

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Tokhal-adenovírus és hal-herpeszvírusok
genetikai elemzése

PhD értekezés

Doszpoly Andor

2011

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Témavezető és témabizottsági tagok:

.....

Dr. Benkő Mária
MTA Állatorvos-tudományi Kutatóintézete
témavezető

Dr. Harrach Balázs
MTA Állatorvos-tudományi Kutatóintézete
témabizottság tagja

Dr. Csaba György
MgSzH Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság
témabizottság tagja

Készült 8 példányban. Ez az sz. példány.

.....

Dospoly Andor

Tartalomjegyzék

1.	Rövidítések.....	5
2.	Összefoglalás	6
3.	Bevezetés.....	8
4.	Irodalmi áttekintés	10
4.1.	Herpeszvírusok.....	10
4.1.1.	A herpeszvírusok általános jellemzése.....	10
4.1.2.	A herpeszvírusok morfológiája	11
4.1.3.	A herpeszvírusok genomja.....	12
4.1.4.	A herpeszvírusok rendszertana.....	12
4.1.5.	Halakban és kétéltűekben előforduló HV-ok.....	14
4.2.	Adenovírusok.....	18
4.2.1.	Az adenovírusok általános jellemzése.....	18
4.2.2.	Az adenovírusok morfológiája	19
4.2.3.	Az adenovírusok genomja.....	20
4.2.4.	Az adenovírusok rendszertana.....	21
4.2.5.	Halakban előforduló AdV-ok.....	24
5.	Anyag és módszer.....	25
5.1.	A vírus törzsek és hal-minták	25
5.2.	A virális DNS tisztítása.....	26
5.3.	Restrikciós endonukleázos emésztés	27
5.4.	Molekuláris klónozás.....	27
5.5.	Polimeráz láncreakció.....	28
5.5.1.	Primer tervezés	28
5.5.2.	PCR körülmények optimalizálása	30
5.6.	WSAdV-1 genom végének meghatározása.....	31
5.7.	DNS szekvenálás.....	32
5.8.	Szekvencia analízis, filogenetikai számítások.....	32
6.	Eredmények	34
6.1.	Fehér tok-herpeszvírus	34
6.1.1.	Genomszerveződés	34
6.1.2.	Filogenetikai analízis	38
6.2.	IcHV-2 és SbSHV	40
6.3.	CyHV-1 és 2	42
6.4.	Fehér tok-adenovírus.....	43

6.4.1.	Genomszerveződés	43
6.4.2.	Filogenetikai analízis	47
7.	Megbeszélés	50
7.1.	Fehér tok-herpeszvírus	50
7.1.1.	Genomszerveződés	50
7.1.2.	Rendszertan.....	52
7.1.2.1.	<i>Herpesvirales</i> rend	52
7.1.2.2.	<i>Alloherpesviridae</i> család.....	53
7.2.	IcHV-2 és SbSHV	58
7.3.	CyHV-1 és 2	60
7.4.	Fehér tok-adenovírus	61
7.4.1.	Genomszerveződés	61
7.4.1.1.	ITR	61
7.4.1.2.	Fiberek	62
7.4.1.3.	E2 régió.....	66
7.4.1.4.	L régió	67
7.4.1.5.	A genom jobb vége.....	70
7.4.2.	Rendszertan.....	71
8.	Új tudományos eredmények és megállapítások.....	73
9.	Irodalomjegyzék	74
10.	Tudományos publikációk	89
10.1.	Lektorált, impakt faktorral rendelkező tudományos folyóiratokban megjelent közlemények	89
10.2.	Könyvfejezet	89
10.3.	Nemzetközi konferencia kiadványban megjelent absztrakt vagy proceeding.....	90
10.4.	A doktori kutatás témájához nem kapcsolódó tudományos közlemények.....	92
11.	Köszönetnyilvánítás	93

1. Rövidítések

AciHV	acipenserid herpesvirus	tok-herpeszvírus
AdV	adenovirus	adenovírus
AHV	alloherpesvirus	alloherpeszvírus
AngHV	anguillid herpesvirus	angolna-herpeszvírus
as	amino acid	aminosav
BAdV	bovine adenovirus	szarvasmarha-adenovírus
bp	base pair	bázispár
CAdV	canine adenovirus	kutya-adenovírus
CyHV	cyprinid herpesvirus	ponty-herpeszvírus
DBP	DNA binding protein	DNS-kötő fehérje
E	early	korai
EDS	egg drop syndrome	tyúkok tojáshozam csökkenés szindrómája
FAdV	fowl adenovirus	tyúk-adenovírus
FrAdV	frog adenovirus	béka-adenovírus
HAdV	human adenovirus	humán adenovírus
HV	herpesvirus	herpeszvírus
IcHV	ictalurid herpesvirus	csatornaharcsa-herpeszvírus
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses	Nemzetközi Vírusrendszertani Bizottság
ITR	inverted terminal repeat	fordított vég-ismétlődés
kbp	kilobase pair	ezer bázispár
L	late	késői
MAdV	murine adenovirus	egér-adenovírus
MLP	major late promoter	késői fő promóter
nt	nucleotide	nukleotid
ORF	open reading frame	nyitott olvasási keret
PCR	polymerase chain reaction	polimeráz láncreakció
RaHV	ranid herpesvirus	béka-herpeszvírus
SalHV	salmonid herpesvirus	lazac-herpeszvírus
SbSHV	siberian sturgeon herpesvirus	lénai tok-herpeszvírus
SnAdV	snake adenovirus	kígyó-adenovírus
TAdV	turkey adenovirus	pulyka-adenovírus
TBE	tris-borate-ethylenediamine-tetraacetic acid	trisz-borát-etilén-diamin-tetraacetát
TE	tris-ethylenediamine-tetraacetic acid	trisz- etilén-diamin-tetraacetát
THEV	turkey haemorrhagic enteritis virus	pulykák vérzéses bélgyulladásának vírusa
TP	terminal protein	terminális fehérje
WSAdV	white sturgeon adenovirus	fehér tok-adenovírus

2. Összefoglalás

Észak-amerikai, fehér tokból (*Acipenser transmontanus*) izolált herpeszvírus (*Acipenserid herpesvirus 2*, AciHV-2) genomjának részleges meghatározását és elemzését, továbbá a szintén fehér tokból izolált adenovírus (white sturgeon adenovirus 1, WSAdV-1) genom teljes nukleotid szekvenciájának meghatározását és részletes genetikai elemzését végeztem el.

A fehér tokból izolált herpeszvírus (HV) genomjának elemzése azért ígérkezett érdekesnek, mert munkám kezdetekor még nagyon kevés információ állt rendelkezésünkre az alacsonyabbrendű gerincesek HV-airól. Az AciHV-2 genom mintegy 50%-ának (66 kbp) nukleotidsorrendjét meghatároztuk és elemeztük. A vírus genomszerveződése és a filogenetikai számítások azt mutatták, hogy az AciHV-2 legközelebbi rokona a foltos csatornaharcsából (*Ictalurus punctatus*) izolált *Ictalurid herpesvirus 1* (IcHV-1), melynek teljes nukleotidsorrendjét meghatározták a 1990-es években. Az AciHV-2-t javaslatunknak megfelelően besorolták az *Ictalurivirus* nemzetségbe, amit korábban az IcHV-1-nek hoztak létre a *Herpesviridae* családon belül. Az egyre gyarapodó molekuláris adatok hatására 2008-ban a Nemzetközi Vírusrendszertani Bizottság (ICTV) létrehozott egy új víruscsaládot, nevezetesen az *Alloherpesviridae* családot, a halak és kételtűek HV-ainak és az *Ictalurivirus* nemzetséget átsorolták ebbe az új családba. Ugyanakkor megalapították a *Herpesvirales* rendet, amelyben jelenleg három család található.

Az AciHV-2 mellett egy-egy génblokkot (7–7 kbp) polimeráz láncreakcióval (PCR) kinyertünk és elemeztünk fekete törpeharcsából (*Ameiurus melas*) és lénai tokból (*Acipenser baeri*) izolált HV-okból (*Ictalurid herpesvirus 2*, IcHV-2 és Siberian sturgeon herpesvirus, SbSHV). Továbbá PCR-rel kimutattunk *Cyprinid herpesvirus 1* és 2 (CyHV-1 és 2) fertőzést hazai ponty (*Cyprinus carpio*) illetve ezüstkárász (*Carassius gibelio*) állományból.

Munkám kezdetekor a WSAdV-1, mely máig az egyetlen izolált hal-adenovírus, be nem sorolt státuszban szerepelt az *Adenoviridae* családban. Az először meghatározott szekvenciái alapján végzett filogenetikai számítások mutatták, hogy az abban az időben elfogadott négy nemzetség (*At*-, *Avi*-, *Mast*- és *Siadenovirus*) egyikébe sem sorolható be a vírus. A WSAdV-1 genomja az eddig ismert leghosszabb adenovírus-DNS, 48 kbp. Szerveződése nagy eltéréseket mutat az összes eddig megismert adenovírus (AdV) genomszerveződésétől. PI.: a fiber génnel homológ négy nyitott leolvasási keret a genom bal oldalán helyezkedik el. 2009-ben az ICTV megvitatta a kutatócsoport javaslatát, elfogadta a *Sturgeon adenovirus A* fajt, és számára létrehozta az *Ichtadenovirus* nemzetséget az *Adenoviridae* családon belül.

Munkám elméleti jelentősége, hogy ősi, tokféléből izolált HV-ból elsőként határoztunk meg és elemeztünk hosszabb genom szakaszokat, és ezen eredmények alapján a vírust

besorolták az *Ictalurivirus* nemzetségbe. Az ICHV-2-t, melyből a világon elsőként publikáltunk DNS-szekvenciákat, javaslatunknak megfelelően szintén ebbe a nemzetségbe sorolták. A SbSHV-ről megállapítottuk, hogy nagyon közeli rokona az AciHV-2-nek. Valószínű, hogy azonos fajnak kell tekinteni, bár ezt szerológia vizsgálattal is szükséges lenne megerősíteni. A CyHV-1-et és 2-t hazánkban először mutattuk ki molekuláris módszerekkel. A világon első alkalommal írtuk le a CyHV-2 előfordulását nem a megszokott gazdában, az aranyhalban (*Carassius auratus*), hanem ezüstkárászban. Továbbá, a világon eddig ismeretes egyetlen, halból izolált AdV teljes genomját elemeztük. Eredményeink alapján egy új, ötödik nemzetséget (*Ichtadenovirus*) hoztak létre az *Adenoviridae* családon belül. Az elvégzett munka gyakorlati jelentősége lehet az eredményeinken alapuló diagnosztikai módszerek kidolgozása, esetleg a vírusok felszíni fehérjéinek génjeiből kifejlesztett DNS-vakcinák előállítása, illetve a WSAdV-1 génkifejező vektorként való felhasználása is.

3. Bevezetés

A fehér tokból (*Acipenser transmontanus*) izolált herpeszvírussal (HV) szakdolgozatom készítése során kezdtem foglalkozni. Véletlenszerű klónozással nyert genom darabok részleges szekvenciáját határoztuk meg (Somogyi, 2004; Doszpoly, 2005). Munkám megkezdésekor az alacsonyabbrendű gerincesekből, illetve puhatestűből izolált herpesz-szerű vírusokat a virion morfológiája és a jellegzetes sejtkárosító hatás alapján a *Herpesviridae* család tartalmazta. Filogenetikai vizsgálatokra alkalmas gének hiányában azonban egyik alcsaládba (*Alpha*-, *Beta*- és *Gammaherpesvirinae*) sem lehetett ezeket a vírusokat besorolni. Az első, halból izolált HV, melynek teljes genomszekvenciáját meghatározták, az *Ictalurid herpesvirus 1* (IcHV-1) volt (Davison, 1992). Ennek a vírusnak egy külön, "nem-besorolt" (alcsaládokhoz nem rendelhető) genust hoztak létre a családon belül, *Ictalurivirus* néven. Ebben az időben egyéb hal- és kétéltű-HV-okból csak nagyon rövid DNS-szekvenciák (elsősorban a DNS-függő DNS-polimeráz génből) voltak elérhetőek nyilvános adatbankokban. Ezek között volt az *Acipenserid herpesvirus 1* és 2 (AciHV-1 és 2) (Kelley et al., 2005), *Anguillid herpesvirus 1* (AngHV-1) (Rijsewijk et al., 2005), *Cyprinid herpesvirus 1, 2* és 3 (CyHV-1, 2 és 3) (Gilad et al., 2002; Waltzek et al., 2005; Goodwin et al., 2006a), *Ranid herpesvirus 1* (RaHV-1) (Davison et al., 1999), Pilchard herpesvirus (Crockford et al., 2005) és a *Salmonid herpesvirus 1* és 2 (SalHV-1 és 2) (Davison, 1998; Bernard & Mercier, 1993). Ezért érdekesnek tűnt, hogy egy ősi, porcos ganoidból izolált HV genomját alaposabban megvizsgáljuk. A későbbiekben Olaszországból kapott fekete törpeharcsa-HV-ről (*Ictalurid herpesvirus 2*, IcHV-2) korábban annyit közöltek, hogy szerológiai vizsgálatok és a restrikciós fragmentumhossz polimorfizmus alapján nem azonos az IcHV-1-gyel (Hedrick et al., 2003). Az Oroszországból származó lénai tok-HV-ból (Siberian sturgeon herpesvirus, SbSHV) szintén nem volt még ismert DNS-szekvencia. A vírust morfológiai bélyegei és sejtkárosító hatása alapján HV-nak azonosították (Shchelkunov et al., 2009). Ezért ezeknek a törzseknek a részleges genomanalízisét is elkezdtük.

A kutatócsoport korábbi eredményei és taxonómiai javaslata alapján az *Adenoviridae* család rendszertani beosztását 2002-ben gyökeresen megváltoztatták. A korábbi, körülbelül 30 éve létező két nemzetség mellett további két, új nemzetséget alakítottak ki (Benkő & Harrach, 1998; Davison & Harrach, 2002; Benkő et al., 2005). Az új nemzetségekbe sorolt vírusok jellegzetes molekuláris tulajdonságainak első leírása szintén magyar állatorvosok részvételével történt (Benkő et al., 1990; Harrach et al., 1997; Dán et al., 1998; Davison et al., 2000). Így jelenleg a *Mastadenovirus* nemzetségbe csak emlősökből, míg az *Aviadenovirus* nemzetségbe csak madaraktól izolált vírusok tartoznak. Az *Atadenovirus* nemzetség tagjai között találunk pikkelyes hüllőkből (Squamata), madaraktól, kérődzőkből,

és erszényesből származókat is (Benkő & Harrach, 1998; Farkas et al., 2002; Thomson et al., 2002). A kutatási eredmények azt mutatják, hogy az atadenovírusok (AdV) a pikkelyes hüllőkkel evolválódtak és feltehető, hogy gazdaváltás eredményeként jutottak más gazdafajokba (Harrach, 2000; Benkő & Harrach, 2003). A *Siadenovirus* nemzetségbe egy békából, madaraktól és teknősből izolált vírusokat találunk (Davison & Harrach, 2002). Korábban feltételezték, hogy ez a nemzetség a kételtűekkel együttfejlődött AdV-okat tartalmazza, de jelenlegi ismereteink szerint a siadenovírusok gazdaeredete még nem állapítható meg bizonyossággal. A fehér tokból izolált AdV genomjának részleges elemzését korábban elkezdték a laboratóriumunkban. Véletlenszerű molekuláris klónozás, polimeráz láncreakció (PCR) és DNS-szekvenálás segítségével meghatározták a fehér tok-AdV (white sturgeon adenovirus 1, WSAAdV-1) genomjának középső részében kódolt, erősen konzervált gének nukleotid (nt) sorrendjét, és a proteáz illetve hexon szekvenciákkal filogenetikai számításokat végeztek. Megállapították, hogy a WSAAdV-1 nem sorolható be a már létező négy AdV nemzetség egyikébe sem (Benkő et al., 2002; Kovács et al., 2003). A különböző AdV nemzetségek vírusainak jellegzetesen eltérő a genomszerveződése, elsősorban a genomvégeken, ezért érdekesnek ígérkezett egy leendő nemzetség első tagjának tűnő AdV teljes genomjának vizsgálata. Arra is számítottunk, hogy esetleg további bizonyítékokat találunk az AdV-ok és gerinces gazdafajaik koevolúciójára vonatkozó hipotézisünk megerősítéséhez vagy cáfolatához.

4. Irodalmi áttekintés

4.1. Herpeszvírusok

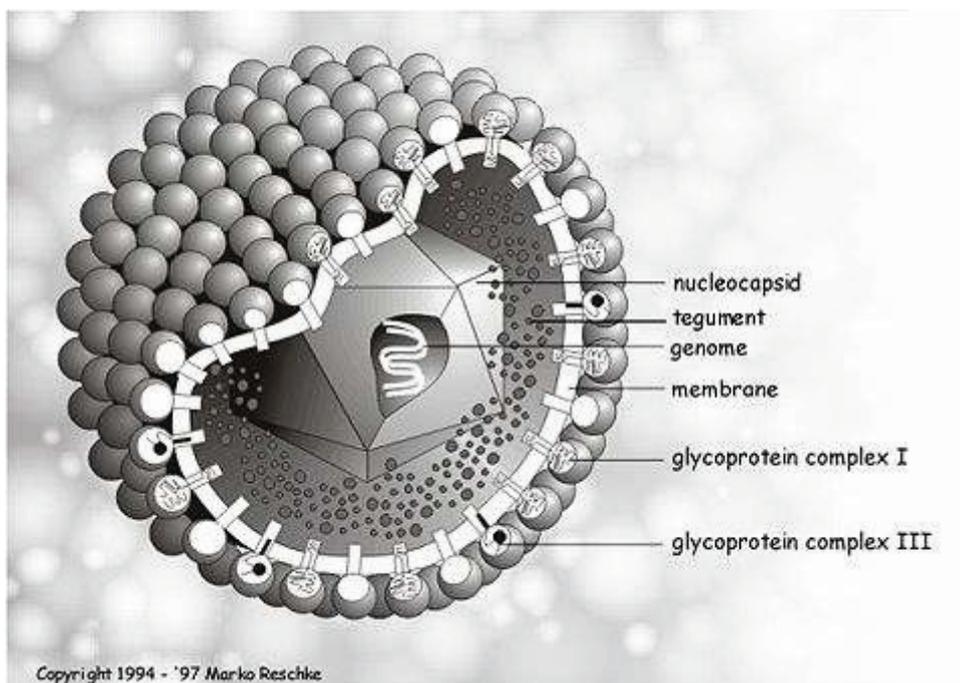
4.1.1. A herpeszvírusok általános jellemzése

A HV-ok nevüket a *herpes*, *herpetos* (kígyó, csúszómászó) szavakból kapták, mely a humán HV-ok által okozott, tipikus rekurrens bőrelváltozásokra utal. Számos, állatorvosi szempontból jelentős betegség kórokozója tartozik ide (pl.: Aujeszky betegség, szarvasmarha fertőző rhinotracheitise, lovak járványos abortusza, ló rhinopneumonitis, macskanátha, Marek betegség). A HV-oknak általában gyenge az immunogén hatásuk és látens fertőzéseket képesek okozni. Jellemző a HV-okra az erős citopatogén hatás, mely megnyilvánulhat magzárványok, szincíciumok és óriássejtképződés formájában. Némely HV-nak onkogén hatását is ismerjük. A sérülékeny burok miatt a HV-ok ellenállóképessége a különböző külső behatásokkal (detergensek, napfény, hő, kiszáradás, szélsőséges pH, stb.) szemben gyenge, leggyakrabban cseppfertőzéssel, nemi úton és más közvetlen kontaktus útján terjednek. A HV-ok általában stenoxen vírusok, de természetesen van kivétel is, mint például az Aujeszky betegséget okozó, egyes típusú sertés-HV, amely a sertéseken kívül az emlős háziállatok többségét is képes megbetegíteni, sőt húsevőkben, kérődzőkben gyors elhullást okoz. Vírusneutralizációs próbánál keresztreakciók csak nagyon közeli rokon vírusok között ismeretesek.

A vírusok a gazdasejtbe a burok és a citoplazmamembrán fúziójával kerülnek be, miután burokfehérjéik segítségével a sejtfelszíni receptorokhoz adszorbeálódtak. Ezután a nukleokapszid a sejtmagba transzportálódik, egyelőre ismeretlen mechanizmussal, miközben tegument fehérjéi megváltoztatják a sejt metabolizmusát. A sejtmagban megkezdődik az azonnali korai (immediate early) gének expressziója, melyek szabályozzák a korai (early) gének (DNS-replikációhoz szükséges gének, gazdasejt metabolizmusát megváltoztató enzimek, proteinek) transzkripcióját. A késői (late) gének elsősorban szerkezeti (struktúr) fehérjéket fejeznek ki. A sejtmagban a virális nukleinsav az éretlen kapszidba csomagolódik és így hagyja el a sejtmagot, majd a virion további érési folyamatokon esik át, míg végül exocitózissal jut a következő sejtbe.

4.1.2. A herpesvírusok morfológiája

A HV-ok nagyméretű, burokkal (envelop) rendelkező vírusok (1. ábra). A virion magból (core), kapszidból, tegument-ből és burokból áll. A core tartalmazza a virális genomot. A kapszid ikozaéder alakú, 20 egyenlő oldalú háromszög határolja, melyeket 162 kapszomerbe rendeződő fehérjeegység alkot, 12 penton és 150 hexon. A kapszid átmérője 100–125 nm közötti lehet. A kapszid és a burok között található a magas fehérjetartalmú tegument. A tegument struktúrájáról kevés ismeret áll rendelkezésünkre. Szimmetrikus alakzatokat csak közvetlen a kapszid melletti részen lehet felismerni. A sejthártya eredetű burok következtében a pleomorf, intakt virion átmérője mintegy 150–200 nm. A burok számos glikoproteidet tartalmaz, melyeknek fontos szerepe van sejt-vírus kölcsönhatásokban (adszopció, penetráció) illetve az immunogenitásban. A *Human herpesvirus 1* (HHV-1) analízise alapján a burok leginkább a Golgi-apparátus membránjára hasonlít (Davison et al., 2005a).



1. ábra A herpesvírusok felépítésének sematikus rajza (http://www.biografix.de/biografix/english/images/2/p_2b2a.jpg).

4.1.3. A herpesvírusok genomja

A HV-ok a Baltimore-féle vírus beosztási rendszer I. csoportjába tartoznak, azaz duplaszálú DNS-genommal rendelkeznek, mely a HV-ok esetében lineáris. Az eddig megismert HV-ok genomjának méretét 125–295 ezer bázispár (kbp) közöttinek találták. A genom végeit terminális ismétlődések (terminal repeat; TR) alkotják. Bizonyos vírusoknál köztes ismétlődések (internal repeat; IR) is találhatóak, melyek egy egyedi hosszú (unique long; U_L) és egy egyedi rövid (unique short; U_S) szakaszra osztják a genomot. Ezen ismétlődő szakaszok hossza igen nagy határok között mozoghat, a murine herpesvírus 1 TR-je 30 bázispár (bp) hosszú, míg a human herpesvírus 6 TR-je 10 kbp. A DNS G+C tartalma széles határok (32–75%) között mozog. A virális DNS mindkét szála kódol (+ sense, - antisense). A HV-ok genomja mintegy 70–200 fehérjét kódol (Davison et al. 2005a). Ezen fehérjéknek csak kis hányada struktúrprotein (eddig még nem azonosítottak közös család- vagy alcsalád-specifikus antigéneket), nagyobb részük a vírus replikációja során szükséges, mint például a DNS-függő DNS-polimeráz, vagy a timidin-kináz. Az egyik legjobban tanulmányozott HV, a HHV-1 esetében több mint 30 fehérjét azonosítottak az érett virionban: 6-ot a kapszidban, legalább 15-öt a tegumentben és legalább 10-et a burookban. Az emlősökből illetve a madaraktól származó HV-ok genomja 7 blokkban mintegy 40 gént hordoz. Ezeknek a blokkoknak az elhelyezkedése, sorrendje szerotípusonként változhat, viszont a blokkokon belüli génsorrend változatlan. Ezen megőrzött gének között találunk kapszid-, tegument- és membránfehérjéket, továbbá a DNS-replikációhoz, a DNS kapszidba történő becsomagolásához szükséges háztartási géneket. Az alacsonyabbrendű gerincesekből izolált HV-ok genomja nagyon eltér ettől, alig rendelkeznek néhány, felismerhetően homológ génnel (DNS-függő DNS-polimeráz, termináz ATP-áz alegysége). Így besorolásuk a *Herpesviridae* családba elsősorban morfológiai alapon történt.

4.1.4. A herpesvírusok rendszertana

A munkám kezdetekor érvényben lévő hivatalos taxonómia szerint a *Herpesviridae* család három alcsaládot és több besorolatlan fajt és típust tartalmazott (Mayo, 2002). Az alcsaládokba a vírusokat biológiai és genomszerkezeti tulajdonságaik, valamint filogenetikai rokonságuk alapján sorolják be. Az *Alphaherpesvirinae* alcsalád négy genust tartalmazott (*Simplexvirus*, *Varicellovirus*, *Mardivirus*, *Iltovirus*). Az egységesebb genomszerkezetű *Betaherpesvirinae* alcsaládot három nemzetségre osztották fel (*Cytomegalovirus*, *Muromegalovirus*, *Roseolovirus*). A *Gammaherpesvirinae* alcsaládot két nemzetség alkotta (*Lymphocryptovirus*, *Rhadinovirus*). A nemzetségeken belül a vírusneutralizációs próbák eredménye alapján szerotípusokat különböztetünk meg. Napjainkra az ismert HV szerotípusok száma száz felett jár, és igen változatos a gazdaeredetük. Az ICTV által

elfogadott fajok egy-egy (szero) típusnak felelnek meg, pl. a human herpesvirus 1 a *Human herpesvirus 1* faj (egyetlen) tagja (ez komoly különbség a később tárgyalandó *Adenoviridae* családdal képest, ahol több (szero) típus is tartozhat ugyanahhoz a fajhoz). 2005-ben az addig leírt 124 HV fajból mintegy 50 nem volt besorolva egyik alcsaládba sem (Davison et al., 2005a). Az alcsaládokba be nem sorolt vírusok között emlős, madár, hüllő, kétéltű, hal és puhatestű eredetűeket is találhattunk. Abban az időben újak számító eredmények szerint a hüllők HV-ai homológia vizsgálatok alapján az alfaherpeszvírusok közé tartoznak (Origgi et al., 2001; McGeoch & Gatherer, 2005). A másik két alcsaládban csak emlősök HV-ai találhatóak. A *Herpesviridae* család tagjai az egész világon előfordulnak. Valószínűleg az összes gerinces fajnak megvan a maga HV-a, mely évmilliók óta a gazdafajjal evolválódott, de ugyanabban az állatban (emlősökben) különböző eredetű HV-ok is találhatóak (pl. a különböző alcsaládok tagjai) (McGeoch et al., 2000). Kísérletes állatfertőzések és *in vitro* fertőzési kísérletek azt mutatják, hogy az *Alphaherpesvirinae* alcsalád tagjai képesek többféle állatfaj sejtjeiben is szaporodni, míg a másik két alcsalád tagjai sokkal szűkebb spektrummal rendelkeznek.

A *Herpesviridae* családot már régóta vizsgálják filogenetikai módszerekkel. Az egyes alcsaládokon belüli, illetve közötti genetikai rokonság alapján megkísérelték a HV-ok evolúciós útjának felderítését is. Ezek a vizsgálatok azonban inkább csak az alcsaládokon belüli kapcsolatokat tisztázása terén jártak eredménnyel, de a három alcsalád közötti leszármazási viszonyok még nem világosak (McGeoch et al., 2000; Davison, 2002). Még nagyobb probléma, hogy a hüllőknél alacsonyabb rendű gazdafajok HV-ai nem tartalmazzak az összehasonlításokhoz alkalmas, homológ géneket. A 90-es évek elején publikálták az első teljes hal-HV genom szekvenciát, az ICHV-1-et (Davison, 1992), melyet foltos csatorna-harcsából (*Ictalurus punctatus*) izoláltak. Ezt a vírust az újonnan létrehozott *Ictalurivirus* nemzetségbe sorolták a *Herpesviridae* családon belül, de egyik létező alcsaládba sem lehetett besorolni filogenetikai számítások alapján mivel a magasabbrendű gerincesekből leírt, HV-okra jellemző, megőrzött génblokkok hiányoztak. Az évek során újabb és újabb, rövid DNS-szekvenciákat publikáltak különböző hal- és kétéltű-HV-okból. Az ICHV-1 faj mellett ezek a HV típusok még fajbeosztást sem kaptak a *Herpesviridae* családon belül.

Kevés eredményt publikáltak abban az időben egyéb alacsonyabbrendű gerincesekből izolált HV-ok genetikai tulajdonságairól. Géntérképezéssel és hibridizációval megállapították, hogy a szivárványos pisztráng (*Oncorhynchus mykiss*) két HV típusának (SalHV-1 és 2) genomja az ICHV-1-hez hasonló ugyan (Bernard & Mercier, 1993), de a távolság a két vírus között majdnem akkora, mint amilyen távolságot az emlősállatok különböző alcsaládba sorolt HV-ai között tapasztalhatunk (Davison, 1998). Az ICHV-1 távoli rokonának tűnt a békából származó HV is, a vírusgenom több mint negyedrészt kitevő, kozmidba klónozott DNS-szakasz szekvenciája alapján (Davison et al., 1999).

Néhány évvel ezelőtt a HV-ok rendszertana gyökeresen megváltozott, ezekről a változásokról azonban a megbeszélés fejezetben lesz szó, mivel szoros összefüggésben állnak saját eredményeinkkel is.

4.1.5. Halakban és kétéltűekben előforduló HV-ok

Régóta ismeretes, hogy halakban herpesz-szerű vírusok megbetegedéseket okoznak. A hal-HV-okat az általuk okozott betegségek lefolyása (akut vagy krónikus), illetve a tünetek kiterjedése (általános vagy csak a kültakaróra korlátozódó) alapján négy csoportra lehet osztani (Shchelkunov et al., 2009): 1. Erős virulenciájú vírusok, melyek akut, szisztémás fertőzést és nagy mortalitással járó megbetegedéseket okoznak. Pl.: ICHV-1 (Fijan et al., 1970) és ICHV-2 (Alborali et al., 1996), CyHV-2 (Jung & Miyazaki, 1995).

2. Gyenge virulenciájú vírusok, amelyek krónikus, szisztémás megbetegedést okoznak. Pl.: SalHV-1 (Eaton et al., 1989).

3. Erős virulenciájú vírusok melyek akut, elsősorban bőrtünetekkel (eróziókkal, fekélyekkel, vérzéses elváltozásokkal) járó, nagy mortalitással kísért megbetegedéseket idéznek elő: AciHV-1 (Hedrick et al., 1991) és AciHV-2 (Watson et al., 1995), SalHV-2 (Kimura & Yoshimizu, 1989), CyHV-3 (Hedrick et al., 2000), Japanese flounder HV (Iida et al., 1989).

4. Gyenge virulenciájú vírusok, amelyek rendszerint enyhe vagy jóindulatú bőrelváltozásokat okoznak. Pl.: AngHV-1 (Békési et al., 1986; Hangalapura et al., 2007) Silurus glanis HV (Békési et al., 1984).

A halak HV-ai általában tavasszal és kora nyáron okoznak járványokat, amikor a vizek hőmérséklete emelkedni kezd és eléri a vírus replikációjának kedvező hőmérsékletet, de az állatok immunrendszere még legyengült a tél után.

A CyHV-1 által okozott betegség már a középkor óta ismeretes "pontyhimlő" néven (Gessner, 1558). Természetes körülmények között általában nagyon alacsony a mortalitás. Intenzív tartásban viszont a fiatal (2 hetes) pontyok (*Cyprinus carpio*) között magas lehet az elhullás (Sano et al., 1991). A betegség tipikus tünetei a változó méretű, kerek, vagy térképszerűen összefolyó bőrelváltozások, amelyek viaszszerű felrakódásnak tűnnek. Testszerte, a fejen és az úszókon is megjelenhetnek (Sano et al., 1985). A tünetek alapján eddig számos halfajban megfigyelték a betegséget, de a kórokozó azonosítása az esetek többségében nem történt meg. Az érintett fajok között van a ponty, dévérkeszeg (*Abramis brama*), szélhajtó kűsz (*Alburnus alburnus*), márna (*Barbus barbus*), aranyhal (*Carassius auratus*), kárász (*Carassius carassius*), fejes domolykó (*Leuciscus cephalus*), jászkeszeg (*Leuciscus idus*), compó (*Tinca tinca*), bodorka (*Rutilus rutilus*), vörösszárnýú keszeg

(*Scardinius erythrophthalmus*) (Dixon, 2008). A CyHV-1 által okozott betegség hazánkban is régóta ismeretes (Békési et al., 1979).

A CyHV-2-t aranyhalból írták le (Jung & Myazaki, 1995) (herpesviral haematopoietic necrosis virus, HVHNV), más halfajok nem bizonyultak fogékonyak. Nincsenek olyan tipikus klinikai tünetei mint a CyHV-1-nek, általában letargia, anorexia jellemzi a beteg halakat. Boncoláskor halvány kopoltyú, máj, vese és megnagyobbodott lép jellemző. Majdnem 100%-os mortalitást okoz minden korcsoportban. 25°C fölé emelve a hőmérsékletet a vírus nem képes szaporodni, ez általában jellemző az összes hal-HV-ra.

