

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Tokhal-adenovírus és hal-herpeszvírusok
genetikai elemzése

PhD értekezés tézisei

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

Bevezetés

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 herpeszvírus (HV), melynek teljes genomszekvenciáját meghatározták, az *Ictalurid herpesvirus 1* (IcHV-1) volt. Ennek a vírusnak egy külön, "nem-besorolt" (alcsaládokhoz nem rendelhető) nemzetséget hoztak létre a családon belül, *Ictalurivirus* néven. Ebben az időben egyéb hal- és kétéltű-HV-okból csak nagyon rövid DNS-szekvenciák voltak elérhetőek nyilvános adatbankokban. Ezért érdekesnek tűnt, hogy egy ősi, porcos ganoidból izolált HV (*Acipenserid herpesvirus 2*, AciHV-2) 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. 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. Ezért ezeknek a törzseknek a részleges genomanalízisét is elkezdtük.

Munkám kezdetekor az *Adenoviridae* család négy nemzetséget tartalmazott, 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. A kutatási eredmények azt mutatják, hogy az atadenovírusok a pikkelyes hüllőkkel evolválódtak és feltehető, hogy gazdaváltás eredményeként jutottak más gazdafajokba. A *Siadenovirus* nemzetségbe egy békából, madaraktól és teknősből izolált vírusokat találunk. Korábban feltételezték, hogy ez a nemzetség a kétéltűekkel együttfejlődött AdV-okat tartalmazza, de jelenlegi ismereteink szerint a siadenovírusok gazdaeredete még nem állapítható meg bizonyossággal. A fehér tokból izolált adenovírus (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, WSAV-1) genomjának középső részében kódolt, erősen konzervált gének nukleotid (nt) sorrendjét, és filogenetikai számításokat végeztek. Megállapították, hogy a WSAV-1 nem sorolható be a már létező négy AdV nemzetség egyikébe sem. 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.

A PhD munka célja

- Fehér tok-herpeszvírus genom részleges szekvenálása és elemzése
- Fehér tok-adenovírus genom teljes szekvenálása és elemzése
- Egyéb hal-herpeszvírusok molekuláris vizsgálata
- Hal-herpeszvírusok DNS-alapú kimutatásának lehetősége hazánkban

Anyag és módszer

A vírus törzsek és hal-minták

Munkám során összesen négy izolált vírustörzs DNS-ét vizsgáltam. Az amerikai törzseket, WSA_{AdV}-1 és AciHV-2 felnőtt, tünetmentes, vadon élő fehér tokból izolálták. Az I_cHV-2 törzset Olaszországban izolálták fekete törpeharcsából. Az SbSHV törzseket (SK1/0406, SK2/0506 és BK/0506) Oroszországban izolálták lénai tokból.

A hazai vizekből származó, tipikus pontyhimlős tüneteket mutató pontyból mintát vettünk a hámon keletkezett elváltozásból, a kopolyúból, májból és veséből. A szintén hazai tógazdaságból, tömeges elhullás alkalmával gyűjtött ezüstkárászból a hal belső szerveinek keverékét használtuk mintaként. Ezeket a vírusokat nem izoláltuk.

A virális DNS tisztítása

Az AciHV-2 és WSA_{AdV}-1 esetében a sejtenyészet felülúszójából a virionokat ultracentrifugálással koncentráltuk. Ezután fenolos DNS kivonást végeztünk.

Az I_cHV-2 törzset liofilizálva, az SbSHV kivont DNS-ét Whatman-papíron rögzítve küldték laboratóriumunkba.

A pontyból illetve ezüstkárászból vett szervmintákat homogenizáltuk, proteinázzal emésztettük, és guanidin-hidrokloridos kezelést követően a nukleinsavakat etanollal precipitáltuk.

