

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**ŐSIBB GERINCESEK KÜLÖNFÉLE
VÍRUSAINAK GENETIKAI VIZSGÁLATA,
BIODIVERZITÁSA ÉS FILOGENETIKÁJA**

Tarján Zoltán László

Témavezető: Dr. Benkő Mária



ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM
Állatorvostudományi Doktori Iskola

Budapest, 2021

Témavezető és témabizottsági tagok:

.....

Prof. Dr. Benkő Mária, az MTA doktora
ELKH Állatorvostudományi Kutatóintézet
témavezető

Prof. Dr. Harrach Balázs, az MTA levelező tagja
ELKH Állatorvostudományi Kutatóintézet
témabizottság tagja

Doszpoly Andor PhD
ELKH Állatorvostudományi Kutatóintézet
témabizottság tagja

.....

Tarján Zoltán László

Bevezetés

Az Állatorvostudományi Kutatóintézet Molekuláris és Összehasonlító Virologia témacsoportjában összehasonlító genetikai és filogenetikai módszerek alkalmazásával évtizedek óta megkülönböztetett figyelemmel tanulmányozzák az ősbibb gerinces csoportokat fertőző adenovírusokat (AdV). Eredményeik alapján az *Adenoviridae* család eredeti két nemzetsége (*Mastadenovirus* és *Aviadenovirus*) mellett már három újat alapítottak *Atadenovirus*, *Siadenovirus* és *Ichtadenovirus* névvel. Az *Atadenovirus* tagjait a hüllők osztályával együtt fejlődött AdV leszármazási vonalnak feltételezték, de később egyre több adat utalt arra, hogy ezek a vírusok a pikkelyes hüllők rendjébe tartozó állatok vírusai, és feltételezhető, hogy madarakba és kérődzőkbe gazdaváltás útján kerülhettek. Meglepő módon szinte azonos időben, 2007-ben egy amerikai és két magyar laboratóriumban is felfedeztek az addig ismertektől jelentős filogenetikai távolságban lévő AdV-eket kedvtelésből tartott, szárazföldi és édesvízi teknősökben. A PCR-rel felerősített DNS-polimeráz génszakasz alapján készült törzsfa-rekonstrukció az újonnan talált vírusokat egy nemzetség szinten

elkülönülő leszármazási vonal tagjaiként mutatta. Érdekesnek látszott minél több pozitív minta keresése, és a vírusgenomból további szakaszok szekvenciájának megismerése és elemzése.

Halakból és kétéltűekből véletlenszerűen gyűjtött minták PCR-es szűrésével sem adenovírust, sem herpeszvírust nem sikerült kimutatnom. Egy hazai tógazdaságból kapott, bőrelváltozásokat mutató harcsa bőrmintájában azonban kimutattam egy addig ismeretlen herpeszvírust. A nemrégiben kialakított *Herpesvirales* renden belül a szintén újonnan létesített *Alloherpesviridae* család tagjai halakat és kétéltűeket fertőző, halgazdasági és állategészségügyi szempontból is jelentős kórokozók. A hazánk természetes vizeiben is őshonos lesőharcsának (*Silurus glanis*) az úgynevezett pontyhimlőhöz hasonló bőrelváltozását mikroszkópos és elektronmikroszkópos lelet alapján magyar kutatók szintén herpeszvírus fertőzésnek tulajdonították, de molekuláris vizsgálattal ezt évtizedek óta nem erősítették meg.

Mintagyűjteményemben jelentősebb pozitivitást a cirkovírusok általános kimutatására alkalmas PCR-es szűréssel kaptam. A *Circoviridae* családba sorolható vírusok előfordulását halakban a világon elsőként

magyar kutatók írták le, de doktori munkám kezdetéig kétéltűekből és hüllőkből nem mutattak ki cirkovírusokat. A környezeti mintákból nyert szekvencia adatok ugrásszerű gyarapodása nyomán fokozatosan ismertté vált a ma már CRESS DNS vírusnak nevezett vírusok rendkívüli mennyisége, változatossága és elterjedtsége. E vírusok közös jellemzője, hogy kicsi, körkörös, egyszálú DNS genommal rendelkeznek, amely replikációs fehérjét is kódol. A CRESS DNS vírusok előfordulását gerinces és gerinctelen állati szervezetekben, de a növényvilág különböző szerveződésű tagjaiban, sőt gombákban is kimutatták. Egyelőre kevés ismerettel rendelkezünk a viroszférában betöltött szerepükre, illetve esetleges kórokozó képességükre vonatkozóan.

