

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Hüllőkben és kétélűekben
előforduló adenovírusok és parvovírusok
sokfélesége és filogenetikája

PhD értekezés tézisei

Pénzes Judit

2015

Szent István Egyetem

Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Témavezető és témabizottsági tagok:

Prof. Dr. Benkő Mária

témavezető

Magyar Tudományos Akadémia

Agrártudományi Kutatóközpont

Állatorvos-tudományi Intézet

Prof. Dr. Harrach Balázs

témabizottsági tag

Magyar Tudományos Akadémia

Agrártudományi Kutatóközpont

Állatorvos-tudományi Intézet

Bevezetés és célkitűzések

Az adenovírusok (AdV) általában szűk gazdaspektrummal rendelkező dsDNS-vírusok, melyeknek előfordulását a gerincesek (Vertebrata) altörzsében szinte minden jelentősebb osztály képviselőjében kimutatták már. A PCR széleskörű elterjedése és a DNS szekvenálásra kidolgozott módszerek egyszerűsödése lehetővé tette, hogy a kutatások az emlősök és madarak mellett kiterjedjenek a többi gerinces osztály képviselőire is. Egyben lehetőség nyílt a vírusok izolálása nélkül is a genom vizsgálatára, és ebből taxonómiai és filogenetikai következtetéseket lehetett levonni. Munkám kezdetekor hüllőkből már létezett néhány AdV törzs, míg kétéltlűekből csupán egyetlen egy izolátum volt ismert, mely számára a teljes-genom szekvenciájának elemzése alapján létrehozták a *Siadenovirus* nemzetséget. Hüllők AdV-ai közül az egyetlen teljes genom-szekvenciát egy kígyó-AdV-ből határozták meg, és megállapították, hogy az *Atadenovirus* nemzetség tagja (kígyó-AdV-1, SnAdV-1) (Farkas *et al.*, 2008). A pikkelyes hüllőkben (Squamata) a továbbiakban kimutatott valamennyi AdV atadenovírusnak bizonyult.

A parvovírusok (PV) (*Parvoviridae*) két alcsaládjá közül a *Parvovirinae* képviselőit gerincesekben, ezen belül emlősökben, madarakban és hüllőkben mutatták ki. Eddig hüllőkben az összes PV-t AdV-okkal együtt figyelték meg, ezért dependoparvovírusnak feltételezték őket. Molekuláris alapú vizsgálati módszerekkel azonban ezt csak két kígyófaj esetében állapították meg, melyeket AdV-os fertőzöttség mellől írtak le. A *Dependoparvovirus* nemzetség legtöbb tagjának replikációjához helper vírus (leginkább AdV vagy herpeszvírus) jelenléte szükséges. Kivételt képeznek a vízi szárnyasok dependoparvovírusai, melyek önálló replikációra képesek. A *Dependoparvovirus* genust a diapsidákkal (tuatarák, pikkelyes hüllők, krokodilok és madarak) elsődlegesen együtt fejlődött nemzetségnek vélték, és feltételezték, hogy gazdaváltása az emlősökre viszonylag újeletű lehet. Ezt támasztotta alá, hogy autonóm dependoparvovírusokat csak madarakban mutattak ki. A pikkelyes hüllők dependoparvovírusainak replikációs tulajdonságairól azonban nem volt adat. Kétéltlűekben napjainkig nem mutattak ki PV-t.

Részben a kétéltlűek PV-aival és AdV-aival kapcsolatos információk csekély mennyisége miatt, részben pedig az *Atadenovirus* nemzetség pikkelyes hüllő eredetére vonatkozó további bizonyítékok reményében fogtunk hozzá e két gerinces osztályba sorolható állatok vírusainak vizsgálatába. Cél volt még a hüllőket fertőző PV-ok evolúciójának és replikációs tulajdonságainak vizsgálata is, akárcsak a szintén csekély számban reprezentált hüllő-PV-ok mennyiségének gyarapítása. A két víruscsalád sokféleségét egyrészt új vírusok kimutatásával terveztük vizsgálni, másrészt a kimutatott vírusok genomszerveződésének analízisét is célul tűztük ki. Az újonnan kimutatott PV-okat lehetőség szerint teljes genom szinten kívántuk

meghatározni, akárcsak két, korábban Németországban izolált gyík-atadenovírus teljes genom-szekvenciáját is. A PCR segítségével nyert részleges szekvenciákkal készített törzsfarekonstrukciók és a genomok összehasonlító elemzése alapján újabb következtetések levonását reméltük az *Atadenovirus* és *Dependoparvovirus* nemzetségek evolúciójára vonatkozólag.

Anyag és módszer

A vizsgálati minták eredete

A minták túlnyomó többsége egy budapesti, kifejezetten hullókre szakosodott állatkereskedésből származott, továbbá magánszemélyek is rendelkezésünkre bocsájtották elhullott állataikat. Vizsgáltunk még – általában járművek által elütött – szabadban, főként Észak-Magyarországon begyűjtött elhullott állatokat is. A tíz csukaorrú aligátor (*Aligator mississippiensis*) májminta az Egyesült Államokból származott. Összesen 314 hulló és 207 kétéltű mintájának PCR-es vizsgálatát végeztük el AdV-okra, míg ezek közül 165 hulló és 60 kétéltű mintát szűrtünk PV-okra. A változatos forrásokból adódóan – a hidasgyíkokat (Rhynchocephalia) kivéve – az összes hulló rendből kerültek hozzánk minták, míg a kétéltűek három rendjéből kettő (Caudata, Anura) volt képviselve. A nukleinsavat különböző belső szervekből (máj, tüdő, vese, bél, gonádok) vontuk ki.

