



**Kigyó-adeno- és parvovírus teljes genomjának szekvenciája és
analízise, mindkét víruscsoportban az első molekuláris elemzések
hüllő-eredetű izolátummal**

PhD értekezés

Készítette:

dr. Farkas Szilvia

2005

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Témavezető és témabizottsági tagok:

.....
Dr. Benkő Mária
MTA Állatorvos-tudományi Kutatóintézete

Dr. Harrach Balázs
MTA Állatorvos-tudományi Kutatóintézete

Dr. Lomniczi Béla
MTA Állatorvos-tudományi Kutatóintézete

Készült 8 példányban. Ez a 8. sz. példány.

.....
dr. Farkas Szilvia

Tartalomjegyzék

Rövidítések.....	5
Összefoglalás	6
Bevezetés	8
ELŐZMÉNYEK	8
IRODALMI ÁTTEKINTÉS	9
<i>Adenovírusok előfordulása hüllőkben.....</i>	<i>11</i>
<i>Parvovírusok előfordulása hüllőkben.....</i>	<i>13</i>
AZ ADENOVÍRUSOK JELLEMZÉSE.....	14
<i>Az adenovírusok rendszerezése</i>	<i>14</i>
<i>Az adenovírusok morfológiája és replikációja</i>	<i>14</i>
<i>Az adenovírusok genomszerveződése.....</i>	<i>16</i>
A PARVOVÍRUSOK JELLEMZÉSE.....	21
<i>A parvovírusok rendszerezése</i>	<i>21</i>
<i>A parvovírusok morfológiája és replikációja.....</i>	<i>21</i>
<i>A parvovírusok genomszerveződése.....</i>	<i>22</i>
Anyag és módszer.....	25
A VÍRUS-DNS TISZTÍTÁSA.....	25
MOLEKULÁRIS KLÓNOZÁS.....	25
<i>Restrikciós emésztések</i>	<i>26</i>
<i>Gélelektroforézis</i>	<i>26</i>
<i>DNS fragmentumok izolálása gélből.....</i>	<i>26</i>
<i>Ligálás</i>	<i>27</i>
<i>Baktériumok transzformálása.....</i>	<i>27</i>
<i>A klónok tesztelése.....</i>	<i>28</i>
<i>Szubklónozás.....</i>	<i>28</i>
<i>A végfragmentumok klónozása</i>	<i>29</i>
A KÍGYÓ-PARVOVÍRUS KLÓNOZÁSI STRATÉGIÁJA ÉS SZEKVENÁLÁSA.....	29
PCR VIZSGÁLATOK	32
DNS SZEKVENÁLÁS	33
SZEKVENCIA ELEMZÉS	33
FILOGENETIKAI SZÁMÍTÁSOK.....	33
Eredmények.....	35
A KÍGYÓ-ADENOVÍRUS.....	35

<i>A kígyó-adenovírus feltételezett genomszerveződése és általános tulajdonságai</i>	35
<i>Filogenetikai számítások</i>	37
A KÍGYÓ-PARVOVÍRUS.....	39
<i>A kígyó-parvovírus feltételezett genomszerveződése és általános tulajdonságai</i>	39
<i>Filogenetikai számítások</i>	42
Megbeszélés.....	43
A GABONASIKLÓBÓL IZOLÁLT KÍGYÓ-ADENOVÍRUS GENOMSZERVEZŐDÉSE.....	43
<i>A kígyó-adenovírus ITR szekvenciái</i>	44
<i>Az E1 régió</i>	45
<i>Az E2 régió</i>	47
<i>Késői gének</i>	49
<i>Az U exon</i>	55
<i>Az E4 régió</i>	55
A KIRÁLYPITONBÓL IZOLÁLT KÍGYÓ-PARVOVÍRUS GENOMSZERVEZŐDÉSE.....	58
KÖVETKEZTETÉSEK.....	64
Új tudományos eredmények és megállapítások.....	68
Irodalomjegyzék.....	69
Tudományos publikációk.....	82
Melléklet.....	83
Köszönetnyilvánítás.....	85

Rövidítések

AAV	adeno-associated virus	adeno-asszociált vírus
AdV	adenovirus	adenovírus
BAdV	bovine adenovirus	szarvasmarha-adenovírus
CAdV	canine adenovirus	kutya-adenovírus
DAdV	duck adenovirus	kacsa-adenovírus
EAdV	equine adenovirus-latin	ló-adenovírus
FAdV	fowl adenovirus	tyúk-adenovírus
FrAdV	frog adenovirus	béka-adenovírus
GAdV	goat adenovirus	kecske-adenovírus
HAdV	human adenovirus-latin	humán-adenovírus
MAdV	murine adenovirus-latin	egér-adenovírus
OAdV	ovine adenovirus-latin	juh-adenovírus
OdAdV	odocoileus adenovirus-latin	szarvas-adenovírus
PAdV	porcine adenovirus-latin	sertés-adenovírus
SAdV	simian adenovirus-latin	majom-adenovírus
SnAdV	snake adenovirus	kígyó-adenovírus
TAdV	turkey adenovirus	pulyka-adenovírus
WSAdV	white sturgeon adenovirus	hal-adenovírus
as		aminosav
bp	base pair	bázispár
CAP v. VP	capsid protein	kapszid fehérje
CELO	chicken embryo lethal orphan	csirkeembrió letális árvírus (1-es szerotípusú tyúk-adenovírus)
DBP	DNA binding protein	DNS-kötő fehérje
E	early	korai
EDS	egg drop syndrome	tyúkok tojáshéjképződési zavara
ICTV	International Committee on the Taxonomy of Viruses	Nemzetközi Vírusrendszertani Bizottság
ITR	inverted terminal repeat	fordított vég-ismétlődés
kb	kilobase pair	kilobázispár
L	late	késői
LH	left hand	bal oldali
MLP	major late promoter	késői fő promóter
NLS	nuclear localisation signal	mag lokalizációs hely
NS v. REP	non-structural	nem-szerkezeti
nt		nukleotid
ORF	open reading frame	nyitott olvasási keret
PCR	polymerase chain reaction	polimeráz láncreakció
PV	parvovirus	parvovírus
GPV	goose parvovirus	liba-parvovírus
MdPV	Muskovy duck parvovirus	barbári kacsa-parvovírus
RH	right hand	jobb oldali
SAAV	serpentine adeno-associated virus	kígyó-adeno-asszociált vírus
THEV	turkey haemorrhagic enteritis virus	pulykák vérzéses bélgyulladásának vírusa
TP	terminal protein	terminális fehérje
VA RNS	virus-associated RNS	vírus-asszociált RNS

Összefoglalás

Doktori tanulmányaim kezdetekor célkitűzésem egy kígyó-eredetű adenovírus izolátum DNS-ének szekvencia-szintű meghatározása és részletes elemzése volt. A témaválasztást alapvetően meghatározták a Ph.D. kutatásaim feltételeit biztosító kutatócsoport korábbi kutatásainak eredményei és az azokra épülő vírusrendszertani javaslatok. A kígyó-adenovírus tanulmányozásával arra a kérdésre szándékoztunk választ találni, hogy mi lehet az *Adenoviridae* családon belül kialakítani javasolt, új *Atadenovirus* nemzetség eredete. Az *Adenoviridae* család több évtizeden át mindössze két (*Mastadenovirus* és *Aviadenovirus*) nemzetségből állt, az emlősökből, illetve madaraktól izolált vírusok besorolására. A filogenetikai elemzések elterjedése nyomán kiderült, hogy bizonyos szarvasmarha-adenovírusok, melyek a *Mastadenovirus* nemzetségen belül kivételnek számítottak, valójában egy harmadik, az avi- és mastadenovírusokétól jól elkülönülő leszármazási vonalat képviselnek, érdekes módon egy ugyancsak kivételnek tartott madár-adenovirussal, az úgy nevezett III. csoportba sorolt EDS-vírussal (egg drop syndrome vírus, I-es szerotípusú kacsá-adenovírus) együtt. Egy békából izolált adenovírus filogenetikai és genom vizsgálata kimutatta, hogy létezik egy negyedik leszármazási ág is, amit a béka-adenovírus és a másik kivételnek tekintett, korábban az ún. II. csoportba sorolt aviadenovírus, a pulykák vérzéses bélgyulladását okozó THEV (3-as szerotípusú pulyka-adenovírus) alkot. Ezt a csoportot javasolták *Siadenovirus* néven új nemzetséggé elkülöníteni. Feltételeztük, hogy az *Atadenovirus* nemzetség ismert tagjai esetleg más ősi gerinces osztály, nevezetesen a hüllők adenovirusaival mutatnak hasonlóságot. A német kollégák által rendelkezésünkre bocsátott, gabonasiklókból (*Elaphe guttata*) származó adenovírus törzs teljes genomját molekulárisan klónoztuk, DNS szekvenciáját meghatároztuk, és elemeztük. Megállapítottuk, hogy a vizsgált vírus mind genom szerkezetében, mind pedig a filogenetikai számítások alapján egyértelműen az időközben hivatalosan is elfogadott *Atadenovirus* nemzetség tagjai közé sorolható. Részleges szekvenciák alapján megállapítottuk, hogy az általunk vizsgált törzssel azonosnak tekinthető adenovírusok Németországban, más kígyófajokban is előfordulnak. Királypítóból (*Python regius*) izolált adenovírus törzs véletlenszerű klónozása során találtunk egy klónt, ami szekvenciája alapján parvovírus eredetűnek bizonyult. Filogenetikai elemzéssel kimutattuk, hogy érdekes, új parvovírus típusból származik. Kanadai tanulmányút keretében elvégeztem a kígyó-parvovírus (serpentine adeno-asszociált vírus, SAAV) teljes genomjának szekvenálását, és egy darabban történő molekuláris klónozását. A SAAV genomjának elemzése és törzsfá rekonstrukciós számítások alapján kimutattuk, hogy az a *Dependovirus* nemzetségbe sorolható. Munkám elméleti jelentősége, hogy a világon legelsőként elemeztünk hüllő-adenovírus és -parvovírus genomot. Gyakorlati

szempontból fontos eredményeim között e vírusok génkifejező vektorként történő esetleges hasznosítása, valamint modern diagnosztikai módszerek megalapozása említhető.

Bevezetés

Előzmények

Kutatómunkám kezdetekor az *Adenoviridae* család rendszertani beosztása gyökeres változtatások előtt állt. Az adenovírusokból (AdV) meghatározott teljes, illetve részleges genom szekvenciák alapján végzett filogenetikai elemzések rohamosan növekvő mennyisége egyre meggyőzőbb bizonyítékokat szolgáltatott arra vonatkozóan, hogy a közel 30 éve kialakított két nemzetség (*Mastadenovirus* és *Aviadenovirus*) kivételnek számító tagjait új nemzetségekbe lehet és kell besorolni.

A különböző gének összehasonlítására alapozott adenovírus törzsfá rekonstrukciók kezdetben egyértelműen három csoport elkülönülését mutatták (Harrach és mtsai, 1997; Harrach és Benkő, 1998; Dán és mtsai, 1998). Később világossá vált, hogy a három leszármazási vonal háromféle jellegzetes genom szerveződésnek felel meg. Javaslat született a Nemzetközi Vírusrendszertani Bizottság (ICTV, International Committee on the Taxonomy of Viruses) számára (Benkő és Harrach, 1998), hogy a *Mastadenovirus* nemzetségben található, elsősorban szarvasmarhából származó kivételek (Bartha, 1969) új nemzetségbe kerüljenek az egyik rendhagyó madár-adenovírussal, az EDS-vírussal együtt (egg drop syndrome virus, 1-es szerotípusú kacsá-adenovírus; Hess és mtsai, 1997), ami korábban az aviadenovírusok ún. III. csoportját alkotta. Az újonnan kialakítandó nemzetségnek vegyes gazdaeredete miatt az *Atadenovirus* elnevezést ajánlották, mivel valamennyi ismert tagjában igen magasnak találták a genom A+T arányát.

A gazdafajok és adenovírusaik filogenetikai összehasonlítása alapján merész hipotézis született. Az atadenovírusok viszonylagos filogenetikai távolsága az avi- és mastadenovírusokhoz képest közvetlenül megfelelt a hüllők, madarak és emlősök relatív filogenetikai távolságának (Harrach, 2000). A hasonló arányok alapján elképzelhetőnek tűnt, hogy az atadenovírusok ősbibb gerincesekkel fejlődtek együtt, és a napjainkban kérdésesekben, erszényesekben és madarakban előforduló törzsek esetleg gazdaváltás révén kerültek mai gazdáikba. A hipotézis vizsgálatához halakból, kétélűtűkből és hüllőkből származó adenovírus izolátumok beszerzésére és vizsgálatára volt szükség.

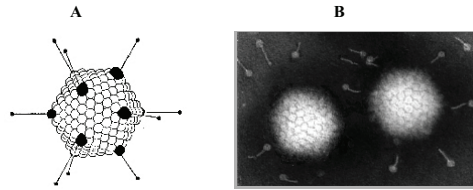
Az egyetlen létező béka-adenovírus (FrAdV-1) izolátum genom-szintű vizsgálata kiderítette, hogy az *Aviadenovirus* nemzetségben II. csoportként elkülönített, pulykák vérzéses bélgyulladását okozó THEV-vel (turkey haemorrhagic enteritis virus, 3-as szerotípusú pulyka-adenovírus; Pitcovski és mtsai, 1998) egy negyedik csoportot képez (Davison és mtsai, 2000). Filogenetikai elkülönültségük és sajátos szerveződésű, szialidáz enzimekével homológ gént

tartalmazó genomjuk alapján e két vírus számára egy negyedik nemzetség létrehozását javasolták *Siadenovirus* néven (Davison és Harrach, 2002).

Az atadenovírusok eredete után nyomozva határoztuk el hüllőkbeli és halakból származó AdV-ok beszerzését és genetikai vizsgálatát. A pítón-adenovírus-DNS szekvenálása során azonosítottunk egy olyan klónt, ami a filogenetikai elemzés alapján érdekes, új parvovírusnak (PV) tűnt, ezért a pítón-eredetű PV genom-szintű vizsgálatát is elvégeztük.

Irodalmi áttekintés

Az AdV-ok (1. ábra) az egész világon elterjedt, emberben és egyéb emlősökben, valamint madarakban igen gyakran előforduló, közepes méretű, burok nélküli, duplaszálú DNS genomot tartalmazó vírusok (Benkő és mtsai, 2004). A különféle gazdafajokból rendszerint sokféle, szérumszemlegesítési próbával elkülöníthető szerotípus izolálható. Kórokozó képességük változatos, de általában nem, vagy csak fakultatív patogén vírusoknak tekintik őket. Az AdV-okra általában jellemző a szűk gazdaspektrum, és *in vitro* körülmények között is rendszerint csak az adott gazdafaj (esetenként annak is csak bizonyos) sejtjeiben szaporíthatók. A humán adenovírus (HAdV) szerotípusok száma jelenleg 50 felett jár, de több állatfajban is azonosítottak már 10-nél több szerotípust.



1. ábra. (A) Adenovírus vázlatos rajza (<http://www.med.sc.edu:85/mhunt/dna1.htm>).
(B) Adenovírus elektronmikroszkópos képe
(<http://web.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/aden.html>).

Az adenovírus elnevezés több mint fél évszázaddal ezelőtti felfedezésük körülményeire utal. 1953-ban gyermekek műtéti úton eltávolított garatmanduláiból (adenoid szövetből) készült sejtenyészetek spontán degenerációját figyelték meg, majd a sejtkárosító hatást kiváltó ágenszt izolálták (Rowe és mtsai, 1953). Kísérleti állatoltások során bizonyos HAdV típusok tumor képződést eredményeztek, és ezek a megfigyelések igen intenzív kutatások megindulásához

vezettek. Hamarosan kiderült azonban, hogy természetes körülmények között, eredeti gazdjukban az AdV-ok nem képesek daganatot indukálni. A sejtranszformációért felelős gének illetve genomszakaszok kutatása során azonban felfedezték a primer RNS transzkriptumok érési mechanizmusát, az úgynevezett splicing folyamatát. Amikor kiderült, hogy ez a jelenség az eukarióta sejtekben általánosan előfordul, az AdV-ok a génkifejeződés vizsgálatának egyik fontos modelljévé váltak. Meg kell jegyezni, hogy a kutatások eleinte csaknem kizárólag a HAdV-okkal, döntő többségükben az egymástól nukleotid (nt) sorrend szintjén mindössze 2%-ban különböző, 2-es és 5-ös szerotípussal folytak. Mivel a többi HAdV típusok sem mutattak a genom szerveződés vagy replikációs ciklus tekintetében jelentős eltéréseket, általánosan elterjedt az a nézet, hogy az *Adenoviridae* meglehetősen konzervatív víruscsoport. Nem csoda, hogy az első állati AdV-ok szekvencia és genom elemzésének az elképzelt változatosságnál sokkal nagyobb fokú eltérésekre utaló eredményeit főként a humán medicina tudományos közvéleménye lassan fogadta el, és ez a rendszertani változtatásokat is nehezítette, időben jelentősen elhúzódtává tette.

A 90-es évek második felében, gyors egymásutánban jelent meg négy olyan állati AdV teljes genom szekvenciája és elemzése, melyek mindegyike különleges sajátosságokat mutatott. E vírusok genomja számos olyan gént tartalmazott, melyeknek homológjai a humán és addig vizsgált többi emlős AdV-ban nem fordultak elő, így kiderült, hogy az elsőként a HAdV-oknál megismert, és sokáig teljesen megőrzöttnek vélt genom szerveződés valójában csak egyetlen nemzetségre, a mastadenovírusokra érvényes. A rendhagyó genom szerveződésűnek talált vírusok között volt a madár AdV-ok prototípusának számító FAdV-1 vagyis CELO (chicken embryo lethal orphan; Chiocca és mtsai, 1996) vírus, valamint a kivételek besorolására használt II. és III. aviadenovírus csoport képviselőjeként a THEV (Pitcovski és mtsai, 1998), és az EDS-vírus (Hess és mtsai, 1997). Főként a genomok végein megfigyelhető, jelentős méret- és minőségbeli eltérések felismerése hirtelen változást hozott az általános felfogásban, és kialakult az a vélemény, hogy a mastadenovírusokkal szemben az aviadenovírusok genomjában különféle variációk fordulnak elő.

A negyedik különleges vírus genomot egy ausztrál juh-adenovírus izolátum (OAdV-7) genetikai térképezése során ismerték fel (Vrati és mtsai, 1996a). E vírus izolátumot eredetileg génkifejező vektorrá akarták alakítani, de a HAdV-oknál az idegen gén beültetésére legalkalmasabbnak bizonyult E1 és E3 régiókat (lásd később) nem sikerült a várt pozíciókban azonosítani (Vrati és mtsai, 1996b). A teljes genom szekvencia birtokában kiderült, hogy ezek a régiók a különleges juh-adenovírus izolátumban szinte egyáltalán nem is léteznek. Az időközben megindult filogenetika számítások már korán kiderítették, hogy szekvencia hasonlóság alapján valójában négy nagy csoport létezik, és az EDS-vírus, az azóta hivatalosan OAdV-7 típusként

elfogadott juh-adenovírus izolátummal közös nemzetségbe sorolandó (Harrach és mtsai, 1997). Ph.D. kutatásaim helyszínéül szolgáló laboratóriumban az elmúlt években két olyan szarvasmarha-adenovírus (BAdV) teljes genom elemzését végezték el, amelyekről szerológiai, biológiai tulajdonságaik és részleges szekvenciájuk alapján feltételezni lehetett, hogy ugyancsak az *Atadenovirus* nemzetség tagjai. Mind a BAdV-4 (Dán és mtsai, 1998; Dán, 2001), mind pedig a Rus elnevezésű szarvasmarha-adenovírus izolátum genomszerveződése (Élő, 2002) alátámasztotta az atadenovírusokra jellemzőnek tartott genetikai térképet (Both, 2002). Egy újabb házityúk-adenovírus (FAdV-9) elemzése (Ojkic és Nagy, 2000) megerősítette az aviadenovírusok jellegzetességeit, míg az egyetlen béka-adenovírus genomja a THEV-vel azonos szerveződésűnek bizonyult (Davison és mtsai, 2000).

Érdekesnek ígérkezett annak vizsgálata, hogy további ősbibb gerincesek, halak és hüllők AdV-ai genomszerveződés és genetikai rokonság alapján hogyan illeszthetők az egyes nemzetségekbe.

Adenovírusok előfordulása hüllőkben

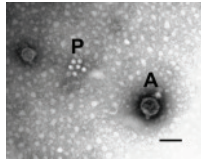
Az AdV-ok előfordulását a gerincesek valamennyi főbb osztályának több-kevesebb képviselőjében leírták már (Russell és Benkő, 1999), de számos esetben ez csupán fény- vagy elektronmikroszkópos leleteken alapul, és főleg az ősbibb, változó testhőmérsékletű gerincesekből mindössze néhány izolátum áll rendelkezésre.

A különféle kígyó- és gyíkfajokban a vírusos fertőzöttség nem ritka. A szakirodalom adatai szerint a herpesz-, pox-, paramyxo- és picornavírusok mellett az AdV-ok is jelentős, gyakori kórokozók (Essbauer és Ahne, 2001). Hüllő fajok AdV-sal való fertőzöttségét számos esetben kimutatták, főként kórbonctani, kórszövettani és elektronmikroszkópos vizsgálatokkal; nílusi krokodilból (*Crocodylus niloticus*; Jacobson és mtsai, 1984), sztyeppi varánuszából (*Varanus exanthematicus*; Jacobson és Kollias, 1986), háromszarvú kaméleonból (*Chameleo jacksoni*; Jacobson és Gardiner, 1990), Rankin sárkánygyíkból (*Pogona henrylawsoni*; Frye és mtsai, 1994), rózsabóából *Lichanura trivirgata*; Schumacher és mtsai, 1994), szakállas agámából (*Pogona vitticeps*; Jacobson és mtsai, 1996) és hegyi kaméleonból (*Chameleo montium*; Kinsel és mtsai, 1997). A közelmúltban adenovírus-DNS-t sikerült kimutatni Mojave csörgőkígyó (*Crotalus scutulatus scutulatus*) és közönséges óriáskígyó (*Boa constrictor*) máj és vékonybél mintáiból *in situ* hibridizációval (Ramis és mtsai, 2000; Perkins és mtsai, 2001). A jelölt oligonukleotid próbák a FAdV-10 penton gén szekvenciájának alapján készültek (Sheppard és Trist, 1992).

Annak ellenére, hogy AdV-ok jelenlétét hullókben gyakran mutatják ki, csak néhány esetben sikerült izolálni a vírust. Közönséges óriáskígyóból (*Boa constrictor*) származó AdV izolátummal újszülött, egészséges *Boa constrictor*-t fertőztek meg (Jacobson és mtsai, 1985). A kísérleti állat 14 nap után elhullott, és májában a szövettani vizsgálat során elhalásos góccokat figyeltek meg. Ahne és munkatársai királypítóból (*Python regius*; Ogawa és mtsai, 1992) és egy tüdőgyulladásra jellemző tüneteket mutató, moribund gabonasiklóból (*Elaphe guttata*, Juhász és Ahne, 1993) izoláltak AdV törzseket.

Parvovírusok előfordulása hüllőkben

Az AdV-ok vagy ritkábban más helper-vírusok (picorna- vagy herpeszvírus) kíséretében PV-ok (2. ábra) előfordulását többször kimutatták különféle hüllőfajok kórszöveti és elektronmikroszkópos vizsgálatával, így erdei (*Elaphe longissima*) illetve négycsíkos siklóból (*Elaphe quatuorlineata*; Heldstab és Bestetti, 1984), hegyi korallsiklóból (*Lampropeltis zonata multicincta*; Wozniak és mtsai., 2000) és szakállas agámából (*Pogona vitticeps*; Jacobson és mtsai., 1996; Kim és mtsai., 2002).



2. ábra. Negatív festésű elektronmikroszkópos kép: *Boa constrictor*-ból származó vírus szuszpenzióban található adenovírusok (A) és parvovírusok (P) (mérce: 100 nm; Farkas és mtsai., 2004).

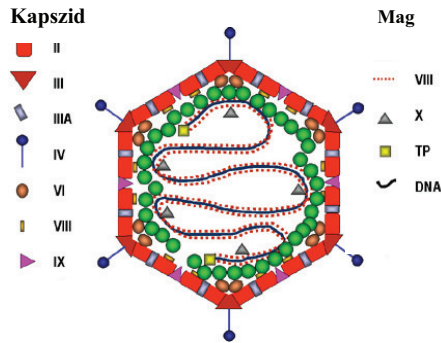
A királypítóból származó AdV izolátum véletlenszerű klónozása során talált parvovírus-DNS szekvencia előfordulása tehát nem volt meglepő. Mivel hüllőkből vagy más hidegvérű gerinces gazdából származó PV-ről még semmilyen molekuláris biológiai adat nem állt rendelkezésre, célul tűztük ki a piton-parvovírus teljes genomjának elemzését is.

Az adenovírusok jellemzése

Az adenovírusok rendszerezése

Kezdetben, amikor a vírusok rendszertani besorolása azok biológiai, biokémiai és biofizikai tulajdonságai, valamint szerológiai vizsgálatok alapján történt, az *Adenoviridae* családba tartozó vírusokat két nemzetségbe sorolták, az emlős AdV-okat a *Mastadenovirus*, a madár AdV-okat az *Aviadenovirus* nemzetségbe (Norby és mtsai, 1976). A molekuláris biológia új módszereinek fokozatos térhódítása azonban lehetővé tette teljes vírus-genomok szekvenálását, és szerveződésük feltérképezését. A rendszertani besorolásban a filogenetikai számítások egyre nagyobb szerepet kaptak. Az ICTV 2002. július 30-án magyar kutatók javaslata, és a rendelkezésre álló adatok alapján két új nemzetség bevezetését fogadta el *Atadenovirus* és *Siadenovirus* néven. Az előbbibe az ún. 2. alcsoportbeli BAdV-okat, az OAdV-7-et és az EDS-vírust sorolták, a másodikba a THEV és a FrAdV-1 került (Benkő és mtsai, 2004).

