

Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar
Biológiai Intézet
Magyar Tudományos Akadémia Agrártudományi Kutatóközpont
Állatorvos-tudományi Intézet

Majom-adenovírusok molekuláris szintű összehasonlító vizsgálata

Készítette: Földes Katalin

Témavezetők: Dr. Harrach Balázs és Vidovszky Márton
MTA Agrártudományi Kutatóközpont Állatorvos-tudományi Intézet

Budapest

2013

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	1
Rövidítések jegyzéke	2
Bevezetés	4
Irodalmi áttekintés	6
Az adenovírusok általános leírása	6
A virion jellemzői	7
IVa2 és hexon	8
A mastadenovírusok általános bemutatása	8
A simian adenovírusok rendszerezése	10
Az újvilági és félmajmok filogenetikai viszonyai	11
Célkitűzések	13
Anyag és módszer	14
A minták eredete	14
DNS kivonása széklet mintákból	15
PCR	15
PCR termék tisztítása	17
DNS szekvenálás	18
Bioinformatikai kiértékelés	18
G+C arány számítás	20
Eredmények	21
Megbeszélés	27
Összefoglalás	32
Summary	33
Köszönetnyilvánítás	34
Irodalomjegyzék	35

Rövidítések jegyzéke

aa	amino acid (aminosav)
AdV	adenovirus (adenovírus)
A, C, G, T	adenine, cytosine, guanine, thymine nucleotide (adenin, citozin, guanin, timin nukleotid)
bp	base pair (bázispár)
CPRev	chloroplast proteins substitution model (chloroplast fehérje szubsztitúciós modell)
dNTP	dezoxiribonukleotid-trifoszfátok keveréke
E	early (korai)
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid (etilén-diamin-tetra-ecetsav)
g ₁	gram (gramm)
g ₂	gravitational acceleration (gravitációs gyorsulás)
G	gamma distribution (gamma eloszlás)
HAdV	human adenovirus (humán adenovírus)
JTT	Jones-Taylor-Thornton matrix
L	late (késői)
M	million (millió)
ml	milliliter
mM	millimolar (millimól)
mp	másodperc
MTMam	mammalian mitochondrial proteins substitution model (emlős mitochondriális protein szubsztitúciós modell)
mV	millivolt
PCR	polymerase chain reaction (polimeráz-lánreakció)
pH	pondus Hydrogenii (hidrogénion-kitevő /az oxóniumion koncentráció tizes alapú negatív logaritmus)
pmol	picomol (pikomól)
SAdV	simian adenovirus (majom-adenovírus)
SDS	sodium dodecyl sulphate (nátrium-lauril-szulfát)
TAE	trisz-acetát EDTA
U	unit (egység)
UV	ultraviolet (ibolyántúli)

VT Vingron resolvent method (Vingron-féle szubsztitúciós modell)
μl mikroliter

Bevezetés

Az első adenovírus (AdV) leírások már az 50-es években megjelentek (HULL, et al., 1956). Az AdV-ok természetes vírusai a gerinces fajoknak, beleértve az embert is. Az adenovírusokat öt elfogadott nemzetségbe sorolják: *Mastadenovirus* (csak emlősökben), *Aviadenovirus* (csak madarakban), *Atadenovirus* (pikkelyes hüllőkben, kérődzőkben, madarakban), *Siadenovirus* (békában, madarakban, Sulawesi teknősben), *Ichtadenovirus* (halban; HARRACH, et al., 2011). Legújabban egy hatodik nemzetség létrehozását javasolták a feltételezhetően a teknősökkel együtt fejlődött AdV-ok számára: Testadenovirus (csak teknősökben; DOSZPOLY, et al., 2013). A *Mastadenovirus* nemzetségbe tartozó humán adenovírusok (hét fajba sorolva: *Human adenovirus A*-tól *G*-ig; HAdV-A – HAdV-G) és simian adenovírusok (egyetlen elfogadott fajjal: *Simian adenovirus A*; SAdV-A) alkotják a főemlősök rendjének képviselőiben előforduló AdV-okat. Az AdV-ok fontos humán és állati patogének is lehetnek. Olyan kutatások modell szervezetei továbbá, melyek a sejt ciklus kontrollálásával, DNS replikációval, transzkripcióval, splicing mechanizmussal, vírus-gazda interakcióval és/vagy az apoptózis jelenségével foglalkoznak (BERGET, et al., 1977; WOLD and CHINNADURAI, 2000). Kutatásuk során a 90-es évektől vektorként való használatukra terelődött a figyelem (RUSSEL, 2000). Az AdV-ok alkotják az egyik legnépszerűbb vektor rendszert a vírus alapú génterápia és vakcinázás területén, egyben daganatos betegségek gyógyítására próbálják alkalmazni (RUSSEL, 2000; TUBOLY and NAGY, 2001; COLLOCA, et al. 2012; CHEN, et al., 2013; CHENG, et al., 2013; KIM, et al., 2013; SHARMA, et al., 2013). Kutatásokat végeztek humán szervezetben található neutralizáló ellenanyag mennyiségét illetően azért, hogy felmérjék, mennyire lenne sikeres a rekombináns AdV vakcinák használata. Az emberekben előforduló HAdV-ok elleni neutralizáló ellenanyagok magas aránya miatt a ritkábban előforduló HAdV-ok, illetve az emberrel távolabbi rokonságban álló újvilági és félmajmokban előforduló eddig nem ismert SAdV szerotípusok alternatív megoldást jelenthetnek a vektoralapú génpótlás, vakcinázás és a daganatellenes terápia során (XIANG, et al., 2006; ROY, et al., 2009; ERSCHING, et al., 2010; O'HARA, et al., 2012).

Mindezen tulajdonságaikon kívül, széles körű előfordulásuk a változatos gazda állatokban, és a nagymértékben megőrzött genom-szerveződésük, az AdV-okat ideális modellé teszi a vírus evolúció vizsgálatában is (HARRACH, 2008). A gazdával történő mai együttélésük feltételezések szerint általában a koevolúció eredménye. A virális fajképződés

ennek megfelelően jól tükrözi többek között a Hominae alcsalád fajképződését, de esetenként előfordul a fajon belüli illetve fajok közötti gazdaváltás is (BENKŐ and HARRACH, 2003; ROY, et al. 2009). Az AdV-ok egészséges állatokban is magas prevalenciát mutatnak. A főemlősök AdV-ai közül a legjobban kutatottak az emberfélék (Hominidae) AdV-ai. Kevésbé ismertek azonban a szélesorrú majmok (Platyrrhini) vagy más néven újvilági majmok nagycsaládjának AdV-ai, míg a félmajmok (Prosimii) adenovírusairól egyetlen közölt molekuláris adat sem áll rendelkezésre. Csupán két évvel ezelőtt publikálták az első újvilági majom-AdV genom adatokat (WEVERS, et al., 2011). A filogenetikai elemzésekből a nem óvilági majom-adenovírusok ismert szekvencia hiányában eddig mindig kimaradtak.

Ez a szakdolgozat egyes újvilági és félmajom-AdV gének PCR-el való részleges felerősítése révén új adenovírusokat ír le, e vírusok biodiverzitásáról szolgál adatokat, továbbá a nyert szekvenciák előzetes filogenetikai jellemzése útján koevolúciós vizsgálatot végzett a gazda és vírus fajok között.

Irodalmi áttekintés

Az adenovírusok általános leírása

Az *Adenoviridae* családba jelenleg öt elfogadott nemzetséget sorolunk: *Ichtadenovirus*, *Siadenovirus*, *Atadenovirus*, *Aviadenovirus* és *Mastadenovirus* (HARRACH, et al., 2011). Az öt nemzetség nagyjából megfeleltethető a gerincesek öt főbb osztályának, de várható további nemzetségek alapítása is. Nincsenek rendelkezésre álló fossziliák, és még nem ismert a legközelebbi közös ősök, ugyanakkor adott az AdV-ok legközelebbi rokona, mely a *Tectiviridae* családba tartozó enterobaktérium fág. Egyes kutatások szerint az adenovírusoknak közeli rokona még a zöld alga egyik vírusa (*Paramecium bursaria Chlorella virus 1*), és egy *Archea* vírus is (HARRACH, et al., 2011).

Szinte minden gerincesben található AdV, a halaktól az emlősökig. Egy vírus fajnak azonban általában csak egy gerinces faj a természetes gazdája, mellyel együtt fejlődtek. Megjelenésüket több mint 400 millió évvel ezelőttre becsülik. A koevolúció mellett azonban ismertek olyan esetek, amikor gazdaváltás történt, és ezek evolúciós szempontból akár nem túl régi események is lehetnek: pl. az ember rendelkezik a ma ismert legtöbb Homininae AdV-sal is (HARRACH, 2008; <http://www.vmri.hu/~harrach/ADENOSEQ.HTM>). PCR technikát alkalmazva nagyszámú új AdV-t azonosítottak az utóbbi évtizedekben, de *in vitro* tenyésztésük többnyire nem megoldott a megfelelő sejt kultúrák hiánya miatt (HULL and MINNER, 1957; PAPP, et al., 2009; VIDOVSZKY and BOLDOGH, 2011). Néhány humán, ill. állati AdV okozhat megbetegedést, sőt halált is, de a legtöbb faj nem okoz betegséget egészséges egyedekben (BENKŐ, 2008). A leggyakoribb tünetek főemlősökben: gastroenteritis, keratokonjunctivitis és akut légzőszervi megbetegedések.

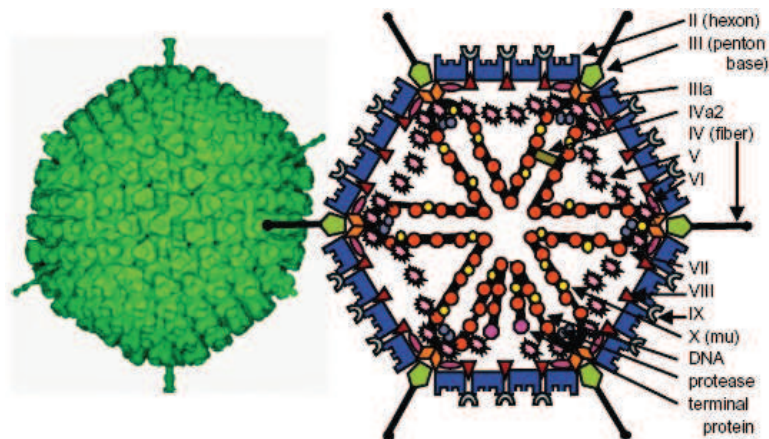
Korábban immunkémiai módszerek és biológiai tulajdonságaik alapján osztályozták az AdV-okat, manapság azonban evolúciós távolságuk alapján (BENKŐ and HARRACH, 2003; DE MOTES, et al., 2011; LU, et al., 2011). A filogenetikailag közeli típusokat közös fajba sorolják. A faj szintű elkülönítés alapja általában a következő tulajdonságok alapján történik (HARRACH, et al., 2011):

- A DNS-polimeráz alapján számított filogenetikai távolság (>5-15%)
- Genom-szerveződés
- Nukleotid összetétel (G+C%)
- Gazda specificitás
- Kereszt-neutralizáció

- Rekombinációs képesség

A virion jellemzői

Az AdV-ok burok nélküli, ikozahedrális, lineáris, dupla-szálú DNS-sel (26-45 kb) rendelkező vírusok, melyeknek 70-100 nm az átmérője (**1. ábra**). A kapszid 240 csúcs nélküli



1. ábra. Az AdV kapszid és fehérjéi (HARRACH et al, 2011).

kapszomerből (hexon), melyek mindegyike 8-10 nm átmérőjű, valamint 12 csúcsos kapszomerből (pentonalap) áll, mely utóbbiak mindegyikéből kinyúlik legalább egy fiber (9-77.5 nm); a pentonalap és a fiber alkotja együtt a pentont, mely a kapszid szétesésekor is még gyakran egyben marad (HARRACH, 2008). A hexon és a penton között más, kisebb fehérjék találhatók, úgymint a IIIa, VI, VIII, IX proteinek, melyek stabilizálják a szerkezetet (RUSSEL, 2000). További kisebb fehérjék helyezkednek el a kapszidon belül és általában a DNS-t stabilizálják (IVa2, V, X). A DNS molekula tartalmaz egy fordított terminális ismétlődést (ITR) is, a vírus kódolta terminális protein (TP) pedig kovalensen kötődik az 5'-s véghez minden DNS szálon. Az AdV genomok G+C tartalma 33,6% és 66,9% között változik. A gazdafajt váltó, nem hüllő-eredetű atadenovírusok és a siadenovírusok genomjának alacsonyabb a G+C tartalma (vagyis genomjuk magasabb A+T dinukleotid aránnyal rendelkezik). Az alacsonyabb G+C tartalom a feltételezések szerint a gazdaváltás eredménye (BENKŐ és HARRACH, 2003). A genom középső része megőrzött genom-szerveződésű, míg a két véget nagy változatosság jellemzi hosszban és gén tartalomban egyaránt (HARRACH, et al., 2011). Az evolúció során az AdV-ok genomjának mérete növekedhetett rekombináció, gén felvétel és duplikáció révén (BENKŐ and HARRACH, 2003; DAVISON, et al., 2003). A legtöbb genus specifikus gén a genom két végén, és

sorolták: HAdV-A – HAdV-G és a SAdV-A. Viszont számos majom-AdV izolátumot még nem soroltak be fajba. A mai napig legalább 65 különböző HAdV (geno)típust javasoltak (ez 51 bizonyított szerotípusnak és néhány további rekombinánsnak vagy szekvencia alapján új szerotípusnak feltételezett AdV-nak felel meg) (WALSH et al., 2009; MATSUSHIMA, et al., 2013).

