

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Hüllőkben és kétéltűekben
előforduló adenovírusok és parvovírusok
sokfélesége és filogenetikája

PhD értekezés

Pénzes Judit

2015

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

Készült 8 példányban. Ez a számú példány.

.....
Pénzes Judit

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	5
Összefoglalás	6
1. Bevezetés	7
2. Irodalmi áttekintés	9
2.1 Adenovírusok	9
2.1.1 Az adenovírusok biológiai jelentősége.....	9
2.1.2 Az adenovírusok morfológiája és strukturális jellemzői	10
2.1.3 Az adenovírusok genomszerveződése és replikációja	12
2.1.4 Az adenovírusok rendszertana és evolúciója; adenovírusok hullőkben és kétéltűekben	13
2.2 Parvovírusok	18
2.2.1 A parvovírusok biológiai jelentősége	18
2.2.2 A parvovírusok morfológiája és strukturális jellemzői	19
2.2.3 A parvovírusok genomszerveződése és replikációja	20
2.2.4 A parvovírusok rendszertana; parvovírusok hullőkben és kétéltűekben.....	21
2.2.4.1 <i>Densovirinae</i> alcsalád.....	21
2.2.4.2 <i>Parvovirinae</i> alcsalád	22
2.2.4.3 Genus <i>Dependoparvovirus</i> ; parvovírusok hullőkben	23
3. Anyag és módszer	26
3.1 A vizsgálati minták eredete	26
3.2 A minták feltárása és DNS-izolálás	26
3.3 Polimeráz láncreakció (PCR)	28
3.3.1 Diagnosztikai szűrés	28
3.3.2 További virális gének vizsgálata PCR-rel	29
3.3.3 Teljes genom-analízis	30
3.3.4 A parvovírus végfragmentumok meghatározása PCR-rel	31
3.4 Molekuláris klónozás	32
3.5 DNS szekvenálás	32
3.6 Az adatok elemzése	32
4. Eredmények	34
4.1. Adenovírusok	34
4.1.1 PCR-es szűrés	34
4.1.2 Részleges genomanalízis; az újonnan kimutatott adenovírusok további génjeinek vizsgálata	38
4.1.3 A két izolált gyík-adenovírus teljes genomjának vizsgálata	39
4.1.4 Filogenetika és G+C tartalom	44
4.2 Parvovírusok	48
4.2.1 Szűrővizsgálatok	48
4.2.2 Részleges és teljes genom-analízis	51
4.2.3 Taxonómia, evolúció és törzsfa-rekonstrukció	54
5. Megbeszélés	58
5.1 Adenovírusok	58
5.1.1 Az adenovírusok előfordulása	58
5.1.2 A pozitív mintákból meghatározott további szekvenciák; teljes- és részleges genom-analízis	61

5.1.2.1 A LAdV-1 és -2 ITR szekvenciái	62
5.1.2.2 E1 régió	63
5.1.2.3 E2 és L régió	64
5.1.2.4 Fiber	67
5.1.2.5 E4 régió és a genomok jobb vége	70
5.1.3 Filogenetika és törzsfa-rekonstrukció	73
5.1.4 G+C tartalom	75
5.2 Parvovírusok	75
5.2.1 PCR-es szűrővizsgálatok; prevalencia és diverzitás	75
5.2.2 Replikációs tulajdonságok	77
5.2.3 A szakállas agama parvovírus genomszerveződése; a hosszabb genomszakaszok részletes elemzése	77
5.2.3.1 Általános jellemzők és transzkripció	77
5.2.3.2 Fehérjék	79
5.2.4 Taxonómia és törzsfa-rekonstrukció	81
5.3 Következtetések	82
5.3.1 Adenovírusok	82
5.3.2 Parvovírusok	85
6. Új tudományos eredmények	87
7. Irodalom	88
8. Az értekezés alapjául szolgáló publikációk és konferencia közlemények	106
8.1 Publikációk	106
8.2 Konferencia közlemények	107
9. További publikációk	108
10. Köszönetnyilvánítás	109