A CyHV-3, koi herpeszvírus, megjelenése óta súlyos veszteségeket okoz a halgazdaságoknak szerte az egész világon, ezért áll a kutatások középpontjában. Jelenleg az egyik legnagyobb gazdasági károkat okozó hal-HV, bejelentési kötelezettség alá tartozó betegség. Csak a pontyot és annak egyik díszváltozatát a koi pontyot betegíti meg, más halfajoknál betegséget nem okoz. Kopoltyúnekrózis, enophtalmia és az úszók tövéénél hemorrágiás bőrelváltozások a tipikus külső tünetek (Hedrick et al., 2000). Hazánkban még nem bizonyított a megjelenése, viszont bármikor várható, ugyanis a környező országok nagy részében már megjelent (Marek et al., 2010; Novotny et al., 2010).

Az ICHV-1-et foltos csatornaharcsából izolálták (Fijan et al., 1970). A betegség klinikailag hemorrágiás bőrelváltozásokkal jár, kórbonctani tünetei a megnagyobbodott lép, halvány kopoltyú, nephritis. Intenzív tartásban növendék halaknál igen magas lehet a mortalitás (Plumb, 1989).

A fekete törpeharcsából (*Ameiurus melas*) leírt ICHV-2 magas mortalitással (80–90%) járó betegséget okozhat halgazdaságokban, melynek tünetei: hemorrágiás elváltozások a bőrön, lépen, májon, továbbá nephritis (Alborali et al., 1996).

Az AciHV-1-et és AciHV-2-t fehér tokból izolálták (Hedrick et al., 1991; Watson et al., 1995), a későbbiekben az AciHV-2-t rövidorrú tokból (*Acipenser brevirostrum*) is kimutatták (Kelley et al., 2005). Mindkét vírus elsősorban növendék halak esetében okoz jelentős elhullást (AciHV-1: 40%; AciHV-2: 80%). A 2006-ban lénai tokból izolált SbSHV (Shchelkunov et al., 2009) kísérletes fertőzés esetén akár 100%-os mortalitást is okoz fiatal tokoknál. A betegség tipikus tünetei letargia, rendellenes úszás, bőrléziók és hemorrágiás elváltozások testszerte. Boncoláskor a belső szervek vérfogyottsága tűnik szembe.

Az angolna (*Anguilla anguilla*) HV-át először magyar kutatók írták le (Békési et al., 1986), később a világ több országában izolálták a vírust (Sano et al., 1990; van Nieuwstadt et al., 2001; Chang et al., 2002). A betegség tünetei: hemorrágiás elváltozások a bőrön, az úszókon és a kopoltyún.

A SalHV-1-et szivárványos pisztrángból izolálták (Eaton et al., 1989). Komoly gazdasági károkat okoz növendék halállományokban. Tipikus tünetei a kopoltyúnekrózis, exophthalmia, a szív és a vérképző szervek ödémája (Wolf & Taylor, 1975; Wolf, 1988).

Kísérletes fertőzés során fogékonyak bizonyultak még a sebes pisztráng (*Salmo trutta*) és pataki száibling (*Salvelinus fontinalis*) is (Hedrick & Sano, 1989).

SalHV-2-t (*Oncorhynchus masou virus*) Japánban izolálták egy pisztrángféléből, az *Oncorhynchus masou*-ból. A beteg halak vérképző szerveinek nekrozisát és hiperpláziáját írták le, a túlélő egyedeknél epidermális papillómákat figyeltek meg (Kimura & Yoshimizu, 1989). A vírus horizontális és vertikális terjedését is megfigyelték (Wolf, 1988; Kumagai et al., 1997).

A Salmonid herpesvirus 3-at (SalHV-3) amerikai tavipisztrángból (*Salvelinus namaycush*) izolálták. A vírus epidermális hiperpláziákat és nekrozist, továbbá kopoltyú ödémát okozott. Egyéb pisztrángfélék nem voltak fogékonyak (Bradley et al., 1989).

A pilchard HV-t egy heringféléből (*Sardinops sagax neopilchardius*) mutatták ki Ausztrália partjainál a 90-es évek második felében (Hyatt et al., 1997). A kopoltyúkon léziókat illetve az epitheliumon hiperpláziát és hipertrófiát figyeltek meg. Két járvány vonult végig az ausztrál partok mentén, melyek a becslések szerint a teljes *Sardinops sagax* állomány legalább 10%-át kipusztították (Crockford et al., 2005).

A Percid herpesvirus 1-et egy sügérféléből (*Sander vitreus*) izolálták. (Kelley et al., 1983).

Az Esocid herpesvirus 1-et csukában (*Esox lucius*) és egy észak-amerikai csukafélében (*E. masquinongy*) figyelték meg, mely epidermális léziókat okozott (blue spot disease). A vizsgálatok szerint a vírus prevalenciája 30% körüli volt (Yamamoto et al., 1984; Wolf, 1988). Az új évezredben, Észak-Írországból is megfigyelték hasonló eseteket (Graham et al., 2004).

További halfajokban elektronmikroszkópos vizsgálattal figyeltek meg herpesz-szerű vírusokat, amelyek általában valamilyen bőrelváltozást okoztak. A Pleuronectid herpesvirus 1-et egy lepényhalalakúakhoz tartozó fajból (*Psetta maximus*) írták le Skócia és Dánia partjainál (Buchanan & Madeley, 1978; Wolf, 1988; Hellberg et al., 2002). Egy másik, Japán partjai mentén élő lepényhal fajból (*Paralichthys olivaceus*) a flounder HV-t mutatták ki (Iida et al., 1989; Iida & Nagai, 2004). Jászkeszgeből a Golden ide vírust publikálták (McAllister et al., 1985). A pacific cod HV-t egy tőkehalféléből (*Gadus macrocephalus*) írták le (McArn et al., 1978). A sheatfish HV-t lesőharcsából (*Silurus glanis*) magyar kutatócsoport közölte (Békési et al., 1984). A smelt papillomatous vírust viaszlazacból (*Osmerus eperlanus*) a Balti-tengerből illetve az USA partjairól mutatták ki (Anders, 1989; Morrison et al., 1996). Hasonló HV-t egy másik, a bűzös-lazacalakúakhoz tartozó fajból (*Osmerus mordax*) az USA-ban is leírták (Burke et al., 1989; Herman et al., 1997). Atlantic salmon papillomatosis vírust lazacban (*Salmo salar*) figyelték meg Oroszországban és Skandináviában (Wolf, 1988; Shchelkunov et al., 1992). Az angelfish HV-t Dániában írták le az Amazonas vidékéről importált vitorlášalakból (*Pterophyllum altum*) (Møllergaard & Bloch, 1988). Ezeken felül egy

HV-t közöltek egy skorpióhal-alakúakhoz tartozó fajból (*Sebastes proriger*) (Kent & Meyers, 2000). Továbbá egy ősi porcoshalból, nevezetesen a nyestcápából (*Mustelus canis*) mutattak ki herpesz-szerű részecskéket (Leibovitz & Lebovitz, 1985).

Az északi leopárdbékák (*Rana pipiens*) adenocarcinómáját a múlt század első felében tanulmányozták, és a vírusos eredetét is feltételezték (Lucké tumour herpesvirus) (Lucké, 1934, 1938). A vírust (RaHV-1) később elektronmikroszkópos vizsgálattal is megfigyelték, de szövettenszinten nem izolálták. Fertőzött állatok szűrt szervdörzsölékével a betegséget elő lehetett idézni. A vírus tumorképző hatását kísérletesen is bizonyították (Tweedell, 1967). A Ranid herpesvirus 2-t (RaHV-2, frog virus 4) szintén adenocarcinomás északi leopárdbékából izolálták (Rafferty, 1963). Nem bizonyult onkogén hatásúnak (Granoff et al., 1969). Továbbá erdei békában (*Rana dalmatina*) mutattak ki HV-t elektronmikroszkóppal Olaszországban. A vírus által okozott mortalitás elérte a 80%-ot (Bennati et al., 1994).

4.2. Adenovírusok

4.2.1. Az adenovírusok általános jellemzése

Az AdV-ok elnevezése első izolálásuk körülményeire utal, ugyanis műtétileg eltávolított garatmandulákból készített sejtenyészetek spontán degenerációját észlelték, és ilyen tenyészetekből származott az első AdV izolátum (Rowe et al., 1953). Néhány évvel az első humán AdV-ok izolálása után már egyéb állatfajokban, pl. szarvasmarha, sertés is találtak AdV-okat. Megjegyzendő, hogy vírusizolátum minták a különféle szervekből készített szövetenyészetekből származnak. AdV-ok az egész világon megtalálhatók, és valamennyi főbb gerinces osztály képviselőiben előfordulhatnak (Russell & Benkő, 1999).

Az AdV-ok kórokozó képessége a vírus típusától és gazdától függően változó. A fertőzés általában tünetmentes, vagy enyhe lefolyású betegséget okoz, de immunhiányos állapotban lévő gazdaszervezetben súlyos betegség is kialakulhat, és szinte valamennyi szervrendszer érintett lehet (Benkő, 2008). Az AdV-ok által okozott, állatorvosi szempontból fontosabb betegségek közé tartozik a kutyák fertőző májgyulladás (vírusos hepatitis), a tyúkok tojáshozam csökkenés szindrómája (EDS), a pulykák vérzéses bélgyulladás (THEV). Az AdV-okra általában szűk gazdaspektrum jellemző, és *in vitro* körülmények között is csak az adott gazdafaj bizonyos sejtvonalain szaporíthatók. Épp a felsorolt betegségek kórokozói közül kettő azonban kivételnek számít. A kutyák fertőző májgyulladását előidéző canine adenovirus 1 (CAV-1) számos más húsevő fajt is fertőz, és betegséget is okoz. Az EDS vírusa a tyúk mellett kacsában és libában is előfordul, sőt betegséget is okozhat (Bartha et al., 1982; Bartha, 1984; Ivanics et al., 2001).

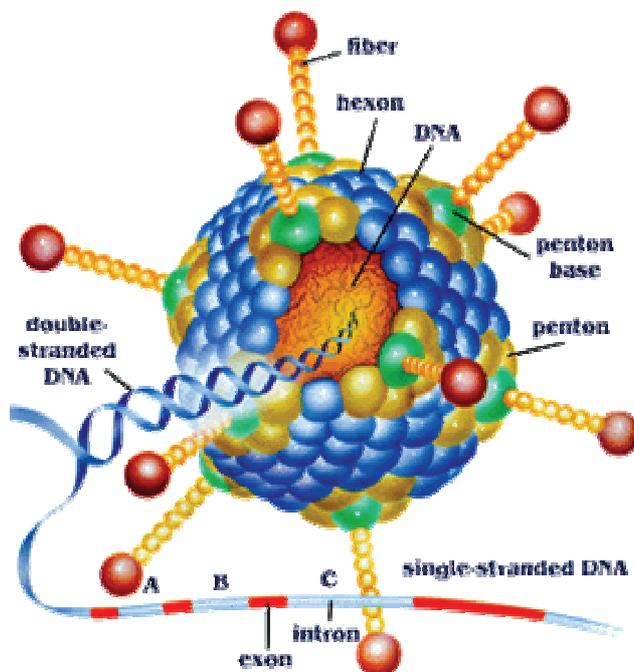
Az AdV-ok szélsőséges külső behatásokkal szemben (kémhatás, hő, zsiroidószer) is ellenállóak.

Az AdV-ok elsődleges receptora az antenna-szerű nyúlvány, a fiber, amely a sejtreceptorokhoz kötődik. Ezután a fiber talapatát alkotó pentonalap a sejt integrinjeivel kölcsönhatásba lép, és endocitózissal jut a sejtbe. Az endoszómában megtörténik a kapszid leválása (uncoating), és a magba szállítódik, ahol a vírus RNS transzkripciója megkezdődik a gazdasejt RNS polimeráz II által. A sejtmag megduzzad, a kromatin a maghártyához szorul, jellegzetes magzárványok keletkeznek. A vírus leállítja a sejt saját DNS, RNS és protein szintézisét. A virális DNS-replikáció (saját DNS-polimerázzal) és összeszerelés után a virionok a sejt lízise után jutnak ki. A virionok éréséhez a vírus által kódolt proteáz szükséges.

Az AdV-ok mRNS érése során komplex splicing mechanizmusok játszódnak le. A splicing mechanizmus folyamatát az AdV-oknál fedezték fel (Berget et al., 1977; Chow et al., 1979). Génterápiában illetve vakcina vektorként való alkalmazásuk nagyon ígéretes a humán és állatorvosi gyógyászatban, ezért világszerte fontos objektumai különböző kutatásoknak.

4.2.2. Az adenovírusok morfológiája

Az AdV-ok közepes méretű (70-90 nm átmérőjű), burok nélküli, duplaszálú DNS-vírusok (2. ábra). Ikozaéder alakú kapszidjuk 240 hexonból azaz lap-kapszomerből (ezek mindegyikét hat hexon veszi körül), és 12 csúcsi kapszomerből (pentonból) (ezeket öt hexon veszi körül) áll. A hexonokat három azonos polipeptid (polipeptid II) alkotja. A hexonok faj- és nemzetségspecifikus antigén epitópokat hordoznak. E fehérje rendkívül konzervatív, az egyes nemzetségekben jól megőrződött szakaszokat tartalmaz, valamint nagyon változékony részeket is (hypervariable region 1–7), amelyek szerotípusonként eltéréseket mutatnak. A csúcsi kapszomerekből egy-egy (aviadenovírusok esetében két) nyúlvány (fiber) ered, melyek hossza változatos, 9 és 77,5 nm közötti. A fiber három, azonos alegységből felépülő fehérje (homotrimer), amelynek szerkezete három részre osztható: feji (knob), nyél- (shaft), és farki (tail) régiókra. A vírus a sejtfelszíni receptorokhoz (ez a HAdV-2-nél a Cocksackie-adenovírus-receptor) a fiber disztális, feji részével kapcsolódik. A hemagglutinációért szintén a fiber felelős. A vírus DNS-sel komplexet adó proteinek (V, VII, X és terminális protein) alkotják a magot. A IIIa, VI, és VIII-as proteinek helyét csak valószínűsíteni lehet a virionban. A IIIa két monomerje valószínűleg áthatol a kapszidot alkotó hexonok élleinél. A VI-os proteinek gyűrűt formálnak a pentonokat körülvevő hexonok alatt. A VIII-as fehérje a hexon kapszid belső felületén helyezkedik el. A VI-os és VIII-as fehérjék felelősek a kapszid és a mag összekapcsolásáért (Russell, 2009).



2. ábra Az adenovírusok felépítésének sematikus rajza

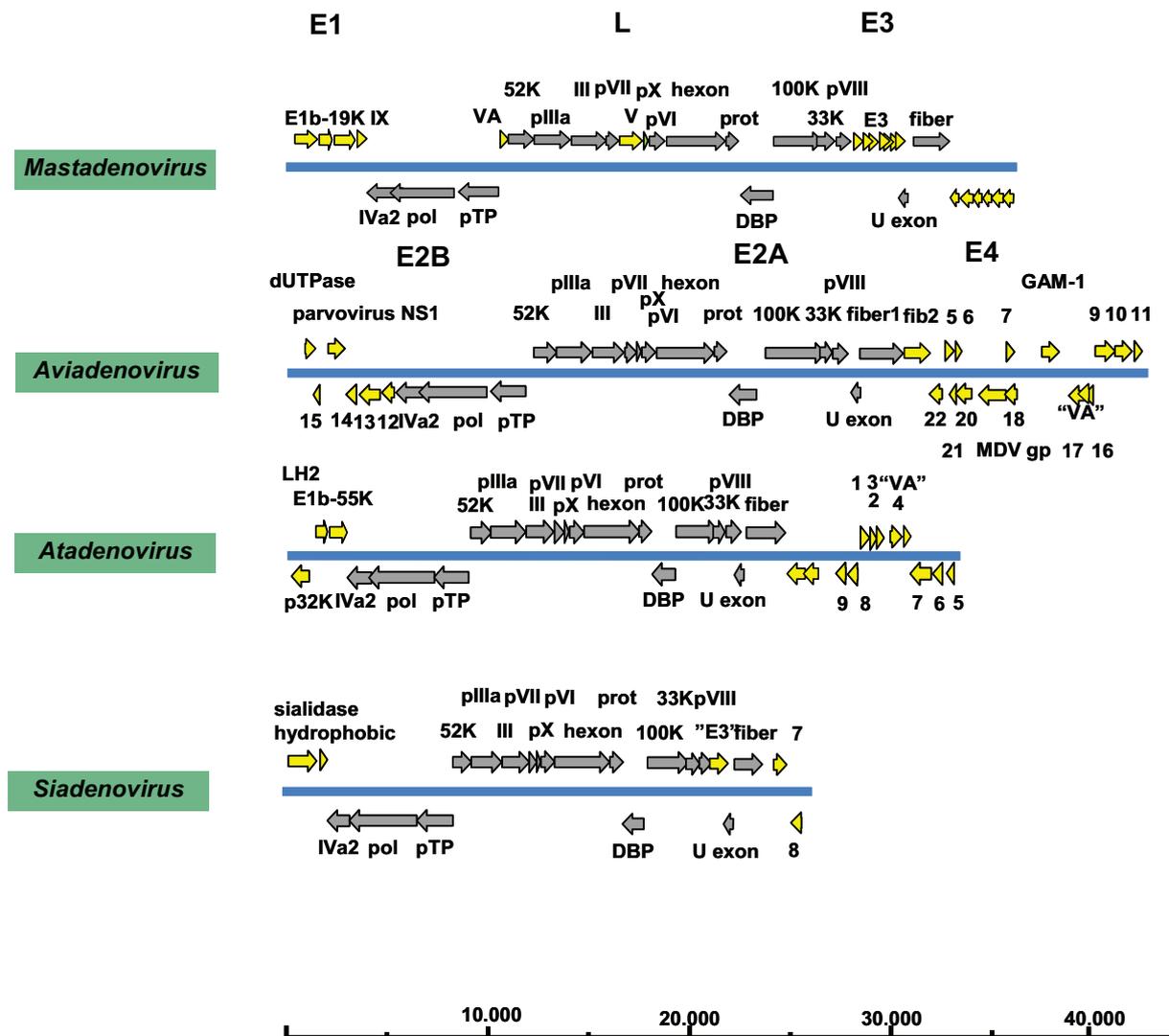
(http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1993/illpres/genes-in-pieces.html).

4.2.3. Az adenovírusok genomja

Az AdV-ok duplaszálú, lineáris genomjának mérete az eddig megismert típusoknál 26 és 45 ezer bp között mozog és általában nemzetségre jellemző. A legrövidebb a siadenovírusok (26 kbp) a leghosszabb az aviadenovírusok genomja (45 kbp). A teljes genomok G+C tartalma 33,7 és 67,6% közötti. A genom két végének szekvenciája azonos, ezeket fordított végismétlődéseknek nevezzük (ITR). Az eddig megismert ITR-ek hosszát 36 és 371 bp közöttinek találták. A DNS-molekula 5' végeihez kovalensen kötődik az úgynevezett terminális fehérje (TP) egy-egy példánya. Az AdV-ok DNS-ének mindkét szála kódol, ennek megfelelően megkülönböztetünk jobbra (rightward) és balra (leftward) átíró *r*- és *l*-szálat. Kifejeződésük időzítettsége szerint megkülönböztetünk korai és késői géneket, melyeket angol elnevezésük alapján E (early) vagy L (late) jelöléssel látunk el. Az AdV-ok genomja átlagosan körülbelül 40 proteint kódol. A fehérjék egy része prekurzorként keletkezik, és a vírus által kódolt proteáz dolgozza fel érett fehérjévé, az érintett proteinek (prekurzor fehérjék) a nevük előtti p betűvel vannak jelölve.

Az AdV-ok genomjának középső részét elfoglaló E2A és B, valamint az általában több transzkripciós egységre bontható L régió a család valamennyi nemzetségének tagjaiban jól megőrzött (Davison et al., 2003) (3. ábra). Az E2A a DNS-kötő fehérjét (DBP), az E2B pedig a TP-t, a replikációért felelős DNS-függő DNS-polimerázt, és a genom bepakolódását elősegítő IVa2 fehérjét kódolja. Az L régióban főként a viriont felépítő szerkezeti fehérjék génjei találhatóak. Ezek közül az V-ös protein csak a mastadenovírusokban található meg. A genom végein, amint azt a 3. ábra is szemlélteti, mind méret, mind tartalom szempontjából nemzetségenként jelentős eltéréseket mutató régiók találhatóak. Elnevezésük az eddig legbehatóbban tanulmányozott HAdV-ok alapján történik. Így az *r*-szálon, a genom bal végéhez közel eső régiót E1-nek, az *l*-szálon pedig, a jobb véghez közelit E4-nek is szokás nevezni. A mastadenovírusokban a pVIII és fiber gén között, szintén az *r*-szálon az E3 régió található. A többi nemzetségben ezeknek mindössze néhány homológja található meg, vagy egyáltalán nincs homológia a kódolt fehérjék között.

Az E1 és E4 korai régióknak a termékei a gazdasejt transzkripciós mechanizmusának megváltoztatásáért felelősek. Továbbá segítik a vírus replikációs komplex beindulását (E2) és gazdasejt védekező mechanizmusának kikerülésére hivatott E3 régió génjeinek kifejeződését.



3. ábra A négy elfogadott adenovírus nemzetség genomszerveződése. A szürke nyilakkal jelzett gének megőrzöttek minden eddig leírt adenovírusban (kivéve U exon). A sárga nyilak a nemzetség- illetve fajspecifikus ORF-eket jelölik (Benkő et al., 2005).

4.2.4. Az adenovírusok rendszertana

Munkám kezdetekor ismeretes volt, hogy a négy nemzetségbe sorolt AdV-ok mind genomszerveződésük szempontjából, mind pedig genetikai rokonsági viszonyaik alapján négy fő leszármazási vonalat képviseltek (Davison et al., 2003). Úgy tűnt, e csoportok (genusok) nagyjából megfelelnek a kétéltűekkel, hüllőkkel, madarakkal és emlősökkel feltételezhetően együtt fejlődött, egyes AdV leszármazási vonalaknak (Harrach, 2000). A koevolúciós képet néhány feltételezett gazdaváltás bonyolítja (Benkő & Harrach, 2003), melyek pontos megértéséhez ősbíró gerinces fajok (hüllők, kétéltűek, halak) további AdV-ainak vizsgálata látszott szükségesnek. A korai rendszerezés alapjául szolgáló, hagyományos, főleg szerológiai módszerek mellett ma már, ugyanúgy, mint a többi

víruscsalád esetében, az egyes taxonok megkülönböztetése szempontjából a genomszerveződés és a filogenetikai számítások eredményei döntő fontosságúvá váltak.

Egy adott speciesbe sorolt vírustípusok között, bár határozott szerológiai különbözőséget mutatnak, csak igen kis genetikai különbségek fordulnak elő. A jelenlegi rendszertani munka legnagyobb feladata, hogy a gyakran molekuláris szinten még nem is tanulmányozott állati izolátumokat miként lehetne helyesen fajokba csoportosítani.

Az AdV-ok és gerinces gazdáik közös törzspejlődésére vonatkozó elmélet szerint az egyes gazdák és a bennük kimutatott AdV-ok genetikai távolságai és viszonyai (amit törzsfá rekonstrukciókkal lehet szemléltetni) nagy hasonlóságot mutatnak (Benkő & Harrach, 2003). Az egyes nemzetségeken belül AdV fajokat különböztetnek meg, amelyeket a gazdafaj nevével és az ABC betűivel jelölnek, például *Bovine adenovirus A* (BAdV-A). Egy-egy vírushalmaz rendszerint több, szerológiailag elkülöníthető, arab számmal jelölt típust foglal magában (Benkő et al., 2005). A legtöbb vizsgált emlős- és madárfajban több AdV típus és faj, sőt akár több nemzetség tagjainak az előfordulását is megfigyelték.

Mind a négy nemzetség tagjai jól megkülönböztethetők a többi nemzetség tagjaitól szerológiai illetve filogenetikai vizsgálatokkal, és genomszerveződésük is egyedi sajátosságokkal bír.

A mastadenovírusok csak emlősöket fertőznek. A vírusok 56°C-on 10 percig tartó hőhatás során inaktiválódnak. Az eddig megismert AdV-ok genomjának mérete 30.536 és 37.860 bp közötti. A genomjuk G+C tartalma 43,6–63,9%. ITR-jük a leghosszabb a családban (93–371 bp). A már korábban említett V-ös protein mellett a IX-es is csak a mastadenovírusok genomjában található meg, melynek funkciója többrétű, szerkezeti fehérjeként is van szerepe és a késői fő promóter aktiválásában is részt vesz (Boulanger et al., 1979; Lutz et al., 1997). Az E3 és E4 régiók proteinjai a nemzetség különböző tagjai közt is nagymértékben eltérőek lehetnek (Belák et al., 1986). Az E4 régióban kódolt 34K protein megtalálható az összes eddig vizsgált mastadenovírus genomban. A legjobban tanulmányozott nemzetség, hiszen a humán AdV-ok is ide tartoznak, az ez idáig leírt a humán típusok száma 55 (Walsh et al., 2010). Habár a legújabban leírt típusokat egyesek vitatják, mert ezek némelyike korábban már leírt szerotípusok rekombinánsának tekinthető, pl. HAdV-53 és 55.

Aviadenovírusokat eddig csak madaraktól izoláltak illetve mutattak ki. Az általuk okozott fontosabb betegségek tipikus tünetei a magzárványos hepatitis, bronchitis, tüdőödéma, valamint szívburok vizenyősödés, melyeket különböző madárfajokból írtak le. Napjainkra négy aviadenovírus teljes genomját határozták meg, a fowl adenovirus 1 (FAdV-1) (Chiocca et al., 1996), FAdV-9 (Ojkic & Nagy, 2000), turkey adenovirus 1 (TAdV-1) (Kaján et al., 2010) és FAdV-8 (Grgic et al., 2011). Genomméretük nagyobbnak bizonyult, mint a mastadenovírusoké, 43.804–45.413 bp. G+C tartalmuk magas, 53,8 és 67,6% közötti.

Az ITR-ek hossza 54 és 95 bp közötti. A virionoknak két fibere van a csúcson. A FAdV-1 genomja (és valószínűleg az eredeti TAdV-1 is) két fiber gént kódol, a többi tyúk aviadenovírus viszont csak egyet, de géntermékük duplán található meg a vertexeken. A mastadenovírusoknál leírt E1 és E3 régiók hiányoznak genomjukból. Genomjuk jobb vége számos nyitott leolvasási keretet (ORF) tartalmaz. Ezek funkciója általában ismeretlen. Genomjuk bal végén tartalmaznak parvovírus nem strukturális proteinnel homológiát mutató gént több példányban is.

Atadenovírusokat sokféle gerinces gazdából izoláltak illetve mutattak ki PCR-rel, így kérődzőkből, madaraktól, pikkelyes hüllőkből (Squamata), sőt egy erszényesből is (Woods et al., 1996; Lehmkuhl & Cutlip, 1999; Lehmkuhl et al., 2001; Thomson et al., 2002; Wellehan et al., 2004). Borjakban tüdő- és bélgyulladást okoznak, de leírtak vérzéses-elhullásos járványokat is (Woods et al. 1996). Madaraknál az EDS okoz komoly gazdasági károkat. A virionok hőstabilak, képesek megtartani a fertőzőképességüket akár 30 percen át tartó 56°C-os hőkezelés után is. Az eddig szekvenált genomok mérete 29.576 és 33.213 bp közötti. Az ITR-ek hossza 46 és 118 bp közöttinek bizonyult. A kérődzőkből, erszényesekből, madaraktól kimutatott atadenovírusok G+C tartalma 33,6–43,0%. A nemzetség is erről az A+T gazdag genomról kapta a nevét. A későbbiekben vizsgált hüllő atadenovírusok G+C tartalma viszont kiegyenlített (50% körüli) (Wellehan et al., 2004; Farkas et al., 2008). Az eddig vizsgált atadenovírusok mindegyikében kimutattak a genom bal oldalán egy szerkezeti fehérjét kódoló gént, a p32K-t (Xu et al., 1997). Ugyancsak a nemzetség tagjaira jellemző gén az LH1, de ezt nem mindegyik vírusban sikerült megtalálni. Az LH3 is egy szerkezeti fehérjét kódoló gén, látszólag az atadenovírusokból hiányzó IX-es proteint helyettesíti a kapszid stabilizálásában.

Siadenovírusokat madaraktól, kétélűből és teknősből mutattak ki napjainkig. Jelenleg három elfogadott tagja van a nemzetségnek, a frog adenovirus 1 (FrAdV-1) (Davison et al., 2000), turkey adenovirus 3 (TAdV-3) (Pitcovski et al., 1998), mely a pulykák vérzéses bélgyulladását okozza és a raptor adenovirus 1 (RAdV-1), melyet ragadozó madaraktól (bagoly, ölyv) mutattak ki (Zsivanovits et al., 2006; Kovács et al., 2009). Genomjuk a családon belül a legrövidebb, 26.163 és 26.282 bp közötti, G+C tartalom 34,9 és 38,5%, míg ITR-jük hossza mindössze 29–39 bp. A megőrzött középső genomrészen kívül csupán öt nemzetség-specifikus gént tartalmaznak. A genom baloldalán egy, a bakteriális szialidázokkal homológ fehérjét kódoló gén található (innét kapta nevét a nemzetség). Ezt követi egy erősen hidrofób fehérjét kódoló ORF. A mastadenovírusok E3 régiójának helyén (pVIII és fiber gének között) egy ismeretlen funkciójú nemzetség-specifikus ORF helyezkedik el ("E3"). A genom jobb végén még további kettő, ismeretlen funkciójú ORF található.

4.2.5. Halakban előforduló AdV-ok

AdV-ok halakban történő megfigyeléséről eddig nagyon kevés közlemény jelent meg.

1975-től Japán partjainál magas mortalitással járó limfoleukémiát figyeltek meg egy tengeri sügérfélében (*Pagrus major*). Az elhullott halakban testszerte metasztatikus tumorokat és vérükben megnövekedett számú limfocitát és limfoblasztoid sejteket találtak. Ezek magjában elektronmikroszkóppal 78–83 nm átmérőjű adenovírus-szerű részecskéket figyeltek meg (Miyazaki et al., 2000).

AdV-ok jelenlétét valószínűsítették atlanti tőkehal (*Gadus morhua*) és közönséges lepényhal (*Limanda limanda*) epidermális hiperpláziájának elektronmikroszkópos vizsgálata során (Jensen & Bloch, 1980; Bloch et al., 1986).

Fehér tokban adenovírus-szerű részecskéket mutattak kis a 80-as években. Az érintett állományban fokozott mortalitást figyeltek meg, az elhullott halak bélcsatornájának hámfájában megnagyobbodott magvú sejteket azonosítottak. A vírust nem sikerült izolálni, de kísérletesen a betegséget sikerült reprodukálni. Az elhullott állatok homogenizált belső szerveiből készített oldatot juttattak be egészséges halakba intraperitoneálisan (Hedrick et al., 1985).

Japán angolna (*Anguilla japonica*) állományokban súlyos gazdasági károkat okoz Ázsiában a VECNE (viral endothelial cell necrosis of eel). Pár éve sikerült a betegségért felelős vírust izolálni, melyet AdV-nak vélték (Ono et al., 2007). Napjainkra a vírus teljes genomjának szekvenciája alapján azonban kiderült, hogy nem AdV-ról van szó, hanem valószínűleg egy új víruscsalád első képviselőjéről (Mizutani et al., 2011).

5. Anyag és módszer

5.1. A vírus törzsek és hal-minták

Munkám során összesen négy izolált vírustörzs DNS-ét vizsgáltam. Valamennyi vírust külföldön izolálták, különféle halfajokból, amint azt a 1. táblázatban bemutatom. Az amerikai törzseket, WSAdV-1 és SRWSHV (Snake river white sturgeon herpesvirus) felnőtt, tünetmentes, vadon élő fehér tokból izolálta Dr. Scott E. LaPatra, egy jelentős halgazdaság (Clear Springs Foods Incl., Buhl, Idaho) kutatási részlegének állatorvosa. A fehér tok lépéből készült, WSS-2 (white sturgeon spleen) elnevezésű, hám eredetű sejtvonalon (LaPatra et al., 2002) elszaporított vírus törzseket fagyasztott formában küldték a laboratóriumunkba.

Az ICHV-2 törzset Olaszországban izolálták (Alborali et al., 1996) fekete törpeharcsából. A vírust CCO (channel catfish ovary) sejtvonalon szaporították el. Az SbSHV törzseket (SK1/0406, SK2/0506 és BK/0506) Oroszországban izolálták lénai tokból SSO-2 (Siberian sturgeon pooled internal organs) sejtvonalon (Shchelkunov et al., 2009).

A hazai vizekből származó, tipikus pontyhimlős tüneteket mutató pontyból mintát vettünk a hámon keletkezett elváltozásból, a kopoltyúból, májból és veséből. A szintén hazai tógazdaságból, tömeges elhullást követően gyűjtött ezüstkárászból a hal belső szerveinek (lép, máj, vese) keverékét használtuk mintaként. Ezeket a vírusokat nem izoláltuk.