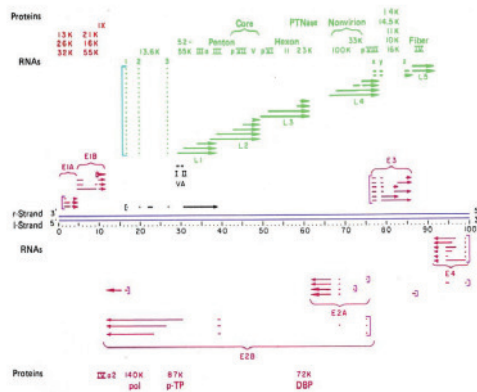
Az adenovírusok morfológiája és replikációja



3. ábra. A mastadenovírusok felépítésének vázlatos rajza (<http://www.med.sc.edu:85/mhuni/dna1.htm>). A szerkezeti fehérjék közül azoknak, amelyek a virionokban nagy példányszámban fordulnak elő, római számmal jelzett elnevezésük is van, ami valójában a tisztított virionok poliakrilamid gélelektroforézis segítségével, méret alapján szétválasztott polipeptid frakcióinak sorszáma.

Az AdV-ok (3. ábra) 70-90 nm átmérőjű, burok nélküli, ikozaéder alakú, kubikális szimmetriájú részecskék (Shenk, 2001). Kapszidjuk 240 lap-kapszomerből vagy hexonból (hat másik hexon veszi körül), és 12 csúcsi kapszomerből vagy pentonból (öt hexon veszi körül) áll. A kapszid csúcsairól egy (aviadenovírusok esetében két) antenyszerű nyúlvány, ún. fiber ered. Mindegyik hexon három azonos polipeptidből (polipeptid II) épül fel, felületükön faj- és nemzetség-specifikus antigén epitópok találhatóak. A kapszid élein a penton mellett 2-2 IIIa jelű monomer helyezkedik el. A penton-kapszomerek a penton-alapból (polipeptid III) és a fiberből (polipeptid IV) állnak. A fiber felelős a hemagglutinációért és a receptorhoz való kötődésért. A VI-os, VIII-as, és IX-es számú polipeptidek a hexonnal állnak kapcsolatban. Valószínűleg a kapszid stabilizálásában, összeépülésében van szerepük. Az V-ös, VI-os, X-es fehérjék és a terminális fehérje (TP), a genommal komplexet alkotva a részecske magját képezik. Az V-ös és a VII-es polipeptidek argininben gazdag, bázikus fehérjék, és a virion magjában találhatóak. Az V-ös fehérje valószínűleg a részecske összeépülésében játszik szerepet, összeköttetést biztosít a kapszid és a genom, valamint a penton-alap között. A VII-es fehérje, a hisztonokhoz hasonlóan nem kovalensen kötődik a genomhoz. A TP kovalensen kapcsolódik a DNS 5' végéhez, és fontos szerepet tölt be a vírus replikációjában. Az AdV fehérjék jelölésekor megállapodás szerint a kis p azt jelenti, hogy az illető fehérje prekursor formában szintetizálódik. A prekursorok érésében és aktiválásában a vírus által kódolt proteáz (endopeptidáz) specifikus vágáshelyeken történő hasítással vesz részt.

Az AdV-ok replikációja korai (E) és késői (L) szakaszból áll (4. ábra). A korai fázist az azonnali korai (immediate early) szakasz előzi meg, melynek szerepe a korai gének expressziójának szabályozása. Két gén (IVa2 és IX) kifejeződésének ideje átmeneti, a korai és a késői szakasz között történik. A késői szakasz a vírus-DNS replikációjával kezdődik. A korai és a késői fázis nem különül el élesen egymástól. A késői fő promoterről (MLP, major late promoter) átiródó transzkriptumok kis mennyiségben a fertőzés korai szakaszában is megtalálhatóak, és bizonyos korai mRNS-ek a késői szakaszban is termelődnek. A szerkezeti fehérjék általában a késői fázisban szintetizálódnak és az MLP-ről íródnak át. A korai és késői mRNS szintézisét a gazdasejt RNS-polimeráz II enzimje végzi. Számos fehérje termék a mRNS-ekből alternatív splicing révén keletkezik.



4. ábra. Az adenovírusok transzkripció térképe (<http://www.med.sc.edu:85/mhunt/dna1.htm>). A korai és késői mRNS-eket és az átíródás irányát piros, illetve zöld nyilak jelölik. A promótereket szögletes zárójelek mutatják.

Az adenovírusok genomszerveződése

Az *Adenoviridae* család tagjainak genomja lineáris, duplaszállú DNS, közepes méretű, mely 26-45 ezer bázispárt (bp) tartalmaz (5. ábra), mindkét végén megegyező szekvenciájú, fordított vég-ismétlődések (inverted terminal repeat, ITR) találhatóak. Az ITR mérete változó (36-368 bp), leghosszabb a mastadenovírusokban. Az egyes nemzetségekre jellemzőek a genomszerveződésben talált eltérések. A genom középső része az E2 régió. Itt az *l* szálon található gének és az *r* szálon található szerkezeti fehérje-gének erősen konzerváltak, a csak mastadenovírusokban megtalálható, V-ös szerkezeti fehérjét kódoló gén kivételével. Az E2 régió génjei az AdV-ok legősibb génjei közé tartoznak, a DNS replikációjában, becsomagolásában van szerepük. A nemzetségekre jellemző régiók a genom két végén találhatóak. Az itt található géneket az AdV-ok feltehetően az evolúció során vették fel vagy veszítették el. Ezekben a régiókban gyakoriak a duplikációk, inzerciók, deléciók, és egy-egy nemzetség tagjai között is változatos képet mutatnak.

Mastadenovírusok

A *Mastadenovirus* nemzetség jelenleg a legtöbb ismert tagot számlálja, csak emlősökből származó AdV-okat tartalmaz. Az eddig jellemzett mastadenovírusok genomjának mérete körülbelül 30,5-36,5 kilobázispár (kb). A G+C tartalom változó, 46,5-63,8%. Mivel a kutatások középpontjában elsősorban a mastadenovírusok álltak, legtöbb génjük, illetve szabályozó régiójuk szerepe megközelítőleg tisztázott. A mastadenovírusokra jellemző az E1A, E1B, E3 és E4 korai régiók megléte, és csak ebben a nemzetségben fordulnak elő az V-ös és IX-es szerkezeti fehérjéket kódoló gének. Az E4 régióban 34K fehérjét kódoló gén, egyes vírusokban szintén az E4 régióban dUTP-ázzal homológ gén, a főemlősök mastadenovirusaiban az E3 régióban a főemlősök cytomegalovirusaival rokonságot mutató CR1 gének találhatóak. Vírus-asszociált RNS gén (VA RNS; egy vagy kettő) csak a főemlősök mastadenovirusaiban fordul elő.

Aviadenovírusok

Ez a nemzetség csak madár-eredetű vírusokat foglal magában. Annak ellenére, hogy ez a második legtöbb tagot számláló nemzetség, teljes genom szekvencia csak a FAdV-1 (Chiocca és mtsai, 1996) és FAdV-9 (Ojkic és Nagy, 2000) szerotípusokból áll rendelkezésünkre, melyekben a G+C tartalom körülbelül 54%. A madarak AdV-ainak genomja a leghosszabb, 43,8-45 kb. A genom bal és jobb végén számos nyitott olvasási keret (ORF) található, melyeknek funkciója legtöbbször ismeretlen. Az E1 régióban egy dUTP-ázt (ORF1) kódoló gén és PV nem-szerkezeti fehérje (Rep) homológok (ORF2, 12, 13) találhatóak. A dUTP-áz gén megtartotta aktivitását, eredete valószínűleg eltér a mastadenovírusok megfelelő génjétől. Az E3 régió hiányzik. Az E4 régióban található ORF-ek közül a feltételezett glükoprotein gének (FAdV-1: ORF9-11; FAdV-9: ORF11, ORF23) a fehérvérszövetek adhéziós molekuláival mutatnak homológiát. Az ORF19 fehérje a Marek-féle betegség vírusának (*Herpesviridae, Alphaherpesvirinae, Mardivirus* nemzetség) membrán fehérjéjéhez (feltételezett lipázok) hasonlítanak. A GAM-1 fehérje a fertőzött sejtek pusztulását késlelteti (antiapoptotikus hatás; Chiocca és mtsai, 1997).

Atadenovírusok

Az újonnan elfogadott *Atadenovirus* nemzetség gazdaeredet szempontjából a legvegyesebb. Ide sorolták a mastadenovírusoktól eltérő biológiai tulajdonságokkal rendelkező 2. alcsoportbeli BAdV-okat, az Ausztráliában izolált, teljesen megszekvenált OAdV-74 (Vrati és

(közönséges rókakazu, *Trichosurus vulpecula*) kimutatott AdV-t (Thomson és mtsai, 2002), és az Egyesült Államokban izolált kecske-adenovírus 1-es szerotípusát (Lehmkuhl és Cutlip, 1999). Egy orosz BAdV izolátum, a Rus törzs (Élő, 2002), valamint egy a fehér-farkú szarvasok (*Odocoileus hemionus*) között járványos, elhullással járó megbetegedést okozó AdV (Woods és mtsai, 1996; Sorden és mtsai, 2000) szintén atadenovírusnak bizonyult. A nemzetség nevét a genom magas A+T (57-66,7%), azaz alacsony G+C tartalmáról kapta. A nemzetség tagjaira jellemző a viszonylag rövid, 29,5-33,2 kb méretű genom. Az ITR-ek rövidiek, méretük 46 és 74 bp között változik. Az E1A és az E3 régió, valamint az V-ös és a IX-es szerkezeti fehérjét kódoló gének hiányoznak. Az E1A régió helyén az *l* szálon a nemzetség valamennyi tagjában jelen lévő p32K szerkezeti fehérje génje, ettől jobbra, az *r* szálon az E1B régió LH1-3 (left hand) génjei találhatóak.

Siadenovírusok

A *Siadenovirus* nemzetségnek egyelőre mindössze két tagja van, a THEV (Pitcovski és mtsai, 1998) és a FrAdV-1 (Davison és mtsai, 2000). A THEV korábban az *Aviadenovirus* nemzetség tagja volt, azonban genomszerveződése különlegesnek, a többi madár AdV-től eltérőnek bizonyult, és csak a leopárdbékából (*Rana pipiens*) izolált AdV-sal (FrAdV-1) mutatott rokonságot. Genomjuk az összes AdV közül a legegyszerűbb és a legkisebb, 26,2 kb. A genom G+C tartalma alacsony, mindössze 34,9%, illetve 37,9%. Az E1 régióknak megfelelő pozícióban található egy a szialidáz-enzimeket kódoló génekkel homológiát mutató gén, amiről a nemzetség a nevét kapta. A pVIII és a fiber között található E3 régió a mastadenovírusokon kívül csak ebben a nemzetségben fordul elő, de az itt található gén nem homológ a mastadenovírusoknál található gének egyikével sem.

Javaslat született egy új, ötödik nemzetség bevezetésére is *Ichtadenovirus* néven, melynek jelenleg egyetlen ismert tagja a fehér tokból (*Acipenser transmontanus*) izolált AdV (WSAdV-1; Benkő és mtsai, 2002; Kovács és mtsai, 2003), amelynek egyelőre csak részleges genomsekvenciáját ismerjük.

A különböző nemzetségekbe tartozó AdV-ok eltérő genomszerveződése, génjeik, és a gazdaállatfajok mitokondriumaiban levő riboszómák kis alegység RNS-ének filogenetikai fájának összehasonlító elemzése alapján azt feltételezték, hogy az AdV-ok egy része (mastadenovírusok és aviadenovírusok) együtt fejlődött a gazdaállatokkal, míg más része gazdafajt váltott és csak később adaptálódott az új fajhoz (Harrach, 2000). Elképzelhető, hogy a madarakból izolált THEV eredetileg a kétélűekkel fejlődött együtt, az *Atadenovirus* nemzetségbe tartozó madár,

erszényes-, juh- és szarvasmarha-adenovírusok pedig hüllő-adenovírus eredetűek, és gazdafajváltás következtében kerültek jelenlegi gazdáikba.

A parvovírusok jellemzése

A parvovírusok rendszerezése

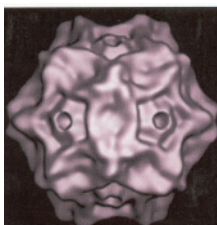
A *Parvoviridae* család jelenleg két alcsaládból áll (1. táblázat; Tattersall és mtsai, 2004). A *Densovirinae* alcsalád tagjai gerinctelen állatokat, rovarokat és rákokat fertőznek meg (Bergoin és Tijssen, 2000), a *Parvovirinae* alcsalád tagjait pedig gerincesekből, madarakból és emlősökből mutatták ki (Zádori és mtsai, 1995; Brown és Young, 2000; Truyen és Parrish, 2000).

1. táblázat. A parvovírusok rendszerezése.

<i>Parvoviridae</i> család	
<i>Parvovirinae</i> alcsalád	<i>Densovirinae</i> alcsalád
<i>Amdovirus</i> nemzetség	<i>Brevidensovirus</i> nemzetség
<i>Bocavirus</i> nemzetség	<i>Densovirus</i> nemzetség
<i>Dependovirus</i> nemzetség	<i>Iteravirus</i> nemzetség
<i>Erythrovirus</i> nemzetség	<i>Pefudensovirus</i> nemzetség
<i>Parvovirus</i> nemzetség	

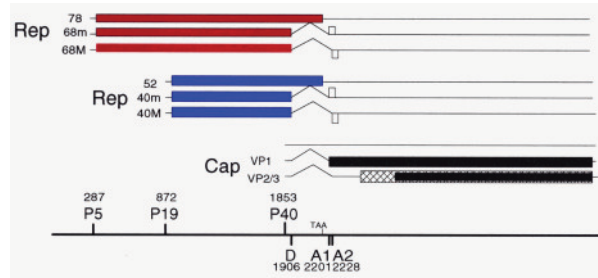
A parvovírusok morfológiája és replikációja

A PV-ok 18-26 nm átmérőjű, burok nélküli, ikozaéder formájú részecskék (6. ábra; Tattersall és mtsai, 2004). Kapszidjuk 60 fehérje alegységből épül fel. Az egyszálú DNS-vírusok közé tartoznak, replikációjuk során nemzetségenként eltérő arányban pozitív vagy negatív irányultságú szálak épülnek be a virionokba.



6. ábra. A kutya-parvovírus cryo-elektronmikroszkópos képe (Walters és mtsai, 2004).

A PV-ok replikációja és transzkripciója a sejtmagban történik. Nem kódolnak DNS-polimeráz enzimet, ezért szaporodásukhoz osztódó, „S” fázisban lévő gazdasejtek vagy más vírusok (pl. AdV, herpeszvírus) polimeráz enzimét használják fel. A replikáció kezdetén a vírus duplaszálú DNS-sé alakítja át genomját. Ez történhet a sejtmagba jutott pozitív, illetve negatív irányultságú DNS szálak spontán összekapcsolódásával, vagy a genom két végén található hajtúszerű szerkezet segítségével komplementer szál képződik és így alakul ki a duplaszálú DNS genom. A 2-es szerotípusú adeno-asszociált vírus (AAV-2) transzkripció térképe a 7. ábrán látható.



7. ábra. A *Dependovirus* nemzetségbe tartozó humán adeno-asszociált vírus 2 (AAV-2) genomjának és transzkripciójának vázlatos rajza (<http://web.missouri.edu/~mmiwwww/djp.html>). A dependovírusok három promóterrel rendelkeznek (az AAV-2-ben az 5-ös, 19-es és 40-es térkép-egységénél). A p5-ről átiródó 1-es transzkriptum kódolja a Rep78-as, a 2-es és a 3-as a Rep68-as nem-szerkezeti fehérjét. A Rep78-as és Rep68-as fehérjék C-terminális része különbözik egymástól. A p19-esről átiródó 4-es transzkriptum a Rep52-es, az 5-ös és 6-os a Rep40-es nem-szerkezeti fehérjét, míg a p40-esről átiródó mRNS-ek a szerkezeti fehérjéket kódolják. Az A1 akceptor hely után a m-mel jelölt fehérjékhez egy 16 aminosavból, az A2 akceptor hely után a M-mel jelölt fehérjékhez egy 7 aminosavból álló rövid farok kapcsolódik. A 8-as transzkriptum a VP1-es, a 9-es transzkriptum a VP2-es és VP3-as fehérjéket kódolja. Az utóbbi két fehérje alternatív translációs mechanizmus révén jön létre. A VP1, VP2, VP3 fehérjék 1:1:10 arányban keletkeznek. A splicing nélküli 7-es transzkriptum valószínűleg nem kódol funkcióval bíró fehérjét. D: donor; A: akceptor; TAA: stop kodon.

A parvovírusok genomszerveződése

A PV-ok genomjában két nagy ORF azonosítható, melyek a transzkripcióban és a DNS replikációban szerepet játszó, nem-szerkezeti fehérjéket (NS vagy Rep) és a szerkezeti, kapszid fehérjéket (CAP vagy VP) kódolják. A gerincesek PV-aiban, valamint az iteravírusokban és brevidensovírusokban mindkét gén ugyanazon a szálon található, míg a densovírusokban az

ellentétes szálakon helyezkednek el. A genom két végén található ITR-ek palindrom szekvenciái egy energetikailag stabil hajtű szerkezetet hoznak létre. A kicsi és egyszerű genom felépítése nemzetségenként eltéréseket mutat, amelyeket az alábbiakban vázlatosan bemutatok.

A *Parvovirinae* alcsalád

A *Parvovirus* nemzetség

A *Parvovirus* nemzetség egyes tagjai negatív irányultságú DNS-t csomagolnak kapszidba, más vírusok esetén viszont pozitív irányultságú DNS csomagolódnak be 1-50%-ban. Genomjuk mérete 5 kb, melynek két végén az ITR szekvenciák hajtű szerkezetet képeznek. A 3' végén a hajtű 115-116 nt, az 5' végén 200-242 nt hosszúságú. Csak két promóterrel rendelkeznek (p4 és p39), és egy poliadenilációs szignál található a genom 3' végén. A Rep és VP fehérjéket kódoló gének ugyanazon a szálon helyeződnek.

Az *Erythrovirus* nemzetség

Az erythrovírusok genomja 5 kb méretű, az érett virionokba a pozitív és negatív irányultságú DNS egyenlő arányban csomagolódnak be. A B19 ITR hosszu, 383 nt, melyből az első 365 nt a palindrom szekvenciák miatt hajtű szerkezetet képez. Egyetlen promóterrel rendelkeznek (p6), két poliadenilációs szignáljuk van a genom középső részén, valamint a 3' vég közelében.

A *Dependovirus* nemzetség

A *Dependovirus* nemzetség elnevezése arra utal, hogy az ide sorolt vírusok bár bizonyos körülmények között önállóan is képesek szaporodni, replikációjukhoz helper-vírust igényelnek. Kivételt képez a barbari kacsa- (MdPV) és a liba-parvovírus (GPV), melyeket genomsekvenciájuk alapján soroltak ide. Tagjai a pozitív, illetve negatív irányultságú DNS-t 50-50%-ban csomagolják be a kapszidba. A nemzetség legjobban tanulmányozott tagja az AAV-2, genomjának mérete 4,68 kb. Az AAV-2 ITR 145 nt, ebből 125 nt képezi a hajtű szerkezetet. A dependovírusok három promóterrel rendelkeznek (p5, p19, p40).

Az *Amdovirus* nemzetség

Egyetlen ismert tagja a nyércek Aleuti-betegségének vírusa. Genomjának mérete 4,8 kb, két promóterrel rendelkezik (p3, p36). A *Parvovirinae* alcsalád többi tagjával ellentétben a VP1 N-terminális részén a foszfolipáz A₂ domén hiányzik. Replikációja során a transzkriptumok bonyolult mintázatú splicing-mechanizmus révén keletkeznek. A két fő, bal és jobb oldali ORF mellett két rövid ORF található a genom közepén.

A *Bocavirus* nemzetség

A nemzetségnek mindössze két ismert tagja a szarvasmarha-parvovírus (5491 nt) és a kutya minute-vírus (5097 nt). Három feltételezett promóterrel rendelkeznek (p4,5, p13 és p39). A két nagy ORF mellett egy harmadik, rövid ORF található a genom közepén.

Anyag és módszer

A vírus-DNS tisztítása

A gabonasiklókból (*Elaphe guttata*) származó 145/88-as számú AdV-t, a királypityonból (*Python regius*) származó 91/88-as és a közönséges óriáskígyóból (*Boa constrictor*) származó 183b/88-as számú, AdV-t és PV-t tartalmazó izolátumokat víperaszív (VH-2; ATCC CCL 140) és leguánszív (IgH2; ATCC CCL 108) sejtvonalon, Németországban elszaporították, majd ultracentrifugálással koncentrálták. Az ultracentrifugált mintákhoz SDS (nátrium-dodecilszulfát) és EDTA (etilén-diamin-tetra-acetát) oldatot adtunk úgy, hogy végkoncentrációjuk 0,5% és 1 mM legyen, majd proteináz K enzimmel (Sigma-Aldrich, 50 i g/ml végkoncentrációban) másfél órán át 37°C-os vízfürdőben inkubáltuk. Ebben a lépésben a fehérjék lebomlanak, és a vírus-DNS szabaddá válik. Ezt követően az emésztett fehérjék kivonását azonos mennyiségű, TE (10 mM tris/tris (hidroximetil)-amino-metán/, 1 mM EDTA, pH 7,9) pufferrel telített fenollal végeztük el. A fenol hozzáadása után a mintákat kiméletesen összeráztuk, majd centrifugálással (5 perc, 6000 g) szeparáltuk a fázisokat. A DNS ekkor a felső vizes fázisba került. A felső vizes fázis fenolos tisztítását még kétszer megismételtük, majd szintén azonos mennyiségű kloroform és izoamilalkohol 24:1 arányú keverékével mostuk át, hogy a mintában maradt fenolt teljes mértékben eltávolítsuk. Ezután a vizes fázishoz 1/10 térfogat mennyiségű 3 M nátriumacetátot (NaAc, pH 5,2), valamint 2,5-szeres mennyiségű abszolút alkoholt (-20°C) adtunk, és 1 éjszakára -70°C-ra téve kicsaptuk a DNS-t. Centrifugálás (30 perc, 17900 g, 4°C), 70%-os alkoholos mosás és rövid szárítás után, steril MilliQ vízben (Millipore) oldottuk fel a vírus-DNS-t (Benkő és mtsai, 1988, 1990).

A 91/88-as számú kevert izolátumból parvovírus-DNS tisztítása esetén a fenolos kivonást megelőzően 0,1 M végkoncentrációban nátrium-kloridot (NaCl) adtunk a mintához és 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, ami elősegítette az egymással komplementer pozitív és negatív DNS-szálak összetapadását.

Molekuláris klónozás

Az izolátumokból kivont adenovírus-DNS-t *Pst*I, majd *Sma*I restrikciós enzimekkel vágtuk. Megállapítottuk, hogy a keletkezett fragmentumok mérete alkalmas a molekuláris klónozáshoz. Mivel a DNS mennyisége nem volt elegendő fizikai térkép elkészítéséhez, véletlenszerű klónozást végeztünk. Kezdetben a *Pst*I fragmentumokat tartalmazó klónok

kétoldali szekvenálásával próbáltuk azok genombeli elhelyezkedését meghatározni, majd a *Pst*I klónok által le nem fedett területet *Sma*I klónokkal, illetve polimeráz láncreakció (PCR) segítségével kinyerni.

Restriktációs emésztések

A felhasznált restriktációs enzimek New England Biolabs, Amersham, Fermentas, GIBCO vagy QBIOSGENE gyártmányúak voltak. Az emésztéseket 20, 30, 50 vagy 100 il végértéigatban végeztük, enzim, és az enzimnek megfelelő összetételű puffer hozzáadásával, a gyártó által ajánlott hőmérsékleten 1,5-2 órán keresztül. Az enzim mennyiségét az emésztendő DNS mennyisége alapján határoztuk meg, az emésztés eredményességét gélelektroforézissel ellenőriztük.

Gélelektroforézis

A DNS fragmentumokat elektroforézissel különítettük el méretüktől függően 0,6-1,5%-os agaróz (BRL) gélben, amit 0,5-szörös töménységű TBE oldattal készítettünk (0,045 M trisz-borát, 0,001 M EDTA pH 8; Maniatis és mtsai, 1982). A gélhez a kiöntés előtt a DNS láthatóvá tétele érdekében etidium-bromidot adtunk 0,5 µg/ml végkoncentrációban. Az elektroforézis horizontális gélrendszerben, 0,5-szörös TBE pufferben történt, 3-4 V/cm feszültséggel. A mintafelvívő puffer (6-szoros) 2,5 mg/ml brómfenolkéket és 400 mg/ml szacharózt tartalmazott. Archiváláshoz az elektroforézist követően (302 nm hullámhosszú) UV átvilágító lámpán digitális kamerával (Kodak Digital Science DC120) fényképeztük a géleket és a Kodak Digital Science 1D v. 3.0.2. programot használtuk. A fragmentumok méretének meghatározásához molekulatömeg standardként *Pst*I enzimmel hasított ϕ fág-DNS-t (Fermentas) használtunk.

DNS fragmentumok izolálása gélből

A DNS fragmentumokat és PCR termékeket agaróz gélben történő elektroforézist követően a gélből kivágtuk, majd GeneClean III kit (Bio101) vagy üvegyapot segítségével tisztítottuk. Üvegyapot használata esetén a kivágott gélből a DNS fragmentumot is tartalmazó folyékony fázist centrifugálással (6000 g) nyertük ki, ezt követően a fenolos tisztítási lépést elhagyva (Brosius és mtsai, 1996) a DNS-t NaAc és abszolút alkohol hozzáadásával kicsaptuk.