A PhD munka célja

- Ősibb gerincesek mintáinak PCR-es szűrése a három víruscsalád (*Adenoviridae*, *Alloherpesviridae* és *Circoviridae*) tagjainak kimutatására.
- A kimutatott új vírusokból a teljes genom, vagy a lehetőségek szerint minél nagyobb genomrészletek nukleotid sorrendjének meghatározása.
- Az újonnan nyert szekvenciák elemzése, a vírusok filogenetikai vizsgálata, az új vírusok rendszertani helyének tisztázása.
- A vírusok és a gazdafajok feltételezett koevolúciójának tanulmányozása.

Anyag és módszer

A vizsgálati minták eredete

A teknősök AdV-szűrővizsgálatához 23 teknősfaj 148 egyedéből származó mintákat használtam. Az élő állatokból kloakatampont vettem, az elhullott állatoknak kevert szervmintáit vizsgáltam. Az ősbibb gerincesekben előforduló CRESS DNS vírusok kimutatásához 40 halfaj (407 egyed), 15 kétéltű faj (52 egyed) és 29 hüllőfaj (107 egyed) kevert szervmintáit használtam. Az alloherpeszvírus kimutatása egy hazai halgazdaságból vizsgálatra küldött, himlőszerű kiütéseket mutató, kétnyaras lesőharcsa bőrmintájának felhasználásával történt. A mintákból minden esetben DNS-t vontam ki.

A polimeráz láncreakció (PCR), a DNS szekvenálás és a molekuláris klónozás

A vírusnukleinsav jelenlétének kimutatására a nemzetközi szakirodalomban közölt, széles körben alkalmazott PCR módszereket használtam, amelyeket az egyes víruscsoportok adott génjeiben található konzervatív régiók felerősítésére terveztek.

A teknős-adenovírus és a lesőharcsa-herpeszvírus esetében további génszakaszok felerősítését és azok összekötését próbáltam meg egy-, illetve kétkörös PCR-ekkel, konszenzus és specifikus primerek alkalmazásával. A CRESS DNS vírus jelenlétére pozitív mintákból saját tervezésű specifikus primerekkel, kétkörös inverz PCR-ekkel kíséreltem meg a teljes genom felerősítését.

A PCR termékek szekvenálását Sanger-féle reakcióval BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) használatával végeztem.

Többszörös hullámokat eredményező PCR termékek esetén a CloneJET™ PCR Cloning Kit (Thermo Scientific) használatával elvégzett molekuláris klónozással különítettem el az azonos méretű, de nem vírus eredetű DNS fragmentumokat.

Az adatok elemzése és a filogenetikai vizsgálatok

A kétoldalról meghatározott nukleinsav-sorrendeket a Staden programcsomag Gap v4.11.2 programjának segítségével illesztettem, szerkesztettem és javítottam. A BLAST homológiakereső alkalmazással online elvégeztem a kapott szekvenciák ellenőrzését. Az aminosav és nukleotid szekvenciák pozicionális

illesztését a T-Coffee programmal végeztem. A származtatott aminosav (as) szekvenciákat a JavaScript DNA Translator 1.1 programmal állítottam elő. Az as és nukleinsav adataimra legjobban illeszkedő evolúciós modell kiválasztására a ProtTest v3.3, illetve a jModelTest 2.1.10 programot használtam. Az ékszerteknős-AdV esetében az illesztésekben esetlegesen előforduló bizonytalan régiókat a Gblocks v0.91 program online szerverének használatával távolítottam el. A HV-ok és a CRESS DNS vírusok esetében manuálisan végeztem az illesztések szerkesztését a BioEdit v7.0.9.0 programmal. A maximum likelihood analízishez a PhyML 3.0 programot használtam. A Bayes-i statisztikán alapuló filogenetikai elemzéshez a MrBayes 3.2.7 programot alkalmaztam. A vírusok és természetes gazdáik feltételezett közös evolúciós múltját bemutató tanglegramokat a Dendroscope v3.7.2 program segítségével készítettem el. A sematikus géntérképek és genomábrák készítéséhez az Artemis r16.0.0 programcsomag DNAPlotter r1.11 programját használtam.

