

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Pulyka-, liba- és más madár-adenovírusok
genetikai vizsgálata

PhD értekezés tézisei

dr. Kaján Győző

2011

Témavezető és témabizottsági tagok:

Prof. Dr. Benkő Mária
Magyar Tudományos Akadémia Állatorvos-tudományi Kutatóintézete
témavezető

Dr. Dán Ádám
Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatósága
témabizottság tagja

Prof. Dr. Harrach Balázs
Magyar Tudományos Akadémia Állatorvos-tudományi Kutatóintézete
témabizottság tagja

1. Bevezetés

A baromfifajokban előforduló adenovírusokat a 2005-ben hivatalossá vált rendszertani beosztás szerint három nemzetségbe soroljuk az *Adenoviridae* családon belül. A *Si-* és *Atadenovirus* génuszba egy-egy baromfiból izolált adenovírus tartozik, és mindkettőnek ismert a teljes genomszekvenciája. Azonban a madár-adenovírusok többségét magában foglaló *Aviadenovirus* nemzetség tagjai közül munkám kezdete előtt csupán két házityúk-adenovírus teljes genomjának elemzését közölték. A pulyka vagy a különféle vízibarmfi fajok aviadenovirusaiból csak a legfontosabb kapszid fehérje, a hexon génjének rövid szakaszaiból volt ismert szekvencia.

Részleges hexon gén szekvenciák alapján végzett előzetes törzsfa-rekonstrukciós számításaink szerint a lúdalakúak (*Anseriformes*) aviadenovirusai határozottan elkülönülnek a tyúkalakúak (*Galliformes*) aviadenovirusaitól. Ezzel szemben a pulyka aviadenovirusai nagyfokú hasonlóságot mutatnak a házityúk aviadenovirusaival. A DNS-kimutatáson alapuló, modern és érzékeny diagnosztikai módszerek alkalmazásával kiderült, hogy adenovírusok jelenléte a hazai libaállományokban nem ritka, de esetleges kórtani szerepükre vonatkozó adatok nem álltak rendelkezésünkre.

Egy hazai izolálású pulyka-adenovírus törzs molekuláris klónozását és DNS-szekvenálását már elkezdték laboratóriumunkban. Ezért munkám céljából ennek a törzsnek a teljes genomszekvenálását tűztük ki. Továbbá egy szintén hazánkban izolált liba-adenovírus törzs teljes genomjának bázis-sorrendjét is meg kívántuk határozni. Ezután számítógépes programok segítségével terveztük azonosítani a más adenovírusokban is megtalálható, ismert géneket, és elemezni a várhatóan előforduló ismeretlen ORF-ek méretét, számát és pontos helyeződését.

A genomszekvenálási projekttel párhuzamosan terveztük további pulyka-, liba-, tyúk- és vadmadár-adenovírus minták vizsgálatát olyan esetekből, amelyek háttérben adenovírusok, mint kórokozók feltételezhetőek. Ezekből PCR segítségével terveztük felerősíteni a hexon gén bizonyos szakaszait, majd szekvenciájukat meghatározva ennek alapján tipizálni a vírusokat. Megkíséreltük más génszakaszok (DNS-polimeráz) PCR-rel történő felerősítését is, és vizsgáltuk ezek alkalmazhatóságát a tipizálásban.

Kutatásaink nemzetközi érdeklődésre is számot tartó, elméleti és gyakorlati eredményekkel is kecsegtettek. Feltételeztük, hogy alapkutatói eredményeink a madár-adenovírusok rendszertanának és feltételezett evolúciós útjának pontosításához járulhatnak hozzá. A diagnosztikai módszerek tökéletesítése, az egyes kórképek és adenovírus típusok közötti esetleges összefüggések feltárása pedig fontos adatokat szolgáltat a baromfi-egészségügy számára.