Restrikciós enzimes emésztés és molekuláris klónozás

A virális és plazmid (pBluescript KS; Stratagene Ltd., Santa Clara, CA, USA) DNS-t *Hind*III illetve *Pst*I enzimmel emésztettük, kis mennyiségben gélelektroforézissel ellenőriztük, majd a tisztított DNS-t plazmidba ligáltuk. A ligátummal *E. coli* törzseket transzformáltunk elektroporációval vagy hősokk alkalmazásával. A baktériumokat ampicillin tartalmú LB agar lemezekon szélesztettük. Alkálikus mini preparálással tisztítottuk a plazmid DNS-t.

A későbbiekben, a PCR-ekkel felerősített DNS-fragmentumokat CloneJet (Fermentas AG., Vilnius, Litvánia) kittel klónoztuk a gyártó utasítása szerint.

Polimeráz láncreakció (PCR)

Alapvetően kétféle PCR primert használtunk, specifikusat és konszenzus, degenerált primereket. A már megismert genomszekvenciák alapján, az egyes, vizsgált vírusokra specifikus PCR primereket terveztünk. Az AciHV-2, IcHV-2 és SbSHV DNS-polimeráz és terminális transzferáz génjeinek felerősítését konszenzus primerekkel oldottuk meg, a primerek tervezését a GenBank adatai alapján végeztük. A primereket az egyes fehérjék aminosav (as) sorrendjének pozicionális illesztése (alignment) alapján terveztük. A hal-HV-ok általános kimutatására javasolt, szintén konszenzus primerekkel működő PCR-t használtuk a CyHV-1 és 2 amplifikálásához.

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 5X Phusion puffer, 1,5 µl dNTP (10 mM) oldat, 1–1 µl primer (50 pmol/µl), 0,5 µl Phusion DNS-polimeráz enzim és 2 µl minta DNS-oldat. A WSAdV-1 esetében alkalmazott egykarú PCR-ek során, mivel csak 1 µl primert használtunk, a reakcióelegy 35 µl desztillált vizet tartalmazott.

WSAdV-1 genom végének meghatározása

Az AdV-ok DNS-szálainak 5' végéhez kapcsolódó terminális fehérje általában megakadályozza a végfragmentumok tompa végként történő klónozását. Ezért a genomvégekhez legközelebbi ismert szekvencia alapján tervezett, "kifelé" (a DNS vége felé) irányuló primerrel egykarú PCR-eket végeztünk. A genomok végén az 5'/3' RACE Kit-et (Roche Ltd., Basel, Svájc) alkalmaztuk a gyártó utasításai szerint, mellyel a duplaszálú DNS szálainak 3' végére poli-A farkat építettünk, így egy kifelé mutató specifikus primerrel és oligo-T primerrel sikerült a genom bal végének felerősítése.

DNS szekvenálás, szekvencia analízis, filogenetikai számítások

A DNS-szekvenálási reakciót a BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems Ltd., Warrington, Egyesült Királyság) alkalmazásával a gyártó utasításai szerint végeztük. Az elektroforézis automata DNS-szekvenálón (ABI Prism® 3100) történt.

A DNS-szekvenciák azonosítását homológia kereső programok, BLASTX és BLASTN segítségével on-line végeztük a NCBI adatbankjában (GenBank). A szekvenciákat a Staden program csomag használatával állítottuk össze.

A filogenetikai számításokat a legnagyobb valószínűség (maximum likelihood) becslési módszerrel, távolsági mátrix (distance matrix) módszerrel, valamint Bayesian statisztikával is elvégeztük.

Eredmények

Fehér tok-herpeszvírus

A fehér tok-herpeszvírus, azaz az AciHV-2 genomjának középső részén 66.037 bp hosszúságú szakasz nt sorrendjét határoztuk meg. A véletlenszerű klónokat, illetve a két, konszenzus primerekkel nyert szakaszt hét PCR termékkel kötöttük össze. 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 G+C tartalma 38%-nak bizonyult. A szakasz 46 feltételezett ORF-et tartalmaz. Ezek közül 38 ORF egyértelmű homológiát mutat az IcHV-1 ezen szakaszán található génekkel. Ezeknek az ORF-eknek irányultsága és pozíciója megegyezik az IcHV-1 homológ ORF-jeivel, és méretükben sem mutatnak nagy eltéréseket. A további 8 ORF nem mutat egyértelmű homológiát semmilyen eddig leírt HV ORF-fel sem. Az AciHV-2 genom vizsgált középső szakasza tartalmazza azt a 12 ORF-et is, melyek az eddig megismert, teljes AHV genomok mindegyikében megtalálhatók.