1. táblázat A vizsgált vírustörzsek

vírus	gazdafaj	szárm. hely	sejtvonal	referencia
AciHV-2 (SRWSHV)	Fehér tok (<i>Acipenser transmontanus</i>)	USA	WSS-2 (white sturgeon spleen)	Scott E. LaPatra, unpublished
ICHV-2	Fekete törpeharcsa (<i>Ameiurus melas</i>)	Olaszország	CCO (channel catfish ovary)	Alborali et al., 1996
SbSHV	Lénai tok (<i>Acipenser baeri</i>)	Oroszország	SSO-2 (siberian sturgeon pooled internal organs)	Shchelkunov et al., 2009
WSAdV-1	Fehér tok (<i>Acipenser transmontanus</i>)	USA	WSS-2 (white sturgeon spleen)	Scott E. LaPatra, unpublished

5.2. A virális DNS tisztítása

Az AciHV-2 és WSAdV-1 mintából háromszori lefagyasztás és felolvasztás után a keletkezett sejttörmeléket centrifugálással (10.000×g, 30 perc, SORVALL RC-5B Superspeed Centrifuge) ülepitettük, és az így feltisztított felülúszóból a virionokat ultracentrifugálással (SW-28-as rotor, 25.000 rpm, 100.000×g, 1,5 óra, 4°C, BECKMAN XL-90) koncentráltuk. A vírus üledéket 800 µl NTE pufferben (100 mM NaCl, 10 mM TRIS-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,9) szuszpendáltuk. Ez az eredeti térfogathoz képest kb. kétszázszoros koncentrációt jelentett.

Ezután fenolos DNS kivonást végeztünk 400 µl virion szuszpenzióból, amit 0,5% SDS és 1 mM EDTA jelenlétében, 2 órán át inkubáltuk 37°C-os vízfürdőben 50 µg/ml végkoncentrációjú Proteináz K enzimmel (Boehringer Ltd., Ingelheim, Németország). A mintához 400 µl, TE pufferrel telített fenolt (Sigma, St. Louis, MO. USA) adtunk, majd óvatos, de alapos elegyítés után 5 percig centrifugáltuk 6000 rpm sebességgel (3800×g) Eppendorf centrifugában (Centrifuge 5417C). A felső, vizes fázist új csőbe tettük, és még kétszer ismételtük a fenolos kezelést. Ezután a vizes fázisból a fenol nyomokat kétszeres mennyiségű kloroform (Reanal ZRt., Budapest, Magyarország) hozzáadásával távolítottuk el. A vizes fázist ismét tiszta csőbe tettük, és 1/10 mennyiségű, 3 M nátrium-acetát (NaAc), valamint 2,5-szeres mennyiségű, jéghideg abszolút etanol hozzáadásával precipitáltattuk a DNS-t egy éjszakán át, -20°C-on. A DNS-t centrifugálással (30 perc, 12.000 rpm, 15.000×g, Eppendorf Centrifuge 5417C) ülepitettük, 70%-os jéghideg etanollal mostuk, és rövid ideig vákuum centrifugában szárítottuk, majd 100 µl steril desztillált vízben oldottuk fel.

Az ICHV-2 törzset laboratóriumunkba liofilizálva küldték. A mintát rehidratáltuk 1 ml steril desztillált vízzel, rövid ideig forraltuk, majd -20°C-on tároltuk felhasználásig.

Az SbSHV kivont DNS-ét Whatman-papíron rögzítve küldték laboratóriumunkba. Ezt 250 µl steril desztillált vízzel kioldottuk (3 óra 4 °C-on), vákuum centrifugában 50 µl-re koncentráltuk és a mintát -20°C-on tároltuk.

A pontyból, illetve ezüstkárászból a szervmintákat 1 ml TE puffer (10 mM Trisz-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) hozzáadása után homogenizáltuk. Mikrocentrifuga-csőben a szervdörzsölék 100 µl mennyiségéhez 10 µl 10%-os Sarcosyl és 4 µl Proteinase K (20 mg/ml) (Boehringer Ltd., Ingelheim, Németország) oldatot adtunk, majd egy éjszakán át 55°C-on inkubáltuk. Ezután hozzáadtunk 300 µl guanidin-HCl (8 M) és 20 µl ammónium acetát (7,5 M) oldatot, és a csöveket 15 percenként megforgatva, 1 órán keresztül, szobahőmérsékleten inkubáltuk. A nukleinsavat 1 ml jéghideg (-20°C-os) abszolút etanol hozzáadásával csaptuk ki, majd 12 percen keresztül centrifugáltuk 12.000-es fordulatszámmal (15.000×g) hűthető Eppendorf (5415 R) centrifugában 4°C-on. A keletkezett üledéket a felülúszó leöntése után 1 ml jéghideg, 70%-os etanol hozzáadásával mostuk,

majd az előbbi beállítások szerint 5 percig újra centrifugáltuk. A felülúszó eltávolítása után a csapadékot rövid ideig szárítottuk, majd 50 µl steril desztillált vízben szuszpendáltuk.

5.3. Restriktációs endonukleázos emésztés

A vírus DNS-t (SRWSHV) *HindIII* és *PstI* restriktációs endonukleázzal hasítottuk a gyártó (Fermentas AG., Vilnius, Litvánia) által ajánlott pufferben 37°C-on. A keletkezett DNS-fragmentumok számának és méretének meghatározásához 1%-os agaróz (BRL) gélben elektroforézist végeztünk 90–110 V-os feszültséggel. A gél 0,5-szeres töménységű TBE (Tris-Bórsav-EDTA, pH 8,0) pufferben készült, és 0,5 µg/ml etidium-bromidot tartalmazott (Sambrook & Russel, 2001). A későbbiekben áttértünk a GelRed (Biotium Inc., Hayward, CA. USA) gélfesték alkalmazására, mely nem veszélyes az egészségre. A mintafelvivő puffer 2,5 mg/ml brómfenolkéket és 400 mg/ml szacharózt tartalmazott (Sambrook & Russel, 2001). Az elektroforézist követően a gélt 302 nm hullámhosszúságú UV átvilágító lámpán (Appligene Oncor Ltd., Illkirch, Franciaország) digitális kamerával (Kodak DC120 Zoom) fényképeztük. Molekulatömeg-standardként (M) *PstI* enzimmel hasított lambda fág DNS-t (Fermentas AG., Vilnius, Litvánia), vagy GeneRuler DNA Ladder Mix-et (Fermentas AG., Vilnius, Litvánia) használtunk.

5.4. Molekuláris klónozás

A virális és plazmid (pBluescript KS; Stratagene Ltd., Santa Clara, CA, USA) DNS-t *HindIII* illetve *PstI* enzimmel emésztettük, kis mennyiségben gélelektroforézissel ellenőriztük, majd NaAc és etanol hozzáadásával precipitáltuk és 10 µl desztillált vízben vettük fel. Az így tisztított DNS-oldatok töménységét agaróz gél elektroforézissel ellenőriztük, és ennek alapján a ligáláshoz a vektort és inszertet megközelítőleg 1:4 arányban használtuk. A ligálási reakciót 15 µl végtérfogatban végeztük T4 ligáz enzim (NEB Inc., Ipswich, MA. USA) és puffer hozzáadása után egy éjszakán át 16°C-on. A reakcióelegy 2–5 µl-nyi mennyiségével XL-1 Blue, JM109 vagy TOP10 jelzésű *E. coli* törzset transzformáltunk. A DNS-t vagy elektroporációval juttattuk be az elektrokompetens baktériumsejtekbe (BioRad Inc., Richmond, CA. USA, elektroporációs készülék, 25 µF, 2,5 V és 200 Ω paraméterekkel) vagy hősokk alkalmazásával (Sambrook & Russel, 2001). Némely esetben TransformAid™ (Fermentas AG., Vilnius, Litvánia) módszerrel végeztük a transzformálást a gyártó használati utasítása szerint. A baktériumokat ampicillin tartalmú LB agar (Sambrook & Russel, 2001) lemezeken szélesztettük. A táptalajt X-gallal (Sigma, St. Louis, MO. USA) és IPTG-vel (izopropil-tiogalaktózidáz) egészítettük ki a β-galaktózidáz aktivitás kimutatása céljából. A baktériumokat 37°C-on egy éjszakán át inkubáltuk. A fehér színű telepeket 3 ml ampicillin

tartalmú folyékony LB tápoldatba oltottuk, és egy éjszakán át rázattuk 37°C-on. Alkálikus mini preparálással tisztítottuk a plazmid DNS-t (Sambrook & Russel, 2001). A baktérium tenyészetekből 1,5 ml-t mikrocentrifuga-csőbe öntöttünk, majd 6000 rpm (3800×g) fordulatszámmal centrifugáltuk 30 mp-ig Eppendorf centrifugában (Centrifuge 5417C). Ezután a felülúszót eltávolítottuk, és az üledéket 100 µl TEG oldatban (25 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA, 50 mM glükóz) vortex segítségével alaposan szuszpendáltuk. A mikrocentrifuga-csövekhez ezután 200 µl frissen készített NaOH (0,2 M) és SDS (1%) tartalmú oldatot adtunk. Óvatos keverés után a csöveket 5 percig jégen tartottuk, majd 150 µl jéghideg KAc oldatot (3 M kálium-acetát, 2 M tömény ecetsav, pH 4,9) adtunk a csövekhez, amelyeket kíméletes összekeverés után ismét jégre tettünk 10 percre. Ezen idő letelte után centrifugáltuk a csöveket (12.000 rpm, 15.000×g, 10 perc), és a felülúszót új csövekbe öntöttük át. Ehhez 900 µl szobahőmérsékletű, 96%-os etanolt adtunk, összekevertük, és centrifugálással üleptítettük (12.000 rpm, 15.000×g; 10 perc) a kicsapódott plazmid DNS-t. Ezt 70%-os etanollal mostuk, és vákuumcentrifugában (Speed-Vac) 5 percig szárítottuk. A DNS-t 40 µl desztillált vízben oldottuk fel, mely 20 µg/ml RNáz-t (Fermentas AG., Vilnius, Litvánia) tartalmazott. A mintákból 1–1 µl-t vizsgáltunk elektroforézissel 1%-os agaróz gélen. A molekulatömeg markerhez viszonyítva méretnövekedést mutató klónokat a klónozó enzimmel (*HindIII* illetve *PstI*) hasítottuk, és így határoztuk meg a klónozott inszert méretét.

A későbbiekben, a PCR-ekkel felerősített DNS-fragmentumokat CloneJet (Fermentas AG., Vilnius, Litvánia) kittel klónoztuk a gyártó utasítása szerint. A kit öngyilkos plazmidokat tartalmaz, csak azok a baktériumok nőnek az ampicilines táptalajon melyek inszertet tartalmazó plazmidot hordoznak, így a kék-fehér szelekcióra nincs szükség.

5.5. Polimeráz láncreakció

5.5.1. Primer tervezés

Alapvetően kétféle PCR primert használtunk, specifikusat és konszenzus, degenerált primereket. A véletlenszerű klónozással nyert genom fragmentumok közötti szakaszok amplifikálásához a primereket, illetve a "primer walking" során használt szekvenáló primereket a már kezünkben lévő szekvenciák alapján terveztük. Ehhez a primereket a Primer Designer Version 2.0 (Scientific and Education Software) program segítségével úgy terveztük, hogy megfelelő legyen a G+C tartalmuk és ezáltal az olvadási hőmérsékletük (T_m). A program azt is ellenőrzi, hogy a primer molekulák ne alkossanak hurkot, illetve ne legyenek önmaguk vagy primer párjuk komplementerei. A WSA_{AdV-1} esetében, a genom már meghatározott szekvenciájú középső részének jobb és bal végétől, kifelé induló primereket, valamint a nem egyértelmű szekvenciák ellenőrzésére szolgáló primereket is ellenőriztük a

programmal. Az AciHV-2, IchiV-2 és SbSHV DNS-polimeráz és terminális transzferáz génjeinek felerősítését konszenzus primerekkel (2. táblázat) oldottuk meg (Dospoly et al., 2008; Dospoly et al., 2010; Dospoly et al., 2011a). A primerek tervezését a GenBank CyHV, IchiV, RaHV és SaHV adatai alapján végeztük. A primereket az egyes fehérjék aminosav (as) sorrendjének pozicionális illesztése (alignment) alapján terveztük. A többszörös illesztést a MultAlin programmal (Corpet, 1988) az INRA szerverén on-line végeztük (<http://toulouse.inra.fr/multalin.html>). Olyan rövid megőrzött motívumokat kerestük, melyek a legkevesebb kodonnal rendelkező aminosavakból álltak.

A hal-HV-ok általános kimutatására javasolt, szintén konszenzus primerekkel működő PCR-t használtuk a CyHV-1 és 2 amplifikálásához. A primerek az alloherpeszvírusok (AHV) DNS-függő DNS polimeráz génjéből egy kb. 450 bp méretű, erősen megőrzött szakasz felszorzozását segítik elő (Kelley et al., 2005).

2. táblázat Saját tervezésű konszenzus primerek (a többféle nukleotidot tartalmazó pozíciók jelölésére az IUPAC által ajánlott rövidítéseket alkalmaztam)

felderősített szakasz	Primerek szekvenciája
SbSHV polimeráz gén (277 bp)	outer forward: 5'-AAG GSV CAG ATT YTC ATG-3' outer reverse: 5'-TCA CRW ASC CBC CYC TCC-3' inner forward: 5'-GAY ATG ATG TAY GTG TGY AA-3' inner reverse: 5'-ACM CCY CGK GTG TGY GCG GC-3'
SbSHV és IchiV-2 termináz gén (258 bp)	forward: 5'-TTY CAR BTN GAR YTN ATG MGN GG -3' Reverse: 5'-TGN GCY TGN ACN ACD ATN TCD AT -3'
AciHV-2 és IchiV-2 polimeráz gén (1643 bp)	forward: 5'-TTY GAY ATH GAR ACN ATH CT-3' reverse: 5'-TTN GYR CAN AYY TTC ATY TC-3'
AciHV-2 termináz gén (253 bp)	forward: 5'-CCN GGN ATG ATG TGY CCN TG-3' reverse: 5'-TGN GTN CCR TTN GCR TAN GTN GG-3'

N= A/T/G/C; S= G/C; W= A/T; Y= C/T; M= A/C; R= A /G; K= G/T; B= C/G/T; V= A/C/G;

D= A/G/T; H= A/C/T

Az SbSHV DNS-polimeráz génjére a 3. táblázatban található specifikus primereket terveztük diagnosztikai céllal.

3. táblázat Az SbSHV DNS-polimeráz génjére tervezett diagnosztikai primerek

felderősített szakasz	primerek szekvenciája
SbSHV polimeráz gén	outer forward: 5'-CAA CAA GGC TCG GTT AGA TGC TGG-3' outer reverse: 5'-CTT GAG AGA TAC GCT GGT GTC AGA-3' inner forward: 5'-GGC GGT TGG CAA CTT ACA CAA TTC-3' inner reverse: 5'-AGG CTG TGC TGG ATC ACT CCT GTC-3'

5.5.2. PCR körülmények optimalizálása

A PCR-eket PTC-200 DNA Engine Gradient Cyclers (MJ Research Inc., Watertown, USA) vagy Tpersonal (Biometra Ltd., Göttingen, Németország) gépeken végeztük. A reakciókat 200 µl-es PCR csövekben végeztük el. A programok során a hőmérsékletváltozás sebességét jelző ramp értéke mindvégig 1°C/másodperc volt. A megfelelő annealációs hőmérsékleteket gradiens PCR segítségével határoztuk meg.

Az SRWSHV DNS-polimeráz génjének amplifikációja során FailSafe™ (Epicentre Ltd., Madison, WI, USA) polimerázt használtunk. A reakcióelegy végtérfogata 50 µl volt, mely a következő összetevőkből állt: 25 µl FailSafe™ PCR 2× Premix F puffer, 17,5 µl desztillált víz, 1-1 µl primer (50 µM), 0,5 µl FailSafe™ PCR enzim Mix és 2 µl minta DNS (Dospoly et al., 2008).

Az összes többi esetben a PCR-ekhez Phusion DNS-polimeráz enzimet (Finnzyme Ltd., Espoo, Finnország) használtunk. Az 50 µl végtérfogatú reakcióelegy a következő összetevőkből állt: 34 µl desztillált víz, 10 µl 5× Phusion puffer (Finnzyme Ltd., Espoo, Finnország), 1,5 µl dNTP (10 mM) oldat, 1–1 µl primer (50 pmol/µl), 0,5 µl Phusion DNS-polimeráz enzim (Finnzyme Ltd., Espoo, Finnország) és 2 µl minta DNS-oldat. A WSA_{Adv}-1 esetében alkalmazott egykarú PCR-ek során, mivel csak 1 µl primert használtunk, a reakcióelegy 35 µl desztillált vizet tartalmazott. Valamennyi PCR program paramétereit a 4. táblázat foglalja össze.

A PCR termékeket 1%-os agaróz gél-elektroforézissel vizsgáltuk. A pozitív reakciók termékeit a QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen Ltd., Düsseldorf, Németország) segítségével tisztítottuk, majd klónoztuk.

4. táblázat A PCR programok paramétereit

Folyamat	Hőmérséklet	Időtartam	Ciklusszám
Kezdeti denaturáció	98°C	5 perc	1
Denaturáció	98°C	30 másodperc (mp)	
Primer tapadás	46°C/68°C	30–60 mp	45
Szintézis	72°C	1–6 perc	
Terminális szintézis	72°C	3–10 perc	1

A szintézis időtartama a felerősíteni kívánt szakasz hosszától függött: 30 s/1000 bp; primer tapadás hőmérséklete: konszenzus primerek alkalmazásakor 46°C, specifikus primerek esetében 68°C.

5.6. WSA_{AdV}-1 genom végének meghatározása

Az AdV-ok DNS-szálainak 5' végéhez kapcsolódó terminális fehérje általában megakadályozza a végfragmentumok tompa végként történő klónozását. Ezért, az alábbi módszerrel próbáltuk meghatározni a genomvégek DNS-szekvenciáját. A genomvégekhez legközelebbi ismert szekvencia alapján tervezett, "kifelé" (a DNS vége felé) irányuló primerrel egykarú PCR-t végzünk, majd a keletkezett egyszálú termékhez RNS-ligázzal ismert oligonukleotidot kapcsolunk. Ezután hagyományos PCR-t végzünk (a második primer a kapcsolt oligonukleotidhoz kötődik) és a dupla szálú terméket klónozzuk, szekvenáljuk. Az eltervezett eljárás alkalmazása során azonban azt tapasztaltuk, hogy már az egykarú PCR termékei között is gyakran előfordulnak duplaszálú DNS-molekulák. Ezek szekvenciáit meghatározva, kiderült, hogy az egyetlen alkalmazott primer bekötött az ellenkező oldalon is, nem specifikusan, és ez eredményezte a duplaszálú DNS-t. Ezt kihasználva, ilyen egykarú (egy primert alkalmazó) PCR-rel sikerült több ezer bp szekvenciáját meghatározni, az ismert középső genomszakasz felől mind a két oldalon. Mikor a genom bal oldalán az újabb és újabb PCR-ek nem eredményeztek több terméket, az 5'/3' RACE Kit-et (Roche Ltd., Basel, Svájc) alkalmaztuk a gyártó utasításai szerint, mely a duplaszálú DNS szálainak 3' végére poli-A farkat épít, így egy kifelé mutató specifikus primerrel és oligo-T primerrel sikerült a genom bal végének felerősítése.

Ezzel párhuzamosan próbálkoztunk a végfragmentumok véletlenszerű molekuláris klónozásával is. A WSA_{AdV}-1 genomját Repli-g Mini Kit-tel (Qiagen Ltd., Düsseldorf, Németország) amplifikáltuk a gyártó cég utasításai alapján. Ez a módszer a reakcióelegyben található összes DNS-t amplifikálja nem specifikus hexamerekkel. A keletkezett termékek átlagos hossza 2–8 kbp. Feltételeztük, hogy a genom végek is felerősödnek, és az újonnan képződő molekulák nem tartalmazzák a terminális fehérjét. A már megismert genomszekvencia bal oldalához legközelebbi restriktív enzim vágáshely *SacI* volt, így ezzel az enzimmel hasítottuk az amplikonokat. A fragmentumokat *SacI* és *EcoRV* (tompá véget eredményező) enzimmel vágott plazmidba (pBluescript KS; Stratagene Ltd., Santa Clara, CA, USA) ligáltuk az 5.4. fejezetben leírtak szerint. Majd 30 inszertet tartalmazó klón szekvenciáját meghatároztuk.

Miután a genom bal végének szekvenciáját meghatároztuk, a feltételezett ITR szekvenciára primert terveztünk, és hagyományos PCR-rel felerősítettük a genom jobb végét is. Ellenőrzésképpen az 5'/3' RACE Kit-tel (Roche Ltd., Basel, Svájc) is megerősítettük, hogy valóban a genom jobb végét sikerült meghatározni.

Az említett módszereken felül, az AdV-okból eddig meghatározott összes ITR szekvencia alapján tervezett, konszenzus primerekkel is megpróbáltuk felerősíteni az ismert hal-AdV genomrész és az ITR közötti szakaszt.

5.7. DNS szekvenálás

A PCR termékeket a PCR primerekkel közvetlenül szekvenáltuk, hogy meggyőződjünk arról, hogy a kívánt szakaszt erősítettük-e fel és egynemű-e a termék. A nagy méretű, vegyes, illetve közvetlenül nem szekvenálható fragmentumokat plazmidokba ligáltuk és DNS-szekvenálási reakciót az alkalmazott klónozó vektortól függően T3 és T7, vagy PJETfo és PJETre primerrel kezdtük, BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems Ltd., Warrington, Egyesült Királyság) alkalmazásával a gyártó utasításai szerint. 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-fragmentumot több lépésben. Az elektroforézist automata DNS-szekvenálón (ABI Prism® 3100; Applied Biosystems Ltd., Warrington, Egyesült Királyság) az MTA Szegedi Biológiai Központban illetve a gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézetben végezték, és az eredményeket elektronikus levélben kaptuk meg.

5.8. Szekvencia analízis, filogenetikai számítások

A DNS-szekvenciák azonosítását homológia kereső programok, BLASTX és BLASTN (Altschul et al., 1990) segítségével on-line végeztük a National Center for Biotechnology Information (NCBI) adatbankjában (GenBank) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). A szekvenciákat a Staden program csomag (Staden, 1996) használatával állítottuk össze (<http://staden.sourceforge.net>).

A filogenetikai számításokhoz a GenBankból kivett homológ aminosav szekvenciákat FASTA formátumban összeállítottuk, majd az illesztést (alignment) a MultAlin (Corpet, 1988) (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin>) illetve a BioEdit (Hall, 1999) programmal végeztük (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit>). A filogenetikai számításokat a legnagyobb valószínűség (maximum likelihood) becslési módszerrel, távolsági mátrix (distance matrix) módszerrel, illetve Bayesian statisztikával is elvégeztük. Az első esetben a számításokat és törzsfa-rekonstrukciót a PHYLIP program csomag (Felsenstein, 1989) felhasználásával, illetve on-line a Pasteur Institute (Paris) Mobylye honlapján (<http://mobylye.pasteur.fr>) végeztük. A távolsági mátrix analízishez a PROTDIST (Jones–Taylor–Thornton mátrix), a törzsfa készítéshez pedig a FITCH programot használtuk (global rearrangements funkcióval). A törzsfa topológiáját bootstrap analízissel vizsgáltuk. Ehhez a távolsági mátrix számítás megelőzően a SEQBOOT programmal 1000 mintát vettünk a szekvencia-illesztésből, majd a távolsági számítás után a CONSENSE programmal megnéztük, hogy a kapott 1000 fából hány egyezik meg. A legnagyobb valószínűség becslési módszernél PhymI programot

használtuk WAG as szubsztitúciós modellel (1000 mintavétel) a Mobylye honlapján. Bayesian statisztikához MrBayes programot alkalmaztuk (Huelsenback & Ronquist, 2001) a TOPALi v2.5 program csomagból (Milne et al., 2004) (<http://www.topali.org>) a következő paraméterekkel: független futtatások száma: 4, generációs szám: 1 millió, mintavételi sűrűség 10, "burn in" 25%, WAG as szubsztitúciós modellt alkalmazva. A filogenetikai fák megjelenítéséhez a TreeView 1.5.2 programot vettük igénybe (Page, 1996). Az ORF-ek azonosításához az FgenesV (<http://linux1.softberry.com>) és JavaScript DNA Translator 1.1 (<http://nbc11.biologie.uni-kl.de/framed/left/menu/auto/right/JDT>) programokat használtuk on-line. A megőrzött domének keresését az InterProScan programmal on-line végeztük (<http://ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan>).

6. Eredmények

6.1. Fehér tok-herpeszvírus

6.1.1. Genomszerveződés

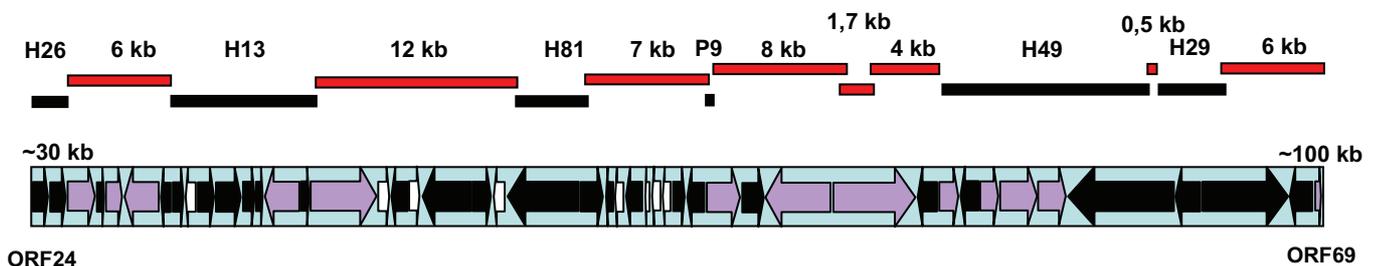
A fehér tok-herpeszvírus, azaz az AciHV-2 genomjának középső részén 66.037 bp hosszúságú szakasz nt sorrendjét határoztuk meg. A véletlenszerű klónozás során öt *HindIII* és egy *PstI* klón bizonyult egyértelműen virális eredetűnek (4. ábra). Az így nyert szakaszok hossza 20.746 bp. A klónozott fragmentumok mérete 500 és 10.000 bp között változott. A klónok kb. félének (mintegy 10.000 bp) szekvenálását elvégeztük már egy másik egyetemi hallgatóval szakdolgozatunk során (Somogyi, 2004; Doszpoly, 2005). Konszenzus primerekkel a DNS-függő DNS-polimeráz (továbbiakban DNS-polimeráz) génből (ORF57+58) 1643 bp hosszúságú szakaszt sikerült felerősíteni. Ezt a PCR-t izolált, de még nem karakterizált AHV-ok elsődleges vizsgálatára terveztük (Doszpoly et al., 2008). A termináz gén ATP-áz alegységének (továbbiakban termináz) második exonjából (ORF69) szintén konszenzus primerekkel egy 253 bp hosszú szakaszt erősítettünk fel. A véletlenszerű klónokat, illetve a két, konszenzus primerekkel nyert szakaszt hét PCR termékkel kötöttük össze. A PCR-rel felerősített fragmentumok hossza 500 és 12.000 bp közötti volt (4. ábra). Az így nyert DNS-szakaszokat összeillesztettük, és a teljes nt szekvenciát, valamint az ORF-ek által kódolt fehérjék as szekvenciáit a GenBankban elhelyeztük (FJ815289). A teljes szakasz (66.037 bp) G+C tartalma 38%-nak bizonyult. A szakasz 46 feltételezett ORF-et tartalmaz, amennyiben minden 100 as-nál hosszabb fehérjét elfogadunk. Ezek közül 38 ORF egyértelmű homológiát mutat az IChV-1 ezen szakaszán található génekkel (24–72%-os as azonosság). Ezeknek az ORF-eknek irányultsága és pozíciója megegyezik az IChV-1 homológ ORF-jeivel, és méretükben sem mutatnak nagy eltéréseket. Az AciHV-2 genom vizsgált középső szakasza tartalmazza azt a 12 ORF-et is, melyek az eddig megismert, teljes AHV genomok mindegyikében megtalálhatók (van Beurden et al., 2010). A további 8 ORF nem mutat egyértelmű homológiát semmilyen eddig leírt HV ORF-fel sem. A 4. ábrán látható az AciHV-2 genom középső részének térképe, az 5. táblázat tartalmazza az azonosított ORF-eket. Az IChV-1-gyel homológ ORF-ek ugyanazt a számot kapták, mint az IChV-1 genomjában. Az egyedi, csak az AciHV-2-ben található ORF-ek számozását 80-tól kezdtük (balról jobbra haladva), ugyanis az IChV-1 (az *Ictalurivirus* nemzetség egyetlen tagja, melynek teljes genomszekvenciája ismeretes) 79 különböző ORF-et tartalmaz.

Akárcsak az IChV-1 genomjában, poliadenilációs szignálokat általában nem egyes ORF-ek után találunk, hanem 2–4, azonos irányban átíródó ORF után. A szignálok szekvenciája a következő volt: AATAAA, ATATAA, AGATAA. A 46 ORF közül, mindössze

háromnál nem sikerült a poliadenilációs szignált azonosítanunk. Ezek egyike az ORF62, melynek mRNS-e feltehetően splicing mechanizmuson megy keresztül (5. ábra), akárcsak az IchiV-1 genomjában (Davison, 1992), az intron 16501 bp hosszú. A másik két ORF (52 és 81) esetében nem találtunk splicing-ra utaló jeleket. A DNS-polimeráz génben egy feltételezett splicing helyet azonosítottunk, az intron 94 bp hosszúságú (6. ábra).

Feltételezett szignál-peptideket találtunk a következő fehérjék N-terminális végén: ORF31, 33, 38, 40, 45, 46, 47, 63, 86, 87 és 88. Bizonyos fehérjékben különböző számú transzmembrán régiót lehetett azonosítani. Az ORF26, 46 és 62 által kódolt fehérjékben egy, az ORF65 által kódoltban három, míg az ORF59, 86, 87, 88 feltételezett fehérje termékeinek mindegyikében négy transzmembrán régiót mutattunk ki.

A genomvizsgálat során két nem tökéletes ismétlődő régiót találtunk. Az ORF39-et tartalmazó régióban egy 18 nt hosszúságú szakasz ismétlődik ötször, a 9. pozícióban az első kettőben citozin, a további háromban timin található. Az ORF44 és 83 közötti nem kódoló régióban pedig egy 108 nt hosszúságú szakasz ismétlődik kétszer, mindössze két nt eltéréssel.



4. ábra Az AcicHV-2 genom középső, általunk elemzett részének térképe. Lila nyilak jelölik azokat az ORF-eket, melyeknek homológjai minden teljesen végigszekvenált AHV-ban megtalálhatóak. Fekete nyilakkal azok az ORF-ek vannak jelölve, melyeknek homológjai az IchiV-1 genomban megtalálhatóak. Fehér nyilakkal, a csak az AcicHV-2 genomjában azonosított ORF-eket jelöltük. A genomtérkép fölött a véletlenszerű klónok és PCR termékek vannak feltüntetve. A fekete vonalakkal jelzett véletlenszerű klónok száma fölött a H a *HindIII*, míg a P a *PstI* klónokat jelöli. A piros vonalakkal jelzett PCR ampliconok fölötti jelzés, azok hosszára utal.