Ligálás

A DNS fragmentumok klónozásához megfelelő restriktív enzimmel, illetve enzimekkel vágott pBluescript II KS (Stratagene) plazmidot használtunk. A restriktív enzimek hatástalanítását a DNS kicsapásával érték el (1/10-ed mennyiségű 3 M NaAc, pH 5,2 és 2,5-szeres mennyiségű abszolút alkohol hozzáadásával). A kicsapott DNS-t centrifugáltuk (10 perc, 17900 g), 70%-os etanollal mostuk, majd rövid szárítás után MilliQ vízben oldottuk fel. Gyakran alkalmaztuk a Qbiogene által forgalmazott „Miniprep Express MatrixTM”-ot (BIO101) is. A kész emésztéshez az összes DNS megkötéséhez szükséges mennyiségű, de legalább azzal megegyező térfogatú mátrixot adtunk, majd az izolálást a gyártó által előírt módon fejeztük be. A ligálás egy éjszakán át történt 4°C-on, általában 10 vagy 15 l térfogatban. A ligálási reakcióelegy 25-100 ng DNS fragmentumot, 6-25 ng emésztett plazmidot, megfelelő mennyiségű ligáló puffert és 5-7 egység (U) T4 DNS-ligázt (Fermentas vagy New England Biolabs) tartalmazott.

Baktériumok transzformálása

A ligálási reakcióelegy 1-3 µl-nyi mennyiségével XL-1 Blue, Sure-2, DH5-á vagy TOP10 jelzésű *E. coli* törzset transzformáltunk kétféle módszerrel:

1. Elektrokompetens sejtek előállítása (Maniatis és mtsai, 1982) után, Bio-Rad elektroporációs készülékkel (Gene Pulser System) a következő paraméterek beállításával: ellenállás: 200 Ω; kapacitás: 25 µF; feszültség: 2,5 kV.
2. Kalcium-klorid oldattal kémiai kompetenssé tett sejtek (Maniatis és mtsai, 1982) hőshockkal (42°C, 90 sec) történő kezelésével.

A transzformált baktériumokat ampicillin (30 i g/ml) tartalmú LB (Luria-Bertani) agar lemezekre szélesztettük. A baktériumokat 37°C-on egy éjszakán át inkubáltuk. A PV genom végfragmentumainak klónozása során Sure-2 törzset használtuk 30°C-os inkubáció mellett, hogy csökkentsük a rekombináció és deléción esélyét az ITR szekvenciákban. Az agarlemezek ampicillin tartalma biztosította, hogy csak a plazmiddal rendelkező baktériumok szaporodjanak. A β-galaktozidáz aktivitás kimutatására a táptalajon 40 i l X-galt (5-bromo-4-chloro-3-índoyl-β-D galaktozid; 20 mg/ml dimetil-formamidban) és 4 i l IPTG-t (izopropil-tiogalaktozidáz; 200 mg/ml) szélesztettünk szét. Az IPTG által indukált β-galaktozidáz aktivitás esetén az X-gal lebomlása miatt, a baktérium telepek kék színűek lettek (kék-fehér szelekció). A plazmidba beépült fragmentum jelenlétének valószínűségét a színreakció elmaradása mutatta. Az inzert felvétele nélkül visszazáródott plazmidot tartalmazó baktériumok telepei megkékültek, míg az idegen DNS szakasz beépülése meggátolta a β-galaktozidáz kifejeződését.

A klónok tesztelése

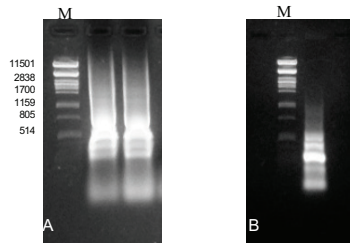
A fehér telepeket 2-3 ml ampicillin tartalmú folyékony LB tápoldatba oltottuk, és egy éjszakán át ráztattuk 37°C-on. A plazmid-DNS tisztításához az „alkalikus lízis” módszerét alkalmaztuk. 1,5 ml baktériumkultúrát Eppendorf csőben centrifugáltunk (6000 g, 1 perc). A felülúszó gondos eltávolítása után az üledéket 100 µl TEG oldatban (25 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA, 50 mM glükóz) kémcsoházó segítségével alaposan szuszpendáltuk. A csövekhez 200 µl frissen készített NaOH (0,2 M) és SDS (1%) tartalmú oldatot adtunk, majd kíméletesen összekevertük. Ezután 150 µl kálium-acetát oldatot (3 M KAc, 2 M tömény ecetsav, pH 4,9) adtunk a csövekhez, amelyeket újabb keverés után 10 percig jégen inkubáltuk. A keletkezett csapadékot centrifugálással ülepítettük (17900 g; 10 perc), és a felülúszót új csövekbe tettük. A 2,5-szörös térfogatú (1000 µl) 96%-os etanol hozzáadásával kicsaptuk a plazmid DNS-t, majd centrifugálással ülepítettük (17900 g; 10 perc), 70%-os etanollal mostuk, és vákuumcentrifugában (Speed-Vac) beszárítottuk. A DNS-t 40 µl, DN-áz mentes RN-áz tartalmú (20 µg/ml) MilliQ vízben oldottuk fel. A kitisztított plazmidok hozzávetőleges méretét, mennyiségét üres plazmid, illetve ismert mennyiségű molekulatömeg standardhoz viszonyítva gélelektroforézis segítségével becsültük meg mindegyik mintából 1-1 µl mennyiséget vizsgálva 1%-os gélen. A klónozott fragmentumok pontos méretét restrikciós enzimes emésztés segítségével állapítottuk meg.

Szubklónozás

A kétoldalról történő szekvenáláshoz a 600 bp-nál nagyobb méretű fragmentumokat szubklónoztuk. A nagyobb méretű fragmentumot tartalmazó plazmidokat restrikciós enzim(ek) segítségével vágtuk. Ezután a vektort „vizsgálva” szubklónokat készítettünk. Szükség esetén az enzimes hasítás után szabaddá váló fragmentumokat gélből való izolálás után megfelelő enzimmel vágott plazmidokba építettük be. A megfelelő restrikciós enzimek kiválasztása a szekvencia ismeretében a MapDraw program (Lasergene package, DNASTAR Inc.) vagy tesztelő emésztések segítségével történt. Egyes nagy méretű fragmentumokat gyakran vágó enzimmel (*Sau3AI*) végzett részleges emésztésekkel sikerült szubklónozni. Részleges emésztés során az enzim különböző méretű fragmentumokat hasított ki a plazmidból, amit az emésztés után „vizsálgáltunk”. Ennek a módszernek az a hátránya, hogy az enzimek gyakran bizonyos hasítóhelyeket előnyben részesítenek, így a keletkezett szubklónok sokszor nem mutattak megfelelő méretvariációt.

A végfragmentumok klónozása

Az kígyó-adenovírus (SnAdV-1) *Sma*I-gyel való véletlenszerű klónozása során nem sikerült a genom végeit klónozni. Ezért az AdV genom bal oldali végének klónozásához a legszélső, p32K gén egy részét is tartalmazó *Sma*I klón szekvenciája alapján primert terveztünk egyirányú PCR-hez (8/A ábra). Az így kapott egyszálú PCR termékhez egy ismert szekvenciájú oligonukleotidot kapcsolunk T4 RNS-ligázzal (New England Biolabs). Az oligonukleotidra tervezett primer segítségével PCR-rel (8/B ábra) már duplaszálú terméket kaptunk, amit pBluescript II KS plazmidba ligáltunk, majd szekvenáltunk. Mivel az ITR szekvenciája a genom két végén azonos, az ITR-re és a genom jobb végéhez legközelebb eső, ismert szekvenciájú klónra tervezett primerek segítségével a genom jobb végét is felerősítettük. Ezt a PCR terméket pGEM-T Vector System I kit (Promega) segítségével klónoztuk, majd szekvenáltuk.



8. ábra. (A) A kígyó-adenovírus bal végére tervezett egyirányú PCR reakció során keletkezett egyszálú termékelegy elektroforézise agaróz gélben (5 l az 50 l PCR termékéből). (B) Az egyirányú PCR termék új primer szakasszal történt ligálását követő, második PCR-rel nyert dupla szálú DNS. M: molekulatömeg standardként *Pst*I restrikciós enzimmel vágott ϕ 109-DNS-t használtunk. Az egyes fragmentumok méretét bázispárban adtam meg.

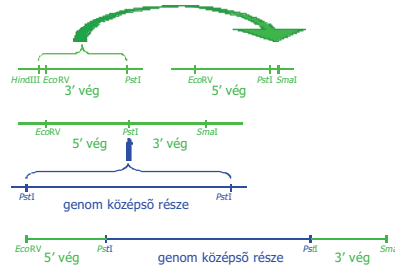
A kígyó-parvovírus klónozási stratégiája és szekvenálása

A királypityonból (*Python regius*) származó 91/88-as számú AdV izolátum *Pst*I restrikciós enzimmel végzett véletlenszerű klónozása során kaptuk a PV genom középső részét tartalmazó klónt. A PV genom végeit *Pst*I és *Eco*RV enzimmel emésztett pBluescript II KS plazmidba klónoztuk (9. ábra). A teljes PV genomot tartalmazó infekatív klón létrehozása céljából először a 3' véget tartalmazó klónt *Hind*III-mal megvágtuk, deoxynukleotid mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) hozzáadása után T4 polimerázzal (New England Biolabs; 15 perc, 12°C) kezelve tompa

véget hoztunk létre, majd *Pst*I enzimmel vágtuk meg és ligáltuk az 5' véget tartalmazó klónba, melyet *Pst*I és *Sma*I enzimekkel vágunk meg. A genom középső részét tartalmazó klónt megfelelő irányultságban beépítettük a végek közé. Mivel fizikai térkép készítésére nem került sor, az ismert szekvenciák alapján primereket terveztünk, és a PCR termékek szekvenálásával ellenőriztük, hogy nem volt-e hiányzó fragmentum a három klón között.

Ezzel a primerekkel két, körülbelül 300 bp, valamint az 5'-TCTTCTACGGCTGGACCTGC-3' és 5'-AACTGTCGTCGCGTGATT-3' primerpárral egy körülbelül 1000 bp hosszúságú fragmentumot erősítettünk fel és szekvenáltunk meg a közönséges óriáskígyóból (*Boa constrictor*) származó, 183b/88-as számú, PV-t is tartalmazó kevert izolátumból.

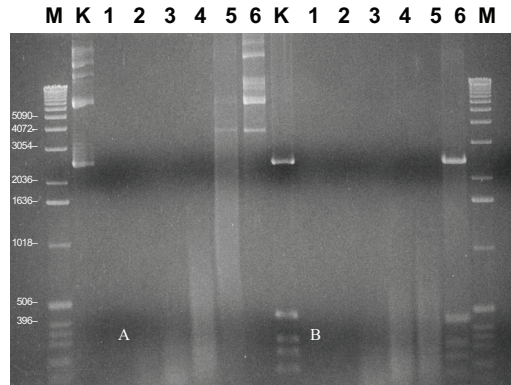
Parvovírus teljes genom klónozása (pKS)



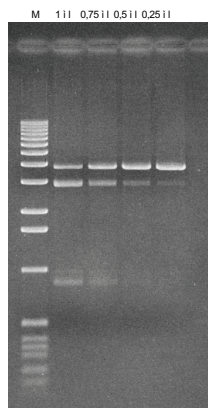
9. ábra. A kígyó parvovírus klónozási stratégiája.

A genom 3' és 5' végén található palindrom szekvenciákat tartalmazó ITR másodlagos szerkezete lehetetlenné tette a szekvenálást, azaz a szekvenálási reakció a hajtű szerkezethez érve leállt. A végek másodlagos szerkezetét DN-ázos (15 perc, 37°C) kezeléssel szüntettük meg. A DN-ázos kezelést emésztetlen, valamint *Pst*I és *Pvu*II enzimekkel linearizált a plazmidokon is elvégeztük. A reakciót 10% (v/v) 0,5 M EDTA-val (pH 5) állítottuk meg. Az optimális DN-áz koncentráció megállapításához háromszoros hígítási sort készítettünk, és az eredményt gélelektroforézissel ellenőriztük (10. ábra). A DN-ázos kezelés után az ITR-t részlegesen tudtuk szekvenálni, és az így kapott szekvenciát gyakran vágó restrikciós enzim keresése céljából a Webcutter 2.0 programmal elemeztük (<http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html>). Az ITR

részleges emésztéshez az *Eco0109I* restrikciós enzimet (New England Biolabs) választottuk ki. A végeket tartalmazó plazmidokat linearizáltuk, majd az *Eco0109I* restrikciós enzimből hígítási sort készítettünk, és a részleges emésztést 5 perces után (37°C) 10% (v/v) 0,5 M EDTA-val (pH 5) állítottuk meg. Az eredményt gélelektroforézissel ellenőriztük (11. ábra).



10. ábra. A kígyó-parvovírus 3' végét tartalmazó, vágatlan (A) és *PstI* és *PvuII* restrikciós enzimmel vágott (B) plazmidok emésztése különböző koncentrációjú DN-ázzal. A DN-áz koncentráció az 1–6. minták felé csökken. K: kontroll. M: molekulatömeg standard (1Kb DNA ladder; Invitrogen). Az egyes fragmentumok méretét bázispárban adtam meg.



11. ábra. A kígyó-parvovírus 5' végét tartalmazó *Pst*I-gyel vágott plazmid részleges emésztése *Eco*0109I restrikciós enzimmel (2000 unit): 1 i1, 0,75 i1, 0,5 i1 és 0,25 i1. M: molekulatömeg standard (1Kb DNA ladder; Invitrogen).

PCR vizsgálatok

Azokat az AdV genomszakaszokat, melyeket nem sikerült klónozni PCR segítségével erősítettük fel, majd szekvenáltuk. A primereket a már ismert szekvenciák alapján terveztük. Az egyik ilyen primerpárral (5'-GAGAGTAGTAGCTCCACCTGAAG-3' és 5'-ATGATGAGCCGAGACGGAGCCT-3') további két (IBD 27/00 és 968/12/00 számú), közönséges óriáskígyóból (*Boa constrictor*) izolált, Németországból származó AdV törzset vizsgáltunk meg.

Primerek tervezéséhez, az olvadási hőmérséklet megállapításához (T_m) a PRIMER DESIGNER Version 2.0. (Scientific & Educational Software) programot használtuk. A lánchosszabbítás idejét a várt PCR termék mérete alapján határoztuk meg (körülbelül 1000 nt/perc). PCR termékek közvetlen szekvenálása esetén legalább 4 független reakció termékeit kevertük össze, a Taq polimeráz (Sigma-Aldrich, Fermentas) által okozott esetleges hibák kiküszöbölése céljából. A PCR-t általában 50 μ l végtérfogatban végeztük. A reakcióelegy 5 μ l 10-szeres koncentrációjú puffert (500 mM KCl, 11 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl, pH 8,3), 50 μ M primert, 2,5 egység (U) DNS-polimeráz enzimet (Sigma-Aldrich, Fermentas), 1,5 μ l 10 mM

deoxynukleotid mixet (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0-2,5 µl 25 mM MgCl₂-t és 1-2 µl templát DNS-t (6-10 µg/ml) tartalmazott. A térfogatot steril MilliQ vízzel egészítettük ki 50 µl-re.

A reakciókat Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 2400 (USA) vagy MJ Research PTC-200 (USA) készülékekkel végeztük. Az alkalmazott ciklusok általában a következők voltak: 1 x 95°C/5perc; 35 x (94°C/30 sec, 52°C/30 sec, 72°C/120 sec); 1 x 72°C/5 perc.

DNS szekvenálás

Szekvenáláshoz a plazmid-DNS-t kezdetben a „Concert Rapid Plasmid MiniprepTM” készlettel (GIBCO) tisztítottuk, később áttértünk az „alkalikus lízissel” kivont plazmid-DNS „Miniprep Express MatrixTM”-szal (BIO101, Qbiogene) való tisztítására. A szekvenálási reakciót T3, T7, M13-20 és M13 primerekkel, BigDye Terminator V3.1. Cycle Sequencing (ABI) készlettel végeztük a gyártó utasításai szerint, majd az elektroforézis ABI 3100 kapilláris szekvenálón történt. Más esetekben a SequiThermTM Excel II, Long-readTM KIT-ALFTM készletet (Epicentre Technologies) használtuk, az elektroforézist pedig ALFTM Express (Pharmacia) szekvenálón hajtottuk végre. PCR termékek közvetlen szekvenálásához a Szegedi Biológiai Központ szolgáltatását vettük igénybe.

Szekvencia elemzés

A szekvencia ellenőrzése az ALFwin Sequence Analyser module v. 2.00.15. program segítségével, az elektroforetogram alapján manuálisan történt. A javított szekvenciák elemzése az EditSeq, SeqMan és MapDraw programokkal történt (Lasergene package, DNASTAR Inc.). A fehérjéket kódoló gének azonosítása a GenBank (NCBI) és a saját adenovírus adatbázissal (<http://www.vmi.hu/blast.htm>) szemben futó BLASTX, a nem kódoló DNS szekvenciák azonosítása BLASTN (Altschul és mtsai, 1990) homológia kereső programokkal történt. Feltételezett splicing esetén az akceptor és donor helyek megállapítása a NNSPLICE 0.9 version program segítségével történt (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html).

Filogenetikai számítások

Filogenetikai számításokhoz a PHYLIP programcsomagot használtuk (Phylogeny Inference Package, version 3.572c; <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>; Felsenstein, 1989).

A homológ szekvenciák illesztése a MultAlin (Corpet, 1988) programmal történt (<http://www.toulouse.inra.fr/multalin.html>). Az illesztések szerkesztéséhez a GeneDoc programot használtuk (<http://www.psc.edu/biomed/genedoc/>), majd eltávolítottuk azokat a szakaszokat (deléciók, hipervariábilis régiók), amelyek zavarnák a számításokat (Harrach és Benkő, 1998). A homológ régiókat tartalmazó illesztéseket a PHYLIP programnak megfelelő formátumban (phylip) mentettük el.

A vírusok közötti evolúciós kapcsolatot a nukleotid és aminosav (as) szekvencia illesztések parszimónia és távolsági mátrix („distance matrix”) analízisével vizsgáltuk.

Távolsági mátrix analízis esetén a számításokat DNADIST ("Kimura 2" paraméter algoritmus) vagy PROTDIST (Dayhoff's PAM 001 mátrix) programokkal végeztük. A távolsági mátrixokból a fákat a legtöbbször FITCH (Fitch-Margoliash számítás; global rearrangements opcióval), esetenként KITSCH programok (molekuláris óra alkalmazása) segítségével állítottuk elő. A maximum parszimónia analízist DNAPARS és PROTPARS programokkal végeztük, attól függően, hogy nukleotid, illetve aminosav szekvencia illesztéseket vittünk be adatként. Az így kapott fa topológiájának valószínűségét valamennyi módszer esetén bootstrap analízissel teszteltük, melyhez az illesztésekből először a SEQBOOT program segítségével vettünk 100-féle mintát. A DNADIST vagy PROTDIST, majd FITCH programok alkalmazását követően a CONSENSE program segítségével számítottuk ki a legvalószínűbb (konszenzus) fát és a bootstrap értékeket. A fákat a TreeView 1.5.2 program (Page, 1996; <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>) segítségével jelenítettük meg, majd a Microsoft Word-ben végeztük el végső stilizálását és a bootstrap értékek feltüntetését.

és 52K fehérjéket kódoló gének között helyeződő VA RNS-t kódoló szekvenciák nem találhatóak meg a SnAdV-1 genomban. A genom jobb végén a mókuscickány-adenovírus 105R génjével (Schöndorf és mtsai, 2003) homológ ORF-t azonosítottunk, de az *l* szálon.

Feltételezett proteáz vágási helyeket a következő fehérjék as szekvenciája alapján azonosítottunk: pIIIa, pVI, pVII, pVIII, pX, pTP és p32K.

2. táblázat. A kígyó-adenovírus feltételezett génjei és az általuk kódolt fehérjék.

Gén	Kódoló szál	Helyeződés	Aminosav	G+C%
p32K	<i>l</i>	1365-334	343	55,81
LH1	<i>r</i>	1381-1737	118	50,42
LH2	<i>r</i>	1734-2132	132	48,62
E1B 55K	<i>r</i>	2169-3290	373	52,23
IVa2 ^a	<i>l</i>	4628-3305, 5043-5036	443	47,22
DNS-polimeráz	<i>l</i>	7620-4363	1085	48,34
pTP ^a	<i>l</i>	9413-7596, 12274-12260	610	49,70
52K	<i>r</i>	9443-10411	322	50,15
pIIIa	<i>r</i>	10396-12243	615	50,22
III	<i>r</i>	12288-13640	450	49,59
pVII	<i>r</i>	13681-14028	115	54,31
pX	<i>r</i>	14048-14302	84	56,47
pVI	<i>r</i>	14369-15040	223	56,25
hexon	<i>r</i>	15063-17792	909	51,76
proteáz	<i>r</i>	17789-18394	201	49,83
DBP	<i>l</i>	19602-18409	397	49,83
100K	<i>r</i>	19639-21678	679	50,78
33K ^b	<i>r</i>	21677-21371, 22021-21786	180	51,93
pVIII	<i>r</i>	22046-22882	278	53,76
U exon ^a	<i>l</i>	23081-22905	58	48,02
fiber	<i>r</i>	23099-24346	415	51,20
E4.3	<i>l</i>	24886-24233	217	48,32
E4.2	<i>l</i>	25520-24870	216	43,93
E4.1	<i>l</i>	25960-25511	149	44,67
ORF1 ^c	<i>l</i>	26331-25993	112	54,28
RH1	<i>l</i>	26524-26318	68	47,34
105R	<i>l</i>	27144-26608	178	52,70

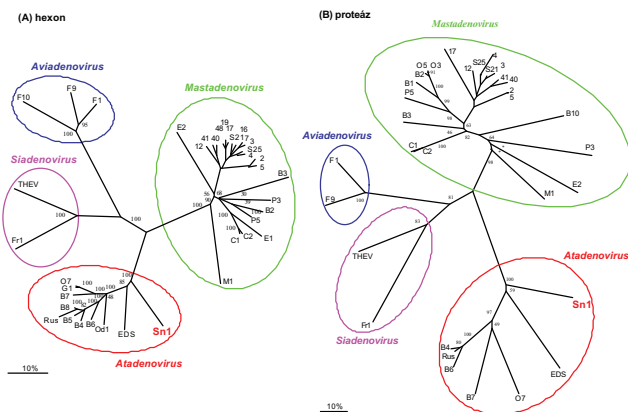
^aFeltételezett splicing. ^bFeltételezett splicing; splicing nélkül a feltételezett 22K fehérje keletkezik. ^cNem azonosított nyitott olvasási keret. *r*: jobb (right); *l*: bal (left).

3. táblázat. Valamennyi adenovírus nemzetség tagjaiban megtalálható homológ gének, illetve egy ORF méretének összehasonlítása (aminosav).

Gén	HAdV-2	FAdV-1	SnAdV-1	OAdV-7	FrAdV-1
IVa2	449	439	443	446	367
DNS-polimeráz	1198	1255	1085	1071	1108
pTP	671	575	610	641	627
52K	415	378	322	335	297
pIIIa	585	575	615	568	484
III	571	515	450	452	445
pVII	198	72	115	111	149
pX	80	188	84	71	57
pVI	250	223	223	221	217
hexon	968	942	909	911	920
proteáz	204	206	201	201	204
DBP	529	441	397	382	378
100K	805	984	679	625	631
33K	228	196	180	133	129
22K	195	184	104	59	107
pVIII	227	245	278	218	193
U exon	54	74	58	54	74
fiber	582	793/410	415	543	429

Filogenetikai számítások

A 13/A és B ábrán az AdV-ok hexon és proteáz génjeinek filogenetikai elemzése látható. Mindkét ábrán megfigyelhető, hogy az AdV-ok négy csoportja jól elkülönül. A SnAdV-1 mindkét esetben az *Atadenovirus* nemzetség tagjaival került egy csoportba. További elemzések (melyeknek eredményét itt illusztráció külön nem mutatja) ugyancsak a négy csoport elkülönülését mutatták akár nt, akár as szekvenciával végeztük a távolsági mátrix vagy maximum parszimónia analízist.

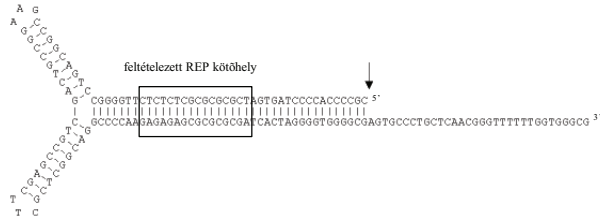


13. ábra. 39 hexon (A) és 33 proteáz (B) gén aminosav illesztésén alapuló, nem irányított számítással nyert (unrooted) filogenetikai fán az atadenovírusok jól elkülönülnek a többi, *Mast-*, *Avi-* és *Siadenovirus* nemzetségtől. Az ágak hosszúsága az egyes vírusok közötti filogenetikai távolsággal arányos, a mércé 10%-os mutációnak megfelelő. A bootstrap értékek 100 mintavételre vonatkoznak. A fa távolsági mátrix analízissel készült (elsőként PROTDIST programmal, a Dayhoff PAM 001 mátrixot használva, ezt követően a FITCH programmal, Global rearrangement opcióval). A bootstrap értékeket csak a főbb ágakon tüntettük fel. A bootstrap számítások nem erősítették meg az EAdV-2 és PAdV-3 helyét a proteáz fán (*), leggyakrabban a MAdV-1, PAdV-3, EAdV-2 sorrendet kaptuk (a bootstrap érték az utóbbi két elágazásban 56, illetve 48 volt). A vírus típusok általában az ICTV rövidítéseivel vannak jelölve (Benkő és mtsai, 2000), utalva a gazdafajra és a típus számra. Rövidítések: B: bovine; C: canine; EDS: egg drop syndrome; E: equine; F: fowl; Fr: frog; G: goat; M: murine; O: ovine; Od: odocoileus; P: porcine; S: simian; Sn: snake; Rus: bovine adenovirus strain Rus; THEV: turkey haemorrhagic enteritis virus. Humán adenovírusok csak a szerotípusuk számával vannak jelölve. Az illesztett szekvenciák a génbanki és az EMBO (European Molecular Biology Organization) adatbázisban találhatóak meg elérési számaik alapján.