Rövidítések jegyzéke

AAAV	avian adeno-associated virus; madarak adeno-asszociált vírusa	ITR	inverted terminal repeats; fordított genomvégi ismétlődés
AAP	assembly-associated protein; összeépüléssel kapcsolatos fehérje	JAM	junctional adhesion molecule; junktóális adhéziós molekula
AAV	adeno-associated virus; adeno-asszociált vírus	LH	left hand (gene); bal oldali (gén)
AdV	adenovírus; adenovírus	LAdV	lizard adenovirus; gyík-adenovírus
AgAdV	agamid adenovírus; agáma-adenovírus	MBD	metabolic bone disease; hüllők metabolikus eredetű csontosodási zavara
as	aminosav	MLP	major late promoter; fő késői promóter
A+T	adenin és timin	NLS	nuclear localisation signal; nukleáris lokalizációs szignál
BAdV	bovine adenovirus; szarvasmarha adenovírus	nt	nukleotid
BDPV	bearded dragon parvovirus; szakállas agáma parvovírus	OAdV	ovine adenovirus; juh adenovírus
bp	bázispár	ORF	open reading frame; nyitott leolvasási keret
CAdV	canine adenovirus; kutya- adenovírus	PCAdV	pygmy chameleon adenovirus; törpekaméleon-adenovírus
CAR	Coxsackie vírus és adenovírus receptor	PCR	polymerase chain reaction; polimeráz láncreakció
CPV	canine parvovirus; kutya parvovírus	PLA	phospholipase A; foszfolipáz A
CSPV	corn snake parvovirus; gabonasikló parvovírus	PV	parvovirus; parvovírus
DAdV	duck adenovirus; kacsza-adenovírus	PCPV	pygmy chameleon parvovirus; törpekaméleon parvovírus
DBP	DNA-binding protein; DNS-kötő fehérje	RH	right hand (gene); jobb oldali (gén)
dNTP, NTP	deoxinukleotid-trifoszfátok keveréke, nukleotid-trifoszfát	SAAV	snake adeno-associated virus; kígyó adeno-asszociált vírus
DPV	duck parvovirus; kacsza parvovírus	SnAdV	snake adenovirus; kígyó- adenovírus
dsDNS	dupla szálú DNS	ssDNS	egyszálú DNS
EDS	egg drop syndrome; tojáshozam- csökkenés szindróma	TE	trisz-EDTA
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav	THEV	turkey hemorrhagic enteritis virus; pulyka vérzéscsökkentő bélgyulladás vírusa
EM	elektronmikroszkóp	TP	terminal protein; terminális végprotein
FAdV	fowl adenovirus; tyúk-adenovírus	VAdV	varanid adenovirus; varánusz- adenovírus
FrAdV	frog adenovirus; béka-adenovírus	VP	capsid proteins of parvoviruses; parvovírusok kapszidfehérjéje
GLAdV	grass lizard adenovirus; fügyík-adenovírus		
GPV	goose parvovirus; liba parvovírus		
G+C	guanin és citozin		
HAdV	humán adenovírus		
IG	immunglobulin		