A teljes genom szinten vizsgált két gyík-AdV-t a Hohenheim Egyetemen leguán szív sejtvonalon (Igh-2,118 ATCC: CCL-108) és Russell vipera szív sejtvonalon (VH-2, ATCC: CCL-140) szaporították el. A két AdV egyikét már 2004-ben leírták gilából (*Heloderma suspectum*) (gyík-AdV-1, LAdV-1) (Wellehan *et al.*, 2004), míg a másikat csak 2008-ban, mexikói viperagyíkokból (*Heloderma horridum*) (gyík-AdV-2, LAdV-2) (Papp *et al.*, 2009).

Polimeráz láncreakció (PCR)

A PCR-ekhez számos hőstabil DNS-polimeráz enzimet kipróbáltunk. Az 1000 bázispár (bp) méret alatti PCR termék előállításához különböző Taq polimeráz enzimeket, míg az ennél hosszabb PCR termékek felerősítéséhez különböző rekombináns enzimeket alkalmaztunk.

Az AdV fertőzöttség megállapításához a Wellehan és mtsai (2004) által leírt, kétkörös (nested) PCR módszert alkalmaztuk. Ehhez a PCR-hez az erősen degenerált, úgynevezett konszenzus primereket a vírus DNS-polimeráz enzimjét kódoló génnek az *Adenoviridae* család valamennyi akkor ismert tagjában megőrzött aminosav motívumaira tervezték. A módszer lehetővé teszi a DNS-függő DNS-polimeráz génből egy kb. 300 bp hosszú szakasz (pol) felszorzozását, és eddig minden nemzetség kimutatásában sikeresnek bizonyult.

A PV diagnosztikához használt primereket magunk terveztük. Ezek a *cap* ORF egy megőrzött szakaszára irányultak, és egy kb. 600 bp hosszú fragmentumot erősítettek fel a *Dependoparvovirus* nemzetség tagjainak genomjából.

Azokat a mintákat, melyekben PV pozitivitást mutattunk ki, de AdV-t nem, tovább vizsgáltuk más, nagyméretű, a genomjukban saját DNS-függő DNS-polimeráz enzimet kódoló DNS-vírusok jelenlétére (Hanson *et al.*, 2006).

Az AdV-ra pozitív mintákból további génszakaszok kinyeréséhez a IVa2 és fiber gén által határolt konzervatív genomrégióból választottuk ki a célszekvenciát. A felerősítendő fragmentumok hossza 200 és 1000 bp között változott. Megkíséreltük még a csak az *Atadenovirus* nemzetségre jellemző p32K gén kimutatását is. A PV tartalmú mintákból két degenerált primerpár segítségével kíséreltük meg további szakaszok felszorzozását. Ezek egyike a *rep* ORF-ből 250 bp, míg a másik kb. 400 bp hosszú fragmentum felerősítésére volt alkalmas.

Teljes genom-analízis

A két LAdV genom szekvenálását németországi kutatókkal együttműködésben végeztük molekuláris klónozás és PCR alkalmazásával. A LAdV-1 genomjának 80,6%-át míg a LAdV-2 genom 73,7%-át szekvenáltuk mi. A PV-ok két génjéből felerősített rövid szakaszokat szintén PCR segítségével összekötöttük. A genomok szélein lévő szakaszok felerősítéséhez egykarú PCR-t is használtunk. Az AdV genom legvégének nukleotid-sorrendjét terminális-transzferáz enzim alkalmazásával határoztuk meg az 5'/3' RACE kit (Roche[®]) használatával. A PV genomvégeket a DNS-hez ligált adapterekre tervezett primerekkel, PCR-rel erősítettük fel, majd klónoztuk és szekvenáltuk.

Az adatok elemzése

A nukleotid-szekvenciákat a Staden programcsomag Gap4 programjával illesztettük össze és javítottuk szükség szerint. A szekvenciák specificitásáról a BLAST homológia kereső programok on-line használatával győződünk meg.

A hosszabb genom-szekvenciák annotálását vagy a JavaScript DNA Translator 1.1 internetes programmal, vagy az Artemis Genome Browser ingyenes software-rel végeztük el. A splice donor és akceptor helyeket manuálisan, vagy a Neural Network Splice Site Prediction program segítségével kerestük. A poliadenilációs szignálok validitását a Soft Berry POLYAH program használatával ellenőriztük. Az azonosított fehérjék különböző funkcionális motívumait és szignálszekvenciáit a SMART programmal vizsgáltuk.

A többszörös pozicionális illesztések (multiple alignment) létrehozásához többféle programot is igénybe vettünk. A filogenetikai számításokat – a meglehetősen hosszú távú evolúció vizsgálata miatt – kizárólag aminosav (as) alapon végeztük. A modellszelekciót a ProtTest programmal hajtottuk végre és a PHYLIP v3.696 programcsomag ProtDist és Fitch programjait használva készítettük el az ún. „vezető fákat” (guide tree). A maximum likelihood elven alapuló számításokat és a fák megbízhatóságának tesztelést (ún. bootstrap analízisét) az ATGC-Montpellier internetes platform PhyML3 programjával végeztük el.