A kígyó-parvovírus

A kígyó-parvovírus feltételezett genomszerveződése és általános tulajdonságai

A királypítonból izolált PV teljes genomját klónoztuk és szekvenáltuk (15. ábra). A SAAV genomja 4432 nt méretűnek bizonyult, mindkét végén rövid, 154 nt-ből álló ITR szekvencia található, melynek első 122 nt-ja Y alakú hajtű szerkezetet képez (14. ábra). Az Y két ágának szekvenciája eltérő. Az ITR feltételezett REP fehérje-kötő motívuma 17 nt távolságra található a trs-től (terminal resolution site). A királypítonból és a közönséges őriáskigyóból izolált PV-ok szekvenciája azonosnak bizonyult a PCR-rel felerősített szakaszok (összesen 1569 bp) szekvenciái alapján.



14. ábra. A serpentine adeno-asszociált vírus (SAAV) ITR (inverted terminal repeat) szekvenciájának másodlagos szerkezete. A 154 nukleotidból álló ITR palindrom szekvenciákat tartalmaz, és Y alakú hajtű szerkezetet képez. A feltételezett REP (nem-szerkezeti fehérje) kötéshelyet keretezés, a feltételezett trs (terminal resolution site) vágási helyet függőleges nyíl jelöli.

A pozitív szálon két ORF-et azonosítottunk, melyek a feltételezhetően az NS (REP1, REP2) és kapszid (VP1, VP2, VP3) fehérjéket kódolják. A genomban három feltételezett promóter régió található, ezekről írójának alternatív splicing-gal a REP (p5, p19) és VP (p40) gének. A SAAV mindkét génje a BLASTX analízis alapján a legnagyobb fokú hasonlóságot a dependovírusokkal, a főemlősök AAV-val és a vízimadarak PV-aival mutatta.

A baloldali ORF 562 as-ból álló feltételezett nem-szerkezeti fehérjét (NS1) kódol, mely 46,1% hasonlóságot mutat a GPV NS1-gyel és 49,9% hasonlóságot az AAV-5 NS1-gyel. A jobboldali ORF által kódolt feltételezett VP1 fehérje 726 as-ból áll. A VP1 megőrzöttebbnek bizonyult, 64,9% hasonlóságot mutatott a GPV, 63,8% hasonlóságot az AAV-5 VP1-gyel. A VP1 és VP3 gének translációja ATG kodonokkal (2030 nt, valamint 2600 nt) kezdődik, míg a

VP2 gén feltételezhetően a többi dependovírushoz hasonlóan egy atipikus start kodonnal (Srivastava és mtsai, 1983), az ACG-vel kezdődik.


```

CGCCGACCC CTATGATGCG GCGCGCTCT CTCTGGGCG CTGACGGCG AGGCGCTCA GCTCCGAGC TTGCTCGGC AGGCCCCAG AGAGAGCCG 100
CGCGATCACT AGGGTGGGG GAGTGGCCCT GCTCAACGGG TTTTGTGGG GGCGAGGCAA TGACGTGAGC GGACATGCTT GGACATGCTT TTGAGCAAGT 200
                    HF
                    TRN-p5
CCATATAGG AGTTCCGGG GATATGCAA TGAGCAATCG CGCAAGCAT TTGGGTAGT CACAGAGAT AAAAGAGAGT GAGAGAGAGT TTGAGGCCCC 300
                    p5
FAATTTTAA AGGATTTTA ACATCGCCT TTACAGAGT TGTGTTGCT TTGCCAAGAG ACAATAAGAA CTGTGTGAT GAGATAGAT ATCAGCCAGA 400
FTTGAAGAA GAGATGACT GCGTGGGA ATATTATACC AGTGAAGATG CCGAGTTAT CGGACTAGCG TATGCTGTC TAAGTGAAT TCGGAGATC 500
FTTGAAGAA AACTACAGG GTTGGCCAG GTTGAATGCT GTCCTACTCG TGTTTACCAC ATGCATGTTT TGTGGAACCA TCGTAGCTG AGTAAGCAGA 600
CTATGGAAG AAAAGTCAAT GAATCGGCTT GCGGTATAGT CGATACCTTT GGCTTAATTA ATCCAGAGA AGTCATGAGT ACCATATAG TTAAGAGCAA 700
CTATGAGAT AAAAGTGA GAGTCAATCA CTAAGAGTCT TATTTGAGA ACTACTTTTT CAGAAGACT TTAGCTCTCC CCAATATAG CGAGAGAGT 800
                    *
                    TATA-p19
                    GAGTGAAGA GAGAGGAGA AGTGGGCTG TGGGATTTA CGAATATCCT CCGTGGAGG CCATTTCTCC GAAATCTAC CAGAGATG GAGTATGGA 900
CGTCTCTTA GCACACAGG AATCGCGCG GAGACGGACC GGCACCTCGA GTGACTGAG GAACCCCGCA TTTTATGGA ACCATGACT GTTGTGGAA 1000
                    p19
ACATGAAAT ACTACAGAC GAGATTTCT CCGACGGCAC GCGCTTTGT ACTGTCTAT CTGCGCTCT ACTTCGGGTG TCGGGCAGT TAAAGAGCG 1100
CGAGCCAGC CGAACAACAT GATGACCGC ACCATGTGAC CAGAGATTA CCGACACAA GAAGAGGATG TATGCGAACC CCTACTGAA AATGAGATC 1200
ACAGAAATG GAAATGAT CCTATGATC CAGACTAGC AGCTGCTCC TCTACGGCT GAGCTCGAA GAACTTGGC AAGAGAAACA CACTGGCT 1300
GTATGGTCA GCTACTAGC GCAAAACAT CATGCTCAA GCTATTGCAC ATGCTGTAA ACTGTTGCT GGTGTAAT GGACTAATG AAATTTCC 1400
TCTGTAACT GTCCAGGAA ACTGTTATC TGTGGGAGG AGGCGAAGT GACAACAAA ATGGTGGAG CCGCTAATG TATACTGGG GATCTGCTG 1500
TACGTGAGA CATCAAGG AAACCCGCTG AAATGTGTC TCAACACCC TGTATTATTA CTAGCAATC TACATGRT CAAGTATAG ATGTATAG 1600
TCTGTACTT GAGCACAGG AACCCGTA GAGACGACT TTTATGTTCA GACTTAATC TAACTGCA TCGACTTTG CGAAGTAC CAGAGAGCAA 1700
                    TATA-p40
                    GCTAAACAT TTATCTCCG GGGGAGGC TTAAGGTTT AAGTCCACA TCGTCTAGA GTGCTTACA CAGAGATG TAAAGGCTA GCGCCGAGG 1800
                    *
                    feltételezett Shine dom.
                    GAAAGCTTA TTTTGGGAT GAGCCCAA AAGGAGGT CCGCTATG GATGCTCT TACCACTATGTTTACAT ATGATGAT GAGTACAG 1900
TAGAGAAAT TTCTAGAGA TTGCTAATC TAATCAATG ATGTTGATC ATGCTTTTC TTGTACGAA TGTATCTCT AATGCTTGA TGACATGGC 2000
                    11
                    12
                    13
                    14
                    15
                    16
                    17
                    18
                    19
                    20
                    21
                    22
                    23
                    24
                    25
                    26
                    27
                    28
                    29
                    30
                    31
                    32
                    33
                    34
                    35
                    36
                    37
                    38
                    39
                    40
                    41
                    42
                    43
                    44
                    45
                    46
                    47
                    48
                    49
                    50
                    51
                    52
                    53
                    54
                    55
                    56
                    57
                    58
                    59
                    60
                    61
                    62
                    63
                    64
                    65
                    66
                    67
                    68
                    69
                    70
                    71
                    72
                    73
                    74
                    75
                    76
                    77
                    78
                    79
                    80
                    81
                    82
                    83
                    84
                    85
                    86
                    87
                    88
                    89
                    90
                    91
                    92
                    93
                    94
                    95
                    96
                    97
                    98
                    99
                    100

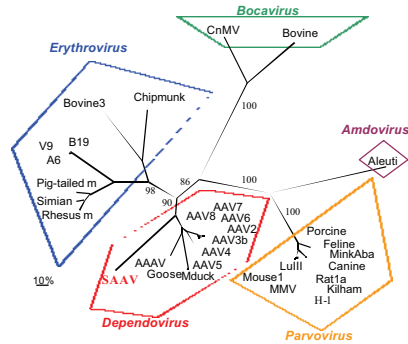
```

15. ábra. A serpentine adeno-asszociált vírus teljes nukleotid szekvenciája. Az ábrán a pozitív szál látható. Az inverted terminal repeat (ITR) és ezeken belül a másodlagos hajlító szerkezet (HP, hairpin) kialakításában szerepet játszó szekvenciákat ITR és HP, a feltételezett promóter régiókat aláhúzás jelöli. A csillagok (*) a transzkripció feltételezett start helyeit mutatják. A nem-

szerkezeti és szerkezeti fehérjék feltételezett start (p5 és p19: REP; p40: VP1, VP2, VP3) és stop (}1-4) kodonjait félkövér betűtípus emeli ki. A feltételezett splice donor és akceptor (A1, A2) helyeket félkövér „/” jelöli.

Filogenetikai számítások

Filogenetikai elemzést végeztünk a gerincesek PV-ainak mindkét (NS és VP) génjével. Az NS gén távolsági mátrix analízisének eredménye a 16. ábrán látható. A *Parvovirinae* alcsaládon belül öt egymástól jól elkülönülő csoportot kaptunk, és a SAAV mindkét esetben a vízimadarak PV-aival és a főemlősök AAV-aival került egy csoportba.



16. ábra. A nem-szerkezeti fehérjék aminosav illesztésén alapuló, gyökértelen filogenetikai fán a SAAV (serpentine adeno-asszociált vírus) egy csoportba került a vízimadarak parvovirusaival és az adeno-asszociált vírusokkal. Az ágak hosszúsága az egyes vírusok közötti filogenetikai távolsággal van összefüggésben, a mérce 10%-os mutációnak megfelelő. Bootstrap értékek 100 adathalmazra vonatkoznak. A fa távolsági mátrix analízissel készült (elsőként PROTDIST programmal, a Dayhoff PAM 001 mátrixot használva, ezt követően a FITCH programmal, global rearrangement opcióval). A bootstrap értékeket csak a főbb ágakon tüntettük fel. Rövidítések: AAV, adeno-asszociált vírus; AAV, avian AAV; B19 (V9, A6) humán parvovirusok; CnMV, Canine minute virus; a Lullii és H-1 parvovirusok szövettenyészetekből származnak; MinkAba, Mink enteritis virus Abashiri vonal; MMV, mice minute virus; Mduck, Muscovy duck.

A kigyó-adenovírus ITR szekvenciái

AdV-okban az **ITR** fontos szerepet játszik a DNS replikáció kezdeti szakaszában, kötőhelyként szolgál számos vírus és sejt eredetű szabályozó fehérje részére. Az ITR funkcióját a replikáció kezdeti szakaszában elsősorban humán AdV-okban tanulmányozták (Hatfield és Hearing, 1993; Hay és mtsai, 1995; Van der Vliet, 1995). Azok a DNS szekvencia motívumok, melyek transzkripció faktorok kötőhelyéül szolgálhatnak nagyfokú variabilitást mutatnak az állati AdV-okban.

Az ITR-ek hosszúsága változatos, de az egyes nemzetségeken belül hasonló. A leghosszabb ITR szekvenciával a mastadenovírusok rendelkeznek, a másik 3 nemzetség eddig ismert tagjaiban az ITR hossza nem éri el a 100 nt-ot. A PAdV-4 ITR 238 bp (Reddy és mtsai, 1998a), a BAdV-10 ITR meglepő módon 368 nt hosszúságú (Dán és mtsai, 2001). A legrövidebb ITR-rel a *Siadenovirus* nemzetségbe tartozó FrAdV-1 (36 bp; Davison és mtsai, 2000) és a THEV (39 bp; Pitcovski és mtsai, 1998) rendelkezik. A SnAdV-1 ITR szekvenciája 118 bp, a leghosszabb az eddig vizsgált atadenovírus ITR szekvenciák közül (BAdV-4: 59 bp, BAdV-5: 67 bp, Rus: 74 bp, Dán és mtsai, 2001; OAdV-7: 46 bp, Vrtai és mtsai, 1996a; EDS: 51 bp, Hess és mtsai, 1997).

Az ITR első 18 nt-ja az úgy nevezett „mag régió”, mely nélkülözhetetlen a DNS replikáció megindulásához (Challberg és Rawlins, 1984; Harris és Hay, 1988). A mastadenovírusokban a 8-19 nt közötti ATAATATACC szekvencia nagy fokú megőrzöttséget mutat. A HAdV-4 esetében a 9-18 nt között *in vitro* végzett pontmutációs vizsgálatok eredményei szerint a 12-16 nt közötti egyszeri nt változások nincsenek hatással a DNS replikációra (Temperley és mtsai, 1991), de fontos szerepet játszhatnak a DNS másodlagos szerkezetének kialakításában. A „mag régió” korántsem mutat olyan fokú megőrzöttséget, hogy egy konszenzus szekvenciával lehessen jellemezni valamennyi AdV nemzetséget. Az állati AdV-okból származó ismert ITR szekvenciák számának növekedésével a megőrzött rész először a 9-14 nt közötti ATAATA (Shinagawa és mtsai, 1983), majd a 10-13 nt közötti TAAT szekvenciára csökkent (Shinagawa és mtsai, 1987). Azonban az *Atadeno-*, *Aviadeno-* és *Siadenovirus* nemzetségben még ez a TAAT motívum sem megőrzött. Összefoglalva valamennyi nemzetségre csak a régió magas A+T tartalma jellemző.

Az eddig megismert ITR szekvenciák alapján valamennyi ITR szekvenciában az 1. és a 17. pozícióban citozin, a 8-13. pozícióban csak adenin és timin található, illetve nincs guanin az 1-17. nt pozícióban az EDS-vírus és a FrAdV-1 kivételével (Dán és mtsai, 2001). Ezeknek a kritériumoknak a SnAdV-1 ITR is megfelel.

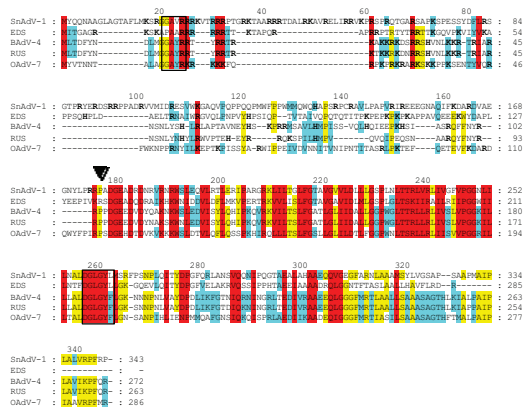
A HAdV-2-ben a „mag régió” kívül két blokkot írtak le a 25-51 nt között. Az itt található szekvencia motívumok fontos szerepet töltenek be a vírus replikációjában, kötőhelyként szolgálnak az NF1 és NFIII (de Vries és mtsai, 1985; Leegwater és mtsai, 1985; Pruijn és mtsai, 1988; Hatfield és Hearing, 1991). A humán és majom AdV-okban többször is ismétlődhetnek a sejt eredetű transzkripciós faktorok, az Sp1 és az ATF (Hatfield és Hearing, 1993) kötőhelyei. Az Sp1 és ATF kötőhelyek valószínűleg az ITR promóter aktivitásáért és az ITR-függő E1A stimulációért felelnek.

Az E1 régió

A p32K fehérje génje valamennyi atadenovírusban, így a SnAdV-1-ben is hiányzó E1A korai régió helyén az 1 szálon található (18. ábra), azonban más nemzetségek tagjaiban nem fordul elő. Mint a neve is mutatja, prekursor formájában keletkezik, éréséhez az AdV proteáz hasítása szükséges (Vrati és mtsai, 1996a). Az as szekvencia alapján több feltételezett proteolitikus felismerési helyet azonosítottunk, azonban ezek működéséről a 18. ábrán bekeretezett szignál kivételével még nincs kísérletes adat. Mivel p32K gén csak az atadenovírusokban fordul elő, a génre tervezett primerek alkalmasak e nemzetség tagjainak specifikus kimutatására (Élő, 2002).

Ma még kevés adat áll rendelkezésünkre a fehérje funkciójáról és pontos helyzetéről a kapszidban. A fehérje két doménből áll, az N-terminális rész igen variábilis, a C-terminális rész nagyobb fokú megőrzöttséget mutat (Élő és mtsai, 2003). Bár filogenetikai kapcsolat nem állapítható meg, az N-terminális domén kis fokú hasonlóságot mutatott a gerincesek protaminjaival, erre utal a bázikus as reziduumok nagy száma is. Az N-terminális régió közelében valamennyi eddig vizsgált szekvenciában mag lokalizációs helyeket (NLS, DNS-kötő funkció) azonosítottunk. A fehérje C-terminális doménje a *Bacillus megaterium* egyik fehérjéjével mutat hasonlóságot, mely a sporuláló Gram-pozitív baktériumok „kis savoldékony” (SAS) fehérjéi közé tartozik (Bagyan és mtsai, 1998). Mivel a SAS fehérjék szerepe a bakteriális DNS csomagolása és védelme a spórákban, feltételezzük, hogy a p32K szerkezeti fehérje hasonló funkciókat lát el az atadenovírusokban. Lehetséges, hogy a p32K a mastadenovírusokban megtalálható V-ös fehérjéhez hasonló funkciót tölt be az atadenovírusokban. Az V-ös fehérje a vírus-DNS csomagolásában és sejtmagba való szállításában játszik szerepet. A filogenetikai kapcsolat a SAS fehérjék és a p32K között nem bizonyított, a kétféle fehérje egymástól függetlenül is fejlődhetett hasonló funkciók betöltésére. Elképzelhető azonban, hogy valóban egy bakteriális eredetű fehérjéről van szó, mivel bizonyos

bakteriófágok kapszid fehérje szerkezeti homológiát mutat az AdV-ok hexon fehérjéjével, és ennek alapján esetleg közös őstük is feltételezhető (Benson és mtsai, 1999).



18. ábra. p32K aminosav szekvenciák illesztése. A két feltételezett domén határát fekete háromszög jelzi. Az N-terminális domén bázikus aminosavai vastag betűvel vannak kiemelve (R, K, H). A homológ régiók a megőrzöttségnek megfelelően árnyékoltak. A feltételezett proteolitikus felismerési helyet bekereteztük.

A p32K géntől jobbra, az *r* szálon a helyezkednek el a feltételezett LH1, LH2 és LH3 gének. A SnAdV-1 **LH1** gén homológiát csak a kerdődzök atadenovirusaiban, így az OAdV-7-ben, a BAqV-4-ben és a Rus törzsben azonosított LH1 génekkel mutat. Homológia kereséssel hasonló fehérjét nem sikerült találni az adatbázisokban. Az LH1 gén kifejeződését OAdV-7-ben már bizonyították (Khatri és Both, 1998), de funkciója mindeddig ismeretlen.

Az **LH2** gén megtalálható a SnAdV-1-ben, az OAdV-7-ben, a BAqV-4-ben, a Rus törzsben és az EDS-vírusban. Homológiát csak egymással mutatnak.

Az atadenovírusok **LH3** és a mastadenovírusok E1B 55K génjének as szekvenciája között homológia figyelhető meg. Humán AdV-ok replikációja során az E1B 55K és az E4 34K komplexet alkot, mely a p53-hoz hozzákapcsolódva meggátolja a sejtsztódás leállítását (onkogén hatás) és a korai sejthalált (Shenk, 2001).

A HAqV-5 esetében végzett mutációs vizsgálattal megállapították (Shen és mtsai, 2001), hogy mely as-aknak van szerepük az E1B 55K és E4 34K közötti komplex kialakulásában. Ezen

as-ak közül az egyik megtalálható az atadenovírusokban is. Az RNS-kötő motívum megőrzöttsége szintén arra utal, hogy a két nemzetség homológ génje között funkcionális hasonlóság is van.

Az E2 régió

Az E2 régió az AdV genom egyik legősibb részének tekinthető, mely az I szálon található, és két nagyobb egységre, a jobb oldali E2A és a baloldali E2B régióra osztható. Az E2A régióban elhelyezkedő **DBP** a SnAdV-1-ben 397 as-ból áll, 132 as-val rövidebb, mint a HAdV-2 DBP (529 as). A variabilis N-terminális részen található „rövidülés” jellemző a többi atadenovírusra (pl. OAdV-7: 382 as; EDS: 378 as), valamint a siadenovírusokra is (FrAdV-1: 378 as; THEV: 346 as). Az aviadenovírus DBP N-terminális végének mérete átmeneti helyet foglal el: FAdV-1, 441 as; FAdV-9, 437 as.

A HAdV-okban a DBP N-terminális részén két NLS-t írtak le (Morin és mtsai, 1989). Ennek megfelelő motívum található az OAdV-7-ben a 11-14. reziduumok között (KKRK). Hasonló pozícióban a BAdV-4-ben RKGR, a 63-66. reziduumok között pedig KKHK szekvencia található. A SnAdV-1 DBP N-terminális részén NLS motívum nem található. A fehérje C-terminális része nagyobb fokú megőrzöttséget mutat. A DBP cink-kötő fehérje (Eagle és Klessig, 1992). A SnAdV-1-ben csakúgy, mint a többi atadenovírusban, a HAdV-2-ben leírt HxC_xCxH cink-kötő motívum (273-286. as; Eagle és Klessig, 1992) első ciszteinje helyén triptofán található. A HAdV-2 DBP-jének szerkezeti vizsgálata azt mutatta, hogy a 284., 339., 355. pozícióban található cisztein reziduumok és a 286. pozícióban lévő hisztidin vesz részt egy cink atom megkötésében (Tucker és mtsai, 1994). A 275. pozícióban található cisztein jelenléte nem esszenciális. A második cink atom megkötésében a 396., 398., 450. és 467. pozícióban található cisztein reziduumok játszanak szerepet (Tucker és mtsai, 1994). Ezek a reziduumok a SnAdV-1-ben is megőrzöttek. Az atadenovírusokra jellemző a fehérje C-terminális végének közelében egy NLS motívum (SnAdV-1, RKRTRTTVAEVHKKKKK). A többi atadenovírushoz hasonlóan a SnAdV-1 DBP egy aszparaginsav és glutaminsav reziduumokból álló szakasszal végződik, szemben a többi AdV-sal, melyekben a vég közelében egy vagy két fenilalanin található.

A **TP** kovalensen kötődik az adenovírus-DNS 5' végéhez. Három doménből áll, melyeknek funkciója a DNS megkötése, a polimerázzal való interakció és szabályozás (Webster és mtsai, 1997a). A fertőzés késői szakaszában a virális proteáz vágja a pTP-t és egy köztes terméket (iTP) keresztül kialakul az érett TP. A HAdV-2-ben három (A, B és C) proteolitikus vágási helyet állapítottak meg (Webster és mtsai, 1994). Az A vágási hely a 175., a B vágási hely a 183. (csak a HAdV-2-ben és a HAdV-5-ben található meg), míg a C vágási hely a 349. as

reziduum után található és a vágás ezeken a helyeken az iTP-t, egy alternatív iTP-t, illetve az érett TP-t eredményezi. A SnAdV-1-ben az A vágási helyen VRGL'G, a C vágási helyen MRGG'A as szekvencia található, melyek valódi vágási szignálnak tűnnek. Kísérleti adatunk azonban nincs arra vonatkozóan, hogy a proteáz valóban működik-e ezeken a vágási helyeken vagy sem.

A HAdV-2-ben a 380-391. pozíciók között található NLS szekvencia motívum (Ramachandra és Padmanabhan, 1995) a SnAdV-1-ben is megőrzöttnek bizonyult: ³⁰¹LRQREGRRRAVTATMRRRR³¹⁸. A dCMP-vel kovalens kötést létesítő szerin szintén megőrzött, a SnAdV-1-ben az 551. pozícióban található.

Az OAdV-7 késői transzkriptumainak feltérképezése (Khatri és Both, 1998), valamint a többi atadenovirussal való hasonlóság alapján kerestük meg a pTP feltételezett splicing helyeit a SnAdV-1-ben (19. ábra). Bár sokan elmulasztják felismerni a pTP szekvenciákban a splicing-ra utaló motívumokat, eredményem is megerősíti Davison és mtsainak (2003) véleményét, hogy kivétel nélkül minden AdV pTP splicing során keletkezik.

```

Donor:
      Exon          Intron
      M A T R Q
      atggccactcgtcag gtagetat

Akceptor:
      Intron       Exon
      agacaaatttgccttttacag atcgaagcatggcacaggct

```

19. ábra. A kígyó-adenovírus pTP gén feltételezett splicing helye.

Az AdV-ok **DNS-polimeráz** génje a többi eukarióta vírushoz hasonlóan az á polimerázok csoportjába (B polimerázok családja) tartozik (Knopf, 1998). Az AdV-ok replikációja fehérje-priming mechanizmussal kezdődik, melynek során a polimeráz heterodimert képez a pTP-vel. A komplex az ITR „mag régiójához” kapcsolódik. A komplementer DNS szál felépülése a pTP szerin reziduumaéhoz (HAdV-2: S⁸⁰⁰) kovalensen kötődő dCMP-vel mint primerrel kezdődik és miután az első három nt összeépült, a komplex visszaugrik a templát első három nt-jához (Brenkman és mtsai, 2002).

