Állatorvostudományi Egyetem

Gyógyszertani és Méregtani Tanszék

Adeno-asszociált vírusok összehasonlító genom analízise

Adeno-associated viruses comparative genome analysis

szakdolgozat

Szabó Annamária

Témavezető:

Dr. Bányai Krisztián, tudományos főmunkatárs
HUN-REN Állatorvostudományi Kutatóintézet

Társ-témavezető:

Szabóné dr. Kaszab Eszter, tudományos munkatárs
Állatorvostudományi Egyetem, Gyógyszertani és Méregtani Tanszék

2024

Absztrakt

Szakdolgozatomban az adeno-asszociált vírusok biológiai és rendszertani jellemzőinek átfogó áttekintését követően az avian adeno-asszociált vírusok genomjainak összehasonlító elemzését végeztük el, különös tekintettel a filogenetikai kapcsolatokra és rekombinációs eseményekre. A virális nukleinsav kivonása után teljes genom szekvenálása Illumina berendezéssel történt, majd a szekvenálási adatok bioinformatikai feldolgozásával meghatároztuk a kérdéses törzsek teljes genom szekvenciáját. Ezt követően filogenetikai és rekombinációs elemzéseket végeztünk, ami rávilágított az egyes törzsek közti evolúciós kapcsolatokra. Végül, a rendelkezésünkre álló adatok alapján rövid áttekintést készítettünk az avian adeno-asszociált vírusok és aviadenovírusok egyidejű előfordulására vonatkozóan.

Abstract

In my thesis, following a comprehensive review of the biological and taxonomic characteristics of adeno-associated viruses, we conducted a comparative analysis of the genomes of avian adeno-associated viruses, with a particular focus on phylogenetic relationships and recombination events. After viral nucleic acid extraction, whole genome sequencing was performed using an Illumina platform, and the sequencing data were bioinformatically processed to determine the complete genome sequences of the strains in question. Subsequently, phylogenetic and recombination analyses were carried out, shedding light on the evolutionary relationships between the individual strains. Finally, based on the available data, we provided a brief overview of the co-occurrence of avian adeno-associated viruses and aviadenoviruses.

Tartalomjegyzék

Absztrakt 2
Tartalomjegyzék 4
Rövidítések jegyzéke 5
1. Bevezetés 6
2. Szakirodalmi áttekintés 7
2.1. Parvovirusok rendszertana 7
2.2. Parvovirinae alcsalád jellemzése 8
2.3. Parvoviridae család biológiai tulajdonságai 10
2.4. Adeno-asszociált vírusok biológiai tulajdonságai 11
2.5. Adenovírusok jellemzői 11
2.6. Adeno-asszociált vírusok vírus-sejt kapcsolata 13
2.7. Adeno-asszociált vírusok genom szerkezete és replikációja 13
2.8. Látencia kialakítása 15
2.9. Az adeno-asszociált vírusok patogenitása 15
3. Metagenomika 16
3.1. Metagenomika definíciója, változatai 16
3.2. Virális metagenomika lépései 16
4. Az adeno-asszociált vírusok biotechnológiai alkalmazása 18
5. Célkitűzések 20
6. Módszer 21
6.1. Virális nukleinsav kivonás 21
6.2. Illumina teljes genom szekvenálás 21
6.3. Szekvenálási adatok elemzése és annotálása 22
6.4. Evolúciós és filogenetikai elemzések 23
7. Eredmények 24
7.1. AAAV törzsek azonosítása 24
7.2. Teljes genom meghatározás 27
7.3. Teljes genom alapú rekombináció elemzés 29
7.4. Filogenetikai elemzések 33
7.5. Avian adeno-asszociált vírusok együttes előfordulása adenovírusokkal csirkékben 40
8. Megbeszélés 42
9. Összefoglalás 43
10. Irodalomjegyzék 44
11. Köszönetnyilvánítás 47

Rövidítések jegyzéke

AAV	adeno-asszociált vírus
AAAV	avian adeno-asszociált vírus
aap	összeépülés aktiváló fehérje (assembly associated protein)
as	aminosav
bp	bázispár
cDNS	komplementer dezoxiribonukleinsav
Cap	kapszid fehérje
CAV	csirke anémia vírus
CRE	cisz regulált elemek (cisz regulated elements)
DNS	dezoxiribonukleinsav
dNTP	dezoxiribonukleid-trifoszfát
ds	duplaszálú
EMA	Európai Gyógyszerügynökség
FDA	Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivatala
ICTV	Nemzetközi Vírusrendszertani Bizottság (International Committee on Taxonomy of Viruses)
IBV	fertőző brochitis vírus
ITR	inverz terminális ismétlődés (inverted terminal repeat)
kb	kilobázis
NGS	új generációs szekvenálás (next generation sequencing)
nm	nanométer
nt	nukleotid
ORF	nyitott leolvasási keret (open reading frame)
RBS	Rep kötőhely
rDNS	riboszomális DNS
RNS	ribonukleinsav
Rep	replikáció iniciált fehérje (replication initiation protein)
PCR	polimeráz láncreakció
PLA	foszfolipáz A
SISPA	sequence-independent single-primer amplification
ss	szimplaszálú
TRS	terminal resolution site

1. Bevezetés

Dolgozatom témáját a *Parvoviridae* család, *Parvovirinae* alcsaládjának *Dependoparvovirus* nemzetségébe tartozó, sajátos szaporodási ciklussal rendelkező adeno-asszociált vírusok képezik.

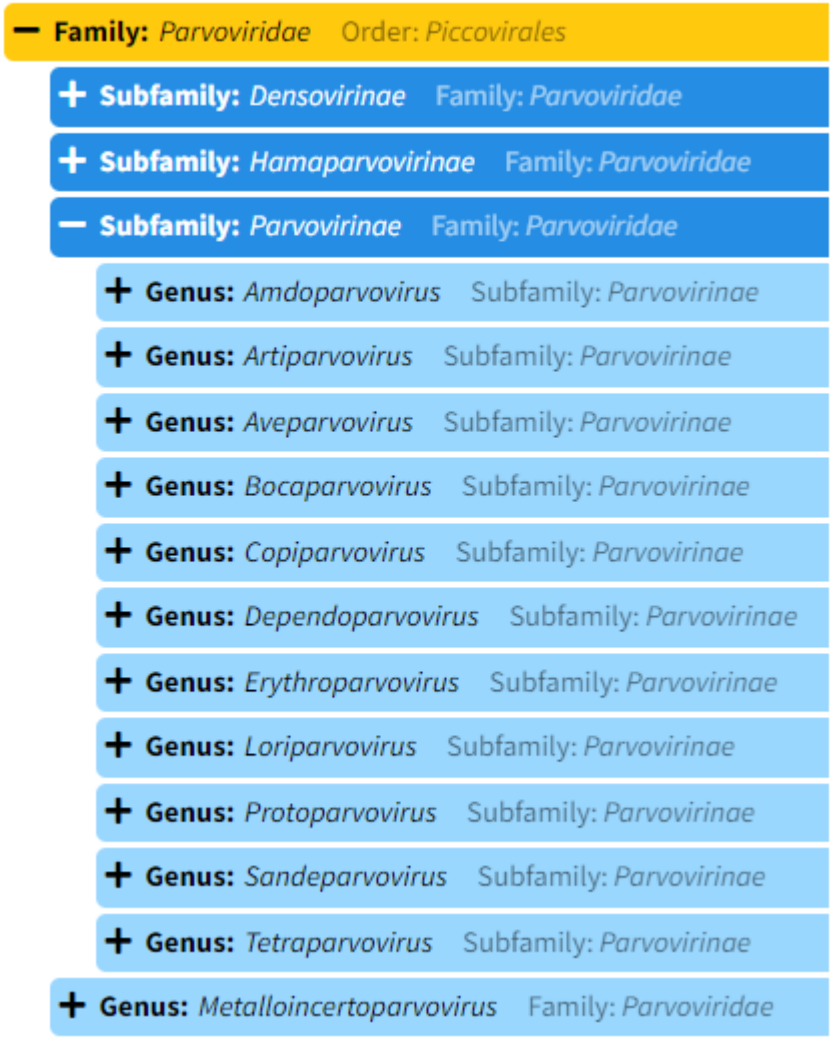
Témaválasztásomat egyrészről ismeretek hiánya motiválta, ugyanis egyetemi tanulmányaim során csak említés szintjén volt szó az adeno-asszociált vírusokról, másrészt a molekuláris biológia és bioinformatika iránti érdeklődésem játszott közre, melybe munkám során nagy örömömre szolgált betekintést nyerni.

Vizsgálataink alapját a világ minden tájáról származó, baromfi eredetű minták nyújtották, melyekből előzetesen tenyésztéses módszerrel és PCR-rel adenovírust mutattak ki. A beérkezést követően már metagenomikai módszerekkel volt lehetőségünk vizsgálatokat végezni. Szakdolgozatomban az azonosított adenovírusokkal egyidejűleg előforduló adeno-asszociált vírusokat vizsgáltuk. Munkánk célját az új vírustörzsek azonosítása, genetikai változatosságának megismerése, az őket jellemző evolúciós mechanizmusok feltérképezése és filogenetikai kapcsolataik megismerése képezte. Ezen felül a teljes vírusgenomok kinyerése révén a génbanki adatbázis gazdagítása vált lehetővé.

2. Szakirodalmi áttekintés

2.1. Parvovirusok rendszertana

A *Parvoviridae* családot 3 alcsalád alkotja, ezek a *Parvovirinae*, *Hamaparvovirinae* és *Desnovirinae* alcsalád. A *Parvovirinae* alcsalád képviselői gerinceseket képesek fertőzni, állatorvosi jelentőséggel leginkább ez a taxon rendelkezik. A *Desnovirinae* alcsalád főként rovarpatogéneket foglal magába. Azokat a vírusokat melyek gerinces és gerinctelen állatokat is képesek fertőzni a legújabb, *Hamaparvovirinae* alcsaládba sorolják [1]. A *Parvovirinae* alcsalád számos további nemzetségre osztható, melyek az *Amdoparvovirus*, *Aveparvovirus*, *Artiparvovirus*, *Bocaparvovirus*, *Copiparvovirus*, *Dependoparvovirus*, *Erythroparvovirus*, *Protoparvovirus*, *Loriparvovirus*, *Sandeparvovirus* és a *Tetraparvovirus* genus [2].



1. ábra: Parvoviridae taxonómia. /International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV): https://ictv.global/taxonomy//

2.2. *Parvovirinae* alcsalád jellemzése

Az utóbbi évek során történt vírus metagenomikai technikák fejlődése által lehetővé vált a minden korábbinál nagyobb léptékű, új parvovírusok azonosítása beteg és egészséges állatokban egyaránt. Az újonnan felfedezett parvovírusok közül sok enyhe tünetekkel járó megbetegedést okoz, vagy nem patogén. Azonban egyes leírások bizonyos állatfajok esetében korábban megállapított megbetegedések etiológiai hátterét tárták fel [3].

Az *Amdoparvovirus* genus legismertebb tagja a nyércek aleuti betegségét okozó *Amdoparvovirus carnivoran-1*, mely leginkább az aleuti színváltozatú nyércekben, hypergammaglobulinaemiát okoz és következményes glomerulonephritishez, vasculitishez vezet. Az érintett színváltozathoz antigénprezentációs hiba társul, mely megakadályozza a kórokozó hatékony eliminálását és III-as típusú hiperszenzitivitási reakció kialakulásához vezet [4]. 2011 után egyéb állatfajok esetében is kimutatásra kerültek új amdoparvovírusok [5].

Az *Aveparvovirus* genusba tartozik az *Aveparvovirus galliform-1*, mely a csirkékben és pulykákban széles körben előfordul. Betegségben betöltött szerepe nem tisztázott, bár összefüggésbe hozták brojlerek maladszorpciós szindrómájával, illetve a pulykákban megfigyelhető PEMS (poultry enteritis and mortality syndrome) tünetegyüttessel [6].

A *Copiparvovirus* genusba tartozó vírusokat eddig csak emlősökben azonosították és klinikai jelentőségük a legtöbb esetben nem bizonyított. Először tehenekben és sertésekben írták le, később lovakban is azonosították. A lovak fulmináns, akut májelhalását először Sir Arnold Theiler írta le 1918-ban és Theiler-betegségként vált ismertté. Száz évvel később, 2018-ban az EqPV-H-t (Equine parvovirus hepatitis) NGS (next generation sequencing) technológiával azonosították olyan lóból, amely Theiler-betegség következtében elpusztult. Később retrospektív vizsgálatokkal rávilágítottak, hogy a Theiler-betegség elsődleges kórokozójának tekinthető ló parvovírust sikerült azonosítaniuk [3, 7, 8].

Az *Erythroparvovirus* genus tagja a humán B19 vírus, melyet 1974-ben fedeztek fel. Az erythroid progenitor sejtek lízisét okozva a vérképzés károsodásához vezet. A betegség súlyosabb formája leginkább immunszuprimált egyéneket érint, illetve terhes nőkben a magzatot megtámadva a terhesség korai szakaszában vetélést, később magzatkárosodást okozhat. A populáció jelentős része szeropozitivitást mutat, a többség gyermekkorban átesik a fertőzésen, enyhe lázas tünetek és erythematosus kiütések kíséretében[9].

A *Protoparvovirus* genusba tartozik a sertések parvovírusa (*Protoparvovirus ungulate-1*) Először 1965-ben az Amerikai Egyesült Államokban leírt megbetegedés. Sertések infertilitását okozó egyik legfontosabb ágens. Az esetek többségében nem okoz klinikai tüneteket nem vemhes, kifejlett sertésekben [10]. A vemhesség előrehaladottságától függően

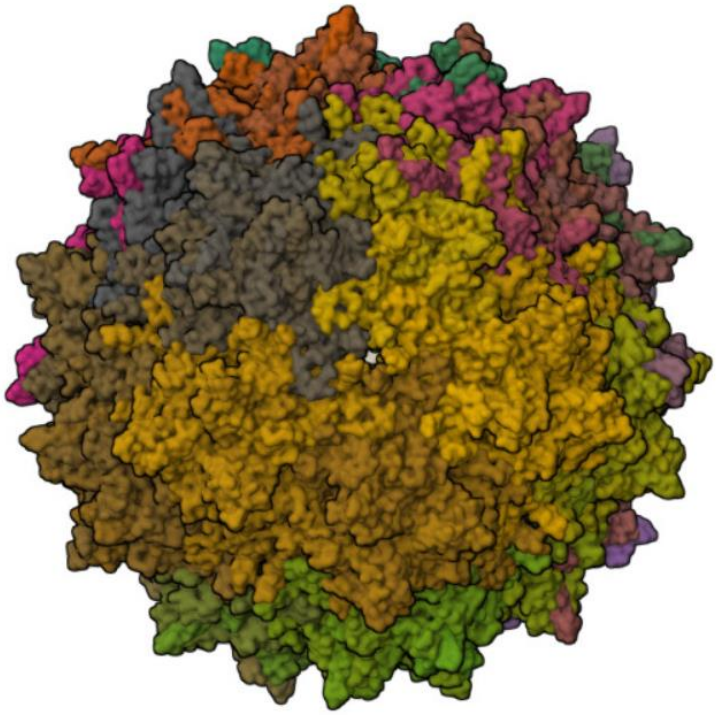
viszont embriófelszívódást (30 napos korig), később magzatelhalást és mumifikációt idézhet elő, 70 napos kor felett pedig a magzati immunválasz megjelenése után élő, gyenge vagy mumifikált magzatok előfordulását okozhatja [11].