Eredmények

Adenovírusok

Az AdV-os fertőzöttségre vizsgált 314 hüllő mintából 41-et találtunk pozitívnak, ami 13,1%-os prevalenciát jelent. A 41 mintában 6 féle AdV-t mutattunk ki, melyek közül 3 új, a tudomány számára eddig ismeretlen vírusnak bizonyult. Ezeket egy fehértorkú varánusz (*Varanus albigularis*), két hosszúfarkú fűgyík (*Takydromus sexlineatus*) és 23 rövidfarkú törpekaméleon (*Rampholeon brevicaudatus*) mintájában találtuk. Ez az első alkalom, hogy a hazánkban is élő nyakörvösgyík-félékben (Lacertidae) AdV-t mutatnak ki. A törpekaméleonok fertőzöttsége kiugróan magas volt (88,5%), és nukleotid (nt) szinten 5 genotípus volt elkülöníthető. Azonosítottuk továbbá a szakállas agámák (*Pogona vitticeps*) világszerte ismert AdV-át is, szintén csekély variációkkal as szinten. A fertőzöttség itt is kiugróan magas volt (88,9%). Kígyók közül AdV-t összesen 7 egyedben mutattunk ki, de ezek mindegyike már korábban ismert vírus volt. A SnAdV-1 génbanki típustól as szinten is eltérő három változatát mutattuk ki egy vörösfarkú boa (*Boa constrictor*) mintájában. A fiatal állat idült májkárosodás jeleit mutatta. A vírus gazdaspektrumát két új fajjal bővítettük, melyek közül a vízisikló (*Natrix natrix*) AdV-a az első hazai, szabadon élő hüllőben kimutatott AdV. A SnAdV-2-t is kimutattuk egy új gazdafajból, a vörös korallsiklóból (*Lampropeltis triangulum sinaloae*).

A 207 kétéltű minta között mindössze 7, azaz a vizsgáltak 3,4%-a volt pozitív. Valamennyi pozitív eredmény nyílmerég békákból (*Dendrobates auratus*, *Phyllobates vittatus*) származott, melyek tömegesen pusztultak egy budapesti állatkereskedésben. A szekvencia alapján egy új, 1973 óta csupán a második kétéltűeket fertőző AdV-t mutattunk ki (FrAdV-2), melynek két, a pol szakaszon egymástól 3 as-ban különböző változatát különböztettük meg.

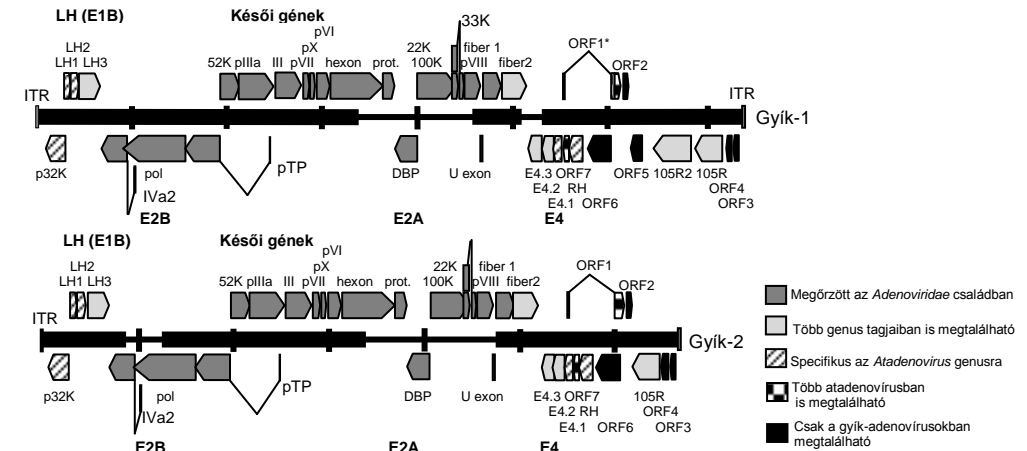
Már a BLAST keresések mutatták, hogy minden ebben a munkában felismert AdV az *Atadenovirus* genus tagja lehet.

Az *Adenoviridae* családra általánosan jellemző gének közül a pentonbázisra és a pVI-ra tervezett primerpár segítségével minden új AdV-ból sikerült felerősíteni a teljes pVII és pX géneket. Mind a két fehérje szekvenciában megvizsgáltuk és azonosítottuk a proteáz vágási helyeket. A törpekaméleon-AdV (PCAdV) 3-as genotípusából és a fehértorkú varánusz-AdV-ából (VAdV-2) majdnem a teljes pentonbázis gént is sikerült kinyerni. Az *Atadenovirus* nemzetségre specifikus p32K génből is meghatároztunk egy 261 bp hosszú fragmentumot a PCAdV 2-es genotípusából, míg 217 bp-t a fűgyík-AdV-ből (GLAdV).

A FrAdV-2 1-es változatából meghatároztunk és összeillesztettünk egy 8161 bp hosszú szakaszt, míg a várható genom méret közel felét (12.033 bp) a másik genotípusból. Mivel a két genotípus egymással az átfedő régiókban 99,36%-ban azonos, így a két szekvenciát összeillesztettük. Az így kapott 14.114 bp hosszú „kiméra” szakasz összesen 9

teljes és 2 részleges ORF-et tartalmaz. G+C tartalmát 36,63%-nak találtuk. A genusra jellemzően az egyes gének közötti távolság rövid, azok gyakran át is fednek egymással. Splicingra utaló szekvenciákat a IVa2 és pTP génekben azonosítottunk. Atadenovírusokban eddig nem mutattak ki intront a IVa2 génben (Both, 2011).

A két, Németországban izolált gyík-AdV teljes genomját – beleértve az ITR-eket is – meghatároztuk (1. ábra). A két vírus hossza eltér, 36 628 bp a LAdV-1 és 32 965 bp a LAdV-2 esetén. Az eltérés két további génben nyilvánult meg a LAdV-1 javára. A teljes genom G+C tartalma 43,99% (LAdV-1) és 44,16% (LAdV-2) volt. Az ITR-ek hossza 125, ill. 126 bp, ellentétben a nem-hüllő atadenovírusok 70 bp-nál is rövidebb ITR szekvenciáival. A LAdV-1 az eddigi leghosszabb atadenovírus genom, míg az ITR-ek szintén a leghosszabbak a nemzetségben.