2. Anyag és módszer

2.1. A pulyka- és liba-adenovírus 1 típusok törzseinek szekvenálása

Egy hazai izolálású pulyka-adenovírus törzset vizsgáltunk, amelyet dr. Palya Vilmos izolált légúti tüneteket mutató, 10 hetes pulykákból csirkeembrió májsejteken. A törzs neve, melyet vizsgálataink után a pulyka-adenovírus 1 (azaz turkey adenovirus 1, TAdV-1) prototípus törzsének javasolunk, D90/2 volt. Hasonlóképpen a liba-adenovírus 1 (goose adenovirus 1, GoAdV-1) prototípus törzsének javasoljuk a P29-es jelzésű dr. Palya Vilmos által szintén hazánkban libaembrió májsejteken izolált vírust. A továbbiakban TAdV-1 és GoAdV-1 néven tárgyalom ezeket. A TAdV-1 esetében a véletlenszerű klónozás, a GoAdV-1 esetében pedig az ún. „sörétespuska” (shotgun) szekvenálás módszerét alkalmaztuk.

2.2. Egyéb madár-adenovírus minták PCR-es vizsgálata

Összehasonlítás céljából a korábban publikált belfasti TAdV-1 és -2 típusok prototípus törzseit is vizsgáltuk, továbbá egy prototípus tyúk-adenovírus (fowl adenovirus, FAdV) törzsgyűjtemény 10 különböző típusba tartozó törzsét (FAdV-2–8b, -10, -11) is. Ezen kívül aviadenovírusos fertőzöttségre gyanús, gyakorlati esetekből is kaptunk mintákat vagy izolátumokat. Ezeket a mintákat az adenovírusok DNS-függő DNS-polimeráz génjére irányuló PCR-rel, valamint a vírus fő szerkezeti fehérjéjének, a hexonnak a génjére irányuló PCR-rel is vizsgáltuk.

2.3. Alkalmazott bioinformatikai módszerek

A szekvenciákat a Staden programcsomag segítségével szerkesztettük és illesztettük össze. A TAdV-1 és GoAdV-1 genom virtuális restrikciós endonukleázos emésztését a pDRAW32 program segítségével végeztük el. A genomokat az Artemis program segítségével értelmeztük. A származtatott aminosavszekvenciákban feltételezhető megőrzött doméneket az InterProScan Sequence Search használatával kerestünk. A filogenetikai számításokat a Phylip programcsomaggal végeztük.

3. Eredmények

3.1. A genomok virtuális restrikciós endonukleázos emésztése, és a belfasti TAdV-1 és -2 törzs vizsgálata

A vizsgált pulyka-adenovírus D90/2 törzs, valamint liba-adenovírus P29 törzs virtuális restrikciós endonukleázos emésztése alapján kapott fragmentummintázat eredménye jelentősen eltért az irodalomban korábban közölt TAdV-1 és -2, valamint GoAdV-1, -2 és -3 DNS-ének megfelelő restrikciós enzim mintázatától. A hexon génre irányuló PCR termék szekvenálása továbbá kimutatta, hogy az eredeti belfasti TAdV-1 izolátum továbbpasszált leszármazottja mára a FAdV-8a típusal egyezik meg.

3.2. A pulyka- és liba-adenovírus 1 genomjának tulajdonságai

A GenBank Nucleotide adatbázisában a TAdV-1 teljes genomja a GU936707 számon érhető el, a GoAdV-1 teljes genomja pedig a JF510462 számon.

A TAdV-1 teljes genomja 45.413 bp-ból áll, ami eddig a leghosszabb ismert adenovírus genom. G+C-tartalma 67,55%, ami ugyancsak az eddigi legmagasabb a teljes genomok között. A fordított végismétlődések (inverted terminal repeat, ITR) hossza 95 bp. A GoAdV-1 genomja 43.376 bp-t tartalmaz, G+C-tartalma 44,6%, az ITR 39 bp. A genomterképeket az 1. ábra mutatja be.