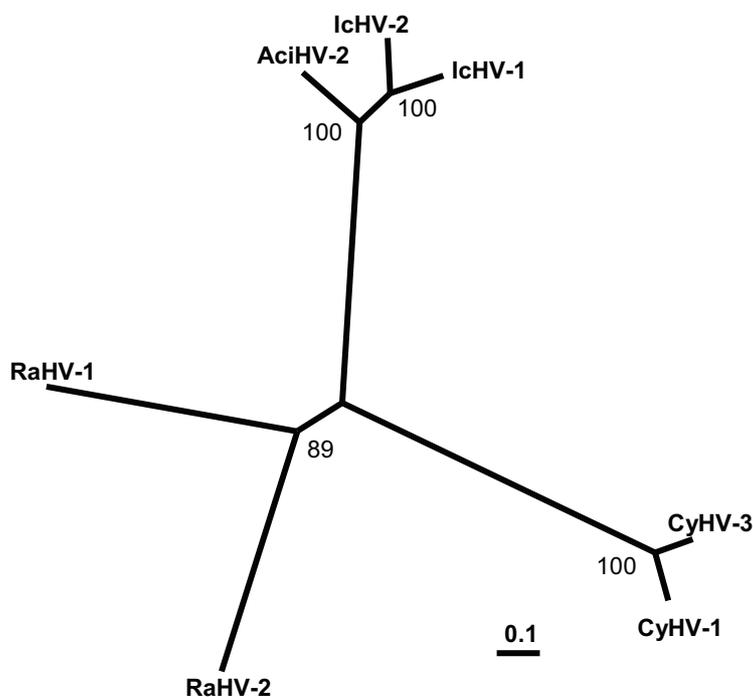
ORF81		209	–	–	–	–	–
ORF41		296	36%	–	–	–	–
ORF82		192	–	–	–	–	–
ORF43		888	43%	–	–	ORF58	ORF84
ORF44		332	45%	–	–	ORF59	ORF85
ORF83		203	–	–	–	–	–
ORF46	membrán glikoprotein	1293	41%	–	ORF99	ORF46	ORF72
ORF47	peptidáz	404	31%	–	–	–	–
ORF48		138	26%	–	–	–	–
ORF84		159	–	–	–	–	–
ORF49	dUTP-áz	294	44%	ORF5	ORF123	–	ORF142
ORF85		71	–	–	–	–	–
ORF86		150	–	–	–	–	–
ORF87		139	–	–	–	–	–
ORF52		211	37%	–	–	–	–
ORF53	kapszid triplex protein 1	313	38%	–	–	ORF76	ORF114
ORF54		608	38%	ORF82	ORF61	ORF75	ORF113
ORF55		397	33%	–	–	ORF74*	ORF112*
ORF56		1182	47%	ORF98	ORF107	ORF73	ORF111
ORF57	DNS-polimeráz	1495	53%	ORF55	ORF79	ORF72	ORF110
ORF59	fő burokfehérje	358	27%	–	–	ORF83*	ORF117*
ORF60		348	40%	ORF52	ORF80	ORF84	ORF118
ORF61		324	31%	–	–	ORF85*	ORF119*
ORF62	termináz első exonja	324	63%	ORF10	ORF33	ORF42	ORF68
ORF63	primáz	672	41%	ORF21	ORF46	ORF87	ORF121
ORF64		500	41%	ORF22	ORF47	ORF88	ORF122
ORF65	tegument fehérje	1927	28%	–	ORF62*	–	–
ORF66		453	37%	–	–	–	–
ORF67		1558	31%	–	–	–	–
ORF68		415	37%	–	–	ORF44*	ORF70*
ORF69	termináz második exonja	108 (részleges)	72%	ORF10	ORF33	ORF42	PRF68

Szürkével kiemelve a minden eddig vizsgált AHV-ban megőrzött ORF-ek. Jelölések:

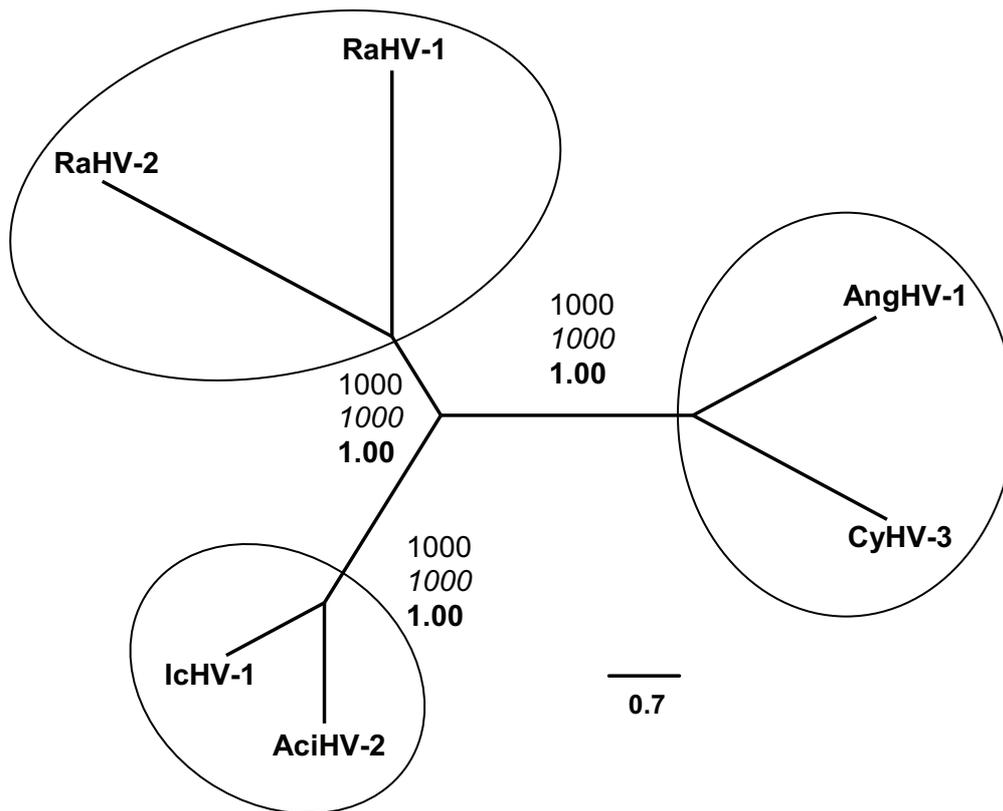
*: Alig felismerhető hasonlóság. +: Pozicionális megfelelők. –: Nincs felismerhető homológia.

6.1.2. Filogenetikai analízis

Filogenetikai számításokat végeztünk az *Alloherpesviridae* családban megőrzötnék bizonyult génekkel. Különböző módszerek (távolság mátrix, legnagyobb valószínűség elve, Bayesian statisztika) alkalmazásával is, minden esetben azonos fa topológiát kaptunk magas statisztikai valószínűségekkel alátámasztva. A törzsfa-rekonstrukció azt mutatja, hogy az AciHV-2 a két ictalurid halfajból izolált vírussal (IcHV-1 és 2) közeli rokonságban áll (7. ábra), ami alapot ad az IcHV-1-gyel való közös nemzetségbe sorolásához. A 8. ábrán bemutatott filogenetikai számítás alapjául 11 teljes ORF-ből összeállított 6996 as-at tartalmazó szakasz szolgált. Ezek az ORF-ek megőrzöttek mind az öt AHV-ban, melyeknek teljes genomszekvenciája ismeretes. A törzsfa-rekonstrukció jól mutatja, hogy az *Alloherpesviridae* családnak három jól elkülönülő csoportja van, a cyprinivírusok, a batrachovírusok és az ictalurivírusok.



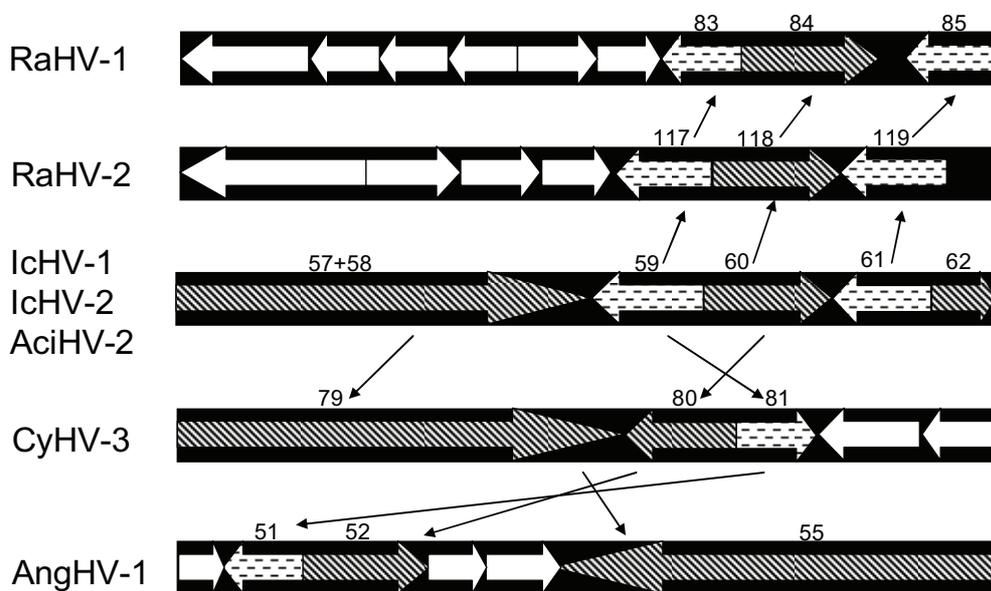
7. ábra A DNS-polimeráz 501 as-ának pozicionális illesztését követő, távolsági mátrix-szal (JTT modell) számított, gyökértelen törzsfa. A magas bootstrap értékek alátámasztják a fa topológiáját. Rövidítések: AciHV-2: acipenserid herpesvirus 2; CyHV-1: cyprinid herpesvirus 1; CyHV-3: cyprinid herpesvirus 3; IcHV-1: ictalurid herpesvirus 1; IcHV-2: ictalurid herpesvirus 2; RaHV-1: ranid herpesvirus 1; RaHV-2: ranid herpesvirus 2 (Dospoly et al., 2008).



8. ábra 11 teljes ORF-ből származtatott (6996) as szekvenciáján alapuló, Bayesian statisztikával (WAG as szubsztitúciós modell) készített filogenetikai számítás, melyet az egyes proteinek pozicionális illesztése után egyesítettünk. A számításokat távolság mátrix (Categories modell) és legnagyobb valószínűség elve (WAG as szubsztitúciós modell) módszerekkel is elvégeztük. Ezen módszerekkel kapott törzsfák topológiája lényegében megegyezett a Bayesian statisztikával számítottal. A magas statisztikai valószínűségek alátámasztják a fa topológiáját (kiemelés nélküli számokkal a távolság mátrix, dőlttel a legnagyobb valószínűség, félkövérrel a Bayesian statisztikához tartozó statisztikai értékek vannak feltüntetve). Rövidítések: AciHV-2: acipenserid herpesvirus 2; AngHV-1: anguillid herpesvirus 1; CyHV-3: cyprinid herpesvirus 3; IcHV-1: ictalurid herpesvirus 1; RaHV-1: ranid herpesvirus 1; RaHV-2: ranid herpesvirus 2.

6.2. IcHV-2 és SbSHV

A fekete törpeharcsa-HV-ból (IcHV-2) konszenzus primerekkel felerősítettünk egy 1640 bp hosszú szakaszt a DNS-polimerázból, illetve egy 262 bp hosszúságút a terminázból. Majd a két szakasz szekvenciája alapján tervezett, specifikus primerekkel felerősítettük a közöttük lévő genomfragmentumot is. Összesen 7982 bp szakasz nt sorrendjét határoztuk meg és helyeztük el a GenBankban (FJ815290). A szakasz G+C tartalma 51,9%. Ez a szakasz tartalmazza az IcHV-1 ORF(57+58), 59, 60, 61 és 62 homológjait. Az ORF(57+58) a DNS-polimeráz génje az ORF62 pedig a termináz első exonja, az ORF59 feltételezett burok fehérje. Az ORF60 funkciója ismeretlen, de megőrzött több AHV-ban is. Szintén ismeretlen funkciójú az ORF61. A felerősített génblokk sematikus térképe a 9. ábrán látható, mely összehasonlítóként tartalmazza más AHV-ok homológ szakaszait is.



9. ábra A DNS-polimeráz és termináz első exonja között elhelyezkedő, vizsgált génblokk különböző AHV-okból. Az ORF-eket jelző, méretarányos nyilak fölött van feltüntetve az ORF-ek száma. A ranid HV-okban a DNS-polimeráz és termináz gén egymástól távol lokalizálódik. Ezért az ORF60 homológja körüli szakaszt tüntettük fel. A harántcsíkozott nyilak az egyértelműen homológ ORF-eket jelölik, a szaggatott vonallal jelzett nyilak a pozicionálisan megfelelő ORF-eket. A fehér nyilakkal jelzett ORF-eknek nincs homológja a különböző AHV genomokban. Rövidítések: AngHV-1: anguillid herpesvirus 1, CyHV-3: cyprinid herpesvirus 3, RaHV-1 és 2: ranid herpesvirus 1 és 2 (Dospoly et al., 2011a).

Az ICHV-2 DNS-polimerázában szintén sikerült azonosítanunk a feltételezett splicing helyeket (10. ábra), az intron hossza 102 bp.

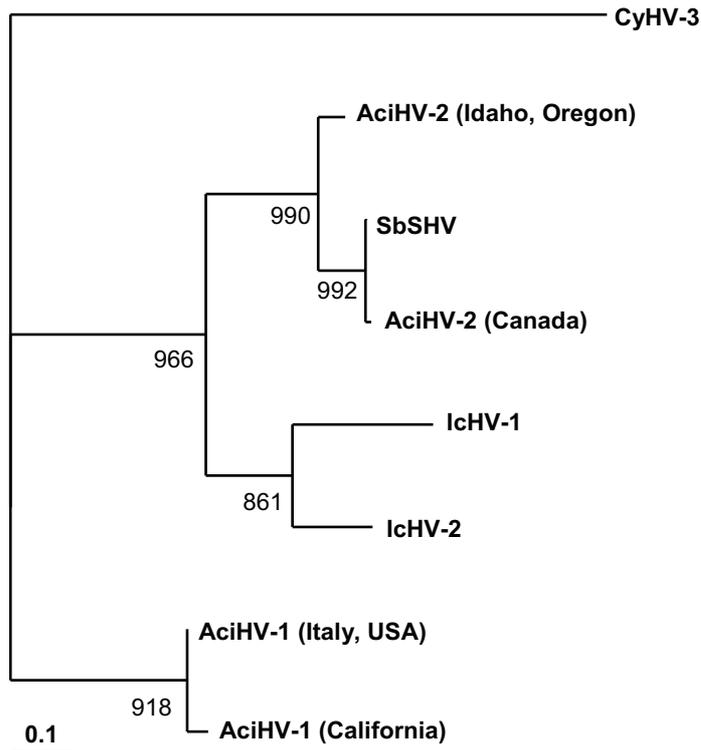
1. exon	intron	2. exon
AAGAAAATG	GTGAGTATCATTTTCCCCAT AG	TATCTCTGCG
	donor-hely	akceptor-hely

10. ábra Az ICHV-2 DNS-polimeráz génjének feltételezett splicing helyei.

Az AciHV-2 és ICHV-2 esetében alkalmazott konszenzus primerrel nem sikerült felerősítenünk a DNS-polimeráz körülbelül 1600 bp hosszú szakaszát az SbSHV törzsekből, valószínűleg a kis mennyiségű virális DNS miatt. Ezért nested konszenzus primerekkel próbálkoztunk, melyekkel sikerült felerősíteni egy 277 és 258 bp hosszúságú szakaszt mindhárom törzs (SK1/0406, SK2/0506 és BK/0506) DNS-polimeráz és termináz első exonjának génjéből. A három törzs nt szekvenciája azonosnak bizonyult, ezért a továbbiakban csak az SK1/0406 törzset vizsgáltuk. A DNS-polimeráz és termináz gén közötti szakaszt specifikus primerekkel felerősítettük. Így az SbSHV genomjából egy 7048 bp méretű DNS-fragmentum nt sorrendjét határoztuk meg (GenBanki hivatkozási szám: GU253908). A vizsgált szakasz G+C tartalma 38,1%-nak bizonyult. A vizsgált szakasz az ICHV-2-nél leírt ORF-ek homológjait tartalmazza. Az SbSHV DNS-polimerázában is azonosítottuk a feltételezett splicing helyet. Az intron mérete 88 bp (11. ábra). A 12. ábrán látható törzsfa-rekonstrukció mutatja az SbSHV és a különböző AciHV-2 izolátumok közeli rokonságát.

1. exon	intron	2. exon
AAAAAATG	GTAAGTTGGCTTCCCTTGC AG	TATCTGTGTC
	donor-hely	akceptor-hely

11. ábra Az SbSHV DNS-polimeráz génjének feltételezett splicing helyei.



12. ábra A DNS-polimeráz 449 nt szekvenciájának pozícionális illesztésén alapuló, legnagyobb valószínűség elvével (HKY85 nt szubsztitúciós modell) készített CyHV-3-mal gyökereztetett, törzsfa-rekonstrukció. Magas bootstrap értékek támasztják alá a törzsfa topológiáját. Rövidítések: AciHV-1: acipenserid herpesvirus 1; AciHV-2: acipenserid herpesvirus 2; CyHV-3: cyprinid herpesvirus 3; ICHV-1: ictalurid herpesvirus 1; ICHV-2: ictalurid herpesvirus 2. SbSHV: Siberian sturgeon herpesvirus (Doszpoly & Shchelkunov, 2010).

6.3. CyHV-1 és 2

Beteg és elhullott halakból származó mintákból a ponty-herpeszvírus (CyHV-1) és az ezüstkárász-herpeszvírus (CyHV-2) DNS-polimeráz génjének 464 bp hosszú szakaszát nyertük ki PCR-rel. Az úgynevezett pontyhimlős tüneteket mutató pontyból a máj kivételével valamennyi szerv pozitív lett a konszenzus primerekkel végzett PCR során. Az ezüstkárász vegyes szerv-mintája szintén pozitív lett. A reakciókban keletkezett termékek nt sorrendjét meghatároztuk, és a szekvenciákat benyújtottuk a GenBankba, ahol a CyHV-1 elérhetőségi száma HM014350, a CyHV-2-é pedig HM014349 lett.

6.4. Fehér tok-adenovírus

6.4.1. Genomszerveződés

Meghatároztuk a WSAdV-1 genom teljes nt sorrendjét, mely 48.395 bp hosszúságúnak bizonyult. A benyújtott szekvencia elérési száma a GenBankban: AY082701. Munkám kezdetekor, mintegy 18 kbp hosszúságú szakasz nt sorrendje volt ismeretes, melyet véletlenszerű klónozással és PCR-rel nyertek a genom középső, megőrzött szakaszából. A IVa2 géntől a genom bal végéig mintegy 7000 bp hosszú részt sikerült felerősíteni 6 db egykarú PCR-rel. Ahogy a genomvégek felé haladtunk, az összeállított szekvenciába be tudtuk illeszteni néhány, korábban klónozott szakaszt, melyekről homológia kereséssel nem tudtuk megállapítani, hogy virális eredetűek-e, illetve, hogy hol helyezkednek el a genomban. A *SacI*-gyel végrehajtott végklónozás során az egyik 740 bp hosszú fragmentet tartalmazó klón szekvenciája hasonlóságot mutatott az AdV-ok ITR szekvenciáival, de az 5'/3' RACE Kit alkalmazásával is meggyőződünk arról, hogy valóban ez a genom vége. A 100K géntől a genom jobb végéig kb. 23.000 bp hosszú szakasz szekvenciáját határoztuk meg, melybe szintén véletlenszerű klónozással nyert szakaszokat is sikerült beépítenünk, miközben az egykarú PCR-ekkel (14 db) haladtunk a genom vége felé. Majd miután a genom bal oldalán az ITR szekvenciáját meghatároztuk, a jobb oldalon is képesek voltunk hagyományos PCR-rel felerősíteni az utolsó hiányzó szakaszt (5000 bp).

A teljes genom G+C tartalma 42,6%. A WSAdV-1 ITR-je 126 bp hosszúságúnak bizonyult. 48 gén meglétét feltételezzük úgy, hogy a talált nyitott leolvasási keretekből azokat fogadtuk el lehetséges gének, melyek 50-as-nál többet kódolnak. A genom középső részén (E2A, E2B és L régiókban) 16 gént azonosítottunk, melyeknek homológjait az összes eddig leírt AdV-ban megtalálták. Négy feltételezett fiber gént azonosítottunk a genom bal végén. Eddig minden vizsgált AdV-ban, a fiber gén vagy gének a genom megőrzött részének jobb oldalán helyezkedtek el (pVIII-tól jobbra). Az úgynevezett U exon megőrzött génnek tekinthető, de homológiát csak az egyes nemzetségeken belül mutat. Lokalizációja miatt (a fiber és pVIII gén között, az ellentétes szálon) a WSAdV-1-ben nem volt azonosítható. Feltételezett proteáz vágási helyeket a következő fehérjéknél azonosítottunk az as szekvenciák alapján: pVI, pVII, pVIII, pX, pTP. Feltételezett splicing helyeket a pTP és 33K génnél azonosítottunk (13-14. ábra).

A genom jobb oldalán két ORF-et találtunk, melyek a parvovírusok nem-stukturális (NS) fehérjéivel mutatnak homológiát. További három ORF-et azonosítottunk a genom jobb oldalán, melyek közül az egyik az Ig szupercsaládba tartozó fehérjét kódoló génekkel mutat homológiát. A másik két, potenciálisan kódolt fehérjéből az egyik szulfotranszferáz domént tartalmaz, a másik pedig homológiát mutat gerincesesekből és egyéb élőlényekből származó szulfotranszferáz fehérjékkel. Ezekon felül további 23 ORF-et találtunk a

genomanalízis során, melyekről feltételezzük, hogy gének, noha nem mutatnak egyértelmű homológiát egyetlenegy, eddig leírt génnel sem. Az egyedi, AdV-ok génjeivel homológiát nem mutató ORF-ek számozását az *Adenoviridae* család más nemzetségeinél megszokott módon végeztük. Balról jobbra haladva, növekvő számsorrendbe a jobbra átíródó ORF-ek, majd a genom jobb végétől visszafelé folytattuk a balra átíródó ORF-ek számozását.

A WSAdV-1 teljes genom térképe a feltételezett ORF-ekkel a 15. ábrán látható. A feltételezett fehérjekódoló szekvenciák lokalizációját a genomban, irányultságukat és az általuk kódolt fehérjék hosszát a 6. táblázat tartalmazza. A 7. táblázat a WSAdV-1 és a másik négy AdV nemzetség egy-egy képviselője által kódolt, megőrzött gének összehasonlítását tartalmazza.

Több feltételezett fehérje tartalmaz transzmembrán régiót (ORF7, 8, 10, 18, 22, 24, 28, pX és proteáz). Az ORF18 jelű fehérje négy transzmembrán régiót is tartalmaz. Feltételezett szignál-peptideket találtunk a következő fehérjék N-terminális végén: pX, ORF7, 8, 17, 18, 21, 23, 24 és 28. A megőrzött gének mindegyikénél és az egyedi ORF-ek többségénél is azonosítani tudtuk a poliadenilációs szignálokat, ezek szekvenciája a következő volt: AATAAA, ATATAA, AGTAAA. Az azonosított új géneknél az ORF11, 17, 18 és 28 esetében nem tudtuk egyértelműen azonosítani a poliadenilációs szignálokat.

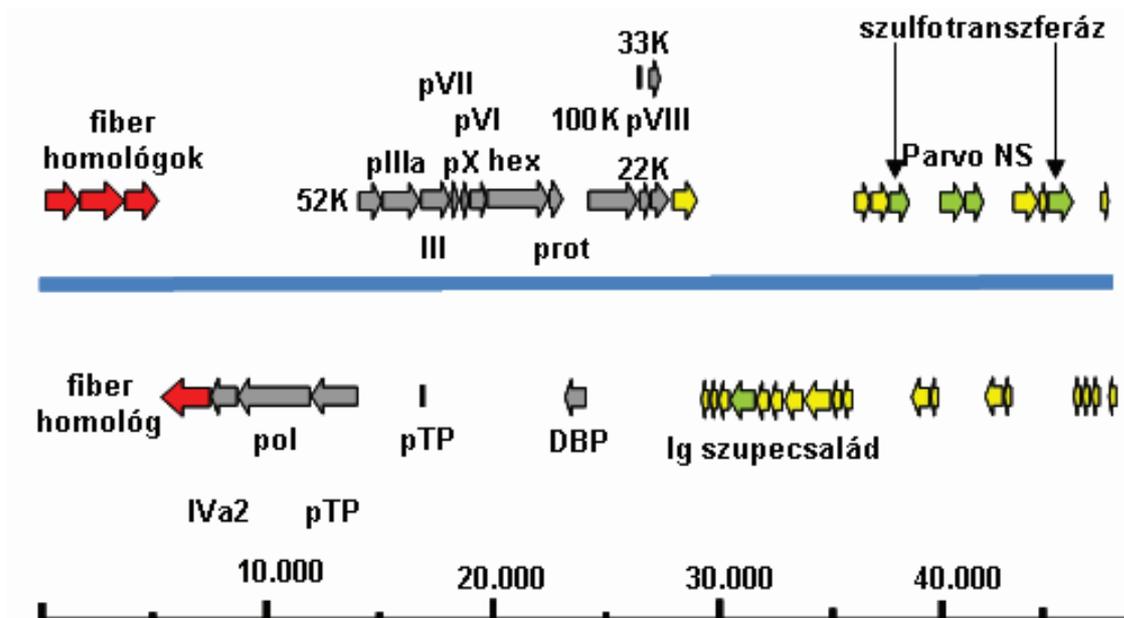
A mastadenovírusokban található V-ös és a IX-es szerkezeti fehérjét kódoló gének homológjait nem találtuk a genomban. Hasonlóan az E1, E3 és E4 régiók homológjait sem lehetett azonosítani.

1. exon	intron	2. exon
GAATTTG	GTAAGTTAAGA.....TTATTTACAG	GACAGAAGATA
donor-hely		akceptor-hely

13. ábra A WSAdV-1 pTP génjének feltételezett splicing helyei.

1. exon	intron	2. exon
ATTGCTG	GTAAGGCAGA.....CTCTTTCAG	CCATGAGA
donor-hely		akceptor-hely

14. ábra A WSAdV-1 33K génjének feltételezett splicing helyei.



15. ábra A WSAAdV-1 genom térképe. Szürke nyilak a minden nemzetségben megőrzött géneket jelölik. Piros nyilak jelölik a négy fiber homológot, sárga nyilak a csak WSAAdV-1-ben azonosított ORF-eket. A zöld nyilak azokat az ORF-eket jelölik, melyek valamilyen megőrzött doménnel vagy motívummal rendelkeznek.

6. táblázat A WSAAdV-1 feltételezett génjei

Gén/ORF	Kódló szál	Helyeződés	Aminosav
fiber homológ 1	<i>r</i>	363-1580	405
fiber homológ 2	<i>r</i>	1610-3691	693
fiber homológ 3	<i>r</i>	3707-4924	405
fiber homológ 4	<i>l</i>	4966-7236	756
IVa2	<i>l</i>	7199-8404	401
DNS-polimeráz	<i>l</i>	11911-8411	1166
pTP ^a	<i>l</i>	11911-14058, 16874-16882	718
52K	<i>r</i>	14090-15151	353
pIIIa	<i>r</i>	15159-16868	569
III	<i>r</i>	16897-18228	443
pVII	<i>r</i>	18244-18318	24
pX	<i>r</i>	18442-18546	34
pVI	<i>r</i>	18789-19502	237
hexon	<i>r</i>	19512-22349	945
proteáz	<i>r</i>	22352-22960	202
DBP	<i>l</i>	23006-23959	317
100K	<i>r</i>	24401-26647	748
33K ^a	<i>r</i>	26478-26688, 26912-27192	163
22K	<i>r</i>	26478-26890	137

pVIII	<i>r</i>	27242-28054	270
ORF1	<i>r</i>	27726-28829	367
ORF28	<i>l</i>	28883-29083	66
ORF27	<i>l</i>	29052-29282	76
ORF26	<i>l</i>	29365-29829	154
ORF25 Ig domén	<i>l</i>	30193-31332	379
ORF24	<i>l</i>	31293-31829	178
ORF23	<i>l</i>	31915-32445	176
ORF22	<i>l</i>	32551-33399	282
ORF21	<i>l</i>	33538-34779	413
ORF20	<i>l</i>	35068-35469	133
ORF19	<i>l</i>	35743-36174	143
ORF2	<i>r</i>	36335-36985	216
ORF3	<i>r</i>	36933-37757	274
ORF4 szulfotranszferáz	<i>r</i>	37857-38744	295
ORF18	<i>l</i>	38825-39619	264
ORF17	<i>l</i>	40097-40375	92
ORF5 parvovírus NS	<i>r</i>	40311-41417	368
ORF6 parvovírus NS	<i>r</i>	41540-42382	280
ORF16	<i>l</i>	42440-43258	272
ORF15	<i>l</i>	43421-43666	81
ORF7	<i>r</i>	43834-44967	377
ORF8	<i>r</i>	44992-45186	64
ORF9 szulfotranszferáz	<i>r</i>	45204-46337	377
ORF14	<i>l</i>	46724-46942	72
ORF13	<i>l</i>	46932-47129	65
ORF12	<i>l</i>	47147-47338	63
ORF10	<i>r</i>	47624-47833	69
ORF11	<i>l</i>	47842-48111	89

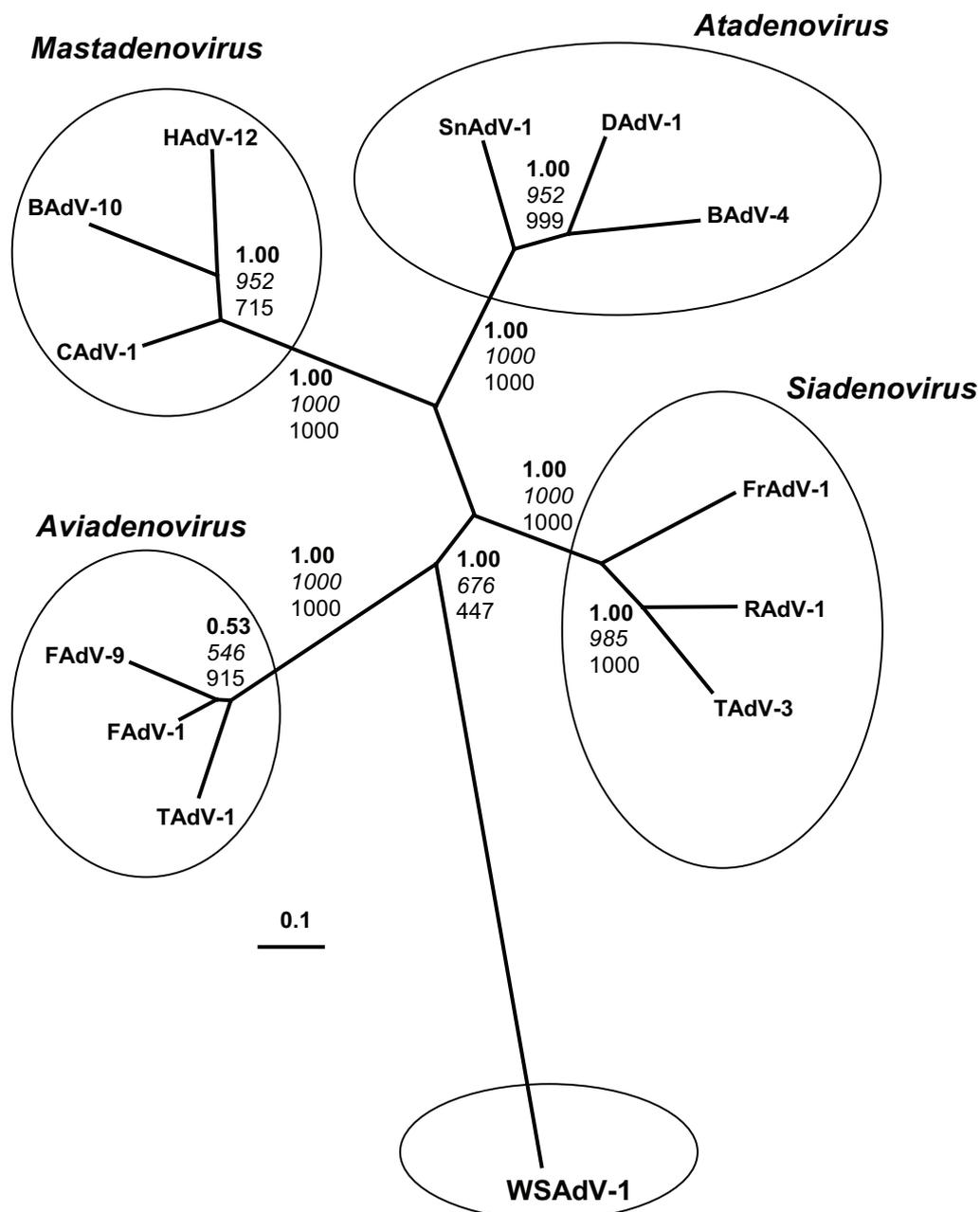
Jelölések: *l*: leftward, *r*: rightward, ^a feltételezett splicing.

7. táblázat Az öt adenovírus nemzetség egy-egy képviselőjében megtalálható homológ gének méretének (as) összehasonlítása (a szélsőséges méretű géneket pirossal kiemeltük)

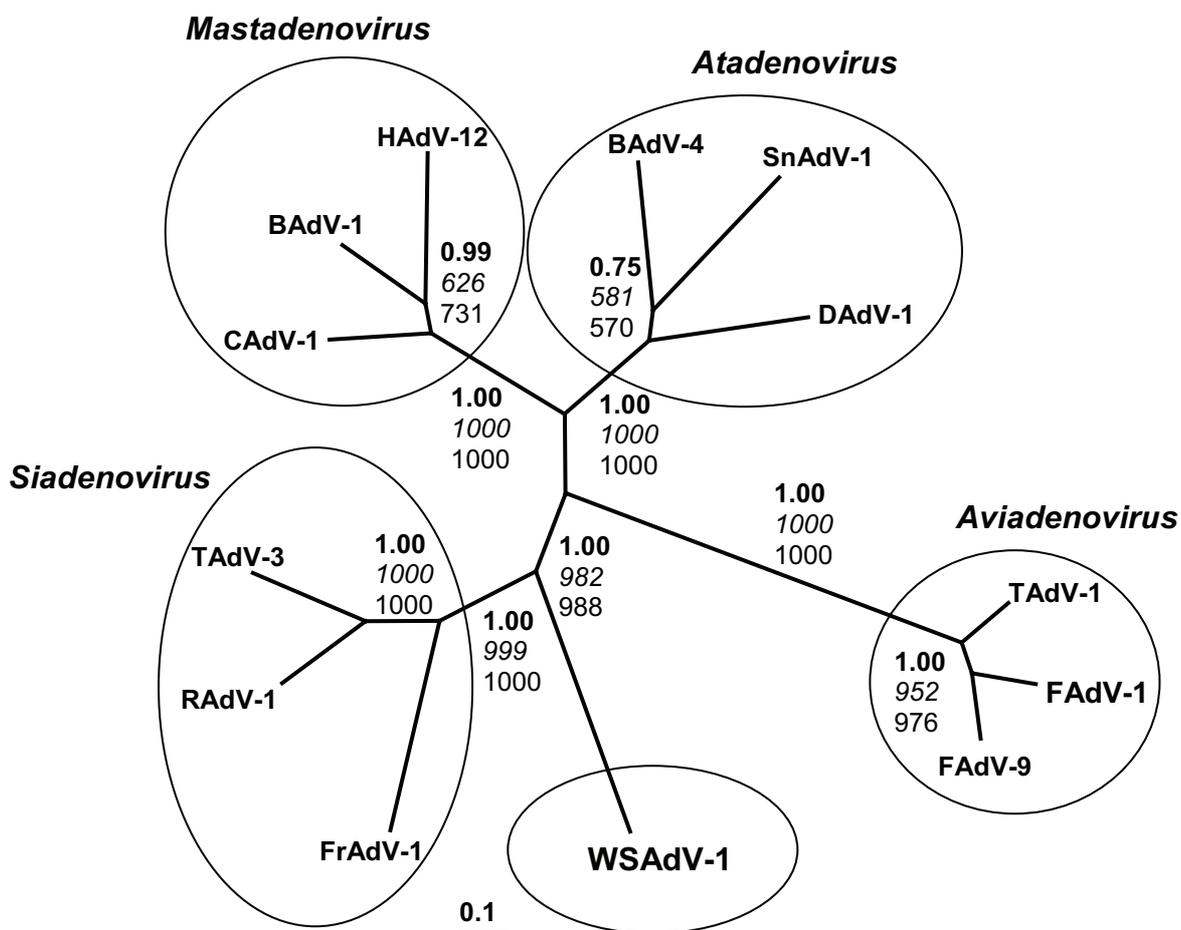
Gén	<i>Atadenovirus</i>	<i>Aviadenovirus</i>	<i>Mastadenovirus</i>	<i>Siadenovirus</i>	<i>Ichtadenovirus</i>
	BAdV-4	FAdV-1	HAdV-5	TAdV-3	WSAdV-1
IVa2	321	439	449	367	401
DNS-polimeráz	1073	1255	1198	1112	1166
pTP	600	575	671	597	718
52K	343	378	415	300	353
pIIIa	573	575	585	505	569
III	450	515	571	448	443
pVII	119	72	198	120	24
pX	71	188	80	58	34
pVI	200	223	250	231	237
hexon	910	942	952	906	945
proteáz	201	206	204	214	202
DBP	380	441	529	380	317
100K	628	984	807	630	748
33K	134	196	229	120	162
22K	104	184	196	89	137
pVIII	222	245	227	200	270
U exon	54	74	54	85	-
fiber	535	793/410	581	454	405/693/405/756

6.4.2. Filogenetikai analízis

Filogenetikai számítások során a WSAdV-1-en kívül, a másik négy nemzetség 3-3 képviselőjét is vizsgáltuk, amint azt a 16. és 17. ábra mutatja. A törzsfákon a WSAdV-1 elkülönül a másik négy nemzetség tagjaitól, önálló csoportot alkotva. Az ugyanazzal a génnel, de különböző módszerekkel végzett számítások hasonló törzsfa topológiát eredményeztek. Viszont a DNS-polimerázzal és hexonnal végzett számítások némileg eltérő törzsfa topológiát adtak.