1. ábra A két gyík-adenovírus genetikai térképe. Felül a gilából származó LAdV-1 genomja, mely 36 628 bp-ból áll, 125 bp hosszú ITR-ekkel. Alul látható a mexikói viperagyíkból származó LAdV-2 genomja, mely szignifikánsan rövidebb, 32 965 bp, 126 bp hosszú ITR-ekkel. Az egyes géneket méretarányosan nyílak jelölik az átíródás irányával megegyező irányultsággal. Az ORF1 a LAdV-1 genomban pseudogénként van jelen (*). A beosztások 5000 bp-onként helyezkednek el, míg a megvastagított szakaszok az általunk szekvenált régiókat jelölik (a vékony régiók nukleotid sorrendjét Németországban határozták meg).

Mindkét genom legelső génje az / szálon az *Atadenovirus* nemzetségre specifikus p32K volt. Azonosítottuk a szintén genus-specifikus 3 LH gént is az r szálon. A genomok középső régiója a családra jellemző szerveződést mutatta. Az E2B régió génjei közül, a FrAdV-2-höz hasonlóan, splicing-ot figyeltünk meg a IVa2 és pTP esetében. A konzervatív régióban mindkét vírusban két fiber gént azonosítottunk, ami eddig nem látott tulajdonság az *Atadenovirus* nemzetségben belül. A Spanyolországban ezekkel végzett proteomikai és szerkezeti vizsgálatok kiderítették, hogy a LAdV-2 1-es fibere csúcsonként egyesével, míg a hosszabb és a predikciók alapján hajlékonyabbnak tűnő 2-es fiber hármasával áll. Ez az egész

családban egyedülálló struktúra. A két vírus 1-es fibere 95%-ban azonos, és a szekvenciájuk a SnAdV-1 fiberére hasonlít a legjobban. A 2-es fibrek között a két LAdV homológ génjei közül a legnagyobb mértékű különbséget figyeltük meg (csak 87%-ban azonosak).

Az E4 régiót követő genomszakasz bizonyult mindkét vírusban a legvariábilisabbnak. Az itt található, szám szerint 11, ill. 9 ORF közül csupán ötnek, ill. négynek van homológja más AdV-ok genomjában. Hasonlóan a SnAdV-1-hez és eltérően a többi, nem hüllőket fertőző atadenovirustól, csupán egyetlen RH gént azonosítottunk mindkét genomban. Ennek hossza azonban több mint kétszerese volt a SnAdV-1-ben lévő homológjának. Hasonlóan a nem-hüllő eredetű atadenovírusok RH génjeihez, egy ún. F-box motívumot fedeztünk fel benne. Ezek a motívumok eukariótákban a sejtciklus szabályzásáért felelősek, míg az atadenovírusokban a gazdaváltással hozzák őket összefüggésbe. A madár- és kerdőző-atadenovírusok RH génjeivel ellentétben az F-box motívum az N-terminálistól távol, a gén közepén található. A motívumot megelőző metioninnál szétvágva, a fehérjét két RH-ként kezelve, törzsfa-rekonstrukciót végeztünk a gén evolúciójának részletesebb vizsgálatához. Ennek alapján úgy tűnik, a gén két fele eltérő evolúciós eredettel bír. Összeolvadásuk másodlagos tulajdonságnak tekinthető.

Az E4 régiótól jobbra eső szakaszban található ORF7-nek egyetlen homológjaként a SnAdV-1 ORF1 génjét azonosítottuk. Ugyanez a helyzet az ORF1 génnel, melynek egyetlen homológja az 1-es típusú kacsa AdV ORF1 génje. A gén a LAdV-1-ben azonban csupán pseudogénként lehet jelen (gén közepébe két stop kodon ékelődik, míg az ORF többi része megőrzött). A 105R-nek egyik ismert homológja a SnAdV-1 105R génje, a másik egy mastadenovírus, a mókuscickány-AdV genomjában található. A LAdV-1 két, a LAdV-2 egyetlen 105R génjében különböző Ig doméneket mutattunk ki, először az *Atadenovirus* genusban. Ilyen domének egyes immunsejtek receptorain, adhéziós fehérjékben, valamint a Coxsackie vírus és adenovírus receptorban (CAR) is megtalálhatóak.

A homológ nélküli ORF-ek közül az ORF2 egy C-lectinek családjába tartozó fehérjét kódol. Ilyen fehérjék más vírusokban (pox- és asfarvírusok), valamint immunsejtek felszíni receptoraiban találhatóak meg. Az ORF4 a mastadenovírusok IX-es proteinjéhez hasonlóan coiled-coil motívumot tartalmaz. Feltételezzük, hogy – a IX-es fehérje homológjának hiányában – ez a fehérje is transzkripció faktoraként működik, és a késői fő promoter stimulálásában vesz részt.