Hagyományosan szerológiai módszerekkel, a gazdafaj és a kórokozó képesség alapján különítették el az egyes genusokat, manapság azonban a filogenetikai távolság és a genom-szerveződési különbség a döntő. Az ismert mastadenovírusok genom mérete 30.536 bp és 37.860 bp között változik. G+C tartalmuk 43,6-63,9%. ITR szakaszaik általában hosszabbak (93-371 bp) és komplexebbek más nemzetségekhez viszonyítva. Az úgynevezett genus-specifikus fehérjék, melyek csak ebben a nemzetségben találhatók meg, a következők: protein V, IX valamint az E1A, E1B, E3 és az E4 régióból a legtöbb fehérje (HARRACH, 2008; HARRACH, et al., 2011). A mastadenovírusok genomja négy korai transzkripciós egységbe szerveződik (E1, E2, E3 és E4). Ezeknek szabályozó és replikációs funkciói vannak. A két késleltetett korai egység (IX és IVa2) és egy fő késői transzkripciós egység pedig a kapszid fehérjék szintézisét irányítja (HARRACH, et al., 2011). Genom-szerveződésük a 2. ábrán látható.

A főemlősök növekvő mértékben felelősek a zoonótikus betegségek előfordulásáért. Vírusfertőzések leggyakrabban közeli fizikai kontaktusból származnak (pl. állatkertben). További ilyen fertőzési mód lehet a főemlősök vadászata és azok fogyasztása. A fajok közötti transzmisszió a különböző patogének esetén ember és majom között a filogenetikai közelségtől függ. Egy ismert példa a transzmisszióra a HIV vírus, mely a HIV-nek megfelelő simian vírus (SIV) emberre történő többszörös transzmissziós esemény következménye. Az Ebola vírus is főemlősökhöz köthető. Kabócamajmok (más néven titi majmok) esetén halálos tüdőgyulladásban és hepatitisben megnyilvánuló AdV fertőzés lépett fel, mely során megfertőződött az egyik kutató is (WEVERS, et al., 2011). Az AdV előfordulása az emberekben igen gyakori, ami magas védettséget eredményez a leggyakoribb szerotípusok ellen. Ez viszont rontja az esélyeit a HAdV alapú vektor vakcinák hatásosságának. Ugyanakkor, távolabbi rokon majom-AdV ellen érhetően nincs ellenanyag a humán populációkban. Néhány simian AdV vektor, melyekbe immunizálásra szolgáló fehérje génjét építették be, képes volt megkerülni az immunológiai barrieréket és hatékony védelmet nyújtani a cél patogének ellen (LU, et al., 2011).

A simian adenovírusok rendszerezése

A korai vizsgálatok idején a HAdV-okhoz hasonlóan a SAdV-okra is alkalmazhatónak találták a klasszikus hemagglutinációs tesztek. A 4 SAdV hemagglutinációs csoport analógnak tűnt a négy HAdV hemagglutinációs csoporttal (RAPOZA, 1967). Ennél pontosabb eredményeket adtak a vírusneutralizációs szerotípus elkülönítések. Manapság filogenetikai távolság alapján csoportosítjuk az AdV-okat.

A legelső izolátumok óvilági, nem emberszabású majmokból származtak (KIM, et al., 1967; VASILEVA, et al., 1978). A ma ismert és egymástól a vírusneutralizációs próbával elkülönített szerotípusok a következők: makákóból (SAdV-1 – SAdV-15), szavannacerkófból (SAdV-16 – SAdV-18, SAdV-20), páviánból (SAdV-19) és csimpánzból származó AdV-k (SAdV-21 – SAdV-25) (ROY, et al. 2004; KOVÁCS, et al., 2005).

Az első szekvenált majom-AdV-ok csimpánzból izolált típusok voltak: SAdV-21 – SAdV-25 (FARINA et al., 2001; ROY, et al., 2004). Az első közölt teljes óvilági majom-AdV genom szekvencia a SAdV-3 genomja volt, és ez tette lehetővé az első teljes genetikai összehasonlítást óvilági majom-, csimpánz- és humán AdV között és szülte az igényt egy új AdV faj létrehozására (SAdV-A; KOVÁCS, et al., 2004). Mára már több mint 50 SAdV-t azonosítottak és szekvenáltak immár gorillából és bonobóból is, az új típusok nevének a SAdV-25.2 – SAdV-50-et adták. (KOVÁCS, et al., 2005; ROY, et al., 2009, 2012; DE MOTES, et al., 2011). Ázsiai emberszabásúakból (orángutánok, gibbonok) azonban még nem írtak le AdV-t.

A HAdV-B, HAdV-C és a HAdV-E-be tartozó SAdV-ok nagy emberszabásúakból, míg a HAdV-G-be tartozóak óvilági, nem emberszabású majmokból származnak. SAdV-ok a HAdV-A, HAdV-D és HAdV-F fajokban jelenleg nincsenek. A legtöbb SAdV-t fogságban tartott egyedek bélsár mintáiból izolálták, vagy mutatták ki. Vadállatokból keveset ismerünk (ROY, et al., 2004; WEVERS, et al., 2011).

Újvilági majmok közül eddig 6 fajban írtak le AdV fertőzést: éji majom (*Aotus sp.*), kabócamajom (*Callicebus cupreus*), közönséges selyemmajom (*Callithrix jacchus*), törpe selyemmajom (*Callithrix pygmaea*), fehérarkú tamarin (*Saguinus labiatus*) és gyapjasfejű tamarin (*Saguinus oedipus*) (CHEN, et al., 2011; GÁL, et al., 2011; WEVERS, et al., 2011; HALL, et al., 2012). 2011-ben publikálták az első újvilági majom-AdV szekvenciát (CHEN, et al., 2011). A GenBank-ban csak ez, a rezes kabócamajom (*Callicebus cupreus*) AdV-ának teljes genomja szerepel, a *Saguinus oedipus* és *Callithrix pygmaea* AdV-ainak pedig csak részleges genomja érhető el (GÁL, et al., 2011; HALL, et al., 2012). A SAdV-ok speciációja

bizonyos vonatkozásban tükrözi a főemlősök fajképződését, vagyis koevolúció tételezhető fel gazda és vírusa között (BENKŐ and HARRACH, 2003; KOVÁCS et al., 2004; ROY et al., 2009). E mellett kimutathatóan a fajok közötti transzmisszió is szerepet játszott az AdV-ok mai gazdáinak kialakulásában (BENKŐ and HARRACH, 2003; PURKAYASTHA, et al., 2005; ROY, et al. 2009).

Az újvilági és félmajmok filogenetikai viszonyai

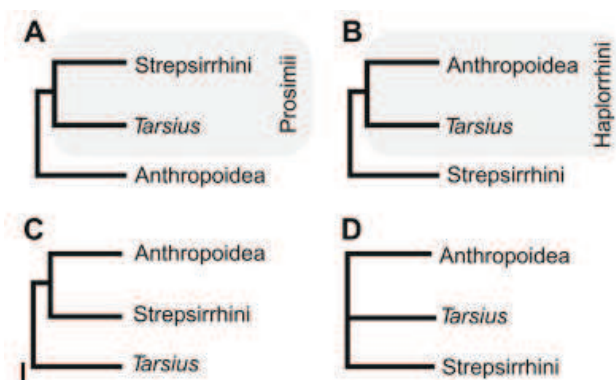
A főemlősök a legjobban tanulmányozott emlős rend. Legközelebbi közös ősök 64,9-72,6 M éve jelenhetett meg (JAMESON, et al., 2011). Az Euarchontoglires öregrendjén belül a főemlősök (Primates) rend az alábbi két alrendre osztható: orrtükrösök (Strepsirrhini: makialkatúak, lajhármaki-alkatúak, szétválásuk 52 M éve történt) és orrtükör nélküliek (Haplorrhini). Szétválásukat 64 M évvel ezelőttre becsülik. Utóbbi az alábbi alrendágakba osztható: koboldmaki-alkatúak (Tarsiiformes: koboldmakifélék) és majomalkatúak (Simiiformes), mely tovább osztható az alábbi csoportokra: keskenyorrú majmok/óvilági majmok (Catarrhini: emberszerűek, cercófszerűek, szétválásuk 29 M évvel ezelőtt történt) és szélesorrú majmok/újvilági majmok (Platyrrhini). Szétválásukat 43 M évvel ezelőttre teszik.

Az újvilági majmok filogenetikailag monofiletikus kládot alkotnak, közel 25-35 M éve alakultak ki Dél-Amerikában és a Karibi térségben. A Paleocén-Oligocén időszak alatt jelentek meg, ekkor izolálódtak az óvilági majmoktól. Amerikában nagy biológiai radiációt mutattak, mely a csoportra jellemző változatosságot eredményezte (ma 15-17 nemzetség és 125 faj ismert), mely megmutatkozik mind az élőhely-, életmódválasztásban, mind pedig a morfológiájukban (PEREZ, et al., 2012). Számos molekuláris vizsgálat és bioinformatikai elemzés ellenére sem sikerült még teljesen megérteni filogenetikai kapcsolatrendszerüket. A csoportba tartozó családok: csuklyásmajomfélék (Cebidae), pókmajomfélék (Atelidae), sátánmajomfélék (Pitheciidae) és éjimajomfélék (Aotidae). A jelenlegi filogenetikai számítások az éjimajomfélék és a többi család kapcsolatát illetően nagy bizonytalanságot mutatnak, és hasonló képet kapunk a sátánmajomfélék esetében is. Minden filogenetikai megközelítés 3 monofiletikus újvilági majom családot különít el egyértelműen: pókmajomfélék, csuklyásmajomfélék, és sátánmajomfélék. Némely kutatásban közelebbi filogenetikai kapcsolatot mutattak ki a pókmajomfélék és csuklyásmajomfélék, máshol az éjimajomfélék és csuklyásmajomfélék családja között. A bizonytalanságot jelzi, hogy a filogenetikai számítások során kapott posterior valószínűségek alacsonyabbak ezeknél a konfliktusos facsomópontoknál (PEREZ, et al., 2012). Opazo és munkatársai szerint a

Maximum Parszímónia módszer alapján a pókmajomfélék és csuklyásmajomfélék alkotnak testvér családokat közeli rokonságban a sátánmajomfélékkel. Míg a Maximum Likelihood és Bayesian módszer alapján a pókmajomfélék és sátánmajomfélék közös csoportot alkotnak kizárva a csuklyásmajomféléket. Nemcsak családok között, hanem egyes családokon belül is vannak nem tisztázott kapcsolatok (pl. pókmajomféléknél) (OPAZO, et al., 2006).

A félmajmok (Prosimii) rendszerezésében is akadnak bizonytalan elemek. Maga az elnevezés is sokáig egy nem monofiletikus csoportot jelölt, mely a hagyományosan ősbibnek tartott tulajdonságokkal rendelkező majmokat tartalmazza. A csoport a ma élő főemlősöktől a késő Paleocén időszakban válhatott el. Egyedülálló morfológiai bélyegeik is hozzá járulnak ahhoz, hogy egyes kutatások szerint nem kerülhetnek egy ágra a főemlősökkel. A legtöbb mai kutatás 3 élő főemlős kládot különít el: 1.) igazi majmok alrendje (Anthropoidea): óvilági majmok (Platyrrhini) és újvilági majmok (Catarrhini), 2.) orrtükrösök alrendje (Strepsirrhini): makialkatúák (Lemuriformes) és lajhármaki-alkatúák (Lorisiformes), valamint 3.) (Tarsiiformii): koboldmaki-alkatúák (Tarsiiformes) (JAMESON, et al., 2011). A koboldmaki-alkatúák (Tarsiiformes) filogenetikai elhelyezkedése azonban vitatott téma, ezen belül is a legproblémásabb a koboldmakifélék (Tarsiidae) helye. A koboldmaki-alkatúák a legkülönállóbb létező főemlős alrendág. Hagyományosan az orrtükrösök alrendjébe sorolták őket közeli rokonságban a makialkatúakkal és lajhármaki-alkatúakkal. A modern szemlélet szerint azonban az orrtükrő nélküliek alrendjébe tartoznak közelebbi rokonságban az ó- és újvilági majmokkal (FLÜGGE, et al., 2002; CHATTERJEE, et al., 2009). Nagyszámú morfológiai és molekuláris tanulmány ellenére is kevés bizonyíték van mindkét fennálló teória bizonyítására. Teljes mtDNS genom alapján csak limitált bizonyítékot találtak az orrtükrő nélküliek alrendjének (Haplorrhini) létjogosultságára. Ugyanezen tanulmány szerint a félmajmok közelebbi rokonságban állnak a denevérekkel, rágsálókkal, és a mókuscickányfélékkel, ami egy nem monofiletikus főemlős kládot eredményezne. Egy másik tanulmány eredménye szerint a koboldmaki-alkatúák testvér taxonja a lajhármaki-alkatúaknak, de ez sem monofiletikusan.

A Fülöp-szigeteki koboldmaki (*Tarsius syrichta*) teljes genomját nemrég tették ismertté, mely alapján kutatók próbálták tisztázni a koboldmaki-félék filogenetikai kapcsolatát a főemlősök rendjén belül. Jameson és mtsai kutatásában négy hipotézist állítottak fel filogenetikai kapcsolatukat illetően (**3. ábra**).



3. ábra. Koboldmai-félék lehetséges filogenetikai kapcsolatai (JAMESON, 2011).

Több mint 1000 ortológ génre alapozott filogenetikai számítások alapján végül is elutasítják a prosimian klád létezését, és a haplorrhini kládot vélik létezőnek, ahová a koboldmaki-félék is tartóznak szerintük. Összességében elmondható, hogy nincs egységes vélemény a témával kapcsolatban, de az egyik elfogadott vélekedés szerint a főemlősök két alrendre oszthatóak: Haplorrhini (koboldmaki-alkatúak, újvilági, óvilági és emberszabású majmok) és Strepsirrhini (makialkatúak, lajhármakialkatúak) (JAMESON, et al., 2011).

Célkitűzések

Az óvilági majmok AdV-ai (a gibbonok és az orángután AdV-ait leszámítva) alaposan vizsgáltak, azonban az újvilági majmok AdV-ai alig, míg a félmajmok AdV-ai egyáltalán nem ismertek.

Ezért célul tűztük ki, hogy az eddig nem tanulmányozott fajok AdV-ainak biodiverzitását felmérjük azáltal, hogy az ezekből a majom-fajokból megkíséreljük AdV-ok egyes génjeinek bizonyos szakaszait PCR-el felerősíteni. A nyert szekvenciák előzetes filogenetikai jellemzését is elvégezzük, mely segítségével koevolúciós következtetéseket vonunk le a gazdafajok és adenovírusaik között. Bővíteni kívántuk ezáltal a *Mastadenovirus* nemzetség tagjaira vonatkozó filogenetikai ismereteket.