16. ábra A hexon teljes as szekvenciáinak pozicionális illesztésén alapuló (856 as), Bayesian statisztikával (WAG as szubsztitúciós modell) készített filogenetikai számítás. A számításokat távolság mátrix (Categories modell) és legnagyobb valószínűség elve (WAG as szubsztitúciós modell) módszerekkel is elvégeztük. Ezen módszerekkel kapott törzsfák topológiája megegyezett a Bayesian statisztikával számítottal. Kiemelés nélküli számokkal a távolság mátrix, dőlttel a legnagyobb valószínűség, félkövérrel a Bayesian statisztikához tartozó statisztikai értékek vannak feltüntetve. Rövidítések: BAdV: bovine adenovirus; CAAdV: canine adenovirus; DAdV: duck adenovirus; FAdV: fowl adenovirus; HAAdV: human adenovirus; RAAdV: raptor adenovirus; SnAdV: snake adenovirus; TAdV: turkey adenovirus; WSAdV: white sturgeon adenovirus.



17. ábra A DNS-polimeráz teljes as szekvenciáinak pozicionális illesztésén alapuló (939 as), Bayesian statisztikával (RTRev as szubsztitúciós modell) készített filogenetikai számítás. A számításokat távolság mátrix (Categories modell) és legnagyobb valószínűség elve (WAG as szubsztitúciós modell) módszerekkel is elvégeztük. A különféle módszerekkel kapott törzsfák topológiája lényegileg megegyezett a Bayesian statisztikával számítottal. Kiemelés nélküli számokkal a távolság mátrix, dőlttel a legnagyobb valószínűség, félkövérrel a Bayesian statisztikához tartozó statisztikai értékek vannak feltüntetve. Rövidítések: mint a 16. ábrán.

7. Megbeszélés

Ph.D. munkám keretében az egyetlen, eddig ismert hal-AdV, a tokhalból izolált WSAdV-1 teljes genomjának nt-sorrendjét meghatároztuk és elemeztük. A tokhal-HV, nevezetesen az AciHV-2 genomjának részleges szekvenálását, és további hal-HV-ok részleges molekuláris jellemzését is elvégeztük.

7.1. Fehér tok-herpeszvírus

A fehér tok-HV (AciHV-2) becsült genommérete kb. 130 kbp, ennek felének nt sorrendjét meghatároztuk. Ez az első olyan, ősi halféléből (Chondrostei) izolált HV, amelyből nagy mennyiségű szekvencia adat (66 kbp) vált ismertté. Adataink alapul szolgáltak az AciHV-2 taxonómiai besorolásához.

7.1.1. Genomszerveződés

Az AciHV-2 genom 66 kbp hosszú szakaszának elemzése során 46 lehetséges gént valószínűsítettünk. Az IchiHV-1 genomjában, mely az első teljesen végig szekvenált hal-HV (Davison, 1992), ez a régió 45 ORF-et tartalmaz, az ORF24-től az ORF69-ig. Az alacsonyabbrendű gerincesek HV-ainak genomjában lévő génekre vonatkozó ismereteink hiányosak. A magasabbrendű gerincesek HV-ainak (*Herpesviridae* családba tartozó) alaposan tanulmányozott génjeinek homológjait általában nem lehetett azonosítani, néhány kivétel a DNS-polimeráz és termináz.

Az IchiHV-1 és az AciHV-2 genomszerveződése között nagyfokú kolinearitást találtunk. Az AciHV-2 46 feltételezett ORF-jéből 38 egyértelmű homológiát mutat az IchiHV-1 ORF-jeivel, ezen ORF-ek irányultsága és pozíciója is megegyezett a két genomban, és méretük sem mutatott nagy különbségeket, kivéve az ORF48 és 65. Az első hossza körülbelül a fele az IchiHV-1 ORF48-ának, viszont az ORF65, ami tegument proteint kódol, mintegy harmadával hosszabb, mint az IchiHV-1 homológja. Mindössze 8, feltételezett ORF-nél nem találtunk homológiát az IchiHV-1 ORF-jeivel, de ezek, a GenBankban található egyetlen más gén termékeivel sem mutattak egyértelmű homológiát. Ezek kivétel nélkül kisméretű ORF-ek (417-627 bp). Feltehetőleg az AciHV-2-re specifikus gének, de nem lehetünk benne biztosak, hogy valóban kifejeződnek-e.

A DNS-polimeráz gén (ORF57+58) mRNS-e az IchiHV-1-ben feltételezetten splicing mechanizmuson megy keresztül, az AciHV-2 DNS-polimerázában szintén megtaláltuk a feltételezett splicing donor és akceptor helyeket. Ezt a gént azért nevezzük ORF(57+58)-nak, mert először két külön ORF-nek azonosították, majd később fedezték fel a feltételezett splicing helyeket, mely által egy termék keletkezik a két ORF-ből (Davison, 1992).

A termináz gén feltételezetten három exonból áll az IChV-1 genomjában (ORF62, 69 és 71), ezek közül a mi általunk vizsgált szakasz az első exont teljesen (ORF62), a másodikat (ORF69) pedig részben tartalmazza, a splicing-ra utaló nt szekvenciákat azonosítottuk. Az IChV-1-ben a termináz első két exonját leszámítva csak egy ORF-nek (ORF52) nem tudták azonosítani a poliadenilációs szignálját. A két vírus közeli rokonságát bizonyítja, hogy az AciHV-2 ORF52-jének mi sem találtuk meg a poliadenilációs szignálját. Ezen felül még egy feltételezett ORF-nek (ORF81) nem tudtuk azonosítani egyértelműen a poliadenilációs szignálját, feltételezhetően ez az ORF nem funkcionál géneként.

Homológia kereső programok alkalmazása során a legnagyobb fokú hasonlóságot mindig az IChV-1 ORF-jei mutatták, egy esetet kivéve. Az IChV-1 genomjában az ORF14, 73 és 74 által kódolt három fehérje szerin/treonin kináz doméneket tartalmaz. Az AciHV-2 genomjában az ORF24 és 25 között található ORF feltételezett génterméke szintén szerin/treonin kináz domént tartalmaz. Homológia keresés során viszont nagyobb fokú hasonlóságot mutatott, gerincesek hasonló doméneket hordozó génjeihez. Ezt egy esetleges független, a gazdaszervezet genomjából történő génteljesítéssel lehetne magyarázni (Davison, 2002). Az IChV-1-ben található, kináz domént kódoló három ORF közül a 73-assal mutatja a legnagyobb hasonlóságot, ezért döntöttünk úgy, hogy az AciHV-2 kináz domént kódoló ORF-je szintén a 73-as számot kapja. Ez volt az egyetlen feltételezetten ismert funkciójú ORF az AciHV-2 vizsgált genomszakaszában, mely az IChV-1 genomjában más régióban helyezkedik el. Mivel az AciHV-2 genom szekvenálása során nem értük el sem az ORF14-et sem az ORF73-74-et tartalmazó régiót, nem tudhatjuk, hogy ezeken a szakaszokon is találhatóak-e hasonló funkcióval bíró ORF-ek.

Az IChV-1 és CyHV-3 szerkezeti fehérjéit azonosították (Davison & Davison, 1995; Michel et al., 2010b). Az AciHV-2 vizsgált genomszakaszán, az IChV-1 genomjának megfelelő szakaszán található összes, feltételezett funkcióval jelölt (szerkezeti és egyéb) géntermék homológiát sikerült azonosítanunk, az ORF51 kivételével, melynek terméke egy feltételezett membránprotein. Az AciHV-2 genomjában az ORF49 és 52 között három, az IChV-1 ORF-jeivel homológiát nem mutató ORF (85, 86 és 87) található, melyek mindegyikének a terméke négy transzmembrán régiót tartalmaz, ezért feltételezzük, hogy ezeknek a géneknek a termékei szintén membránfehérjeként funkcionálnak.

Az AciHV-2 genomjának általunk vizsgált szakasza tartalmazza azt a 12 ORF-et, amit eddig minden teljes hosszán szekvenált AHV tartalmazott (van Beurden et al., 2010). Ezen gének egy részének ismerjük a funkcióját: DNS-polimeráz, termináz, DNS-helikáz, primáz, proteáz és kapszid fehérjék, de a többi ismeretlen funkciójú (5. táblázat). Az előbb említett gének közül a legjobban megőrzött a DNS-polimeráz. Általában erre a génre tervezik a detektáló, illetve diagnosztikai primereket (Hanson et al., 2006; Rijsewijk et al., 2005;

Goodwin et al., 2006b). Ugyancsak megőrzött gének bizonyult a termináz, nem csak halak és kétéltűek, hanem a magasabbrendű gerincesek, illetve a puhatestűek HV-ainak genomjában is. Munkánk során terveztünk egy konszenzus primer párt a DNS-polimeráz megőrzött régióra, melynek segítségével egy viszonylag hosszú szakasz (1600 bp) lehet felerősíteni különböző AHV-okból (Dospoly et al., 2008). Ezen szakasz elegendő bioinformatikai adatot hordoz egy új AHV elsődleges besorolásához, ahogy ez bebizonyosodott az AciHV-2 és ICHV-2 esetében. Az SbSHV esetében nem működött PCR-ünk, valószínűleg a nagyon kis mennyiségben rendelkezésünkre álló virális DNS miatt. Ezen vírus esetében csak nested PCR-ekkel értünk el sikereket. Mindazonáltal úgy gondoljuk, hogy ez az általunk kifejlesztett PCR alkalmas izolált AHV-ok elsődleges vizsgálatához.

7.1.2. Rendszertan

7.1.2.1. Herpesvirales rend

Az AHV-ok molekuláris tanulmányozása felgyorsult az utóbbi időkben. Napjainkig öt AHV teljes genom szekvenciája ismeretes: ICHV-1, CyHV-3, AngHV-1, RaHV-1 és 2 (Davison, 1992; Davison et al., 2006; Aoki et al., 2007; van Beurden et al., 2010). Ez vezetett a HV-ok taxonómiájában bekövetkezett gyökeres változásokhoz (Davison et al., 2009). Már munkám kezdetekor valószínűsíthető volt, hogy az alacsonyabb- és magasabbrendű gerincesek HV-ait nagy evolúciós távolság választja el. Végül 2008-ban az ICTV elfogadta a már 2005-ben javasolt változtatásokat. A halak és kétéltűek, tehát magzatburok nélküliek (Anamnia) HV-ait az újonnan létrehozott *Alloherpesviridae* családba sorolták be. Az egyetlen puhatestűből (kagyló) izolált HV-nak, melynek teljes genom szekvenciáját meghatározták (Davison et al., 2005b), a *Malacoherpesviridae* családot hozták létre. A magasabbrendű gerincesek (magzatburkosok, Amniota) HV-ai maradtak a *Herpesviridae* családban. Azon belül az *Alphaherpesvirinae* alcsalád emlősök, madarak és hüllők HV-ait foglalja magába, míg a *Beta-* és *Gammaherpesvirinae* alcsaládok csak emlősökből kimutatott vírusokat tartalmaznak. A három víruscsaládot az újonnan létrehozott, *Herpesvirales* rendbe sorolták be. Ezzel létrejött a 6. vírusrend (a *Caudovirales*, *Mononegavirales*, *Nidovirales*, *Picornavirales*, *Tymovirales* után). Ugyanakkor 65 hivatalos víruscsalád számára (beleértve az *Adenoviridae* családot) a mai napig nem alapítottak saját rendet. Erre majd csak akkor kerülhet sor, ha már jobban látjuk a ma még besorolatlan családok közös evolúciós eredetét.

7.1.2.2. *Alloherpesviridae* család

Jelenleg is folyamatban van az *Alloherpesviridae* család evolúciót tükröző felosztása alcsaládokra, nemzetségekre. Napjainkban hivatalosan a család négy elfogadott nemzetséget tartalmaz (<http://www.ictvonline.org>). A *Batrachovirus* nemzetségben a kétéltűekből (békából) izolált HV-ok vannak (RaHV-1 és 2). A *Cyprinivirus* nemzetség három, pontyfélékből leírt vírust tartalmaz (CyHV-1, 2 és 3), míg a *Salmonivirus* nemzetségbe lazacfélék HV-ai találhatóak (SalHV-1, 2 és 3). Az *Ictalurivirus* nemzetség törpeharcsákból, illetve tokfélékből kimutatott HV-okat tartalmaz (IcHV-1 és 2, AciHV-2). Utóbbi két vírus besorolását az *Ictalurivirus* nemzetségbe kutatócsoportunk javasolta. A Herpesvirales Munkacsoport (Study Group) ICTV-nek benyújtott hivatalos javaslata az általunk leközölt filogenetikai számításokon alapult.

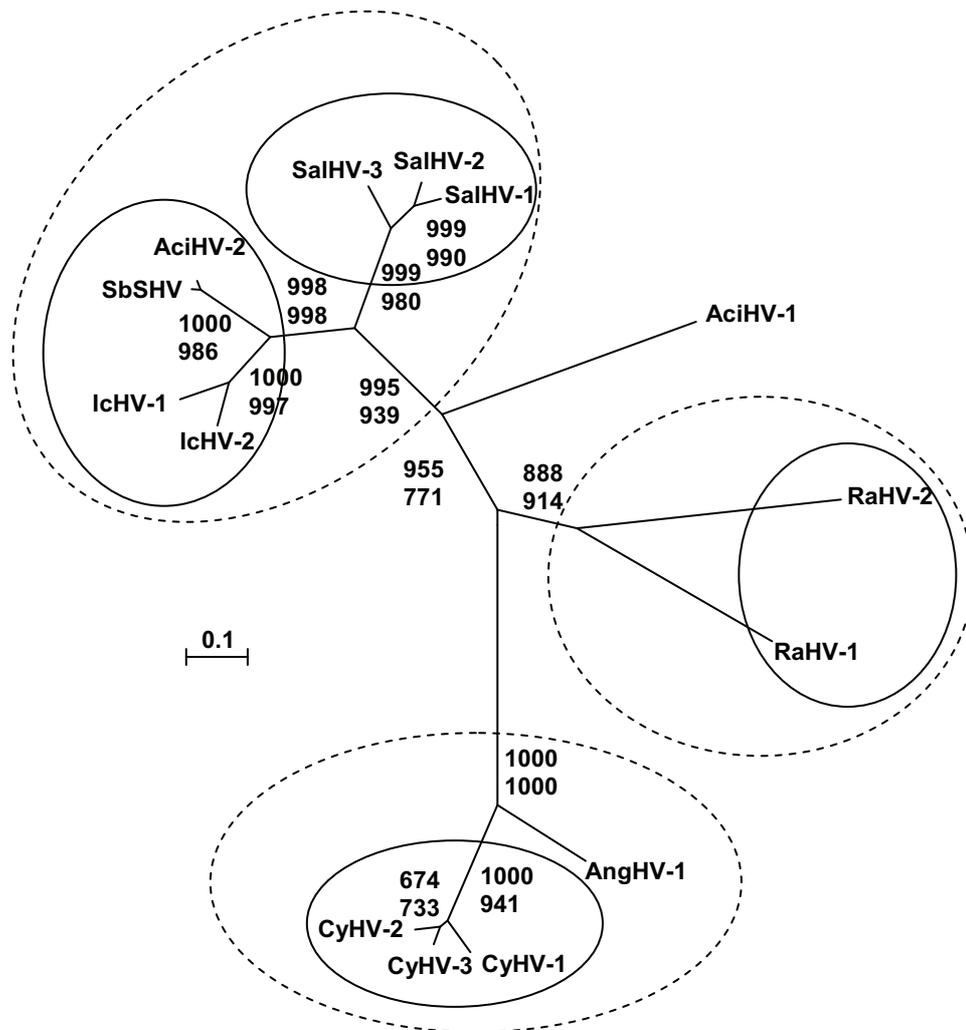
További 15 hal-HV nincs besorolva egyik nemzetségbe sem, szekvencia adatok hiányában (Waltzek et al. 2009). Ezeknek a vírusoknak a nagy részét nem sikerült izolálni, csak elektronmikroszkóppal megfigyelt, morfológiai bélyegeik alapján lehetett a családba sorolni. Néhány ilyen vírusból csak nagyon rövid szekvenciák állnak rendelkezésre nyilvános adatbankokban.

Ez idáig AHV-okat még nem írtak le magasabbrendű gerincesekből, illetve gerinctelenekből. Egy új megfigyelés szerint azonban a CyHV-3-at bizonyos zooplanktonok (Rotifera) képesek sejtmembránjukkal megkötni, így közrejátszhatnak a vírus terjedésében (Minamoto et al., 2011).

Csak egy esetben számoltak be egy, a filogenetikai számítások alapján a *Herpesviridae* családba tartozó, vírusról egy sügérféléből (*Oreochromis aureus*) (Shlapobersky et al., 2010), mely virális encephalitist okoz. Itt meg kell jegyezni, hogy a számítások alapjául szolgáló pozicionális as illesztés igen rövid volt (56 as). További vizsgálatokra van szükség, hogy egyértelműen ki lehessen jelteni, hogy ez a vírus mely családba tartozik.

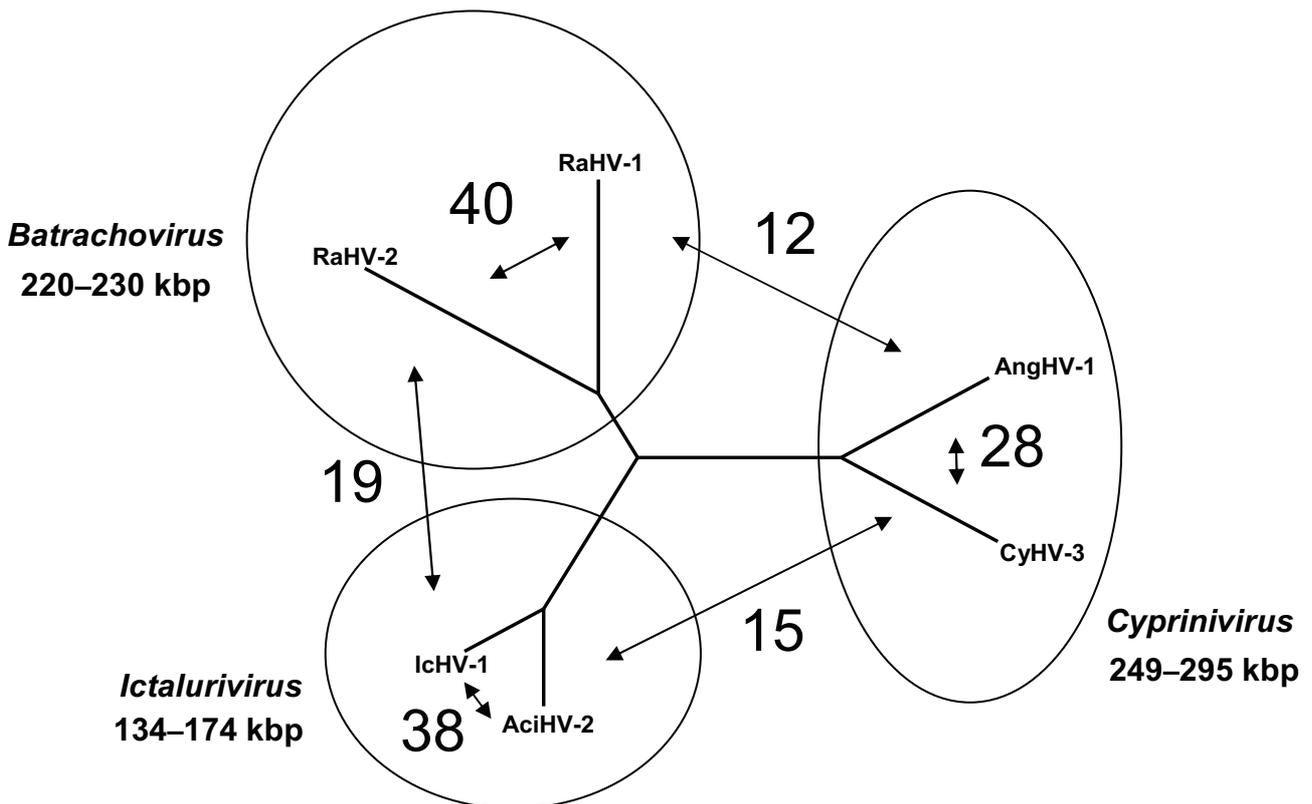
Külföldi kutatócsoportok némelyike az *Alloherpesviridae* család két alcsaládra való felosztását szorgalmazza. Véleményük szerint az *Ictalurivirus*, *Salmonivirus* és a *Batrachovirus* nemzetség egy alcsaládba tartozik (Waltzek et al., 2009; van Beurden et al., 2010). Ezzel szemben az általunk elvégzett filogenetikai számítások, kezdve a rövid génszakaszokon alapulóktól egészen a 11 ORF teljes szekvenciáján alapulóig, azt sugallják, hogy az *Alloherpesviridae* család három fő csoportot (feltételezett leszármazási vonalat) tartalmaz. Ez utóbbin alapuló törzsfa azt mutatja (8. ábra), hogy az egyik csoport tartalmazza a CyHV-3-at és az AngHV-1-et, tehát ez a leágazás megfelel a *Cyprinivirus* nemzetségnek. Noha az AngHV-1 egyelőre még hivatalosan nincs besorolva a nemzetségbe, de az ICTV-nek már benyújtott javaslat szerint valószínűleg hamarosan ennek a nemzetségnek a

tagja lesz. A második csoport tartalmazza *Batrachovirus* nemzetség vírusait, nevezetesen a RaHV-1-et és 2-t. A harmadik csoport tartalmazza az *Ictalurivirus* nemzetséget az IcHV-1-gyel és az AciHV-2-vel. Ezekhez a csoportokhoz további vírusokat lehet rendelni, melyekből csak rövidebb szekvencia adatok állnak rendelkezésre. A cyprinivírus ághoz a CyHV-1-et és 2-t, az ictalurivírus leágazáshoz az IcHV-2-t és a *Salmonivirus* genus három hivatalosan elfogadott tagját (18. ábra).



18. ábra Az *Alloherpesviridae* család törzsfa-rekonstrukciója legnagyobb valószínűség elve (WAG szubsztitúciós modell) és távolsági mátrix (JTT modell) módszerrel számítva a DNS-polimeráz részleges szekvenciájából (133 as). A két módszer bootstrap értékei egymás alatt láthatók. A folyamatos vonallal bekarikázott vírusok a jelenleg elfogadott nemzetségeket jelölik. A szaggatott vonallal feltüntetett karikák a kutatócsoportunk által javasolt alcsaládokra való felosztást mutatják. Rövidítések: AciHV-1 és 2: acipenserid herpesvirus 1 és 2; AngHV-1: anguillid herpesvirus 1; CyHV-1, 2 és 3: cyprinid herpesvirus 1, 2 és 3; IcHV-1 és 2: ictalurid herpesvirus 1 és 2; RaHV-1 és 2: ranid herpesvirus 1 és 2; SalHV-1, 2 és 3: salmonid herpesvirus 1, 2 és 3 (Dospoly et al., 2011b).

A filogenetikai számítások mellett a megőrzött gének számának elemzése is a „három-csoport teóriát” erősíti. A RaHV-1 és 2 genomja, annak ellenére, hogy egy nemzetségbe tartoznak, mindössze 40 homológ ORF-et tartalmaz (19. ábra), míg teljes génkészletük száma 132, illetve 147 ORF. Megjegyzendő, hogy a RaHV-1 és RaHV-2 közötti filogenetikai távolság szinte külön genusba sorolásukat is indokolhatná. Hiszen a törzsfákon látható, hogy a köztük lévő evolúciós távolság nagyobb, mint az ictaluri- és salmonivírusok között (18. ábra). A két ictalurivírus (AciHV-2 és IctHV-1) 38 homológ ORF-et tartalmaz úgy, hogy mindössze 46 ORF szekvenciája ismeretes az AciHV-2 genomjából. Ugyanilyen mérvű kolinearitást feltételezve a genom eddig nem vizsgált részein, a várható homológ ORF-ek száma jóval több lesz. Amennyiben az AngHV-1-et is besorolják a *Cyprinivirus* nemzetségbe, a genus tagjaiban a hasonlóságot mutató ORF-ek száma szintén 40 lesz, melyekből csak 28 mutat egyértelmű homológiát (van Beurden et al., 2010). A teljes genomok által tartalmazott ORF-ek száma: 136–156. Ha a nemzetségek közötti homológ ORF-ek számát nézzük (19. ábra), akkor tény, hogy az *Ictalurivirus* és *Batrachovirus* genus tagjainak több a közös, homológ ORF-je, mint a cyprinivírusok és a másik két nemzetség tagjai között. Továbbá a törzsfán látható, hogy a filogenetikai távolság is valamivel kisebb. De véleményünk szerint, ezen víruscsoportok közti evolúciós távolságok sokkal nagyobbak, semhogy egy alcsaládba lehetne őket sorolni, az viszont bizonyos, hogy monofiletikus csoportot képeznek. A *Herpesviridae* családban mind a három alcsalád minden tagjának 43 homológ génje van, míg az *Alloherpesviridae* családban ez mindössze 12. Az alacsonyabbrendű gerincesekből izolált HV-ok feltehetően sokkal ősbek, mint a *Herpesviridae* család tagjai, és a hosszabb evolúciós idő alatt genomjuk sokkal jobban divergálódott. Valószínűsíthetően független génszerzések is történtek az egyes csoportokban. Pl.: a CyHV-3 genomjában 6 ORF a legnagyobb hasonlóságot *Poxviridae* és *Iridoviridae* család vírusainak génjeivel mutatja (Michel et al., 2010a).



19. ábra A 8. ábrán is bemutatott törzsfa-rekonstrukció, kiegészítve a különböző AHV-ok genomjában található homológ ORF-ek számával (a számok a nyilak mellett vannak feltüntetve). Az egyes csoportok genom méreteit is mutatja az ábra.

A három alcsaládra való felosztást az ide tartozó vírusok genommérete közötti különbségek is alátámasztják (19. ábra). Az IctHV-1-nek 134 kbp, a két ranid HV-nak 220–230 kbp, míg az AngHV-1 és CyHV-3-nak 249–295 kbp hosszú a genomja. A SalHV-1 genom mérete 174 kbp hosszúnak bizonyult (Davison, 1998), jóval rövidebb, mint a ranid és cyprinid HV-oké. Továbbá a filogenetikai számítások alapján (Waltzek et al., 2009; Doszpoly et al., 2011b) a salmonid HV-ok sokkal közelebbi rokonságban állnak az ictalurivírusokkal mint bármelyik másik AHV-sal (18. ábra). Ezekre a számításokra és tényekre alapozva, véleményünk szerint az egyik alcsalád tartalmazná a *Cyprinivirus* nemzetséget és az AngHV-1-et, a második a *Batrachovirus* genust, míg a harmadik az *Ictalurivirus* és *Salmonivirus* nemzetséget.

Észak-amerikai tokfélék fiatal vagy felnőtt, egészséges vagy beteg egyedeiből, legalább 7 izolátum (AciHV) ismeretes (Kelley et al., 2005). Ezek két fajba oszthatók, mind szerológiai, mind filogenetikai elemzésekkel. Habár a törzsfa-rekonstrukciókról kiderül (18. ábra), hogy az AciHV-1 az ictaluri- és salmonivírusok vonalán helyezkedik el (Kelley et al., 2005; Waltzek et al., 2009; Doszpoly et al., 2011b), ám azoktól markánsan el is különül.

Egyelőre azonban nincs elegendő adat a vírus genomszerveződésére vonatkozóan ahhoz, hogy rendszertani besorolására javaslatot lehessen tenni. E vírus kutatása biztosan a jövő egyik érdekes témája lesz.

Az AHV-ok három nemzetsége közül kettőnek a tagjait nagyon eltérő gazdákból írták le. A *Cyprinivirus* nemzetség (leendő) tagjait megtalálták különböző főrendekbe (Elopomorpha, Ostariophysi) tartozó halakban. Az *Ictalurivirus* nemzetség tagjait pedig különböző alosztályokba (Chondrostei, Neopterygii) sorolt fajokban mutatták ki. Úgy tűnik, hogy az AHV-ok fő csoportjai nem a gazdafajok szerint különülnek el, akárcsak a *Herpesviridae* család tagjai. Elképzelhető, hogy az AHV-ok ősei még a halfajok elkülönülése előtt vagy azzal egy időben kezdtek divergálódni. Később a különböző csoportok vírusai függetlenül fejlődtek, és ezért megtalálhatók evolúciósan távoli gazdafajokban, az emlősök HV-aihoz hasonlóan.

Másik magyarázat arra, hogy közel rokon vírusfajok ilyen távoli halfajokat fertőznek, a gazdaváltás lehet (Kurobe et al., 2008). Ebben az esetben a kérdés az, hogy melyik eredeti gazdáról melyik új gazdába került a vírus, és melyikkel milyen hosszú ideig fejlődött együtt az evolúció során. Azon AHV-ok G+C tartalma, melyeknek teljes genomszekvenciáját ismerjük, 52.8 és 59.2% (van Beurden et al., 2010) közötti. Érdekes, hogy az AciHV-2 általunk vizsgált szekvenciájának G+C tartalma mindössze 38%. Egy hipotézis szerint a vírusok nukleinsavának csökkenő G+C tartalma gazdaváltásra utalhat, és az új gazdához való adaptálódás következménye lehet. Ezt a jelenséget már leírták több esetben, pl.: feline immunodeficiency virus (Poss et al., 2006) és canine parvovirus esetében (Shackelton et al., 2006). Továbbá az atadenovírusok (Benkő & Harrach, 1998; Wellehan et al., 2004) és siadenovírusok (Davison et al., 2000) esetében is megfigyeltek hasonló jelenséget. Az evolúciós előnye ennek a folyamatnak még nem teljesen világos. Valószínűleg a vírus így próbálja elkerülni a gazdaszervezet védekező rendszerét, csökkentve a CpG dinukleotidok számát (Davison et al., 2003).

A gazdaváltásra vonatkozó elméletet tovább erősíti az a megfigyelés, hogy az AciHV-2 okozta járványok során a mortalitás jóval magasabb (80%) mint az AciHV-1 által kiváltott betegség esetén (40%) (Watson et al., 1995). Továbbá az SbSHV mely közeli rokona az AciHV-2-nek, és szintén 38%-nak bizonyult G+C tartalma (Dospoly & Shchelkunov, 2010), 100% mortalitást is okozhat növendék tokoknál (Shchelkunov et al., 2009). Ezek a megfigyelések azt sugallják, hogy a gazda és vírus még nem töltöttek el túl sok időt együtt. Ezért jelenlegi ismereteink szerint, feltételezzük, hogy az AciHV-1 az acipenserid halfajok "saját" vírusa, ezt alátámasztja a virális DNS G+C tartalma (47,4%) és az alacsonyabb mortalitás. Az ictalurivirusok pedig az ictalurid halfajokkal koevolválódtak és gazdaváltással kerültek az acipenserid halfajokba.

Ugyanakkor meg kell jegyezni, hogy az ICHV-1 és 2 szintén magas mortalitással járó járványokat képes okozni intenzív haltenyészetekben. Elképzelhető, hogy ennek a víruscsoportnak egy másik haltaxon az eredeti gazdája, melyben a vírust eddig még nem figyelték meg, talán éppen azért, mert nem okoz megbetegedéseket.

