/Ictalurus_punctatus.html Megtekintve: 2015.11.10.
- <http://www.ag.auburn.edu/fish/mediagallery/files/2013/08/754.jpg> Megtekintve: 2015.11.10.
- <http://ictvdb.bio-mirror.cn/Images/Fenner/herpe2.jpg> Megtekintve: 2015.11.10.
- <http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp> Megtekintve: 2015.11.10.
- http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=163995 Megtekintve: 2015.11.10.

<http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2015> Megtekintve:
2015.11.10.

Kelley, G.O., Waltzek, T.B., McDowell, T.S., Yun, S.C., Lapatra, S.E., Hedrick, R.P., 2005: **Genetic relationships among herpes-like viruses isolated from sturgeon.** J Aquat Anim Health 17, p. 297-303.

Kurobe, T., Kelley, G.O., Waltzek, T.B., Hedrick, R.P., 2008: **Revised phylogenetic relationships among herpesviruses isolated from sturgeons.** J Aquat Anim Health 20, p. 96-102.

LaPatra, S.E., Groff, J.M., Keith, I., Hogans, W.E., Groman, D., 2014: **Case report: concurrent herpesviral and presumptive iridoviral infection associated with disease in cultured shortnose sturgeon, *Acipenser brevirostrum* (L.), from the Atlantic coast of Canada.** J Fish Dis 37, p. 141-147.

Lepa A., Siwicki A.K., 2012: **Fish herpesvirus diseases: a short review of current knowledge,** Acta Vet. Brno 81. 383-389.

Plumb, J.A., 1973: **Neutralization of channel catfish virus by serum of channel catfish.** J Wildl Dis 9, p. 324-330.

Plumb, J.A., 1978: **Epizootiology of channel catfish virus disease.** Mar Fisheries Rev 3, p. 26-29.

Plumb, J.A., Gaines, J.L., Mora, E.C., Bradley, G.G., 1974: **Histopathology and electron microscopy of channel catfish virus in infected channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque).** J Fish Biol 6, p. 661-664.

Roncarati, A., Mordenti, O., Stocchi, L., Melotti, P., 2014: **Comparison of Growth Performance of ‘Common Catfish *Ameiurus melas*, Rafinesque1820’, Reared in Pond and in Recirculating Aquaculture System.** J Aquacult Res Develop 5.

Shchelkunov, I.S., Shchelkunova, T.I., Shchelkunov, A.I., Kolbassova, Y.P., Didenko, L.V., Bykovsky, A.P., 2009: **First detection of a viral agent causing disease in farmed sturgeon in Russia.** Dis Aquat Organ 86, p. 193-203.

van Beurden, S.J., Bossers, A., Voorbergen-Laarman, M.H., Haenen, O.L., Peters, S., Abma-Henkens, M.H., Peeters, B.P., Rottier, P.J., Engelsma, M.Y., 2010: **Complete genome sequence and taxonomic position of anguillid herpesvirus 1.** J Gen Virol 91, p. 880-887.

- Waltzek, T.B., Kelley, G.O., Alfaro, M.E., Kurobe, T., Davison, A.J., Hedrick, R.P., 2009: **Phylogenetic relationships in the family *Alloherpesviridae***. Dis Aquat Organ 84, p. 179-194.
- Watson, L.R., Yun, S.C., Groff, J.M., Hedrick, R.P., 1995: **Characteristics and pathogenicity of a novel herpesvirus isolated from adult and subadult white sturgeon *Acipenser transmontanus***. Dis Aquat Organ 22, p. 199–210.
- Wolf, K.: **Fish Viruses and Fish Viral Diseases**. Ithaca, NY: Cornell University Press, 1988.
- Wolf, K., Herman, R.L., Carlson, C.P., 1972: Fish viruses: **Histopathologic changes associated with experimental channel catfish virus disease**. J Fish Res Bd Can 29, p. 149-150.