A SnAdV-1 DNS-polimeráz génje az *l* szálon található a többi AdV-hoz hasonló pozícióban. Úgy tűnik, hogy kifejeződése során nincs splicing, azaz nincs ún. lefordítatlan bevezető szakasza. Ez megerősíti Davison és mtsai véleményét, akik úgy vélték, hogy splicing csak a mastadenovírusoknál fordul elő, de ott általános (Davison és mtsai, 2003). A polimeráz kódoló szakasz 25 nt hosszúságban átfed a szintén az *l* szálon található pTP kódoló szakasz

végével. A különböző prokariótákban és eukariótákban található DNS-polimerázokban Wang és mtsai 6 régiót azonosítottak, melyekben megőrzött motívumok találhatóak (1989). Hwang és mtsai egy újabb VII-es elnevezésű konzervatív régiót azonosítottak (1992). Valamennyi virális DNS-függő DNS-polimeráz rendelkezik javító funkcióval, 3'-5' exonukleáz aktivitással. Az exonukleáz doménben három motívum (Exo I-III, ahol az Exo II megegyezik a polimeráz IV-es motívumával) található, melyek az atadenovírusokban is megőrzöttek. A polimeráz domén I-VI motívuma közül a legnagyobb fokú megőrzöttséget az I-es motívum mutatja (YGDTD). Az előbbieken felsorolt motívumok a SnAdV-1-ben is megtalálhatóak.

A **Iva2** fehérje fontos szerepet játszik az MLP aktiválásában (Lutz és Kedinger, 1996), valamint az 52K fehérjével kölcsönhatásban a kapszid összeépülésében és a vírus-DNS becsomagolásában (Zhang és Imperiale, 2002). Kifejeződésének ideje átmeneti, a korai és a késői szakasz között történik. A feltételezett nukleozid trifoszfát kötőhely: GPTGSGKS, mely a mastadenovírusokban megőrzött (Gorbalenya és Koonin, 1989) a SnAdV-1-ben is megtalálható.

Késői gének

A késői gének az MLP által szabályozott középső transzkripció egységét alkotják, mely az *r* szálon helyeződik.

Az AdV **proteáz** a cisztein típusú endopeptidázok közé tartozik, számos AdV fehérje szerepel szubsztrátjaként a vírus replikációja során: pTP, pIIIa, pVI, pVII, pX, pVIII, atadenovírusokban a p32K, mastadenovírusokban a pV. Aktivitásáért felelős H54-E71-C122 triádot először HAdV-2-ben határozták meg, melynek háromdimenziós elrendeződése a papainnal mutat hasonlóságot (Ding és mtsai, 1996). Valamennyi szerotípusban a HAdV-5 kivételével, glutaminsav (E) helyett aszparaginsav (D) található a triádban. As szekvencia illesztés segítségével sikerült a feltételezett H55-D72-C122 triádot azonosítani a SnAdV-1-ben is. A 137-es prolin, mely erősen megőrzött valamennyi mastadenovírusban és fontos szerepet tulajdonítanak neki a proteáz virionba juttatásában (encapsidation) és aktiválásában (Rancourt és mtsai, 1995), hiányzik valamennyi eddig ismert avi- (Chiocca és mtsai, 1996; Ojkie és Nagy, 2000) és atadenovírusból (Harrach és mtsai, 1997; Barbezange és mtsai, 2000), valamint a THEV-ből (Pitcovski és mtsai, 1998). Azonban a FrAdV-1-ben (Davison és mtsai, 2000), WSAAdV-1-ben (Kovács és mtsai, 2003), valamint a SnAdV-1-ben megtalálható. Egy másik fontos reziduumot, a 104-es ciszteint szintén azonosítottunk. A HAdV-2-ben ez a reziduum létesít diszulfid hidat a pVIc 11 as-ból álló kofaktor 10-es ciszteinjével, ezáltal több ezerszeresére fokozva az enzimaktivitást (Webster és mtsai, 1993). A pVIc kofaktor a pVI-ből képződik proteolitikus hasítás révén, annak harmadik, C-terminális darabja.

Mastadenovirus

II
H2 : M-SILSPSNNTGWGLRFPFSK---MFGGAKKRSQHPVVRGHYRFPWGAHKRGRTGR : 54
H5 : M-SILSPSNNTGWGLRFPFSK---MFGGAKKRSQHPVVRGHYRFPWGAHKRGRTGR : 54
H4 : M-SIFLSPSNNTGWGLRFPFSK---MYGGAXQRSTQHPVVRGHYRFPWGAHKRGRTGR : 54
H40 : M-SILSPSNNTGWGLRFPFSK---MYGGAKKRSQHPVVRGHYRFPWGAHKRGRTGR : 53
C1 : M-AILLSPSNNTGWGLRFPFSK---LFGGAKKRSQHPVVRGHYRFPWGAHKRGRTGR : 52
C2 : M-AILLSPSNNTGWGLRFPFSK---LFGGAKKRSQHPVVRGHYRFPWGAHKRGRTGR : 53
P3 : M-AILLSPSNNTGWGLRFPFSK---MYGGARRLSPDHVIVRRHYRTNWGSLKGRVAP : 52
B2 : M-AILLSPSNNTGWGLRFPFSK---MYGGARRLSPDHVIVRRHYRTNWGSLKGRVAP : 52
B3 : M-AILLSPSNNTGWGLRFPFSK---MYGGARRLSPDHVIVRRHYRTNWGSLKGRVAP : 52
M1 : M-SILSPSNNTGWGLRFPFSK---MYGGAKKRSQHPVVRGHYRFPWGAHKRGRTGR : 53

Atadenovirus

III
EDS : M-SILMSPADNTGWGLRFPFSK---LRATGLRFSEREVVRVRSYRAQWQQLNKRKSAR : 53
O7 : M-SILMSPADNTGWGLRFPFSK---LRATGLRFSEREVVRVRSYRAQWQQLNKRKSAR : 53
B4 : M-SILMSPADNTGWGLRFPFSK---LRATGLRFSEREVVRVRSYRAQWQQLNKRKSAR : 54
Rus : M-SILMSPADNTGWGLRFPFSK---LRATGLRFSEREVVRVRSYRAQWQQLNKRKSAR : 52
Po1 : M-SILMSPADNTGWGLRFPFSK---LRATGLRFSEREVVRVRSYRAQWQQLNKRKSAR : 42
Sn1 : M-SILMSPADNTGWGLRFPFSK---LRATGLRFSEREVVRVRSYRAQWQQLNKRKSAR : 53

Aviadenovirus

II
F1 : M-SILSPSNNTGWGLRFPFSK---LTLRQLLGLSRRRRR--- : 50
F9 : M-SILSPSNNTGWGLRFPFSK---LTLRQLLGLSRRRRR--- : 42
F10 : M-SILSPSNNTGWGLRFPFSK---LTLRQLLGLSRRRRR--- : 53

Siadenovirus

I
Fr1 : MTAVLLSPADNTGWGLRFPFSK---LTLRQLLGLSRRRRR--- : 56
THEV : MHSVVSFGDSRQWGIIGNSMRDYLLIGGALQPSDIYTVRREHRRRRRPTAQTG--- : 56

20. ábra. Az eddig elfogadott négy nemzetségbe tartozó adenovírusok pVII fehérjéjének N-terminális részének aminosav szekvencia illesztése. A különböző típusú (I, II, III) feltételezett proteolitikus felismerési helyeket különböző színek jelölik. A rövidítések megegyeznek a 13. ábrán felsoroltakkal.

A prekursor fehérjék proteolitikus hasítása nélkülözhetetlen a fertőzőképes virion keletkezése szempontjából (Weber, 1995). Kétféle konszenzus szekvenciát állapítottak meg különböző humán és emlős AdV-ok prekursor fehérjéinek vizsgálatok, így az I-es típusú (ML/I)XGGX és a II-es típusú (ML/I)XGX'G proteolitikus felismerési helyeket (Webster és mtsai, 1989; Anderson, 1973). Az OAdV-7 vizsgálatok peptid szekvenálással a pVII fehérjében egy újabb proteolitikus felismerési helyet (ML/I)XAX'G (III-as típus) állapítottak meg. A II-es típus új változatát (NTGW'G) is leírták méghozzá valamennyi nemzetségben (Vrati és mtsai, 1996a). A pVII fehérjében I-es típusú proteolitikus felismerési hely a mastadenovírusokban és siadenovírusokban fordul elő (20. ábra). A III-as típust az eddig megismert atadenovírus pVII szekvenciákban tudtuk azonosítani. Az SnAdV-1-ben az IRAT'G as szekvencia található az adott helyen. Feltételezhetjük, hogy ez is működő vágási szignál. A HAdV-4 pTP-ben a QRGF'G felismerési helyet azonosították (Webster és mtsai, 1997b). Ezáltal

a proteolitikus vágási motívumok szekvenciáinak konszenzusa (N/M/L/I/Q)X(A/G)X'G vagy (M/L/I)XGG'X.

Az **52K** és **55K** fehérje a 48 kD-os prekursor fehérje két különböző foszforilált formája, szerepük a virionok összeépülésében van (Hasson és mtsai, 1992). Kimutathatók üres kapszidokban, átmeneti részecskékben és fiatal virionokban, nem mutathatók ki azonban az érett virionokból. Valószínűleg „állványként” funkcionálnak a vírus összeépülése során. A SnAdV-1 52K fehérjeje a többi atadenovirushoz hasonlóan rövidebb (322 as), mint a HAdV-2 52K fehérjeje (416 as).

A **pIIIa** fehérje hidat képez a pVII-es fehérje és a peripentonális hexonok között. A fehérje C-terminálisának közelében humán AdV-okban az (M/L/I)XGG'X proteáz felismerési hely, atadenovírusokban másik típusú, (M/L/I)XGX'G felismerési hely fordul elő. Az OAdV-7-ben az LIGH'G as szekvencia található a C-terminálustól 20 as távolságra, azonban nem sikerült a vágási hely után található peptidet izolálni (Vrati és mtsai, 1996a). A SnAdV-1 pIIIa C-terminális végéhez közel a VSGT'G szekvencia található, ez azonban egyik proteolitikus felismerési hely típusba sem sorolható be. Hogy valóban működő vágási helyről van-e szó kísérletesen kellene bebizonyítani, de valószínű, mivel a valin az M, L, I-vel együtt a hidrofób as-ak közé tartozik.

A **penton alap** fehérje fontos szerepet játszik a vírus sejtbe való bejutásában (Wickham és mtsai, 1993). As szekvenciája erősen konzervatív, ami arra utal, hogy a különböző mutációk csökkenthetik a vírus életképességét. Számos HAdV-ban az RGD motívum fontos szerepet játszik a sejt felületi integrinokkal (á, á₃, á, á₂) való kölcsönhatásban (Mathias és mtsai, 1994), azonban a SnAdV-1-ben és több más ismert szekvenciájú AdV-ban ez a motívum nem található meg (HAdV-40, Davison és mtsai, 1993; FAdV-1, Chiocea és mtsai, 1996; OAdV-7, Vrati és mtsai, 1996a; EDS, Hess és mtsai, 1997; MAdV-1, Meissner és mtsai, 1997; CAdV-1, Morrison és mtsai, 1997; THEV, Pitcovski és mtsai, 1998; PAdV-3, Reddy és mtsai, 1998a; BAdV-3, Reddy és mtsai, 1998b; PAdV-5, Nagy és mtsai, 2001). Az LDV motívum az á₄ integrinhez kötődik, ennek helyén a SnAdV-1-ben az LDL motívum található. Az RLSNLLG fiber-kötő motívum valamennyi AdV-ban, így a SnAdV-1-ben is megőrzött (RISNMLG).

A **pVII** fehérje valószínűleg a vírus-DNS csomagolásában játszik szerepet, erre utal az erősen bázikus (K, R) as-ak nagy száma is. A SnAdV-1-ben, mint már említettem, a többi atadenovirushoz hasonlóan III-as típusú felismerési hely fordul elő szemben a mastadenovírusokkal és az aviadenovírusokkal, melyekben I-es és II-es típusú proteolitikus felismerési hely található.

A **pX** fehérje nagyon variábilis a feltételezett transzmembrán domént tartalmazó C-terminális régió kivételével, ami viszont komoly mértékű megőrzöttséget mutat. A pX fehérje

szekenciájában a többi atadenovirushoz hasonlóan a C-terminális régió közelében egyetlen feltételezett proteolitikus felismerési helyet azonosítottunk (21. ábra; MRGG'F). Néhány mastadenovirusban a pX N-terminális részén egy második felismerési helyet is leírtak (Rusvai és mtsai, 2000). Az aviadenovirusokban pedig három feltételezett proteolitikus felismerési hely található (Sheppard és Trist, 1993; Chiocca és mtsai, 1996).

Mastadenovirus

```

E2  MDTYRVTYRIVVYVTR..VLRLESRGLV.....RRVARRRSGGGI FLPALFPIIAAAGIPIGIAVVAQASRR
F5  MIVGQRLTYRIVVYVTR..ITVYRNRGLV.....RRFLRRQRSGGGI FLPALVPIIAAAGIPIGIAVVAQASRR
B3  MSFRGLTYRILIPVALS..GRRRRTGLGGI[SAYLLG....RRRRRAGQRLLGGI FLPALFPIIAAAGIPIGIAVVAQASRR
M1  MFAVGLTYRIVVYVTR..RRRRRSGGGI[SILRR.....RRRRRV...RKGDI FLPALFPIIAAAGIPIGIAVVAQASRR
T51  MRSKVTYRILIPVSTA..TSSRRRGLGGI.....RVRRR...RLKGI FLPALFPIIAAAGIPIGIAVVAQASRR
P3  MLTYRILRIVVTR.....RFRLLGGI[FVAAPRSG...GRRRRGRSGGGI ILPALVPIIAAAGIPIGIAVVAQASRR
C1  MGRNVTYRILRIVVTR.....ITGA[GRRRGR.....RTR..TKGRSGGGI FLPALFPIIAAAGIPIGIAVVAQASRR
C2  MGRNVTYRILRIVVTR.....ITGA[GRRRGR.....RFRGIRGRSGGGI FLPALFPIIAAAGIPIGIAVVAQASRR
H11  MALTCLRIVPTTYGRNSRRRGGI[GR.....RVRRRRAIPQLGGI FLPALFPIIAAAGIPIGIAVVAQASRR
S21  MALTCLRIVPTTYGRNSRRRGGI[GR.....RRRRRRRAIPQLGGI FLPALFPIIAAAGIPIGIAVVAQASRR
S25  MALTCLRIVPTTYGRNSRRRGGI[GR.....RRRRRRRAIPQLGGI FLPALFPIIAAAGIPIGIAVVAQASRR
H17  MALTCLRIPVIVYGR..SRRRRGGI[GL.....RRRRRARRRRLGGI FLPALFPIIAAAGIPIGIAVVAQASRR
H40  MALTCLRIPVIVYGR..SRRRRGGI[GL.....RRRRRARRRRLGGI FLPALFPIIAAAGIPIGIAVVAQASRR
H12  MALTCLRIPVIVYGR..SRRRRGGI[GL.....RFRRRRSGGGI ILPALFPIIAAAGIPIGIAVVAQASRR
H2  MALTCLRIPVIVYGR..SRRRRGGI[GLTGG[RRRRRRRARRRSGGGI ILPALFPIIAAAGIPIGIAVVAQASRR
H5  MALTCLRIPVIVYGR..SRRRRGGI[GLTGG[RRRRRRRARRRSGGGI ILPALFPIIAAAGIPIGIAVVAQASRR

```

Atadenovirus

```

E8S  MRSREYGLYGRHVVYRYSQVARRRRLGGI FLPALFPIIAAAGIPIGIAVVAQASRR
E4  MIVVGLTYRIVVYVTR..VLRLESRGLV.....RRVARRRSGGGI FLPALFPIIAAAGIPIGIAVVAQASRR
O7  MIVVGLTYRIVVYVTR..VLRLESRGLV.....RRVARRRSGGGI FLPALFPIIAAAGIPIGIAVVAQASRR
Sn1  MARLAKRRTYRFRRTTRTYVTRTASTYRVRAGRIYRTSKTIVGTRRSGGGI FLPALFPIIAAAGIPIGIAVVAQASRR

```

Aviadenovirus

```

F1  MFAVLLTGG[RTAK..GGRASRRVVKPLPGARRKRAV.....TPVVTATASERAALTNLARRLGRQDYAMRPAVDTSPVASEAA
F9  MFAVLLTGG[RTAKRARRASTARRRLEAKLAKTRRTRSVNGKRRSPNVAVAVPFTTAAERAAQLNQLRQDQYAMRPAVDTSPVASEAA
F10 MFAVLLTGG[RAASRRRTYGRRRRVAVYVTRRSGRRSGVRRS.....SIVYVGTATASERAALNQLRQDQYAMRPAVDTSPVASEAA
Dn1  MFAVLLTGG[RRRRRARRRRTYGRRRRVAVYVTRRSGRRSGVRRS.....SIVYVGTATASERAALNQLRQDQYAMRPAVDTSPVASEAA
F1  KAAASGTPATARRLANTLAAVAVVTT[.....GRRR.....RTARRRRLGGI FLPALFPIIAAAGIPIGIAVVAQASRR
F9  LAAAGGATARRMTOFTTAAVAVVTT[.....GRRR.....RTARRRRLGGI FLPALFPIIAAAGIPIGIAVVAQASRR
F10 KAAASGAAVYRDLTTOATAVAVVTT[.....RRRR.....TGARRRSGGGI FLPALFPIIAAAGIPIGIAVVAQASRR
Fn1  KAAASGATARRMTOFTTAAVAVVTT[AGCAGAS...PGALLRRAGARRRRLGGI FLPALFPIIAAAGIPIGIAVVAQASRR

```

Siadenovirus

```

TREV  MFENLAFRRGLKTRNVPFNSRLGGI FVVVLLVLLSLLGAAPIAGTVIAARRNK
Fz1  MFENLAFRRGLTIRKPKISFRRLGGI FLP.LLVPIIAAAGIPIGIAVVAQASRR

```

21. ábra. A pX fehérjében a feltételezett erősen megőrzött transzmembrán domént ibolya színű betűk jelzik. A feltételezett és azonosított proteáz vágási helyeket függőleges vonal jelzi. A felismerési helyek konszenzusa (M/L/I/V/F)XGG'X és (M/L/I/V/N/Q)X(A/G)X'G, ahol az első aminosav reziduum kevésbé megőrzött, mint az irodalomban leírtak (lásd fent).

Az érett VI-os szerkezeti fehérje a kapszid felépítésében vesz részt, míg prekuzora a hexon kapszomerek transzportjában játszik szerepet. A SnAdV-1 pVI fehérje N-terminális végétől 24 as távolságra I-es típusú proteolitikus felismerési hely (MSGG'F), C-terminális végétől 15 as távolságra II-es típusú proteolitikus felismerési hely (MLGD'G) található. A második vágási helynél történő proteolitikus hasítás eredményeként jön létre a 11 as-ból álló peptid (GVCYRSKRYCY), ami a HAdV-2 pVIc kofaktorjának felel meg (Webster és mtsai, 1993).

A proteáz aktivitása a virionok összeépülésekor és azt megelőzően igen alacsony. Összeépülés után kivágja a pVI-ból a pVIc kofaktort, mely a proteázhoz kapcsolódik és nagy mértékben fokozza annak aktivitását. Az eddig ismert szekenciák alapján a pVIc kofaktor

konszenzus szekvenciája G(V/L)XXXXXXXXC(F/Y). A kofaktor proteázzal összekapcsolódott formájának háromdimenziós szerkezetét röntgen-kristallográfiával állapították meg (Ding és mtsai, 1996).

A **hexon** az AdV kapszid legfőbb alkotóeleme, ami típus-, faj- és nemzetség-specifikus antigén determinánsokat tartalmaz (Norrby és Wadell, 1969; Willcox és Mautner, 1976; Ádám és mtsai, 1996). A hexon fehérje három azonos polipeptidből áll (van Oostrum és mtsai, 1987). Mivel szekvenciája számos humán és állati eredetű AdV törzsből ismert, és az szekvenciája viszonylag megőrzött, kimondottan alkalmas filogenetikai számítások elvégzésére, valamint nemzetség-specifikus tulajdonságok vizsgálatára. A HAdV-2 hexon háromdimenziós felépítését már meghatározták (Roberts és mtsai, 1986). A fehérje nagy sűrűségű alapi részét két párhuzamos és ellentétes irányú α -redőkből álló henger (P1 és P2) alkotja, míg a háromszög alakú csúcsi rész három hurokból áll (I_1 , I_2 és I_3). Ez a három hurok a virion felületén található. A α -redőkből kialakult alapi rész szekvenciája erősen konzervatív régiókból áll, melyeket variábilis és hipervariábilis régiókat tartalmazó hurkok szekvenciái szakítanak meg (Toogood és Hay, 1988; Weber és mtsai, 1994; Sheppard és mtsai, 1995; Crawford-Mikszta és Schnurr, 1996; Reubel és Studdert, 1997). A hármas számú hurok (I_3) nem nyúlik ki a virion felületére, szekvenciája nagyobb fokú megőrzöttséget mutat a többi hurokhoz képest. A legtöbb AdV-ből és a SnAdV-1-ből is hiányzik az egyes HAdV-okban az I_1 -es hurok nagy számú savas as-at tartalmazó régiója (pl. HAdV-2: 139-170 as). Korábban azt feltételezték, hogy az I_1 hurok gazda-specifikus régió (Crawford-Mikszta és Schnurr, 1996), ennek azonban ellentmond, hogy a különféle gazdafajokból (kígyó, madár, erszényes, kérődző) izolált atadenovírusok az szekvenciája egymással mutatja a legnagyobb hasonlóságot.

A **100 kD-os foszfoprotein (100K)** a hexon monomerekkel komplexet alkotva irányítja azok trimerizációját, és részt vesz a hexon trimer sejtmagba történő szállításában is. A 100K fehérje nem mutatható ki az érett virionokból (Riley és Flint, 1993). A SnAdV-1-ben a 100K fehérjét 679 as építi fel. A legnagyobb fokú hasonlóságot az OAdV-7 (azonosság: 44,4%, hasonlóság: 60,0%) és a BAdV-4 (azonosság: 44,8%, hasonlóság: 60,0%) 100K fehérjéjével mutatja. A SnAdV-1 100K 3' vége 308 nt hosszúságú szakaszon átfed a 33K-t kódoló gén 5' végével (másik leolvasási keretben). A BAdV-4-ben és az OAdV-7-ben az átfedés mindössze 121 (Dán, 2001), illetve 127 nt (Vrati és mtsai, 1995). Ennek oka, hogy a SnAdV-1 33K hosszabb (180 as), mint a BAdV-4 (134 as) és az OAdV-7 33K (133 as).

A **33K** fehérje a késői fázis kezdeti szakaszában termelődik és elsősorban a fertőzött sejtek magjában található. Legfontosabb szerepe valószínűleg a virionok összeépülésében, a gazdasejt fehérje termelésének leállításában van (Fessler és Young, 1999). A HAdV-2-ben a 33K fehérjét kódoló mRNS-ben egy 202 nt hosszúságú intront mutattak ki. Az intronban stop kodon

található, így amennyiben az intron nem vágódik ki a mRNS-ből a **22K** fehérje íródik át, míg splicing esetén 33 kD-os fehérje keletkezik (Oosterom-Dragon és Anderson, 1983). A többi atadenovirushoz hasonlóan a SnAdV-1-ben is megtaláltuk a feltételezett splicing donor és akceptor helyeit (22. ábra).

```

Donor:
      Exon      Intron
      getccta gtaaagtag

Akceptor:
      Intron      Exon
      ctctttcattottttttgaag gaaactacgggactccttcg

```

22. ábra. A 33K fehérje mRNS-ének kódoló szakaszán feltételezett splicing a SnAdV-1-ben. Az intron 108 nt hosszúságú.

A **pVIII** prekurzor fehérje (278 as) a 33K-val megegyező leolvasási keretben található és 24 nt távolságra kezdődik annak stop kodonjától. A VIII-as fehérje egy hexon-asszociált fehérje, a magot és a kapszid belső felületét köti össze, szerepe a virion szerkezeti stabilizálásában van. A SnAdV-1-ben két feltételezett proteolitikus felismerési helyet azonosítottunk: az egyiket a 118. pozícióban (LSGG'A), a másikat a 200. pozícióban (LQGG'G). Az utóbbi felismerési hely a többi atadenovirusban is megtalálható. A fehérje N- és C-terminális része nagyobb fokú megőrzöttséget mutat, mint a centrális régió.

A **fiber** homotrimer fehérje jelentős, szerepe a sejtreceptorokkal való kapcsolat létrehozása (Louis és mtsai, 1994). Három fő részből áll, a rövid N-terminális farki részből, az ismétlődő szakaszokból álló szár részből és a globuláris C-terminális feji részből.

A SnAdV-1 fiber alegysége (23. ábra) rövid, mindössze 415 as építi fel. A humán AdV-ok farki részén található az erősen megőrzött KRAR szekvencia, ami a sejtmagi lokalizációért felelős (Hong és Engler, 1991) és az FNPVYP szekvencia motívum, mely a penton-alaphoz való kötődés szempontjából jelentős (Caillet-Boudin, 1989). A SnAdV-1 farki részében mindkét motívumot azonosítani tudtuk (KKIK, illetve PVYP). A PPF motívum, melynek funkciója ismeretlen, szintén megőrzött és a SnAdV-1-ben is megtalálható. A szár jellegzetes ismétlődést mutat, ebből 14 példány található a SnAdV-1-ben. A SnAdV-1-ben a szár és a fej találkozásánál található TLWT motívumból (Chroboczek és mtsai, 1992) csak a triptofánt tudtuk azonosítani hasonlóan a többi atadenovirushoz (BAV-4, EDS-vírus stb.).