A nemzetség másik jelentős képviselője a *Protoparvovirus carnivoran-1*. Az 1900-as évek első felében macskákban figyeltek meg enteritissel, panleukopaeniával és cerebellaris ataxiával járó megbetegedést, melyet a macska panleukopaenia vírus (FPV) okoz. Néhány évvel később, az 1940-es évek végén hasonló betegséget figyeltek meg nyércekben. 1978-ban pedig kutyák új vírusos megbetegedését azonosították, mely enteritist, fiatal egyedekben myocarditist is okozott. Később a már jól ismert macska panleukopaenia egyik variánsaként azonosították (CPV-2, ma *Protoparvovirus carnivoran-1*). Az egyes fajokat megbetegítő vírusok között szoros genetikai rokonság figyelhető meg. Jellemzően súlyos, akut enteritisszel és egyidejű immunszupresszióval járó kórképet okoznak [12].

1960 és 1962 között adenovírus preparátumokat vizsgáltak elektronmikroszkóp alatt és a sejteken adenovírusokkal egyidejűleg jelenlévő egyéb vírust sikerült azonosítani. Megfigyelték, hogy ezek csak adenovírus jelenlétében replikálódnak, ezért adeno-asszociált vírusnak (AAV) nevezték el őket [13]. Később filogenetikai vizsgálatok alapján a ludak, kacsák, mosuszkacsák és barbarikacsák parvovírusát is ehhez a nemzetséghez sorolták, bár ezek nem igényelnek egyéb vírust a sikeres replikációhoz. Ma egységesen a *Dependoparvovirus* genusba tartoznak. A genus eddigi egyetlen patogén vírusa a *Dependoparvovirus anseriform-1*, mely ludakban és pézsmakacsákban előforduló Derzsy-betegség kórokozója, ehhez a fajhoz a goose parvovirus (GPV) és a kacsákban hasonló kórképet okozó duck parvovirus (DPV) tartozik. A nemzettség további tagjaitól eltérően autonóm parvovírusok. Ludakban a Derzsy-betegség néhány hetes életkorban leginkább érfalkárosodással, máj- és szívizomgyulladással, a hasüregben savó-felhalmozódással járó kórképet okoz. Későbbi életkorban történő fertőződésnél hasmenés, tollfejlődési rendellenességek figyelhetők meg. A nagyüzemi állattartással világszerte endémiássá vált. Kacsákban a DPV fertőzés esetében az idegrendszeri tünetek, valamint a csőr és tollfejlődési rendellenességek meghatározóbbak [11]. A genus további tagjai között megtalálhatók főemlősök (*Dependoparvovirus primate 1*), emlősök (*Dependoparvovirus mammalian 1*), húsevők (*Dependoparvovirus carnivoran 1*), madarak (*Dependoparvovirus avian 1-2*), denevérek (*Dependoparvovirus chiropteran 1-2*), hüllők (*Dependoparvovirus squamate 1-2*), fókák (*Dependoparvovirus pinniped 1*) és rágcsálók (*Dependoparvovirus rondent 1-2*) dependoparvovírusai [14].

2.3. *Parvoviridae* család biológiai tulajdonságai

A *Parvoviridae* családba tartozó vírusok kisméretű, lineáris, egyszálú DNS (dezoxiribonuklinsav) genommal rendelkeznek, mely jellemzően 4-6 kilobázis hosszúságú. Nevükből adódóan kisméretűek, ikozaéder szimmetriájú kapszidjuk 21-26 nm átmérőjű, mely 60 másolatban tartalmazza a háromféle kapszid-proteint, ezek a VP1, VP2, VP3. Burokkal nem rendelkeznek, ellenálló képességük nagy.



2. ábra: Az avian adeno-asszociált vírus kapszid struktúrája.
https://doi.org/10.2210/pdb8tex/pdb

Az 56 Celsius fokot 1 órán át elviselik és pH 3-9 között is stabilak. Beszáradt váladékokban akár 4-5 hónapig is fertőzőképesek maradnak. A család képviselői stenoxen kórokozók, többnyire csak adott fajt, illetve azok közeli rokonait fertőzik [15]. Képesek vörösvértestek abszorpciójára és azokat haemagglutinálják is. A parvovírusok által kiváltott immunválasz tartós, neutralizáló ellenanyagok képződésével jár. Jellemzően az osztódó sejteket nagy számban tartalmazó szövetekben szaporodnak, ilyen a lymphoreticularis szövet, bélhám crypta sejtek, fejlődő magzat, fiatal állatok myocardiuma. A horizontális fertőződés jellemzően orális felvétellel történik, és bélsárral, vizelettel, nyállal, ondóval egyaránt ürülnek a fertőzött állat szervezetéből. Vertikális átvitel is jellemző a víruscsaládra, madarak esetében pedig meghatározó a germinatív út [11].

A parvovírusok autonomitása azok multiplikációs stratégiájától függ. Kisméretű genomjuk nem kódol virális polimeráz enzimet, ebből kifolyólag kizárólag olyan sejtekben képesek

sokszorozódni, amelyek tartalmaznak aktív celluláris polimerázt. Ez a gazdasejt S-fázisát jelenti, amikor is az aktív celluláris polimeráz a gazdasejt DNS-e mellett a virális DNS-t is képes felépíteni. Ez a szöveti tropizmusuk magyarázata [11].

2.4. Adeno-asszociált vírusok biológiai tulajdonságai

Az adeno-asszociált vírusok legfőbb biológiai tulajdonságai megegyeznek a fent említettekkel. Genomjuk 4,8 kb hosszúságú lineáris szimplaszálú DNS, melyet pozitív és negatív irányultságban egyaránt tartalmaz kapszidjuk. Szaporodásukat tekintve a *Parvoviridae* család többi tagjától is redukáltabbak. Produktív fertőzést leginkább akkor képesek előidézni, ha a fertőzött sejtben jelen van egy adeno- vagy herpeszvírus, esetleg mindkettő. Ezeket esetükben összefoglalóan helper vírusnak nevezzük. A többi parvovírustól eltérően széles gazdaspektrummal rendelkező, euryxen vírusok [15]. Természetes gazdakörük magába foglalja a gerinces élőlények többségét, számos szövetféleségből kimutathatók [16]. Életciklusuk kiemelkedő jellemzője a látens fertőzés kialakítása a sejtgenomba való integráció révén. Amennyiben az AAV olyan sejtet fertőz, amelyikben nincsen jelen helpervírus, a virális genom kromoszomális integrációval, vagy episzomális DNS kialakításával képes fennmaradni és hosszantartó látenciát elérni, így növelve a helper vírussal való találkozás esélyét. A széles gazdaspektrum, illetve a kromoszomális integrációval létrehozott látens fertőzés a széleskörű elterjedésük kulcsa. Az extrakromoszómális vagy integrált látencia funkcionálisan egyenértékűnek tekinthető, amennyiben a sejt nem osztódik, osztódás után ugyanis az episzomális DNS nem kerül át mindkét utódsejtbe [15]. Sejttenyészeten genotoxikus körülményeket alkalmazva (gazdasejtet ért stresszt imitálva), mint az ultraibolya besugárzás, az ionizáló sugárzás és a cikloheximid alkalmazása megfigyelhető bizonyos korlátozott AAV replikáció helper vírus hiányában is [15, 17].

2.5. Adenovírusok jellemzői

Az adenovírusok, nem burkos, 60-90 nm átmérőjű ikozaéder szimmetriájú kapsziddal rendelkeznek. A virion 252 kapszomerből áll, melyet 240 hexon 12 penton alkot és mindegyik pentonból egy vagy két 9-77,5 nm hosszúságú fiber áll ki, mely a sejthez való kötődésért felel. 26-48 kb hosszúságú dsDNS genommal rendelkező vírusok. A legtöbb adenovírus stenoxen, azonban a *Mastadenovirus canidae* fajon belül a kutya 1-es adenovírusa, a Rubarth-kór okozója rókákban (róka encephalitis), medvékben, farkasokban és prérifarkasokban is képes betegséget okozni. Számos adenovírus különböző súlyosságú akut légúti vagy gyomor-bélrendszeri betegséget okoz [18]. Családon belül 6 nemzetséget különböztetünk meg, melyek az *Aviadeno-*,

Barthadeno-, *Ichtadeno-*, *Mastadeno-*, *Siadeno-*, *Testadenovirus* genus. Szakdolgozati témámhoz szorosan kapcsolódva *Aviadenovirus* genuson belül az *Aviadenovirus gallinae*, *Aviadenovirus hepatitidis*, *Aviadenovirus hydropericardii*, *Aviadenovirus quintum* és *Aviadenovirus ventriculi* kerül említésre [14]. Széles körben előforduló, tünetmentes állatokból is gyakorta kimutatható vírusok. Főleg hajlamosító hatás érvényesülése esetén, ritkán önállóan képesek klinikai formában manifesztálódó megbetegedést okozni. Stenoxen vírusok, leggyakrabban házityúkban fordulnak elő, de sok egyéb más madárfajnak is megvan a saját adenovírusa. Széleskörű elterjedtségük miatt 4 hetes kor alatt a szikimmunitás védelmet nyújt a fertőződés ellen. Leggyakrabban 4-12 hetes csirkéből izolálhatók. Horizontális és germinatív úton is fertőznek, bélsárral hetekig ürülnek. Kórtani hatásuk jelentős mértékben függ az életkortól és a társfertőzésektől (leggyakrabban CAV, IBV), amennyiben megbetegedést idéznek elő megfigyelhetünk légzőszervi tüneteket, zúzógyomor-gyulladást, pancreatitist, hydropericardium szindrómát és sejtzárványos hepatitist is [11].

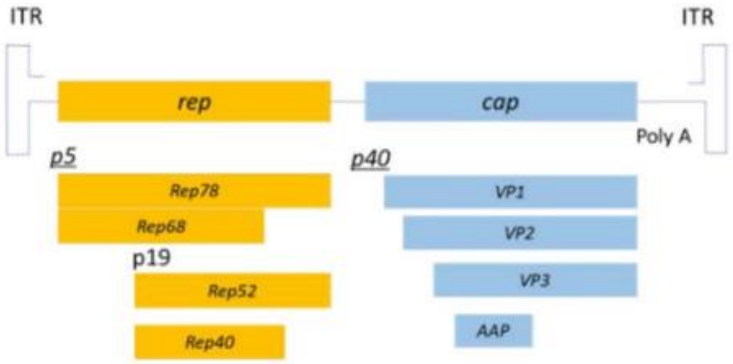
2.6. Adeno-asszociált vírusok vírus-sejt kapcsolata

Az AAV vírusok kapszidját alkotó 3-féle fehérje, a VP1, VP2, VP3 eltérő mértékben foszforilált. A legtöbb parvovírusra jellemző, hogy VP1 fehérjéhez kötődik kalcium függő foszfolipáz A2 (PLA2) enzimaktivitás, mely a hatékony vírusfertőzéshez szükséges. A penetrációhoz jellemzően a heparán-szulfát proteoglikán celluláris receptort használják [19]. A megfelelő sejtfelszíni receptorhoz való kötődés után klatrin mediálta endocitózis révén endoszómába kerülnek, ahol a felvételt követően több órán át detektálhatóak. A citoszolba jutás folyamata még nem tisztázott teljesen, de a VP1 fehérje PLA2 aktivitása képes fokozni a kapszidok felszabadulását a citoplazmába [20]. Vizsgálatok azt mutatják, hogy az AAV-ok sejtmaghoz jutásához ép mikrotubulus és mikrofilamentum architektúra szükséges [21]. A sejtmagba valószínűleg a nukleáris póruskomplexumon keresztül jutnak be [15].

2.7. Adeno-asszociált vírusok genom szerkezete és replikációja

Genomjuk 3 gént tartalmaz; melyek a *rep* (replikáció), *cap* (kapszid), és *aap* (assembly) gének. A *rep* gén a vírus replikációjához, a *cap* a kapszid felépítéséhez és az *aap* a kapszomerek összeállításához szükséges elemeket kódolják. A genom mindkét végén 145 bp hosszúságú ITR (inverted terminal repeat) szekvencia található, mely így a genom 3’ és 5’ végén is nyitott leolvasási keretet (ORF) formál. ITR-en belül az első 125 nukleotid palindrom szekvenciát alkot, a maradék 20 bp hosszúságú szakaszt D-szekvenciának nevezik, melyek CRE (cis-regulatory element) tartalmuk révén fontos szabályozó funkcióval bírnak, a szomszédos gének aktivitásának szabályozásával [15].

A bal oldali ORF tartalmazza a *rep* gént, mely négy, molekulatömeg alapján megkülönböztetett Rep proteint termel; ezek a Rep78, Rep68, Rep52, és Rep40. A *rep* gén által termelt fehérjék a replikációban, illetve látencia létrehozásában töltenek be fontos szerepet. A Rep68, 78 protein



3. ábra: Az adeno-asszociált vírusok genom struktúrája a *rep* és *cap* génekkel, ITR-ekkel a genom két végén, továbbá még az egyes promóterek által képzett leolvasási keretekből szintetizálható fehérjék. https://doi.org/10.1186/s43141-023-00518-5

a transzkripció során a p5-ös promótert használva jöhet létre, a Rep52 és Rep40 a p19-es promóter használatával íródnak át RNS-re. A jobb ORF a *cap* gént tartalmazza, mely a p40-es promóter segítségével a transzkripció során a 3 kapszid proteint hozza létre. Ezek a VP1, VP2, és a VP3. Összesen 60 másolatban 1:1:10 (VP1:VP2:VP3) részarányban építik fel az ikozaéder szimmetriájú kapszidot. Az *aap* gén kódolja az assembly activating proteint, ez egy alternatív leolvasási keretben található a *cap* gén által fedve, mely a virion összeépülését segíti elő [22].