Mindkét genom központi régiója megőrzött sorrendben tartalmazza azt a 16 gént, mely minden adenovírusban így található meg. Ezekhez illeszkedik még az U-exon és a fiber génje, hasonlóan, mint a három ismert genomú tyúk-adenovírusban is. A TAdV-1 genomjában egy teljes és két csökevényes fiber gént találtunk, a GoAdV-1 genomjában pedig két teljeset. A TAdV-1 bal genomvégén megtaláltuk az ORF0, ORF1, ORF1A, ORF1B, ORF2, ORF12, ORF13, ORF14 és ORF24, míg a jobb végén a lipáz, ORF8, ORF9, ORF11, ORF17, ORF20, ORF20A, ORF22 és ORF26 homológját. Mindössze egy olyan ORF-et (ORF50) találtunk a jobb végén, melynek származtatott terméke nem mutatott homológiát a GenBankban található egyetlen fehérjével sem. A GoAdV-1 bal genomvégén az ORF1, ORF2, ORF12 és ORF24 homológját, valamint 2 új ORF-et (ORF51, ORF60) találtunk. A jobb végén az ORF20, ORF20A és ORF22 homológját találtuk meg, a lipáz gént duplikálódva, és 8 teljes új ORF-et (ORF52-ORF59).

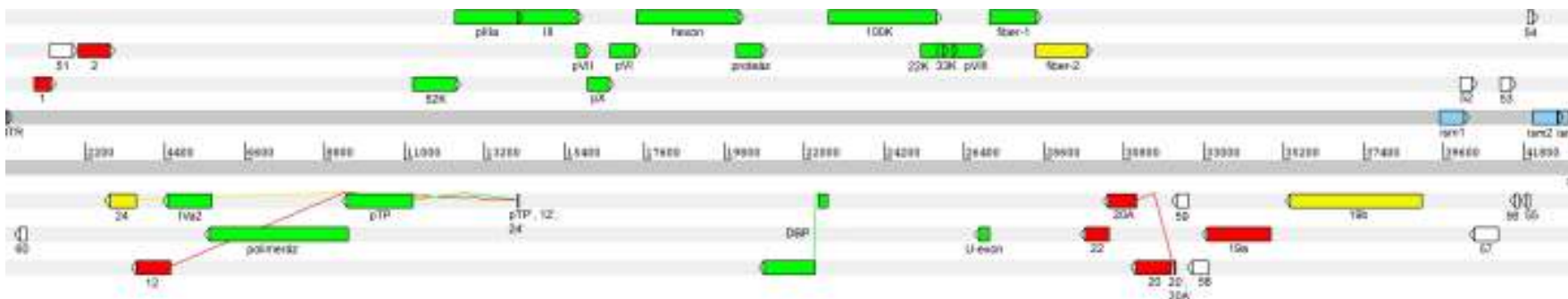
3.3. Filogenetikai elemzések

A teljes hexon gén származtatott aminosavszekvenciáján alapuló törzsfarekonstrukciós elemzésen a különböző génuszok tagjai egyértelműen elkülönültek a törzsfán, és ezt a magas bootstrap értékek is megerősítették. Mind a két szekvenált törzs

TAdV-1:



GoAdV-1:



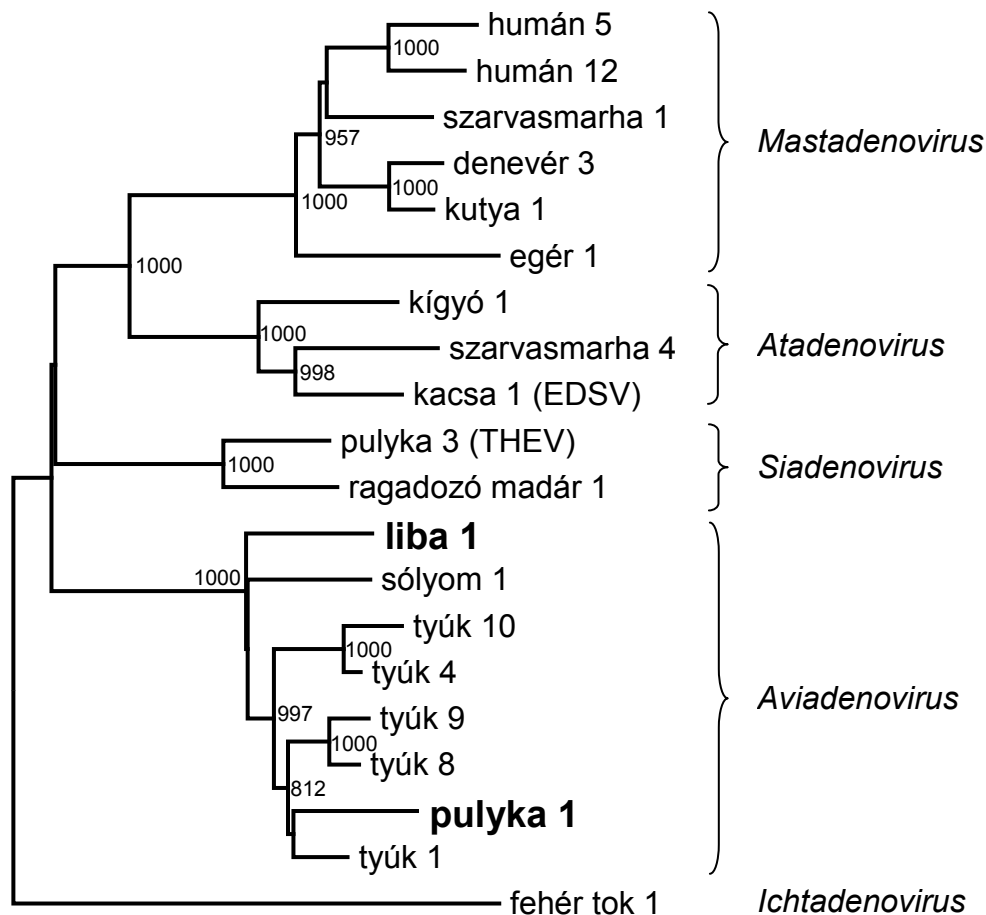
1. ábra: A pulyka-adenovírus 1 (TAdV-1) és liba-adenovírus 1 (GoAdV-1) teljes genomjának géntérképe. A hat világosszürke csík a hat leolvasási keret. Az exonokat vékony vonalak kötik össze. Zöld nyilak: a teljes *Adenoviridae* családban megőrzött központi genom régió génjei. Piros nyilak: minden aviadenovírusban megőrzött gének. Sárga nyilak: csak egyes aviadenovírusokban megtalálható gének. Fehér nyilak: egyedi, homológ nélküli gének. A fiber-2-L és fiber-2-R a TAdV-1 genomjában a második fiber génből eredő két csökevényes fiber gén. ism – ismétlődéseket tartalmazó régió; ITR – inverted terminal repeat, fordított végismétlődés; pTP – terminális protein prekurzora; DBP – DNA-binding protein, DNS-kötő fehérje

A színes ábra megtekinthető a tézisek digitális változatában az Állatorvos-tudományi Doktori Iskola honlapjáról letöltve:
<http://phd.univet.hu/lapok/A-index-ert.htm>

egyértelműen az *Aviadenovirus* génuszba osztályozódott, de filogenetikai távolságuk a többi fajtól megalapozza új fajokként történő elismerésüket (2. ábra).

A vizsgált 10 tyúk-adenovírus referenciatörzs DNS-függő DNS-polimeráz génjének részleges szekvenciáját HM853995–HM854004 elérési számon helyeztük el a GenBankban. A törzsfarekonstrukciós elemzés az egy fajba sorolt típusokat monofiletikusan ábrázolta, sőt a FAdV-D és -E faj típusai egy fajon belül aminosav szinten teljes mértékben megegyeztek. A tyúk-adenovírusok öt faja azonban jól elkülöníthető a törzsfán, amit a magas bootstrap értékek is alátámasztanak.

Az *Aviadenovirus* génuszon belül a vízibaromfi fajok adenovírusai határozottan elkülönülnek a tyúkalakúak adenovírusaitól. A baromfi-adenovírus minták PCR-es vizsgálata alapján a hazánkban előforduló tyúk-adenovírusok többsége a FAdV-D vagy -E, kisebb része a FAdV-A fajokba sorolható. A vadmadár mintákból at-, avi- és sziaadenovírusok is kimutathatóak voltak.