	MKIKR SAADPD PVYF FGDEVPIPL PPF LVPGGGLTTDG	Farok
1.	L SL AVQ T VDP L WV TLGGV L KIGDG	Szár
2.	L SV VDGK L TS EAKIVADPP	
3.	L QQ SGGT L SL STDSMMW	
4.	L PS GQLTINN L PS ISVTSSG	
5.	VGL VSP N A P L QL MSNGA	
6.	L QL SVGGG L TV GAQGS	
7.	L QI STGGV VNV NAAGV	
8.	L ES YPL P L WV DYSSKS	
9.	L TL DIG F G L TV VNGK	
10.	L QV IGAT FSN QMSRMAPAPRAD	
11.	L QS NSIE P L PS PPSKTS	
12.	L DI AEELQNDKG VSF AFQAREEELGAPTKRT	
13.	L FA YSGDG L TG PFKAPASAE	
14.	L SS FLTA H P	
	KGR W LIAFPLGTGIVSVDEGILTLEISRSLPEVGS	Fej
	GSSSTSLKVLISLYFMDLFFVFPIDRASHAPRRS	
	NNSRQLFHSRQLFLKVKDFKKRSWYSSLFTLINL	
	NIQCEPELS	

23. ábra. A kigyó-adenovírus fiberének aminosav szekvenciája. A megőrzött és azonosított motívumokat, hidrofób aminosav reziduomokat félkövér betűtípussal és aláhúzással emeltem ki, a szárrészben található ismétlődéseket számozva mutatom.

Az U exon

Az U exon valamennyi nemzetségben megtalálható (Davison és mtsai, 2000), de egyes mastadenovírusok, mint a PAdV-5 (Nagy és mtsai, 2001), a MAdV-1 (Meissner és mtsai, 1997), valamint a BAdV-10 (Ursu és mtsai, 2004) az evolúció során valószínűleg elvesztették. Az U exon ORF-jét a SnAdV-1-ben is sikerült azonosítani, ATG start kodonnal kezdődik és egy splice donor helyig tart (24. ábra), azonban a splice akceptor hely lokalizációja egyelőre ismeretlen (Chow és mtsai, 1979; Davison és mtsai, 2000; Davison és mtsai, 2003). Az U exon as illesztése azt mutatta, hogy a szekvenciák az egyes nemzetségeken belül megőrzöttek, de a nemzetségek között nagy fokú a variabilitás (Davison és mtsai, 2000).

Donor:

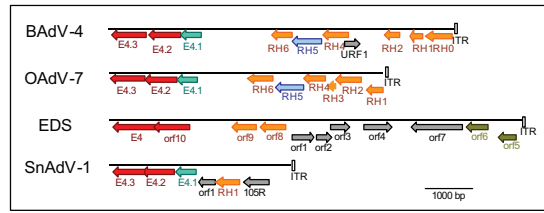
	Exon	Intron
	atctcat	g t ^a agtaa

24. ábra. A SnAdV-1 U exonjának szekvenciájában feltételezett splicing. Az akceptor hely ill. a második exon még nem ismert.

Az E4 régió

Az E4 régióban (25. ábra) a BAdV-4-hez és az OAdV-7-hez hasonlóan megtalálhatóak a feltételezett **E4.1**, **E4.2**, illetve **E4.3** gének, melyek közül az E4.2 és E4.3 duplikációval

keletkeztek egymásból és a HAdV-C fajok (HAdV-2, HAdV-5) 34K polipeptidjével mutatnak hasonlóságot (Both, 2002). Gének duplikációja az atadenovírusok E4 régiójában általános jelenségnek mondható. A 34K polipeptid a cink-kötő fehérjék közé tartozik. Kimutatták, hogy a 34K az E1B régió 55K fehérjéjével komplexet képezve szelektíven befolyásolja a mRNS felhalmozódását a citoplazmában, gátolva a sejt-mRNS és elősegítve a vírus-mRNS transzportját (Shenk, 2001). A SnAdV-1 E4.3 és E4.2 génjeiben a HCHXXPGSLQC motívum felismerhető, de nem teljesen megőrzött.



25. ábra. Az atadenovírusok E4 régiójának összehasonlítása. Az azonos színnel jelölt gének egymással homológok. A szürke szín azokat a lehetséges, start kodonnal kezdődő géneket jelöli, melyek csak az adott vírus fajban találhatóak.

Az E4 régióban található **ORF1** feltételezéseink szerint egy 112 as-ból felépülő fehérjét kódol. Funkciója ismeretlen, homológia kereséssel hasonló fehérjét nem sikerült találni az adatbázisokban.

A SnAdV-1 **RH1** (right hand) génje a BAdV-4 RH0, 1, 2, 4, 6, az OAdV-7 RH1, 2, 4, 6 és az EDS-vírus ORF8, 9 génjeivel mutat hasonlóságot. A SnAdV-1 RH1 génje kivételével valamennyiben a fehérjék N-terminális részében megtalálható az ún. F-box motívum (Both, 2002). Feltételezik, hogy az atadenovírus F-box fehérjék egyes sejtfunkciókat szabályozó fehérjékkel lépnek kölcsönhatásba és ezáltal módosítják a fertőzött sejt anyagcseréjét, megfelelő körülményeket teremtve a vírus szaporodásához. Mivel vizsgálataink alapján a SnAdV-1 tűnik a legősibb atadenovírusnak, ezért feltételezhető, hogy ezt a motívumot az evolúció későbbi időpontjában vették fel, majd a továbbiakban megőrizték az atadenovírusok.

A SnAdV-1 **105R** (178 as) csak a mókuscickány-adenovírusban (Schöndorf és mtsai, 2003), szintén az E4 régióban, de ellentétes szálon helyezkedő 105R génnel (435 as) mutat hasonlóságot. A 105R gén funkciója, szerkezete egyelőre ismeretlen. Mivel csak ebben a két evolúción nagyon távoli vírusban fordul elő, feltételezhetjük, hogy vagy két független

génfelvétel eredménye ez, vagy az evolúció során szinte minden más fejlődési ág elvesztette, mivel nem volt hasznos a vírus számára.

A mastadenovírusok két fontos, V-ös és IX-es szerkezeti fehérjéje, melyeket eddig csak mastadenovírusokban találtak meg, az összes ismert aviadenovírus, siadenovírus és atadenovírus genomjából, így a SnAdV-1 genomjából is hiányzik. A IX-es fehérjét kódoló gén mastadenovírusokban az E1B és IVa2 gének között helyeződik. A IX-es fehérje stimulálja az MLP aktivitását (Lutz és mtsai, 1997), és mint szerkezeti fehérje erősíti a hexonok közötti kapcsolatot (Boulangier és mtsai, 1979). Az V-ös fehérje szerepe valószínűleg a vírus-DNS csomagolásában van, és a mastadenovírusok genomjában a pVII és pX gének között található.

Homológia kereséssel VA RNS gént a SnAdV-1 genomban nem tudunk azonosítani. A HAdV-2 VA RNS₂ stimulálja a fehérjeszintézist a fertőzött sejtben, valamint gátolja a sejt interferon-indukált védekező rendszerét (Ma és Mathews, 1996). A VA RNS hozzákapcsolódva a protein kinázhoz inaktiválja azt, és ez által meggátolja, hogy a protein kináz foszforilálja az eIF2-t (eukarióta transzlációs iniciációs faktort).

A CELO- (FAdV-1; Larsson és mtsai, 1986; Chiocca és mtsai, 1996) és az EDS-vírusokban (Hess és mtsai, 1997) egy VA RNS-t kódoló 91, illetve 100 bp hosszúságú gén található a genom jobb végén, az E4 régióban. Annak ellenére, hogy magas, 74%-os azonosság van a két gén között, valószínűleg a két vírus egymástól függetlenül vette fel azt ma még ismeretlen forrásból (Hess és mtsai, 1997). Az OAdV-7-ben az egyes mastadenovírusokra jellemző helyen VA RNS-sel homológiát mutató szekvencia nem található, valamint a pTP és 52/55K gén között átfedés van. *In vitro* végzett transzkripció analízissel is kizárták a VA RNS gén jelenlétét az OAdV-7 genom többi részén is (Venkatesh és mtsai, 1998).

A királypítóból izolált kígyó-parvovírus genomszerveződése

Meghatároztuk egy királypítóból izolált PV teljes genomszekvenciáját. Az AAV-ok, így a SAAV replikációja során is pozitív vagy negatív irányultságú szimplaszálú DNS épül be az egyes virionokba. A vírus-DNS kivonása során az egymással komplementer DNS szálak összekapcsolódnak, duplaszálú DNS keletkezik, ezáltal a DNS klónozhatóvá válik. A másodlagos szerkezettel rendelkező PV ITR szekvenálását egy új módszer kidolgozásával oldottuk meg.

A SAAV genomja (15. ábra) rövidebbnek bizonyult, mint a többi eddig megismert AAV genomja. Ennek egyik oka, hogy a NS C-terminális része rövidebb, mint a többi dependovírus megfelelő fehérjéje.

A REP fehérje as szekvenálása alapján (26. ábra) megállapíthatjuk, hogy a gén leginkább megőrzött régiója a középső részén található. Ebben a régióban azonosítottuk az I-es és II-es replikációs motívumokat, amelyek feltehetően a replikáció kezdetében és befejezésében játszanak szerepet. Az I-es motívumban található két hisztidin valószínűleg fém ionokhoz kötődik (H&H&&&&, ahol az „&” hidrofób as-at jelöl; Ilyina és Koonin, 1992). Az AAV-2II-es motívumában a 152. pozícióban található tirozin, amely a SAAV-ban is megtalálható a 140. pozícióban, a replikáció során kovalensen kötődik (foszfo-diészter kötéssel) a genom 5' végéhez. A helikáz szuperhelázba tartozó és három részből álló III-as motívum (A, B és C) megtalálható a gerincesek PV-aiban és a gerinctelenek densovirusaiban (Tijssen és Bergoin, 1995; Li és mtsai, 2001; Fédiere és mtsai, 2002), feltehetően a DNS-replikáció megkezdésében játszik szerepet (Koonin, 1993). A SAAV-ban is azonosított GPATGKT (328-335. pozíció), „P loop”, azaz ATP/GTP-kötő motívum a PV-okban erősen megőrzött (GxxxGKT; Saraste és mtsai, 1990). A fehérje C-terminális végéhez közel egy feltételezett cink-kötő motívumot azonosítottunk.

A SAAV esetében a REP fehérje C-terminális vége az első splice akceptor hely után egy 5 as-ból álló farkat kap, míg a második akceptor hely után egy stop kodon következik. Ezzel szemben az AAV-2-ben egy 16, illetve 7 as-ból álló rövid fark kapcsolódik a fehérje C-terminális végéhez. Az AAV-5-ben ez a jelenség nem figyelhető meg, mivel az intronban két poliadenilációs szignál található (Qiu és mtsai, 2002).

A VP1 kapszid fehérje (27. ábra) N-terminális részén található foszfolipáz A₂ domén a genom legmegőrzöttebb régiója, a méhek és a kígyók mérgeiben található foszfolipázal mutat hasonlóságot (Zádori és mtsai, 2001; Girod és mtsai, 2002). Szerepe a fertőzés során a vírus sejtbe való kötődésében, a sejtbe való bejutásában van.

A BLASTX analízis, a genomszerveződés és a filogenetikai számítások eredményei alapján a SAAV a *Dependovirus* nemzetségbe tartozik. A *Dependovirus* nemzetség tagjai között mindaddig csak emlősökből és madaraktól származó vírusokat ismertek.

A PV-ok genomja nem kódol DNS-függő DNS-polimerázt ezért szaporodásukhoz S-fázisban lévő sejteket, vagy mint a *Dependovirus* nemzetség tagjai helper-vírusokat (adeno-, herpes-, papillomavírusokat) igényelnek szaporodásukhoz (Buller és mtsai, 1981; McPherson és mtsai, 1982; Hoggan és mtsai, 1968; Walz és mtsai, 1997). Ezért a genom elemzéseket megelőző időben az önálló szaporodásra képes vízimadár PV-okat, a liba Derzsy-féle betegségét okozó és a barbari kacsa-parvovírust *Parvovirus* nemzetségbe sorolták. Teljes genomszekvenciájuk megismerése után (Zádori és mtsai, 1995) kiderült, hogy e vírusok mind genomszerveződésük, mind pedig filogenetikai rokonságuk alapján valójában a *Dependovirus* nemzetségbe tartoznak (Tattersall és mtsai, 2004).

Az AAV-2 replikációját, génexpresszióját és a splicing-mechanizmusokat AdV-ok jelenléte erősen stimulálja. Meghatározott körülmények között, pl. differenciálódó elszarusodó laphámában azonban az AAV-2 önmagában is képes replikációra (Meyers és mtsai, 2000). Az AAV-5-ből készült fertőző klónnal készült kísérletek azt mutatták, hogy az AAV-5 replikációja kevésbé függ az AdV-ok jelenlététől (Chiorini és mtsai, 1999). Még nem tudjuk, hogy az általunk vizsgált PV képes-e önállóan szaporodni vagy szaporodásához helper-vírus jelenlétét igényli. Azonban az a tény, hogy mindaddig AdV-ok mellett mutatták ki, arra enged következtetni, hogy a SAAV is helper-vírus jelenlétét igényli szaporodásához. Ennek meghatározása az általunk létrehozott infekzív klón segítségével még további kísérleteket igényel.

```

SAAV -----MAFYEVVFRLEPRD--NNLLDEDRVQPELKEEDDWPPEYLTSEDASFIGL 48
GPV  MALSRFLQISSDKFYEVIIIRLSSDIDQDVPGLSLNFVWELSTGVME--PTGIWNMEHVNL 58
AAV2 -----MPGFYELVIKVPSELDLHLPGISDSFVNVAEKEMELPPDSMDLNLIEQ 50

                                     I
SAAV  AYAVLSR-IRRFCKELQWFAQVENCPE-----TAGVMMVLLNHPKLSNQTYGRKYN 99
GPV   PMVTLAEIKNIETIQRNQFNQ-DETDFFQLEGGSEYHLLHCCIAQGVRSFVLRGYS 117
AAV2  APLTVAEKLRDRLETEWRRVSKAPEALFFVQFEKGESYHMMHVLVETTIVKSMVLGRFLS 110
                                     Konszenzus  Hstxxxx
                                     II
SAAV  ELACRIV-DTFGLINPEEVISLHYVKSNYGHHKVRVTHLESMLKNVFFRKTLPAPPYTEE 158
GPV   QIKDSIIRDVVEGKQIKIPDMFAITKTKRG--GQNKVTAAYLHVLIPKQPELQWA-- 173
AAV2  QIREKLIQRIVRGIEPTLPNMFVAVTKTRNGAGGGNKVDECYIPNVLLEPQPELQWA-- 168
                                     Konszenzus  Yx Yx K

SAAV  GDYKREEEVLWAFPTNIVAWKPFVRNLIKRELATVFKQENPAGDGPAPRVTAGTRHFM 218
GPV   --FTNMPLPTAAALCLQKRQELLD---AFQESDLAALPDPQASTVAELISNRAAKN-YS 227
AAV2  --WTNMEQYLSACLNLTERKRLVAQHLTHVSTQEQENKQNPNSDAEIVIRSKTSAR-YM 225

SAAV  ETIDMLVKHGILITREFPCHANRPLVLEMLLSTSGAGQIKRRLDQAKHMWTSYMSALDVLIT 278
GPV   NLVDMLIEGMIISEKQWLTENREKREFQATSSNRQVKAALNRAEMLLKTTATDYLI 287
AAV2  ELVGNLVDKGITSEKQWIQEQASVTEFNASNSRSQIKAAIDNAGKIMSLKTKTADYLV 285

SAAV  TEEDVIEPPTENRIYKIMKLNRYDEELAAALFYQWCKNECKRNTIWLGPATTGKTIIA 338
GPV   GKDFVLDI-TKNRVYOLLKMNYNPOYIGSLCGWVKREFNKRNAIWLGPATTGKTIIA 346
AAV2  GQQFVEDI-SSNRIVKLELNGYDEOYAASVFLGWATKKECKRNTIWLGPATTGKTIIA 344

                                     B
SAAV  QAIATAHVKLFAGVNWNTNENPFPCNCPGKLLIWWEEGKMTNKVETAKCILGGSAPVVDIK 398
GPV   EAIATAHVPFYGCWNWNTNENPFNDVDMKLIWWEEGKMTNKVVESAKAILGGSAPRVDOK 406
AAV2  EAIATAHVPFYGCWNWNTNENPFNDVDMKLIWWEEGKMTNKVVESAKAILGGSAPRVDOK 404
                                     *****

                                     C
SAAV  GHPAEMCFQPCIIITSNTMCOVYDGNSSSEFEHQEPLLEERMFMRNLTNKLPTSTFGKITEE 458
GPV   CEGSVCIEPTBVIITSNTDMCMIVDGNSTTMEHRIPLLEERMFQIVLSHKLEPSFGKISKK 466
AAV2  CEGSAQIDPFBVEVTSNEMMAVIGNSYTFEHQEPLQDRMEKPELTRRLDHDHFGKVTQK 464
                                     *****

                                     NLS
SAAV  EVKQFITTGRSLKVOVPHCFRVPPTGEYKRBAEAKAHSDEPPKEKVA----- 507
GPV   EVREPKKANDNLVIVVSEKVRTNEQTNLEEVPERANEPEPKKIWAPPPTREELEELL 526
AAV2  EVKDFRKAADHVVEHEFYVKGGAKKRBAESDADISEPKRVRESVQPSTSDAEASI 524

SAAV  ----RIDDSLTRYVNNIDESATSREMFLEIANTNQCMLHCFSCTECYPELLDDMDKEQ- 562
GPV   RASPELFSVAP-IPVTQNSPEPKRSRNNYQVR-CALHTYDNSMDFECMECEKANFPE 584
AAV2  NYADRYQNKCSRHVGMNMLFPQCRCERMNQNINSIETHGQKDCLECFVSESQPVSV-- 582

SAAV  -----
GPV   FQPLGENYCDEHGWDCAICKELKNEIAEIEHFELDDAENEQ 627
AAV2  VKKAYQKLCYIHHIMGRVDPDCTACDLVNVVD---LDDCIFEQ 621

```

26. ábra. A SAAV (serpentine adeno-asszociált vírus), liba-parvovírus (GPV; Zádori és mtsai, 1995) és az adeno-asszociált vírus 2 (AAV-2; Srivastava és mtsai, 1983) a nem-szerkezeti fehérjének (REP) aminosav szekvencia illesztése. A replikáció kezdő motívumok (I és II) be vannak keretelve. A II-es motívumban a megőrzött tirozin reziduumok jelölésé. A konszenzus szekvenciában a „&” jelű aminosavak hidrofób reziduumok. A háromtagú helikáz szupercsaládba tartozó III-as motívum (A, B és C) pontos aláhúzással van jelölve. Az NTP kötő motívum félkövér betűtípussal van jelölve. A feltételezett nukleáris lokalizációs szignálok (NLS)

aláhúzás jelzi. A cink-kötő motívum cisztein és hisztidin reziduumainak jelölése *. Szürke háttérrel a megőrzött aminosavakat jelöltük.

VP1

SAAV -----MFLDDFFADKYKTVNELGKPVNPKVKHISEAH-----SQPGSRRGFVVG 48
 GPV ---MSTFLDSFEWEYETAASWRNLKAGAPQPKFNQSQSVSPDREPERKDNRRGFVLPG 57
 AAV2 MAADGYLFDWLEDTLSEGIQWKLKPGPPPKPAER-----HKDSRGLVLE 49

SAAV YRYLGFNGSLDRGKPVNKADEAAKKHQQEYDQQLKAGDNPIRYNHABEQFKDLQGGTS 108
 GPV KYLGFNGSLDRGKPVNKADSVLEHAKAYDQQLKAGDNPIRYNHADQDFIDSLQDEQS 117
 AAV2 YRYLGFNGSLDRGKPVNKADADLPHKAVRQVLSSTNPIRYNHADQDFIDSLQDEQS 109

 && VP2 &

SAAV LAGNAANLQGGKTLALGLVETPVGKTSKHKLDEYFP-----KAKKAKQGL 158
 GPV FCGNLGKAVQAKKRILEBFGVLEDPVNTAPAKKNTGKLDHYP-----VVKPKLTE 170
 AAV2 FCGNLGKAVQAKKRILEBFGVLEDPVNTAPGKRPVHSFVEPDSSSGTGKAGQQPARK 169

VP3

SAAV QIPAPFKGEEBATSQSGGS--FAGSDTSGTSMVTRCQCFMADNQCAGVGNSSGQWH 217
 GPV EVSAGGSSAVQDGGATAECTEVAAS----EMAEFCGQAMGDSGGADGVGNASGNWH 225
 AAV2 RLNFQGTGDADSVDFPQFLGQFAAPSGLGTNTMATEGSAFMADNNEGADGVGNSSGQWH 229

SAAV CBTWMMGDHWTTRKSTRTWLETVGNHLYGPIVDFDGTGSGANAAVAGYKTPWGYDFDNRE 277
 GPV CBSQNMGNVTITKTRTWLBSVNNHLYKALIT--SGTSDANVQVAGYSTPWGYDFDNRE 283
 AAV2 CBSQNMGDHWTTRTWLETVGNHLYKQES--SQSGASNDNHVFGYSTPWGYDFDNRE 287

SAAV HCHFPRDWQRLINNHGTIRPKGLKIKVFNVOVKEVITQDSKTIANNLTSIVQIFADEN 337
 GPV HCHFPRDWQRLINNHGIRPKSLKIKVFNVOVKEVITQDSKTIANNLTSIVQIFADEN 343
 AAV2 HCHFPRDWQRLINNHGIRPKRINFKLENVOVKEVITQDSKTIANNLTSIVQIFADEN 347

SAAV YDLPYVLGSATGTFPPFENDVFMLOYAVCTLQG--NSGKVDLRSAPYCLEYPPSQMLR 395
 GPV HQLPYVLGSATGTFPPFSDVYALFOYCYCTMHTNQGARFNRSAPYCLEYPPSQMLR 403
 AAV2 YQLPYVLGSAHQGLPEPFAVFMVFOYCYLTLN---NSQAVGRSSAPYCLEYPPSQMLR 404

SAAV TGNNEEFQFKFEEVPPHSGWAQSQSLDRLMNLPLDQVLYIGDYGTASGNL-----IYHR 449
 GPV TGNNEEFTDFEVEVPPHSMFAHSQDLRLMNLPLDQVLYLWVFNVDSSRNA-----QFKK 457
 AAV2 TGNNEEFSVTFEVEVPPHSSYAHSQDLRLMNLPLDQVLYLRSNTTSPGTTTQSRQLQFSQ 464

SAAV AGPNDLNEFYKNWABAYECIQNINS-SDNTKNANSINGSNSTNKWGLQCRQAWDAQGFV 508
 GPV AVKGYGTMRNWLKGRKFLDRVRAVYGGTDNYANWNVWSGNKVNLDKQYLLQGGPV 517
 AAV2 AGASDIRDQSRNWLKGRCYRQORV-SKTSADNNSEYS-WTGATKYHLNCRDLSLVNFGPA 522

SAAV QASTYEGAAAGQSLNGLVTFDSS--ATTSSPAATAVNRTEDEIQCTNNFGNARNNIV 566
 GPV SATYTEGAASSLPA-QNILEGIADPYRSGSTTAGISDIMVDEQEVAPTNVGVWPKPYGRT 576
 AAV2 MASHKDEEKFFPQ-SGVLIFGKQG--SEKTNVDIEKVMITDEPEIRITNVPVATEQYGSV 579

SAAV AINQITKGTNPTTGSTSQFETMGMVNSNRDYLQGFIAKIPNTDGHFHPSPRMGGFGL 626
 GPV VTNEQNTTAPTSSDLDVGLGPMVQNRDYLQGFIAKIPKTDGKHPSPNLGGFGL 636
 AAV2 STNLQRGNRQAATADVNTQGVLPGMVQDRDYLQGFIAKIPHTDGHFHPSPMLGGFGL 639

SAAV KHPEEMILIRNTPVPADPPTTFNMPQTSFTTISTGQVTEMLWEVCKESSKRWNPVQ 686
 GPV HNPEEIVFLKNTVPADPVEYVHQWNSYITQISTGQVTEMLWELRKNESKRWNPVQ 696
 AAV2 KHPEEQILIRNTEVPANSTTFSAAKFAFTTQISTGQVTEMLWEVCKESKRWNPVQ 699

SAAV FTSNFGTSDPAVDGIPFGINNLSTVSESRPIGTRVLSKHL 726
 GPV FTSNFSNRT----SIMPAPNETGGYVEDRLIGTRVLTQNL 732
 AAV2 FTSNFKSV---NVDETVDTNVSSEPRPIGTRVLTQNL 735

27. ábra. A SAAV (serpentine adeno-asszociált vírus), liba-parvovírus (GPV; Zádori és mtsai, 1995) és az adeno-asszociált vírus 2 (AAV-2; Srivastava és mtsai, 1983) szerkezeti fehérjéinek

(VP) aminosav szekvencia illesztése. A foszfolipáz A₂ motívumot aláhúzás, a Ca²⁺ kötő hurkot* és a katalitikus hatású reziduumokat **¶** jelöli. A VP1, VP2 és VP3 fehérjék feltételezett kezdő metionin és triptofán reziduuma félkövér betűtípussal van kiemelve. Szürke háttérrel a megőrzött aminosavakat jelöltük.

Következtetések

Meghatároztuk az 1-es szerotípusú kígyó-adenovírus teljes nukleotid-sorrendjét. A genom mérete 27.751 bp. Szekvencia-analízissel homológia alapján azonosítottuk a SnAdV-1 lehetséges fehérjét kódoló szakaszait, és meghatároztuk azok pontos helyét a genomban. A SnAdV-1 genomszerveződésének jellegzetességei megegyeznek az *Atadenovirus* nemzetség többi ismert tagjánál megfigyelttel. Ezek közül legfontosabb a genom bal oldalán található p32K, valamint az LH1 és LH2 gének jelenléte. A genom középső része megőrzött, itt az egyes nemzetségek között is kevés eltérés figyelhető meg. A genom jobb végén az E4 régióban az atadenovírusokra jellemző megduplázódott 34K gént és egy RH gént találtunk. Az RH gének száma a többi atadenovírusban 2-5, melyek valószínűleg génduplikáció eredményeként jöttek létre. Mindössze két olyan ORF-et találtunk, amelyeknek az eddig ismert atadenovírusokban nincs homológiája. Ezek egyike (ORF1) a génbankban eddig elhelyezett szekvenciák közül egyetlennel sem mutatott hasonlóságot. A másik ORF homológiája, érdekes módon, a mókuscickány-adenovírusában előforduló 105R gén.