Az AAV-ok nem kódolnak virális polimerázt, sem pedig ssDNS kötő fehérjét, a szükséges faktorokat a helper vírus és a gazdasejt biztosítja számukra. A replikáció egyszálas lánceltolódással kezdődik, a 3’ végen lévő ITR hajtűszerűen visszakanyarodik egy rövid dsDNS-t kialakítva, mely primerként szolgál a replikáció megindulásához. Ezt követi az elongáció, majd a komplementer szál a 3’ végen összeköttetésben marad a templát szállal. A kapcsolatot a Rep68, vagy Rep78 protein kötődése oldja, melyek az RBS (rep binding site) és TRS (terminal resolution site) szekvenciákhoz kötődnek. A transzkripció a citoplazmában zajlik, majd a kapszidfehérjék visszajutnak a sejtmagba, ahol az assembly activating protein irányítása alatt kialakítják az AAV-ra jellemző kapszid-szerkezetet [15]. Bár a leginkább az adenovírusokról köztudott, hogy képesek segíteni replikációjukban, valójában több vírusról bebizonyították, hogy a replikáció befejezéséhez szükséges faktorokat tudnak szolgáltatni az AAV-ok részére. A *Herpesviridae* család több vírusa képes a replikáció segítésére, úgy, mint a humán cytomegalovírus, humán herpeszvírus 2 és 6, varicella-zoster vírus, papillomavírusok közül a HPV-16, bár ez nem képes teljes helper funkció betöltésére önállóan, illetve a legújabban ide sorolható vírus a humán bocavirus-1, mely egy autonóm parvovírus [23]. A helper vírusok szerepét tekintve megállapították, hogy az adenovírusok esetében nem az adenovírus eredetű DNS polimerázt használják a replikáció során, hanem a celluláris polimeráz D-t, viszont az adenovírus eredetű ssDNS kötő fehérje fokozza az AAV-ok replikációját. Herpeszvírusok esetében igénybe veszik azok saját DNS polimerázát, helikáz-primáz komplexumát és ssDNS kötő fehérjéjét. A gazdasejt eredetű HMG1 és FK506 proteinek esetében bizonyították, hogy a Rep protein kötődésének befolyásolásával, vagy az ITR szabályozó régiójához való kötődéssel képesek befolyásolni az AAV-ok replikációját, erősíthetik, vagy éppen gátolhatják azt [15].

2.8. Látencia kialakítása

Természetes humán AAV-2 fertőzés esetén megfigyelték, hogy az AAV örökítőanyaga javarészt episzomális DNS formájában marad fenn és csak ritkán integrálódik a gazdasejt genomjába. Az AAV transzkripciója az intracelluláris környezettől függ. Fiziológiás körülmények között a sejtben gátlódik a transzkripciós és replikációs képesség, azonban ekkor egy limitált Rep expresszió lehetővé teszi a látencia kialakítását [24]. A látens fertőzés lehetővé teszi a genom fennmaradását mindaddig, amíg a feltételek kedvezőek lesznek a produktív vírusszaporodáshoz. Az RBS és a TRS nem csak a replikációban játszik fontos szerepet, hanem a Rep által közvetített kromoszomális integrációban is. Ez a humán esetben pontosan meghatározott, a 19-es kromoszóma (19q13.42) régiójába történik, melyet AAVS1-nek (adeno-associated integration site-1) neveznek [25]. Az AAV genom hosszú ideig fennmaradhat extrakromoszomális elemként is, és így Rep expresszió hiányában is képes kifejeződni. Ez azonban a gazdasejt osztódásakor nem kerül át mindkét utódsejtbe [15].

2.9. Az adeno-asszociált vírusok patogenitása

Az AAV-ok széles körben elterjedtek, a humán populációt tesztelve széleskörű szeropozitivitást figyeltek meg [26]. Jelenleg semmilyen ismert megbetegedés nem köthető hozzájuk. Állatokból is széles körben kimutathatók, patogenitásban betöltött szerepük nem igazolt.

2022 áprilisában Skóciából jelentették a fiatal gyermekeket érintő ismeretlen etiológiájú akut hepatitis megjelenését. A megbetegedettek körében egy esetben sem tudtak kimutatni ismert akut humán hepatitist okozó vírust (hepatitis A-E). Év végéig emelkedett az esetszám és több esetben májtranszplantációra volt szükség [27]. Később metagenomikai vizsgálatokkal májszövetből herpeszvírust, humán adenovírust és AAV-2-t is sikerült azonosítani [28, 29]. Jelenleg aktív kutatások irányulnak a pontos etiológiai háttér feltérképezésére. Korábban rAAV-t tartalmazó génterápiás kezelések esetén már ismert mellékhatás volt a fulmináns hepatitis, amely megelőzésére előzetesen alkalmazott szteroidos kezelés szolgál. Úgy feltételezik, hogy az AAV2 fertőzés által kiváltott CD4+ T-helper sejt közvetítette immunpatológiai válasz állhat fenn, ami összhangban van az érintett gyermekekben az MHC II. osztályú HLA-DRB104:01 allél jelentősen megnövekedett gyakoriságával [30]. Feltételezhetően AAV-2, valamely ismert helper vírusa, például az esetek jó részében kimutatott HHV-6/7, illetve HAdV közti interakció, illetve immunpatológiás válaszreakció bonyolult kapcsolata állthat az esetek mögött.

3. Metagenomika

3.1. Metagenomika definíciója, változatai

A metagenomika kifejezés egy adott mintában található összes nukleinsav elemzését jelenti, lehetővé téve a mikroorganizmus-közösségek teljes feltárását anélkül, hogy szükség lenne az egyes fajok izolálására, tenyésztésére. Ezenkívül nem igényel előzetes információkat a vizsgálandó genomokról. Ez az új tudományág a biológia egyik leggyorsabban fejlődő területévé vált, amely bővíti a mikrobiális világ sokféleségéről, ökológiájáról, evolúciójáról és működéséről alkotott ismereteinket, valamint hozzájárul az új alkalmazások megjelenéséhez számos különböző területen [31].

Metagenomikai elemzés két legjellemzőbb módszere az amplikon és a shotgun (teljes genom) szekvenálás. Előbbi esetén csak bizonyos szekvenciákat szaporítanak fel egy előzetes amplifikáció során. Fő markergének közé tartoznak a prokarióták esetében a 16S riboszomális DNS, eukarióták esetében a 18S riboszomális DNS, mivel ezek a taxonómiailag leginformatívabb lókuszok. A kiválasztott markergén sokszorosítása előzetes PCR-rel történik, majd az ezt követő szekvenálás révén hatékony és gyors lehetőséget kínál komplex filogenetikai vizsgálatok végzésére [32].

Shotgun szekvenálással lényegesen több információ nyerhető ki a vizsgálni kívánt mintákból, ezzel együtt ennek adat-, memória igénye is nagyobb és költségesebb folyamatról van szó. A mintában jelen lévő genomokat apró darabokra tördelik, majd az egészet szekvenálásnak vetik alá. Ennek eredménye egy olyan rövid leolvasás (read) halmaz lesz mely mindenféle, a mintában jelenlévő nukleinsavból származó szekvenciákat tartalmaz ömlesztve. A minta típusától függően egyaránt megtalálható benne növényi, mikrobiális, gazdatest eredetű szekvencia is [32]. A shotgun metagenomika egy népszerű és széles körben használt megközelítés a vírusközösségek leírására, anélkül, hogy előzetes vírus izolálásra lenne szükség [33].

3.2. Virális metagenomika lépései

A virális metagenomika négy alapvető lépésre bontható; melyek a vírus dúsítás, a virális nukleinsavak amplifikációja, a szekvenálás és a kapott adatok bioinformatikai elemzése [33].

1. Vírus dúsítás az eukarióta és prokarióta nukleinsavak minimalizálása érdekében történik, ezáltal növelhető a virális nukleinsavak relatív aránya. A minta homogenizálása és szűrése 0,22-0,45 mikrométer pórusú membránon át történik, majd víruskoncentrálás követi. A

víruspartikulákat izolálópuffer segítségével feloldják, majd a nukleinsavakat folyadék-folyadék, vagy folyadék-szilárd extrakció révén kinyerik [33].

2. A kivont nukleinsavak mennyisége a legtöbbször túl alacsony a szekvenáláshoz, így ezek sokszorosítása megkerülhetetlen lépés. Erre a célra több módszer is rendelkezésre áll, ilyen a random PCR és a SISPA is. A random PCR során véletlenszerű szekvenciákat alkalmaznak, melyek a DNS bármely szakaszára kötődhetnek, míg a SISPA restrikciós endonukleázos emésztést követően univerzális adaptert ligál a cél DNS végéhez, majd az ezt követő PCR-rel amplifikálásra kerülnek a virális nukleinsavak [34]. Utóbbit eredetileg azért fejlesztették ki, hogy humán genomikai vizsgálatokhoz az alacsony kópiaszámú nukleinsavakat amplifikálják vele [35].

3. DNS szekvenálás alatt azt a folyamatot értjük, amikor egy adott DNS molekula nukleotid sorrendje kerül meghatározásra [36]. Az első kereskedelmi forgalomban kapható új generációs szekvenálási rendszerek a 2000-es évek elején jelentek meg. Azokat a módszerek soroljuk ide, amelyek képesek egyszerre több mintát párhuzamosan szekvenálni. Elsősorban metagenomika, genomok és transzkriptomok elemzése során alkalmazzák őket [33]. Hátrányuk, hogy használatukhoz nagy számítógép-kapacitás szükséges, több hibát ejtenek és viszonylag rövid leolvasásokat (néhány száz bázis) képeznek, ellenben akár több milliárd DNS darabot is képesek egyszerre szekvenálni [36].

4. Bioinformatikai elemzés. Az NGS-módszerek által szolgáltatott nyers adatok jelentős számítógépes munkát igényelnek ahhoz, hogy rövid leolvasásokból genom szintű szekvenciákat alkossanak. A szükséges programok többsége gráfmodellekre épül, mint az átfedési (OLC) és a de Bruijn gráfok [37].

A nukleotidszekvencia-elemzés többlépéses folyamat. Első a szekvenálási futás lehívása, majd pedig a minőség-ellenőrzés következik. A leolvasott szekvenciák (readek) FASTQ fájlban vagy a szekvenáló eszköz és az ahhoz tartozó fedélzeti szoftverek által használt nyers adatformátumokban tárolódnak. A második lépés a readek minőség-ellenőrzése, szekvencia hibák keresése, mint például a duplikált leolvasások, előzetes PCR indukálta leolvasási hibák, illetve az adott szekvenáló berendezésre jellemző hibaprofil azonosítása és javítása, majd a trimmelés (adapterek, primerek eltávolítása) és a kontigok illesztése és összeállítása (assembly) referencia genom alapján, vagy *de novo*. A *de novo* assembly során nem áll rendelkezésre referencia szekvencia az illesztéshez. Harmadik lépés a genom azonosítása és annotálása, vagyis biológiai funkcióinak és taxonómiai jelentőségének azonosítása. Az utóbbi években számos új program jelent meg a bioinformatikai elemzések megkönnyítésére, melyek lehetővé

teszik a vírusgenomok hatékonyabb észlelését, összeépítését és taxonómiai klasszifikációját [33].

4. Az adeno-asszociált vírusok biotechnológiai alkalmazása

A humán génterápia jelenlegi definíciója az FDA (Cellular & Gene Therapy Guidances, 2018. július 20.) és az EU Bizottság (2001/83/EK irányelv, I. melléklet IV. rész) szerint összefoglalható úgy, mint egy biológiai gyógyszerkészítmény, amely rekombináns nukleinsavat tartalmaz, és amelyet emberben használnak vagy embernek adnak be genetikai szekvencia szabályozása, javítása, cseréje, hozzáadása vagy törlése céljából betegségek kezelése vagy gyógyítása érdekében [38].

Az utóbbi évtizedre a génterápia az egyik legaktívabban kutatott területté vált, és mára több génterápiás szer került engedélyezésre. A génterápia megvalósításában az egyik legkritikusabb lépés a megfelelő vektor kiválasztása. A vektorok lehetnek vírusvektorok, ez a leggyakoribb, illetve alkalmazhatnak nem vírus vektorokat, ezek fő előnye a biológiai biztonság, de szállítási hatékonyságuk elmarad a vírusokétól [39]. Vírusvektorok alkalmazása esetén a fő nehézséget azok immunogenitása és citotoxicitása jelenti. További veszélyt jelenthet a transzgén ektópiás kromoszomális integrációja, mely aktiválhat tumor onkogéneket, vagy pedig a szupresszorgének expressziójának megváltoztatása révén képes daganatos megbetegedést indukálni. Vadvírusokból rekombináns vírusvektor előállítása során eltávolítják a betegséget okozó géneket és helyettesítik a megfelelő terápiás génekkel és az azok expresszióját szabályozó szekvenciákkal, miközben a sejtbe jutáshoz szükséges kapszidot megtartják. Vektorként használt vírusok a DNS vírusok közül a herpeszvírusok, adenovírusok és adeno-asszociált vírusok, RNS vírusok közül pedig a retrovírusok [40].

A rekombináns AAV vektorok különösen a központi idegrendszeri betegségek kezelési stratégiáiban bizonyultak igazán hasznosnak. Sokoldalú vektorok, mind az osztódásban lévő, mind a nem osztódó sejtekben kifejeződnek [38]. Jelenleg 14 AAV szerotípust különböztetnek meg, ezek az AAV1-9, AAV6.2, AAVrh8, AAVrh10, AAVrh39 és AAVrh43. Ezek jórészt humán eredetűek, illetve humán szövetek transzdukciójára alkalmas főemlős vírusok, melyeket a kapszidszerkezet, a kiváltott immunreakció és szöveti tropizmus alapján soroltak különböző szerotípusokba [41]. Túlnyomórészt szimplaszálú vagy duplaszálú episzomális DNS formájában maradnak fenn. Bár egy részük integrálódhat a gazdasejt genomjába, a kromoszomális integráció rendkívül ritka és rekombináns AAV vektorok esetében nem fordul elő. Genomiális felépítés alapján az egyes szerotípusokat A vagy B csoportba sorolják [42]. Az

AAV-alapú vektorok hosszú távú transzgén kifejezést biztosítanak. Jelenleg a legkevésbé immunogén vektoroknak tartják és kevesebb vektorral összefüggő toxicitással rendelkezőnek tekintik, ami miatt sok központi idegrendszeri betegség esetében előnyben részesítik őket [38]. Jelenleg hét AAV vektor alapú génterápiás biológiai készítmény kapott forgalomba hozatali engedélyt. A Glybera, mely egy AAV1 vektor, amelyet az Európai Gyógyszerügynökség (EMA) hagyott jóvá a lipoprotein lipáz hiány kezelésére. A Luxturna, egy AAV2 vektor, amelyet a Food and Drug Administration (FDA) és az EMA is engedélyezett Leber-féle veleszületett amaurosis kezelésére. A Zolgensma AAV9 vektor, amit az FDA és az EMA is jóváhagyott a gerincvelői izomsorvadás 1-es típusának kezelésére. Az Upstaza egy AAV2 vektor, amelyet az EMA hagyott jóvá az aromás L-amino-sav dekarboxiláz hiány kezelésére. A Roctavian AAV5 vektor, amit az EMA hagyott jóvá hemofília A kezelésére. A Hemgenix egy AAV5 vektor, amit az FDA hagyott jóvá hemofília B kezelésére és az Elevidys: egy AAVrh74 vektor (rhesus majomból izolált), amelyet az FDA hagyott jóvá Duchenne-féle izomsorvadás kezelésére [43].