Hosszú távú célok között szerepel az itt kimutatott eredmények humán gyógyászatban való felhasználása a SAdV-ok esetleges vektorként való alkalmazása révén.

Anyag és módszer

A minták eredete

A bélsár mintákat hazai állatkertek majmaitól gyűjtöttem be. A mintagyűjtés során külön egyszer használatos kesztyűt használtam minden mintához. A mintákat Falcon-csövekben tároltuk fagyasztva (-20 °C-on). A minta gyűjtések időpontja: Budapest: 2012. 02. 06., Nyíregyháza: 2012. 04. 03., Jászberény: 2012. 07. 09., Győr: 2012. 10. 12. Fölhasználtam továbbá a Pantó Laura által gyűjtött és kivont DNS mintákat is. Ezek Debrecenből (2011. májusa) és egy magángyűjteményből származtak (gyűjtés ideje ismeretlen). Egy mintát, a Fővárosi Állat- és Növénykertből Dr. Harrach Balázs gyűjtött be (*Lemur catta*, 2012. 09. 09.). A 25 fajból összesen 43 mintát dolgoztam fel (**1. táblázat**).

1. táblázat. A vizsgált fajok és adataik

Gyűjtés helye	Gyűjtő személye	Fajnév	Minta típusa
Debreceni Állat- és Növénykert	Pantó Laura	apella csuklyásmajom (<i>Cebus apella</i>)	bélsár
		gyűrűsfarkú maki (<i>Lemur catta</i>)	bélsár
		közönséges selyemmajom (<i>Callithrix jacchus</i>)	bélsár
Fővárosi Állat- és Növénykert	Földes Katalin, Dr. Harrach Balázs és Pantó Laura	aranyfejű oroszlánmajmocska (<i>Leontopithecus chrysomelas</i>)	bélsár
		aranyhasú mangábe (<i>Cercocebus agilis chrysogaster</i>)	bélsár
		Azara-éjímajom (<i>Aotus azaraï</i>)	bélsár
		borneói orángután (<i>Pongo pygmaeus</i>)	bélsár (2x)
		Goeldi-tamarin (<i>Callimico goeldi</i>)	bélsár
		gyűrűsfarkú maki (<i>Lemur catta</i>)	bélsár
		huszármajom (<i>Erithrocebus patas</i>)	máj
		közönséges selyemmajom (<i>Callithrix jacchus</i>)	bélsár (2x)
		mandrill (<i>Mandrillus sphinx</i>)	bélsár
Jászberényi Állat- és Növénykert	Földes Katalin	fehérkezű gibbon (<i>Hylobates lar</i>)	bélsár
		gyűrűsfarkú maki (<i>Lemur catta</i>)	bélsár
		halálfejes mókusmajom/közönséges mókusmajom (<i>Saimiri sciureus</i>)	bélsár
		japán makákó (<i>Macaca fuscata</i>)	bélsár
		közönséges selyemmajom (<i>Callithrix jacchus</i>)	bélsár
		liszt-majmocska (<i>Saguinus oedipus</i>)	bélsár
magángyűjtemény	Pantó Laura	halálfejes mókusmajom/közönséges mókusmajom (<i>Saimiri sciureus</i>)	vese és bél (2x)
		közönséges selyemmajom (<i>Callithrix jacchus</i>)	máj és tüdő

Nyíregyházi Állatpark	Földes Katalin		
		apella csuklyásmajom (<i>Cebus apella</i>)	bélsár
		bolíviai mókusmajom (<i>Saimiri boliviensis boliviensis</i>)	bélsár
		borneói orangután (<i>Pongo pygmaeus</i>)	bélsár
		fehérajkú tamarin (<i>Saguinus labiatus</i>)	bélsár
		fehéarcú sátánmajom (<i>Pithecia pithecia</i>)	bélsár
		Geoffroy selyemmajom/fehérfejű selyemmajom (<i>Callithrix geoffroyi</i>)	bélsár
		gyűrűsfarkú maki (<i>Lemur catta</i>)	bélsár
		liszt-majmocska (<i>Saguinus oedipus</i>)	bélsár
		sárgaszakállas maki (<i>Eulemur fulvus mayottensis</i>)	bélsár
		törpe lajhármaki (<i>Nycticebus pygmaeus</i>)	bélsár
		zászlósfarkú guereza (<i>Colubus guereza</i>)	bélsár
Xantus János Állatkert	Földes Katalin		
		apella csuklyásmajom (<i>Cebus apella</i>)	bélsár
		bóbitás gibbon (<i>Nomascus concolor</i>)	bélsár
		csuklyásmajom (<i>Cebus capucinus</i>)	bélsár
		galléros pávián (<i>Papio hamadryas</i>)	bélsár
		halálfejes mókusmajom/közönséges mókusmajom (<i>Saimiri sciureus</i>)	bélsár
		huszármajom (<i>Erythrocebus patas</i>)	bélsár
		közönséges csimpánz (<i>Pan troglodytes</i>)	bélsár

DNS kivonása széklet mintákból

A DNS kivonást az E.Z.N.A.[®] Stool DNA Kit (OMEGA bio-tek) gyártói ajánlása alapján végeztük.

PCR

A széklet minták DNS feltárását követően kétkörös (nested) és normál PCR-t használtunk. Az adenovírus IVa2, hexon és a DNS-polimeráz génjeinek egy-egy rövidebb szakaszát próbáltuk meg felerősíteni a megfelelő primerekkel. A polimeráz primereket Wellehan és munkatársai (WELLEHAN, et al., 2004) valamint az Ehlers laboratórium (WEVERS, et al., 2011), míg a hexon primereket Kiss és munkatársai (KISS, et al., 1996a) nyomán alkalmaztuk. A IVa2 gén degenerált primereit (Vidovszky Márton személyes közlése) a **2. táblázat** mutatja. A reagensek a GoTaq Flexi DNA Polymerase kitből származtak (Promega), a reakcióelegy összeállítását a **3. táblázat** mutatja.

2. táblázat. Az adenovírus IVa2 génjének felerősítésére használt primerek

Pozíció	Szekvencia	Termék mérete
külső forward	5'-CCNNSNCCNGARACNGTNTTYTT-3'	~400 bp
külső reverse	5'-GGRTTCATRTRTGNARNACNAC-3'	~400 bp
belső forward	5'-CCNCARRTNGAYATGATHCCNCC-3'	~250 bp
belső reverse	5'-TTNSWNGGRAANGCRTGRAARAAAYTT-3'	~250 bp

3. táblázat. A vizsgálat során alkalmazott reakcióelegy összetétele

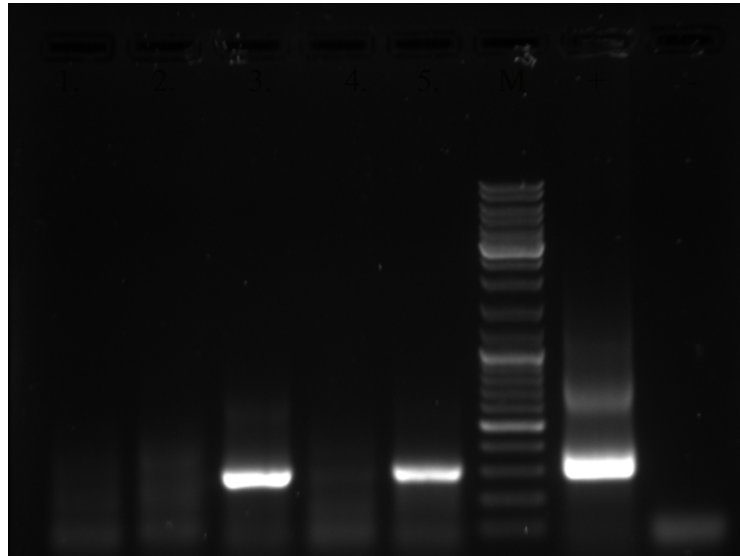
	Koncentráció	Bemérés (µl)	Végső koncentráció
Milli-Q	-	29,7	-
Go Taq puffer	5X	10	1X
MgCl ₂	25 mM	6	3 mM
dNTP	10 mM	1	0,2 mM
Primer1	50 pmol/µl	1	1 pmol/µl
Primer2	50 pmol/µl	1	1 pmol/µl
Enzim (Taq polimeráz)	5 U/µl	0,3	1,5 U
DNS	ismeretlen	1	ismeretlen
Összesen		50	

A reakciókat Biometra TPersonal PCR készülékben végeztük el. A PCR program leírását a **4. táblázat** tartalmazza.

4. táblázat. PCR reakció lépései

Lépés	Név	Hőmérséklet	Idő	Ismétlés
	Kezdeti			
1	denaturáció	94 °C	5 perc	-
2	Denaturáció	94 °C	30 s	} 45 X
3	Primer kötődés	46 °C	1 perc	
4	Elongáció	72 °C	1 perc	
5	Végső elongáció	72 °C	3 perc	-

A PCR végeztével a termék 5 µl-ét, 1%-os agaróz gélen elektroforetizáltuk 80 mV feszültségen 0,5 X TAE pufferben. A puffer összetevői: 2,42 g_l Tris; 1 ml 0,5 M EDTA (pH=8.0); 0,57 ml jéget desztillált vízzel 1000 ml-re kiegészítve. Molekulatömegmarkerként a Generuler DNA Ladder Mix (Fermentas) DNS létrát használtuk. Az eredményt UV fényel átvilágítva dokumentáltuk Electrophoresis Documentation and Analysis System (EDAS) 120 (Kodak) rendszerrel (**4. ábra**).



4. ábra. A IVa2 primer PCR termékei. +, pozitív kontroll (SAdV-24); -, negatív kontroll; M, molekulatömeg standard, 1-5, a minták számai. A második kör (nested) PCR termékét gélen futtatva a pozitívítást a megfelelő molekulatömegű (~300 bp) termékek jelzik két esetben (3-as és 5-ös minta).

PCR termék tisztítása

A PCR termék tisztításához a NucleoSpin® Gel and Clean-up (MACHEREY- NAGEL) kitet használtuk a gyártó ajánlása alapján, amennyiben a gélkép alapján csak specifikus terméket tartalmazott. Amennyiben aspecifikus termékek is voltak, ugyanezen készlet agaróz gélből kivonó protokollját használtuk. A tisztított DNS-t 1%-os agaróz gélen elektroforetizáltuk, így ellenőrizve a tisztítás sikerét. A gélkép alapján döntöttünk a szekvenáló reakció végtérfigatáról, mely 5 vagy 10 µl lehetett.

DNS szekvenálás

PCR csövekbe a BigDye® Terminator (Applied Biosystems) reagenseit mértük össze az alábbi táblázat (5. táblázat) szerint:

5. táblázat. Szekvenálás reagensei

	Koncentráció	Bemérés 1 (µl)	Bemérés 2 (µl)
MilliQ	-	0,5	2
Szekvenáló puffer	5 X	0,5	1
Primer	2 pmol/µl	2	2
DNS	ismeretlen	1	3
Reaction mix	5 X	1	2
Végtérfogat		5	10

A szekvenáló program 1 perces denaturációval kezdődött (96 °C), melyet 35 ciklus követett, melynek lépesei a következők: denaturáció 1 perc (96 °C), primer kötődés 10 mp (50 °C), elongáció 4 perc (60 °C). A reakció végeztével a DNS-t kicsaptuk az oldatból, mintánként 1,5 µl 3 mólos nátrium-acetát, 31 µl abszolút etanol (96%) és 7,5 µl MilliQ víz keverékével. A mixet a termékhez adtuk, majd óvatosan elegyítettük vortex használata nélkül, a DNS szálak eltöredezésének elkerülése miatt. Ezt követően 15 percig inkubáltuk sötétben, szobahőmérsékleten, amit 2000 g₂-n 45 percig tartó centrifugálás követett „SOFT” üzemmódban. A folyadék fázist alacsony fordulatszámú (10–80 g₂), 5–7 mp ideig tartó lepörgetéssel távolítottuk el. A precipitátumot 70 µl 70%-os etanollal „mostuk”, ezt 15 perc centrifugálás követte. A folyadékot az előbb ismertetett módszerrel eltávolítottuk a csövekből, az üledéket 10 percig szobahőmérsékleten szárítottuk, sötétben.

A szekvenálási reakciót követően a reakció terméket fénytől védő csomagolásban elküldtük a Szegedi Biológiai Központ DNS Szekvenáló Laboratóriumába kapilláris gélelektroforézisre (ABI 3500 Genetic Analyzer). Az eredményeket ABI formátumú fájlban, elektronikus levélben kaptuk meg.

Bioinformatikai kiértékelés

A kapott DNS szekvenciákat a BioEdit programmal jelenítettük meg, szükség szerint szerkesztettük őket, majd az átfedő szakaszokkal illesztést végeztünk (HALL, 1999). Ez utóbbi során a „forward” és „reverz” irányú szekvenciákat egymáshoz illesztettük. Az illesztést a primer szekvenciák eltávolításával és a génszekvenciák közötti eltérések ellenőrzésével végeztük.