Összefoglalás

PhD munkám célja az ősbibb gerincesekben előforduló adeno- és parvovírusok sokféleségének feltárása és filogenetikai viszonyaik megismerése volt. Ehhez kezdetben PCR-es szűrővizsgálatokat végeztem állatkereskedésekből és állatkertekből származó, elhullott állatok mintáin, de gyűjtöttünk anyagot vadon élő hüllőkből és kétéltűekből is. Az adenovírusok (AdV-ok) jelenlétére vizsgált 314 hüllő mintából 41 bizonyult pozitívnak, míg a 207 kétéltű mintából csupán hét. A PCR termékek szekvenciájának elemzése alapján újnak látszó AdV-t mutattunk ki három olyan hüllőfaj egyedeiben, melyekben AdV-t nem írtak le eddig. A többi pozitív mintában korábban már kimutatott, és szekvencia adatokkal is jellemzett AdV-okat találtunk. Hazai tenyésztésű egyedekben megtaláltuk a már régóta ismert agáma AdV-t. Az 1-es és 2-es típusú kígyó-AdV változatait eddig nem vizsgált fajokhoz tartozó kígyókban mutattuk ki. A szakállas agámák és törpekaméleonok fertőzöttsége kiemelkedően magasnak (88,88% ill. 88,46%) bizonyult, és vírusaiknak több genotípusát is megfigyeltük. A kétéltűekből származó pozitív mintákban egy a tudomány számára új atadenovírust találtunk. Az újonnan felfedezett atadenovírusok genomjából minél több további szakasz PCR-es felerősítését és szekvenálását kíséreltük meg. Munkám további részében két, Németországban izolált gyík-AdV teljes genom-szekvenálásában vettem részt. Megállapítottuk, hogy mindkét vírusban két fiber gén van. A rövidebb fiber fehérjékből egy, míg a hosszabbakból három figyelhető meg a virionok csúcsán található pentonbázisba ágyazva. Ilyen struktúrát korábban nem mutattak ki AdV-okban. A törzsfarekonstrukciók világosan mutatták, hogy mindegyik vírus az *Atadenovirus* genus tagja. A parvovírusok (PV-ok) kimutatására általam kidolgozott PCR segítségével 165 hüllő mintát vizsgáltam, és hetet találtam pozitívnak, míg a 60 kétéltű negatívnak bizonyult. A tudomány számára új PV-t mutattunk ki négy szakállas agámában, valamint egy-egy gabonasiklóban, rövidfarkú törpekaméleonban és ásógyíkban. Ez utóbbi állatcsoportban eddig semmilyen vírus előfordulását nem írták le. Az egyik szakállas agámában és az ásógyíkban nagyméretű DNS-vírus jelenlétét nem tudtuk kimutatni, ezért feltételezzük, hogy hasonlóan a madarakhoz, hüllőkben is előfordulnak önálló replikációra képes dependoparvovírusok. A szakállas agáma-PV teljes genom-szekvenciáját meghatároztuk és elemeztük. A siklóban és a törpekaméleonban talált vírusok DNS-ének kb. felét sikerült szekvenálnunk. Mindhárom vírus – hasonlóan az 1-es típusú kígyó parvovírushoz – a törzsfarekonstrukció során a *Dependoparvovirus* genus legősibb leágazásán helyezkedett el. Eredményeim tovább erősítik az AdV-ok és gerinces gazdáik koevolúciójára, valamint a dependoparvovírusok diapsida eredetére vonatkozó feltételezést.

1. Bevezetés

PhD munkám előzményei a szakdolgozatom elkészítéséig nyúlnak vissza, amikor hüllők és kétélűek adenovirusaival kezdtem el foglalkozni. A kutatómunkát egy olyan laboratóriumban végeztem, ahol évtizedek óta folytatnak legfőbbképpen az adeno- és herpeszvírusok genetikai jellemzésére, hatékony kimutatására és rendszertanuk tisztázására irányuló vizsgálatokat. Az AdV-ok szűk gazdaspektrummal rendelkező dsDNS-vírusok, melyeknek előfordulását a gerincesek (Vertebrata) altörzsében szinte minden jelentősebb osztály képviselőjében kimutatták már (Harrach *et al.*, 2011). Az AdV-ok kutatása több mint hat évtizedes múlttal rendelkezik, azonban sokáig csak az ember és a fontosabb gazdasági haszonállatok fertőzöttségét vizsgálták. Az AdV-ok egyéb állatokban való előfordulására kezdetben főleg csak szerológiai felmérések és fény- vagy elektronmikroszkópos (EM) vizsgálatok nyomán lehetett következtetni.

A PCR széleskörű elterjedése és a DNS nt-sorrendjének meghatározására, azaz a 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 (Benkő *et al.*, 2002; Wellehan *et al.*, 2004; Farkas *et al.*, 2008; Papp *et al.*, 2009), míg kétélűekből csupán egyetlen egy izolátum volt ismert, melynek számára (a pulykák vérszeses bélgyulladását okozó vírussal együtt) a teljes genom szekvenciájának elemzése alapján megalapították a *Siadenovirus* nemzetséget (Davison *et al.*, 2000). Hüllők AdV-ai közül az egyetlen teljes genom-szekvenciát egy kígyó-AdV-ból határozták meg, és megállapították, hogy az *Atadenovirus* nemzetség tagja (Farkas *et al.*, 2002; Farkas *et al.*, 2008). Akárcsak az 1-es típusú kígyó-AdV, a pikkelyes hüllőkben (Squamata) a továbbiakban kimutatott valamennyi AdV atadenovírusnak bizonyult (Wellehan *et al.*, 2004).