Eredmények és megbeszélés

Vörösfülű ékszerteknős-AdV

A szűrővizsgálatok során nyert PCR termék szekvenciája alapján egy elhullott vörösfülű ékszerteknős belső szerveiből származó mintában az újonnan felfedezett adenovírus vonal egyetlen változata volt jelen, így ez a minta alkalmas kiindulási anyag volt a vírus genomjának szekvenálásához. A korábban a DNS-polimeráz, valamint a hexon génjéből felerősített termékek szekvenciája alapján a vírusra specifikus primereket terveztem kétkörös, összekötő PCR végrehajtásához. A genom bal vége felé eső IVa2 génre tervezett konszenzus primerekkel a DNS-polimeráz gén ismert része felé egy másik összekötő PCR-t végeztem. A PCR termékek szekvenciáinak illesztése után a vírus genomjának középső, megőrzött részéből 14776 bázispárnyi nukleotid-sorrend vált ismertté. A teljes genom nagyjából felének becsülhető szekvencia G+C tartalma 55,2% volt, ami kiegyensúlyozottnak tekinthető. A szekvencia annotálása során 2 részleges (IVa2 és hexon) és 8 teljes (DNS-polimeráz, pTP, 52K, pIIIa, pentonbázis, pVII, pX és pVI) gént azonosítottam. Ezek

relatív mérete, iránya és sorrendje megfelelt az adenovírusokra általánosan jellemző szerveződésnek. Lehetséges splicing donor és akceptor helyet a terminális fehérje prekursor (pTP) génjében találtam.

Öt prekursor protein aminosav sorrendjében kerestem a virális proteáz vágási motívumait, mivel ezek az egyes nemzetségek tagjaiban általában jellegzetesek és jól megőrzöttek, így számuk, valamint pontos szekvenciájuk a genusok taxonómiai elkülönítésére is alkalmas lehet. A pVI és pX prekursor protein esetében jelentős eltéréseket tapasztaltam a többi nemzetség képviselőihez viszonyítva. A pVII esetében az eltérés kevésbé szembeötlő volt. A filogenetikai távolságot két teljes (DNS-polimeráz és pentonbázis), valamint a részleges hexon gén alapján elvégzett törzsfarekonstrukciókkal vizsgáltam. A red-eared slider adenovírusnak (RESAdV-1) elnevezett vírus mindhárom fán a hivatalosan elfogadott nemzetségektől jól elkülönülő ágon jelent meg, és testvércsoportja minden esetben az *Ichtadenovirus* nemzetséget képviselő fehér tok-adenovírus 1 volt. A kimutatott filogenetikai távolság is indokolta a vírus új fajként történő besorolását, valamint a teknősökből kimutatott, hasonló adenovírusok számára egy új nemzetség létrehozását. Eredményeink

alapján tett javaslatunk szerint a Nemzetközi Vírusrendszertani Bizottság (ICTV) hivatalosan elfogadta a hatodik nemzetséget *Testadenovirus* néven. Alapító fajként az új, *Pond slider testadenovirus 1* vírushajt fogadta el. Az új teknős-adenovírusok leszármazási vonalának elkülönülését a koevolúciós vizsgálatok eredménye is megerősítette. Feltehető, hogy ezeknek a teknős-adenovírusoknak az őse már az ősi teknősöket fertőzte, és a teknősök evolúciója során a teknősfajok kialakulásával párhuzamosan velük együtt fejlődtek a testadenovírusaik is.