0,2

2. ábra: Adenovírusok teljes hexon génjének származtatott aminosavszekvenciáján alapuló törzsfarekonstrukciós elemzés. A törzsfát a megjelenítéshez a fehér tok 1-es típusú adenovírusával gyökereztettük. Az adenovírus típusokat a fán a gazdaállat nevével és a típuszámmal tüntettük fel (ragadozó madár 1: raptor adenovirus 1). A vizsgált pulyka- és liba-adenovírus 1 típusokat félkövéren és nagyobb betűmérettel tüntettük fel. Dőlt betűvel a génuszokat jelöltük. A bootstrap értékek 1000 analízisre vonatkoznak, és akkor tüntettük fel őket, ha 750-nél nagyobbak.

4. Megbeszélés

4.1. Pulyka- és liba-adenovírus 1

Kutatócsoportunk elsőként határozta meg nem házityúk eredetű aviadenovírusok teljes genomjának szekvenciáját. Eredményeinket összevetve más kutatócsoportok által közölt adatokkal, az alábbi következtetésekre jutottunk.

Az évtizedekkel ezelőtt leírt TAdV-1 és GoAdV-1 eredeti izolátuma mára nem elérhető, szekvencia pedig nem áll rendelkezésre belőlük. Ezért célszerűnek látszik, hogy a témában különösen aktív kutatókkal történő egyeztetés után az általunk szekvenált D90/2 pulyka-adenovírus és P29 liba-adenovírus törzs képviselje ezentúl a pulyka-adenovírus 1 és liba-adenovírus 1 típusokat. A törzseket ilyen számmal javasoljuk referenciatörzsnek, annak ellenére is, hogy a genomok virtuális restriktív enzimes emésztése megmutatta, ezek a törzsek nem egyeznek meg az eredetileg leírt TAdV-1 és GoAdV-1 típusok törzseivel. Nem tartjuk ugyanis ésszerűnek az eddigi számozás folytatását, mivel a régi típusokból semmilyen szekvenciainformáció nem áll rendelkezésünkre, és ez várhatóan nem is fog változni. Az eredeti belfasti TAdV-1 típus törzsének továbbpasszált leszármazottja mára ugyanis a FAdV-8a típusal (58-as törzs) egyezik meg.

Eredményeink (genomszerveződés, homológ gének, splice-helyek, proteáz vágási szignálok, gazdafaj) alapján elmondhatjuk, hogy a két vizsgált vírus az *Aviadenovirus* genuszba tartozik, és ezt a törzsfarekonstrukciós elemzés is alátámasztja. Ugyanakkor mindkét vírus olyannyira elkülönül a már elfogadott aviadenovírus fajoktól, hogy új fajként való elfogadásuk megalapozottnak tekinthető. Ezért a Nemzetközi Vírusrendszertani Bizottság felé hivatalos javaslatot fogunk tenni, melyben javasoljuk a Turkey adenovirus B faj elfogadását a TAdV-1 típus részére, továbbá a GoAdV-1 típus besorolását a *Goose adenovirus* fajba.

4.2. A tyúk-adenovírus referencia törzsek filogenetikája; polimeráz gén alapú PCR a diagnosztikai kimutatásukra

Az adenovírusok DNS-függő DNS-polimeráz génjén alapuló törzsfarekonstrukciós elemzés szerint a tizenkét tyúk-adenovírus típus öt fő kládba sorolódik, melyek megfelelnek a tyúk-adenovírusok öt elfogadott fájának. Ez az első olyan PCR, mely úgy képes kimutatni a tyúkokat fertőző avi-, at- és sziaadenovírusokat, hogy primereit nemcsak a tyúk-adenovírusok, a pulyka vérzéses bélgyulladásának vírusa (turkey hemorrhagic enteritis virus, THEV, TAdV-3) és a tyúk tojáshéjképződési zavarának vírusa (egg drop syndrome virus, EDSV, kacsá-adenovírus 1) alapján tervezték, ezért új, eddig nem ismert adenovírusok, esetleg új tyúk-adenovírusok kimutatására is alkalmas lehet. Használatával írtak is már le

vadmadarakat fertőző új adenovírusokat. Ezt a reakció nagyfokú érzékenysége is elősegíti, a PCR ugyanis kétkörös (nested). A PCR a DNS-függő DNS-polimeráz gén legkonzerváltabb szakaszát célozza meg, melynek szekvenciája annyira megőrzött, hogy általában csak előzetes, génusz- és fajszintű besorolást tesz lehetővé az eredmény. Fajon belüli, típus szintű elkülönítésre egyéb gének szekvenciája, például hexonszekvencia szükségeltetik.