Parvovírusokat (PV-okat) a '60-as években mutattak ki először. A *Parvoviridae* család két alcsaládja közül a *Densovirinae* eddigi képviselőit ízeltlábúakban (Bergoin és Tijssen, 2000; Tijssen *et al.*, 2011), a *Parvovirinae* képviselőit gerincesekben, ezen belül emlősökben, madarakban és hüllőkben mutatták ki (Zádori *et al.*, 1995; Brown és Young, 2000; Farkas *et al.*, 2004; Palade *et al.*, 2011). 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 mellett írtak le (Farkas *et al.*, 2004; Farkas és Gál, 2008). A *Dependoparvovirus* nemzetség legtöbb tagjának replikációjához helper vírus (leginkább AdV vagy herpeszvírus) jelenléte szükséges. Kivételt képeznek a vízi szárnyasok

dependoparvovírusai (*Anseriform dependoparvovirus 1*) melyek önálló replikációra képesek (Le Gall-Reculé és Jestin, 1994; Brown *et al.*, 1995; Zádori *et al.*, 1995). A *Dependoparvovirus* genust a diapsidákkal (pikkelyes hüllőkkel, krokodilokkal és madarakkal) elsődlegesen együtt fejlődött nemzetségnek vélik, és feltételezik, hogy gazdaváltása az emlősökre viszonylag új keletű lehet (Zádori *et al.*, 1995; Farkas *et al.*, 2004). Ezt támasztja alá, hogy autonóm dependoparvovírusokat eddig csak madarakban mutattak ki. A pikkelyes hüllők dependoparvovírusainak replikációs tulajdonságairól azonban nincs adat. Kételtűekben napjainkig nem mutattak ki PV-t.

Részben a kételtűek PV-aival és AdV-aival kapcsolatos információk csekély mennyisége miatt, részben pedig az *Atadenovirus* nemzetség pikkelyes hüllő eredetére vonatkozó további bizonyítékok reményében fogtunk 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 azok részleges analízise is a céljaink között szerepelt. Ezen kívül két, Németországban izolált gyík-AdV genomjának szekvenálását és annotálását terveztük elvégezni, melyeket gilákban és mexikói viperagyíkokban mutattak ki először. Két, a szűrővizsgálataim során talált nyílméreg béka-AdV genomjából több genomszakasz szekvenciáját meghatároztuk. Ez nem volt könnyű feladat, mivel izolált vírus vagy nagy mennyiségű, tiszta DNS nem állt rendelkezésünkre. A PCR-es szűrővizsgálatok során talált új hüllő vírusokból is sikerült felerősíteni rövidebb genom- és génszakaszokat. Az újonnan talált hüllő-PV-ok közül egy szakállas agáma PV teljes genomszekvenciáját sikerült meghatározni a vírus izolálása nélkül. További részleges genom analízist is sikerült véghezvinni egyéb újonnan kimutatott gyík és kígyó PV-ok esetén. A PCR és/vagy klónozás segítségével nyert részleges szekvenciákkal készített törzsfa-rekonstrukciók és a genomok összehasonlító elemzése alapján újabb következtetések vonhatók le az *Atadenovirus* és *Dependoparvovirus* nemzetségek evolúciójára vonatkozólag. A minták szimultán PCR-es vizsgálata PV-okra és nagyméretű DNS-vírusokra pedig információval szolgálhat a hüllőket fertőző PV-ok replikációs tulajdonságait illetően.