Filogenetikai számításokat végeztünk az *Alloherpesviridae* családban megőrzötnnek bizonyult génekkel. Különböző módszerek alkalmazásával is minden esetben azonos fa topológiát kaptunk magas statisztikai valószínűségekkel alátámasztva. A törzsfarekonstrukció azt mutatta, hogy az AciHV-2 a két ictalurid halfajból izolált vírussal (IcHV-1 és 2) közeli rokonságban áll, ami alapot ad az IcHV-1-gyel való közös nemzetségbe sorolásához. A törzsfarekonstrukciók azt is világosan mutatták, hogy az *Alloherpesviridae* családnak három jól elkülönülő fő csoportja van, a cyprinivírusok, batrachovírusok (béka-HV-ok) és az ictalurivírusok.

IcHV-2 és SbSHV

A fekete törpeharcsa-HV-ból (IcHV-2) összesen 7982 bp szakasz nt sorrendjét határoztuk meg és helyeztük el a GenBankban (FJ815290). A szakasz G+C tartalma 51,9%. Ezen szakasz tartalmazza az IcHV-1 ORF(57+58), 59, 60, 61 és 62 homológjait.

A lénai tok-HV (SbSHV) három törzsének (SK1/0406, SK2/0506 és BK/0506) 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 hosszú szakasz 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.

CyHV-1 és 2

A ponty-herpeszvírus (CyHV-1) és az ezüstkárász-herpeszvírus (CyHV-2) DNS-polimeráz génjének 464 bp hosszú szakaszát nyertük ki megbetegedett halakból 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.

Fehér tok-adenovírus

Meghatároztuk a WSA_{AdV}-1 genom teljes nt sorrendjét, mely 48.395 bp hosszúságúnak bizonyult. A benyújtott szekvencia elérési száma a GenBankban: AY082701. A teljes genom G+C tartalma 42,6%. A WSA_{AdV}-1 ITR-je 126 bp hosszúságúnak bizonyult, 48 gén meglétét feltételezzük. A genom középső részén 16 gént azonosítottunk, melyeknek homológjait az összes eddig leírt AdV-ban megtalálták. A genom bal végén négy feltételezett fiber gént azonosítottunk. A genom jobb oldalán két ORF-et találtunk, melyek a parvovírusok nem-stukturális (NS) fehérjével mutatnak homológiát. További három ORF-et azonosítottunk a genom jobb oldalán, melyek közül az egyik az Ig szupercsaládba tartozó fehérjéket 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. Ezeken felül további 23 ORF-et találtunk a genomanalízis során, melyekről feltételezzük, hogy gének, noha nem mutatnak egyértelmű homológiát egyetlenegy, eddig leírt génnel sem.

Filogenetikai számítások során a WSA_{AdV}-1-en kívül, a másik négy nemzetség 3-3 képviselőjét is vizsgáltuk. A törzsfákon a WSA_{AdV}-1 határozottan elkülönül a másik négy nemzetség tagjaitól, önálló csoportot alkotva. Az ugyanazzal a génnel, különböző módszerekkel végzett számítások hasonló törzsfa topológiát eredményeztek. Viszont a DNS-polimerázzal és hexonnal végzett számítások némileg eltérő törzsfa topológiát adtak.