7.2. ICHV-2 és SbSHV

Az ICHV-2 és SbSHV genomjának a DNS-polimeráz (ORF57+58) és a termináz első exonja (ORF62) által határolt génblokkját vizsgáltuk. Választásunk azért esett erre a régióra, mert az előbb említett két gén jól megőrzött szekvenciákkal rendelkezik, ezáltal konszenzus primerekkel könnyű volt felerősíteni egyes szakaszait. Az összes eddig vizsgált ictalurivírusban (AciHV-2, ICHV-1 és 2, SbSHV) jól megőrzötnnek tűnik ez a génblokk, melynek összehasonlító elemzése megerősítette a filogenetikai számítások eredményeit. Az öt géntermék hasonlósága a két ICHV típusban 56-80%. Egyértelműen kiderült, hogy az ICHV-2 is az *Ictalurivirus* nemzetségbe sorolandó, de nem egy faj az ICHV-1-gyel, amint azt korábban a szerológiai próbák alapján is megállapították (Hedrick et al., 2003). Az ICTV 2009-ben elfogadta a Herpesvirales Munkacsoport által benyújtott javaslatot, és az ICHV-2-t, mint önálló fajt az *Ictalurivirus* nemzetségbe tagolta.

Az ebben a régióban található, öt ORF egyértelmű homológiát mutat az *Ictalurivirus* nemzetség különböző tagjainál. Az ORF-ek irányultsága és pozíciója megegyezik, méretükben kisebb eltérések tapasztalhatók (8. táblázat). A 9. ábrán látható, hogy az ICHV-1 ORF60 homológjai megtalálhatók másik négy AHV genomjában: RaHV-1 (ORF84), RaHV-2 (ORF118), AngHV-1 (ORF52) és CyHV-3 (ORF80), de az utóbbi kettőben irányultságuk fordított. A ranid HV-okban a DNS-polimeráz (ORF72 és 110) és a termináz (ORF42 és 68) gén messze található ettől a génbloktól. Az ORF61-nek nincs homológja az AngHV-1 és CyHV-3-ban, míg a ranid HV-okban az ORF83 és 117, és ORF85 és 119 (RaHV-1 és 2) csak alig egyértelmű hasonlóságot mutatnak az ICHV ORF59 és ORF61-hez, inkább csak pozicionális megfelelők, akárcsak az ORF59 "homológjai" az AngHV-1 és CyHV-3 esetében. A CyHV-3 és AngHV-1 genomjában a DNS-polimeráz ebben a régióban helyezkedik el az ORF60 homológjának szomszédságában, viszont a termináz gén a genom távolabbi részében található. Ezek a genomszerveződésben talált különbségek is azt erősítik, hogy három csoport létezik a családon belül. Hiszen a filogenetikai számítások alapján elkülönülő leszármazási vonalnak a genomszerveződése is jelentősen eltér a többi csoportétól.

8. táblázat A vizsgált génblokk ORF-jeinek irányultsága és mérete (az SbSHV DNS-polimeráz génjének felerősítése más primerekkel történt, ezért nem hasonlítható össze a többivel)

ORF Irányultság	57+58 +	59 -	60 +	61 -	62 +
IcHV-1	1299	345	393	319	212
IcHV-2	1299	345	397	313	212
SbSHV	-	341	393	322	229
AciHV-2	1297	339	348	324	218

Az SbSHV 2006-ban jelent meg először oroszországi halgazdaságokban, komoly gazdasági károkat okozva. A fertőzés által kiváltott járvány során növendékhalaknál 100% mortalitást is tapasztaltak. A legfogékonyabb fajnak a lénai tok bizonyult, de a vírus egyéb tokféléket is megbetegített (Shchelkunov et al., 2009). A három vizsgált törzs a DNS-polimeráz és termináz gén részleges nt szekvenciája alapján nem mutat eltérést. Az SbSHV megfelelő génblokkjának szekvencia analízise azt mutatja, hogy nagyon közeli rokona az AciHV-2-nek. Annak egy kanadai törzsével, 99%-os nt azonosságot mutat a DNS-polimeráz és termináz gén szekvenciája. Sajnos a kanadai törzs egyéb ORF-jeiből nincs szekvencia adat. Az öt géntermék as hasonlósága az AciHV-2 (SRWSHV) fehérjéihez 89-95%. Szerológiai vizsgálatokra lenne szükség, hogy megállapítsuk, vajon az SbSHV és AciHV-2 azonos faj (típus) vagy nem, mindenesetre a nagyfokú szekvencia hasonlóság ezt sugallja.

Az általunk tervezett, specifikus, diagnosztikai primerek (3. táblázat), melyeket az SbSHV DNS-polimeráz génjére terveztünk, jól működtek izolált vírustörzseken. Jelenleg kipróbálás alatt állnak Oroszországban hal-mintákon. Ezenkívül összehasonlítása az orosz kutatók által kifejlesztett diagnosztikai, valósidejű PCR-rel szintén folyamatban van. Az első eredmények szerint a két módszer érzékenysége hasonló (Shchelkunov I.S. személyes közlése).

7.3. CyHV-1 és 2

Hazánkban először mutattuk ki a CyHV-1 jelenlétét PCR segítségével. A DNS-szekvencia adatok kinyerése után a világ más részein leírt törzsekkel összehasonlítottuk, és megállapítottuk, hogy a virális DNS-polimeráz génnek ezen a jól megőrzött szakaszán számottevő, azaz az as-szekvenciát is befolyásoló eltérés nem mutatható ki. Nukleinsav szinten bizonyos génbanki izolátumokkal 100%-os az egyezés, míg más törzsekhez viszonyítva minimális eltérés (1%) figyelhető meg, mely a tripletek harmadik tagjának variálódásából adódik. Elképzelhető, hogy kevésbé megőrzött genom szakaszokon nagyobb eltéréseket tapasztalnánk. Előreláthatólag hamarosan ismertté válik a CyHV-1 teljes genomszekvenciája is, és ekkor lehetőség nyílik majd egyéb gének, illetve géntermékek, például az immunogenitás szempontjából legjelentősebb envelop fehérjék és glikoproteidek összehasonlító vizsgálatára is.

Több évtizede tapasztalható hazánkban időnként tömeges elhullás ezüstkárász tenyészetekben. Az elhullások okát eddig nem sikerült kideríteni, ami részben a kárászok csekély gazdasági jelentőségével magyarázható. A CyHV-2 kimutatása az első alkalom e vírus hazai jelenlétének igazolására. Ezen túlmenően a világon elsőként írtuk le a CyHV-2 fertőzést ezüstkárászban. Korábban ezt a vírust csak aranyhalakban mutatták ki. Az ezüstkárász és az aranyhal nagyon közeli rokonságot mutató halfajok, sőt korábban egy egységes faj *Carassius auratus* alfajainak tekintették az ezüstkárászt (*Carassius auratus gibelio*) illetve az aranyhalat (*Carassius auratus auratus*). A HV-ok döntő többsége szűk gazdafaj-spektrummal rendelkezik, de nem különösebben váratlan, hogy ugyanaz a HV megtalálható e két nagyon közeli fajban. Aranyhalakban a CyHV-2 fertőzés nyomán kialakuló jellegzetes kóros elváltozások között van az eozinofil magzárványok és elhalásos góccok kialakulása a lépben, a vese vérképző szöveteiben, valamint a pancreasban és a belekben. A vérszegénység mellett a kopoltyúban krónikus branchitis jelentkezhet (Phylbey, 2006). A ezüstkárászban okozott klinikai tünetek, illetve betegség azonban valószínűleg eltér az aranyhalakban ismert kórképtől, és ennek tanulmányozását tervezzük a jövőben.

Az általunk szekvenált DNS-polimeráz szakaszra igazak a már a CyHV-1 esetében megállapítottak, azaz as szinten a vírus vizsgált szakasza tökéletesen megegyezett a korábban Nyugat-Európában, Észak-Amerikában és Japánban leírt törzsek megfelelő szakaszával. Nukleinsav szinten mutat csak minimális eltérést (1%) bizonyos törzsekkel.

7.4. Fehér tok-adenovírus

A világon elsőként kutatócsoportunk határozta meg egy halból izolált AdV teljes genomszekvenciáját. Ez az egyetlen, eddig ismeretes hal-AdV izolátum. Ezenkívül egyetlen más feltételezett hal-AdV-ből sem, sikerült egyetlen más kutatócsoportnak sem, akár egy rövid DNS-szekvenciát is nyerni. Így nem is vélhető bizonyítottnak az elektronmikroszkópos felvételek alapján feltételezett többi hal-AdV létezése.

A WSAdV-1 genomszerveződése jelentősen eltér a más állatokból és emberből izolált összes eddig megismert AdV-étől. Genomja a leghosszabb az eddig vizsgált AdV genomok közül, 48.395 bp. Az utána következő leghosszabbak az aviadenovírusok, FAdV-1, 8 és 9, továbbá TAdV-1 (43.804–45.413 bp). Már a doktori munkám kezdete előtt végzett, filogenetikai számítások arra engedtek következtetni, hogy ez a vírus nem sorolható be az akkoriban hivatalosan elfogadott négy nemzetség egyikébe sem (Benkő et al., 2002; Kovács et al., 2003). A teljes genom elemzése megerősítette ezeket az előzetes megállapításokat.

7.4.1. Genomszerveződés

7.4.1.1. ITR

A genom végeit, mint minden AdV esetében, ITR szekvenciák alkotják, melyek hossza 126 bp-nak bizonyult. Ennél hosszabb ITR-je csak bizonyos mastadenovírusoknak van. Az ITR-ek hossza általában nemzetségekre jellemző, de a különböző genusok tagjainál nagyon eltérő lehet. Az ITR-ek funkcióját főleg humán- és tyúk-AdV-oknál vizsgálták. A virális DNS replikációjának kezdetekor gazdasejt eredetű transzkripciós faktorok kötőhelyéül szolgál (Hatfield & Hearing, 1993; Hay et al., 1995; Van der Vliet, 1995). A DNS-replikáció megindulásához az úgynevezett mag (core) régióra van szükség, mely az ITR első 18 nt-ja (Challberg & Rawlins, 1984; Harris & Hay, 1988). Az eddig vizsgált ITR-ek 8–13. pozíciókban csak adenint és timint tartalmaznak, ez a rész a WSAdV-1 ITR-jére is igaz. Az ITR-ek 1. és 17. pozíciójában eddig mindig citozint találtak kivéve *Murine adenovirus 2* (MAdV-2) (Ramelli et al., 2011), ahol adenin van a 17. pozícióban, továbbá egy FAdV-1 törzsben az első pozícióban guanint találtak (Aleström et al., 1982). Az ITR-ek első 17 nt-ja nem tartalmaz guanint, kivéve a FAdV-1 (csak egy törzse), FrAdV-1 és EDSV (Dán et al., 2001). A WSAdV-1 ITR-jében a 17. pozícióban citozin található, viszont az első és ötödik nt guanin.

7.4.1.2. Fiberek

Az AdV-ok fibere felelős a virion elsődleges kapcsolódásért a sejtreceptorokon keresztül. Három fő részből állnak, farki, szár-, és feji régiókból. A fiberek farki része jobban megőrzött, mint a másik két régió (Szendrői et al., 2003). A szár-rész ismétlődő részekből épül fel. Az ismétlődések száma szerint meglehetősen eltérő hosszúságú fiberek léteznek.

A WSAV-1 genom bal végén az E1 vagy annak megfelelő régió teljesen hiányzik. Helyén négy ORF található (három a jobbra, egy a balra átíródó szálon), melyek a homológia kereső program szerint feltehetően fibert, vagy ahhoz hasonló fehérjét kódolnak. Jó minőségű elektronmikroszkópos felvétel nem készült a szabad virionokról, melyen láthatók lennének a fiberek, így a valós pentononkénti számukról nincs tudomásunk. Meglepő módon a hal-AdV fiber génjei az E2B régiótól balra helyezkednek el. Minden eddig vizsgált AdV genomban a fiber gén (vagy gének) a megőrzött középső régió jobb végén található, pontosabban az E3 régiótól jobbra, illetve ahol nincs E3 régió ott a pVIII-től jobbra. Az aviadenovírusok kapszidjának csúcsain két fiber található, a FAdV-1 genomja (és valószínűleg az eredeti TAdV-1 is) két fiber gént kódol, a többi tyúk aviadenovírus viszont csak egyet, de a kapszid csúcsain két fiber illeszkedik a pentonalaphoz. Ugyanakkor bizonyos humán és nem-emberszabású majom AdV-ok genomjában két fiber gén fordul elő, de ezek termékeiből mindig csak egy található egy csúcson (váltakozva).

A fiberek vizsgálata során több megőrzött, funkcióval bíró motívumot leírtak a fiber proteinek szekvenciájában. A KRAR motívum (a farki rész elején) felelős a sejtmagi lokalizációért (Hong & Engler, 1991), ezt a motívumot nem tudtuk azonosítani egyik fiber jelöltnél sem. A fiberek farki része az FNPVYP motívummal kapcsolódik a pentonalaphoz (Caillet-Boudin, 1989). A feltételezett 1-es és 2-es fiberben PIYP, a 3-asban PVYP motívumot azonosítottunk (20-22. ábra). E motívumtól "jobbra" (downstream) található az ismeretlen funkciójú PPF motívum, mely a 2-es fiberben megtalálható, illetve a 3-asban PIF motívumot találtunk.

A szár ismétlődéseket tartalmaz, az 1-es és 2-es fibereknél 14 ismétlődést, a 3-asnál 12-t feltételezünk (van Raaij et al., 1999). A fiberekben a fej és a szár találkozásánál elhelyezkedő TLWT motívumot (Chroboczek et al., 1992) csak részben tudtuk azonosítani, az 1-es fiberben TSVT, a 2-esben TL és a 3-asban TW motívumot látni (20-22. ábra). Az 1-es és 3-as, valamint a 2-es és 4-es fiber homológ gének valószínűleg valamelyikük duplikációjával jöttek létre (4-es esetben inverzióval), legalábbis erre utal az általuk kódolt as-ak pozicionális illesztése (23-24. ábra). A 4-es valószínűleg már nem fiberként működik, mert nem tartalmaz megőrzött motívumokat, és felismerhető szárismétlődéseket sem találtunk. Továbbá átíródásának iránya is ellentétes a többi fiber génével. Úgy néz ki, hogy a IVa2, DNS-polimeráz és pTP génnel alkot egy transzkripció egységet, poliadenilációs

szignált ugyanis csak itt találtunk a 4-es fibertől downstream irányba. A három, *r*-szálon kódolt fiber is valószínűleg együtt íródik át, a 3-astól downstream irányban azonosítottuk feltételezett poliadenilációs szignáljukat. A legnagyobb homológiát egyéb AdV fiberekkel a 3-as fiber mutatja. A 2-es és 4-es fiber C-terminális végén (feji régió) megőrzött domén (Concanavalin A) található, mely általában különböző glikoproteinekhez való kapcsolódásért felel. Ez a két fiber hasonlóságot mutat bizonyos ismeretlen funkciójú fág génekkel, mely alátámaszthatja azt a hipotézist, miszerint bizonyos fágoknak (*Tectiviridae*) és az AdV-oknak közös őse volt (Rux et al., 2003).

MAATPIYPGWKPQDKLMTAMYFAEGLDMIPRI farok

LTL	YLKVDGEA	LVI	VGGQ	
LTI	SDHAFS	LLL	PGLG	
TKF	SAIPG	KVR	IDMNYG	
VGL	KTYNGAAG	LKF	VDTFRIQANQ	
LLV	DTNVP	LTH	YEGLLIDID	
LST	MFF	LDN	PKGTKI	
LSV	MAITPKAN	LPL	TIANTNVS	
LGV	GDGLQVINNA	LTL	KTSTAAFTQSPT	szár
LAL	VDKTA	LDW	EGQGISP	
IYY	RRDIAQMEMWTHPNNFVPSSH	LYL	STEYFPRTY	
LYT	AKNNT	LTY	KTASGTVGTTPCQ	
LIL	ARCG	LMM	ACQVSIDD	
LQV	AANFPISFY	LRQ	QDLDK	
LPD	DPYPFVEST	VPF	VQGVMMKGQAYVI	

TSVTNQQQQYRYMAYTEIGNYSSQM fej
 YLNVFIPNPVNQVVGSSIKIVFGTLVGYCRQDRGSFWPPNNVYID

20. ábra Az 1-es fiber as sorrendje és feltételezett szerkezete. A megőrzött motívumok félkövér betűtípussal és aláhúzással jelölve.

MGTPIIYPYIPVEPKAMPPFYGAGLKEEDDT

farok

MTL	MMDINTDQ	FVL	TPELNLKSP
IVP	DKYRAD	LSK	FYV
IAI	GGSSNG	VGY	GCYEKPVDYS
LAE	NQPDPRIFQ	LGR	FGLSSPSDEFNFN
YIR	NVTPTTTGYG	LNF	NKFRTFDDAN
LKL	IPAMPC	LDH	AQNMFEYSA
LST	KFKKKNGG	TVG	YGLYVAKR
LLP	YIPSDYNI	LLV	PCAFGESGFVQPP
IFP	VKDP	LVN	GQYDAVR
LDI	SNGTDNKSP	LWG	ADLPIAKQIDRIKYV
LNL	NPLNKLMG	ILW	TEGVQATGQKIAQH
LQS	TSEFVTWSNVQ	LAP	ISSQ
LLN	QKVNWIFTSG	TKY	TYAQNFIFRRKYQPR
LMD	LSSIYG	NYA	WISNNIGGEFVDSLIT

szár

TLGGYSETSDINANAFNDTK YFSAAAMVHSVSFAIAQSILVSWLDMKT
EYIEWGPEFTDSNSKCGPPIKKTSSGRFDILLDNTDSLFCWLMWDDKQA
LDTNFAPDTAVVKVHTKVERPTSAAMIGFISVPNYARNVLNINGDSPVTE
YISVSLPPANFEVLTAHIAFKIDNITNVSGADAEVLISIEHIDPKRQGY
LKYACNDEYSFRLNFEFDNVESQLNVYGTGLGAPTGVWNSLTVIVDMVS
DNMRMFFNGSILEGGSLKELQLLDIKRFTIGALDGGSNGTAGYISEVRL
YDKMLTEEEVANLHAMTVSNFLY

fej

21. ábra A 2-es fiber as sorrendje és feltételezett szerkezete. A megőrzött motívumok félkövér betűtípussal és aláhúzással jelölve.

MAKRTRTDTPVYPEVDHAPKVIPIFYGDGLKQDE

farok

LTL	MINADPKT	FSF	TSDGA
LTL	SGGSSG	IGT	NYVGGDG
INL	EVVDDK	TKK	VSVQPAPNGG
VAV	DSSGVK	VKV	SEP
LTV	DEGGIG	IMI	SDGIKIDENGH
LGV	NYDPDTMG	LNS	TGALTVTNAKVN
LQA	TPP	LTV	ANNTIS
LST	GDGVTTTENK	LSL	NISNDFVFRDSM
LDL	AKAPVRTVTQP	LIL	NAAHAVA
LQT	GPSNFGVQNG	VLY	QNTKYFPRSRVGA
FSG	NVTIASAANDP	YIL	PMRFNLVKTGQICS
FIF	NSFTINNGTQP	VKF	PITMNIS

szár

AGWTSPNSADTTTFQPGRVRMLMPVQGICTIKAGTGNTYFGRFELNNLQFGD
GFTFKISVLDATININTPSIYFDSVIFPCQVSRSEKYAPAGVYFD

fej

22. ábra A 3-as fiber as sorrendje és feltételezett szerkezete. A megőrzött motívumok félkövér betűtípussal és aláhúzással jelölve.

```

fiber_2 : MCTPIY-PYIPEEP-KAMPPFYG-----AGLKEEDDTMTLMMD : 36
fiber_4 : MATPMKRPYLSAESGDALRTPYHGMVDTRPNFADCPTPDSVNCFRGLTVKDNQLTLNID : 60
M TP6 PY6 E A6 Y GL D1 6TL 6D

fiber_2 : INTDQE-----VLTPEELNLKS-----PIVPEPKYRADLSKEY : 67
fiber_4 : PHTLGFENNLGQLAVIGVDKNGLNTPEGLNPPSGVGGGGGGPLPDDNLPEPEVDLTPPOKYY : 120
T F 6 TP LN S P K5Y

fiber_2 : VIATGGSSNGVGYGCEYKPVDSYSLAENQEDDRIFQLGRFGLSSPSDEENFN--YLRNVTP : 125
fiber_4 : VITLGGANCVGYGTSG--YNELDPTNREHRSRIKQLGRFNQTLNMDAVADIGGYSRYVDD : 178
VI I G N VGYG 15 N P RI QLGRF 3 D Y R V

fiber_2 : TTTGYGLNENKERTFDDANLKLIPAMPCLDHAQNMF EYSALSTKFKKKNGGTVGYGLYVA : 185
fiber_4 : ISTGYGTAINHERSQIGN-LAVLPATPCLDHAQNMFYELFHDG---AQS GGSVGFGLAMA : 234
3TGYG N FR3 L 66PA PCLDHAQNMF GG3VG5GL 6A

fiber_2 : KRLLPYIPSDYNILLVPCAFGESGFVQPPIFPVKDEPLVNGOYDAVRLDISNGTDNKSPLW : 245
fiber_4 : KRLLPELEADYDILLVPCAYGNINFSN-----MNNQVFDELTLDIIG-LSKEPGNW : 284
KRLLP56P DY1ILLVPCA5G 3 F 6 N 5D 6 LDI W

fiber_2 : CADLPIAKQIMIDRIKYLNLNPLNKLMLGILWTEGVQATGQKIAQHLQSTSEFVWTSNVQL : 305
fiber_4 : KANNPLAQOCLARTEFALNMMPHNMFCCMIWSEDIITDISETAETHYLELQREIESEFNMF : 344
A1 P6A Q 6 R 5 LN6NP N 66W3E 6 2 H F6 N

fiber_2 : APISSQLLNQKVN-WIETSQTKRYTAQNFIG-----FRRKYQPRMLDLSIYGNVYAW : 356
fiber_4 : SGRVDDLLTQGIKPIVLSPPGRQOQYVVTNSKLMQEDYARRPTESRSETLCTKLSAYIT : 404
LL Q 6 WI S 4 5 RR 2 R L 3 Y

fiber_2 : ISNNIGGEFVDLSITTLGGYSETDSDINANAENDTK--YFSAAAMVHVSFALAQSIIVS : 414
fiber_4 : LGQMYNITYIDCSVVPDGLSLIDNRSVADTGLDAFYGDYFSTKSQTLTIKNIADVIIQD : 464
6 56D S6 G 1 6 1 YFS 6 6 IA I6

fiber_2 : WLDMKTEYIEWGPFEFTDSNSKCGPPIKKTSSGREFDILLDNTDLSLFCMLMDDDEKALDTN : 474
fiber_4 : ILLGESPETFMLSTLPLSNPYGYAHYKKAIGEVDFFLNGVQSLKYWQDEFTGKIEGFEDET : 524
L 3 W SN G K G D L1 SL W 5 2 D

fiber_2 : FAPDTAVVKVHTKVER-PTSAAAMIGFTSVEN-YARN-----VLNINQDSDSPVTE : 520
fiber_4 : SNLVTPETEGKPTIVKETPNNHFTLTYVGTLNQFESKQSLRMGLLDDDAIPEIPEDSLLSD : 584
T T V P 6 56 N 5 4 I DS 63

fiber_2 : YISVSLLPANFEVLTAAHIAFKIDNITNVSGADAEVLISIEHIDPKRQGYDKYACNDEYS : 580
fiber_4 : YIKLTETTTDVYDSFTFFCVCKP--LTYLONGSAVTLASIVGKALECOLMIQNEAIKVV : 642
YI 63 P 5 T K IT 6 A L SI Q 6

fiber_2 : FRLNFEEDNVESQLNVYGTGELGAPTVGNNSLTVIVDMVSDNMRMFENGSLLEGGSLKKE : 640
fiber_4 : AASSSSSEEFTEVATFFYGLIACCPITNKM--MSVAFSWDNDYLTFLVNGQLIBKIQCSFD : 700
YG E G T W 63V D 6 6F NG 66E

fiber_2 : LQLLDIKRFTIGALDG--GSNGTAGYISEVRLYDKMLTEEEVANLHAMTVSNFLY- : 693
fiber_4 : FSGTELESYLGVDSTKVGSGPFOGLISELRVYKEPLSASEVRNLHMTTCVPEVYTY : 756
I IG GS G ISE6R6Y L3 EV NLH MT 56

```

23. ábra A 2-es és 4-es fiber pozicionális illesztése.

```

      *           20           *           40           *           60
fiber_1 : -----MAATPIYFGWKPODKLMTAMYFAEGLDMI PRI LTLTYLKV DGEALVIVG-GQLTIS : 54
fiber_3 : MAKRTRTDTPVYBEVDHAPKVIPIE-IFYGDGLKODE--LTLMINADPKTFSFTSDGALTLS : 57
          TP6YP           K66 655 GL           LTL 6 D           G LT6S

      *           80           *           100          *           120
fiber_1 : DHAESL---LLPGLGTFKFSATIPG---KVRIDMNYGVGLKTYNGAAGLKEFVDTFRIQANQL : 108
fiber_3 : GGSSGIGTNYVGGDCINLEVVDDKTKKVSQPAENGVAVDSSGVKVKVSEPLTVDEGGI : 117
          6           6 G G           6           KV 6           G6           6K           6 6

      *           140          *           160           *           180
fiber_1 : LVDTNVPLTHYEGLLIDIDLSTMFELDNPKGTKILSVMAITPKANLPLTIANTNVSLGVG : 168
fiber_3 : GIMISDGLKIDENGHILGVNYDPDTMGLNISTCALTVTNAKVNLOQATPLTVANNTISLSTG : 177
          6           6 E 6 61           N G 63 6 A PLT6AN 6SL G

      *           200          *           220           *           240
fiber_1 : DGLOVINNALTKTSTAAETQSETLDAIVDKTALDMEGQGISPIYYRRDIAQMEMMWHHPNN : 228
fiber_3 : DGVTTTENKLSLNISNDFVERDSMLDLAKAPVR-----TVTQPLILNAAHAVALQTGPSN : 232
          DG6 N L3L S           L L           63           6 6 T P N

      *           260          *           280           *           300
fiber_1 : F-VPSHLYLSTEYFPRTYLYTAKNNTLTYKTASGTVGTTPCQLILARCGLMMACQVS-- : 285
fiber_3 : FGVONGVLYONTKYFPRSRVGAFFSGN-VTIASAANDPYILEMRENLVKTKGICSFIFNSE : 291
          F V LY T YFPR3 6 N 6T 3A P L 4 G 6

      *           320          *           340           *           360
fiber_1 : -IDDLOVAANFPISEYLRQDDLKLPDDPYEVEVESTVFFVQGVMMKGOAYVITSVTNQQQQ : 344
fiber_3 : TINNGTQPVKFPITMNLISAG-WTSPNSADTTEQPGRVRMLMPVQG-----ICTIKAGTG : 344
          I11 FPI3 6 F V 6 V

      *           380          *           400           *           420
fiber_1 : YRYMAYTEIGNYSSQMYLNVETIPNPNVQVVGSSIKIVFGTLVGYCRQDRGSEFMPNNVYI : 404
fiber_3 : NTYEGREFEINNLQFGDGETEKISVLDATLININTPSIYEDSVIFPCQVSRSEKYAPAGVYE : 404
          Y E6 N I 6 3 I F 366 C R 5 P VY

fiber_1 : D : 405
fiber_3 : D : 405
          D

```

24. ábra Az 1-es és 3-as fiber pozícionális illesztése.

7.4.1.3. E2 régió

Az E2 régió génjei a WSAdV-1 genomjában ugyanúgy lokalizálódnak, mint minden más AdV esetében. A DBP mely az E2A régió génje, jóval rövidebb, mint az eddig megismert AdV-oké, mindössze 317 as hosszú és splicing helyet sem sikerült azonosítanunk. Az avi- és siadenovírusok esetében a DBP mRNS-e splicing mechanizmussal két exonból épül össze. A C-terminális végén leírt cink-kötő motívum (Eagle & Klessig, 1992) megtalálható a WSAdV-1 DBP-jének származtatott as szekvenciájában is.

Az E2B régióban kódolt terminális protein a virális DNS-szálak 5' végéhez kovalensen kötődik. Funkciója a DNS megkötésén kívül a polimeráz szabályozása (Webster et al.,

1997). A vírus érése során a proteáz enzim három helyen hasítja HAdV-2-ben (Webster et al., 1994). A WSAdV-1 pTP génjében is sikerült a három feltételezett hasítási helyet azonosítanunk a 177. 284. és 322. as pozícióban. A proteolitikus hasítási helyek as szekvenciája a következő: LIGS'G, LSGA'G, MLGG'M. A vágáshelyek általános elemzését lásd később.

A pTP mRNS-e minden AdV genomjában splicing mechanizmussal keletkezik. A WSAdV-1 pTP génjét vizsgálva is sikerült azonosítanunk a splicing helyet. Ezek szerint, ugyanúgy mint minden más AdV-ban, a pTP első három as-a az *l*-szálon a pIIIa és penton gén között van kódolva. A WSAdV-1 pTP-je 718 as, ez hosszabb, mint a másik négy nemzetség tagjaiban.

Az AdV-ok DNS-polimeráz génje a B polimerázok családjába tartozó enzim (Knopf, 1998). A polimeráz kapcsolódik a pTP-vel, majd az így kialakult komplex az ITR mag régiójához kapcsolódik és megindul a DNS-szintézis (Brenkman et al., 2002). A DNS-polimeráz génnek vannak jól megőrzött régiói, melyekre detektáló illetve diagnosztikai PCR primereket lehet tervezni (Wellehan et al., 2004). A PCR során felerősített szakasz nt sorrendje elég variábilis, ezért alkalmas előzetes filogenetikai számításokra (Jánoska et al., 2011). DNS-polimerázok mRNS-ének érése során splicing-ot eddig csak mastadenovírusoknál írtak le (Davison et al., 2003). A WSAdV-1 DNS-polimerázának hossza 1166 as, átlagosnak tekinthető, splicing-ra utaló szekvenciákat nem találtunk.

A IVa2 a korai és késői kifejeződés között úgynevezett átmeneti időszakban fejeződik ki. Funkcióját tekintve segít a kapszid összeszerelődésében és a DNS becsomagolásban (DNA packaging) (Zhang & Imperiale, 2002), továbbá a késői fő promóter (MLP) aktiválásában is részt vesz (Lutz & Kedinger, 1996). A mastadenovírusoknál megőrzött GPTGSGKS szekvencia, ami feltételezett nukleozid-trifoszfát kötőhely motívum (Gorbalenya & Koonin, 1989), a WSAdV-1 IVa2-jében is felismerhető: GPTRSGKS.

7.4.1.4. L régió

Az *r*-szálon kódolt késői gének az MLP-ről íródnak át. A proteáz gén egy endopeptidáz enzimet kódol, ami proteolitikus hasításokat végez bizonyos virális prekursor fehérjéken: pTP, pIIIa, pVI; pVII, pX, pVIII. Az enzim aktivitásért felelős as-ak (triád) pontjait először HAdV-2-nél azonosították: H54-E71-C122 (Ding et al., 1996). A később vizsgált vírusoknál (beleértve a nem HAdV-C fajhoz tartozó HAdV-okat is) azonban legtöbbször a glutaminsav (E) helyett aszparaginsavat (D) találtak. A WSAdV-1 proteázában azonosítottuk a H55-D72-C122 triádot. Továbbá létezik a 137-es pozícióban lévő prolin is, melyet minden

mastadenovírusban megőrzöttnek találtak. A kutatások szerint szerepe van a vírus encapsidációban (Rancourt et al., 1995). Aviadenovírusokban nem található prolin a 137. pozícióban (Chiocca et al., 1996; Ojkic & Nagy, 2000) és atadenovírusokban (madár és ovine) (Harrach et al., 1997; Barbezange et al., 2000), továbbá a THEV-ben sem (Pitcovski et al., 1998). Viszont FrAdV-1-ben (Davison et al., 2000), valamint a SnAdV-1-ben megtalálható (Farkas et al., 2002). Egy másik fontos as-at a 104-es pozícióban található ciszteint szintén azonosítottuk. A HAdV-2-ben ez a reziduum létesít diszulfid hidat a pVIc (a pVI-ből lehasított harmadik polipeptid) 11 as-ból álló kofaktor 10-es ciszteinjével, ezáltal több ezerszeresére fokozva a proteáz enzim aktivitását (Webster et al., 1993). Három tipikus proteáz vágáshelyet azonosítottak eddig: az I-es típusút (M/L/I)XGG'X és a II-es típusút (M/L/I)XGX'G (Anderson, 1973; Webster et al., 1989). Majd OAdV-7-ben írták le először a III-ast (M/L/I)XAX'G. Később a II-es típus egy másik változatát, a IIb-t (NTGW'G) is megfigyelték a pVII fehérjénél, méghozzá valamennyi AdV nemzetség tagjainál (Vrati et al., 1996). A WSAdV-1 fehérjében I-es és II-es (IIb) típusú hasítási helyek találhatók.

Az 52K fehérje a virionok összeszerelődése során játszik szerepet (Hasson et al., 1992), hossza a WSAdV-1 esetében 353 as, ami közepes méretűnek tekinthető.

A pIIIa fehérje összeköttetést létesít a pVII-es fehérje és a peripentonális hexonok között (San Martin & Burnett, 2003). Több típusú proteolitikus vágáshelyet is leírtak a pIIIa esetében különböző AdV-okból (Vrati et al., 1996). WSAdV-1 pIIIa-jában nem találtunk tipikus hasítási helyeket.

A pentonalap és a fiber együtt alkotják a csúcsi kapszomereket. Az RLSNLLG fiber-kötő motívumot (Roberts et al., 1986) a WSAdV-1-ben is megőrzöttnek találtuk: RLSNILG.