2. Irodalmi áttekintés

2.1 Adenovírusok

2.1.1 Az adenovírusok biológiai jelentősége

Az AdV-okat először 1953-ban írták le, amikor műtéileg eltávolított mirigyszövetekből (pl. garatmandulákból) készített sejtkultúrák spontán degenerációját figyelték meg (Rowe *et al.*, 1953). Az adenovírus elnevezés innen ered. Az AdV-ok felfedezéséhez az amerikai katonai újoncok között rendszeresen jelentkező, lázzal járó, heveny felső légúti megbetegedések okának célzott vizsgálata vezetett. A vírusneutralizációs próbával elkülöníthető humán AdV (HAdV) szerotípusok száma ma 50 felett jár. Ezek nagyobb része a légzőszerveket fertőzi, és gyakran évekig perzisztál tünetmentes vírushordozókban. Egyes szerotípusok (pl. a HAdV-40 és -41) gastroenteritist és esetenként súlyos hasmenést okoznak főként gyermekekben (Richmond *et al.*, 1979; Uhnou *et al.*, 1984). Számos HAdV típust (pl. HAdV-42-től -51-ig) a HIV megjelenése után az AIDS-es betegekből izoláltak. Nagyon jelentősek a húgyúti szervekben előforduló típusok is (pl. a HAdV-11, -34 és -35), melyek veseátültetés során okozhatnak fatális kimenetelű fertőzést az immunszuppresszív kezelésben részesített recipiensben. Az AdV-sal fertőzött donorokból származó egyéb szervek (pl. csontvelő) is megghiúsíthatják a transzplantációs beavatkozások sikerét.

Az AdV-ok előfordulását lényegében az összes nagyobb állatcsoport képviselőiben kimutatták már (Russell és Benkő, 1999; Harrach, 2014; <http://www.vmri.hu/~harrach/ADENOSEQ.HTM>). Kezdetben főleg a gazdasági haszonállatokból, így szarvasmarhából, lóból, kecskéből, sertésből és juhból izoláltak egyre több új AdV-t. A kutyák egyik legjelentősebb vírusos betegségének, a Rubarth-kórnak a kórokozója az 1-es típusú canin AdV (CAdV-1). A súlyos hepatitist és/vagy vasculitist okozó fertőzés ellen a kutyákat CAdV-2-ből készült vakcinával lehet védeni. A CAdV-2 egy sokkal enyhébb lefolyású multifaktoriális betegség, az ún. kennel-köhögés kialakításában szerepet játszó egyik patogén (Marusyk *et al.*, 1970). Baromfiban szintén gyakori az AdV-os fertőzés. Fontos megemlíteni a tyúkállományokban 1976 óta világszerte tojáshozam-csökkenés szindrómát (EDS) okozó kacsza-AdV-1-et (DAdV-1) (Bartha, 1984). A vírust többek között házi lúdból, pulykából és fürjből (*Coturnix coturnix japonica*) is kimutatták (Das és Pradhan, 1992; Ivanics *et al.*, 2001; Bidin *et al.*, 2007). A másik, súlyosabb lefolyású megbetegedést, a pulykák vérzésszerű bélgyulladását a THEV okozza, azaz a pulyka-AdV-- 3 (TAdV-3) (Tolin és Domermuth, 1970).

Az egyes AdV szerotípusok általában szűk gazdaspektrummal rendelkeznek, és a közeli fajok egyedeit is csak ritkán fertőzik. Így valószínűsíthető, hogy a legtöbb gerinces fajnak lehet egy vagy több saját AdV típusa. Emiatt az AdV-ok gazda-parazita koevolúciós vizsgálatokhoz különösen alkalmas modellek (Benkő és Harrach 2003). Feltételezik azonban, hogy esetenként előfordulhat távolabbi fajok közötti gazdaváltás is, és ez fokozott patogénitásban nyilvánulhat meg (Davison *et al.*, 2003).

Az AdV-ok génkifejező vektorként történő alkalmazása egyre több kutatás témáját képezi. Valószínűsíthető, hogy jelentőségük vakcinaként vagy génterápiás eszközként a jövőben még tovább növekszik mind a humán, mind pedig az állatgyógyászatban (Arnberg, 2012).

2.1.2 Az adenovírusok morfológiája és strukturális jellemzői

Az AdV-ok lineáris, duplaszálú DNS genommal rendelkező, burok nélküli vírusok. Az ikozaéder alakú virionok átmérője 70-90 nm. Az AdV virion sematikus szerkezetét és EM képét mutatja be az 1. számú ábra. A kapszidot alkotó fő fehérje a hexon, melyből 240 alegység van egy virionban. Az ikozaéder csúcsain található 12 (vertex) kapszomer neve penton. Ezeket a pentonbázis és az abból kiálló, jellegzetes fehérjenyúlvány, a fiber alkotja. A fiberek száma pentonbázisonként az emlősök adenovirusaiban egy, míg a madarak egyes adenovirusaiban kettő lehet. Az AdV-ok jellegzetes megjelenését biztosító, antennaszerű fiberek hosszát 9 és 77,5 nm közöttinek találták (Harrach *et al.*, 2011).