A mastadenovírusokétól eltérő genomszerveződés alapján feltételezhető, hogy a többi nemzetségben, így az atadenovírusokban is a replikáció eltér a jól jellemzett menettől. A hiányzó fehérjék szerepét valószínűleg más fehérjék látják el. Az V-ös és IX-es szerkezeti fehérjék hiánya és az emiatt megváltozott szerkezet is lehet a szarvasmarha atadenovírusoknál megfigyelt nagyobb hőrezisztencia magyarázata (Bartha, 1969). Más tényezők mellett a VA RNS hiánya is lehet oka az atadenovírusok csökkent szaporodóképességének. E szempontoknál a siadenovírusok vizsgálata érdekes lenne, mert azokban mindössze 5 olyan gén van, ami nem család-specifikus.

A genomtérkép azonossága mellett a filogenetikai vizsgálatok is egyértelműen bizonyították, hogy a SnAdV-1 az atadenovírusok csoportjába tartozik, és annak legősibb képviselőjének bizonyult.

E vírusok közös eredetét további bizonyítékok, az ún. „shared derived” tulajdonságok is megerősítik. Ezek közé sorolhatjuk a hexon gén vége és a proteáz gén eleje közötti 4 nt átfedést, amelyhez hasonló más nemzetségbeli vírusoknál nincs, viszont valamennyi atadenovírusban megfigyelhető. Megemlíthető továbbá a proteolitikus felismerési helyek megőrzöttsége. Míg a mastadeno- és aviadenovírusokban I-es típusú (M/L/I)XGG'X és II-es típusú (M/L/I)XGX'G proteolitikus felismerési helyek találhatóak a pVII fehérjében, az atadenovírusokban II-es és III-as típusú, azaz (M/L/I)XAX'G proteolitikus felismerési helyet azonosítottuk. Így a II-es és III-as proteolitikus felismerési hely szekvenciáinak konszenzusa (N/M/L/I)X(A/G)X'G.

Marschangtól később kapott, két közönséges óriáskígyóból (*Boa constrictor*) származó AdV izolátumból PCR segítségével felerősített részleges genom szekvenciák tökéletesen megegyeztek egymással (Marschang és mtsai, 2003) és a gabonasikló, valamint azzal korábban azonosnak talált királypiton izolátum szekvenciáival. Úgy tűnik, hogy Németországban a fogságban tartott óriáskígyók azonos típusú AdV-sal fertőzöttek.

A kígyó-adenovírusok (atadenovírusok) elterjedtségére vonatkozóan szerológiai felmérést végeztek Marschang és munkatársai (2003). Négy országból gyűjtöttek savmintákat, melyekben a sejtmagzárványokból izolált és atadenovírusnak bizonyult vírustörzssel szembeni ellenanyagok jelenlétét vizsgálták. A 262 (vadon élő és tenyésztett kígyóból vett) minta 14,5%-a bizonyult pozitívnak vírus-semlegesítési próbával. Marschang szerológiai vizsgálatai úttörő jellegűek, de nem lehet tudni, hogy az alacsony vírus-semlegesítési titer oka nem épp az, hogy más országok, földrészek kígyóiban további atadenovírus fajok is előfordulnak.

Legújabbban Wellehan és mtsai (2004) a Floridai Egyetem Állatorvosi Karán különféle vadon élő és tenyésztett gyíkokból PCR segítségével AdV-ok jelenlétét mutatták ki. Az általuk vizsgált mintákból felerősített és szekvenált DNS-polimeráz génszakaszok alapján végzett filogenetikai számítások szerint ezek az AdV-ok is atadenovírusoknak bizonyultak. Ez is bizonyítja, hogy a hüllőkben feltehetőleg sokféle szerotípusú atadenovírus fordul elő, hiszen a legkonzervatívabb DNS-polimeráz gén-szakaszban is vannak eltérések. Korábbi feltételezéseinkkel szemben e rövid DNS-polimeráz génszakaszok, valamint a SnAdV-1 genom G+C tartalma meglepő módon kiegyensúlyozottnak (~50%) bizonyult. Az *Atadenovirus* nemzetség ugyanis épp az idesorolt vírusok feltűnően eltolódott, 60% körüli A+T tartalma alapján lett elnevezve. Az atadenovírusok e szembetűnő tulajdonsága még a filogenetikai számítások előtt feltűnt. Később feltételezték, hogy az adott vírus bázis-összetétele hasonlít gazda kromoszómájának bázis-összetételére (Harrach, 2000). Ez alátámasztotta volna az atadenovírusok hüllő eredetét, mivel tudjuk, hogy a hidegvérűek kromoszómális DNS-ének általában kevés a G+C tartalma, és a G+C gazdag szigetecskék csak a hüllőkben kezdenek megjelenni (Hughes és mtsai, 1999).

Mivel minden eddig vizsgált hüllő-adenovírus atadenovírusnak bizonyult, ez nagymértékben alátámasztja a kiinduló feltételezést, miszerint az atadenovírusok hüllő eredetűek, és csak aránylag később kerültek gazdaváltással kérődzőkre, madárra és erszényes emlősre. Jelenlegi elképzeléseink szerint az új gazdában (madár, kérődző, erszényes) az erős szelekciós nyomás hatására a genom G+C tartalma jelentős mértékben csökkent (Benkő és Harrach, 2003). Ennek oka lehet, hogy gerincesekben a szervezet számára idegen DNS-ben található CG dinukleotidokat a konstitutív („innate”) immunrendszer Toll-like receptor 9 (TLR9; Kandimalla és mtsai, 2003) segítségével felismeri, tehát arányuk csökkenése előnyös lehet a

vírus túlélése szempontjából (Aderem és Hume, 2000). Ez is alátámasztani látszik azt a hipotézisünket, miszerint a hullókból izolált atadenovírusok végig együtt fejlődtek gazdáikkal, míg a madár, erszényes és kérődző atadenovírus esetében gazdaváltás történt, és még nem volt idejük alkalmazkodni az új gazdához. Ezt tűnik erősíteni az a tény is, hogy számos atadenovírus erősen patogén, súlyos megbetegedést, illetve elhullással is járó járványt okoz (Benkő és Harrach, 2003).

Az egyetlen hal-adenovírusból származó rész-szekvenciára ugyancsak 50% körüli G+C tartalom jellemző (Kovács és mtsai, 2003). Érdekes azonban, hogy a *Siadenovirus nemzetség* két eddig ismert tagja, a FrAdV-1 és THEV ugyanakkor A+T gazdag genommal rendelkezik. A jelenség okának felderítése további vizsgálatokat igényel.

Meghatároztuk a serpentine adeno-asszociált vírus teljes nukleotid-sorrendjét. Új módszert dolgoztunk ki a PV-ok ITR szekvenciáinak szekvenálására. A genom mérete 4432 bp, és a genom két végén elhelyezkedő ITR szekvenciák 154 nt hosszúságúak, Y alakú hajtű szerkezetet képeznek. A SAAV genomszerveződése és génjeinek filogenetikai elemzése alapján a legnagyobb hasonlóságot az AAV-okkal mutatta. Létrehoztunk egy, a SAAV teljes genomját tartalmazó pBluescript II KS plazmidot, mely alapja lehet később előállítandó (pl. humán gyógyászati célú) rekombináns vírusoknak is. A SAAV teljes genomját tartalmazó klón értékesítésre került.

Mind a SnAdV-1, mind a SAAV elemzésének vannak következményei rendszerint a vonatkozóan. Korábban a taxonok elnevezése a biológiai tulajdonságokon alapult (pl. gazdafaj vagy szaporodóképesség). Ma igyekeznek mindent genetikai (evolúciós) alapokra helyezni, a besorolási kritériumok között egyre nagyobb jelentőségre tesz szert a vírusok genomszerveződése, illetve a vírusok közötti filogenetikai viszonyok. Az atadenovírusok nevüket az elsőként vizsgált genomok magas A+T (57-66%) tartalmáról kapták. Ez az elnevezés ma már nem teljesen helytálló, mivel az eddig megismert hulló-adenovírusok bázis-összetétele kiegyensúlyozottnak mondható (~50% A+T tartalom), azonban a hulló-adenovírus elnevezés sem lenne sokkal szerencsésebb, hiszen az első megismert atadenovírusok gazdái nem hullók voltak. A *Dependovirus nemzetség* elnevezése sem pontosan fedi az odatarozó vírusok jellegzetességeit, mivel genomszerveződésük alapján ma már az önálló szaporodásra képes vízimadár PV-okat is ebbe a nemzetségbe sorolták.

A kedvtelésből tartott állatok között az utóbbi időben a hullók világszerte növekvő népszerűsége tesz szert, megjelentek az állatorvosi praxisban, így betegségeik és kórokozóik vizsgálata is egyre fontosabbá válik. A tendencia hazánkban is megfigyelhető. A különféle vírusok előfordulására vonatkozóan főként csak kórszövettani, illetve elektron-mikroszkópos

vizsgálatok eredményeire alapozott megfigyeléseket találunk. A modern diagnosztikai eljárások elsősorban a vírus-eredetű nukleinsav kimutatását, illetve szekvencia-elemzését foglalják magukba. Az egyes hulló-megbetegedések vírusos oktanára vonatkozó kutatások csupán az utóbbi néhány évben gyorsultak fel, ezért csak néhány vírusból állnak rendelkezésre részleges vagy teljes genomszekvencia adatok, melyek segítségével PCR módszerek dolgozhatók ki.

Új tudományos eredmények és megállapítások

1. A világon elsőként határoztuk meg egy hüllőből izolált adenovírus, a SnAdV-1 teljes nukleotid sorrendjét, azonosítottuk lehetséges fehérjét kódoló szakaszait.
2. Megállapítottuk, hogy a SnAdV-1 genomszerveződése az atadenovírusok jellegzetességeit mutatja és a filogenetikai számítások során minden esetben az atadenovírusokkal került egy csoportba. Így tovább valószínűsítettük azt a feltételezést, hogy az atadenovírusok közvetlen ősei a hüllők adenovírusai lehettek.
3. Egy mindeddig ismeretlen ORF jelenlétét mutattuk ki a SnAdV-1-ben, valamint megtaláltuk egy nemrégiben leírt, egyelőre ismeretlen funkciójú fehérje (105R) génjének homológját, amelynek előfordulását előttünk csak a mókuscickány (*Tupaia belangeri*) adenovírusában írták le.
4. Új módszert dolgoztunk ki a parvovírus ITR szekvenálására.
5. Meghatároztuk a SnAdV-1-et is tartalmazó izolátumban jelen levő kigyó-parvovírus teljes nukleotid sorrendjét. Azonosítottuk a SAAV feltételezett szerkezeti és nem-szerkezeti fehérjéit kódoló szakaszait. Megállapítottuk, hogy genomszerveződése a dependovírusok jellegzetességeit mutatja.
6. Filogenetikai számításokkal a SAAV minden esetben a dependovírusokkal került egy csoportba.
7. A SAAV genomját egész darabban molekulárisan klónoztuk. Ez a feltehetően infektiós klón további vizsgálatokban alkalmas lehet annak meghatározására, hogy a SAAV önálló replikációra képes-e, vagy helper-vírust, adeno- vagy herpesvírust igényel szaporodásához.

Irodalomjegyzék

- Ádám, É., Nász, I. & Lengyel, A. (1996). Characterization of adenovirus hexons by their epitope composition. *Archives of Virology* 141, 1891-1907.
- Aderem, A. & Hume, D. A. (2000). How do you see CG? *Cell* 103, 993-996.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215, 403-410.
- Anderson, C. W., Baum, P. R. & Gesteland, R. F. (1973). Processing of adenovirus-2 induced proteins. *Journal of Virology* 12, 241-252.
- Bagyan, I., Setlow, B. & Setlow, P. (1998). New small, acid-soluble proteins unique to spores of *Bacillus subtilis*: identification of the coding genes and regulation and function of two of these genes. *Journal of Bacteriology* 180, 6704-6712.
- Barbezange, C., Benkő, M., Dán, Á. & Harrach, B. (2000). DNA sequencing and phylogenetic analysis of the protease gene of ovine adenovirus 3 suggest that adenoviruses of sheep belong to two different genera. *Virus Research* 66, 79-80.
- Bartha, A. (1969). Proposal for subgrouping of bovine adenoviruses. *Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae* 19, 319-321.
- Benkő, M., Bartha, A. & Wadell, G. (1988). DNA restriction enzyme analysis of bovine adenoviruses. *Intervirology* 29, 346-350.
- Benkő, M., Harrach, B. & D'Halluin, J. C. (1990). Molecular cloning and physical mapping of the DNA of bovine adenovirus serotype 4; study of the DNA homology among bovine, human and porcine adenoviruses. *Journal of General Virology* 71, 465-469.
- Benkő, M. & Harrach, B. (1998). A proposal for a new (third) genus within the family *Adenoviridae*. *Archives of Virology* 143, 829-837.
- Benkő, M., Harrach, B. & Russell, W. C. (2000). Family *Adenoviridae*. In *Virus Taxonomy*. VIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, pp. 227-238. Edited by M. H. V. van Regenmortel, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, E. B. Carstens, M. K. Estes, S. M. Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. J. McGeoch, C. R. Pringle & R. B. Wickner. Academic Press, San Diego.
- Benkő, M., Élő, P., Ursu, K., Ahne, W., LaPatra, S. E., Thomson, D. & Harrach, B. (2002). First molecular evidence for the existence of distinct fish and snake adenoviruses. *Journal of Virology* 76, 10056-10059.
- Benkő, M. & Harrach, B. (2003). Molecular evolution of adenoviruses. In *Adenoviruses: Model and Vectors in Virus-host Interactions*. *Current Topics in Microbiology and*

- Immunology*, 272, pp. 4-35. Edited by W. Doerfler & P. Böhm. (eds). Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag.
- Benkő, M., Harrach, B., Both, G. W., Russell, W. C., Adair B. M., Ádám, É., de Jong, J. C., Hess, M., Johnson, M., Kajon, A., Kidd, A. H., Lehmkuhl, H. D., Li, Q.-G., Mautner, V., Pring-Akerblom, P. & Wadell, G. (2004).** *Adenoviridae*. In *Virus Taxonomy*. VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, pp. 213-228. Edited by C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger & L. A. Ball. Elsevier, Academic Press, London.
- Benson, S. D., Bamford, J. K., Bamford, D. H. & Burnett, R. M. (1999).** Viral evolution revealed by bacteriophage PRD1 and human adenovirus coat protein structures. *Cell* 98, 825-833.
- Bergoin, M. & Tijssen, P. (2000).** Molecular biology of *Densovirinae*. *Contributions to Microbiology* 4, 12-32.
- Both, G. W. (2002).** Identification of a unique family of F-box proteins in adenoviruses. *Virology* 304, 425-433.
- Boulanger, P., Lemay, P., Blair, G. E. & Russell, W. C. (1979).** Characterization of adenovirus protein IX. *Journal of General Virology* 44, 783-800.
- Brenkman, A. B., Breure, E. C. & van der Vliet, P. C. (2002).** Molecular architecture of adenovirus DNA polymerase and location of the protein primer. *Journal of Virology* 76, 8200-8207.
- Brosius, F. C., Holzman, L. B., & Cao, X. (1996).** Purification of PCR products from agarose gels for direct sequencing. In *PCR sequencing protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 65, pp. 11-21. Edited by R. Rapley. Totowa: Humana Press Inc.
- Brown, K. E. & Young N. S. (2000).** Epidemiology and pathology of erythroviruses. *Contributions to microbiology* 4, 107-122.
- Buller, R. M., Janik, J. E., Sebring, E. D. & Rose, J. A. (1981).** Herpes simplex virus types 1 and 2 completely help adenovirus-associated virus replication. *Journal of Virology* 40, 241-247.
- Caillet-Boudin, M. L. (1989).** Complementary peptide sequences in partner proteins of the adenovirus capsid. *Journal of Molecular Biology* 208, 195-198.
- Challberg, M. D. & Rawlins, D. R. (1984).** Template requirements for the initiation of adenovirus DNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 81, 100-104.

- Chiocca, S., Kurzbauer, R., Schaffner, G., Baker, A., Mautner, V. & Cotton, M. (1996).** The complete DNA sequence and genomic organization of the avian adenovirus CELO. *Journal of Virology* 70, 2939-2949.
- Chiocca, S., Baker, A. & Cotton, M. (1997).** Identification of a novel antiapoptotic protein, GAM-1, encoded by the CELO adenovirus. *Journal of Virology* 71, 3168-3177.
- Chiorini, J. A., Kim, F., Yang, L. & Kötin, R. M. (1999).** Cloning and characterization of adeno-associated virus type 5. *Journal of Virology* 73, 1309-1319.
- Chow, L. T., Broker, T. R. & Lewis, J. B. (1979).** Complex splicing patterns of RNAs from the early regions of adenovirus-2. *Journal of Molecular Biology* 134, 265-303.
- Chroboczek, J., Bieber, F. & Jacrot, B. (1992).** The sequence of the genome of adenovirus type 5 and its comparison with the genome of adenovirus type 2. *Virology* 186, 280-285.
- Corpet, F. (1988).** Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research* 16, 10881-10890.
- Crawford-Miksza, L. & Schnurr, D. P. (1996).** Analysis of 15 adenovirus hexon proteins reveals the location and structure of seven hypervariable regions containing serotype-specific residues. *Journal of Virology* 70, 1836-1844.
- Dán, Á., Ruzsics, Zs., Russell, W. C., Benkő, M. & Harrach, B. (1998).** Analysis of the hexon gene sequence of bovine adenovirus type 4 provides further support for a new adenovirus genus (*Atadenovirus*). *Journal of General Virology* 79, 1453-1460.
- Dán, Á. (2001).** Analysis of the complete DNA sequence of bovine adenovirus type 4 confirms the genome organization characteristic of the proposed new genus *Atadenovirus*. Ph.D. értekezés. Eötvös Loránd Tudományegyetem, Budapest, pp. 63.
- Dán, Á., Élő, P., Harrach, B., Zádori, Z. & Benkő, M. (2001).** Four new inverted terminal repeat sequences from bovine adenoviruses reveal striking differences in the length and content of the ITRs. *Virus Genes* 22, 175-179.
- Davison, A. J., Telford, E. A., Watson, M. S., McBride, K. & Mautner, V. (1993).** The DNA sequence of adenovirus type 40. *Journal of Molecular Biology* 234, 1308-1316.
- Davison, A. J., Wright, K. M. & Harrach, B. (2000).** DNA sequence of frog adenovirus. *Journal of General Virology* 81, 2431-2439.
- Davison, A. J. & Harrach, B. (2002).** *Stadenovirus*. In the *Springer Index of Viruses*, pp. 29-33. Edited by C. A. Tidona & G. Darai. New York: Springer-Verlag.
- Davison, A. J., Benkő, M. & Harrach, B. (2003).** Genetic content and evolution of adenoviruses. *Journal of General Virology* 84, 2895-2908.

- de Vries, E., van Driel, W., Tromp, M., van Boom, J. & van der Vliet, P. C. (1985). Adenovirus DNA replication in vitro: site-directed mutagenesis of the nuclear factor I binding site of the Ad2 origin. *Nucleic Acids Research* 13, 4935-4952.
- Ding, J., McGrath, W. J., Sweet, R. M. & Mangel, W. F. (1996). Crystal structure of the human adenovirus proteinase with its 11 amino acid cofactor. *The EMBO Journal* 15, 1778-1783.
- Eagle, P. A. & Klessig, D. F. (1992). A zinc-binding motif located between amino acids 273 and 286 in the adenovirus DNA-binding protein is necessary for ssDNA binding. *Virology* 187, 777-787.
- Essbauer, S. & Ahne, W. (2001). Viruses of lower vertebrates. *Journal of Veterinary Medicine B* 48, 403-475.
- Élő, P. (2002). Egy atadenovírus izolátum genomjának összehasonlító elemzése. Ph.D. értekezés. Szegei Tudományegyetem, Szeged, pp. 78.
- Élő, P., Farkas, S. L., Dán, Á. & Kovács, G. M. (2003). The p32K structural protein of the atadenovirus might have bacterial relatives. *Journal of Molecular Evolution* 56, 175-180.
- Farkas, S. L., Benkő, M., Élő, P., Ursu, K., Dán, Á., Ahne, W. & Harrach, B. (2002). Genomic and phylogenetic analyses of an adenovirus isolated from a corn snake (*Elaphe guttata*) imply a common origin with members of the proposed new genus *Atadenovirus*. *Journal of General Virology* 83, 2403-2410.
- Farkas, S. L., Zádori, Z., Benkő, M., Essbauer, S., Harrach, B. & Tijssen, P. (2004). A parvovirus isolated from royal python (*Python regius*) is a member of the genus *Dependovirus*. *Journal of General Virology* 85, 555-561.
- Fédiere, G., Li, Y., Zádori, Z., Szelei, J. & Tijssen, P. (2002). Genome organization of Casphalia extranea densovirus, a new *Iteravirus*. *Virology* 292, 299-308.
- Felsenstein, J. (1989). PHYLIP-Phylogeny inference package. *Cladistics* 5, 164-166.
- Fessler, S. P. & Young, C. S. (1999). The role of the L4 33K gene in adenovirus infection. *Virology* 263, 507-16.
- Frye, F. L., Munn, R. J., Gardner, M., Barten, S. L. & Hadfy, L. B. (1994). Adenovirus-like hepatitis in a group of related rankins dragon lizards (*Pogona-henrylawsoni*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 25, 167-171.
- Girod, A., Wobus, C. E., Zádori, Z., Ried, M., Leike, K., Tijssen, P., Kleinschmidt, J. A. & Hallek, M. (2002). The VP1 capsid protein of adeno-associated virus type 2 is carrying a phospholipase A2 domain required for virus infectivity. *Journal of General Virology* 83, 973-978.

- Gorbalenya, A. E. & Koonin, E. V. (1989).** Viral proteins containing the purine NTP-binding sequence pattern. *Nucleic Acids Research* 17, 8413-8440.
- Harrach, B., Meehan, B. M., Benkő, M., Adair, B. M. & Todd, D. (1997).** Close phylogenetic relationship between egg drop syndrome virus, bovine adenovirus serotype 7, and ovine adenovirus strain 287. *Virology* 229, 302-308.
- Harrach, B. & Benkő, M. (1998).** Phylogenetic analysis of adenovirus sequences; proof of the necessity of establishing a third genus in the *Adenoviridae* family. In *Adenovirus Methods and Protocols* 21, pp. 309-339. Edited by W. S. M. Wold. NJ, Totowa: Humana Press.
- Harrach, B. (2000).** Reptile adenoviruses in cattle? *Acta Veterinaria Hungarica* 48, 484-490.
- Harris, M. P. & Hay, R. T. (1988).** DNA sequences required for the initiation of adenovirus type 4 DNA replication *in vitro*. *Journal of Molecular Biology* 201, 57-67.
- Hasson, T. B., Ornelles, D. A. & Shenk, T. (1992).** Adenovirus L1 52- and 55-kilodalton proteins are present within assembling virions and colocalize with nuclear structures distinct from replication centers. *Journal of Virology* 66, 6133-6142.
- Hatfield, L. & Hearing, P. (1991).** Redundant elements in the adenovirus type 5 inverted terminal repeat promote bidirectional transcription *in vitro* and are important for virus growth *in vivo*. *Virology* 84, 265-276.
- Hatfield, L. & Hearing, P. (1993).** The NFIII/OCT-1 binding site stimulates adenovirus DNA replication *in vivo* and is functionally redundant with adjacent sequences. *Journal of Virology* 67, 3931-3939.
- Hay, R. T., Freeman, A., Leith, I., Monaghan, A. & Webster, A. (1995).** Molecular interactions during adenovirus DNA replication. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 199, 31-48.
- Heldstab, A., & Bestetti, G. (1984).** Virus-associated gastrointestinal diseases in snakes. *Journal of Zoo and Animal Medicine* 5, 118-128.
- Hess, M., Blöcker, H. & Brandt, P. (1997).** The complete nucleotide sequence of the egg drop syndrome virus: an intermediate between mastadenoviruses and aviadenoviruses. *Virology* 238, 145-156.
- Hoggan, M. D., Shatkin, A. J., Blacklow, N. R., Koczot, F. & Rose, J. A. (1968).** Helper-dependent infectious deoxyribonucleic acid from adenovirus-associated virus. *Journal of Virology* 2, 850-851.
- Hong, J. S. & Engler, J. A. (1991).** The amino terminus of the adenovirus fiber protein encodes the nuclear localization signal. *Virology* 185, 758-767.