Megbeszélés

Fehér tok-herpeszvírus

Az AciHV-2 genom 66 kbp hosszú szakaszának elemzése során 46 lehetséges gént valószínűsítettünk. Az IChV-1 genomjában, mely az első teljesen végig szekvenált hal-HV, ez a régió 45 ORF-et tartalmaz, az ORF24-től az ORF69-ig. Az IChV-1 és az AciHV-2 genomszerveződése között nagyfokú kolinearitást találunk. Az AciHV-2 46 feltételezett ORF-jéből 38 egyértelmű homológiát mutat az IChV-1 ORF-jeivel. Mindössze 8, feltételezett ORF-nél nem találtunk homológiát az IChV-1 ORF-jeivel, de ezek, a GenBankban található egyetlen más gén termékeivel sem mutattak egyértelmű homológiát. Az IChV-1 genomjának megfelelő szakaszán található összes, feltételezett funkcióval jelölt (szerkezeti és egyéb) génjének homológját sikerült azonosítanunk.

Ma már öt AHV teljes genomszekvenciája ismeretes: *Ictalurid herpesvirus 1*, *Cyprinid herpesvirus 3*, *Anguillid herpesvirus 1*, *Ranid herpesvirus 1* és 2. Ez vezetett a HV-ok taxonómiájában bekövetkezett gyökeres változásokhoz. 2008-ban a Nemzetközi Vírusrendszertani Bizottság (ICTV) elfogadta a már 2005-ben javasolt változtatásokat. A halak és kételtűek HV-ait az újonnan létrehozott *Alloherpesviridae* családba sorolták be. Az egyetlen puhatestűből izolált HV-nak a *Malacoherpesviridae* családot hozták létre. A magasabbrendű gerincesek (magzatburkosok) HV-ai maradtak a *Herpesviridae* családban. A három víruscsaládot az újonnan létrehozott, *Herpesvirales* rendbe sorolták be.

Napjainkban az *Alloherpesviridae* család négy elfogadott nemzetséget tartalmaz. A *Batrachovirus* nemzetségben a kételtűekből izolált HV-ok vannak. A *Cyprinivirus* nemzetség három, pontyfélékből leírt vírust tartalmaz, és feltehetőleg idetartozik az angolna-HV is, míg a *Salmonivirus* nemzetségben lazacfélék HV-ai találhatóak. Az *Ictalurivirus* nemzetség törpeharcsákból, illetve tokfélékből kimutatott HV-okat tartalmaz. Utóbbi két vírus besorolását az *Ictalurivirus* nemzetségbe kutatócsoportunk javasolta. A Herpesvirales Munkacsoport (Study Group) ICTV-nek benyújtott hivatalos javaslata az általunk közölt filogenetikai számításokon alapult.

Külföldi kutatócsoportok némelyike az *Alloherpesviridae* család két alcsaládra való felosztását szorgalmazza. Véleményük szerint az *Ictalurivirus*, *Salmonivirus* és a *Batrachovirus* nemzetség egy alcsaládba tartozik. 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.

A filogenetikai számítások mellett a megőrzött gének számának elemzése is a „három-csoport teóriát” erősíti. A RaHV-1 és 2 genomja mindössze 40 homológ ORF-et tartalmaz. A két ictalurivírus (AciHV-2 és IChV-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 tagjai 28 egyértelmű homológiát mutató génnel rendelkeznek. De véleményünk szerint, ezen víruscsoportok közti evolúciós távolságok sokkal nagyobbak, semhogy egy alcsaládba lehetne őket sorolni. 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 ősbibek, mint a *Herpesviridae* család tagjai, és a hosszabb evolúciós idő alatt genomjuk sokkal jobban divergálódott.

A három alcsaládra való felosztást az ide tartozó vírusok genommérete közötti különbségek is alátámasztják. Az ICHV-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, így jóval rövidebb, mint a ranid és cyprinid HV-oké. A filogenetikai számítások alapján is a salmonid HV-ok sokkal közelebbi rokonságban állnak az ictalurivírusokkal, mint bármelyik másik AHV-sal. 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.