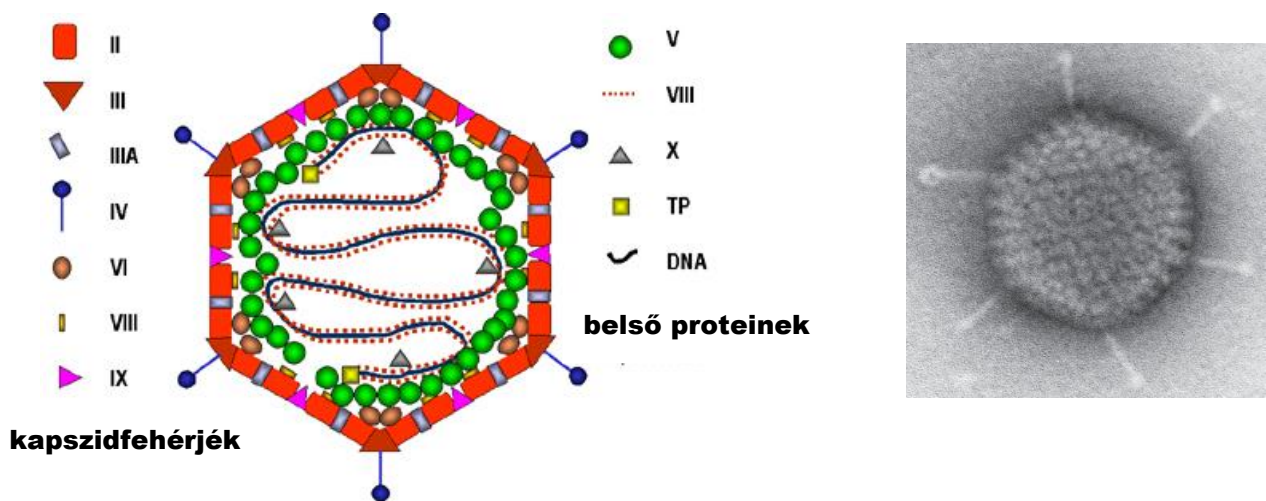
A hexon fehérje homotrimer, azaz három egyforma polipeptid egységből tevődik össze (van Ostrum *et al.*, 1987). Ezekben két antiparallel hordó (P1 és P2) valamint 4 hurok (I1-4) struktúra található. Szerológiai szempontból az I1, I2 és I4 fontos, mivel ezek a hurkok a virion felszínére nyúlnak, és felelősek a vírus immunogén hatásáért. Ennek megfelelően – ellentétben a hexon többi, alapvetően konzervatív aminosav (as) sorrendű részétől – ezek a régiók variábilisak vagy hipervariábilisak is lehetnek (Roberts *et al.*, 1986a; Dán *et al.*, 1998). Az immunológiai szempontból fontos másik fehérje a már említett fiber, ugyanis ez felelős a virion gazdasejt-receptorhoz való kötődésért. A fiber szintén három alegységből felépülő homotrimer, amelynek szerkezetileg is három régiója különböztethető meg. A pentonbázisba ágyazódó farok, a típusonként eltérő hosszúságú szár, valamint a sejtfelszíni receptorokhoz való kapcsolódást közvetítő fejecske (knob). A legtöbb HAdV receptora a CAR (Coxsackievirus Adenovirus Receptor), de bizonyos HAdV-ok egyéb membránfehérjéket (CD46, desmoglein-2, szialinsav, stb.) is igénybe vesznek. Az állati AdV-ok receptorhasználatára vonatkozóan igen kevés ismerettel rendelkezünk. Tudott viszont, hogy bizonyos AdV-ok (pl. EDS vírus) hemagglutinációt okozó képességéért is a fiber fehérje a felelős. Az AdV-ok szerológiai jellemzéshez a hemagglutináció gátlási (HAG) próba is

hasznos lehet. Az ikozaéder 12 csúcsán található pentonbázis homopentomer szerkezetű. Az ezek körül elhelyezkedő hexonokat peripentonális hexonnak nevezzük (Harrach *et al.*, 2011).