Az AAV-ok klinikai alkalmazását nehezítő tényező a már jelenlévő neutralizáló ellenanyagok jelenléte, mely széles körben előfordul a humán populáció körében. A preformált ellenanyagok a vektorok kapszidját célozzák, így a kezelés hatékonyságának csökkenéséhez, vagy akár a vektorok inaktiválódásához vezethet. Ennek kiküszöbölésére az egyik lehetséges stratégia olyan AAV-ok alkalmazása, melyek természetes körülmények között nem keringenek főemlősök körében, vagy nem reaktívak humán szérummal. Erre a célra egy ígéretes jelölt az avian adeno-asszociált vírus (AAAV), mivel jelentős szekvenciális eltérések figyelhetők meg az AAAV kapszid és a főemlős alapú AAV-ok között és várhatóan nem, vagy alacsony mértékben reagálnak humán szérummal [44].

5. Célkitűzések

Munkánk során az alábbi célokat tűztük ki:

- A rendelkezésünkre álló Gallus gallus domesticus eredetű mintákból adeno-asszociált vírusok előfordulásának vizsgálata és azonosítása.

- Ugyanezen mintákban az adeno-asszociált vírusokkal egyidejűleg előforduló adenovírusok áttekintő vizsgálata.

- Az azonosított vírustörzsek teljes genomszekvenciájának meghatározása, a genomok szerkezeti elemzése.

- Az újonnan azonosított törzsek evolúciós kapcsolatainak feltérképezése, filogenetikai modellezése, rekombinációs mechanizmusaik vizsgálata.

6. Módszer

A felhasznált mintákat a CEVA-Phylaxia Oltóanyagtermelő Zrt. bocsátotta rendelkezésünkre szövettenyészet formájában. A minták a világ minden tájáról származnak és javarészt telepi survillance program keretein belül gyűjtötték őket.

6.1. Virális nukleinsav kivonás

A mintákat először egy laboratóriumi centrifuga segítségével ülepítettük le, 8000 $x\ g$ fordulatszámon 5 percig. Ezt követően a felülúszót egy 0,45 µm-es fecskendőszűrővel megtisztítottuk a baktériumoktól és más sejtes törmelékektől, hogy a víruspartikulumokat feldúsítsuk. A megmaradt szennyező nukleinsavakat egy DNáz-t és RNáz-t tartalmazó keverékkel távolítottuk el. A szöveti felülúszóból a nukleinsavat ZiXpress-32 Automata Nukleinsav Tisztító Műszer (Automated Nucleic Acid Purification Instrument) és Zixpress-32 Vírus Nukleinsav Kivonó Készlet (Viral Nucleic Acid Extraction Kit, Zinexts Life Science Corp., New Taipei City, Tajvan) segítségével izoláltuk a gyártói protokollnak megfelelően, majd a kapott nukleinsavat az extrakciós kit által biztosított 100 µl pufferben eluáltuk.

6.2. Illumina teljes genom szekvenálás

A teljes genom szekvenálása az Illumina NextSeq 500 újgenerációs, nagy áteresztőképességű szekvenáló berendezéssel történt. A DNS könyvtárak készítéséhez az Illumina® Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina, San Dieago, USA) készletet vettük igénybe. A DNS fragmentek egyedi jelölése a Nextera XT Index Kit v2 Set A (Illumina, San Dieago, USA) indexek használatával történt.

A munkafolyamat első lépéseként a mintában található nukleinsavat amplifikáltuk, majd a cDNS mintákat 2,5 µl végtérfogatban 0,2 ng/µl koncentrációra hígítottuk. Ezt követte a tagmentáló reakció, amely a könyvtárkészítés kezdeti lépéseként a még nem fragmentált DNS-t megfelelő méretűre hasítja és jelöli. Ehhez 5 µl Tagment DNA pufferrel, valamint 2,5 µl AmpliconTagment Mix reagenssel kevertük össze a mintánkat és 55°C-on 6 percig inkubáltuk GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Waltham, USA) készülékben majd pedig 10°C-ra hűtöttük. A továbbiakban hozzáadásra került 2,5 µl Neutralize Tagment puffer és további 5 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Következő lépésként a DNS könyvtár készítéséhez szükséges reagensek kerültek hozzáadásra, ehhez 7,5 µl Nextera PCR Master

mixet összekevertünk 2,5-2,5 µl i5 és i7 index primerrel, és hozzáadtuk a tagmentált DNS mintához. Ezt egy PCR-es amplifikáló lépés követte, ami 95°C 30 mp kezdeti denaturációt követően 12 ciklusból állt. A végső 72°C-os 5 percig tartó elongációs lépést követően a mintát 10 °C-ra hűtöttük. Ezáltal megkaptuk a szekvenáláshoz szükséges indexált DNS könyvtárat és ezt a Gel/PCR DNA Fragments Extraction kittel (Geneaid Biotech, Hszinpej, Tajvan) tisztítottuk, majd alávetettük egy fluorometriás mennyiségi meghatározásnak a Qubit® dsDNA HS Assay kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) felhasználásával. Az indexált DNS könyvtárat a gyártói ajánlásnak megfelelő koncentrációra hígítottuk és poolozás után denaturáltuk, majd 1,5 pM végső koncentrációban NextSeq 500/550 Mid Output flowcell-re (Illumina, San Dieago, USA) töltöttük és a szekvenálást elvégeztük.

6.3. Szekvenálási adatok elemzése és annotálása

Az Illumina NextSeq 500 futása után nyert leolvasások minőség-ellenőrzésen estek át. A túl rövid szekvencia-readek, primerek és adapterek levágásra kerültek és a FASTQ formátumú szöveges dokumentum alapján értékelt leolvasási minősítésnek megfelelően az alacsony minőségű leolvasásokat a Trimmomatic programmal szűrtük. Gyors taxonómiai klasszifikáció érdekében Taxonomer webszoftvert és a Kaiju programot használtuk, amely alapján kigyűjtöttük azokat a mintákat, melyek tartalmaztak *Aviadenovirus* genusba és *Dependoparvovirus* genusba sorolt szekvenciákat.

A továbbiakban a Geneious Prime szoftverrel dolgoztunk. Első körben, *de novo* assemblyt végeztünk Tadpole assembler segítségével. A program gyors futási teljesítménnyel képes contigokat létrehozni readekből de Bruijn gráf alapján működő algoritmusával, ezáltal lehetőséget biztosít a későbbi referenciagenom gyors keresésére. Referenciagenom keresése a Genbank adatbázisában történt BLASTn algoritmus (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) használatával. Az így talált referenciagenomok segítségével referencia alapú assemblyt végeztünk a Geneious Prime beépített mappere segítségével. Ezáltal a vírustörzsek teljes genomját sikerült meghatározni. Ezt követően a kapott konszenzus szekvenciákat manuálisan javítottuk és annotáltuk.

6.4. Evolúciós és filogenetikai elemzések

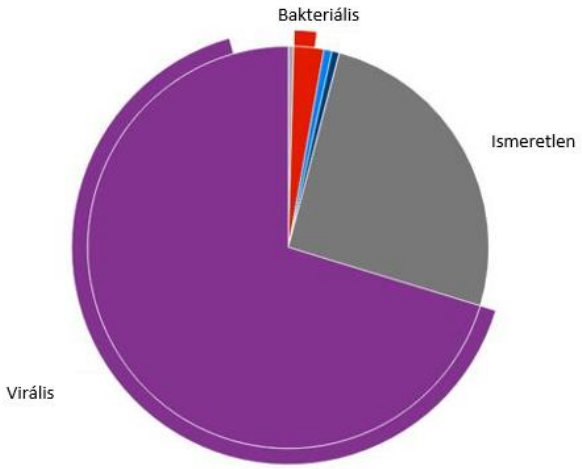
A többszörös szekvencia illesztéseket a Geneious Prime szofverrel végeztük MAFFT algoritmus használatával. Első körben a *Dependoparvovirus* genus fajaival készítettünk teljes genom alapú filogenetikai elemzést a MEGAX szoftvercsomag segítségével, melynek során a nukleotid szubsztitúciós folyamatok modellezése a GTR + G + I komplex modell segítségével készült. A fa rekonstrukcióját Maximum Likelihood valószínűségi keretrendszer segítségével végezte a MEGAX szoftvercsomag, a csomópontok megbízhatóságának becslésére pedig 1000-es bootstrap értéket alkalmaztunk. Saját törzseink leszármazási vizsgálataihoz készített filogenetikai elemzést szintén a MEGAX szoftvercsomag végezte Maximum Likelihood valószínűségi keretrendszer segítségével, de GTR+G modellel és szintén 1000-es bootrstrap beállítással. A VP1 fehérje aminosav szekvenciáján alapuló evolúciós fához szintén MAFFT algoritmussal készült a VP1 gén alapú nukleotid illesztés, mely a TranslatorX szoftverrel került aminosav fordításra. A PHYLM szoftver Maximum Likelihood valószínűségi keretrendszer segítségével végezte a fa rekonstrukciót. A *Dependoparvovirus* genusra készített filogenetikai fa esetében az aminosav szubsztitúciós folyamatok modellezésére Qpfam +R+F valószínűségi eljárást, a saját törzsek leszármazási vizsgálatához pedig MtArt +R+F modellt alkalmaztunk. A csomópontok megbízhatóságának becslésére ebben az esetben is 1000-es bootstrap értéket állítottunk be.

Rekombinációs eseményeket az RDP5 szoftver RDP, Bootscan, Geneconv, Chimaera, MaxChi, SiScan és 3Seq algoritmusainak segítségével azonosítottuk a legmagasabb elfogadott P-érték=0,05 beállítással. Kizárólag azokat a rekombinációs eseményeket vizsgáltuk tovább, ahol legalább 3 algoritmus jelezte a rekombinációs eseményt.

7. Eredmények

7.1. AAAV törzsek azonosítása

Az összesen 209 db minta javarészt brojlerállományból került beküldésre, melyekből előzetesen PCR-rel különböző *Aviadenovirus* genushoz tartozó adenovírust mutattak ki. A teljes genom szekvenálása során 2,377x10^9 read került generálásra. A FASTQ fájlok minőség-ellenőrzése után gyors taxonómiai klasszifikációt végeztünk a mintában található mikroorganizmusok azonosítására és rendszerezésére. Bár ezek korlátozott mélységű taxonómiai azonosítási lehetőséget nyújtanak, gyorsan elvégezhetők és átfogó képet adnak a mintában található számunkra érdekes vagy releváns szekvenciák további elemzéséhez.



4. ábra: A D1845/4/12/BG megnevezésű minta előzetes eredménye a Taxonomer program futása után. Látható, hogy a vizsgált readek nagyságrendileg milyen mennyiségben kerültek klasszifikálásra az egyes taxonómiai egységekhez.

Munkánk során vírus metagenom elemzést végeztünk és az előkészületi lépésekkel növeltük a vírus DNS relatív mennyiségét. Ez magyarázza, hogy a taxonómiailag vírushoz sorolt readek relatív aránya ilyen magas a baktérium eredetű readekhez képest. Ezenfelül mi kizárólag DNS vírusok meghatározását végeztük, mivel nem történt reverz tanszkriptázos kezelés. Így a Taxonomer program által vírusra klasszifikált readek nem tartalmaznak RNS vírust.

5. ábra: Szintén a D1845/4/12/BG nevű minta Taxonomer futási eredménye látható, mely már kizárólag a vírusok közé, a megfelelő genusokba sorolt readek relatív mennyiségét vizualizálja.

Látható, hogy a D1845/4/12/BG mintában adenovírust és adeno-asszociált vírust azonosított az általunk használt Taxonomer szoftver és a mintában az avian adeno-asszociált vírushoz tartozó readek domináltak. Ezáltal könnyen lehetővé vált számunkra, hogy a 209 db mintából kiválogassuk azokat, amelyekben feltételezhetően megtalálhatók avian adeno-asszociált vírusokhoz tartozó readek, és ezekkel folytassuk a genomok felépítéséhez szükséges további lépéseket.

30 minta esetén jelzett a Taxonomer szoftver feltételezhetően *Dependoparvovirus* genusba tartozó vírushoz sorolható readeket, a 30 mintára összesen 330 066 898 read került leolvasásra teljes genom szekvenálás során. A későbbiekben kizárólag ezekkel dolgoztunk tovább.

Azonosító	Állatfaj	Kor(nap)	Szárm.
D1648/2/11/HU	-	-	Magyarország
D1845/4/12/BG	brojler	25	Bulgária
D1959/2/3/12/AR	-	42	Argentína
D2008/1/12/MY	brojler	36	Malajzia
D2033/50/12/PH	-	-	Fülöp-szigetek
D2148/6/13/PE	brojler	28	Peru
D2148/12/13/PE	brojler	28	Peru
D2334/8/2/13/IC	brojler	42	Elefántcsontpart
D2342/2/5/13/US	-	-	USA
D2342/2/6/13/US	-	-	USA
D2342/2/7/13/US	-	-	USA
D2342/2/8/13/US	-	-	USA
D2345/11/2/13/NG	brojler	32	Nigéria
D2358/7,8,9/2/13/PE	brojler	-	Peru
D2467/4/13/PE	brojler	36	Peru
D2467/6/13/PE	brojler	35	Peru
D2467/10/13/PE	brojler	39	Peru
D2486/3/13/US	brojler	-	USA
D2516/2/2/13/FR	brojler	26	Franciaország
D2563/4/14/GR	brojler	-	Görögország
D2605/14/RO	brojler	35	Románia
D2628/1/7/14/MA	brojler	36	Marokkó
D2861/2/1/14/RU	brojler	17	Oroszország
D3150/9/15/US	brojler	-	USA
D3150/10/15/US	brojler	-	USA
D4316/8/18/SE	brojler	-	Svédország
D4316/14/18/SE	brojler	-	Svédország
D2415/3/13/GR	brojler	45	Görögország
D4811/1/19/ US	-	-	USA
D2058/44/10/PE	-	-	Peru

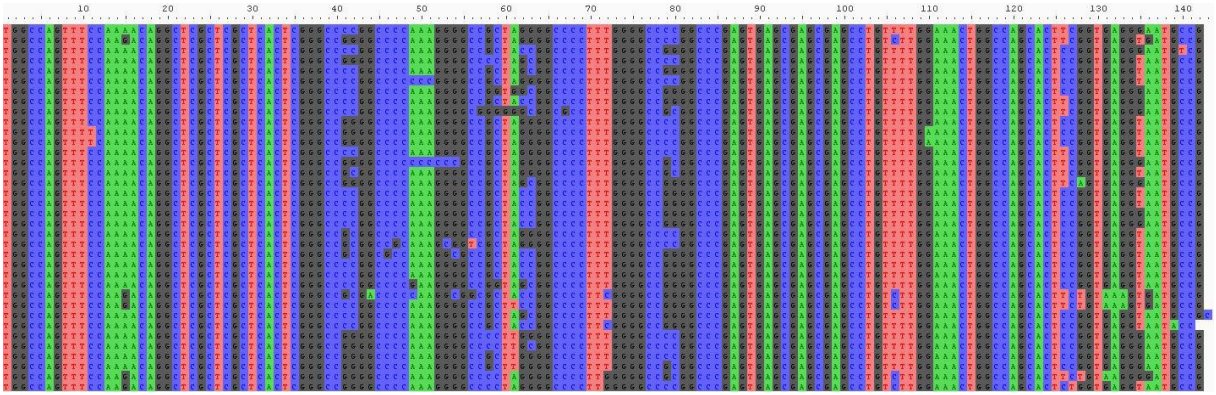
6. ábra: A 30 db feltételezetten AAAV genomot tartalmazó minta azonosítói, az állatfaj, amelyből a minták származnak, az életkor azokban az esetekben ahol rendelkezésünkre állt az információ, emellett leolvasható a származási ország is.