Az AHV-ok három nemzetsége közül kettőnek a tagjait nagyon eltérő gazdákból írták le. Úgy tűnik, hogy az AHV-ok fő csoportjai nem a gazdafajok szerint különülnek el. 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. 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% 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.: macska AIDS vírusa és kutya parvovírus esetében. Továbbá az atadenovírusok és siadenovírusok esetében is megfigyeltek hasonló jelenséget. A gazdaváltásra vonatkozó elméletet tovább erősíti az a megfigyelés, hogy az AciHV-2 által okozott járványok során a mortalitás jóval magasabb (80%) mint az AciHV-1 által kiváltott betegség esetén (40%). Ezek a megfigyelések azt sugallják, hogy a gazda és vírus még nem töltötték el túl sok időt együtt. Ezért jelenlegi ismereteink szerint, feltételezzük, hogy az

ictalurivírusok az ictalurid halfajokkal koevolválódtak és gazdaváltással kerültek az acipenserid halfajokba.

IcHV-2 és SbSHV

Az IcHV-2 és SbSHV genomjának a DNS-polimeráz és a termináz első exonja által határolt génblokkját vizsgáltuk. Az összes eddig vizsgált ictalurivírusban (AciHV-2, IcHV-1 és 2, SbSHV) jól megőrzöttnek tűnik ez a génblokk, melynek összehasonlító elemzése megerősítette a filogenetikai számítások eredményeit. Az öt géntermék as 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. Az ICTV 2009-ben elfogadta a Herpesvirales Munkacsoport által benyújtott javaslatot, és az IcHV-2-t, mint önálló fajt az *Ictalurivirus* nemzetségbe tagolta.

Az SbSHV 2006-ban jelent meg először oroszországi halgazdaságokban, komoly gazdasági károkat okozva. 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. Az öt géntermék as hasonlósága az AciHV-2 (SRWSHV) fehérjéjéhez 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.

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.

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 általunk szekvenált DNS-polimeráz szakaszra igazak a már a CyHV-1 esetében megállapítottak, azaz as szinten a vírus vizsgált szakasza tökéletesen megegyezett a korábban leírt törzsek megfelelő szakaszával.

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 akárcsak egy rövid DNS-szekvenciát is nyerni.

Genomja a leghosszabb az eddig vizsgált AdV genomok közül, 48.395 bp. A genom végeit, mint minden AdV esetében, ITR szekvenciák alkotják, melyek hossza 126 bp-nak bizonyult. Az ITR-ek első 17 nt-ja nem tartalmaz guanint az eddig leírt AdV-oknál, de WSAdV-1-ben az első és ötödik nt guanin. A WSAdV-1 genomszerveződése jelentősen eltér a más állatokból és emberből izolált összes eddig megismert AdV-étől.

A WSAdV-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 WSAdV-1 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 a pVIII-tól jobbra. Az aviadenovírusok kapszidjának csúcsain két fiber található, a FAdV-1 genomja két fiber gént kódol, a többi tyúk aviadenovírus viszont csak egyet, de vertexenként két fiber illeszkedik a pentonalapba. 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 fiberek farki része az FNPVYP motívummal kapcsolódik a pentonalaphoz. A WSAdV-1 feltételezett 1-es, 2-es és 3-as fiberben a motívumot azonosítottunk. A szár ismétlődéseket tartalmaz, az 1-es és 2-es fibereknél 14 ismétlődést, a 3-asnál 12-t feltételezünk. Az 1-es és 3-as, valamint a 2-es és 4-es fiber homológ gének valószínűleg valamelyikük duplikációjával jöttek létre (4-es esetében inverzióval), legalábbis erre utal az általuk kódolt as-ak pozicionális illesztése. 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.

Az E2 régió génjei, a DBP, pTP, DNS-polimeráz, IVa2 gén, sem lokalizációjában, sem méretében nem mutat eltérést a másik négy nemzetség tagjában megfigyeltektől. A késői gének közül az 52K, pIIIa, pentonalap, hexon, proteáz, 100K, 33K és 22K gén nem mutat eltérést a másik négy nemzetségbe tartozó AdV-okhoz képest.

Kivételnek tekinthető a pVII fehérje génje mely a WSAdV-1 genomjában nagyon rövidnek bizonyult. A származtatott fehérje mindössze 24 as-ból áll, szemben az eddig jellemzettekkel (72-160 as). Ezzel összhangban csak egyetlen proteolitikus hasítási helyet lehetett azonosítani a szekvenciájában.