A kapott nukleotid szekvenciákat a BLASTX homológia kereső program segítségével összehasonlítottuk a GenBank (NCBI) adatbázisával (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), és az általuk kódolt aminosav szekvenciát elmentettük. A szekvenciák többszörös illesztését a MultAlin programmal végeztük (<http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>; CORPET, 1988). Ezt követte a PHYLIP 3.67 programcsomag aminosav szekvencián alapuló filogenetikai távolság elemzése PROTDIST programmal ahol a szubsztitúciós modellként az alapbeállításként adott JTT-t használtuk (FELSENSTEIN, et al., 1989). A távolságmátrixból FITCH programmal (global rearrangement opcióval) filogenetikai fát rekonstruáltunk. Megbízhatósági, azaz bootstrap számításokhoz e két program előtt és után a SEQBOOT és CONSENSE programokat futtattuk (100 mintavétellel) (FELSENSTEIN, et al., 1985). A Maximum Likelihood és Bayesian számításokat (HUELSENBECK and RONQUIST, 2001; GUINDON and GASCUEL, 2003; RONQUIST and HUELSENBECK, 2003) a Topali v2.5 programcsomaggal végeztük el (MILNE, et al., 2009), mindkettőhöz először modell szelekciót végezve ugyanezen programcsomaggal. MrBayes általános beállításai a következők voltak: Number of runs: 2, Number of generations: 1 000 000, Sample frequency: 100, Burn in (%): 40. A PhyML általános beállítása: Bootstrap Runs: 100 (FELSENSTEIN, et al., 1985). A kiszámolt fát a TreeView (PAGE, 1996), FigTree v 1.3.1 (RAMBAUT, <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>), illetve Mega 5.1 program segítségével jelenítettük meg (TAMURA, et al., 2011), kulcsoportként az északi mókuscickány-adenovírust választva (BAHR, et al. 2003). A számítások során felhasználtuk az összes eddig publikált SAdV szekvenciát, HAdV szekvenciákból fajonként maximum 4 szerepel, ennél kevesebb akkor, ha nem állt több a rendelkezésünkre. A szekvenciák GenBank-i hozzáférési számai a következők: X73487.1, GU191019.1, AM749299.1, JF964962.1, NC_011203.1, AC_000018.1, AY163756.1, AY803294.1, AF534906.1, J01917.1, HC000816.1, HC000847.1, AB448767.1, EF121005.1, JN226752.1, AY875648.1, AY487947.1, AY530876.1, HB426607.1, JN254802.1, L19443.1, DQ315364.2, DQ923122.2, AY771780.1, DQ792570.1, AY598782.1, CQ982401.1, HQ241818.1, CQ982407.1, HQ605912.1, HQ241819.1, HQ241820.1, HQ913600.1. A kulcsoport, az északi mókuscickány (*Tupaia belangeri*) adenovírusának referencia száma: NC_004453.1. Liszt-majmocska (*Saguinus oedipus*) adenovírusából rendelkezésünkre áll a hexon gén egy részleges szekvenciája (hozzáférési szám: JN377907.1), azonban az adatbázisunkban szereplő génszakasszal túl rövid az átfedése, ezért ezt a szekvenciát kihagytuk a vizsgálatból. A gazdafajok és vírusaik koevolúciójának szemléltetésére a TreeMap programot használtuk (HUGHES, et al., 2007). A gazdafajok filogenetikai elemzésére a GenBank-ban rendelkezésre

álló teljes citokróm b szekvenciákat (379 aa) használtuk föl. Hozzáférési számaik: AEQ59326.1, AAS00126.1, AAM92734.1, ADM73210.1, BAA85293.1, ADM73217.1, CAA67640.1, BAH69181.1, ADT82644.1, AAG09463.1.

G+C arány számítás

A G+C dinukleotidok %-os arányának kiszámítását a Science Buddies Genomics %G~C Content Calculator-ral végeztük (http://www.sciencebuddies.org/science-fair-projects/project_ideas/Genom_GC_Calculator.shtml).

Eredmények

A gyűjtött és kapott minták mindegyikén (n=43) elvégeztem IVa2 génre tervezett primerekkel a nested PCR-t. Az intézet korábbi munkatársainak (Pantó Laura és Jánoska Máté) eredménye szerint leginkább a IVa2 gén primerei alkalmazhatóak majom-adenovírusok kimutatására, ezért polimeráz és hexon gén esetén elsősorban a IVa2 primerekkel pozitív eredményt adó mintákat vizsgáltam. Polimeráz génre az Ehlers-féle és a Wellehan-féle degenerált primerekkel végeztem nested PCR vizsgálatot (n=13). Hexon génre egykörös PCR-t alkalmaztunk (n=12). A PCR és a szekvenálás a vizsgált mintából IVa2 primerek esetén 10 esetben, hexon esetén 2 esetben adott pozitív eredményt, míg polimeráz esetén egyszer sem. A minta típusa egy kivételtől eltekintve bélsár volt (**6. táblázat**). A kapott szekvenciák mind a Mastadenovírus nemzetségbe tartozó vírust mutattak.

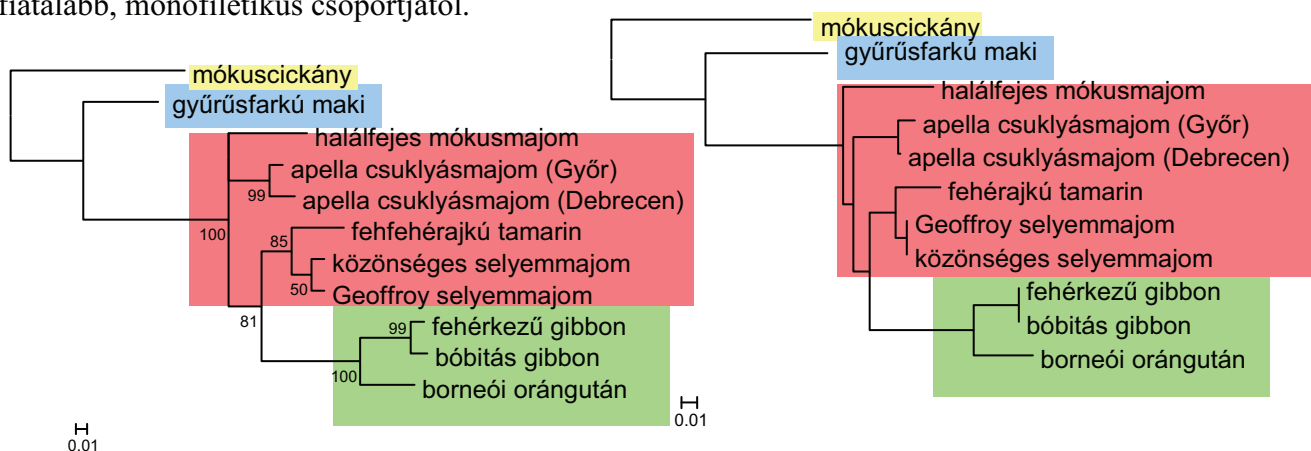
6. táblázat. PCR és a szekvenálás pozitív eredményei

Gyűjtés helye	Fajnév	minta típusa	IVa2	hexon
Debreceni Állat- és Növénykert				
	apella csuklyásmajom (<i>Cebus apella</i>)	bélsár	pozitív	negatív
	gyűrűsfarkú maki (<i>Lemur catta</i>)	bélsár	pozitív	negatív
Jászberényi Állat- és Növénykert				
	fehérkezű gibbon (<i>Hylobates lar</i>)	bélsár	pozitív	negatív
magángyűjtemény				
	közönséges selyemmajom (<i>Callithrix jacchus</i>)	máj és tüdő	pozitív	negatív
Nyíregyházi Állatpark				
	borneói orangután (<i>Pongo pygmaeus</i>)	bélsár	pozitív	negatív
	fehérajkú tamarin (<i>Saguinus labiatus</i>)	bélsár	pozitív	pozitív
	Geoffroy selyemmajom/fehérfejű selyemmajom (<i>Callithrix geoffroyi</i>)	bélsár	pozitív	pozitív
Xantus János Állatkert				
	apella csuklyásmajom (<i>Cebus apella</i>)	bélsár	pozitív	negatív
	bóbitás gibbon (<i>Nomascus concolor</i>)	bélsár	pozitív	negatív
	halálfejes mókusmajom/közönséges mókusmajom (<i>Saimiri sciureus</i>)	bélsár	pozitív	negatív

A pozitív minták nukleotid sorrendjét mindkét irányból meghatároztuk. A szekvenált termék hossza mindkét primer esetén ~270 nukleotid volt. A közönséges selyemmajom májából és tüdejéből származó szekvenciák mind aminosav, mind nukleotid szinten azonosak voltak.

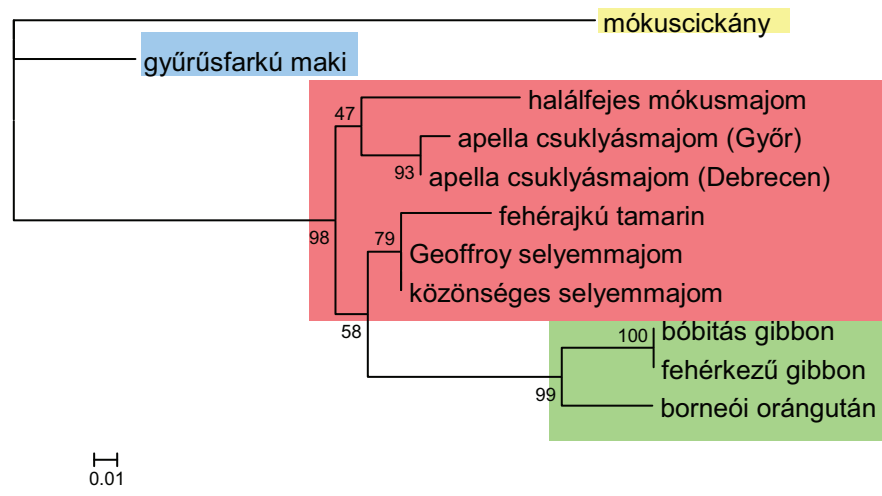
A szekvenciák illesztését követően a IVa2-gén 84 aminosav hosszúságú átfedő szakaszát használtuk a filogenetikai számításokhoz. Az ennek alapján készített törzsfá

rekonstrukció háromféle filogenetikai módszerrel számítva az **5. ábrán** látható. Mind három módszer hasonló eredményt adott. A félmajom AdV-a egy elkülönülő, ősből leszármazási ágat képvisel. Az újvilági majmok parafiletikusak, de elkülönülnek az óvilági majmok fiatalabb, monofiletikus csoportjától.



**MrBayes
(VT+G)**

**Protein Distance
(JTT)**

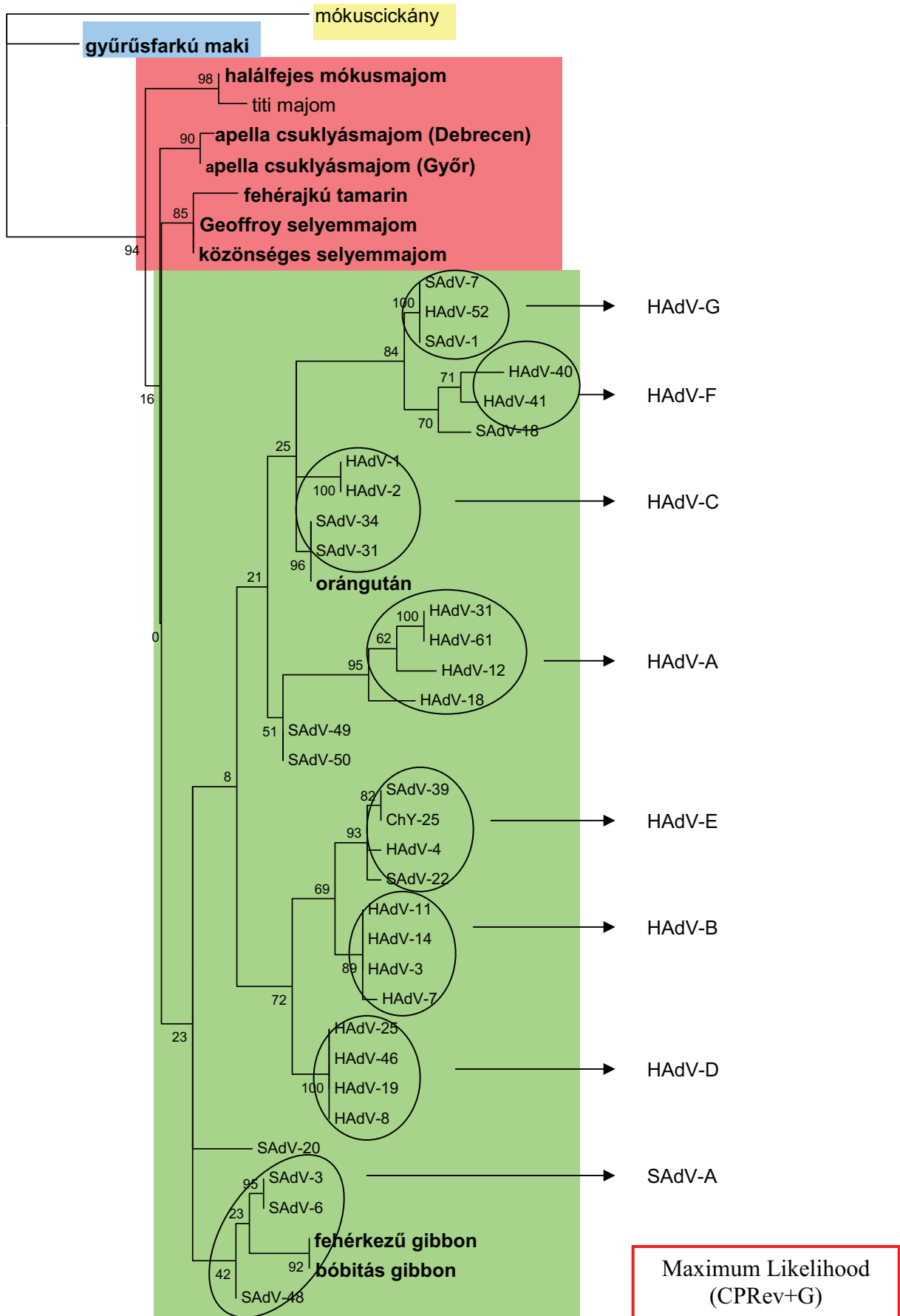


**Maximum Likelihood
(VT+G)**

5. ábra. A IVa2 gén 84 aminosavja alapján számolt törzsfák. Nem-irányított (non-rooted) számítások. Az ábrázolásnál külső csoportnak az északi mókuscickány (*Tupaia belangeri*) adenovírusát használtuk. A fa számítás módszerei és a számításnál használt modellek az adott fák alatt láthatóak piros keretbezárással. A rendszertani elkülönítést színekkel jelöltük. Sárga: külső csoport, kék: félmajom, piros: újvilági majmok, zöld: óvilági majmok.