7.2. Teljes genom meghatározás

A továbbiakban a Geneious Prime szoftverrel végzett *de novo* assembly során generált contigokhoz BLASTn algoritmus segítségével történt referencia genomok keresése, mely 70-90% lefedettségi és 87-99% azonossági értékek között hozott találatot. A D2342/2/7/13/US azonosítójú minta esetében nem sikerült igazolni a Taxonomer által feltételezett adeno-asszociált vírus jelenlétét. A referenciagenom keresését egy referencia alapú assembly követte. A referenciagenomra illeszthető readek mennyisége átlagosan 345 238 volt (minimum 36 390, maximum 1 050 183). A teljes genomra számított átlagos lefedettség 11 981x volt. Ezt manuális javítás követte és a kész genomokat annotáltuk, ennek szemléltetésére szolgál a *7. ábra*.

7. ábra: A 4 különböző referenciagenom alapján létrehozott assembly szemléltetése látható. A contigokból mély lefedettséggel sikerült felépíteni a konszenzus szekvenciákat. A lefedettség a terminális szakaszokon, ahol az ITR szekvenciák találhatók jelentősen csökken.

Az ITR szekvenciák gyenge lefedettsége miatt hiányos vagy nagyon hibás terminális konszenzus szakaszok születtek. Mivel ezek palindrom szekvenciák a genom elején található ITR forward irányból olvasva teljes egészében megegyezik a genom végén található ITR reverse irányú olvasásával. Ezen felül ezek konzervatív régiók is, aminek köszönhetően a változékonyság az egyes törzsek között alacsony. Ennek köszönhetően a 142 bp hosszúságú ITR szekvenciákat a megfelelő irányultságban egymás alá helyezve lehetőség nyílt a pontos javításukra, ahol a széli részek gyenge lefedettsége miatt bizonytalan volt a nukleotidok azonossága. Végül 29 db teljes genomot sikerült felépítenünk.



8. ábra: Itt látható az AliView programban megjelenített, javított ITR szekvenciák a genomok elejéről és végéről megfelelő irányultságban egymás alá rendezve.

A teljes genomok összeállítása után a kapott konszenzus szekvenciákat BLASTn algoritmussal futtattuk szekvencia homológia keresése céljából. Ennek segítségével találtunk egy új variánst, mely a D1648/2/11/HU azonosítókódot viseli. Ez a referenciagenomnak használt törzzsel mindössze 83%-os azonosságot mutatott teljes genom lefedettség mellett. A D4316/14/18/SE azonosítójú törzs esetén a referenciagenommal mutatott azonosság 89% volt teljes genom lefedettség mellett. A többi genom esetében ez az érték 93-97% között mozgott.

7.3. Teljes genom alapú rekombináció elemzés

Vírusok esetén a rekombináció az egyik legfontosabb genetikai folyamat, amely lehetővé teszi a gyors alkalmazkodást különböző környezeti tényezőkhöz, így jelentős hatást gyakorol a vírusok evolúciójára. Munkánk során az RDP5 szoftverrel végeztünk rekombináció elemzést az általunk azonosított törzsek és 4 db génbanki adatbázisból letöltött referenciának használt vírustörzs közötti genetikai variánsok azonosítására. Az RDP5 szoftver több különböző

Overview

Event number	Found in	Recomb.	Major parent	Minor parent	Detection methods R	G	B	M	C	S	T
1	1	D4316/14/18/SE	Unknown	D4811/1/19/US	+	+	+	+	+	+	+
3	1	D1648/2/11/HU	D1845/4/12/BG	Unknown	+	+	-	+	+	+	+
4	1	D1648/2/11/HU	D4316/8/18/SE	Unknown	+	+	-	+	-	+	+
5	1	D1648/2/11/HU	D2058/44/10/PE	D2467/6/13/PE	+	+	+	-	+	+	+
7	1	D2861/2/1/14/RU	Unknown	D3150/9/15/US	-	-	-	+	+	+	+
8	4	D2342/2/6/13/US	D2345/11/2/13/NG	Unknown	+	+	+	+	+	+	+
9	1	D2334/8/2/13/IC	D4316/8/18/SE	D2342/2/8/13/US	+	-	+	+	-	+	+
12	1	D2516/2/2/13/FR	Unknown	D2148/12/13/PE	+	+	+	+	+	+	+
13	1	D1845/4/12/BG	D2516/2/2/13/FR	D4811/1/19/US	+	+	+	+	+	+	+
15	1	D2467/6/13/PE	Unknown	D2148/6/13/PE	+	+	+	+	+	+	+
16	1	D1845/4/12/BG	D2342/2/8/13/US	Unknown	-	+	+	+	-	+	+
18	2	D1959/2/3/12/AR	D2467/6/13/PE	D2342/2/5/13/US	+	+	+	+	+	+	+
19	1	D4316/8/18/SE	D2058/44/10/PE	D2605/14/RO	+	+	+	+	+	+	+
20	1	AY186198 Avian adeno	KF937794 Avian adeno	Unknown	+	+	+	+	+	+	+
21	1	D2058/44/10/PE	D2358/7,8,9/2/13/PE	D3150/9/15/US	+	+	+	+	+	+	+
22	1	D2008/1/12/MY	Unknown	D2342/2/6/13/US	-	-	-	+	-	+	+
23	1	D4316/14/18/SE	D2628/1/7/14/MA	Unknown	+	+	+	+	+	+	+
24	1	D1845/4/12/BG	D2467/10/13/PE	Unknown	+	+	-	+	+	+	+
25	1	D2605/14/RO	D2415/3/13/GR	Unknown	+	+	+	+	+	+	+
26	1	D2148/6/13/PE	D3150/9/15/US	Unknown	-	-	-	+	+	+	+
27	1	D3150/9/15/US	D2415/3/13/GR	Unknown	+	+	+	+	+	+	+
29	1	D2467/10/13/PE	D2467/4/13/PE	Unknown	+	+	+	+	+	+	+
30	1	D3150/9/15/US	D3150/10/15/US	Unknown	-	-	-	+	-	+	+
31	1	D2415/3/13/GR	Unknown	D2342/2/6/13/US	-	-	-	+	-	+	+
33	1	D2628/1/7/14/MA	D2467/4/13/PE	Unknown	+	+	+	+	+	+	-
34	3	D2342/2/5/13/US	D2486/3/13/US	D4811/1/19/US	+	+	-	+	-	+	+
37	1	D2467/4/13/PE	D2358/7,8,9/2/13/PE	D3150/10/15/US	+	+	+	+	+	+	+
40	1	D2008/1/12/MY	D2148/12/13/PE	Unknown	+	+	+	+	+	+	-
42	1	D3150/10/15/US	Unknown	D2486/3/13/US	+	+	+	+	+	+	+
43	1	D1648/2/11/HU	D1959/2/3/12/AR	Unknown	+	+	+	+	+	+	-
44	1	D2008/1/12/MY	Unknown	D2415/3/13/GR	-	-	-	+	+	+	+
45	16	D2467/6/13/PE	Unknown	D4316/8/18/SE	+	+	+	+	+	+	+
50	1	D3150/10/15/US	Unknown	D2148/12/13/PE	+	+	+	+	+	+	+
52	1	D1959/2/3/12/AR	D2033/50/12/PH	D2334/8/2/13/IC	+	+	-	+	-	+	+
57	1	D4316/14/18/SE	Unknown	D2467/4/13/PE	+	+	+	-	-	+	+
62	1	D2467/4/13/PE	D2148/12/13/PE	D1959/2/3/12/AR	+	+	+	+	+	+	-
63	1	D2415/3/13/GR	Unknown	D2516/2/2/13/FR	+	+	-	+	+	-	-
65	1	D2334/8/2/13/IC	D2148/12/13/PE	D2628/1/7/14/MA	-	-	-	+	+	-	+
66	1	D2563/4/14/GR	D4316/8/18/SE	D2342/2/6/13/US	+	-	+	+	-	+	+
75	1	D2628/1/7/14/MA	D2342/2/6/13/US	D2148/12/13/PE	-	+	-	+	+	+	+

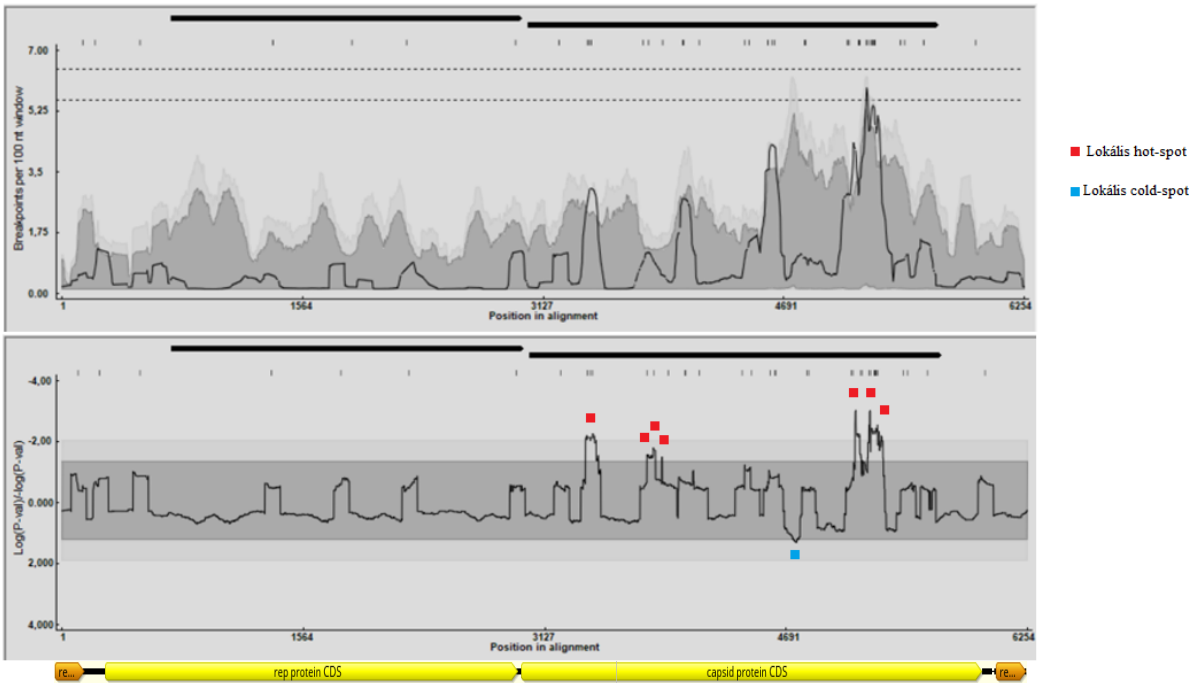
9. ábra: Áttekintő az RDP5 által azonosított rekombinációs eseményekről a vizsgált törzsek között.

algoritmust is integrál, ezáltal lehetővé válik a rekombinációs események pontosabb detektálása. A beépített algoritmusok között megtalálható az RDP, Bootscan, MaxChi, Chimaera, SiScan, 3Seq, és a GENECONV, amelyek különféle statisztikai és gráf-alapú módszereket használnak a rekombinációs események feltárására. Több algoritmus használata

növeli a detektált rekombináció pontosságát. Dolgozatomban azok a rekombinációs események kerültek elfogadásra, amelyeket legalább 3 beépített algoritmus is érzékelt.

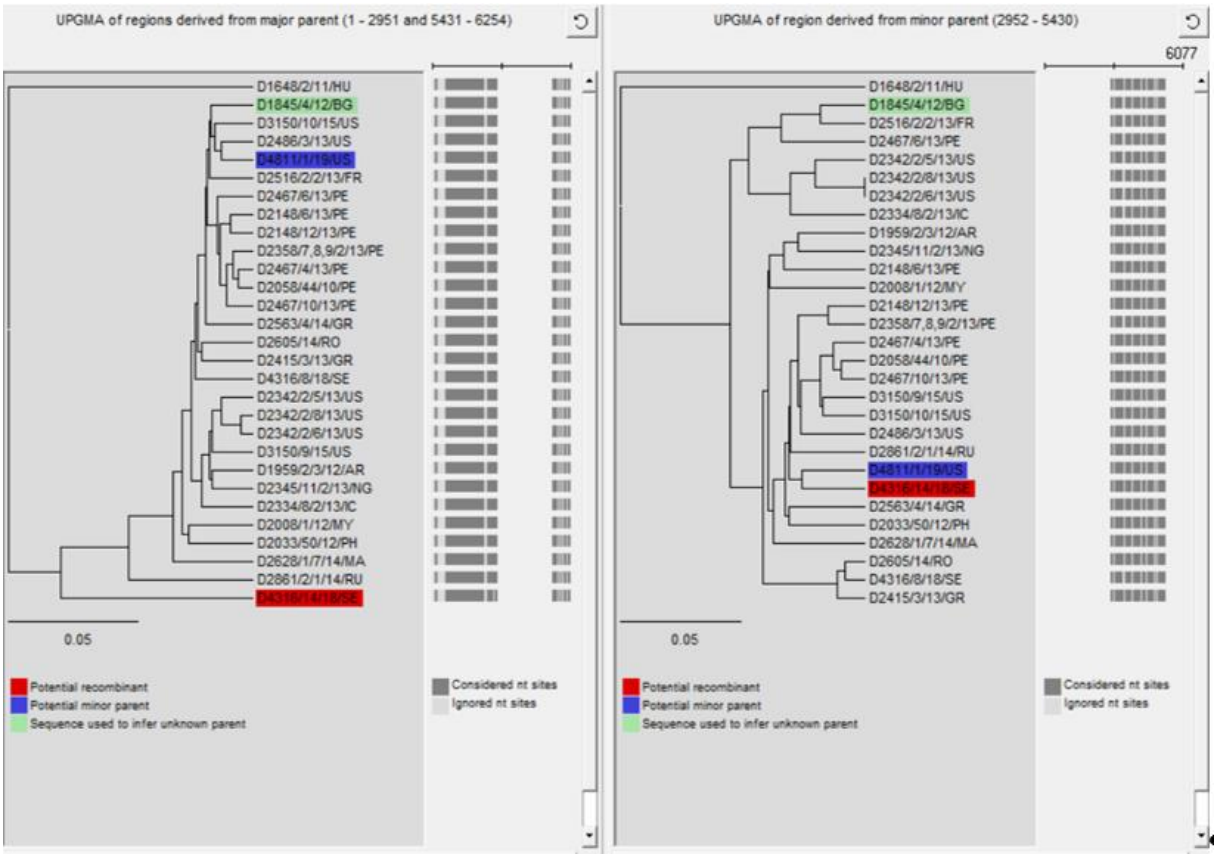
A *9. ábrán* az első oszlopban a törzsek azonosítói láthatók, a második oszlop *found in* értéke arra utal, hogy az adott rekombináció milyen gyakran fordult elő a teljes szekvenciahalmazban. A harmadik oszlopban találhatók a rekombináns törzsek. A negyedik és ötödik oszlop a minor és major parentet adó törzsek azonosítóit tartalmazza. Az ábra bal oldalán látható oszlop azt részletezi, hogy az egyes algoritmusok közül melyik érzékelte az adott rekombinációs eseményt. RDP5 szoftverrel összesen 40 rekombinációs eseményt azonosítottunk.