Törzsfa-rekonstrukciót készítettünk 4 fehérje alapján. Ezek eredménye szerint a GLAdV a jelenlegi legősibb atadenovírus. Ez összhangban van a gazdafajok evolúciós viszonyaival. A FrAdV-2 viszont a DNS-polimeráz szekvencia alapján a nem-hüllő atadenovírusokkal került egy ágra. A p32K alapján készült fa a pikkelyes hüllő- és a nem-hüllő atadenovírusokat monofiletikus csoportként jeleníti meg. Az RH alapján készült törzsfa az atadenovírusok RH génjeit három leszármazási vonalon ábrázolja, ahol a LAdV-ok RH-inak két fele ezek közül különbözőeken helyezkedik el. A G+C tartalom minden általunk vizsgált

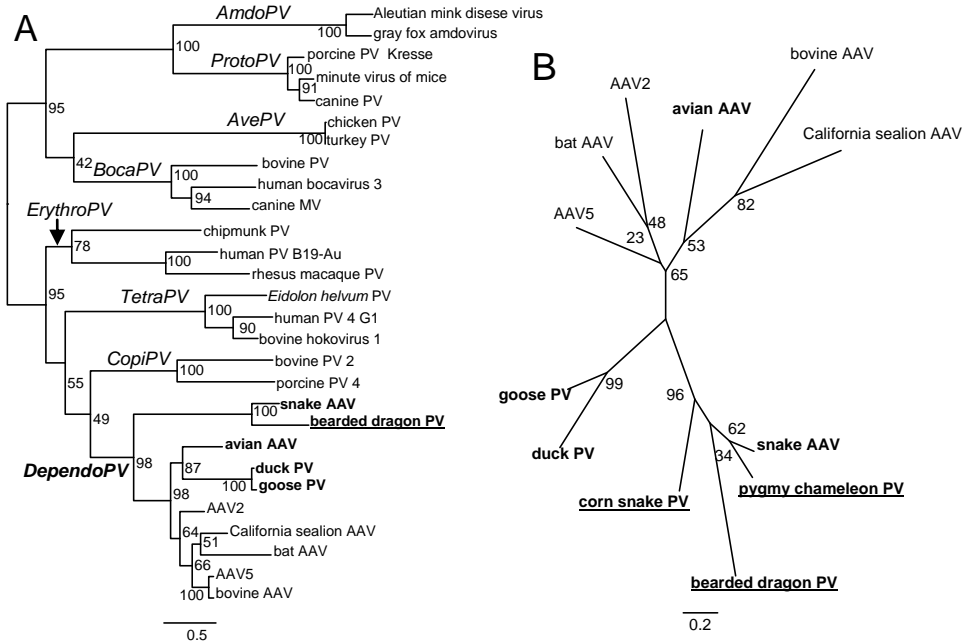
vírusban kiegyensúlyozottnak (vagy extrém magasnak) bizonyult, kivéve – hasonlóan a nem-hüllő atadenovírusokhoz - a FrAdV-2-t.

Parvovírusok

A PV-ok kimutatásához az általam tervezett primereket használva a 165 vizsgált hullő minta közül 7 (4,2%) bizonyult pozitívnak. A hét pozitív mintában 4, a tudomány számára új PV-t találtunk. Az egyik új PV-t négy szakállas agáma mintájában mutattuk ki. Érdekes módon, a négy állatból csak hármat találtunk előzőleg AdV-ra is pozitívnak, míg a negyedik állatban sem AdV-t, sem egyéb, helpervírusként szóba jöhető nagy DNS-vírust sem sikerült kimutatnunk. PV jelenlétét sikerült kimutatni egy rövidfarkú törpekaméleon mintájából is, mely egyúttal AdV-ra is pozitív volt. A kaméleonfélék (Chameleoniae) családjába tartozó egyedekben első alkalommal lehetett PV-ok jelenlétét megfigyelni. PV-ra pozitívnak bizonyult az egyetlen ásógyík (*Trogonophis wiggmanni*) mintája, mely egyúttal negatív volt mind AdV-ra, mind herpeszvírusra és más, saját DNS-polimeráz enzimmel rendelkező DNS-vírusra is. Az ásógyík-alkatúak alrendjének (*Amphisbaenia*) tagjaiban korábban soha nem mutattak ki sem PV-t, sem bármilyen más vírust. A kígyók mintái közül egyetlen bizonyult pozitívnak, nevezetesen egy tartós anorexia után elhullott, kifejlett gabonasiklóé. Az állat egyúttal fertőzött volt a SnAdV-1-gyel is. A kimutatott PV szintén a tudomány számára új, eddig le nem írt vírus, és szám szerint csupán a harmadik kígyó-PV. Mind a négy új PV a *Dependoparvovirus* nemzetség tagjának bizonyult.

A törpekaméleon PV-ból (PCPV) 1487 nt, a gabonasikló PV-ból (CSPV) pedig 1821 nt hosszú szekvenciát sikerült kinyerni. A szakállas agáma PV (BDPV) teljes genomját meghatároztuk, beleértve az ITR-ek másodlagos struktúráját is. Teljes hossza 4590 nt. A 257 nt hosszú ITR-ek szabályos hajtű szerkezetet mutatnak, ám a másodlagos struktúra kialakításában szerepet nem játszó egyenes szakasz hossza jóval meghaladta a kígyó adeno-asszociált vírusét (Farkas *et al.*, 2004). Feltételezzük, hogy a szakasznak a gazdasejt genomjába való integrációban van szerepe. Mindhárom vírusban két fő ORF-et (*rep* és *cap*), és a *cap* génbe ágyazva egy genus-specifikus alternatív ORF-et (assembly-activating protein – AAP) mutattunk ki. Egy splicing donor és két akceptor hely figyelhető meg mindhárom vírusban. Az intronon belül egy belső poliadenilációs szignált mutattunk ki. Nincs arról adatunk, hogy milyen százalékban poliadenilálódnak itt a két proximális promoterről átiródó mRNS-ek. Az intron hossza mindhárom esetben 190 nt alatti volt. A rövid intront ősi tulajdonságnak tekinthetjük. A madár dependoparvovírusok 200 nt-nál hosszabb, az emlős dependoparvovírusok kb. 300 nt hosszúságú intronnal rendelkeznek. A BDPV genom végén, a *cap* ORF-ről kifejeződő VP fehérjék stop kodonja után, megőrzött poliadenilációs szignált azonosítottunk. A BDPV teljes genomja alapján új fajként javasolható, mint *Squamate dependoparvovirus 2*.