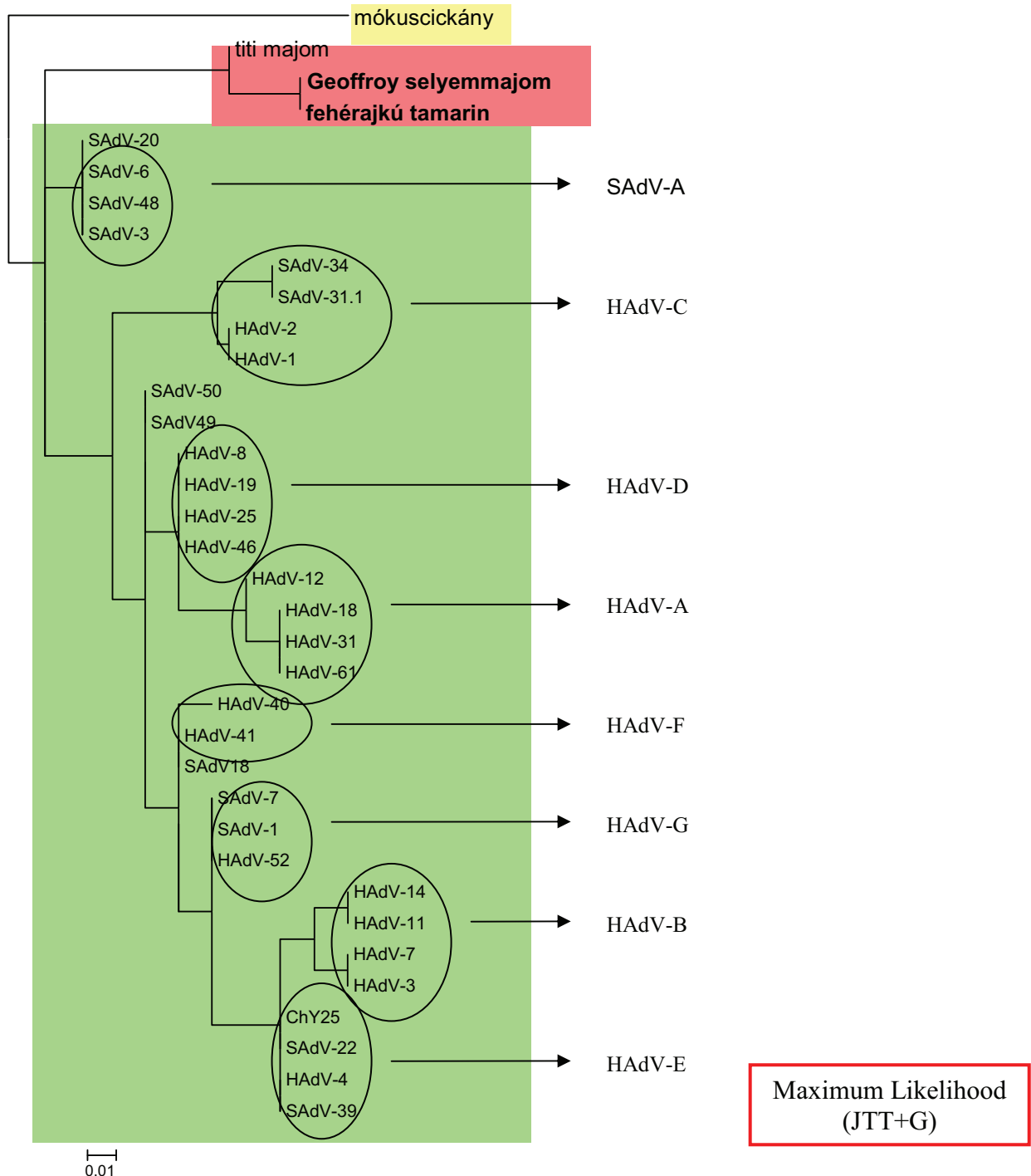
A GenBank-ban található IVa2 gén HAdV és SAdV szekvenciákkal kiegészített adatbázis alapján készített törzsfák a **6. ábrán** látható.

6. ábra. GenBank-i szekvenciákkal kiegészített IVa2 gén 84 aminosavja alapján végzett törzsfák rekonstrukció (következő oldal). A színezés megegyezik az 5. ábránál használttal. Körökkel jelöltük az ismert HAdV és SAdV fajokba tartozó típusokat, mellettük a nyílak végén a fajnevek láthatóak. Félkövér betűtípussal jelöltük az általunk nyert szekvenciákat. A törzsfák számítás módja és a modellszelekció eredménye piros keretben látható.



H
0.01

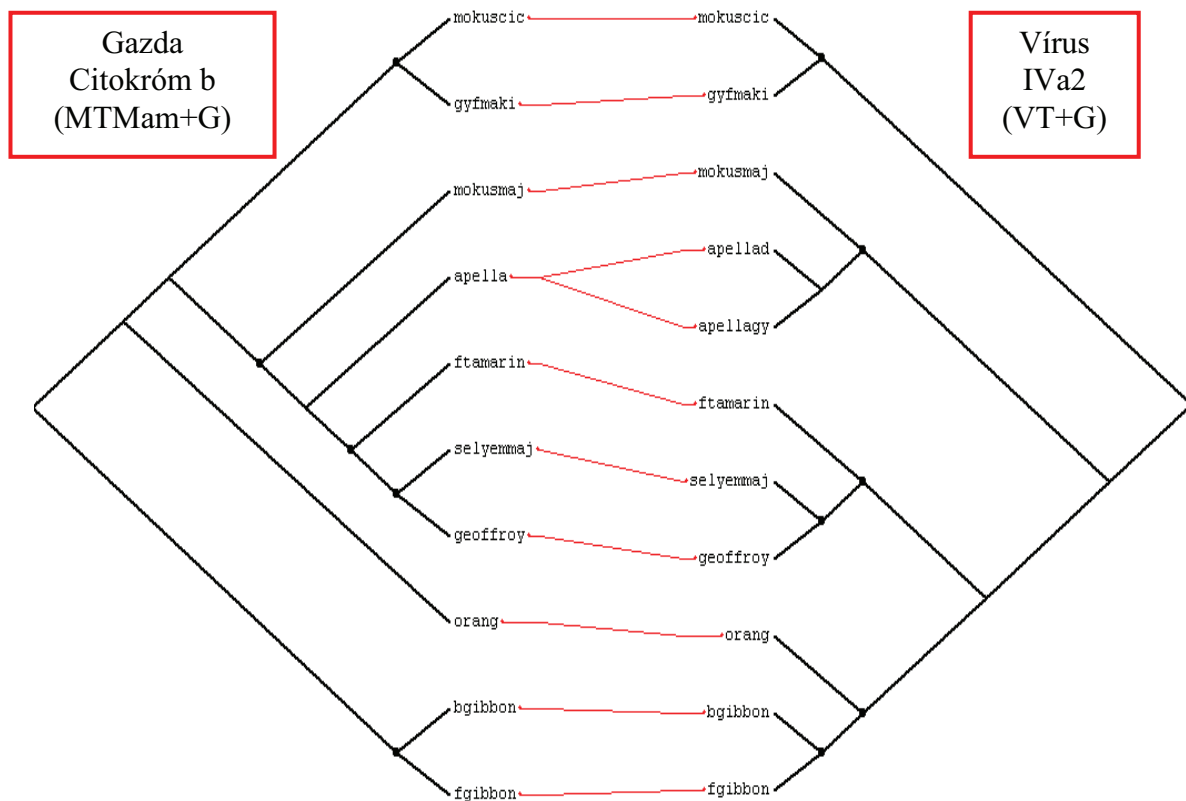
A törzsfá topológia vizsgálata során a gyűrűsfarkú maki egy határozottan elkülönülő, ősbibb leszármazási ágat képez ezen az ábrán is. Az újvilági majmok vírusai szintén elkülönülő leszármazási vonalat képviselnek, de itt is parafiletikusak. Azonban közös csoportot alkotnak az egyetlen ismert teljes genommal rendelkező újvilági majomból származó adenovírussal (titi majom/rezes kabócamajom). Az óvilági majmok adenovírusai monofiletikus ágat képeznek. A borneói orángután a HAdV-C-vel jelenik meg közös klaszteren. A két gibbon a SAdV-A-val mutat rokonságot.



7. ábra. Hexon gén alapján számolt törzsfá rekonstrukció. A színek és jelek azonosak az 5. és 6. ábrán láthatókkal. A modellszelektió eredményeként kapott szubsztitúciós modell típusa és a számítás során alkalmazott módszer piros keretben látható.

Az ismert és az általam talált hexon gén alapján készült törzsfá a **7. ábrán** látható. Itt is elkülönülő klasztert képeznek az újvilági majmok adenovírusai, melyek a SAdV-A-val mutatnak közelebbi rokonságot. Hexon gén félmajmokból származó szekvenciája még nem ismert. Az óvilági majmok adenovírusai parafiletikusak a SAdV-A típusai miatt.

A gazda fajok teljes citokróm b szekvenciája (379 aa) és az általam talált majom-adenovírusok IVa2 gén szekvenciája (84 aa) alapján a TreeMap nevű programmal koevolúció összehasonlítást végeztünk. Az eredmény a **8. ábrán** látható, mely alátámasztja a koevolúciós hipotézisünket, bár a két fa topológiája nem teljesen azonos. A gyűrűsfarkú maki ez alapján is elkülönülő, a külsoporthoz közelebb álló ágat képez. A gazda fajoknál az újvilági majmok monofiletikus csoportot alkotnak, vírusaik parafiletikusak. Az óvilági majmok mindkét esetben monofiletikusak.



8. ábra. Gazda fajok és adenovírusaik koevolúciója. Az ábra baloldalán látható a gazdafajok citokróm b szekvenciája alapján rekonstruált törzsfá, míg jobboldalán a IVa2 gén részleges szekvenciája alapján készült törzsfá. Mindkét esetben Maximum Likelihood módszert alkalmaztunk. A modell-selektáció eredményeként kapott és a számítás során alkalmazott szubsztitúciós modellek típusai a piros keretben zárójelben láthatóak. A program nem teszi lehetővé a 8 karakternél hosszabb fajneveket, így azok rövidítései láthatóak az ábrán, melyek a következők: apella: apella csuklyásmajom; apellad: apella csuklyásmajom (debreceni minta); apellagy: apella csuklyásmajom (győri minta); bgibbon: bóbitás gibbon; fgibbon: fehérkezű gibbon; ftamarin: fehérarkú tamarin; geoffroy: Geoffroy selyemmajom; gyfmaki: gyűrűsfarkú maki; mokusmaj: halálfejes/közönséges mókusmajom; orang: borneói orángután; selyemmaj: közönséges selyemmajom.

A vizsgált adenovírusok G+C dinukleotidainak %-os aránya a **7. táblázatban** látható. A vizsgált szekvenciák egyike sem mutat gazdaváltásra utaló jelet, magas a G+C dinukleotidok aránya (átlagosan 62.25 %) ezzel is alátámasztva a koevolúciót.

7. táblázat. G+C dinukleotidok %-os aránya

Fajnév	G+C %
közönséges selyemmajom (<i>Callithrix jacchus</i>)	65,9
Geoffroy selyemmajom (<i>Callithrix geoffroyi</i>)	65,1
apella csuklyásmajom (<i>Cebus apella</i>) Győr	64,7
apella csuklyásmajom (<i>Cebus apella</i>) Debrecen	64,4
fehérajkú tamarin (<i>Saguinus labiatus</i>)	64,2
gyűrűsfarkú maki (<i>Lemur catta</i>)	60,5
halálfejes/közönséges mókusmajom (<i>Saimiri sciureus</i>)	60,4
fehérkezű gibbon (<i>Hylobates lar</i>)	59,4
bóbitás gibbon (<i>Nomascus concolor</i>)	59,2
borneói orángután (<i>Pongo pygmaeus</i>)	58,7

Megbeszélés

Vizsgálatunk során IVa2 gén rész-szekvenciája alapján 10 simian adenovírus típust találtunk: a világon elsőként 1 félmajom-AdV-t, 1 orángután és 2 gibbon-AdV-t, továbbá 6 eddig ismeretlen újvilági majom-AdV-t. Az utóbbiakból kettőnek a részleges hexon génszekvenciáját is megismertük (6. táblázat).

Pantó Laura és Jánoska Máté korábbi kutatásának eredményét megerősítve a IVa2 gén bizonyult a legalkalmasabbnak majom-adenovírusok kimutatására. Az izolált AdV-ok egészséges állatokból származnak, továbbá egy kivételtől eltekintve (közönséges selyemmajom mája és tüdeje) bélsár mintából (n=9) mutattuk ki ezeket, így a mintagyűjtésnek ezt a módját alkalmasnak találtuk AdV jelenlét igazolására és eddig ismeretlen AdV-ok keresésére más kutatásokhoz hasonlóan (BÁNYAI, et al., 2010; WEVERS, et al., 2010; LU, et al., 2011; ROY, et al., 2012). A talált AdV-ok a Mastadenovirusok nemzetségbe tartoznak.

A mastadenovírusok megismert diverzitását tovább bővítettük, mellyel filogenetikájuk jobban tanulmányozhatóvá válik. Az AdV-ok minden gerinces osztályban előfordulnak, általában erősen gazda specifikus organizmusok. Ezért is feltételezzük, hogy minden fajnak létezik vele együtt fejlődött „saját” AdV-a. Izolálásuk nehézsége abban áll, hogy *in vitro* tenyésztésük akadályozott a megfelelő sejt kultúrák hiánya miatt (HULL and MINNER, 1957). Ez lehet a magyarázat az újvilági és félmajmokról rendelkezésünkre álló csekély információra, és ez növeli eredményünk jelentőségét. Óvilági majmok AdV-ait széleskörűen ismerjük, kivételt képeznek ez alól az orángutánok és gibbonok AdV-ai, melyekből AdV-t még nem írtak le. A mi eredményünk révén azonban ez utóbbi két csoport AdV-ainak megismeréséhez is közelebb kerültünk. Szövettenyészetten való szaporításuk helyett kimutatásuk és vizsgálatuk lehetséges módja az általunk is használt módszer, vagyis egy-egy génszakaszra specifikus primer pár kifejlesztése, majd a felerősítés PCR-rel. Hexon gén esetén egykörös PCR-t használtunk, mert ez működött, továbbá nem mindig van lehetőség nested (két körös) PCR-t tervezni a rendelkezésre álló homológ szakaszok szűkössége miatt. A másik két gén (IVa2 és polimeráz) esetén nested PCR-t alkalmaztunk. A polimeráz génszakasz felerősítésére szolgáló általános adenovírus PCR primer keverék primerjei annyira változékonyságra („lötyögősre”, „degeneráltra”) tervezettek, hogy a végső koncentrációban már csak nagyon kis százalékban fordul elő a valóban működő primer. Ez lehetett az oka, hogy esetünkben, amikor általában egészséges majmokat vizsgáltunk, a természetesen előforduló, de csak nagyon kis mennyiségben jelen levő adenovírusokat nem tudtuk ezzel felerősíteni.