A pVII fehérje, mely igen nagy kópiaszámban található a virion magjában a DNS-hez kötődve, a WSAdV-1 genomjában nagyon rövidnek bizonyult, mindössze 24 as szemben az eddig jellemzettekkel (72-160 as) Mindössze egy IIb típusú (STGW'G) proteolitikus hasítási helyet sikerült azonosítani, szemben a többi AdV-nál leírt kettővel.

A pX fehérje, a legkisebb szerkezeti fehérje (μ) prekuzora, szintén nagyon rövid, 34 as (71-214 as a többi nemzetségnél). Általában egy proteolitikus hely van a N-terminális régióban, ez megtalálható a WSAdV-1-ben is, MRGG'F. Bizonyos mastadenovírusban a pX N-terminális végén is találtak hasítási helyet (Rusvai et al., 2000), míg az aviadenovírusokban három feltételezett proteolitikus felismerési helyet is azonosítottak (Sheppard & Trist, 1993; Chiocca et al., 1996). Bár ez utóbbi fehérje hossza a proteolitikus hasítás előtt jóval rövidebb, mint az eddig megismert AdV-oké, a hasítás után keletkező termék hossza átlagos méretűnek tűnik.

A pVI-os fehérje mérete átlagos a WSA_{AdV}-1-ben, az N-terminális vég közelében található egy II-es típusú proteolitikus hasítási hely, a C-terminális végén szintén egy lehetséges vágáshelyet találtunk, melynek szekvenciája (FCGR'G) minimálisan eltér a megszokottól. Ennél a vágáshelynél történő hasításnál viszont létrejön a 11 as-ból álló pVIc kofaktor peptid (GVSYSKLRKCY), amit először HAdV-2-ben írtak le, majd később minden eddig ismert AdV-ban. Ennek konszenzusa: G(V/L)XXXXXXXXC(F/Y) (Webster et al., 1993). Ezért igen valószínű, hogy bár eltér ezen vágáshely szekvenciája a konszenzus szekvenciától, mégis működő hasítási hely.

A kapszid fő alkotóeleme a hexon, mely szerotípus-, faj- és nemzetségspecifikus epitópokat is hordoz (Norrby & Wadell, 1969; Willcox & Mautner, 1976; Ádám et al., 1996). Bizonyos részei jól megőrzöttek, alkalmasak a vírusok tipizálására, filogenetikai számításokra, de vannak hipervariábilis régiói, melyek a szerotípus-specifikus epitópokkal rendelkeznek (Toogood & Hay, 1988; Weber et al., 1994; Sheppard et al., 1995; Crawford-Miksza & Schnurr, 1996; Reubel & Studdert, 1997). A WSA_{AdV}-1 hexonjának mérete az eddig megfigyelt tartományba esik.

A 100K fehérje a hexon polipeptidek kapszomerré építésében játszik szerepet, de az érett virionban nem található (nem-struktúr fehérje) (Riley & Flint, 1993). Génje átfedésben van a 33K és 22K fehérjéket kódoló génnel, de másik leolvasási keretben van kódolva.

A 33K fehérje a virionok összeszerelődésénél játszik szerepet, továbbá leállítja a gazdasejt fehérjeszintézisét (Fessler & Young, 1999). Splicing mechanizmus után kerül sor az mRNS fehérjére fordítására, a WSA_{AdV}-1 33K génjében is sikerült azonosítani a splicing helyeket. A 22K fehérje (mely a 33K splicing nélküli variánsa) az MLP aktiválásában játszik szerepet. Ez utóbbi három gén, sem lokalizációjában, sem méretében nem mutat eltérést a másik négy nemzetség tagjában megfigyeltektől.

A pVIII prekursor protein mely a kapszidot és magot köti össze 270 as hosszúságú, mely az eddig leírt második leghosszabb a SnAdV-1 után (Farkas, 2005). Hat lehetséges, II-es típusú (M/L/I) XGX'G proteolitikus felismerési helyet sikerült azonosítani a WSA_{AdV}-1 pVIII génjében. Nagyon gyenge (nem szignifikáns) homológiát mutat más AdV-ok pVIII-asaihoz. Inkább a genomban elfoglalt helye miatt gondoljuk, hogy ez az ORF kódolja a pVIII-at.

Az U exon a már korábban leírt négy nemzetség majdnem minden vírusában megtalálható (Davison et al., 2000). Bizonyos mastadenovírusokban nincs jelen, pl.: porcine adenovirus 5 (PAdV-5) (Nagy et al., 2001), a MAdV-1 (Meissner et al., 1997), valamint a BAdV-10 (Ursu et al., 2004), ezek feltehetően elvesztették ezt a gént az evolúció során. A WSA_{AdV}-1-ben nem sikerült azonosítani az U exont. A különböző nemzetségek vírusai által kódolt U exonok között nagyfokú az eltérés (Davison et al., 2000), elképzelhető, hogy ezért

nem tudtuk azonosítani, hiszen a WSAdV-1 az *Ichtadenovirus* nemzetség első és egyetlen tagja.

A mastadenovírusok IX-es és V-ös fehérjéit kódoló ORF-ek, mint ahogy a mastadenovírusokon kívül más nemzetségeknél sem, a WSAdV-1-ben sem találhatóak.

7.4.1.5. A genom jobb vége

A genom jobb oldalán, az utolsó megőrzött géntől, a pVIII-tól jobbra, 28 olyan ORF-et találtunk, amelyeket a származtatott fehérjékük mérete (63–379 as) alapján géneknek feltételezünk. A túlnyomó többségük által kódolt fehérje nem mutat homológiát semmilyen ismert fehérjével. Kivételt mindössze öt ORF képez. Az ORF5 és 6-nak elnevezett valószínűsíthető fehérje a parvovírusok nem-strukturális (NS) fehérjéjével mutat hasonlóságot. Az AdV-ok közül hasonló géneket eddig csak aviadenovírusokban találtak. Megjegyzendő azonban, hogy ezek a homológok az aviadenovírusok genomjának a bal oldalán találhatóak. Funkciójuk egyelőre ismeretlen az aviadenovírusok esetében. Mindazonáltal ezen parvovírus NS géneknek DNS-helikáz és ATP-áz aktivitását is leírták (Wilson et al., 1991). A WSAdV-1-ben az ORF5 és 6 valószínűleg génduplikációval jött létre, legalábbis erre enged következtetni származtatott fehérjékük pozicionális illesztése. Arra vonatkozóan, hogy ezek a gének mely vírus genomjából kerültek a másikba, csak találgatni lehet. Elképzelhető, hogy a parvovírusokból (dependovírusokból) kerültek az AdV-okba, de elméletileg történhetett fordítva is. Az is lehetséges, hogy az adeno- és parvovírusok függetlenül jutottak ezen génekhez, például a gazdaszervezetekből, vagy valamilyen társ-mikróbából.

Az ORF25 származtatott fehérjéje két immunglobulin domént tartalmaz. Hasonló domént tartalmazó gént eddig szintén csak aviadenovírusokban írtak le, de azokéval nem mutat homológiát. Nem csak immunfehérjék tartalmaznak ilyen doméneket, hanem különböző sejtfelszíni receptorok is. Az ORF25 a GenBanki adatbázisban halak idegsejtjének adhéziós molekulájával mutat hasonlóságot.

Az ORF4 és 9 szulfotranszferázokat kódoló génekkel mutat hasonlóságot. Nincs róla tudomásunk, hogy hasonló géneket találtak volna vírusokban. A homológia keresés során az ORF9 specifikusan a halak szulfotranszferáz génjével mutat hasonlóságot. Ez arra utal, hogy a vírus valószínűleg a gazdaszervezet genomjából vette fel a gént.

A többi 23 ORF feltételezett terméke semmilyen eddig publikált gén vagy ORF által kódolt fehérjével nem mutat homológiát, tehát ezek eredetére és/vagy funkciójára vonatkozóan nincs semmilyen feltételezésünk se.

A teljes genom mérete a korábban vizsgált AdV-ok esetében nemzetségenként jelentős eltéréseket mutat. A három siadenovírus genomja a legkisebb, 26 kbp körüli. Az eddig

elemzett atadenovírusok DNS-e 29–33 kbp közötti. A mastadenovírusok genomja 30–37 kbp, az aviadenovírusoké 43–45 kbp között van. Munkám kezdetekor az volt a hipotézisünk, hogy az AdV genommérete növekvő tendenciát mutat az egyre magasabb rendű gazdáiban (Benkő & Harrach, 2003). Ezáltal a vírus egyre több gént kódolva, hatásosabban tudja felvenni a versenyt a magasabbrendű gerincesek fejlettebb immunrendszerével. Ekkor még úgy gondoltuk, hogy a siadenovírusok a kétélűekkel együtt fejlődött AdV leszármazási vonalnak felelnek meg. Ezek alapján azt vártuk, hogy a hal-AdV genomja lesz a legrövidebb. Meglepő módon, ennek az ellenkezője bizonyosodott be, a WSAdV-1 genomja (48 kbp) az eddig leírt leghosszabb.

A WSAdV-1 teljes genomjának G+C tartalma 42,6%. Ez az érték pont a határán van a mastadenovírusok (43,6–63,9%) és a nem hulló atadenovírusok (33,6–43,0%) G+C tartalmának, jóval alacsonyabb, mint az aviadenovírusoké, és magasabb, mint a siadenovírusoké. Ez alapján nem lehet egyértelműen kijelenteni, hogy a WSAdV-1 esetében történt-e gazdaváltás, lásd a HV-oknál már tárgyalt G+C tartalom csökkenés és gazdaváltás teóriát. Egy másik hipotézis szerint a vírus G+C tartalma hasonlít a gazdaszervezet G+C tartalmára (Harrach, 2000). Mivel a hidegvérű állatok genomjának alacsony a G+C tartalma, ez magyarázhatja a WSAdV-1 alacsony G+C tartalmát.

7.4.2. Rendszertan

A hipotézisünk szerint az AdV-ok a gazdafajaikkal együtt evolválódtak az évmilliók alatt. Ennek a koevolúciónak láthatjuk ma az eredményét. Mastadenovírusokat mindezülig csak emlősökből írtak le, míg aviadenovírusokat csak különböző madaraktól. Minden bizonnyal ezek a vírusok a fent említett fajokkal fejlődtek. Az atadenovírusokat először kérődzőkben írták le, majd madarakban. Ezeknek a két különböző osztályba sorolt gazdából származó AdV-oknak a genomjában az A+T tartalom igen magas, és ezek a vírusok gyakran okoznak súlyos betegségeket (Benkő & Harrach, 1998). A pikkelyes hullókból izolált AdV-ok célzott vizsgálatakor kiderült, hogy azok genomjának G+C tartalma kiegyenlített, noha genomszerveződésük az atadenovírusokéra jellemző (Farkas et al., 2002). Feltételezhető, hogy az atadenovírusok eredetileg a pikkelyes hullókkal fejlődtek, és később gazdaváltások útján jutottak egyéb osztályok (emlősök és madarak) képviselőibe. Az eltolódott bázisösszetétel a gazdaváltás következménye lehet (Harrach, 2000; Benkő & Harrach, 2003). Többféle hullóvonal AdV-ainak vizsgálata alapján, jelenleg az atadenovírusokat a pikkelyes hullókkal (Squamata) együtt fejlődött leszármazási vonalnak tekintjük (Wellehan et al., 2004; Rivera et al., 2009). A siadenovírusoknak, jelenlegi ismereteink szerint, nem tudjuk az eredeti gazdafaját. Ugyanis mind a madaraktól, mind a békától, mind pedig a sulawesi

teknősökből kimutatott siadenovírusok G+C tartalma igen alacsony, tehát ezekbe a gazdába valószínűleg gazdaváltással jutottak.

A filogenetikai számítások azt mutatják, hogy a négy, korábban hivatalosan elfogadott nemzetség és a WSAAdV-1 jól elkülönül egymástól. A különböző gének illetve fehérjék alapján számított törzsfák topológiája némileg eltérő lehet, de a WSAAdV-1 mindig önálló leágazáson foglal helyet. Ezen számítások és a már ismertett, jelentős genomszerveződésbeli eltérések alapján, kutatócsoportunk javasolta, hogy a WSAAdV-1 számára hozzanak létre egy új fajt (*Sturgeon adenovirus A*), sőt egy új AdV nemzetséget *Ichtadenovirus* néven. Az ICTV 2009-ben elfogadta a kutatócsoport javaslatát és ezzel ötre nőtt az *Adenoviridae* család nemzetségeinek száma.

8. Új tudományos eredmények és megállapítások

1. A világon elsőként határoztunk meg és elemeztünk egy tokféléből (*Acipenser transmontanus*) izolált herpeszvírus (AciHV-2) genomjából egy jelentős méretű, a genom kb. 50%-át kitevő szakaszt (66 kbp).
2. Elsőként közöltünk DNS-szekvencia adatokat a fekete törpeharcsa (*Ameiurus melas*) herpeszvírusából (IcHV-2).
3. A két, újonnan jellemzett vírushajt, az AciHV-2-t és IcHV-2-t az *Alloherpesviridae* család *Ictalurivirus* nemzetségébe sorolták, melyhez a hivatalos javaslat az általunk készített törzsfa-rekonstrukción alapult.
4. A lénai tokból (*Acipenser baeri*) izolált herpeszvírus (SbSHV) genomjából a világon elsőként határoztunk meg egy DNS-szakaszt. Ennek elemzésével megállapítottuk, hogy az SbSHV nagyon közeli rokona az AciHV-2-nek, valószínűleg ugyanannak a vírushajtnek egy eltérő izolátuma.
5. Hazánkban először mutattuk ki PCR segítségével a CyHV-1 és 2 jelenlétét. A világon először találtuk meg a CyHV-2-t a megszokott gazdától eltérő (jóllehet közeli rokon) halfajban, az ezüstkárászban (*Carassius gibelio*).
6. A világon elsőként határoztuk meg az egyetlen máig ismeretes hal-adenovírus izolátum (WSAdV-1) teljes genomszekvenciáját.
7. Kutatócsoportunk javaslatára az *Adenoviridae* családon belül létrehozták az *Ichtadenovirus* nemzetséget a hal-adenovírus besorolásához.

9. Irodalomjegyzék

- Ádám É., Nász I., Lengyel A.: **Characterization of adenovirus hexons by their epitope composition**, Arch. Virol., 141. 1891-1907, 1996.
- Alborali, L., Bovo, G., Lavazza, A., Cappellaro, H., Guadagnini, P.F.: **Isolation of a herpesvirus in breeding catfish (*Ictalurus melas*)**, Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol., 16. 134-137, 1996.
- Aleström, P., Stenlund, A., Li, P., Pettersson, U.: **A common sequence in the inverted terminal repetitions of human and avian adenoviruses**, Gene, 18. 193-197, 1982.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. Lipman, D.J.: **Basic local alignment search tool**, J. Mol. Biol., 215. 403-410, 1990.
- Anders, K.: **A herpesvirus associated with an epizootic epidermal papillomatosis in European smelt, *Osmerus eperlanus* L.** In: *Viruses of Lower Vertebrates*. Szerk.: Ahne, W., Kurstak, E. Heidelberg: Springer-Verlag, 1989. p. 184-197.
- Anderson, C.W., Baum, P.R. Gesteland, R.F.: **Processing of adenovirus-2 induced proteins**, J. Virol., 12. 241-252, 1973.
- Aoki, T., Hirono, I., Kurokawa, K., Fukuda, H., Nahary, R., Eldar, A., Davison, A.J., Waltzek, T.B., Bercovier, H., Hedrick, R.P.: **Genome sequences of three koi herpesvirus isolates representing the expanding distribution of an emerging disease threatening koi and common carp worldwide**, J. Virol., 81. 5058-5065, 2007.
- Barbezange, C., Benkő M., Dán Á., Harrach B.: **DNA sequencing and phylogenetic analysis of the protease gene of ovine adenovirus 3 suggest that adenoviruses of sheep belong to two different genera**, Virus Res., 66. 79-80, 2000.
- Bartha A.: **Dropped egg production in ducks associated with adenovirus infection**, Avian Pathol., 13. 119-126, 1984.
- Bartha A., Mészáros J., Tanyi J.: **Antibodies against EDS-76 avian adenovirus in bird species before 1975**, Avian Pathol., 11. 511-513, 1982.
- Békési L., Horváth I., Kovács-Gayer É., Csaba G.: **Demonstration of herpesvirus like particles in skin-lesions of European eel (*Anguilla anguilla*)**, J. Appl. Ichthyol., 2. 190-192, 1986.
- Békési L., Kovács-Gayer É., Rátz F., Turkovics O.: **Skin infection of the sheatfish (*Silurus glanis* L.) caused by a herpesvirus**, Symp. Biol. Hung., 23. 25-30, 1984.
- Békési L., Rátz F., Szabó E.: **Contribution to the etiology of the so called carp pox (epithelioma-papulosum)**, Magy. Állatorvosok., 34. 101-104, 1979.
- Belák S., Virtanen, A., Zabielski, J., Rusvai M., Berencsi G., Pettersson, U.: **Subtypes of bovine adenovirus type-2 exhibit major differences in region-E3**, Virology, 153. 262-271, 1986.

- Benkő M.: **Adenoviridae: Pathogenesis**. In: *Encyclopedia of Virology*. Szerk.: Mahy, B., Van Regenmortel, M. Oxford: Elsevier, 2008. p. 24-29.
- Benkő M., Élő P., Ursu K., Ahne, W., LaPatra, E.S., Thomson, D., Harrach B.: **First molecular evidence for the existence of distinct fish and snake adenoviruses**. *J. Virol.*, 76. 10056-10059, 2002.
- Benkő M., Harrach B.: **A proposal for a new (third) genus within the family Adenoviridae**, *Arch. Virol.*, 143. 829-837, 1998.
- Benkő M., Harrach B.: **Molecular evolution of adenoviruses**. In: *Adenoviruses: Model and Vectors in Virus Host Interactions*. Current Topics in Microbiology and Immunology. Szerk.: Doerfler, W., Bohm, P. Berlin: Springer-Verlag, 2003. 272. p. 3-35.
- Benkő M., Harrach B., Both, G.W., Russell, W.C., Adair, B.M., Ádám É., de Jong, J.C., Hess, M., Johnson, M., Kajon, A., Kidd, A.H., Lehmkuhl, H.D., Li, Q.G., Mautner, V., Pring-Akerblom, P. Wadell, G.: **Family Adenoviridae**. 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, 2005. p. 213-228.
- Benkő M., Harrach B., D'Halluin, J.C.: **Molecular cloning and physical mapping of the DNA of bovine adenovirus serotype 4; study of the DNA homology among bovine, human and porcine adenoviruses**, *J. Gen. Virol.*, 71. 465-469, 1990.
- Bennati, R., Bonetti, M., Lavazza, A., Gelmetti, D.: **Skin lesions associated with herpesvirus-like particles in frogs (*Rana dalmatina*)**, *Vet. Rec.*, 135. 625-626, 1994.
- Berget, S.M., Moore, C., Sharp, P.A.: **Spliced segments at 5' terminus of adenovirus 2 late messenger-RNA**, *Proc. Nat. Acad. Sci. U S A*, 74. 3171-3175, 1977.
- Bernard, J., Mercier, A.: **Sequence of two Eco RI fragments from *Salmonis herpesvirus 2* and comparison with *Ictalurid herpesvirus 1***, *Arch. Virol.*, 132. 437-342, 1993.
- Bloch, B., Mellegraard, S., Nielsen, E.: **Adenovirus-like particles detected by electron microscopy in epithelial hyperplasias in dab, *Limanda limanda* (L.)**, *J. Fish Dis.*, 9. 281-285, 1986.
- Boulanger, P., Lemay, P., Blair, G.E., Russell, W.C.: **Characterization of adenovirus protein IX**, *J. Gen. Virol.*, 44. 783-800, 1979.
- Bradley, T.M., Medina, D.J., Chang, P.W., McClain, J.: **Epizootic epitheliotropic disease of lake trout (*Salvelinus namaycush*): history and viral etiology**, *Dis. Aquat. Organ.*, 7. 195-201, 1989.
- Brenkman, A.B., Breure, E.C. van der Vliet, P.C.: **Molecular architecture of adenovirus DNA polymerase and location of the protein primer**, *J. Virol.* 76. 8200-8207, 2002.

- Buchanan, J.S., Madeley, C.R.: **Studies on *Herpesvirus scophthalmi* infection in the turbot *Scophthalmus maximus* (L.): ultrastructural observations**, J. Fish Dis., 1. 283-295, 1978.
- Burke, C.N., Herman, R.L., Perry, S.: **Virus infection of squamous cell carcinoma in rainbow smelt (*Osmerus mordax*)**, Proceedings of the 14th Annual Eastern Fish Health Workshop, Annapolis, USA, p. 15. 1989.
- Caillet-Boudin, M.L.: **Complementary peptide sequences in partner proteins of the adenovirus capsid**, J. Mol. Biol., 208. 195-198, 1989.
- Challberg, M.D., Rawlins, D.R.: **Template requirements for the initiation of adenovirus DNA replication**, Proc. Nat. Acad. Sci. U S A, 81. 100-104, 1984.
- Chang, P.H., Pan, Y.H., Wu, C.M., Kuo, S.T., Chung, H.Y.: **Isolation and molecular characterization of herpesvirus from cultured European eels *Anguilla anguilla* in Taiwan**, Dis. Aquat. Organ., 50. 111-118, 2002.
- Chiocca, S., Kurzbauer, R., Schaffner, G., Baker, A., Mautner, V., Cotton, M.: **The complete DNA sequence and genomic organization of the avian adenovirus CELO**, J. Virol. 70. 2939-2949, 1996.
- Chow, L.T., Broker, T.R., Lewis, J.B.: **Complex splicing patterns of RNAs from the early regions of adenovirus-2**, J. Mol. Biol., 134. 265-303, 1979.
- Chroboczek, J., Bieber, F., Jacrot, B.: **The sequence of the genome of adenovirus type 5 and its comparison with the genome of adenovirus type 2**, Virology, 186. 280-285, 1992.
- Corpet, F.: **Multiple sequence alignment with hierarchical clustering**, Nucleic Acids Res., 16. 10881-10890, 1988.
- Crawford-Miksza, L., Schnurr, D.P.: **Analysis of 15 adenovirus hexon proteins reveals the location and structure of seven hypervariable regions containing serotype-specific residues**, J. Virol., 70. 1836-1844, 1996.
- Crockford, M., Jones, J.B., Crane, M.S.J., Wilcox, G.E.: **Molecular detection of a virus, Pilchard herpesvirus, associated with epizootics in Australasian pilchards *Sardinops sagax neopilchardus***, Dis. Aquat. Organ., 68. 1-5, 2005.
- Dán Á., Élő P., Harrach B., Zádori Z., Benkő M.: **Four new inverted terminal repeat sequences from bovine adenoviruses reveal striking differences in the length and content of the ITRs**, Virus Genes, 22. 175-179, 2001.
- Dán Á., Ruzsics Z., Russel, W.C., Benkő M., Harrach B.: **Analysis of the hexon gene sequence of bovine adenovirus type 4 provides further support for a new adenovirus genus (*Atadenovirus*)**, J. Gen. Virol., 79. 1453-1460, 1998.
- Davison, A.J.: **Channel catfish virus: a new type of herpesvirus**, Virology, 186. 9-14, 1992.

- Davison, A.J.: **The genome of salmonid herpesvirus 1**, J. Virol., 72. 1974-1982, 1998.
- Davison, A.J.: **Evolution of the herpesviruses**, Vet. Microbiol., 86. 69-88, 2002.
- Davison, A.J., Benkő M., Harrach B.: **Genetic content and evolution of adenoviruses**, J. Gen. Virol., 84. 2895-2908, 2003.
- Davison, A.J., Cunningham, C., Saurbier, W., McKinnell, R.G.: **Genome sequences of two frog herpesviruses**, J. Gen. Virol., 87. 3509-3514, 2006.
- Davison, A.J., Davison, M.D.: **Identification of structural proteins of channel catfish virus by mass spectrometry**, Virology, 206. 1035-1043, 1995.
- 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.: **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, 2005a. 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.: **The order Herpesvirales**, Arch. Virol., 154. 171-177, 2009.
- Davison, A.J., Harrach B.: **Siadenovirus. Adenoviridae**. In: *The Springer Index of Viruses*. Szerk.: Tidona, C.A., Darai, G. Berlin: Springer-Verlag, 2002. p. 29-33.
- Davison, A.J., Sauerbier, W., Dolan, A., Addison, C., McKinnell, R.G.: **Genomic studies of the Lucke tumor herpesvirus (RaHV-1)**, J. Cancer Res. Clin., 125. 232-238, 1999.
- Davison, A.J., Trus, B.L., Cheng, N., Steven, A.C., Watson, M.S., Cunningham, C., Le Deuff, R.M., Renault, T.: **A novel class of herpesvirus with bivalve hosts**, J. Gen. Virol. 86. 41-53, 2005b.
- Davison, A.J., Wright, K.M., Harrach B.: **DNA sequence of frog adenovirus**, J. Gen. Virol., 81. 2431-2439, 2000.
- Ding, J., McGrath, W.J., Sweet, R. M., Mangel, W.F.: **Crystal structure of the human adenovirus proteinase with its 11 amino acid cofactor**, EMBO J., 15. 1778-1783, 1996.
- Dixon, P.F.: **Virus diseases of cyprinids**. In: *Fish Diseases Volume 1*. Szerk.: Eiras, J.C., Segner, H., Wakli, T., Kapoor, B.G. Enfield, New Hampshire, USA: Science Publishers, 2008. p. 87-184.
- Doszpoly A.: **Porcos ganoidból izolált herpeszvírus részleges genetikai jellemzése**, Szakdolgozat, Eötvös Loránd Tudományegyetem, Budapest, 2005.
- Doszpoly A., Benkő M., Bovo, G., LaPatra, S.E., Harrach B.: **Comparative analysis of a conserved gene block from the genome of the members of the genus Ictalurivirus**, Intervirology, DOI:10.1159/000319430, 2011a.

- Doszpoly A., Benkő M., Csaba G., Dán Á., Láng M., Harrach B.: **Az *Alloherpesviridae* család bemutatása: pontyfélék herpeszvírusainak első molekuláris kimutatása Magyarországon**, Magy. Állatorvosok., 133. 174-181, 2011b.
- Doszpoly A., Kovács E.R., Bovo, G., LaPatra, S.E., Harrach B., Benkő M.: **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. 2123-2127, 2008.
- Doszpoly A., Shchelkunov, I.S.: **Partial genome analysis of Siberian sturgeon alloherpesvirus suggests its close relation to AciHV-2**, Acta Vet. Hung., 58. 269-274, 2010.
- Eagle, P.A., Klessig, D.F.: **A zinc-binding motif located between amino acids 273 and 286 in the adenovirus DNA-binding protein is necessary for ssDNA binding**, Virology, 187. 777-787, 1992.
- Eaton, W.D., Wingfield, W.H., Hedrick, R.P.: **Prevalence and experimental transmission of the steelhead herpesvirus in salmonid fishes**, Dis. Aquat. Organ., 7. 23-30, 1989.
- Farkas S.: **Kígyó-adeno- és parvovírus teljes genomjának szekvenciája és analízise**, Ph.D. értekezés. Szent István Egyetem, Budapest, 2005.
- Farkas S.L., Benkő M., Élő P., Ursu K., Dán Á., Ahne, W., Harrach B.: **Genomic and phylogenetic analyses of an adenovirus isolated from a corn snake (*Elaphe guttata*) imply a common origin with members of the proposed new genus *Atadenovirus***, J. Gen. Virol., 83. 2403-2410, 2002.
- Farkas S.L., Harrach B., Benkő M.: **Completion of the genome analysis of snake adenovirus type 1, a representative of the reptilian lineage within the novel genus *Atadenovirus***, Virus Res., 132. 132-139, 2008.
- Felsenstein, J.: **PHYLIP – Phylogeny inference package (version3.2)**, Cladistics, 5. 164-166, 1989.
- Fessler, S.P., Young, C.S.: **The role of the L4 33K gene in adenovirus infection**, Virology, 263. 507-16, 1999.
- Fijan, N.N., Wellborn, T.L., Naftel, J.P.: **An acute viral disease of channel catfish**. US Fish Wildl. Serv. Tech. Pap., 43. 1-11, 1970.
- Gessner, C.: **Historiae Animalium Liber III, qui est Piscium et Aquatilium Animantium Natura**, Tiguri, Zürich, 1558.
- Gilad, O., Yun, S., Andree, K.B., Adkison, M.A., Zlotkin, A., Bercovier, H., Eldar, A., Hedrick, R.P.: **Initial characteristics of koi herpesvirus and development of a polymerase chain reaction assay to detect the virus in koi, *Cyprinus carpio koi***, Dis. Aquat. Organ., 48.101-108, 2002.

- Goodwin, A.E., Khoo, L., LaPatra, S.E., Bonar, A., Key, D.W., Garner, M., Lee, M.V., Hanson, L.: **Goldfish hematopoietic necrosis herpesvirus (*cyprinid herpesvirus 2*) in the USA: Molecular confirmation of isolates from diseased fish**, J. Aquatic Anim. Health, 18. 11-18, 2006a.
- Goodwin, A.E., Merry, G.E., Sadler, J.: **Detection of the herpesviral hematopoietic necrosis disease agent (*Cyprinid herpesvirus 2*) in moribund and healthy goldfish: validation of a quantitative PCR diagnostic method**, Dis. Aquat. Organ., 69. 137-143, 2006b.
- Gorbalenya, A.E., Koonin, E.V.: **Viral proteins containing the purine NTP-binding sequence pattern**, Nucleic Acids Res., 17. 8413-8440, 1989.
- Graham, D.A., Curran, W.L., Geoghegan, F., McKiernan, F., Foyle, K.L.: **First observation of herpes-like virus particles in northern pike, *Esox lucius* L., associated with bluespot-like disease in Ireland**, J. Fish Dis., 27. 543-549, 2004.
- Granoff, A., Gravell, M., Darlington, R.W.: **Studies on the viral etiology of the renal adenocarcinoma of *Rana pipiens* (Lucké tumor)**. In: *Biology of Amphibian Tumors (Recent Results in Cancer Research Special Supplement)*. Szerk.: Mizell, M. New York: Springer, 1969. p. 279-295.
- Grgić, H., Yang, D.H., Nagy É.: **Pathogenicity and complete genome sequence of a fowl adenovirus serotype 8 isolate**, Virus Res., 156. 91-97, 2011.
- Hall, T.A.: **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT**, Nucl. Acids Symp. Ser., 41. 95-98, 1999.
- Hangalapura, B.N., Zwart, R., Engelsma, M.Y., Haenen, O.L.: **Pathogenesis of Herpesvirus anguilla (HVA) in juvenile European eel *Anguilla anguilla* after infection by bath immersion**, Dis. Aquat. Organ., 78. 13-22, 2007.
- Hanson, L.A., Rudis, M.R., Vasquez-Lee, M., Montgomery, R.D.: **A broadly applicable method to characterize large DNA viruses and adenoviruses based on the DNA polymerase gene**, Virol. J., 3. 28, 2006.
- Harrach B.: **Reptile adenoviruses in cattle?**, Acta Vet. Hung., 48. 484-490, 2000.
- Harrach B., Meehan, B.M., Benkő M., Adair, B.M., Todd, D.: **Close phylogenetic relationship between egg drop syndrome virus, bovine adenovirus serotype 7, and ovine adenovirus strain 287**, Virology, 229. 302-308, 1997.
- Harris, M.P., Hay, R.T.: **DNA sequences required for the initiation of adenovirus type 4 DNA replication *in vitro***, J. Mol. Biol., 201. 57-67, 1988.
- Hasson, T.B., Ornelles, D.A., Shenk, T.: **Adenovirus L1 52- and 55-kilodalton proteins are present within assembling virions and colocalize with nuclear structures distinct from replication centers**, J. Virol., 66. 6133-6142, 1992.

- Hatfield, L., Hearing, P.: **The NFIII/OCT-1 binding site stimulates adenovirus DNA replication *in vivo* and is functionally redundant with adjacent sequences**, J. Virol., 67. 3931-3939, 1993.
- Hay, R.T., Freeman, A., Leith, I., Monaghan, A., Webster, A.: **Molecular interactions during adenovirus DNA replication**, Curr. Top. Microbiol. Immunol., 199. 31-48, 1995.
- Hedrick, R.P., Gilad, O., Yun, S., Spangenberg, J.V., Marty, G.D., Nordhausen, R.W., Kebus, M.J., Bercovier, H., Eldar, A.: **A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of a common carp**, J. Aquat. Anim. Health, 12. 44-57, 2000.
- Hedrick, R.P., McDowell, T.S., Gilad, O., Adkison, M., Bovo, G.: **Systemic herpes-like virus in catfish *Ictalurus melas* (Italy) differs from Ictalurid herpesvirus 1**, Dis. Aquat. Organ., 55. 85-92, 2003.
- Hedrick, R.P., McDowell, T.S., Groff, J.M., Yun, S., Wingfield, W.H.: **Isolation of an epitheliotropic herpesvirus from white sturgeon *Acipenser transmontanus***, Dis. Aquat. Organ., 11. 49-56, 1991.
- Hedrick, R.P., Sano, T.: **Herpesviruses of fishes**. In: *Viruses of lower vertebrates*. Szerk.: Ahne, W., Kurstak, E. Heidelber: Springer-Verlag, 1989. p. 161-170.
- Hedrick, R.P., Speas, J., Kent, M.L., McDowell, T.: **Adenovirus-like particles associated with a disease of cultured white sturgeon, *Acipenser transmontanus***, Can. J. Fish. Aquat. Sci., 42. 1321-1325, 1985.
- Hellberg, H., Koppang, E.O., Torud, B., Bjerkas, I.: **Subclinical herpesvirus infection in farmed turbot *Scophthalmus maximus***, Dis. Aquat. Organ., 49. 27-31, 2002.
- Herman, R.L., Burke, C.N., Perry, S.: **Epidermal tumors of rainbow smelt in associated virus**, J. Wildl. Dis., 33. 925-929, 1997.
- Hong, J.S., Engler, J.A.: **The amino terminus of the adenovirus fiber protein encodes the nuclear localization signal**, Virology, 185. 758-767, 1991.
- Huelsenback, J.P., Ronquist, F.: **MrBayes: Bayesian inference of phylogeny**, Bioinformatics, 17. 754-755, 2001.
- Hyatt, A.D., Hine, P.M., Jones, H.B., Whittington, R.L., Kearns, C., Wise, T.G., Crane, M.S., Williams, L.M. : **Epizootic mortality in the pilchard *Sardinops sagax neopilchardus* in Australia and New Zealand in 1995. 2. Identification of a herpesvirus within the gill epithelium**, Dis. Aquat. Organ., 28. 17-29, 1997.
- Iida, Y., Masumura, K., Nakai, T., Sorimachi, M., Matsuda, H.: **A viral disease occurred in larvae and juveniles of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus***, J. Aquat. Anim. Health, 1. 7-12, 1989.