A rep gén teljes származtatott as sorrendje alapján készült törzsfarekonstrukció is megerősíti, hogy a BDPV a *Dependoparvovirus* genus tagja, és együtt a SAAV-sal a klád legősibb leágazását képi. Az AAP teljes as szekvenciája alapján készült törzsfán a hüllő-PV-ok egy monofiletikus csoportot képeznek, ám sem ez a fa, sem a másik két fehérje alapján készült törzsfarekonstrukció nem támogatja a diapsida fajok dependoparvovírusainak monofiletikuságát (2. ábra).



2. ábra A teljes Rep (570 aa, maximum likelihood, RtREV+I+G+F, $\alpha=1.29$, pinv=0.03) (A) és assembly-activating protein (212 aa, maximum likelihood, HIV+G+F, $\alpha=0.95$) (B) alapján számított törzsfarekonstrukciók. A diapsida fajok dependoparvovirusai félkövérrel, míg az általunk kimutatott vírusok aláhúzással jelöltek. Mindkét fa monofiletikusnak mutatja a pikkelyes hüllők dependoparvovirusait, ám nem figyelhető meg a diapsidák dependoparvovirusainak monofiletikuságát. (AAV – adeno-asszociált vírus, PV – parvovírus)

Megbeszélés

A hullók DNS-vírusainak diverzitását tükrözi, hogy 314 elhullott állat mintájából hét, eddig ismeretlen vírust mutattunk ki és 3 új hullófajjal bővítettük két ismert vírus gazdaspektrumát. Emellett először igazoltuk molekuláris adatokkal, hogy PV-ok is előfordulnak gyíkokban. A konzervációs programok egyik fontos területét képviselő állatcsoportban, a kétéltűekben is kimutattunk egy új AdV-t, melynek, mint kórokozónak, akár komoly környezetvédelmi jelentősége is lehet.

Adenovírusok

Eredményeim alapján arra következtethetünk, hogy mind a szakállas agámákban, mind a törpekaméleonokban a fertőzés nem újkeletű. Erre abból következtethetünk, hogy mindkét vírussal számos genotípus variánsa létezik. A szakállas agámákban ez as szinten is manifesztálódik, így feltételezzük, hogy a PCAdV-hoz képest ennek a vírusnak több idő állt rendelkezésére a szegregációhoz. Ehhez járulhat még hozzá az a tény, hogy a szakállas agámák kereskedelme sokkal nagyobb mértékű, és hosszabb ideje folyik, mint a törpekaméleonoké. A különböző eredetű – és emiatt a kórokozók különböző változatait hordozó – egyedek nem körültekintő kezelése melegágya lehet az új, gyakran patogénebb típusok kialakulásának. Ezzel ellentétben a kígyók – egy evolúciósan jóval fiatalabb csoport – AdV-ai képesek átlépni a faji barriert. Ennek feltehető okai között szerepel a gazdafajok gyors adaptív radiációja, ami elsősorban a morfológiai tulajdonságokat érintette, és kevésbé befolyásolta a kígyók immunrendszerét.

A két LAdV izolátum teljes genom elemzésén kívül most először nyertünk ki jelentősebb genomszakaszokat nem izolált kétéltű- és hulló-eredetű AdV-okból. Ennek során a pVII és pX teljes génjének felerősítését szolgáló primerpár bizonyult a legsikeresebbnek. A p32K gén jelenlétét először sikerült kimutatni és elemezni két új, nem izolált gyík-AdV-ban. Úgy tűnik, hogy a fehérje eltérő evolúciós utat járt be hulló- és nem-hulló atadenovírusokban, amit a törzsfa-rekonstrukció eredménye is alátámaszt. Biztosra vesszük, hogy a gén jelen van a többi atadenovírusban is, melyekkel munkám során foglalkoztam, ám rendkívül variábilis szekvenciája miatt univerzális PCR rendszer tervezése nehézségekbe ütközik.

PhD munkám kezdetekor többé-kevésbé elfogadott ténynek számított, hogy az *Atadenovirus* nemzetség Squamata eredetű, annak ellenére, hogy tagjai kerdődzöket, madarakat és egy erszényest is fertőznek. Eredményeim megerősítették ezt a feltételezést. Minden, pikkelyes hullóból eddig kimutatott AdV atadenovírusnak bizonyult. A G+C tartalom nemcsak a teljes genomra, de a rövidebb szakaszokra vetítve is kiegyensúlyozott az összes általunk vizsgált hulló-AdV-ban, akárcsak a többi eddig leírt pikkelyes hulló-atadenovírus esetében.

Valószínűsíthető, hogy a nem-hüllő gazdafajokból származó atadenovírusok genomjának kiugróan magas A+T aránya az új gazdához való adaptáció eredménye. Elméletünket alátámasztják a törzsfá-rekonstrukciók is; úgy tűnik a jelenlegi legősibb atadenovírus a GLAdV. A gyíkokból és kígyókból kimutatott AdV-ok bizonyos tulajdonságaik alapján a legősibb atadenovírusoknak látszanak. Például, a hosszú ITR-ek mintha fokozatos degradáción esnének át a feltételezett gazdaváltásokat követően. Ezzel szemben az RH gének száma az ősbibb állapotban kevés (azaz egy), és az új gazdáiban, valószínűleg az adaptáció következményeként duplikálódik, illetve multiplikálódik.