Ritka eset az amikor AdV fertőzés gyanús állatokról kapunk hírt és azokból tudunk mintát gyűjteni. Gyakoribb eset az, amikor az ilyen egzotikus állatokból csak széklet mintát lehet beszerezni.

A gazdaváltás jele lehet, hogy az új gazdához nem alkalmazkodott AdV sokkal patogénebbé válik, mely révén különböző tünetek alapján észlelhetővé válik számunkra. Az esetek egy részében ilyenkor halálos megbetegedést is okozhatnak. Erre jó példa a 2009-es Kaliforniai Nemzeti Főemlős Kutató Központban kitört járvány, amely a 23 megbetegített titi majomból/rezes kabócamajomból (*Callicebus cupreus*) 19-et megölt az intenzív kezelések ellenére (CHEN, et al., 2011). Az egészséges állatok széklet mintájában feltételezhetően nagyon kis mennyiségű AdV DNS-t található. Nemcsak a beteg, de az egészséges állatok májából, tüdejéből is több esély lenne AdV kimutatására, de non-invazív eljárást kell alkalmaznunk az értékes állatkerti állatok esetében. Éppen ezért eddig is, a legtöbb SAdV-t fogságban tartott egyedek bélsár mintáiból izolálták, vagy mutatták ki (ROY, et al., 2004; WEVERS, et al., 2011).

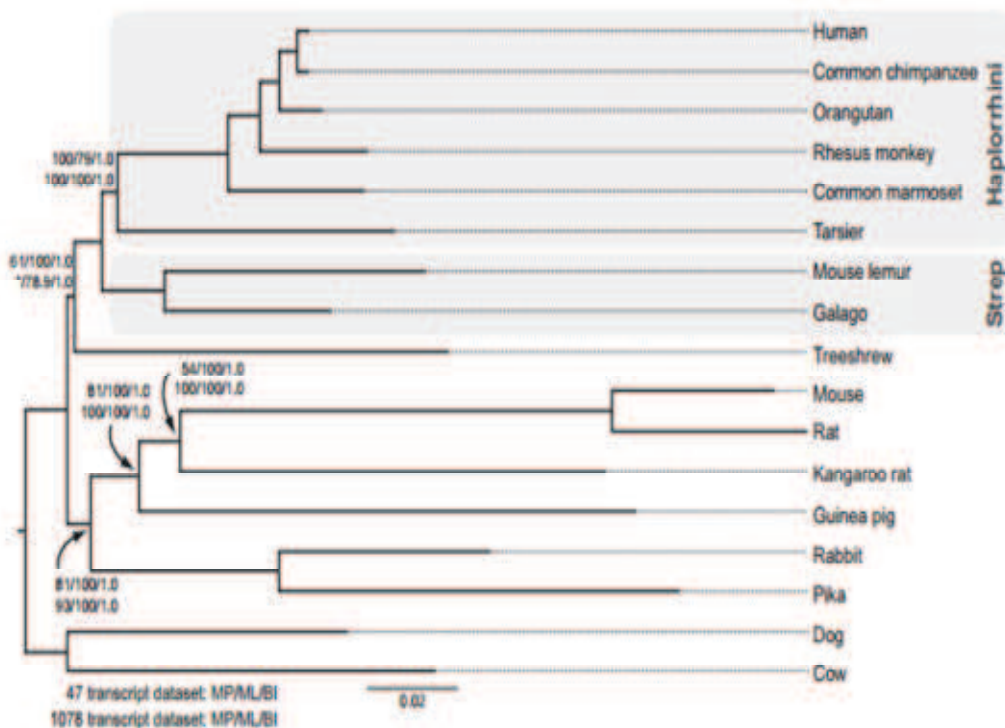
Felmerülhet az a kérdés, hogy vajon az állatkerti állatok AdV faunája jól reprezentálja-e a természetes környezetben élő gazdafajokét. Wevers és munkatársai kutatásukban hasonló kérdésre keresték a választ. Kutatásuk során a nyugati gorilla egy alfaját (*Gorilla gorilla gorilla*) vizsgálták a Loango Nemzeti Park területén Gabonban. Eredményük szerint az általuk korábban, a münsteri állatkertben tartott, hasmenéstől és légzőszervi megbetegedéstől szenvedő azonos fajú egyedekből azonosított *Gorilla gorilla* AdV-B7-et megtalálták szabadon élő fajtársában is (WEVERS, et al., 2010). Ebből következtethetünk arra, hogy kutatásunk releváns, nemcsak a fogságban tartott populációkra, de szabadon élő társaikra is.

Filogenetikai számításaink során aminosav szekvenciát használtunk nem pedig nukleotid szekvenciákat. Ennek magyarázata az, hogy az AdV genomiális DNS-ének nukleotid összetétele megváltozik annak függvényében, hogy átesett-e gazdaváltáson. Legszembetűnőbb példa erre az *Atadenovirus* nemzetség. Az ebbe a nemzetségbe tartozó elsőként azonosított vírusok (bovin és ovin AdV-ok) sajátos jellege a magas A+T dinukleotidok (~60%) aránya (KOVÁCS and BENKŐ, 2011). A nemzetségbe tartozó madár és erszéyes eredetű AdV-ok esetében is hasonló eredményt találtak. A hulló eredetű AdV-ok esetében azonban ennél alacsonyabb az arány, gyakorlatilag kiegyensúlyozott (FARKAS, et al., 2008). Feltételezhető, hogy a magas A+T tartalom a gazdaváltás jele, és az atadenovírusok valójában hulló eredetű vírusok (HARRACH, 2000). A magas A+T tartalom kompetitív előnyt jelent a vírus számára egy új környezetben, mivel a G+C tartalmat könnyebben azonosítja a szervezet. A kiegyensúlyozott G+C tartalom viszont a gazdához való hosszú

idejű alkalmazkodás, azaz a koevolúció jele (BENKŐ and HARRACH, 2003). Vizsgálatunkban így a gazdát váltó, de mégis azonos nemzetségbe tartozó vírusok nukleotid szintű elemzése ezeket a típusokat/fajokat valószínűleg külön kládokba helyezné. Alátámasztva ezt a gondolatot, Kovács és Benkő, a Siadenovírus nemzetségen belül nukleotid és aminosav szinten is végezett filogenetikai számításokat. Csak az utóbbi esetben került a vizsgálatban résztvevő mind a négy madár eredetű AdV azonos ágra. Nukleotid szintű vizsgálatnál azonban a psittacin AdV-2 a béka-AdV-1 és a Sulawesi teknős-AdV által alkotott kládba került (KOVÁCS and BENKŐ, 2011). További indok, hogy az aminosavak jobban megőrződtek, míg nukleotid szinten könnyebben végbe mehet változás. Az AdV-ok több mint 400 M éve együtt élnek gazda fajaikkal, ilyen távlatokban ezt a szempontot is érdemes figyelembe venni.

A filogenetikai elemzések során a csak a saját AdV szekvenciákat tartalmazó adatbázis esetében három féle módszerrel is elvégeztük a számításokat (Protein Distance, Maximum Likelihood és Bayesian) (5. ábra). A rövid és kevés szekvencia révén ezzel próbáltuk alátámasztani számításunk helyességét, hogy a különféle módszerek is hasonló eredményt adnak-e. A szakirodalomban a tapasztalat szerint a filogenetikai számítástól függően módosulhat a fák topológiája (OPAZO, et al., 2006). A mi esetünkben mind három számításnál nagyon hasonló topológiát kapunk. Egy kivétel van ez alól, a halálfejes mókusmajom és az apella csuklyásmajmok (debreceni és győri minta) filogenetikai viszonya nem egyértelmű. A kibővített adatbázis alapján, valamint a gazda és vírus fajok közötti koevolúció vizsgálatára készült számításokat (6, 7 és 8. ábra) egységesen a Maximum Likelihood módszerrel számítottuk a legjobban illeszkedő szubsztitúciós modellek alapján (GUINDON and GASCUEL, 2003).

A koevolúciót sikerült alátámasztani a gazda és vírus fajok között. Célunk a gazda fajok valódi vírusainak azonosítása volt, melyet mind a G+C %-ok (7. táblázat), mind a TreeMap program által készült ábra alátámaszt (8. ábra).



9. ábra. Főemlősök és emlősök Maximum Likelihood elemzés alapján kapott törzsfája (JAMESON, et al., 2011).

Jameson és munkatársainak eredménye alapján két nagy csoportot különíthetünk el főemlősökön belül: a Haplorrhini (koboldmaki-félék, újvilági, óvilági és emberszabású majmok) és Strepsirrhini (makialkatúak, lajhármakialkatúak) (9. ábra, JAMESON, et al., 2011). Ez tükrözi az általunk talált eredményeket (5, 6, 7. ábra). A makialkatúak közé tartozó gyűrűsfarkú maki (*Lemur catta*) AdV-a minden elemzésben egy ősi, különálló kládot képez, közelebbi rokonságban a mókuscickányhoz (angol nevén treeshrew). Az újvilági, és óvilági majmok egy közös nagy elágazási csoportot alkotnak, a Haplorrhini-t. Ezen belül ősi az újvilági majmok. Eredményeink is ezt tükrözik, az újvilági majmok AdV-ai ősi kládot alkotnak, bár parafiletikus. Meg kell jegyezni ugyanakkor, hogy a gazda fajaik filogenetikai viszonyai sem tisztázottak teljesen. Kutatásunkban az óvilági majmok AdV-ai alkották a legfiatalabb filogenetikai elágazást, IVa2 gén esetében monofiletikusak (5. és 6. ábra), hexon gén esetében parafiletikus (7. ábra). Érdekes megfigyelni, hogy a borneói orángután AdV-a a HAdV-C-be, a gibbonok AdV-a a SAdV-A-ba esik (6. ábra). A HAdV-D az ember, a HAdV-E a csimpánz, a HAdV-B a gorilla, a HAdV-A, HAdV-F, HAdV-G és SAdV-A egyéb óvilági majmok saját adenovírusa lehet (ROY, et al., 2004). Korábbi

feltételezéseink szerint a HAdV-C orángután eredetű AdV faj, melyet szekvenciánkkal sikerült megerősíteni.

Egy-egy gén rész-szekvenciája állt csupán rendelkezésünkre, mellyel felállítottuk koevolúcióra irányuló feltételezésünket, de a biztos filogenetikai kapcsolatrendszer több gén, illetve teljes genom analízisek után lehet csak megállapítani. Érdeemes lesz megvizsgálni a jövőben, hogy milyen további különbségeket találunk a majom-AdV genomokban. Hipotézisünk az, hogy az E3 régióban eltérést találunk az újvilági és főleg a félmajmok AdV-aiban összehasonlítva az óvilági majmok AdV-aival. Ez a régió genus, sőt általában faj specifikus, szerepe van az új gazdához való alkalmazkodásban. Az eddig egyetlen ismert teljes genommal rendelkező újvilági majom-AdV genomja (titi majom/rezes kabócamajom) szintén eltér az E3 transzkripciós egységben az óvilági majmok adenovírusainak hasonló szakaszától.

Hosszú távú céljaink között szerepel az általunk talált majom-AdV-ok vektorként való alkalmazása. A legtöbb ismert humán AdV ellen található ellenanyag a humán populációban, sőt már egyes óvilági majom AdV-ok ellen is (ERSCHING, et al., 2010). Újvilági és félmajmok AdV-a ellen még nem tudtak kimutatni neutralizáló ellenanyagot. Egy eset ismert, amikor újvilági majmok AdV-sal fertőztek meg egy kutatót (CHEN, et al, 2011), de az AdV nem volt képes hosszú távon fennmaradni emberben. Ezért mindenképpen érdemes ezen majmok AdV-ainak vektorként való felhasználásának megfontolása.

Összefoglalás

Egészséges majmoktól gyűjtöttük mintákat hazai állatkertek és vadasparkok területéről. A vizsgált 25 majom fajtól 9 állat széklet mintái és 1 állat szerv mintái voltak pozitívak adenovírus eredetű DNS jelenlétére. A PCR-rel felerősített genomtöredékek nukleotid sorrendjét meghatároztuk és filogenetikai analízist végeztünk azokkal. A kimutatott IVa2 és hexon gének alapján 10 új adenovírust azonosítottunk. Új adenovírust találtunk egy félmajomban: egy gyűrűsfarkú makiban (*Lemur catta*), 6 újvilági majomban: egy Geoffroy selyemmajomban (*Callithrix geoffroyi*), egy közönséges selyemmajomban (*Callithrix jacchus*, májból és tüdőből is), 2 apella csuklyásmajomban (*Cebus apella*), mely vírusok kis mértékben különböztek egymástól, egy fehérarjkú tamarinban (*Saguinus labiatus*), egy halálfejes/közönséges mókusmajomban (*Saimiri sciureus*) és három olyan óvilági majom fajban, melyekből eddig még nem írtak le adenovírust: egy fehérkezű gibbonban (*Hylobates lar*), egy bóbitás gibbonban (*Nomascus concolor*) és egy borneói orángutánban (*Pongo pygmaeus*). A kapott szekvenciák GC gazdagok, ami friss gazdaváltás hiányára utal. Bayesian, maximum likelihood és távolsági mátrix filogenetikai analízisek alapján a talált vírusok a *Mastadenovirus* nemzetségbe tartoznak. A talált mastadenovírusok filogenetikai viszonyai hasonlóak a gazdafajokéhoz, ami a koevolúciós hipotézist erősíti. A félmajmok adenovirusa nagyon határozottan elkülönül a többi simian adenovírustól. Az újvilági majmoktól származó AdV-ok szintén elkülönülnek parafiletikusan. Ezen kívül két típus (a fehérkezű gibboné és a bóbitás gibboné) hasonlóságot mutat a SAdV-A-val, míg egy típus (a borneói orángutáné) a HAdV-C-vel. Tehát a világon először mutattunk ki és jellemeztünk molekulárisan félmajom-adenovírust, és bővítettük a rendelkezésre álló ismereteket az újvilági és egyes, eddig nem tanulmányozott óvilágimajom-adenovírusok heterogenitására és filogenetikájára vonatkozóan.