- Hughes, S., Zelus, D. & Mouchiroud D. (1999).** Warm-blooded isochore structure in Nile crocodile and turtle. *Molecular biology and evolution* 16, 1521-1527.
- Hwang, C. B., Ruffner, K. L. & Coen, D. M. (1992).** A point mutation within a distinct conserved region of the herpes simplex virus DNA polymerase gene confers drug resistance. *Journal of Virology* 66, 1774-1776.
- Ilyina, T. V. & Koonin, E. V. (1992).** Conserved sequence motifs in the initiator proteins for rolling circle DNA replication encoded by diverse replicons from eubacteria, eucaryotes and archaeobacteria. *Nucleic Acids Research* 20, 3279-3285.
- Jacobson, E. R., Gardiner, C. H. & Foggin, C. M. (1984).** Adenovirus-like infection in two Nile crocodiles. *Journal of American Veterinary Medicine Association* 185, 1421-1422.
- Jacobson, E. R., Gaskin, J. M. & Gardiner, C. H. (1985).** Adenovirus-like infection in a boa constrictor. *Journal of the American Veterinary Medicine Association* 187, 1226-1227.
- Jacobson, E. R. & Kollias, G. V. (1986).** Adenovirus-like infection in a Savannah monitor. *Journal of Zoo Animal Medicine* 17, 149-151.
- Jacobson, E. R. & Gardiner, C. H. (1990).** Adeno-like virus in esophageal and tracheal mucosa of a Jackson's chameleon (*Chamaeleo jacksoni*). *Veterinary Pathology* 27, 210-212.
- Jacobson, E. R., Kopit, W., Kennedy, F. A. & Funk, R. S. (1996).** Coinfection of a bearded dragon (*Pogona vitticeps*) with adenovirus- and dependovirus-like viruses. *Veterinary Pathology* 33, 343-346.
- Juhász, A. & Ahne, W. (1993).** Physicochemical properties and cytopathogenicity of an adenovirus-like agent isolated from corn snake (*Elaphe guttata*). *Archives of Virology* 130, 429-439.
- Kandimalla, E. R., Zhu, F. G., Bhagat, L., Yu, D. & Agrawal, S. (2003).** Toll-like receptor 9: modulation of recognition and cytokine induction by novel synthetic CpG DNAs. *Biochemical Society transactions* 31, 654-658.
- Khatri, A. & Both, G. W. (1998).** Identification of transcripts and promoter regions of ovine adenovirus OAdV-7. *Virology* 245, 128-141.
- Kim, D. Y., Mitchell, M. A., Bauer, R. W., Poston, R. & Cho D. Y. (2002).** An outbreak of adenoviral infection in inland bearded dragons (*Pogona vitticeps*) coinfecting with dependovirus and coccidial protozoa (*Isospora* sp.). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 14, 332-334.
- Kinsel, M. J., Barbiers, R. B., Manharth, A. & Murnane, R. D. (1997).** Small intestinal adeno-like virus in a mountain chameleon (*Chamaeleo montium*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 28, 498-500.

- Knopf, C. W. (1998).** Evolution of viral DNA-dependent DNA polymerases. *Virus Genes* 16, 47-58.
- Koonin, E. V. (1993).** A common set of conserved motifs in a vast variety of putative nucleic acid-dependent ATPases including MCM proteins involved in the initiation of eukaryotic DNA replication. *Nucleic Acids Research* 21, 2541-2547.
- Kovács, G. M., LaPatra, S. E., D'Halluin, J. C. & Benkő, M. (2003).** Phylogenetic analysis of the hexon and protease genes of a fish adenovirus isolated from white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) supports the proposal for a new adenovirus genus. *Virus Research* 98, 27-34.
- Larsson, S., Bellett, A. & Akusjärvi, G. (1986).** VA RNAs from avian and human adenoviruses: dramatic differences in length, sequence, and gene location. *Journal of Virology* 58, 600-609.
- Leegwater, P. A., van Driel, W. & van der Vliet, P. C. (1985).** Recognition site of nuclear factor I, a sequence-specific DNA-binding protein from HeLa cells that stimulates adenovirus DNA replication. *The EMBO Journal* 4, 1515-1521.
- Lehmkuhl, H. D. & Cutlip, R. C. (1999).** A new goat adenovirus isolate proposed as the prototype strain for goat adenovirus serotype 1. *Archives of Virology* 144, 1611-1618.
- Li, Y., Zádori, Z., Bando, H., Dubuc, R., Fédieri, G., Szelei, J. & Tijssen, P. (2001).** Genome organization of the densovirus from *Bombyx mori* (BmDENV-1) and enzyme activity of its capsid. *Journal of General Virology* 82, 2821-2825.
- Louis, N., Fender, P., Barge, A., Kitts, P. & Chroboczek, J. (1994).** Cell-binding domain of adenovirus serotype 2 fiber. *Journal of Virology* 68, 4104-4106.
- Lutz, P. & Keding, C. (1996).** Properties of the adenovirus IVa2 gene product, an effector of late-phase-dependent activation of the major late promoter. *Journal of Virology* 70, 1396-1405.
- Lutz, P., Rosa-Calatrava, M. & Keding, C. (1997).** The product of the adenovirus intermediate gene IX is a transcriptional activator. *Journal of Virology* 71, 5102-5109.
- Ma, Y. & Mathews, M. B. (1996).** Structure, function, and evolution of adenovirus-associated RNA: a phylogenetic approach. *Journal of Virology* 70, 5083-5099.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J. (1982).** *Molecular Cloning a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour.
- Marshang, R. E., Michling, R., Benkő, M., Papp, T., Harrach, B. & Böhm, R. (2003).** Evidence for wide-spread atadenovirus infection among snakes. *Proceedings of the 6th International Congress of Veterinary Virology on Virus Persistence and Evolution*. St. Malo, p. 152.

- Mathias, P., Wickham, T., Moore, M. & Nemerow, G. (1994).** Multiple adenovirus serotypes use alpha v integrins for infection. *Journal of Virology* 68, 6811-6814.
- McPherson, R. A., Ginsberg, H. S. & Rose, J. A. (1982).** Adeno-associated virus helper activity of adenovirus DNA binding protein. *Journal of Virology* 44, 666-673.
- Meissner, J. D., Hirsch, G. N., LaRue, E. A., Fulcher, R. A. & Spindler, K. R. (1997).** Completion of the DNA sequence of mouse adenovirus type 1: sequence of E2B, L1, and L2 (18-51 map units). *Virus Research* 51, 53-64.
- Meyers, C., Mane, M., Kokorina, N., Alam, S. & Hermonat, P. L. (2000).** Ubiquitous human adeno-associated virus type 2 autonomously replicates in differentiating keratinocytes of a normal skin model. *Virology* 272, 338-346.
- Morin, N., Delsert, C. & Klessig, D. F. (1989).** Nuclear localization of the adenovirus DNA-binding protein: requirement for two signals and complementation during viral infection. *Molecular and Cellular Biology* 9, 4372-4380.
- Morrison, M. D., Onions, D. E. & Nicolson, L. (1997).** Complete DNA sequence of canine adenovirus type 1. *Journal of General Virology* 78, 873-878.
- Nagy, M., Nagy, É. & Tuboly, T. (2001).** The complete nucleotide sequence of porcine adenovirus serotype 5. *Journal of General Virology* 82, 525-529.
- Norrby, E. & Wadell, G. (1969).** Immunological relationships between hexons of certain human adenoviruses. *Journal of Virology* 4, 663-670.
- Norrby, E., Bartha, A., Boulanger, P., Dreizin, R. S., Ginsberg, H. S., Kalter, S. S., Kawamura, H., Rowe, W. P., Russell, W. C., Schlesinger, W. & Wigand, R. (1976).** *Adenoviridae. Intervirology* 7, 117-125.
- Ogawa, M., Ahne, W. & Essbauer, S. (1992).** Reptilian viruses: adenovirus-like agent isolated from royal python (*Python regius*). *Journal of Veterinary Medicine B* 39, 732-736.
- Ojkic, D. & Nagy, É. (2000).** The complete nucleotide sequence of fowl adenovirus type 8. *Journal of General Virology* 81, 1833-1837.
- Oosterom-Dragon, E. A. & Anderson, C. W. (1983).** Polypeptide structure and encoding location of the adenovirus serotype 2 late, nonstructural 33K protein. *Journal of Virology* 45, 251-263.
- Page, R. D. M. (1996).** TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12, 357-358.
- Perkins, L. E., Campagnoli, R. P., Harmon, B. G., Gregory, C. R., Steffens, W. L., Latimer, K., Clubb, S. & Crane, M. (2001).** Detection and confirmation of reptilian adenovirus infection by *in situ* hybridization. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigations* 13, 365-368.

- Pitcovski, J., Mualem, M., Rei-Koren, Z., Krispel, S., Shmueli, E., Peretz, Y., Gutter, B., Gallili, G. E., Michael, A. & Goldberg, D. (1998).** The complete DNA sequence and genome organization of the avian adenovirus, hemorrhagic enteritis virus. *Virology* 249, 307-315.
- Pruijn, G. J., van Miltenburg, R. T., Claessens, J. A. & van der Vliet, P. C. (1988).** Interaction between the octamer-binding protein nuclear factor III and the adenovirus origin of DNA replication. *Journal of Virology* 62, 3092-3102.
- Qiu, J., Nayak, R., Tullis, G. E. & Pintel, D. J. (2002).** Characterization of the transcription profile of adeno-associated virus type 5 reveals a number of unique features compared to previously characterized adeno-associated viruses. *Journal of Virology* 76, 12435-12447.
- Ramachandra, M. & Padmanabhan, R. (1995).** Expression, nuclear transport, and phosphorylation of adenovirus DNA replication proteins. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 199, 50-88.
- Ramis, A., Fernandez-Bellon, H., Majo, N., Martinez-Silvestre, A., Latimer, K., Campagnoli, R., Harmon, B. G., Gregory, C. R., Steffens, W. L., Clubb, S. & Crane, M. (2000).** Adenovirus hepatitis in a boa constrictor (*Boa constrictor*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigations* 12, 573-576.
- Rancourt, C., Keyvani-Amineh, H., Sircar, S., Labrecque, P. & Weber, J. M. (1995).** Proline 137 is critical for adenovirus protease encapsidation and activation but not enzyme activity. *Virology* 209, 167-73.
- Reddy, P. S., Idamakanti, N., Song, J. Y., Lee, J. B., Hyun, B. H., Park, J. H., Cha, S. H., Bae, Y. T., Tikoo, S. K. & Babiuk, L. A. (1998a).** Nucleotide sequence and transcription map of porcine adenovirus type 3. *Virology* 251, 414-426.
- Reddy, P. S., Idamakanti, N., Zakhartchouk, A. N., Baxi, M. K., Lee, J. B., Pyne, C., Babiuk, L. A. & Tikoo, S. K. (1998b).** Nucleotide sequence, genome organization, and transcription map of bovine adenovirus type 3. *Journal of Virology* 72, 1394-1402.
- Reubel, G. H. & Studdert, M. J. (1997).** Identification, cloning and sequence analysis of the equine adenovirus 1 hexon gene. *Archives of Virology* 142, 1193-1212.
- Riley, D. & Flint, S. J. (1993).** RNA-binding properties of a translational activator, the adenovirus L4 100-kilodalton protein. *Journal of Virology* 67, 3586-3595.
- Roberts, M. M., White, J. L., Grutter, M. G. & Burnett, R. M. (1986).** Three-dimensional structure of the adenovirus major coat protein hexon. *Science* 232, 1148-1151.
- Rowe, W. P., Huebner, R. J., Gilmore, L. K., Parrott, R. H. & Ward, T. G. (1953).** Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in

tissue culture. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 84, 570-573.

- Russell, W. C. & Benkő, M. (1999).** Animal adenoviruses. In *Encyclopedia of Virology*, 2nd edn. pp. 14-21. Edited by A. Granoff & R. G. Webster. San Diego: Academic Press.
- Rusvai, M., Harrach, B., Bánrévi, A., Evans, P. S. & Benkő, M. (2000).** Identification and sequence analysis of the core protein genes of bovine adenovirus 2. *Virus Research* 70, 25-30.
- Saraste, M., Sibbald, P. R. & Wittinghofer, A. (1990).** The P-loop—a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends in Biochemical Sciences* 15, 430-434.
- Schöndorf, E., Bahr, U., Handermann, M. & Darai, G. (2003).** Characterization of the complete genome of the Tupaia (tree shrew) adenovirus. *Journal of Virology* 77, 4345-4356.
- Schumacher, J., Jacobson, E. R., Burns, R. & Tramontin, R. R. (1994).** Adenovirus-like infection in 2 rosy boas (*Lichanura trivirgata*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 25, 461-465.
- Shen, Y., Kitzes, G., Nye, J. A., Fattaey, A. & Hermiston, T. (2001).** Analyses of single-amino-acid substitution mutants of adenovirus type 5 E1B-55K protein. *Journal of Virology* 75, 4297-4307.
- Shenk, T. E. (2001).** *Adenoviridae: the viruses and their replication*. In *Fields Virology*, 4th edn, vol. 2, pp. 2265–2300. Edited by D. M. Knipe & P. M. Howley. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Sheppard, M. & Trist, H. (1992).** Characterization of the avian adenovirus penton base. *Virology* 188, 881-886.
- Sheppard, M. & Trist, H. (1993).** The identification of genes for the major core proteins of fowl adenovirus serotype 10. *Archives of Virology* 132, 443-449.
- Sheppard, M., McCoy, R. J. & Werner, W. (1995).** Genomic mapping and sequence analysis of the fowl adenovirus serotype 10 hexon gene. *Journal of General Virology* 76, 2595-2600.
- Shinagawa, M., Ishiyama, T., Padmanabhan, R., Fujinaga, K., Kamada, M. & Sato, G. (1983).** Comparative sequence analysis of the inverted terminal repetition in the genomes of animal and avian adenoviruses. *Virology* 125, 491-495.
- Shinagawa, M., Iida, Y., Matsuda, A., Tsukiyama, T. & Sato, G. (1987).** Phylogenetic relationships between adenoviruses as inferred from nucleotide sequences of inverted terminal repeats. *Gene* 55, 85-93.

- Sorden, S. D., Woods, L. W. & Lehmkuhl, H. D. (2000).** Fatal pulmonary edema in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) associated with adenovirus infection. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigations* 12, 378-380.
- Srivastava, A., Lusby, E. W. & Berns, K. I. (1983).** Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome. *Journal of Virology* 45, 555-564.
- Tattersall, P., Bergoin, M., Bloom, M. E., Brown, K. E., Linden, R. M., Muzyczka, N., Parrish, C. R. & Tijssen, P. (2004).** *Parvoviridae*. In *Virus Taxonomy*. VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, pp. 353-369. Edited by C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger & L. A. Ball. Elsevier, Academic Press, London.
- Temperley, S. M., Burrow, C. R., Kelly, T. J. & Hay, R. T. (1991).** Identification of two distinct regions within the adenovirus minimal origin of replication that are required for adenovirus type 4 DNA replication *in vitro*. *Journal of Virology* 65, 5037-5044.
- Thomson, D., Meers, J. & Harrach, B. (2002).** Molecular confirmation of an adenovirus in brushtail possums (*Trichosurus vulpecula*). *Virus Research* 83, 189-195.
- Tijssen, P. & Bergoin, M. (1995).** Densonucleosis viruses constitute an increasingly diversified subfamily among the parvoviruses. *Seminars in Virology* 6, 347-355.
- Toogood, C. I. & Hay, R. T. (1988).** DNA sequence of the adenovirus type 41 hexon gene and predicted structure of the protein. *Journal of General Virology* 69, 2291-2301.
- Truyen, U. & Parrish, C. R. (2000).** Epidemiology and pathology of autonomous parvoviruses. *Contributions to microbiology* 4, 149-162.
- Tucker, P. A., Tsernoglou, D., Tucker, A. D., Coenjaerts, F. E., Leenders, H. & van der Vliet, P. C. (1994).** Crystal structure of the adenovirus DNA binding protein reveals a hook-on model for cooperative DNA binding. *The EMBO Journal* 13, 2994-3002.
- Ursu, K., Harrach, B., Matiz, K. & Benkő, M. (2004).** DNA sequencing and analysis of the right-hand part of the genome of the unique bovine adenovirus type 10. *Journal of General Virology* 85, 593-601.
- van Der Vliet, P. C. (1995).** Adenovirus DNA replication. In *Molecular Repertoire of Adenoviruses*, pp. 24. Edited by W. D. P. Böhm. Köln: Springer.
- van Oostrum, J., Smith, P. R., Mohraz, M. & Burnett, R. M. (1987).** The structure of the adenovirus capsid. III. Hexon packing determined from electron micrographs of capsid fragments. *Journal of Molecular Biology* 198, 73-89.
- Venktesh, A., Watt, F., Xu, Z., Both, G. W. & Xu, Z. Z. (1998).** Ovine adenovirus (OAV287) lacks a virus-associated RNA gene. *Journal of General Virology* 79, 509-516.

- Vrati, S., Boyle, D., Kocherhans, R. & Both, G. W. (1995).** Sequence of ovine adenovirus homologs for 100K hexon assembly, 33K, pVIII, and fiber genes: Early region E3 is not in the expected location. *Virology* 209, 400-408.
- Vrati, S., Brookes, D. E., Strike, P., Khatri, A., Boyle, D. B. & Both, G. W. (1996a).** Unique genome arrangement of an ovine adenovirus: identification of new proteins and proteinase cleavage sites. *Virology* 220, 186-99.
- Vrati, S., Macavoy, E. S., Xu, Z. Z., Smole, C., Boyle, D. B. & Both, G. W. (1996b).** Construction and transfection of ovine adenovirus genomic clones to rescue modified viruses. *Virology* 220, 200-203.
- Walters, R. W., Agbandje-McKenna, M., Bowman, V. D., Moninger, T. O., Olson, N. H., Seiler, M., Chiorini, J. A., Baker, T. S. & Zabner, J. (2004).** Structure of adeno-associated virus serotype 5. *Journal of Virology* 78, 3361-3371.
- Walz, C., Deprez, A., Dupressoir, T., Durst, M., Rabreau, M. & Schlehofer, J. R. (1997).** Interaction of human papillomavirus type 16 and adeno-associated virus type 2 co-infecting human cervical epithelium. *Journal of General Virology* 78, 1441-1452.
- Wang, T. S., Wong, S. W. & Korn, D. (1989).** Human DNA polymerase alpha: predicted functional domains and relationships with viral DNA polymerases. *FASEB Journal* 3, 14-21.
- Weber, J. M., Cai, F., Murali, R. & Burnett, R. M. (1994).** Sequence and structural analysis of murine adenovirus type 1 hexon. *Journal of General Virology* 75, 141-147.
- Weber, J. M. (1995).** Adenovirus endopeptidase and its role in virus infection. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 199, 227-235.
- Webster, A., Russel, S., Talbot, P., Russel, W. C. & Kemp, G. D. (1989).** Characterization of the adenovirus proteinase: substrate specificity. *Journal of General Virology* 70, 3225-3234.
- Webster, A., Hay, R. T. & Kemp, G. (1993).** The adenovirus protease is activated by a virus-encoded disulphide-linked peptide. *Cell* 72, 97-104.
- Webster, A., Leith, I. R. & Hay, R. T. (1994).** Activation of adenovirus-coded protease and processing of preterminal protein. *Journal of Virology* 68, 7292-7300.
- Webster, A., Leith, I. R. & Hay, R. T. (1997a).** Domain organization of the adenovirus preterminal protein. *Journal of Virology* 71, 539-547.
- Webster, A., Leith, I. R., Nicholson, J., Hounsell, J. & Hay, R. T. (1997b).** Role of preterminal protein processing in adenovirus replication. *Journal of Virology* 71, 6381-6389.

- Wellehan, J. F., Johnson, A. J., Harrach, B., Benkő, M., Pessier, A. P. Johnson, C.M., Garner, M.M., Childress, A. & Jacobson, E. R. (2004).** Detection and analysis of six lizard adenoviruses by consensus primer PCR provides further evidence of a reptilian origin for the adenoviruses. *Journal of Virology* 78, 13366-13369.
- Wickham, T. J., Mathias, P., Cheresch, D. A. & Nemerow G. R. (1993).** Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* 73, 309-319.
- Willcox, N. & Mautner, V. (1976).** Antigenic determinants of adenovirus capsids. II. Homogeneity of hexons, and accessibility of their determinants, in the virion. *Journal of Immunology* 116, 25-29.
- Woods, L. W., Swift, P. K., Barr, B. C., Horzinek, R. C., Nordhausen, R. W., Stillian, M. H., Patton, J. F., Oliver, M. N., Jones, K. R. & MacLachlan, N. J. (1996).** Systemic adenovirus infection associated with high mortality in mule deer (*Odocoileus hemionus*) in California. *Veterinary Pathology* 33, 125-132.
- Wozniak, E. J., DeNardo, D. F., Brewer, A., Wong, V. & Tarara, R. P. (2000).** Identification of adenovirus- and dependovirus-like agents in an outbreak of fatal gastroenteritis in captive born California mountain kingsnakes, *Lampropeltis zonata multicincta*. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery* 10, 4-7.
- Zádori, Z., Stefancsik, R., Rauch, T. & Kisary, J. (1995).** Analysis of the complete nucleotide sequences of goose and muscovy duck parvoviruses indicates common ancestral origin with adeno-associated virus 2. *Virology* 212, 562-573.
- Zádori, Z., Szelei, J., Lacoste, M. C., Li, Y., Gariépy, S., Raymond, P., Allaire, M., Nabi, I. R. & Tijssen, P. (2001).** A viral phospholipase A2 is required for parvovirus infectivity. *Developmental Cell* 1, 291-302.
- Zhang, W. & Imperiale, M. J. (2002).** Requirement of the adenovirus IVa2 protein for virus assembly. *Journal of Virology* 77, 3586-3594.

Tudományos publikációk

Farkas, S. L., Benkő, M., Élő, P., Ursu, K., Dán, Á., Ahne, W. & Harrach, B. (2002): Genomic and phylogenetic analyses of an adenovirus isolated from a corn snake (*Elaphe guttata*) imply common origin with the members of the proposed new genus *Atadenovirus*. *Journal of General Virology* 83 (10): 2403-2410. (IF 3,300)

Élő, P., **Farkas, S. L.,** Dán, Á. & Kovács, G. M. (2003): The p32K structural protein of the atadenovirus might have bacterial relatives. *Journal of Molecular Evolution* 56: 175-180. (IF 3,041)

Farkas, S. L., Zádori, Z., Benkő, M., Essbauer, S., Harrach, B. & Tijssen, P. (2004): A parvovirus isolated from royal python (*Python regius*) is a member of the *Dependovirus* genus. *Journal of General Virology* 85 (3): 555-561. (IF 3,300)

Farkas L. S. (2004): Hüllök adenovírusai. *Magyar Állatorvosok Lapja* 126 (4), 212-216. (IF 0,051)

Melléklet

Az illesztésekhez felhasznált fehérjék génbanki elérhetősége

Teljes AdV genom szekvenciák	Génbanki elérhetőségi szám
BAdV-2	AF252854
BAdV-3	AF030154
BAdV-4	AF036092
CAAdV-1	Y07760
CAAdV-2	U77082
EDS	Y09598
FAdV-1	U46933
FAdV-9	AF083975
FrAdV-1	AF224336
HAdV-2	J01917
HAdV-5	M73260
HAdV-12	X73487
HAdV-17	AF108105
HAdV-40	L19443
MAdV-1	U95843
OAdV-7	U40837
PAdV-3	AF083132
PAdV-5	AF289262
SAdV-21	AR101858
SAdV-25	AF394196
THEV	AF074946
További AdV hexon szekvenciák	Génbanki elérhetőségi szám
BAdV-5	AF207658
BAdV-6	AF207659
BAdV-7	AF238232
BAdV-8	AF238233
EAdV-1	L79955
EAdV-2	L80007
FAdV-10	U26220
GAdV-1	AF207660
HAdV-3	X76549
HAdV-4	AF065062
HAdV-7	X76551
HAdV-16	X74662
HAdV-19	AF161565, X98359, Y17250
HAdV-41	X51783
HAdV-48	U20921
OAdV-1	AF198354
Rus-törzs	E16 P. (nem publikált eredmény)
SnAdV-1	AY082603
További AdV proteáz szekvenciák	Génbanki elérhetőségi szám
BAdV-1	Evans, P. S. (nem publikált eredmény)
BAdV-6	Szathmáry, R. (nem publikált eredmény)
BAdV-7	X53989
BAdV-10	AF027599
EAdV-2	L80007
HAdV-3	X13271
HAdV-4	M16692
HAdV-41	M21163
OAdV-3	AF153447
OAdV-5	Szathmáry, R. (nem publikált eredmény)

Rus-törzs	E10, P. (nem publikált eredmény)
SnAdV-1	AY082603
További AdV p32K szekvenciák	Génbanki elérhetőségi szám
EDS	CAA70797
Rus-törzs	AF238880
SnAdV-1	Farkas S. L. (nem publikált eredmény)
További AdV pVII szekvenciák	Génbanki elérhetőségi szám
FAdV-10	L08450
HAdV-4	U70921
PoAdV-1	AF249333
SnAdV-1	Farkas S. L. (nem publikált eredmény)
Parvovírus szekvenciák	Génbanki elérhetőségi szám
AAAV	AY186198
AAV2	J01901
AAV3b	AF028705
AAV4	U89790
AAV5	AF085716
AAV6	AF028704
AAV7	AF513851
AAV8	AF513852
A6	AY064475
Aleuti mink disease virus	M20036
B19	P07298
BPV	M14363
Bovine3 PV	AF406967
Canine PV	M19296
CnMV	AF495467
Chipmunk PV	U86868
Feline PV	M38246
Goose PV	U25749
H-1	X01457
Kilham rat PV	AF321230
Lull1 PV	M81888
MinkAba	D00765
MMV	J02275
Mouse1 PV	U12469
Muskovy duck PV	U22967
Pig-tailed macaque PV	AF221123
Porcine PV	U44978
Rat1a PV	AF036710
Rhesus macaque PV	AF221122
Simian PV	U26342
V9	AJ249437

Köszönetnyilvánítás

Mindenek előtt őszintén köszönöm témavezetőimnek Dr. Benkő Máriának és Dr. Harrach Baláznak, hogy bevezettek a molekuláris biológia világába, lehetővé tették, hogy a Molekuláris Virologia Témacsoportban végezhessem doktori munkámat, valamint a sok segítséget és támogatást, amelyet a csoportban eltöltött évek alatt kaptam tőlük.

Köszönetet szeretnék mondani Dr. Tekes Lajosnak, az Országos Állategészségügyi Intézet igazgatójának, amiért lehetővé tette az ALFTM Express (Pharmacia) szekvenáló használatát.

Köszönettel tartozom munkatársaimnak, különösképpen Ursu Krisztinának, Dr. Dán Ádámnak és Dr. Élő Péternek, amiért végtelen türelemmel segítettek a molekuláris biológiai módszerek elsajátításában.

Köszönöm Prof. Peter Tijssennek, Dr. Zádori Zoltánnak kanadai tanulmányutam megszervezését és az együttműködésünk során nyújtott segítséget, technikai irányítást.