Eredményeink rávilágítanak arra is, hogy az atadenovírusok sokkal változatosabbak, mint eddig gondoltuk. Ennek példája a splicing jelenlétének kimutatása három atadenovírus IVa2 génjében is. A LAdV genomok vizsgálata során 5 olyan ORF-et találtunk, melyek fajspecifikusak, és funkciójukat legjobb esetben is csak sejteni tudjuk. A két vírus egy fajba sorolhatónak tekinthető, ám még e két típus jobb genomvége is jelentősen különbözik egymástól. A két fiber gén jelenlétére a LAdV-okban jelenleg nincs elfogadható magyarázat. Biztos azonban, hogy párhuzamos evolúció eredményeként egymással közeli közös őson nem osztozó AdV csoportoknál is többször megjelent a két fiber. A két fiber nyilvánvalóan szélesíti az adott vírus gazdaspektrumát. Ezt megerősíti, hogy a LAdV-2-t törpe szakállas agámából (*Pogona minor minor*) is kimutatták már (Hyndman és Shilton, 2011). Figyelembe véve, hogy a LAdV-ok számos génjének (az RH-ban F-box motívum, a 105R-ben Ig domén, ORF2 C-lektin-homológ) szerepe az immunrendszer hatásának kivédésével lehet kapcsolatos, az sem zárható ki, hogy a vírus eredetileg a törpe szakállas agámák vírusa, és éppen adaptálódik a mexikói viperagyíkhöz, mint új gazdafajhoz.

A FrAdV-2 az első kétéltűekben felismert atadenovírus. A pikkelyes hüllőkről történt gazdaváltás lehetőségét alátámasztja a vírus filogenetikai helye mellett DNS-ének alacsony G+C tartalma. Az atadenovírusok előfordulása kétéltűekben arra utal, hogy evolúciójuk során legalább négy gazdaváltás történhetett. Úgy tűnik, ezek egymástól független események voltak, mivel a nem-hüllő atadenovírusok nem képeznek monofiletikus csoportot. Feltételezhető tehát, hogy a legkorábbi gazdaváltás a kétéltűekre történt, és a kerdőzöket érintő mehetett végbe a legkésőbb.

Parvovírusok

Az általunk újonnan kimutatott PV-ok megkétszerezik a hullókben munkám előtt ismert PV-ok számát. Ezen felül először mutattuk ki minden kétséget kizáróan PV-ok jelenlétét gyíkokban. Az ásógyík-alkatúak alrendjében először írtuk le bármilyen vírus jelenlétét.

Eredményeink alapján úgy tűnik, hogy mind az ásógyík PV, mind a BDPV képes önálló replikációra, legalábbis mindkét vírust kimutattuk olyan mintákban, melyekből nem lehetett helper funkciót ellátni képes DNS-vírust kimutatni. Amennyiben feltételezhető, hogy a dependoparvovírusok autonóm őseiktől származnak, akkor ez az eredmény erősen támogatja a diapsida eredetre vonatkozó hipotézist.

Cáfolja azonban a közös eredetet az, hogy a teljes Rep alapján végzett törzsfarekonstrukció a hullóket fertőző dependoparvovírusokat hozza ki a legbazálisabbnak a nemzetségben. A pikkelyes hulló-eredetű dependoparvovírusok egy monofiletikus csoportot képeznek az AAP as szekvenciája alapján készült törzsfán is. Egy madár dependoparvovírus, az AAV, azonban az emlősök dependoparvovirusaival kerül közös monofiletikus csoportba. A *cap* alapján készült fa sem támogatja az összes diapsida-eredetű dependoparvovírus monofiletikusságát. Eredményeink alapján valószínűbbnek tűnik a *Dependoparvovirus* nemzetség Squamata eredete.

Új tudományos eredmények

1. Hét, a tudomány számára új hüllő-vírust mutattunk ki. Először mutattunk ki adenovírust nyakörvös gyíkokban (Lacertidae), és derítettünk fényt a rövidfarkú törpekaméleonoknak a szakállas agámákéhoz hasonlóan nagymértékű adenovírusos fertőzöttségére. A négy új dependoparvovírus megháromszorozza a PhD munkám kezdetekor molekuláris szinten is ismert hüllő-parvovírusok számát. A világon először írtunk le bármilyen vírust az ásógyíkok alrendjének (Amphisbaenia) tagjaiban. Elsőként mutattunk ki minden kétséget kizáróan parvovírusos fertőzöttséget gyíkokban.
2. 1973 óta először mutattunk ki adenovírust kétéltűekben. A mindössze a második béka-adenovírus az *Atadenovirus* genus tagja. Ez egyben az első bizonyítéka annak, hogy az atadenovírusok – feltételezhetően gazdaváltás útján – kétéltűeket is fertőznek.
3. Magyarországon vadon élő hüllőben adenovírusos fertőzöttséget mutattunk ki.
4. Meghatároztuk és elemeztük gyík-eredetű adeno- és parvovírusok teljes genomját. Korábban semmilyen gyíkokat fertőző vírus teljes genomszekvenciája nem volt ismert.
5. Először mutattunk ki két fiber gén és Ig doménnel rendelkező fehérjék génjének jelenlétét atadenovírusokban, valamint (C típusú) lektin génekkel homológ ORF-et adenovírusokban. Korábban csak pox- és asfarvírusokban találtak ilyen géneket. Az egész *Adenoviridae* családban egyedülálló struktúra, nevezetesen három fiber nyúlvánnyal rendelkező csúcsi kapszomerek (pentonbázisok) előfordulását fedeztünk fel.
6. Első alkalommal mutattunk ki hüllőkben dependoparvovírusok jelenlétét helper vírussal való szimultán fertőzöttség nélkül. Ez arra utal, hogy a hüllőket fertőző dependoparvovírusok is képesek autonóm replikációra.
7. Új eredményeink a *Dependoparvovirus* genus evolúciójának vizsgálatával kapcsolatban az eddig feltételezett közös madár-hüllő (Diapsida) eredet helyett a Squamata eredetet valószínűsítik.