A pX fehérje szintén nagyon rövid, 34 as-ból áll (a többi nemzetség tagjaiban 71-214 as). A proteolitikus hasítás után keletkező termék hossza viszont átlagos méretűnek tűnik.

A pVI-os fehérje mérete átlagos a WSAdV-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, melyet minden eddig ismert AdV-ban leírtak. Ezért igen valószínű, hogy bár eltér ezen vágáshely szekvenciája a konszenzus szekvenciától, mégis működő hasítási hely.

A genom jobb oldalán, az utolsó megőrzött géntől, a pVIII-tól jobbra, 28 olyan ORF-et találtunk, amelyeket a kódolt fehérje 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 valószínűsített gének származtatott fehérjeterméke a parvovírusok nem-strukturális (NS) fehérjéjével mutat hasonlóságot. Az AdV-ok közül eddig csak aviadenovírusokban találtak hasonló géneket. Funkciójuk egyelőre ismeretlen az aviadenovírusok esetében. Az ORF25 származtatott fehérjéje két immunglobulin domént tartalmaz. Hasonló immunglobulin domént tartalmazó gént eddig szintén csak aviadenovírusokban írtak le, de azokéval nem mutat homológiát. Az ORF4 és 9 szulfotranszferázokat kódoló génekkel mutat hasonlóságot. Nincs róla tudomásunk, hogy hasonló géneket találtak volna vírusokban. A többi 23 ORF eredetére és/vagy funkciójára vonatkozóan nincs semmilyen feltételezésünk se.

A teljes genom mérete a korábban vizsgált AdV-ok esetében nemzetségenként jelentős eltéréseket mutat. Munkám kezdetekor az volt a hipotézisünk, hogy az AdV-ok genommérete növekvő tendenciát mutat az egyre magasabb rendű gazdáiban. 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 kétélteűekkel együtt fejlődött AdV leszármazási vonalnak felelnek meg. Ezek alapján azt vártuk, hogy a hal-AdV genomja lesz a legrövidebb. Ennek épp az ellenkezője bizonyosodott be.

A hipotézisünk szerint az AdV-ok a gazdafajaikkal együtt evolválódtak az évmilliók alatt. Mastadenovírusokat mindeztáig csak emlősökből írtak le, míg aviadenovírusokat csak különböző madaraktól. Minden bizonnyal ezek a vírusok a fent említett gerinces osztályok képviselőivel fejlődtek. Az atadenovírusokat először kórózdókban írtak 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. A pikkelyes hüllőkből izolált AdV-ok célzott vizsgálatok kiderült, hogy azok genomjának G+C tartalma viszont kiegyenlített, noha genomszerveződésük az atadenovírusokéra jellemző. Feltételezhető, hogy az atadenovírusok eredetileg a pikkelyes hüllőkkel fejlődtek, és később gazdaváltások útján jutottak egyéb osztályok (emlősök és madarak) képviselőibe. Az eltolódott bázisösszetétel a gazdaváltás következménye lehet. A siadenovírusoknak, jelenlegi ismereteink szerint, nem tudjuk az eredeti gazdafaját. Ugyanis mind a madaraktól, mind a békától, mind pedig a sulawesi teknősöktől kimutatott siadenovírusok G+C tartalma igen alacsony, tehát ezekbe a gazdába valószínűleg gazdaváltással jutottak.

A filogenetikai számítások azt mutatták, 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.

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 vírusfajt, 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 vírusfajnak 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.

Tudományos publikációk

Lektorált, impakt faktoral 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

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)

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.
- Pénzes 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.
- Pénzes 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.
- Pénzes 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.

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**, Magyar. Állatorvosok., 132. 302-308, 2010. IF: 0,200

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

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 a munka elkészüljön.

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

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

Természetesen köszönettel tartozom az MTA Állatorvos-tudományi Kutatóintézet 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.