Lesőharcsa-herpeszvírus

Az intézetünkbe vizsgálatra küldött lesőharcván megfigyelhető, himlőszerű kiütések hasonlítottak a Békési és mtsai (1981) által leírt, fény-, illetve elektronmikroszkópos vizsgálatok alapján herpeszvírusos fertőzésnek tulajdonított bőrelváltozásokhoz. Az alloherpeszvírusok DNS-polimeráz génjét célzó, sikeres PCR termékének szekvenciája egy új alloherpeszvírus jelenlétét sugallta. A termináz génre irányuló PCR terméke olvashatatlan szekvenciát eredményezett, ami arra utalt, hogy az amplikon nem homogén. Molekuláris klónozás után sikerült a terminázból származó

fragmentumot elkülöníteni. Meglepetésünkre azonban kiderült, hogy a többféle, nem-specifikus termék között még egy szintén virális eredetű fragmentum is volt, ami a *Cyprinivirus* nemzetség egyes tagjaiban előforduló, egyelőre ismeretlen funkciójú fehérje génjével mutatott homológiát. Ennek a PCR terméknek, valamint a részleges DNS-polimeráz gén szekvenciájának alapján tervezett, specifikus primerekkel sikerült a két gén összekötése PCR-rel. Az áthidaló PCR-rel kapott termék szekvenálásával 15222 bp méretű genomszakasz elemzésére nyílt lehetőségem. A genomszakasz szekvenciájában talált ORF-ek közül kilencet fogadtam el génnek a hasonló genomszakasszal rendelkező 1-es típusú angolna- és 1-es típusú ponty-herpeszvírus genomterképe alapján. A hét teljes gén közül négy a harcsa-herpeszvírusra specifikusnak mutatkozott. Az összehasonlító genomvizsgálatok eredményei alapján a felerősített részleges genomszakasz szerveződésében egyértelműen a CyHV-1 megfelelő szakaszára hasonlít jobban. Mivel egy üvegharcsában talált alloherpeszvírus teljes genomszekvenciáját nemrégiben silurid herpeszvírus 1 elnevezéssel közölték, mi a lesőharcsában kimutatott új vírusnak a silurid herpeszvírus 2 (SiHV-2) nevet és a számára kialakítandó faj számára a *Silurid*

herpesvirus 2 fajnevet javasoljuk. A részleges vagy teljes génszekvenciák alapján készült törzsfa-rekonstrukciók szerint ez az új vírus a *Cyprinivirus* nemzetségbe sorolhatóan bizonyult, amelyben a pontyfélék alloherpeszvírusain kívül az angolna-herpeszvírus is található. A genusba tartozó vírusok és gazda-halaik törzsfa-rekonstrukciója hasonló topológiát mutatott.

Ősibb gerincesek CRESS DNS vírusai

A replikációs fehérje konzervatív szakaszára tervezett, kétkörös PCR-rel a szűrővizsgálatok során 566 vizsgálati mintából 8 esetben kaptam pozitív eredményt úgy, hogy ezt követően a teljes vírusgenomot sikerült felerősíteni. Az eredetileg cirkovírusok kimutatására tervezett kétkörös PCR módszer (Halami és mtsai, 2008) alkalmasnak bizonyult ciklovírus (CyV) és a *Circoviridae* családot is magába foglaló nagyobb csoport, az ún. CRESS DNS vírusok kimutatására is. Pozitív PCR-t eredményezett a dévérkeszeg, a razbóra, az angolna, a fenékjáró küllő, az amazóniai tejbéka és a vörösfülű ékszerteknősből származó minták vizsgálata. A vírusok mindegyike a tudomány számára újnak bizonyult. Egy folyami gébtől származó szervminta keverékből a sertés 2-es típusú cirkovírusát (PCV-2) mutattam ki. Néhány