Az értekezés alapjául szolgáló publikációk és konferencia közlemények

Publikációk

- Pénzes J.J., Benkő M.: **Novel parvovirus from the worm lizard *Trogonophis wiegmanni* - First virus ever detected in amphisbaenian hosts**, Acta Vet. Hung., 62. 284-292, 2014.
- Pénzes J.J., Menéndez-Conejero, R., Condezo, G.N., Ball, I., Papp, T., Doszpoly, A., Paradela, A., Pérez-Berná, A.J., López-Sanz, M., Nguyen, T.H., van Raaij, M.J., Marschang, R.E, Harrach B., Benkő, M., San Martín, C.: **Molecular characterization of a lizard adenovirus reveals the first atadenovirus with two fiber genes, and the first adenovirus with either one short or three long fibers per penton**, J. Virol., 88. 11304-11314, 2014.
- Pénzes J., Doszpoly A.: **Adenovírusos fertőzöttség kimutatása szakállas agámákban (*Pogona vitticeps*) Magyarországon**, Magy. Állatorvosok, 133. 432-437, 2011.
- Pénzes J.J., Pham, H.T., Benkő M., Tijssen, P.: **Novel parvoviruses in reptiles and genome sequence of a lizard parvovirus shed light on *Dependoparvovirus* genus evolution**, 2015. [publikálásra benyújtva]
- Pénzes J.J., Doszpoly A., Harrach B., Benkő M.: **PCR screening of carcasses of captive reptiles reveals a high prevalence of adenoviruses**, 2015. [publikálásra előkészítve]

Konferencia közlemények

- Pénzes J., Lopez, P., Martin, J., Harrach B., Benkő M.: **Novel adeno- and parvoviruses in reptiles; first virus detections ever in suborder Amphisbaenia**, Combined Exotics and Avian Conference – Tropical and Tropical, Cairns, Australia, 2014.
- Pénzes J., Harrach B., Benkő M.: **Novel parvoviruses in reptiles: first results concerning autonomous replication of reptilian dependoviruses supports the Diapsida-origin of genus *Dependovirus***, 5th European Wildlife Disease Association Student Workshop, Veyrier-du-Lac, France, 2013.
- Pénzes J., Romanova, I., Papp, T., Doszpoly A., Marschang, R.E., Harrach B.: **Genome sequencing and analysis of two novel lizard adenoviruses**, 10th International Adenovirus Meeting, Umeå, Sweden, 2012.

- Pérez J., Benkő M.: **Prevalence and diversity of adenoviruses and parvoviruses detected in samples of reptiles and frogs kept in captivity**, International Conference on Reptile and Amphibian Medicine, Cremona, Italy, 2012.
- Pérez J., Doszpoly A., Benkő M., Harrach B.: **Novel amphibian and reptile adenoviruses provide further proofs for the reptilian origin of atadenoviruses**, 4th European Wildlife Disease Association Student Workshop, Veyrier-du-Lac, France, 2011.
- Pérez J., Romanova, I., Papp, T., Doszpoly A., Harrach B., Marschang, R.E.: **Genome sequencing and analysis of two novel lizard adenoviruses**, 21st Annual Meeting of the Gesellschaft für Virologie (GfV) Freiburg, Germany, 2011.
- Pérez J., Doszpoly A., Benkő M.: **Examinations aiming at the verification of the reptilian origin of atadenoviruses**, 8th International Symposium on Viruses of Lower Vertebrates, Santiago de Compostela, Spain, 2010.
- Pérez J., Doszpoly A., Benkő M.: **Examinations aiming at the verification of the reptilian origin of atadenoviruses**, ESVV 8th International Congress of Veterinary Virology, Budapest, Hungary, 2009.

További publikációk

- Tarján Z.L., Pérez 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, 2013.

Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Benkő Máriának, aki a rengeteg segítség mellett lehetővé tette, hogy PhD munkámat is két kedvenc állatcsoportom vírusaiból írjam. Külön köszönet illeti Dr. Harrach Balázst is, aki nagyban hozzájárult ahhoz, hogy ez a munka létrejöhön. Szeretnék még nagy köszönetet mondani Dr. Peter Tijssennek, akitől kanadai tanulmányutam alkalmával rengeteget tanultam. A Molekuláris Virologia és Összehasonlító Virologia témacsoportok tagjait is köszönet illeti, kiváltképp dr. Papp Tibort és dr. Doszpoly Andort a munkám során nyújtott segítségért, Erdei Noémit a kézirat átnézéséért és kijavításáért, Iva Podgorskit pedig a lelki támaszáért, mint asztalszomszéd. Csabai Domonkost és Hangya Dánielt, valamint Dr. Andy Goodwint a mintákért illeti nagy köszönet. Végül, de nem utolsó sorban, a családomnak szeretném megköszönni, kiváltképp a nagypapámnak, mert nélküle az idáig vezető út is másképp alakult volna. A munka anyagi feltételeihez az OTKA a K100163 számú pályázati támogatás útján járult hozzá.