Szakirodalmi adatok alapján a rekombináció az AAV-ok körében általános jelenség [42].



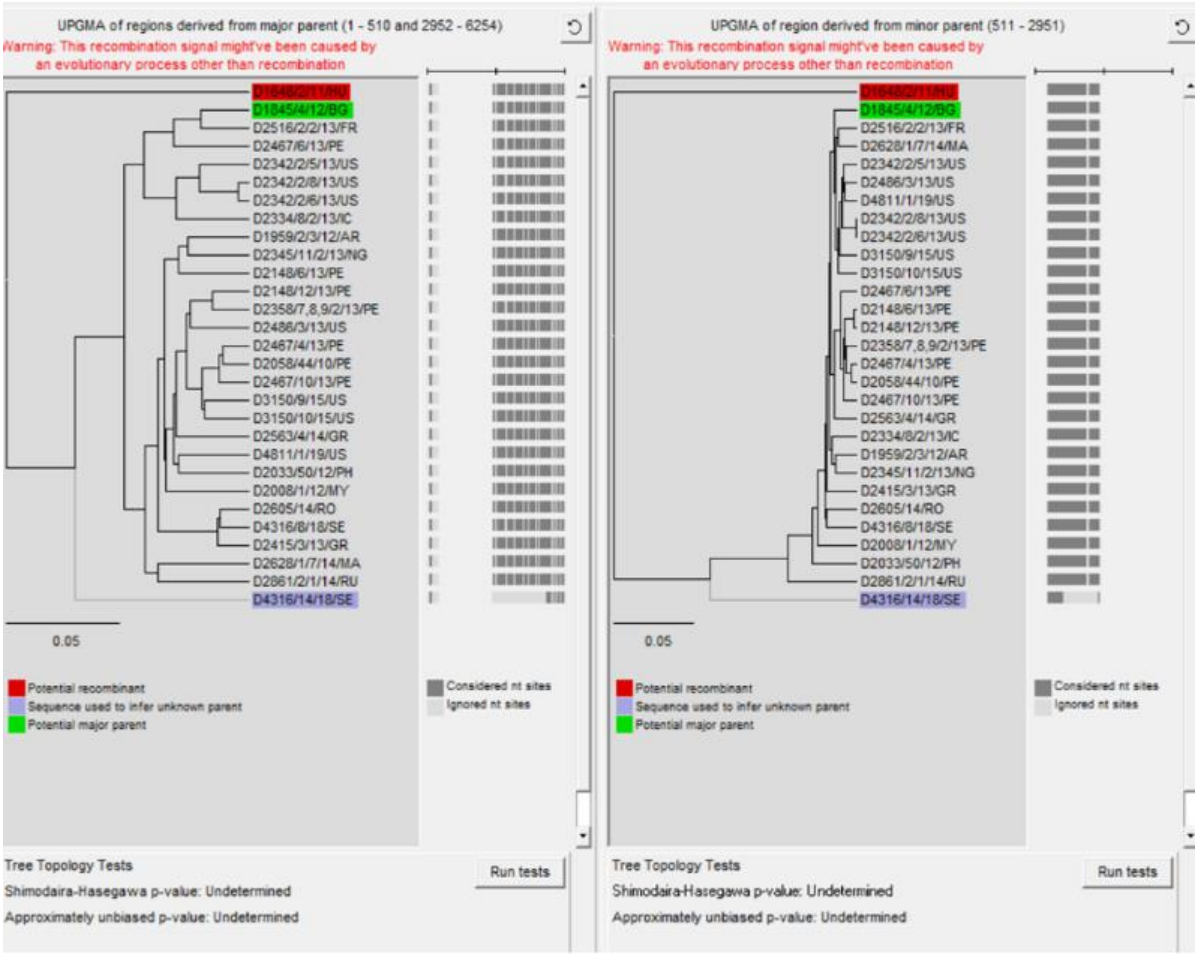
10. ábra: Breakpont distribution plot – Töréspont eloszlási ábra
A sötét és világos szürke színű területek a véletlenszerűen bekövetkező rekombinációs események 95 és 99%-os konfidencia intervallumai.

A *10. ábra* az azonosított rekombinációs töréspontok átfogó ábrázolására szolgál. Pirossal jelöltük a lokális forró pontokat (hot-spot). Ezek olyan genomi régiók, ahol a rekombináció gyakrabban következik be a vírusgenomban. Ezen felül azonosítható egy rekombinációs hideg pont (cold-spot), ahol a bekövetkező rekombináció valószínűsége kisebb a többi genomi régióhoz képest. Látható továbbá, hogy a bekövetkezett rekombinációs töréspontok mind a *cap* gén régiójába esnek. Az RDP5 szoftver filogenetikai fát is készít a rekombináció megerősítésére, mely korábban az egyik elsődleges módszere volt a rekombináns törzsek azonosításának.



11. ábra: Az RDP5 által generált filogenetikai fákat figyelhetjük meg a D4316/14/18/SE azonosítójú törzs esetén feltételezett rekombinációs esemény igazolására.

A *11. ábrán* jól kivehető miszerint a bal oldali leszármazási fán a potenciális rekombináns D4316/14/18/SE azonosítójú törzs és a minor parentként azonosított D4811/1/19/US törzs a genom 1-2951 és 5431-6254 nukleotid közötti szakaszát vizsgálva egymástól jelentős filogenetikai távolságot mutat. A jobb oldali fán a 2952-es és 5430-as pozíció közötti régiót vizsgálva azonban már közös csomópontból lépnek ki, ami igazolja, hogy az adott szakasz közös ősre vezethető vissza.

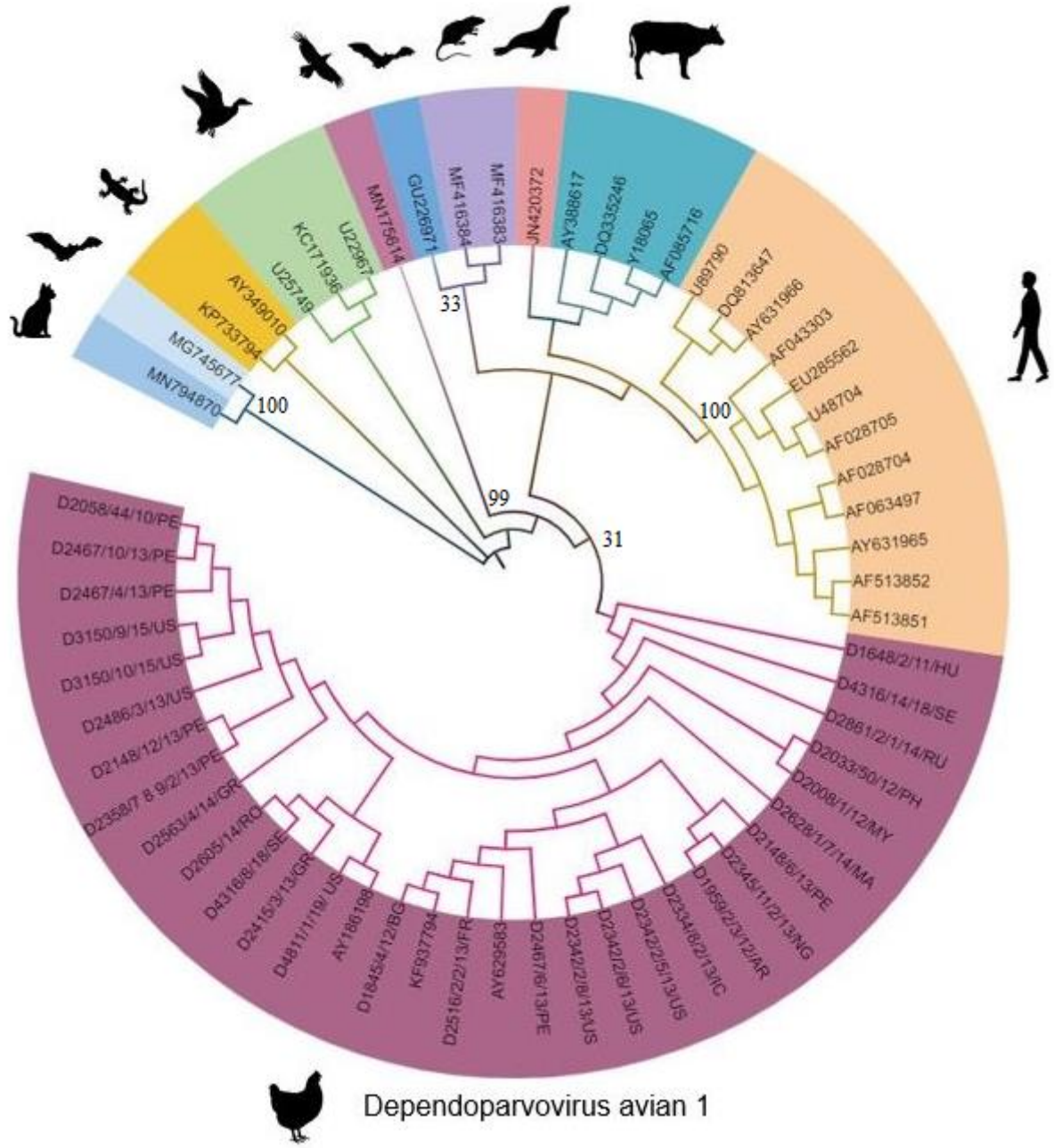


12. ábra: A D1648/2/11/HU azonosítójú törzs rekombinációjának igazolására szolgáló fa nem az elvárt képet mutatja.

A D1648/2/11/HU azonosítójú új variáns esetében az RDP5 szoftver által készített fa mást mutat, ez egyértelműen nem igazolja a rekombináció létrejöttét. A *12. ábrán* látható, hogy a korábban felvázolt rekombinációs eseménynél megfigyelhető ugrás nincs jelen. Ennek ellenére mivel több program is stabilan jelzi a rekombinációt, és a töréspont eloszlása is hasonló lefutást mutat az általunk megfigyelt további esetekhez képest, ezért azt feltételezzük, hogy valós rekombinációs eseményt jelezhetett a program a D1648/2/11/HU törzs esetében is, azonban ez a rendelkezésünkre álló 29 törzs szekvenciaadatai alapján nem követhető vissza egyértelműen.

7.4. Filogenetikai elemzések

A vizsgált törzsek filogenetikai besorolása elsődlegesen a teljes genom szekvencia alapján történt. Az elkészült filogenetikai fa átfogó képet nyújt a *Dependoparvovirus* genuson belüli evolúciós kapcsolatok szerkezetéről, mivel azon a genushoz tartozó madár- és nem madárfajok egyaránt megtalálhatók. Ezáltal mélyebb rálátást kapunk a saját törzsek és egyéb taxonok közötti filogenetikai viszonyokra.



13. ábra: Az ábrán látható teljes genom alapú filogenetikai fa MEGAX programmal készült, Maximum Likelihood módszerrel, GTR + G + I modellel és 1000-es bootstrap beállítással.

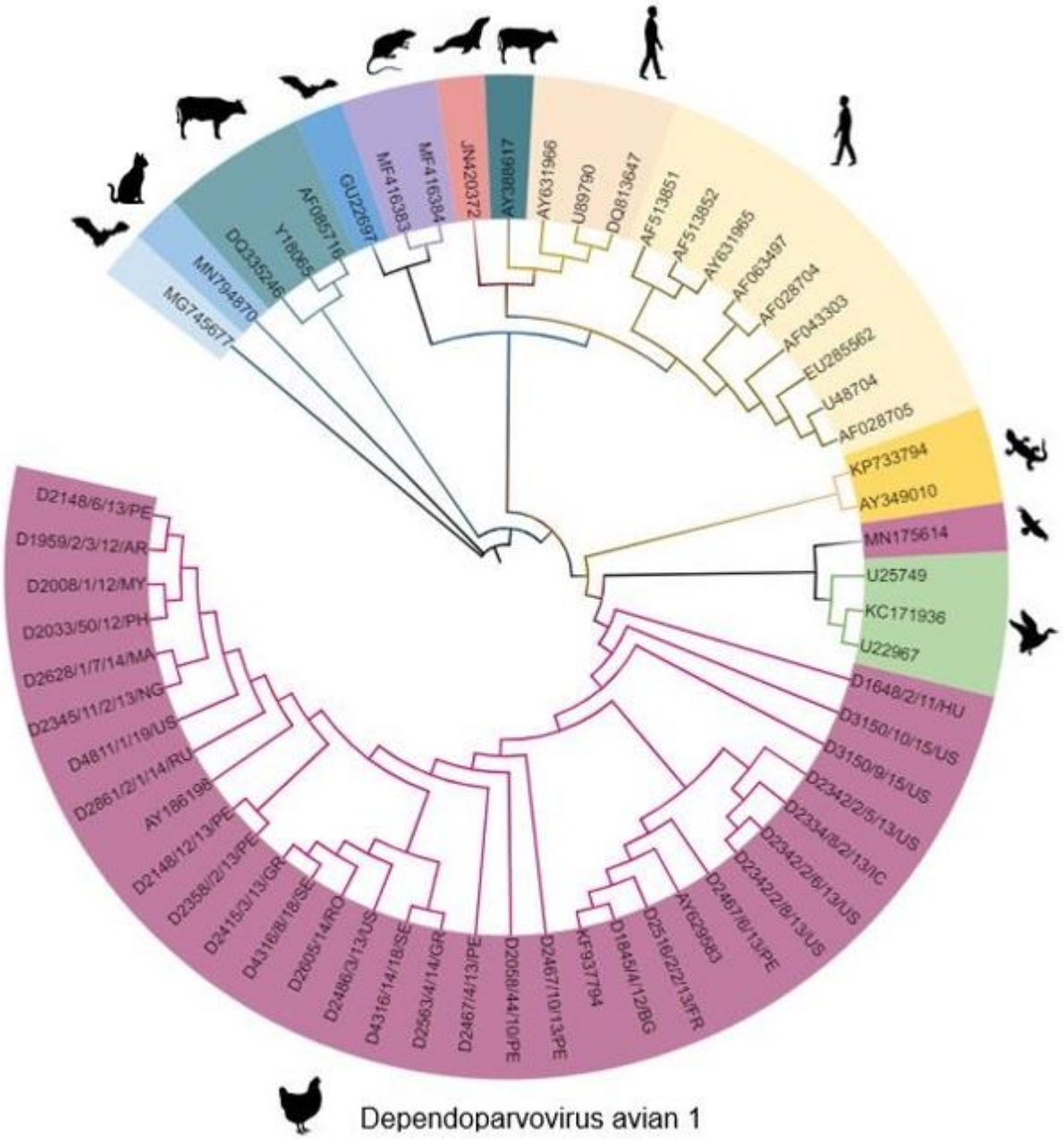
A *Dependoparvovirus* genushoz tartozó fajok kiválasztásánál arra törekedtünk, hogy a korábbi rendszertan szerinti különálló fajok genomjai is reprezentálva legyenek az új rendszertani felosztás egyes taxonjain belül. A *13. ábrán* a génbanki azonosítók felett látható szimbólumok a jelenlegi rendszertan szerinti megnevezést tükrözik, amely a következő fajokat jelöli: *Dependoparvovirus carnivoran 1* – macska, *Dependoparvovirus chiropteran 1-2* – denevér, *Dependoparvovirus squamate 1-2* – gőte, *Dependoparvovirus anseriform 1* – kacsa, *Dependoparvovirus avian 1* – csirke, *Dependoparvovirus avian 2* – ragadozómadár, *Dependoparvovirus rodent 1-2* – patkány, *Dependoparvovirus pinniped 1* – fóka, *Dependoparvovirus mammalian 1* – szarvasmarha, valamint *Dependoparvovirus primate 1* – ember.