4.3. Egyéb madár minták PCR-es szűrése; új adenovírusok filogenetikája

A vizsgált tyúk-adenovírus minták többsége a FAdV-D és -E fajba sorolódott, hasonlóan mások vizsgálataihoz. Ezen fajok típusai okozzák a tyúkok leggyakoribb adenovírusos kórképét, a sejtzárványos májgyulladást (inclusion body hepatitis). De a FAdV-1 típust is sikerült kimutatnunk. Ezt egy esetben a patológiához is kötni tudtuk, a Lengyelországból származó mintákat ugyanis egy zúzógyomor fekélyes tyúkállományból kaptuk. Mind a FAdV-B, mind a FAdV-C faj képviselőjét mindössze egyszer sikerült kimutatnunk. A FAdV-B fajba sorolható törzset korábban még nem mutattak ki hazánkban, így ez volt az első hazai izolálása és tipizálása.

Egy májgyulladást és hydropericardium szindrómát mutató liba állományból sikerült kimutatnunk egy liba-adenovírus jelenlétét. Bár a vizsgált polimeráz szakasz aminosavszekvenciájában nem találtunk eltérést a liba-adenovírus törzsek között, a részleges hexon szekvenciák már nagyobb variációt mutattak, és az ezen a szakaszon is vizsgált két törzs itt jól elkülönült. A teljes genomjában szekvenált P29 törzs és a hydropericardiumot okozó törzs nukleotidszekvenciája között a vizsgált szakaszon mindössze 60%-os a hasonlóság. Ezek alapján feltételezhetjük, hogy a vizsgált négy GoAdV törzs egy fajt, de legalább két típust alkot.

Néhány madár-adenovírus a *Siadenovirus* génuszba sorolódott, de ez az ott megtalálható madár-adenovírusok számának növekedésével nem is meglepő. Az általam vizsgált madár mintákból az *Atadenovirus* génuszba még több madár-adenovírus került, az egyik mintából rögtön két elkülönülő törzs, melyeket távolságuk alapján biztosan külön fajba sorolhatunk. A minták többsége, egy kivételével, egy külön leágazást képvisel az atadenovírusok között, mely csak madár-atadenovírusokat tartalmaz. Ezen vírusok gazdafaja szinte minden esetben a verébalakúak rendjébe sorolható madár, az egyetlen kivétel a kládon belül a kacsá-adenovírus 1 (EDS vírus). Hat házi veréb mintából is ki tudtuk mutatni atadenovírust, ezekből öt valószínűleg egy fajt alkot, mert a részleges polimeráz aminosavszekvencia alapján alig különböznek el egymástól. Feltételezhetjük tehát, hogy a verébalakú madarakkal hosszabb ideje együtt fejlődhetnek az atadenovírusok, és jelenlétük e madarakban feltehetően egy ősi gazdaváltás következménye.

5. Új tudományos eredmények

1. A világon először határoztunk meg teljes genomszekvenciát nem tyúk eredetű baromfi-adenovírusokból. Egy pulyka- és egy liba-adenovírus elemzésével megállapítottuk, hogy mindkettő az *Aviadenovirus* nemzetség tagja.
2. Meghatároztuk a virális DNS-függő DNS-polimeráz gén részleges nukleotidsorrendjét a tyúk-adenovírusok (FAdV-ok) tíz olyan típusának referenciatörzséből, melyből ez eddig nem volt elérhető. A génszakaszt rendkívül érzékeny, kétkörös PCR segítségével megbízhatóan lehet felszaporítani. Ezzel a PCR módszer állategészségügyi diagnosztikai célra való használhatóságát jelentősen fokoztuk.
3. Először állapítottuk meg Magyarországon egy FAdV-B fajba sorolható törzs jelenlétét molekuláris módszerrel.
4. Különbféle baromfi- és vadmadárfajokból származó minták PCR-es szűrése során korábban ismert FAdV típusokat és új adenovírusokat mutattunk ki.
5. Megállapítottuk, hogy hazánkban, illetve a környező országokban a leggyakoribb tyúk-adenovírusok a FAdV-D és -E, valamint ritkábban a FAdV-A fajokba sorolhatók.
6. Megállapítottuk, hogy a vadmadaraktól kimutatott, új adenovírusok általában az *Aviadenovirus* génuszba tartoznak, de énekesmadarakban (*Passeriformes*) másik két (*At-* és *Siadenovirus*) nemzetségbe tartozó vírusok is gyakoriak.