Summary

Samples were collected from healthy monkeys from several zoos and wildlife parks in Hungary. Among the 25 simian species studied, fecal samples from 9 animals and organ samples from 1 animal were positive for the presence of adenoviral DNA. PCR amplicons were sequenced and subjected to phylogenetic analyses. According to IVa2 and hexon genes, we identified 10 novel AdVs. Novel adenoviruses were identified in one prosimian: a ring-tailed lemur (*Lemur catta*), in six New World monkeys: a Geoffroy's marmoset (*Callithrix geoffroyi*), a common marmoset (*Callithrix jacchus*, both liver and lung samples), two tufted capuchins (*Cebus apella*, the adenoviruses slightly differed from each other), a white-lipped tamarin (*Saguinus labiatus*) and a common squirrel monkey (*Saimiri sciureus*), and in three Old World monkey species from which no adenovirus was described yet: a lar gibbon (*Hylobates lar*), and in a black crested gibbon (*Nomascus concolor*), and a Bornean orangutan (*Pongo pygmaeus*). The obtained sequences were GC-rich, which may suggest a lack of recent host jumps. Bayesian, maximum likelihood and protein distance phylogenetic analyses indicated that these viruses are members of the genus *Mastadenovirus*. The phylogeny of the identified mastadenoviruses is similar to that of their hosts, supporting coevolution. Prosimian AdV shows a strong differentiation from other primates' AdVs. Platyrrhines' AdVs show differentiation in paraphyletic way. In addition, there were two types (lar gibbon and black crested gibbon) with more similarity to SAdV-A, and one type (Bornean orangutan) with more similarity to HAdV-C. Thus this work is the first to identify and molecularly characterize a prosimian adenovirus, and we broadened our knowledge on the heterogeneity and phylogeny of New World and some not studied Old World monkey adenoviruses.

Köszönetnyilvánítás

Köszönet illeti Dr. Harrach Balázst, témavezetőmet, akitől mindig választ kaptam felmerülő kérdéseimre, és aki biztosította a szakmai háttérrel a dolgozat elkészülése során. Szeretném megköszönni a segítséget Pantó Laurának, Vidovszky Mártonnak és Ballmann Mónikának, akik nagyon sok segítséget nyújtottak a csoportban eltöltött időm alatt. Köszönöm továbbá az intézet minden munkatársának türelmét, kedvességét és segítségét, mellyel hozzájárultak munkám elkészüléséhez.

Köszönettel tartozom továbbá Dr. Garamvölgyi Lászlónak, Tóth Tibornak, Dr. Sós Endrének, Dr. Molnár Zoltánnak, és Mészáros Gabriellának, amiért lehetőséget biztosítottak számomra a minták begyűjtésére.

A kutatást az OTKA K100163 pályázat anyagi támogatása tette lehetővé.

Irodalomjegyzék

1. BAHR, U., SCHÖNDORF, E., HANDERMANN, M., DARAI, G.: Characterization of the complete genome of the tupaia (tree shrew) adenovirus. *Journal of Virology*, 2003. 77. vol. 7. no. p. 4345-4356.
2. BÁNYAI, K., ESONA, M.D., LIU, A., WANG, Y., TU, X., JIANG, B.: Molecular detection of novel adenoviruses in fecal specimens of captive monkeys with diarrhea in China. *Veterinary Microbiology*, 2010. 142. vol. p. 416-419. BENKŐ M.: Adenoviridae. Pathogenesis. In: MAHY, B., VAN REGENMORTEL, M. (ed.): Encyclopedia of Virology, Third Edition. Elsevier, Oxford, 2008. 1. vol. p. 24-29.
3. BENKŐ M.: Adenoviridae. Pathogenesis. In: MAHY, B., VAN REGENMORTEL, M. (ed.): Encyclopedia of Virology, Third Edition. Elsevier, Oxford, 2008. 1. vol. p. 24-29.
4. BENKŐ M., HARRACH B.: Molecular evolution of adenoviruses. In: DOERFLER, W., BÖHM, P. (ed.): Adenoviruses: model and vectors in virus-host interactions. 2003. 272. vol. Springer-Verlag, Berlin, p. 3-35.
5. BERGET, S.M., MOORE, C., SHARP, P.A.: Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proceedings of the National Academy of Science U. S. A.*, 1977. 74. vol. 8. no. p. 3171-3175.
6. CHATTERJEE, H.J., HO, S.Y.W., BARNES, I., GROVES, C.: Estimating the phylogeny and divergence times of primates using a supermatrix approach. *BMC Evolutionary Biology*, 2009. 9. vol. 259. no. p. 1-19.
7. CHEN, E.C., YAGI, S., KELLY, K.R., MENDOZA, S.P., MANINGER, N., ROSENTHAL, A., SPINNER, A., BALES, K.L., SCHNURR, D.P., LERCHE, N.W., CHIU, C.Y.: Cross-species transmission of a novel adenovirus associated with a fulminant pneumonia outbreak in a New World monkey colony. *PLoS Pathogens*, 2011. 7. vol. 7. no. p. 1-16.
8. CHEN, S., XU, O., ZENG, M.: Oral vaccination with an adenovirus-vectored vaccine protects against botulism. *Vaccine*, 2013. 31. vol. 7. no. p. 1009-1011.
9. CHENG, P-H., RAO, X.-M., MCMASTERS, K.M., ZHOU, H.S.: Molecular basis for viral selective replication in cancer cells: activation of CDK2 by adenovirus-induced cyclin E. *PLOS ONE*, 2013. 8. vol. 2. no. e 57340.
10. CHRISTENSEN, J.B., BYRD, S.A., WALKER, A.K., STRAHLER, J.R., ANDREWS, P.C., IMPERIALE, M.J.: Presence of the adenovirus IVa2 protein at a

- single vertex of the mature virion. *Journal of Virology*, 2008. 82. vol. 18. no. p. 9086-9093.
11. COLLOCA, S., BARNES, E., FOLGORI, A., AMMENDOLA, V., CAPONE, S., CIRILLO, A., SIANI, L., NADDEO, M., GRAZIOLI, F., ESPOSITO, M.L., AMBROSIO, M., SPARACINO, A., BARTIROMO, M., MEOLA, A., SMITH, K., KURIOKA, A., O'HARA, G.A., EWER, K.J., ANAGNOSTOU, N., BLISS, C., HILL, A.V., TRABONI, C., KLENERMAN, P., CORTESE, R., NICOSIA, A.: Vaccine vectors derived from a large collection of simian adenoviruses induce potent cellular immunity across multiple species. *Science Translational Medicine*, 2012. 4. vol. p. 115ra2.
 12. CORPET, F.: Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research*, 1988. 16. vol. p. 10881-10890.
 13. DAVISON, A.J., BENKŐ M., HARRACH B.: Genetic content and evolution of adenoviruses. *Journal of General Virology*, 2003. 84. vol. p. 2895-2908.
 14. DE MOTES, C.M., HUNDESA, A., ALMEIDA, F.C., BOFILL-MAS, S., GIRONES, R.: Isolation of a novel monkey adenovirus reveals a new phylogenetic clade in the evolutionary history of simian adenoviruses. *Virology Journal*, 2011. 8. vol. 125. no. p. 1-8.
 15. DOSZPOLY A., WELLEHAN, J.F.X., CHILDRESS, A.L., TARJÁN Z.L., KOVÁCS E.R., HARRACH B., BENKŐ M.: Partial characterization of a new adenovirus lineage discovered in testudinoid turtles. *Infection, Genetics and Evolution*, [Epub ahead of print] 2013. Apr 6.
 16. ERSCHING, J., HERNANDEZ, M.I.M., CEZAROTTO, F.S., FERREIRA, J.D.S., MARTINS, A.B., SWITZER, W.M., XIANG, Z., ERTL, H.C.J., ZANETTI, C.R., PINTO, A.R.: Neutralizing antibodies to human and simian adenoviruses in humans and New-World monkeys. *Virology*, 2010. 407. vol. 1. no. p.1-6.
 17. FARINA, S.F., GAO, G.P., XIANG, Z.Q., RUX, J.J., BURNETT, R.M., ALVIRA, M.R., MARSH, J., ERTL, H.C., WILSON, J.M.: Replication-defective vector based on a chimpanzee adenovirus. *Journal of Virology*, 2001. 75. vol. p. 11603-11613.
 18. FARKAS, S.L., HARRACH B., BENKŐ M.: Completion of the genome analysis of snake adenovirus type 1, a representative of the reptilian lineage within the novel genus Atadenovirus. *Virus Research*, 2008. 132. vol. p. 132-139.
 19. FELSENSTEIN, J.: Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 1985. 39. vol. p. 783-791.

20. FELSENSTEIN, J.: PHYLIP-Phylogeny inference package (version3.2). *Cladistics*, 1989. 5. vol. p. 164-166.
21. FLÜGGE, P., ZIMMERMANN, E., HUGHES, A.L., GÜNTHER, E., WALTER, L.: Characterization and phylogenetic relationship of prosimian MHC class I genes. *Journal of Molecular Evolution*, 2002. 55. vol. p. 768-775.
22. GÁL J., HORNYÁK Á., DEMETER Z., BAKONYI T., BALKÁ G., SZEREDI L., MAROSÁN M., LUDÁNYI T. RUSVAI M.: Novel mastadenovirus infection and clinical disease in a pygmy marmoset (*Callithrix [Cebuella] pygmaea*). GenBank, elérési szám: HM245776.
23. GUINDON, S., GASCUEL, O.: A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*. 2003. 52. vol. p. 696-704.
24. HALL, T.A.: BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 1999. 41. vol. p. 95-98.
25. HALL, N.H., ARCHER, L.L., CHILDRESS, A.L., WELLEHAN, J.F. JR.: Identification of a novel adenovirus in a cotton-top tamarin (*Saguinus oedipus*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2012. 24. vol. 2. no. p. 359-363.
26. HARRACH B.: Reptile adenoviruses in cattle? *Acta Veterinaria Hungarica*, 2000. 48. vol. 4. no. p. 485-490.
27. HARRACH B.: Adenoviruses: General features. In: MAHY, B.W.J., VAN REGENMORTEL, M.H.V. (ed.): *Encyclopedia of Virology*, 5. vol. Third Edition. Oxford: Elsevier, 2008. 1. vol. p. 1-9.
28. HARRACH B., BENKŐ M., BOTH, G.W., BROWN, M., DAVISON, A.J., ECHAVARRÍA, M., HESS, M., JONES M.S., KAJON, A., LEHMKUHL, H.D., MAUTNER, V., MITTAL, S.K., WADELL, G.: Family *Adenoviridae*. In: KING, A.M.Q., ADAMS, M.J., CARSTENS, E.B., LEFKOWITZ, E.J. (ed.): *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. 2011. Elsevier, San Diego p. 125-141.
29. HUELSENBECK, J.P., RONQUIST, F.: MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics*, 2001. 17. vol. p. 754-755.

30. HUGHES, J., KENNEDY, M., JOHNSON, K.P., PALMA, R.L., PAGE, R.D.: Multiple cophylogenetic analyses reveal frequent cospeciation between peleciform birds and Pectinopygus lice. *Systematic Biology*, 2007. 56. vol. p. 232-251.
31. HULL, R.N., MINNER, J.R.: New viral agents recovered from tissue cultures of monkey kidney cells. II. Problems of isolation and identification. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1957. 67. vol. p. 413-423.
32. HULL, R.N., MINNER, J.E., SMITH, J.W.: New viral agents recovered from tissue cultures of monkey kidney cells. *American Journal of Epidemiology*, 1956. 63. vol. p. 204-215.
33. JAMESON, N.M., HOU, Z.C., STERNER, K.N., WECKLE, A., GOODMAN, M., STEIPER, M.E., WILDMAN, D.E.: Genomic data reject the hypothesis of a prosimian primate clade. *Journal of Human Evolution*, 2011. 61. vol. 3. no. p. 295-305.
34. JONES, M.S., HARRACH B., GANAC, R.D., GOZUM, M.M., DELA CRUZ, W.P., RIEDEL, B., PAN, C., DELWART, E.L., SCHNURR, D.P.: New adenovirus species found in a patient presenting with gastroenteritis. *Journal of Virology*, 2007. 81. vol. p. 5978-5984.
35. KIM, C.S., SUELTFUSS, E.A., KALTER, S.S.: Isolation and characterization of simian adenoviruses isolated in association with an outbreak of pneumoenteritis in vervet monkeys (*Cercopithecus aethiops*). *The Journal of Infectious Diseases*, 1967. 117. vol. 4. no. p. 292-300.
36. KIM, J.W., GLASGOW, J.N., NAKAYAMA, M., AK, F., UGAI, H., CURIEL, D.T.: An adenovirus vector incorporating carbohydrate binding domains utilizes glycans for gene transfer. *PLOS ONE*, 2013. 8. vol. 2. no. e55533.
37. KISS I., MATIZ K., ALLARD, A., WADELL, G., BENKŐ M.: Detection of homologous DNA sequences in animal adenoviruses by polymerase chain reaction. *Acta Veterinaria Hungarica*, 1996a. 44. vol. 2. no. p. 243-251.
38. KISS I., MATIZ K., BAJMÓCI E., RUSVAI M., HARRACH B.: Infectious canine hepatitis: detection of canine adenovirus type 1 by polymerase chain reaction. *Acta Veterinaria Hungarica*, 1996b. 44. vol. 2. no. p. 253-258.
39. KOVÁCS G.M., DAVISON, A.J., ZAKHARTCHOUK, A.N., HARRACH B.: Analysis of the first complete genome sequence of an Old World monkey adenovirus reveals a lineage distinct from the six human adenovirus species. *Journal of General Virology*, 2004. 85. vol. p. 2799-2807.