A *13. ábráról* leolvasható, hogy a *Dependoparvovirus chiropteran 2* (MG745677) és *Dependoparvovirus chiropteran 1* (GU22697) eltérően csoportosultak. Előbbi a húsevők dependoparvovírusával alkot egy kládot, míg utóbbi a rágcsálók dependoparvovírusaival.

A *Dependoparvovirus avian 2* (MN175614) különálló ágat képez és az általam ábrázolt taxononok egyikével sem csoportosul. A *Dependoparvovirus avian 1* alacsony bootstrap értékkel, de közelebbi kapcsolatot mutat a *Dependoparvovirus primate 1*-gyel és a *Dependoparvovirus mammalian 1*-gyel. Ezen a kládon belül található a 3 referenciagenom mellett a 29 db saját törzsünk is.

A *Dependoparvovirus avian 1* fajon belül, a fa alapján 3 nagyobb csomópont található, ahol több törzs is divergál, alcsoportokat alkotva. A fa jobb oldalán a csomópont közelében az ágak diverzifikálódása figyelhető meg.

A VP1 fehérje aminosav sorrendje alapján is készítettünk egy filogenetikai fát, hogy meglássuk a genotípusos különbségek fenotípusosan hogyan ábrázolódnak. A *14. ábrán* látható taxonok jelölése megegyezik az *13. ábrán* használt szisztematikával. Főbb különbségek, hogy a *Dependoparvovirus mammalian 1* három törzse az AF085716, Y18065, DQ335246 közvetlenül gyökréből kilépve a negyedik törzstől AY388617 elkülönül.

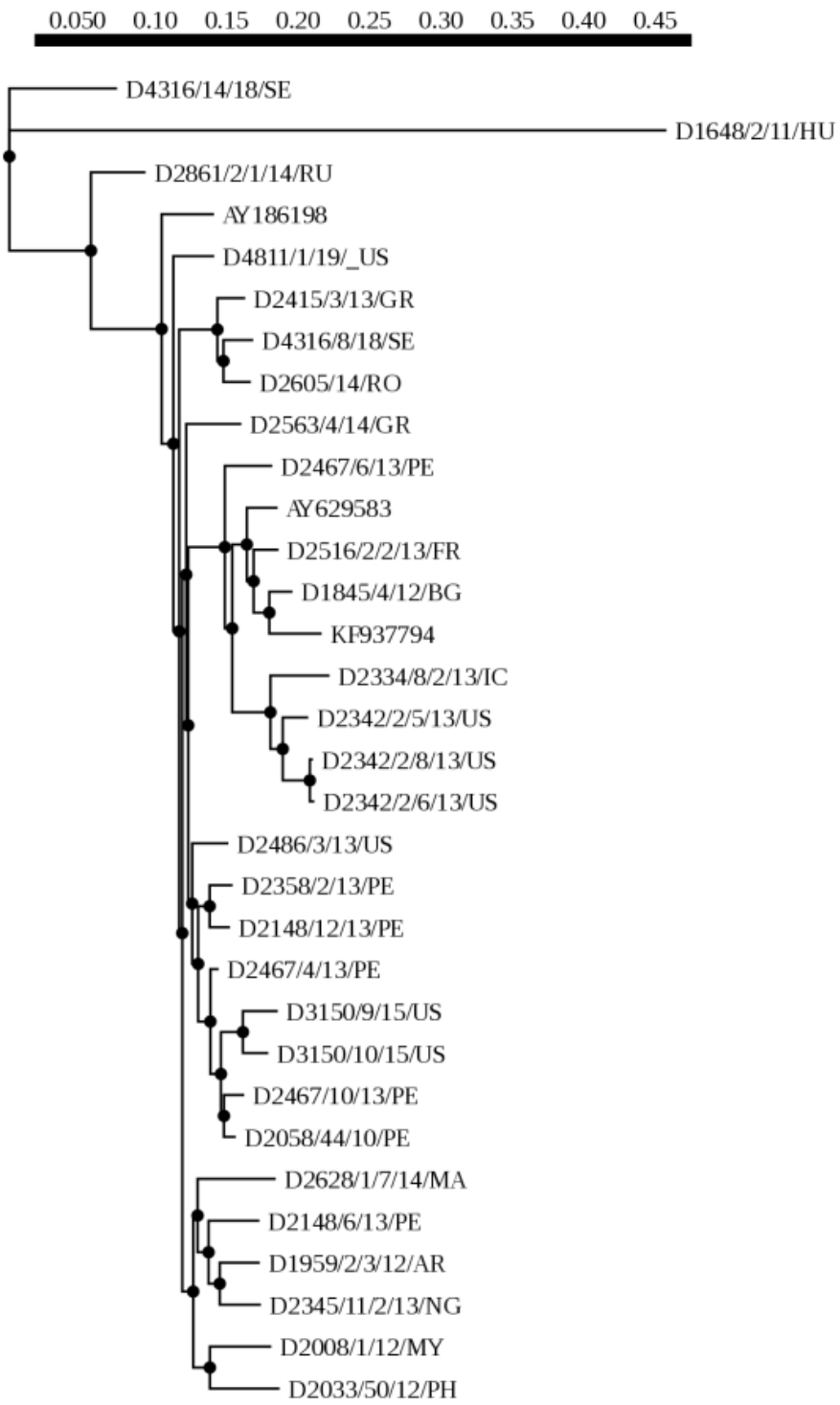


14. ábra: VP1 fehérje alapján PHYLM webszoftverrel készített filogenetikai fa, melyhez, Maximum Likelihood módszert, Qpfam +R+F modellt és 1000-es bootstrap beállítást használtunk.

A *Dependoparvovirus primate 1* faj 12 vizsgált törzse az aminosav alapú filogenetikai elemzések alapján 2 különálló kládra oszlik. Az AY631966, U89790, DQ813647 azonosítójú törzsek közelebbi rokonságot mutatnak a *Dependoparvovirus mammalian 1* különálló AY388617 azonosítójú törzsével, mint a többi *Dependoparvovirus primate 1*-gyel. Fenotípusos tulajdonságok alapján a madarak adeno-asszociált vírusai közelebbi kapcsolatot mutatnak egymással, mint genotípusosan vizsgálva. A *Dependoparvovirus avian 2* közelebb csoportosul a *Dependoparvovirus anseriform 1*-hez, mint a *Dependoparvovirus avian 1*-hez. Saját törzseink fenotípusosan is mind a *Dependoparvovirus avian 1*-gyel alkotnak egy csoportot, a 3 nagy klád hasonlóan megfigyelhető. A taglalt különbségekhez mind magas bootstrap értékek társultak, ám az ábra korlátolt mérete miatt ezek túl aprók voltak, ezért nem tüntettem fel az egyes értékeket. A megfigyelt genotípus és fenotípus alapú leszármazási különbözőségek hátterében gyakran állhat, hogy a fenotípusos tulajdonságok evolúciós szempontból más utakon alakultak ki, vagy a genotípusos divergencia ellenére erős szelekció hat a fenotípusos hasonlóságok megőrzésére.

15. ábra: Teljes genom alapú filogenetikai fa MEGAX programmal készült, Maximum Likelihood módszerrel, GTR + G modellel és 1000-es bootstrap beállítással. A méretvonal 0,1 szubsztitúciónak felel meg bázispáronként.

Az általunk azonosított 29 törzzsel és a génbanki adatbázisból letöltött 3 referenciatörzzsel készített teljes genom alapú filogenetikai fa látható a *15.* ábrán. Az ágak hossza az evolúciós távolság reprezentálására szolgál. Látható az azonos földrajzi régióról származó törzsek közeli csoportosulása. A fa alján 3 törzs jelentősen elkülönül a többitől, a legnagyobb genetikai távolságot az új variánsként azonosított magyar törzs adja. Az RDP5 szoftverrel korábban tapasztalt bizonytalanság a MEGAX szoftverrel készített teljes genom alapú fán is ábrázolódik, a csomópontok megbízhatóságának becslése ebben az esetben nem ábrázolódik, mert az algoritmus ezt nem tudta biztosan megbecsülni a törzs nem egyértelmű taxonómiája, vagy a köztes törzsek hiánya miatt. Mivel a legtöbb helyen magas bootstrap értékek szerepelnek és a fa szabályos lefutást követ, feltételezhető, hogy még hiányoznak egyes taxonok a vizsgálatból, amelyekre a csomópontok magasabb beazonosíthatóságához szükség lenne.



16. ábra: VP1 fehérje alapú filogenetikai fa PHYLM szoftverrel, Maximum Likelihood módszerrel, MtArt +R+F modellel és 1000-es bootstrap beállítással.

A *16. ábrán* látható VP1 fehérje alapú leszármazási fa nagyban hasonló lefutást mutat a teljes genom alapján készített filogenetikai fához képest. Feltételezhető, hogy a genomot érintő változások, mint a rekombináció, gyakran megjelennek fenotípusosan is.

7.5. Avian adeno-asszociált vírusok együttes előfordulása adenovírusokkal csirkékben

A rendelkezésünkre álló adatok alapján készítettünk egy rövid elemzést az AAAV-ok és aviadenovírusok egyidejű előfordulásáról. A hozzánk beérkezett 209 db mintából 88 esetben társított a beküldő állatorvos megfigyelt tüneteket, kórbonctani elváltozásokat, melyek mind beleillenek a PEMS tünetegyüttes képébe úgy, mint a gastroenteritis, perihepatitis, sejtzárványos hepatitis, hepatitis-hidropericardium szindróma.

Azonosító	Faj	Szerotíp.	Hivataos elnevezés
D1648/2/11/HU	-	-	-
D1845/4/12/BG	D	FAdV-2	Aviadenovirus gallinae
D1959/2/3/12/AR	E	FAdV-8	Aviadenovirus hepatitidis
D2008/1/12/MY	D	FAdV-2	Aviadenovirus gallinae
D2033/50/12/PH	D	FAdV-2	Aviadenovirus gallinae
D2148/6/13/PE	A	FAdV-1	Aviadenovirus ventriculi
D2148/12/13/PE	E	FAdV-8	Aviadenovirus hepatitidis
D2334/8/2/13/IC	D	FAdV-2	Aviadenovirus gallinae
D2342/2/5/13/US	D	FAdV-2	Aviadenovirus gallinae
D2342/2/6/13/US	E	FAdV-8	Aviadenovirus hepatitidis
D2342/2/8/13/US	D	FAdV-2	Aviadenovirus gallinae
D2345/11/2/13/NG	D	FAdV-2	Aviadenovirus gallinae
D2358/7,8,9/2/13/PE	E	FAdV-8	Aviadenovirus hepatitidis
D2467/4/13/PE	E	FAdV-8	Aviadenovirus hepatitidis
D2467/6/13/PE	D	FAdV-2	Aviadenovirus gallinae
D2467/10/13/PE	A	FAdV-1	Aviadenovirus ventriculi
D2486/3/13/US	E	FAdV-8	Aviadenovirus hepatitidis
D2516/2/2/13/FR	D	FAdV-2	Aviadenovirus gallinae
D2563/4/14/GR	A	FAdV-1	Aviadenovirus ventriculi
D2605/14/RO	B	FAdV-5	Aviadenovirus quintum
D2628/1/7/14/MA	D	FAdV-2	Aviadenovirus gallinae
D2861/2/1/14/RU	D	FAdV-2	Aviadenovirus gallinae
D3150/9/15/US	A	FAdV-1	Aviadenovirus ventriculi
D3150/10/15/US	A	FAdV-1	Aviadenovirus ventriculi
D4316/8/18/SE	D	FAdV-2	Aviadenovirus gallinae
D4316/14/18/SE	D	FAdV-2	Aviadenovirus gallinae
D2415/3/13/GR	D	FAdV-2	Aviadenovirus gallinae
D4811/1/19/ US	E	FAdV-8	Aviadenovirus hepatitidis
D2058/44/10/PE	D	FAdV-2	Aviadenovirus gallinae

17. ábra: Az általunk azonosított törzsek és a mintában velük egyidejűleg kimutatott aviadenovírus fajok láthatók az aktuális és a korábbi nevezéktannak megfelelően feltüntetve.

Ezek alapján az esetek 42,1%-ában volt megfigyelhető a felsoroltak közül valamelyik elváltozás. Összesen 29 mintából sikerült AAAV genomot kimutatni és felépíteni, ami az

összmintaszám 13,9%-a, ezekből 2 esetben jelentettek elváltozásokat, az egyik esetben gastroenteritist, másik esetben perihepatitist. Ez az AAAV tartalmú minták 6.9%-a.
A rendelkezésünkre álló adatok alapján kijelenthető, hogy az általunk megfigyelt esetben sem történhetett virulencia fokozódás az AAAV és aviadenovírusok egyidejű jelenléte esetén, sőt az AAAV-t nem tartalmazó minták esetében több volt a megfigyelhető elváltozás.

8. Megbeszélés

A munkánk keretében 29 avian adeno-asszociált vírus teljes genomját állítottuk össze. Ezek elemzése hozzájárul a vírusgenomok diverzitásának és evolúciós folyamatainak megértéséhez, mely az avian adeno-asszociált vírusok esetén korlátozott számban áll rendelkezésre az adatbázisokban. További vizsgálataink során egy új variánst is sikerült azonosítanunk, amely tovább bővíti az AAAV-ok ismert genetikai spektrumát. A virusgenomok diverzitásának vizsgálatára több filogenetikai fát készítettünk nukleinsav és aminosav alapján egyaránt, ezáltal betekintést kaptunk milyen különbségek ábrázolódnak, ha fehérje alapon is megvizsgáljuk a vírustörzsek szerveződését. Eredményeink alátámasztják, hogy az AAAV-ok, hasonlóan a humán adeno-asszociált vírusokhoz a humán populáció körében, nem okoznak klinikai tünetekben megnyilvánuló betegséget csirkékben, ezen túlmenően az adenovírusokkal való egyidejű jelenlétéből sem származik virulencia fokozódás [23]. Végeztünk rekombinációs események beazonosítására irányuló vizsgálatokat. Sok más DNS (és RNS) vírushoz hasonlóan a rekombinációra való hajlam a parvovírusok körében is jellemző tulajdonság. A kutyák CPV-2, CPV-2s, CPV-2b törzsei között is bizonyítottan létrejöttek rekombinánsok. Több főemlősből izolált adeno-asszociált vírus esetében figyelték meg rekombináció jeleit a *cap* génekben [42]. Általunk is megerősítést nyert az AAAV-ok esetében is a *cap* gént érintő gyakori rekombináció jelensége. Ezen felül általánosságban elmondható, hogy a vírusok evolúciós stratégiájának egyik meghatározó elemét képezik és hozzájárulnak a genomvariációk létrejöttéhez, jobb adaptációs képességek megszerzéséhez.