esetben (razbóra CV-1 és -2, fenékjáró küllő-asszociált CyV, amazóniai tejbéka-asszociált CRESS DNS vírus) a PCR termék heterogenitása miatt molekuláris klónozásra volt szükség a vírus eredetű amplicon elkülönítéséhez. A folyami gébben talált PCV-2 teljes genomjának mérete 1766 nukleotid volt, és a GenBank adatbázisában található szekvenciák közül a BLASTn keresés alapján egy Brazíliából származó mintával (KT819161) mutatta a legnagyobb egyezést (99,2%). Jelenléte a halban feltételezhetően táplálék eredetű. A teljesgenom vizsgálatok eredményei alapján a 7 új vírustól 4 (a dévérkeszegből, az angolnából és a razbórából kimutatott mindkét vírus) a cirkovírusok közé tartozik. A fenékjáró küllőből leírt vírus ciklovírusnak bizonyult, míg az amazóniai tejbéka vírusáról csak annyi mondható, hogy CRESS DNS vírusokhoz tartozik. A vörösfülű ékszerteknősből származó vírus a szekvenciák alapján szintén CRESS DNS vírus, de a genommérete kisebb. A razbórából kimutatott két CV teljes genomias DNS-ének páros illesztése alapján számított szekvencia azonosság 97,6%, tehát egy vírus két variánsának tekinthetők. A törzsfa-rekonstrukciók alátámasztották a genomvizsgálatok eredményeit. A halakból kimutatott cirkovírusok evolúciósan közel állnak egymáshoz, bár

nem alkotnak monofiletikus leszármazási ágat, és testvércsoportjuk a hal ciklovírusok kládja. E megfigyelés alapján felállítottunk egy hipotézist, amely szerint a *Circovirus* nemzetség a hal-ciklovírusokból származhat, és kialakulásukhoz a genom inverziója vezethetett. Az eredmények alapján a 7 új vírusból 4 (a dévérkeszeg és a razbóra cirkovírusai, a fenékjáró küllő ciklovírusa és az amazóniai tejbéka CRESS DNS vírusa) feltehetően önálló, recens vírus. Az angolnában kimutatott cirkovírus-szerű szekvencia, a kapszid fehérje génjének csökevényes mérete miatt valószínűleg a gazda genomjába integrálódott DNS szakaszból származott. A vörösfülű ékszerteknősből kimutatott szekvencia nem rendelkezik kapszid fehérje gén homológgal, így önálló vírusként való működése nem valószínű. Eredetére vonatkozóan többféle forgatókönyv elképzelhető. A lehetőségek között szerepelhet genomi integráció, szabad replikon, vagy egyes növényi vírusokhoz hasonlóan külön kapszidba csomagolt replikációs és kapszid gének. A két CRESS DNS vírus gazdaeredetét illetően a filogenetikai fán elfoglalt pozíciójuk nem nyújt megbízható információt. A tejbéka mintájából kimutatott vírusról feltételezhető, hogy rovar eredetű, és táplálékkal került a békába.

Új tudományos eredmények

1. Egy ékszerteknősből kimutatott, az *Adenoviridae* család ismert nemzetségeitől jelentősen eltérő, új leszármazási vonalat képviselő vírus közel 15 kb méretű, középső genomszakaszának nukleotid-sorrendjét meghatároztam. A kódolt fehérjék elemzése és filogenetikai vizsgálata alátámasztotta egy új nemzetség kialakítását, amit javaslatunk alapján a Nemzetközi Vírusrendszertani Bizottság *Testadenovirus* néven hivatalosan jóváhagyott. A genus alapító tagja a *Pond slider testadenovirus A* faj.
2. A tudomány számára új alloherpeszvírust mutattam ki himlőszerű bőrelváltozást mutató lesőharcsából. A vírus genomjából több, mint 16 kb szekvenciát meghatároztam. A kódolt fehérjék elemzése alapján a vírust az *Alloherpesviridae* család *Cyprinivirus* nemzetségébe tartozónak találtam. Az új vírusnak, mely az angolna és a ponty herpeszvírusainak közeli rokona, a silurid herpesvirus 2 nevet adtam, és számára egy új faj alapítását javaslom.

3. PCR segítségével korábban nem ismert *rep* gén fragmentumokat nyertem különféle ősbibb gerincese mintáiból. Hét mintából a teljes körkörös genom kinyerése is sikerült. A szekvenciák elemzése alapján *Circoviridae* családba, illetve a CRESS DNS vírusok csoportjába sorolható vírusok jelenléte feltételezhető angolnában, dévérkeszegben, fenékjáró küllőben, razbórában, egy békában és egy ékszerteknősben.
4. A kimutatott vírusok és feltételezett gazdafajaik között az esetek többségében hosszú koevolúciós múltra utaló filogenetikai kapcsolatot mutattam ki.