6. A doktori kutatás eredményeiből született közlemények

6.1. Lektorált, impakt faktoros tudományos folyóiratban megjelent/elfogadott publikációk

Kaján Gy.L., Kecskeméti S.: **Egy tyúk-adenovírus B fajba tartozó típus első magyarországi izolálása**, Magy. Állatorv. Lapja, 2011., [nyomdában]

Kaján Gy.L., Sameti, S., Benkő M.: **Partial sequence of the DNA-dependent DNA polymerase gene of fowl adenoviruses: A reference panel for a general diagnostic PCR in poultry**, Acta Vet. Hung., 59. 279-285, 2011.

Kaján Gy.L., Stefanics 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.

Ivanics É., Palya V., Markos B., Dán Á., Ursu K., Harrach B., Kaján Gy., Glávits R.: **Hepatitis and hydropericardium syndrome associated with adenovirus infection in goslings**, Acta Vet. Hung., 58. 47-58, 2010.

6.2. Könyvfejezet

Harrach B., Kaján Gy.L.: **Aviadenovirus**, In: *The Springer Index of Viruses*. Szerk.: Tidona, C.A., Darai, G., Berlin: Springer, 2011., [nyomdában]

6.3. Konferencia prezentációk

Kaján Gy.L., Davison, A.J., Harrach B., Palya V., Benkő M.: **Beyond mammalian adenoviruses: genome and phylogeny of goose adenovirus**, 8th Int. Adenovirus Meeting, Zürich, 133, 2006.

Kaján Gy.L., Davison, A.J., Harrach B., Palya V., Benkő M.: **Sequencing and phylogeny of a goose adenovirus**, In: *Proceedings of the ESVV 7th Int. Congr. Vet. Virol.* Szerk.: Leitao, A., Martins, C., Lisbon, 129, 2006.

Kaján Gy.L., Davison, A.J., Harrach B., Palya V., Papp T., Stefanics R., Benkő M.: **Sequencing and comparative analysis of a goose and a turkey adenovirus**, Acta Microbiol. Immunol. Hung., Abstracts of the 15th Int. Congr. Hung. Soc. Microbiol., 54. (Supplement) 53, 2007.

Kaján Gy.L., Davison, A.J., Palya V., Harrach B., Benkő M.: **Full genome sequence analysis of a goose and a turkey aviadenovirus**, 9th Int Adenovirus Meeting, Dobogókő, 92, 2009.

Kaján Gy.L., Davison, A.J., Palya V., Harrach B., Papp T., Benkő M.: **Comparative sequence analysis of aviadenoviruses from a goose and a turkey**, 8th Int. Congr. Vet. Virol., 20 years of ESVV: Integrating classical and molecular virology, Budapest, 110, 2009.

Kaján Gy.L., Davison, A.J., Palya V., Harrach B., Papp T., Stefancsik R., Benkő M.: **Comparative genome analysis of aviadenoviruses isolated from goose and turkey**, XIV. Int. Congr. Vir., Istanbul, 217, 2008.

6.4. A doktori kutatás témájához nem kapcsolódó tudományos közlemények

Mayer B., Kis Zs., Kaján Gy., Frenyó L.V., Hammarström, L., Kacs Kovics I.: **The neonatal Fc receptor (FcRn) is expressed in the bovine lung**, Vet. Immunol. Immunopathol., 98. 85-89, 2004.

Papp T., Fledelius, B., Schmidt, V., Kaján Gy.L., Marschang, R.E.: **PCR-sequence characterization of new adenoviruses found in reptiles and the first successful isolation of a lizard adenovirus**, Vet. Microbiol., 134. 233-240, 2009.