Ezen túlmenően eredményeink rávilágítanak a bioinformatikai elemzések kiemelkedő szerepére a virológiai kutatásokban. Ezek a módszerek nemcsak az egyes víruscsoportok, például az AAAV-ok taxonómiájának pontosításához járulhatnak hozzá, hanem szélesebb értelemben segítenek feltárni a vírusok evolúciós folyamatait, genetikai változatosságát és gazdaspecifitását. A bioinformatika lehetővé teszi az összetett adathalmazok feldolgozását, a vírusok genetikai tulajdonságainak részletes vizsgálatát, valamint azok terápiás és diagnosztikai potenciáljának feltérképezését.

9. Összefoglalás

Kisméretű, ssDNS genommal rendelkező, autonóm multiplikációban gátolt parvovírusok közé sorolhatjuk a dependoparvovírusokat, amelyeket először adenovírus izolátumon detektáltak, ezért leggyakrabban adeno-asszociált vírusként hivatkoznak rájuk.

Humán monogénes neuromuscularis rendszert érintő megbetegedések ígéretes és egyedüli gyógymódját jelenthetik, beleértve az állatok adeno-asszociált vírusait, melyekre egyre nagyobb figyelem irányul.

Munkánk során 209 db madárból származó adenovírust tartalmazó mintából sikerült metagenomikai módszerekkel 29 mintában detektálni avian adeno-asszociált vírust, és a továbbiakban ezek teljes genom nukleotid sorrendjének meghatározása is sikeres volt, köztük egy új variánst is azonosítottunk.

Azonosított törzseinkkel filogenetikai elemzéseket végeztünk, kivétel nélkül mind a *Dependoparvovirus avian 1* fajjal mutatnak leszármazási kapcsolatot. Az elvégzett rekombinációs elemzések alapján a gyakori rekombináció előfordulása az adeno-asszociált vírusok körében megerősítést nyert.

10. Irodalomjegyzék

1. Streck AF, Lopes TS, Lunge VR (2024) Antiviral alternatives against important members of the subfamily Parvovirinae: a review. Arch Virol 169

2. Lefkowitz EJ, Dempsey DM, Hendrickson RC, Orton RJ, Siddell SG, Smith DB (2017) Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)

3. Jager MC, Tomlinson JE, Lopez-Astacio RA, Parrish CR, Van de Walle GR (2021) Small but mighty: old and new parvoviruses of veterinary significance. Virol J 18

4. Vahedi SM, Salek Ardestani S, Banabazi MH, Clark F (2023) Epidemiology, pathogenesis, and diagnosis of Aleutian disease caused by Aleutian mink disease virus: A literature review with a perspective of genomic breeding for disease control in American mink (Neogale vison). Virus Res 336

5. Shao XQ, Wen YJ, Ba HX, Zhang XT, Yue ZG, Wang KJ, Li CY, Qiu J, Yang FH (2014) Novel amdoparvovirus infecting farmed raccoon dogs and arctic foxes. Emerg Infect Dis 20:2085–2088. https://doi.org/10.3201/eid2012.140289

6. Kapgate SS, Kumanan K, Vijayarani K, Barbuddhe SB (2018) Avian parvovirus: classification, phylogeny, pathogenesis and diagnosis. Avian Pathology 47:536–545

7. Ramsauer AS, Badenhorst M, Cavalleri JMV (2021) Equine parvovirus hepatitis. Equine Vet J 53:886–894

8. Vengust M, Jager MC, Zalig V, Cociancich V, Laverack M, Renshaw RW, Dubovi E, Tomlinson JE, Van de Walle GR, Divers TJ (2020) First report of equine parvovirus-hepatitis-associated Theiler's disease in Europe. Equine Vet J 52:841–847. https://doi.org/10.1111/evj.13254

9. Algwaiz G, Alharbi A, Alsehaim K, Alahmari A, Fakih R El, Aljurf M (2023) Hematologic Manifestations of Parvovirus B19 Infection. Hematology/ Oncology and Stem Cell Therapy 16:316–322

10. Mészáros I, Olasz F, Cságola A, Tijssen P, Zádori Z (2017) Biology of porcine parvovirus (Ungulate parvovirus 1). Viruses 9

11. Dr. Varga János, Dr. Rusvai Miklós, Dr. Fodor László (2018) A háziállatok fertőző betegségei. MÁOK Kft., Budapest

12. Parrish CR Host range relationships and the evolution of canine parvovirus

13. Wang D, Tai PWL, Gao G (2019) Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. Nat Rev Drug Discov 18:358–378

14. Walker PJ, Siddell SG, Lefkowitz EJ, Mushegian AR, Adriaenssens EM, Alfenas-Zerbini P, Dempsey DM, Dutilh BE, García ML, Curtis Hendrickson R, Junglen S, Krupovic M, Kuhn JH, Lambert AJ, *et al.* (2022) Recent changes to virus taxonomy ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2022). Arch Virol 167:2429–2440. https://doi.org/10.1007/s00705-022-05516-5

15. David M. Knipe, Peter Howley-Fields Virology (Knipe, Fields Virology)-2 Volume Set)-LWW (2013)

16. Gao G, Vandenberghe LH, Alvira MR, Lu Y, Calcedo R, Zhou X, Wilson JM (2004) Clades of Adeno-Associated Viruses Are Widely Disseminated in Human Tissues. J Virol 78:6381–6388. https://doi.org/10.1128/jvi.78.12.6381-6388.2004

17. Nicolas A, Jolinon N, Alazard-Dany N, Barateau V, Epstein AL, Greco A, Büning H, Salvetti A (2012) Factors influencing helper-independent adeno-associated virus replication. Virology 432:1–9. https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.05.027

18. Maclachlan NJ, Dubovi EJ Fenner's veterinary virology

19. Summerford C, Samulski RJ (1998) Membrane-Associated Heparan Sulfate Proteoglycan Is a Receptor for Adeno-Associated Virus Type 2 Virions

20. Girod A, Wobus CE, Ried M, Leike K, Tijssen P, Kleinschmidt rgen A, Hallek M (2002) Printed in Great Britain The VP1 capsid protein of adeno-associated virus type 2 is carrying a phospholipase A2 domain required for virus infectivity

21. Sanlioglu S, Benson PK, Yang J, Morrey Atkinson E, Reynolds T, Engelhardt JF (2000) Endocytosis and Nuclear Trafficking of Adeno-Associated Virus Type 2 Are Controlled by Rac1 and Phosphatidylinositol-3 Kinase Activation

22. Xiang YS, Hao GG (2023) Biophysical characterization of adeno-associated virus capsid through the viral transduction life cycle. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology 21

23. Meier AF, Fraefel C, Seyffert M (2020) The interplay between adeno-associated virus and its helper viruses. Viruses 12

24. Hüser D, Gogol-Döring A, Lutter T, Weger S, Winter K, Hammer EM, Cathomen T, Reinert K, Heilbronn R (2010) Integration preferences of wildtype AAV-2 for consensus rep-binding sites at numerous loci in the human genome. PLoS Pathog 6:1–14. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000985

25. Dutheil N, Henckaerts E, Kohlbrenner E, Linden RM (2009) Transcriptional Analysis of the Adeno-Associated Virus Integration Site. J Virol 83:12512–12525. https://doi.org/10.1128/jvi.01754-09

26. Sylvie Boutin, Virginie Monteilhet, Philippe Veron, Christian Leborgne, Marie Françoise Montus, Carole Masurier (2010) Prevalence of serum IgG and neutralizing factors against adeno-associated virus (AAV) types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the healthy population: implications for gene therapy using AAV vectors. Hum Gen Ther

27. Chen YH, Lou JG, Yang ZH, Chen QJ, Hua CZ, Ye S, Zhang CM, Chen J, Huang ZW, Yu JD, Gao ZG, Shu Q (2022) Diagnosis, treatment, and prevention of severe acute hepatitis of unknown etiology in children. World Journal of Pediatrics 18:538–544

28. Servellita V, Sotomayor Gonzalez A, Lamson DM, Foresythe A, Huh HJ, Bazinet AL, Bergman NH, Bull RL, Garcia KY, Goodrich JS, Lovett SP, Parker K, Radune D, Hatada A, Pan CY, Rizzo K, Bertumen JB, Morales C, Oluniyi PE, Nguyen J, Tan J, Stryke D, Jaber R, Leslie MT, Lyons Z, Hedman HD, *et al.* (2023) Adeno-associated virus type 2 in US children with acute severe hepatitis. Nature 617:574–580. https://doi.org/10.1038/s41586-023-05949-1

29. Morfopoulou S, Buddle S, Torres Montaguth OE, Atkinson L, Guerra-Assunção JA, Moradi Marjaneh M, Zennezini Chiozzi R, Storey N, Campos L, Hutchinson JC, Counsell JR, Pollara G, Roy S, Venturini C, Antinao Diaz JF, Siam A, Tappouni LJ, *et al.* (2023) Genomic investigations of unexplained acute hepatitis in children. Nature 617:564–573. https://doi.org/10.1038/s41586-023-06003-w

30. Ho A, Orton R, Tayler R, Asamaphan P, Herder V, Davis C, Tong L, Smollett K, Manali M, Allan J, Rawlik K, McDonald SE, Vink E, Pollock L, Gannon L, Evans C, McMenamin J, Roy K, Marsh K, Divala T, Holden MTG, Lockhart M, Yirrell D, Currie S, O'Leary M, Henderson D, Shepherd SJ, Jackson C, Gunson R, MacLean A, McInnes N, Bradley-Stewart A, Battle R, Hollenbach JA, Henderson P, Odam M, Chikowore P, Oosthuyzen W, Chand M, Hamilton MS, Estrada-Rivadeneyra D, Levin M, *et al.* (2023) Adeno-associated virus 2 infection in children with non-A–E hepatitis. Nature 617:555–563. https://doi.org/10.1038/s41586-023-05948-2

31. Capobianchi MR, Giombini E, Rozera G (2013) Next-generation sequencing technology in clinical virology. Clinical Microbiology and Infection 19:15–22

32. Liu YX, Qin Y, Chen T, Lu M, Qian X, Guo X, Bai Y (2021) A practical guide to amplicon and metagenomic analysis of microbiome data. Protein Cell 12:315–330

33. Kaszab E, Doszpoly A, Lanave G, Verma A, Bányai K, Malik YS, Marton S (2019) Metagenomics revealing new virus species in farm and pet animals and aquaculture. In: Genomics and Biotechnological Advances in Veterinary, Poultry, and Fisheries. Elsevier, pp 29–73

34. Delwart EL (2007) Viral metagenomics. Rev Med Virol 17:115–131

35. Reyes GR, Kim JP (1991) Sequence-independent, single-primer amplification of complex DNA populations (SISPA)

36. Alexa Anita, Fodor Krisztián, Garai Ágnes, Glatz Gábor, Radnai László, Rapali Péter, Szakács Dávid, Várkuti Boglárka, Zeke András (2013) Géntechnológia és fehérjemérnökség. ELTE-TTK, Budapest

37. Gwak HJ, Lee SJ, Rho M (2021) Application of computational approaches to analyze metagenomic data. Journal of Microbiology 59:233–241

38. Jensen TL, Gøtzsche CR, Woldbye DPD (2021) Current and Future Prospects for Gene Therapy for Rare Genetic Diseases Affecting the Brain and Spinal Cord. Front Mol Neurosci 14

39. Ramamoorth M, Narvekar A (2015) Non viral vectors in gene therapy - An overview. Journal of Clinical and Diagnostic Research 9:GE01–GE06

40. Slade N (2001) Viral vectors in gene therapy. In: Periodicum Biologorum. pp 139–143

41. Yoon DS, Lee KM, Cho S, Ko EA, Kim J, Jung S, Shim JH, Gao G, Park KH, Lee JW (2021) Cellular and tissue selectivity of aav serotypes for gene delivery to chondrocytes and cartilage. Int J Med Sci 18:3353–3360. https://doi.org/10.7150/ijms.56760

42. Beloukhova MI, Lukashev AN, Volchkov PY, Zamyatnin AA, Deviatkin AA (2022) Robust AAV Genotyping Based on Genetic Distances in Rep Gene That Are Maintained by Ubiquitous Recombination. Viruses 14:. https://doi.org/10.3390/v14051038

43. Wang JH, Gessler DJ, Zhan W, Gallagher TL, Gao G (2024) Adeno-associated virus as a delivery vector for gene therapy of human diseases. Signal Transduct Target Ther 9

44. Hsi J, Mietzsch M, Chipman P, Afione S, Zeher A, Huang R, Chiorini J, McKenna R (2023) Structural and antigenic characterization of the avian adeno-associated virus capsid. J Virol 97:. https://doi.org/10.1128/jvi.00780-23

11. Köszönetnyilvánítás

Szeretném kifejezni őszinte köszönetemet mindazoknak, akik támogattak szakdolgozatom elkészítése során.

Mindenekelőtt hálás vagyok témavezetőmnek, dr. Bányai Krisztiánnak, aki lehetőséget adott arra, hogy részt vegyek ebben a munkában. Tanácsai, útmutatásai és kritikus meglátásai nélkülözhetetlenek voltak a szakdolgozat elkészítéséhez, és sokat tanultam belőlük. Nagyra értékelem kiemelkedő szakmai tudását, amely nemcsak a kutatások irányításában, hanem a problémák megoldásában is nagy segítségünkre volt.

Köszönettel tartozom társ-témavezetőmnek, dr. Kaszab Eszternek, aki türelmesen segített elmélyedni a molekuláris biológia rejtelmeiben és segített az egyes programok felhasználói szintű elsajátításában.

Hálás vagyok dr. Marton Szilviának, aki mindig készségesen válaszolt a kérdéseimre és támogatott a munkám során.

Szeretném megköszönni dr. Fehér Enikőnek, hogy az első lépések megtételében segítséget nyújtott.

Köszönöm Küzmös Laurának, hogy társam volt a dolgozatírás nehézségeiben – együtt könnyebb volt megküzdeni a kihívásokkal.

Köszönöm férjemnek a sok hasznos meglátást, szakdolgozatom alapos végigolvasását és hogy felkeltette az érdeklődésem az informatika iránt.

Végül szeretném megköszönni dr. Forgách Petrának, akinek kiváló előadásai nélkül talán sosem szerettem volna meg ennyire a virológiát.