A doktori kutatás eredményeinek közlései

Az értekezés témájához kapcsolódó, lektorált folyóiratokban megjelent publikációk

Harrach B., Tarián Z.L., Benkő M.: **Adenoviruses across the animal kingdom: a walk in the zoo**, FEBS Lett., 593. 3660–3673, 2019.

Tarián Z.L., Doszpoly A.: **Teknősökben előforduló adenovírusok divezitása (Autoreferátum és bővített irodalmi összefoglaló)**, Magy. Állatorvosok, 141. 747–757, 2019.

Doszpoly A., Tarián Z.L., Glávits R., Müller T., Benkő M.: **Full genome sequence of a novel circo-like virus detected in an adult European eel *Anguilla anguilla* showing signs of cauliflower disease**, Dis. Aquat. Organ., 109. 107–115, 2014.

Tarián Z.L., Péntes J.J., Tóth R.P., Benkő M.: **First detection of circovirus-like sequences in amphibians and novel putative circoviruses in fishes**, Acta. Vet. Hung., 62. 134–144, 2014.

Doszpoly A., Wellehan J.F. Jr., Childress A.L., Tarián Z.L., Kovács E.R., Harrach B., Benkő M.: **Partial**

characterization of a new adenovirus lineage discovered in testudinoid turtles, *Infect. Genet. Evol.*, 17. 106–112, 2013.

A doktori kutatás témájához nem kapcsolódó közlemények

Lektorált tudományos folyóiratokban megjelent publikációk

Csépányi-Kömi R., Sáfár D., Grósz V., Tarján Z.L., Ligeti E.: **In silico tissue-distribution of human Rho family GTPase activating proteins**, *Small GTPases*, 4. 90–101, 2013.

Kaján G.L., Doszpoly A., Tarján Z.L., Vidovszky M.Z., Papp T.: **Virus–host coevolution with a focus on animal and human DNA viruses**, *J. Mol. Evol.*, 88. 41–56, 2019.

Köszönetnyilvánítás

Elsőként Dr. Benkő Mária professzor asszonynak szeretnék köszönetet mondani, aki témavezetőként és magánemberként egyaránt mindvégig, mindenben mellettem állt, elméleti és gyakorlati tudásával, tapasztalatával, tanácsaival segítette munkámat és utat mutatott a kutatóvá válás rögzös útján.

Ugyancsak köszönettel tartozom Dr. Harrach Balázs akadémikusnak, aki sokszor inspirált és terelte gondolataimat a helyes irányba. Disszertációm gondos javítása mellett mindig számíthattam rá szakmai és emberi szempontból egyaránt.

A Molekuláris és Összehasonlító Virologia, valamint a Halparazitológia Témacsoportok jelenlegi és hajdani munkatársait a kutatói környezet megalkotásáért és azért illeti köszönet, hogy bármikor, bárkivel tudtam konzultálni módszerekről, eredményekről, elképzelésről, vagy akár csak az élet ügyes-bajos dolgairól, mindezt baráti környezetben.

A harcsa HV vizsgálatához nyújtott segítségét Dr. Eszterbauer Editnek szeretném megköszönni, amiért rendelkezésemre bocsátotta a szervmintát DNS

kivonáshoz és szükség esetén használhattam az általa vezetett laboratóriumot.

Édesanyámnak, Keresztanyámnak, Öcsémnek, Feleségemnek, Nórinak és Szüleinek, valamint Gerinek, Vilinek és Misának azért tartozom köszönettel, mert megteremtették azt a nyugodt családi légkört, ami nélkül nem lehet gondolatokat összerendezni. Szabolcs öcsém ezen kívül még hal-mintákkal is ellátott és Nórival együtt a helyszíni mintavételeknél is segítségemre volt, amiért külön köszönet illeti őket.

Munkám anyagi háttérét az OTKA K100163, NN107632 és NN128309 pályázatok, valamint a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Doktori Iskolájának PhD-kerete biztosította.