- Iida, Y., Nagai, T.: **Detection of flounder herpesvirus (FHV) by polymerase chain reaction**, Fish Pathol. 39. 209-212, 2004.
- Ivanics É., Palya V., Glávits R., Á., Pálfi V., Révész T., Benkő M.: **The role of egg drop syndrome virus in acute respiratory disease of goslings**, Avian Pathol., 20. 201-208, 2001.
- Jánoska M., Vidovszky M., Molnár V., Liptovszky M., Harrach B., Benkő M.: **Novel adenoviruses and herpesviruses detected in bats**, Vet J., (nyomdában), 2011.
- Jensen, N.J., Bloch, B.: **Adenovirus-like particles associated with epidermal hyperplasia in cod (*Gadus morhua*)**, Nord. Vet. Med., 32. 173-175, 1980.
- Jung, S.J., Miyazaki, T.: **Herpesviral haematopoietic necrosis of goldfish, *Carassius auratus* (L.)**, J. Fish Dis., 18. 211-220, 1995.
- Kaján G.L., Stefancsik R., Ursu K., Palya V., Benkő M.: **The first complete genome sequence of a non-chicken aviadenovirus, proposed to be turkey adenovirus 1**, Virus Res., 153. 226-233, 2010.
- Kelley, G.O., Waltzek, T.B., McDowell, T.S., Yun, S.C., LaPatra, S.E., Hedrick, R.P.: **Genetic relationships among herpes-like viruses isolated from sturgeon**, J. Aquat. Anim. Health, 17. 297-303, 2005.
- Kelly, R.K., Nielsen, O., Mitchell, S.C., Yamamoto, T.: **Characterization of *Herpesvirus vitreum* isolated from hyperplastic epidermal tissue of walleye, *Stizostedion vitreum vitreum* (Mitchell)**, J. Fish Dis., 6. 249-260, 1983.
- Kent, M.L., Meyers, M.S.: **Hepatic lesions in a redstriped rockfish (*Sebastes prorigor*) suggestive of a herpesvirus infection**, Dis. Aquat. Organ., 41. 237-239, 2000.
- Kimura, T., Yoshimizu, M.: **Salmonid herpesvirus: OMV, *Oncorhynchus masou* virus**. In: *Viruses of Lower Vertebrates*. Szerk.: Ahne, W., Kurstak, E. Berlin: Springer-Verlag, 1989. p. 171-183.
- Knopf, C.W.: **Evolution of viral DNA-dependent DNA polymerases**, Virus Genes, 16. 47-58, 1998.
- Kovács E.R., Benkő M.: **Confirmation of a novel siadenovirus species detected in raptors: partial sequence and phylogenetic analysis**, Virus Res., 140. 64-70, 2009.
- Kovács G.M., LaPatra, S.E., D'Halluin, J.C., Benkő M.: **Phylogenetic analysis of the hexon and protease genes of a fish adenovirus isolated from white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) supports the proposal for a new adenovirus genus**, Virus Res., 98. 27-34, 2003.
- Kumagai, A., Takahashi, K., Fukuda, H.: **Infection source of herpesvirus disease in coho salmon culture and its control**, Fish Pathol., 32. 103-108, 1997.

- Kurobe, T., Kelley, G.O., Waltzek, T.B., Hedrick, R.P.: **Revised phylogenetic relationships among herpesviruses isolated from sturgeon**, J. Aquat. Anim. Health, 20. 96-102, 2008.
- LaPatra, S.E., Keith, I., Hogans, B., Groman, D., Nordhausen, R., Groff, J.M.: **Concurrent herpesviral and iridoviral infection in cultured juvenile shortnose sturgeon (*Acipenser brevirostrum*) from Atlantic Canada**, Fifth International Symposium for Viruses of Lower Vertebrates, Seattle, Washington. p. 21, 2002.
- Lehmkuhl, H.D., Cutlip, R.C.: **A new goat adenovirus isolate proposed as the prototype strain for goat adenovirus serotype 1**, Arch. Virol., 144. 1611-1618, 1999.
- Lehmkuhl, H.D., Hobbs, L.A., Woods, L.W.: **Characterization of a new adenovirus isolated from black-tailed deer in California**, Arch. Virol., 146. 1687-1696, 2001.
- Leibovitz, L., Leboutitz, S.S.: **A Viral dermatitis of the smooth dogfish, *Mustelus canis* (MITCHILL)**, J. Fish Dis., 8. 273-279, 1985.
- Lucké, B.: **A neoplastic disease of the kidney of the frog, *Rana pipiens***, Am. J. Cancer, 20. 352-379, 1934.
- Lucké, B.: **Carcinoma in the leopard frog: its possible causation by a virus**, J. Exp. Med., 68. 457-468, 1938.
- Lutz, P., Kedinger, C.: **Properties of the adenovirus IVa2 gene product, an effector of late-phase-dependent activation of the major late promoter**, J. Virol., 70. 1396-1405, 1996.
- Lutz, P., Rosa-Calatrava, M., Kedinger, C.: **The product of the adenovirus intermediate gene IX is a transcriptional activator**, J. Virol., 71. 5102-5109, 1997.
- Marek, A., Schachner, O., Bilic, I., Hess, M.: **Characterization of Austrian koi herpesvirus samples based on the ORF40 region**, Dis. Aquat. Organ., 88. 267-270, 2010.
- Mayo, M.A.: **ICTV at the Paris ICV: Results of the plenary session and the binomial ballot**, Arch. Virol., 147. 2254-2260, 2002.
- McAllister, P.E., Lidgerding, B.C., Herman, R.L., Hoyer, L.C., Hankins, J.: **Viral diseases of fish: first report of carp pox in golden ide (*Leuciscus idus*) in North America**, J. Wild. Dis., 21. 199-204, 1985.
- McArrn, G.E., McCain, B., Wellings, S.R.: **Skin lesion associated virus in Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) in the Bering Sea**, Fed. Proc., 37. 937, 1978.
- McGeoch, D.J., Dolan, A., Ralph, A.C.: **Toward a comprehensive phylogeny for mammalian and avian herpesviruses**, J. Virol., 74. 10401-10406, 2000.
- McGeoch, D.J., Gatherer, D.: **Integrating reptilian herpesviruses into the family *Herpesviridae***, J. Virol., 79. 725-731, 2005.

- Meissner, J.D., Hirsch, G.N., LaRue, E.A., Fulcher, R.A., Spindler, K.R.: **Completion of the DNA sequence of mouse adenovirus type 1: sequence of E2B, L1, and L2 (18-51 map units)**, *Virus Res.*, 51. 53-64, 1997.
- Mellergard, S., Bloch, B.: **Herpesvirus-like particles in angelfish (*Pterophyllum altum*)**, *Dis. Aquat. Organ.*, 5. 151-155, 1988.
- Michel, B., Fournier, G., Loeffrig, F., Costes, B., Vanderplasschen, A.: **Cyprinid Herpesvirus 3**, *Emerg. Infect. Dis.*, 16. 1835-1843, 2010a.
- Michel, B., Leroy, B., Stalin Raj, V., Loeffrig, F., Mast, J., Watties, R., Vanderplasschen, A.F., Coste, B.: **The genome of cyprinid herpesvirus 3 encodes 40 proteins incorporated in mature virions**, *J. Gen. Virol.*, 91. 452-462, 2010b.
- Milne, I., Wright, F., Rowe, G., Marshall, D.F., Husmeier, D., McGuire, G.: **TOPALi: software for automatic identification of recombinant sequences within DNA multiple alignments**, *Bioinformatics*, 20. 1806-1807, 2004.
- Minamoto, T., Honjo, M.N., Yamanaka, H., Tanaka, N., Itayama, T., Kawabata, Z.: **Detection of cyprinid herpesvirus-3 DNA in lake plankton**, *Res. Vet. Sci.*, (nyomdában)
- Miyazaki, T., Asai, Y., Kobayashi, T., Miyata, M.: **Lympholeukemia in madai *Pagrus major* in Japan**, *Dis. Aquat. Organ.*, 40. 147-155, 2000.
- Mizutani, T., Sayama, Y., Nakanishi, A., Ochiai, H., Sakai, K., Wakabayashi, K., Tanaka, N., Miura, E., Oba, M., Kurane, I., Saijo, M., Morikawa, S., Ono, S.: **Novel DNA virus isolated from samples showing endothelial cell necrosis in the Japanese eel, *Anguilla japonica***, *Virology*, 412. 179-187, 2011.
- Morrison, C.M., Leggiadro, C.T., Martell, D. J.: **Visualization of viruses in tumors of rainbow smelt *Osmerus mordax***, *Dis. Aquat. Organ.*, 26. 19-23, 1996.
- Nagy M., Nagy É., Tuboly T.: **The complete nucleotide sequence of porcine adenovirus serotype 5**, *J. Gen. Virol.* 82. 525-529, 2001.
- Norrby, E., Wadell, G.: **Immunological relationships between hexons of certain human adenoviruses**, *J. Virol.*, 4. 663-670, 1969.
- Novotny, L., Pokorova, D., Reschova, S., Vicenova, M., Axmann, R., Vesely, T., Mikler, J.R.: **First clinically apparent koi herpesvirus infection in the Czech Republik**, *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, 30. 85-91, 2010.
- Ojkic, D., Nagy É.: **The complete nucleotide sequence of fowl adenovirus type 8**, *J. Gen. Virol.*, 81. 1833-1837, 2000.
- Ono, S., Wakabayashi, K., Nagai, A.: **Isolation of the virus causing viral endothelial cell necrosis of eel from cultured Japanese eel, *Anguilla japonica***, *Fish. Pathol.*, 42. 191-200, 2007.
- Origi, F.C., Klein, P.A., Mathes, K., Blahak, S., Marschang, R.E., Tucker, S.J., Jacobson, E.R.: **Enzyme-linked immunosorbent assay for detecting herpesvirus exposure in**

- Mediterranean tortoises (spur-thighed tortoise [*Testudo graeca*] and Hermann's tortoise [*Testudo hermanni*])**, J. Clin. Microbiol., 39. 3156-3163, 2001.
- Page, R.D.M.: **TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers**, Comput. Appl. Biosci., 12. 357-358, 1996.
- Phylbey, A.W.: **Herpesvirus haematopoietic necrosis in a goldfish (*Carassius auratus*) in the UK**, Vet. Rec., 158. 800-801, 2006.
- Pitcovski, J., Mualem, M., Rei-Koren, Z., Krispel, S., Shmueli, E., Peretz, Y., Gutter, B., Gallili, G.E., Michael, A., Goldberg, D.: **The complete DNA sequence and genome organization of the avian adenovirus, hemorrhagic enteritis virus**, Virology, 249. 307-315, 1998.
- Plumb, J.A.: **Channel catfish virus**. In: *Viruses of Lower Vertebrates*. Szerk.: Ahne, W., Kurstak, E. Heidelberg: Springer-Verlag, 1989. p. 198-216.
- Poss, M., Ross, H.A., Painter, S.L., Holley, D.C., Terwee, J.A., Vandewoude, S., Rodrigo, A.: **Feline lentivirus evolution in cross-species infection reveals extensive G-to-A mutation and selection on key residues in the viral polymerase**, J. Virol., 80. 2728-2737, 2006.
- Rafferty, K.A.: **Spontaneous kidney tumors in the frog: rate of occurrence in isolated adults**, Science, 141. 720-721, 1963.
- Ramelli, S., Vidovszky M.Z., Decurtins, W., Ruminska, J., Greber, U., Harrach B., Hemmi, S.: **Genome analysis of murine adenovirus 2 a very distinct mastadenovirus**, 2011 (benyújtva)
- Rancourt, C., Keyvani-Amineh, H., Sircar, S., Labrecque, P., Weber, J.M.: **Proline 137 is critical for adenovirus protease encapsidation and activation but not enzyme activity**, Virology, 209. 167-73, 1995.
- Reubel, G.H., Studdert, M.J.: **Identification, cloning and sequence analysis of the equine adenovirus 1 hexon gene**, Arch. Virol., 142. 1193-1212, 1997.
- Rijsewijk, F., Pritz-Verschuren, S., Kerkhoff, S., Botter, A., Willemsen, M., van Nieuwstadt, T., Haenen, O.: **Development of a polymerase chain reaction for the detection of Anguillid herpesvirus DNA in eels based on the herpesvirus DNA polymerase gene**, J. Virol. Meth., 124. 87-94, 2005.
- Riley, D., Flint, S.J.: **RNA-binding properties of a translational activator, the adenovirus L4 100-kilodalton protein**, J. Virol., 67. 3586-3595, 1993.
- Rivera, S., Wellehan, J.F., McManamon, R., Innis, C.J., Garner, M.M., Raphael, B.L., Gregory, C.R., Latimer, K.S., Rodriguez, C.E., Diaz-Figueroa, O., Marlar, A.B., Nyaoke, A., Gates, A.E., Gilbert, K., Childress, A.L., Risatti, G.R., Frasca, S.: **Systemic adenovirus infection in Sulawesi tortoises (*Indotestudo forsteni*) caused by a novel siadenovirus**, J. Vet. Diagn. Invest., 21. 415-426, 2009.

- Roberts, R.J., Akusjarvi, G., Alestrom, P., Gelinas, R.E., Gingeras, T.R., Sciaky, D., Pettersson, U.: **A consensus sequence for the adenovirus 2 genome**. In: *Adenovirus DNA: The Viral Genome and its Expression*. Szerk.: Doerfler, W. Boston: Martinus Nijhoff, 1986. p. 1-51.
- Rowe, W.P., Huebner, R.J., Gilmore, L.K., Parrott, R.H., Ward, T.G.: **Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture**, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 84. 570-573, 1953.
- Russel, W.C.: **Adenoviruses: update on structure and function**, J. Gen. Virol., 90. 1-20, 2009.
- Russell, W.C., Benkő M.: **Animal adenoviruses**. In: *Encyclopedia of Virology*. Szerk.: Granoff, A., Webster, R.G. San Diego: Academic Press, 1999. p. 14-21.
- Rusvai M., Harrach B., Bánrévi A., Evans, P.S., Benkő M.: **Identification and sequence analysis of the core protein genes of bovine adenovirus 2**, Virus Res., 70. 25-30, 2000.
- Rux, J.J., Kuser, P.R., Burnett, R.M.: **Structural and phylogenetic analysis of adenovirus hexons by use of high-resolution X-ray crystallographic, molecular modeling, and sequence-based methods**, J. Virol., 77. 9553-9566, 2003.
- Sambrook, J., Russel, D.W.: **Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 3rd edition**. Cold Spring Harbour: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2001.
- San Martín, C., Burnett, R.M.: **Structural studies on adenoviruses**, Curr. Top. Microbiol. Immunol., 272. 57-94, 2003.
- Sano, M., Fukuda, H., Sano, T.: **Isolation and characterization of a new herpesvirus from eel**. In: *Pathology in Marine Sciences*. Szerk.: Perkins, F.O., Cheng, T.C. San Diego: Academic Press, 1990. p. 15-31.
- Sano, T., Fukuda, H., Furukawa, M., Hosoya, H., Moriya, Y.: **A herpesvirus isolated from carp papilloma in Japan**, Fish Shellfish Pathol., 32. 307-311, 1985.
- Sano, T., Morita, N., Shima, N., Akimoto, M.: **Herpesvirus cyprini: Lethality and oncogenicity**, J. Fish Dis., 14. 533-543, 1991.
- Shackelton, L.A., Parrish, C.R., Holmes, E.C.: **Evolutionary basis of codon usage and nucleotide composition bias in vertebrate DNA viruses**, J. Mol. Evol., 62. 551-63, 2006.
- Shchelkunov, I.S., Karaseva, T.A., Kadoshnikov, Y.U.P.: **Atlantic salmon papillomatosis: visualization of herpesvirus-like particles in skin growth of affected fish**, Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol., 12. 28-29, 1992.
- Shchelkunov, I.S., Shchelkunova, T.I., Shchelkunov, A.I., Kolbasova, Y.P., Didenko, L.V., Bykovsky, A.F.: **First detection of a viral agent causing disease in farmed sturgeon in Russia**, Dis. Aquat. Organ., 86. 193-203, 2009.

- Sheppard, M., McCoy, R.J., Werner, W.: **Genomic mapping and sequence analysis of the fowl adenovirus serotype 10 hexon gene**, J. Gen. Virol., 76. 2595-2600, 1995.
- Sheppard, M., Trist, H.: **The identification of genes for the major core proteins of fowl adenovirus serotype 10**, Arch. Virol., 132. 443-449, 1993.
- Shlapobersky, M., Sinyakov, M.S., Katzenellenbogen, M., Sarid, R., Don, J., Avtalion, R.R.: **Viral encephalitis of tilapia larvae: primary characterization of a novel herpes-like virus**, Virology, 399. 239-247, 2010.
- Somogyi V.: **Egy új hal-herpeszvírus izolátum részleges jellemzése**, Szakdolgozat, Szent István Egyetem, Budapest, 2004.
- Staden, R.: **The Staden sequence analysis package**, Mol. Biotechnol., 5. 233-241, 1996.
- Szendrói A., Schamberger A., Bakonyi T., Hornyák Á., Rusvai M.: **Molecular comparison of the fibre proteins of bovine adenovirus subtype A and subtype B**, Virus Res., 94. 59-63, 2003.
- Thomson, D., Meers, J., Harrach B.: **Molecular confirmation of an adenovirus in brushtail possums (*Trichosurus vulpecula*)**, Virus Res., 83. 189-195, 2002.
- Toogood, C.I., Hay, R.T.: **DNA sequence of the adenovirus type 41 hexon gene and predicted structure of the protein**, J. Gen. Virol., 69. 2291-2301, 1988.
- Tweedell, K.S.: **Induced oncogenesis in developing frog kidney cells**, Cancer Res., 27. 2040-2052, 1967.
- Ursu K., Harrach B., Matiz K., Benkő M.: **DNA sequencing and analysis of the right-hand part of the genome of the unique bovine adenovirus type 10**, J. Gen. Virol., 85. 593-601, 2004.
- 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.: **Complete genome sequence and taxonomic position of anguillid herpesvirus 1**, J. Gen. Virol., 91. 880-887, 2010.
- van der Vliet, P.C.: **Adenovirus DNA replication**. In: *Molecular Repertoire of Adenoviruses*. Szerk.: Böhm, W.D.P. Köln: Springer, 1995. p. 24.
- van Nieuwstadt, A.P., Dijkstra, S.G., Haenen, O.L.: **Persistence of herpesvirus of eel *Herpesvirus anguillae* in farmed European eel *Anguilla anguilla***, Dis. Aquat. Organ., 45. 103-107, 2001.
- van Raaij, M.J., Mitraki, A., Lavigne, G., Cusack, S.: **A triple b-spiral in the adenovirus fibre shaft reveals a new structural motif for a fibrous protein**, Nature, 401. 935-938, 1999.
- Vrati, S., Brookes, D.E., Strike, P., Khatri, A., Boyle, D.B., Both, G.W.: **Unique genome arrangement of an ovine adenovirus: identification of new proteins and proteinase cleavage sites**, Virology, 220. 186-99, 1996.

- Walsh, M.P., Seto, J., Jones, M.S., Chodosh, J., Xu, W., Seto, D.: **Computational analysis identifies human adenovirus type 55 as a re-emergent acute respiratory disease pathogen**, J. Clin. Microbiol., 48. 991-3, 2010.
- Waltzek, T.B., Kelley, G.O., Alfaro, M.E., Kurobe, T., Davison, A.J., Hedrick, R.P.: **Phylogenetic relationships in the family *Alloherpesviridae***, Dis. Aquat. Organ. 84. 179-194, 2009.
- Waltzek, T.B., Kelley, G.O., Stone, D.M., Way, K., Hanson, L., Fukuda, H., Hirono, I., Aoki, T., Davison, A.J., Hedrick, R.P.: **Koi herpesvirus represents a third cyprinid herpesvirus (CyHV-3) in the family *Herpesviridae***, J. Gen. Virol., 86. 1659-1667, 2005.
- Watson, L.R., Yun, S.C., Groff, J.M., Hedrick, R.P.: **Characteristics and pathogenicity of a novel herpesvirus isolated from adult and subadult white sturgeon *Acipenser transmontanus***, Dis. Aquat. Organ., 22. 199-210, 1995.
- Weber, J.M., Cai, F., Murali, R., Burnett, R.M.: **Sequence and structural analysis of murine adenovirus type 1 hexon**, J. Gen. Virol., 75. 141-147, 1994.
- Webster, A., Hay, R.T., Kemp, G.: **The adenovirus protease is activated by a virus-encoded disulphide-linked peptide**, Cell, 72. 97-104, 1993.
- Webster, A., Leith, I.R., Hay, R.T.: **Activation of adenovirus-coded protease and processing of preterminal protein**, J. Virol., 68. 7292-7300, 1994.
- Webster, A., Leith, I.R., Hay, R.T.: **Domain organization of the adenovirus preterminal protein**, J. Virol., 71. 539-547, 1997.
- Webster, A., Russel, S., Talbot, P., Russel, W.C., Kemp, G.D.: **Characterization of the adenovirus proteinase: substrate specificity**, J. Gen. Virol., 70. 3225-3234, 1989.
- Wellehan, J.F., Johnson, A.J., Harrach B., Benkő M., Pessier, A.P., Johnson, C.M., Garner, M.M., Childress, A.L., Jacobson, E.R.: **Detection and analysis of six lizard adenoviruses by consensus primer PCR provides further evidence of a reptilian origin for the atadenoviruses**, J. Virol. 78. 13366-13369, 2004.
- Willcox, N., Mautner, V.: **Antigenic determinants of adenovirus capsids. II. Homogeneity of hexons, and accessibility of their determinants, in the virion**, J. Immunol., 116. 25-29, 1976.
- Wilson, G.M., Jindal, H.K., Yeung, D.E., Chenm, W., Astell, C.R.: **Expression of minute virus of mice major nonstructural protein in insect cells - Purification and identification of ATPase and Helicase activities**, Virology, 185. 90-98, 1991.
- Wolf, K.: **Fish Viruses and Fish Viral Diseases**. Ithaca, NY: Cornell University Press, 1988.
- Wolf, K., Taylor, W.G.: **Salmonid herpesviruses: a syncytium-forming agent from rainbow trout**, Fish Health News, 4. 3, 1975.

- Woods, L.W., Swift, P.K., Barr, B.C., Horzinek, R.C., Nordhausen, R.W., Stillian, M.H., Patton, J.F., Oliver, M.N., Jones, K.R., MacLachlan, N.J.: **Systemic adenovirus infection associated with high mortality in mule deer (*Odocoileus hemionus*) in California**, Vet. Pathol., 33. 125-132, 1996.
- Yamamoto, T., Kelly, R.K., Nielsen, O.: **Epidermal hyperplasias of northern pike (*Esox lucius*) associated with herpesvirus and C-type particles**, Arch. Virol., 79. 255-272, 1984.
- Zhang, W., Imperiale, M.J.: **Requirement of the adenovirus IVa2 protein for virus assembly**, J. Virol. 77. 3586-3594, 2002.
- Zsivanovits, P., Monks, D.J., Forbes, N.A., Ursu K., Raue, R., Benkő M.: **Presumptive identification of a novel adenovirus in a Harris hawk (*Parabuteo unicinctus*), a Bengal eagle owl (*Bubo bengalensis*), and a Verreaux's eagle owl (*Bubo lacteus*)**, J. Avian Med. Surg., 20. 105-112, 2006.
- Xu, Z.Z., Hyatt, A., Boyle, D.B., Both, G.W.: **Construction of ovine adenovirus recombinants by gene insertion or deletion of related terminal region sequences**, Virology, 230. 62-71, 1997.

10. Tudományos publikációk

10.1. Lektorált, impakt faktoralal rendelkező tudományos folyóiratokban megjelent közlemények

Doszpoly A., Kovács E.R., Bovo, G., LaPatra, S.E., Harrach B., Benkő M.: **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. 2123-2127, 2008. IF: 2,020

Doszpoly A., Shchelkunov, I.S.: **Partial genome analysis of Siberian sturgeon alloherpesvirus suggests its close relation to AciHV-2**, Acta Vet. Hung., 58. 269-274, 2010. IF: 0,642

Doszpoly A., Benkő M, Bovo, G., LaPatra, S.E., Harrach B.: **Comparative analysis of a conserved gene block from the genome of the members of the genus *Ictalurivirus***, Intervirology, DOI:10.1159/000319430, 2011. IF: 1,106

Doszpoly A., Benkő M., Csaba Gy., Dán Á., Láng M., Harrach B.: **Az *Alloherpesviridae* család bemutatása: pontyfélék herpeszvírusainak első molekuláris kimutatása Magyarországon**, Magy. Állatorvosok., 133. 174-181, 2011. IF: 0,200

10.2. Könyvfejezet

Benkő M., Doszpoly A.: **Ictadenovirus. *Adenoviridae***. In: *The Springer Index of Viruses*. Szerk.: Tidona, C.A., Darai, G. New York: Springer-Verlag, 2011. (nyomdában)

10.3. Nemzetközi konferencia kiadványban megjelent absztrakt vagy proceeding

- Doszpoly A., Kovács E.R., Somogyi V., LaPatra, S.E., Harrach B., Benkő M.: **Genome sampling of a herpesvirus isolate from white sturgeon implies common origin and co-linear genome organization with ictalurid herpesvirus and justifies the establishment of a novel virus family**, In: *Proceedings of the ESVV 7th Int Congr Vet Virol*. Szerk.: Leitao, A., Martins, C. Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa, p. 241, 2006.
- Benkő M., Doszpoly A., Kovács G.M., Kovács E.R., Jánoska M., Kaján G.L., Zsivanovits, P., Dán Á., Bakonyi T., Weissenböck, H., LaPatra, S.E., Harrach B.: **Fish and frog adenoviruses**, 7th Int Symp on Viruses of Lower Vertebrates, Oslo, 2007.
- Doszpoly A., Kovács E.R., LaPatra, S.E., Harrach B., Benkő M.: **Genome analysis of a herpesvirus isolated from an ancient chondrostei**, 7th Int Symp on Viruses of Lower Vertebrates, Oslo, 2007.
- Benkő M., Doszpoly A., LaPatra, S.: **Sequence analysis of white sturgeon adenovirus reveals unique genome ends: Proposal for establishment of a new adenovirus genus**, XIV. International Congress of Virology, Istanbul, 2008.
- Doszpoly A., LaPatra, S.E., Harrach B., Benkő M.: **Genome study of a herpesvirus isolated from a chondrosteian fish (*Acipenser transmontanus*)**, 4th Croatia Congress of Microbiology with International Participation, Zadar, 2008.
- Harrach B., Doszpoly A., Vidovszky M., Jánoska M., Kaján G.L., Benkő M.: **Search for novel adenoviruses to understand the past and perhaps predict the future**, Adenoviruses. Basic Biology to Gene Therapy, FEMS Workshop, Zadar, 2008.
- Dandár E., Doszpoly A., Jánoska M., Heltai M., Szabó L., Benkő M. (2009): **PCR screening of mammalian predators (Carnivora) for adeno- and herpesviruses**, In: *Proceedings of the ESVV 8th Int Congr Vet Virol*. Szerk.: Benkő M., Harrach B. Budapest, p. 226, 2009.
- Doszpoly A., Harrach B., Benkő M.: **Genome study of three fish herpesviruses**, 3rd ESVV Veterinary Herpesvirus Symposium, Greifswald, 2009.
- Doszpoly A., Harrach B., Benkő M.: **Genome analysis of a fish adenovirus confirms the proposal for a fifth adenovirus genus**, In: *Proceedings of the ESVV 8th Int Congr Vet Virol*. Szerk.: Benkő M., Harrach B. Budapest, p. 142, 2009.
- Doszpoly A., Harrach B., Benkő M.: **Genome analysis of a fish adenovirus confirms the proposal for a fifth adenovirus genus**, 9th International Adenovirus Meeting, Dobogókő, p. 127, 2009.

- Harrach B., Doszpoly A., Vidovszky M., Jánoska M., Péntzes J., Kaján G.L., Kovács E.R., Skoda G., Ballmann M., Dandár E., Benkő M.: **Adenoviruses flying around: search for novel adenoviruses to recognize their diversity and better understand their evolution**, 9th International Adenovirus Meeting, Dobogókő, p. 72, 2009.
- Jánoska M., Doszpoly A., Kaján G.L., Pantó L., Harrach B. (2009): **Novel simian adenoviruses – comparison with formerly isolated primate adenoviruses**, In: *Proceedings of the ESVV 8th Int Congr Vet Virol*. Szerk.: Benkő M., Harrach B. Budapest, p. 229, 2009.
- Jánoska M., Doszpoly A., Kaján G.L., Pantó L., Harrach B.: **Detection of novel simian adenoviruses and comparison with earlier isolated primate adenoviruses**, 9th International Adenovirus Meeting, Dobogókő, p. 128, 2009.
- Péntzes J., Doszpoly A., Harrach B., Benkő M.: **Examinations aiming at the verification of the reptilian origin of atadenoviruses**, In: *Proceedings of the ESVV 8th Int Congr Vet Virol*. Szerk.: Benkő M., Harrach B. Budapest, p. 233, 2009.
- Vidovszky M., Ramelli, S., Decurtins, W., Ruminska, J., Doszpoly A., Skoda G., Jánoska M., Compton, S.R., Harrach B., Greber, U., Hemmi, S.: **Characterisation of the murine adenovirus 2 genome and partial sequences from similar rodent adenoviruses**, In: *Proceedings of the ESVV 8th Int Congr Vet Virol*. Szerk.: Benkő M., Harrach B. Budapest, p. 155, 2009.
- Vidovszky M., Ramelli, S., Decurtins, W., Ruminska, J., Doszpoly A., Skoda G., Jánoska M., Harrach B., Greber, U., Hemmi, S.: **Characterisation of the genome of murine adenovirus 2 and partial sequences from similar rodent adenoviruses**, 9th International Adenovirus Meeting, Dobogókő, p. 131, 2009.
- Doszpoly A., Benkő M., Bovo, G., LaPatra, S.E., Harrach B.: **Partial genome analysis of new members of the genus *Ictalurivirus***, 8th Int Symp on Viruses of Lower Vertebrates, Santiago de Compostela, 2010.
- Péntzes J., Doszpoly A., Benkő M., Harrach B.: **Further proofs for the reptilian origin of atadenoviruses**, 8th Int Symp on Viruses of Lower Vertebrates, Santiago de Compostela, 2010.
- Péntzes J., Romanova, I., Papp T., Doszpoly A., Harrach B., Marschang, R.: **Genome sequencing and analysis of two novel lizard adenoviruses**, 21st Annual Meeting of the Society for Virology, Freiburg, p. 299, 2011.

10.4. A doktori kutatás témájához nem kapcsolódó tudományos közlemények

Dandár E., Szabó L., Heltai M., Doszpoly A.: **Adenovírusok és herpeszvírusok előfordulásának felmérése emlős ragadozók (Carnivora) mintáinak PCR-es vizsgálatával: borz-herpeszvírus első kimutatása Magyarországon**, Magy. Állatorvosok., 132. 302-308, 2010. IF: 0,200

Pénzes J., Doszpoly A.: **Adenovírusos fertőzöttség kimutatása szakállas agámákban (*Pogona vitticeps*) Magyarországon**, Magy. Állatorvosok., 2011. (nyomdában) IF: 0,200

11. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék hálás köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Benkő Máriának, és Dr. Harrach Balázsnak, akik segítettek elsajátítani a labormunka fortélyait, továbbá sem magukat, sem idejüket nem kímélve észrevételeikkel, tanácsaikkal hozzájárultak, hogy e munka elkészüljön.

Továbbá köszönöm Dr. Csaba György valamint Dr. Molnár Kálmán közreműködését munkámban, akik révén a pontyfélék herpeszvirusaival is foglalkozhattam.

Köszönöm a külföldi kutatók, Scott LaPatra, Giuseppe Bovo és Igor Shchelkunov segítségét, hogy az általuk izolált vírusokat rendelkezésünkre bocsátották.

Természetesen köszönettel tartozom az MTA Állatorvos-tudományi Kutatóintézete Molekuláris virológia és Összehasonlító virológia csoport valamennyi jelenlegi és korábbi munkatársának, amiért segítettek a mindennapi munkámban.

A vizsgálatok elvégzéséhez az OTKA K61317 és az NKTH-OTKA K67781 számú pályázat biztosította az anyagi feltételeket.

Továbbá köszönöm a Kőbányai és a Soproni sörgyárnak, hogy termékeikkel segítettek átvészelni a disszertáció írásának nehéz pillanatait.