40. KOVÁCS G.M., HARRACH B., ZAKHARTCHOUK, A.N., DAVISON, A.J.: Complete genome sequence of simian adenovirus 1: an Old World monkey adenovirus with two fiber genes. *Journal of General Virology*, 2005. vol. 86. p. 1681-1686.
41. KOVÁCS R.E., BENKŐ M.: Complete sequence of raptor adenovirus 1 confirms the characteristic genome organization of siadenoviruses. *Infection, Genetics and Evolution*, 2011. vol. 11. p. 1058-1065.
42. LU, J., WANG, Q., WANG, H., LI, G., GAO, G.: Molecular characterization of adenoviruses in fecal samples of captive bred rhesus macaques in China. *Veterinary Microbiology*, 2011. 149. vol. 3-4. no. p. 461-466.
43. MATSUSHIMA, Y., SHIMIZU, H., KANO, A., NAKAJIMA, E., ISHIMARU, Y., DEY, S.K., WATANABE, Y., ADACHI, F., MITANI, K., FUJIMOTO, T., PHAN, T.G., USHIJIMA, H.: Genome sequence of a novel virus of the species human adenovirus D associated with acute gastroenteritis. *Genome Announcements*, 2013. 1. vol. 1. no. p. 1-2.
44. MILNE, I., LINDNER, D., BAYER, M., HUSMEIER, D., MCGUIRE, G., MARSHALL, D., WRIGHT, F.: TOPALi v2: a rich graphical interface for evolutionary analyses of multiple alignments on HPC clusters and multi-core desktops. *Bioinformatics*, 2009. 25. vol. p. 126-127.
45. O'HARA, G.A., DUNCAN, C.J.A., EWER, K.J., COLLINS, K.A., ELIAS, S.C., HALSTEAD, F.D., GOODMAN, A.L., EDWARDS, N.J., REYES-SANDOVAL, A., BIRD, P., ROWLAND, R., SHEEHY, S.H., POULTON, I.D., HUTCHINGS, C., TODRYK, S., ANDREWS, L., FOLGORI, A., BERRIE, E., MOYLE, S., NICOSIA, A., COLLOCA, S., CORTESE, R., SIANI, L., LAWRIE, A.M., GILBERT, S.C., HILL, A.V.S.: Clinical assessment of a recombinant simian adenovirus ChAd63: A potent new vaccine vector. *The Journal of Infectious Diseases*, 2012. 205. vol. p. 772-781.
46. OPAZO, J.C., WILDMAN, D.E., PRYCHITKO, T., JOHNSON, R.M., GOODMAN, M.: Phylogenetic relationships and divergence times among New World monkeys (Platyrrhini, Primates). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2006. 40. vol. p. 274-280.
47. PAGE, D.M.R.: TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, 1996. 12. vol.p. 357-358.
48. PAPP T., FLEDELIUS, B., SCHMIDT, V., KAJÁN G.L., MARSCHANG, R.E. PCR-sequence characterization of new adenoviruses found in reptiles and the first

- successful isolation of a lizard adenovirus. *Veterinary Microbiology*, 2009. 134.vol. p. 233-240.
49. PEREZ, S.I., KLACZKO, J., DOS REIS, S.F.: Species tree estimation for a deep phylogenetic divergence in the New World monkeys (Primates: Platyrrhini). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2012. 65. vol. 2. no. p. 621-630.
50. PURKAYASTHA, A., DITTY, S.E., SU, J., MCGRAW, J., HADFIELD, T.L., TIBBETTS, C., SETO, D.: Genomic and bioinformatics analysis of HAdV-4, a human adenovirus causing acute respiratory disease: implications for gene therapy and vaccine vector development. *Journal of Virology*, 2005. 79. vol.4. no. p. 2559-2572.
51. RAPOZA, N.P.: A Classification of simian adenoviruses based on hemagglutination. *American Journal of Epidemiology*, 1967. 86. vol. 3. no. p. 736-745.
52. RONQUIST, F., HUELSENBECK, J.: MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 2003. 19. vol. p. 1572-1574
53. ROY, S., GAO, G., CLAWSON, D.S., VANDENBERGHE, L.H., FARINA, S.F., WILSON, J.M.: Complete nucleotide sequences and genome organization of four chimpanzee adenoviruses. *Virology*, 2004. 324. vol. p. 361-372.
54. ROY, S., SANDHU, A., MEDINA, A., CLAWSON, D.S., WILSON, J.M.: Adenoviruses in fecal samples from asymptomatic rhesus macaques, United States. *Emerging Infectious Diseases*, 2012. 18. vol. 7. no. p. 1081-1088.
55. ROY, S., VANDENBERGHE, L.H., KRYAZHIMSKIY, S., GRANT, R., CALCEDO, R., YUAN, X., KEOUGH, M., SANDHU, A., WANG, Q., MEDINA-JASZEK, C.A., PLOTKIN, J.B., WILSON, J.M.: Isolation and characterization of adenoviruses persistently shed from the gastrointestinal tract of non-human primates. *PLoS Pathogens*, 2009. 5. vol. 7. no. e 1000503.
56. RUSSELL, W.C.: Update on adenovirus and its vectors. *Journal of General Virology*, 2000. 81. vol. p. 2573-2604.
57. SHARMA, A., KRAUSE, A., XU, Y., SUNG, B., WU, W., WORGALL, S.: Adenovirus-based vaccine with epitopes incorporated in novel fiber sites to induce protective immunity against *Pseudomonas aeruginosa*. *PLOS ONE*, 2013. 8. vol. 2. no. e 56996.
58. TAMURA, K., PETERSON, D., PETERSON, N., STECHER, G., NEI, M., KUMAR, S.: MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 2011. 28, vol. p. 2731-2739.

59. TUBOLY T., NAGY É.: Construction and characterization of recombinant porcine adenovirus serotype 5 expressing the transmissible gastroenteritis virus spike gene. *Journal of General Virology*, 2001. 82. vol. p. 183-190.
60. VASILEVA, V.A., IVANOV, M.T., RUMEL, N.B., YACHENKO, A.G.D., KAKUBAVA, V.V., DANELYAN, G.A.: Isolation and biological characterization of an adenovirus of rhesus macaques. *Acta Biologica et Medica Germanica*, 1978. 37. vol. 8. no. p. 1281-1287.
61. VIDOVSZKY M.Z., BOLDOGH S.: Adenovírusok kimutatása az észak-magyarországi denevérfaunában. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 2011. 133. vol. 12. no. p. 747-753.
62. WALSH, M.P., CHINTAKUNTLAWAR, A., ROBINSON, C.M., MADISCH, I., HARRACH B., HUDSON, N.R., SCHNURR, D., HEIM, A., CHODOSH, J., SETO, D., JONES, M.S.: Evidence of molecular evolution driven by recombination events influencing tropism in a novel human adenovirus that causes epidemic keratoconjunctivitis. *PloS ONE*, 2009. 4. vol. e5635.
63. WELLEHAN, J.F.X., JOHNSON, A.J., HARRACH B., BENKŐ M., PESSIER, A.P., JOHNSON, C.M., GARNER, M.M., CHILDRESS, A., JACOBSON, E.R.: Detection and analysis of six lizard adenoviruses by consensus primer PCR provides further evidence of a reptilian origin for the atadenoviruses. *Journal of Virology*, 2004. 78. vol. p. 13366-13369.
64. WEVERS, D., METZGER, S., BABWETEERA, F., BIEBERBACH, M., BOESCH, C., CAMERON, K., COUACY-HYMAN, E., CRANFIELD, M., GRAY, M., HARRIS, L.A., HEAD, J., JEFFERY, K., KNAUF, S., LANKESTER, F., LEENDERTZ, S.A.J., LONSDORF, E., MUGISHA, L., NITSCHKE, A., REED, P., ROBBINS, M., TRAVIS, D.A., ZOMMERS, Z., LEENDERTZ, F.H., EHLERS, B.: Novel adenoviruses in wild primates: high genetic diversity 1 and evidence of zoonotic transmissions. *Journal of Virology*, 2011. p. 1-22.
65. WOLD, W.M., CHINNADURAI, G.: Adenovirus proteins that regulate apoptosis, In: CANN, A.J. (ed.): DNA Virus Replication. Oxford, Oxford University Press, 2000. p. 200-232.
66. XIANG, Z., LI, Y., CUN, A., YANG, W., ELLENBERG, S., SWITZER, W.M., KALISH, M.L., ERTL, H.C.J.: Chimpanzee adenovirus antibodies in humans, sub-Saharan Africa. 2006. 12. vol. 10. no. p. 1596-1599.

67. ZHANG, W., IMPERIALE, M.J.: Interaction of the adenovirus IVa2 protein with viral packaging sequences. *Journal of Virology*, 2000. 74. vol. 6. no. p. 2687-2693.

HuVetA - SZIA

ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT*

Név: Földes Katalin.....

Elérhetőség (e-mail cím): fldeskatalin@gmail.com.....

A feltöltendő mű címe: Majom-adenovírusok molekuláris szintű összehasonlító vizsgálata

A mű megjelenési adatai: Budapest, 2013. 44 oldal.....

Az átadott fájlok száma: 1.....

Jelen megállapodás elfogadásával a szerző, illetve a szerzői jogok tulajdonosa nem kizárólagos jogot biztosít a HuVetA és a SZIA számára, hogy archiválja (a tartalom megváltoztatása nélkül, a megőrzés és a hozzáférhetőség biztosításának érdekében) és másolásvédelemmel PDF formára konvertálja és szolgáltatassa a fenti dokumentumot (beleértve annak kivonatát is).

Beleegyeznek, hogy a HuVetA és a SZIA egynél több (csak a HuVetA és a SZIA adminisztrátorai számára hozzáférhető) másolatot tároljon az Ön által átadott dokumentumból kizárólag biztonsági, visszaállítási és megőrzési célból.

Kijelenti, hogy az átadott dokumentum az Ön műve, és/vagy jogosult biztosítani a megállapodásban foglalt rendelkezéseket arra vonatkozóan. Kijelenti továbbá, hogy a mű eredeti és legjobb tudomása szerint nem sérti vele senki más szerzői jogát. Amennyiben a mű tartalmaz olyan anyagot, melyre nézve nem Ön birtokolja a szerzői jogokat, fel kell tüntetnie, hogy korlátlan engedélyt kapott a szerzői jog tulajdonosától arra, hogy engedélyezhesse a jelen megállapodásban szereplő jogokat, és a harmadik személy által birtokolt anyagrészt mellett egyértelműen fel van tüntetve az eredeti szerző neve a művön belül.

A szerzői jogok tulajdonosa a hozzáférés körét az alábbiakban határozza meg **(egyetlen, a megfelelő négyzetben elhelyezett x jellel)**:

- engedélyezi, hogy a HuVetA-ban/SZIA-ban tárolt művek korlátlanul hozzáférhetővé váljanak világhálón,
- a Szent István Egyetem belső hálózatára (IP címeire) korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- a SZIE Állatorvos-tudományi Könyvtárban található, dedikált elérést biztosító csak a dokumentum bibliográfiai adatainak és tartalmi kivonatának feltöltéséhez járul hozzá (korlátlan hozzáféréssel),
- nem engedélyezi a feltöltött dokumentum(ok) elérését és a dokumentum bibliográfiai adatainak nyilvánossá tételét a HuVetA-ban/SZIA-ban.*

Kérjük, **nyilatkozzon a négyzetben elhelyezett jellel a helyben használatról is:**

Engedélyezem a dokumentum(ok) nyomtatott változatának helyben olvasását a könyvtárban.

* Jelen nyilatkozat az 5/2011. számú, a Szent István Egyetemen folytatott tudományos publikációs tevékenységgel kapcsolatos adatbázis kialakításáról és alkalmazásáról című rektori utasításhoz kapcsolódik, illetve annak alapján készült.

Amennyiben a feltöltés alapját olyan mű képezi, melyet valamely cég vagy szervezet támogatott illetve szponzorált, kijelenti, hogy jogosult egyetérteni jelen megállapodással a műre vonatkozóan.

A HuVetA/SZIA üzemeltetői a szerző, illetve a jogokat gyakorló személyek és szervezetek irányában nem vállalnak semmilyen felelősséget annak jogi orvoslására, ha valamely felhasználó a HuVetA-ban/SZIA-ban engedéllyel elhelyezett anyaggal törvénytörtő módon visszaélne.

Budapest, 2013. év 04. hó 29. nap

aláírás
szerző/a szerzői jog tulajdonosa

A HuVetA Magyar Állatorvos-tudományi Archívum – Hungarian Veterinary Archive a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Könyvtár, Levéltár és Múzeum által működtetett szakterületi online adattár, melynek célja, hogy a magyar állatorvos-tudomány és -történet dokumentumait, tudásvagyonát elektronikus formában összegyűjtse, rendszerezze, megőrizze, kereshetővé és hozzáférhetővé tegye, szolgáltassa, a hatályos jogi szabályozások figyelembe vételével.

A HuVetA a korszerű informatikai lehetőségek felhasználásával biztosítja a könnyű, (internetes keresőgépekkel is működő) kereshetőséget és lehetőség szerint a teljes szöveg azonnali elérését. Célja ezek révén

- *a magyar állatorvos-tudomány hazai és nemzetközi ismertségének növelése;*
- *a magyar állatorvosok publikációira történő hivatkozások számának, és ezen keresztül a hazai állatorvosi folyóiratok impakt faktorának növelése;*
- *az Állatorvos-tudományi Kar és az együttműködő partnerek tudásvagyonának koncentrált megjelenítése révén az intézmények és a hazai állatorvos-tudomány tekintélyének és versenyképességének növelése;*
- *a szakmai kapcsolatok és együttműködés elősegítése,*
- *a nyílt hozzáférés támogatása.*

A SZIA Szent István Archívum a Szent István Egyetemen keletkezett tudományos dolgozatok tára.