A kapszidot alkotó további fehérjék (IIIa, VI, VIII) szerepe még nem teljesen tisztázott. Úgy tűnik, hogy a IIIa fehérje a peripentonális hexonokat veszi körül hidat képezve a pentonbázissal (San Martin *et al.*, 2008). A VI és VIII szerkezeti fehérjék az eddigi vizsgálatok alapján a core és a kapszid összekapcsolásában játszanak fontos szerepet (Mangel *et al.*, 2003).

Az V-ös, VII-es és X-es fehérjék a belső, azaz core-proteinek. A VII-es fehérje, hasonlóan az eukarioták hiszton fehérjéihez, bázikus aminosavakban meglehetősen gazdag, és képes a DNS-hez kötődni a kovalens módon. A TP (ún. terminális protein) a genomális DNS mindkét szálának 5' végéhez kötődik kovalensen, és a vírus DNS replikációja során mintegy primerként működik (Smart és Stillman, 1982; Tamanoi és Stillman, 1983).

A mastadenovírus virion sematikus szerkezete



1. ábra Az adenovírus virion szerkezete. A jobb oldali képen a humán adenovírus 36 elektronmikroszkópos képe látható. Forrás: <http://www.microbiologybook.org>, www.virology.ws. A római számok a poliakrilamid gélelektroforézis során kapott polipeptid frakciók méret szerinti számát jelölik. (TP – terminális protein, DNA – DNS)

2.1.3 Az adenovírusok genomszerveződése és replikációja

Az eddig megismert AdV-ok genomjának mérete meglehetősen széles skálán, 26 163 és 48 395 bp között mozog. A genomok G+C tartalma hasonlóan tág határok között változik, az eddigi teljes genomok alapján 33,6% és 67,6% közötti (Harrach, 2014). A vírus DNS végén hosszabb-rövidebb, megegyező szekvenciájú, fordított vég-ismétlődések (inverted terminal repeat, ITR) vannak, melyeknek hossza az *Adenoviridae* családban genusonként jellemző. Az AdV-ok DNS-ének mindkét szála kódol. A genom középső része az egész víruscsaládon belül megőrzött. Itt található a jobbra átíródó, *r* (right) szálon, az ún. L (late = késői) transzkripciós egység, amely főként a szerkezeti fehérjék génjeit tartalmazza. Ezt két oldalról az ún. E2A és E2B régió génjei határolják az *l* (left, vagyis balra átíródó) szálon. Az innen keletkező fehérjék a DNS-replikációban és enkapszidációban játszanak fontos szerepet. A genom jobb- és bal vége mind méretében, mind összetételében nemzetségenként, illetve szerotípusonként is igen nagy változatosságot mutat (Ursu *et al.*, 2004). Általában a korai gének találhatóak itt, melyek a vírus replikációs ciklusának kezdeti szakaszában a legaktívabbak.

Az AdV-ok replikációjára vonatkozó ismereteink alapvetően a HAdV-2 tanulmányozásából származnak (Harrach *et al.*, 2011.). A sejtbe endocitózis útján bejut a virion, majd a klatrinnal bélelt endoszomákban kezdődik a dekapszidáció (uncoating), és a kiszabaduló genom a sejtmagba jut. A HAdV-2 transzkripciója három fázisra bontható, és végig a gazdasejt RNS-polimeráz II enzimjének közreműködését igényli. A korai (early = E) promoterekről indul meg a transzkripció. Az E1A, E1B, E2, E3, E4, E5 régiók fehérje termékei a gazdasejt fehérjeszintézisét leállítják, és a vírus DNS replikációjának, valamint a virionok termelődésének optimális feltételeit teremtik meg. Ezután két intermedier promóter (IVa2, IX), majd a késői promoterek (MLP = major late promoter) kapcsolódnak be. Megjegyzendő, hogy a splicing (RNS-átszabás) jelenségét a HAdV-2 mRNS-einek tanulmányozása során fedezték fel (Chow *et al.*, 1979), tehát az AdV-ok az eukarióta génkifejeződés modelljeként is fontos szerepet tölthettek be.

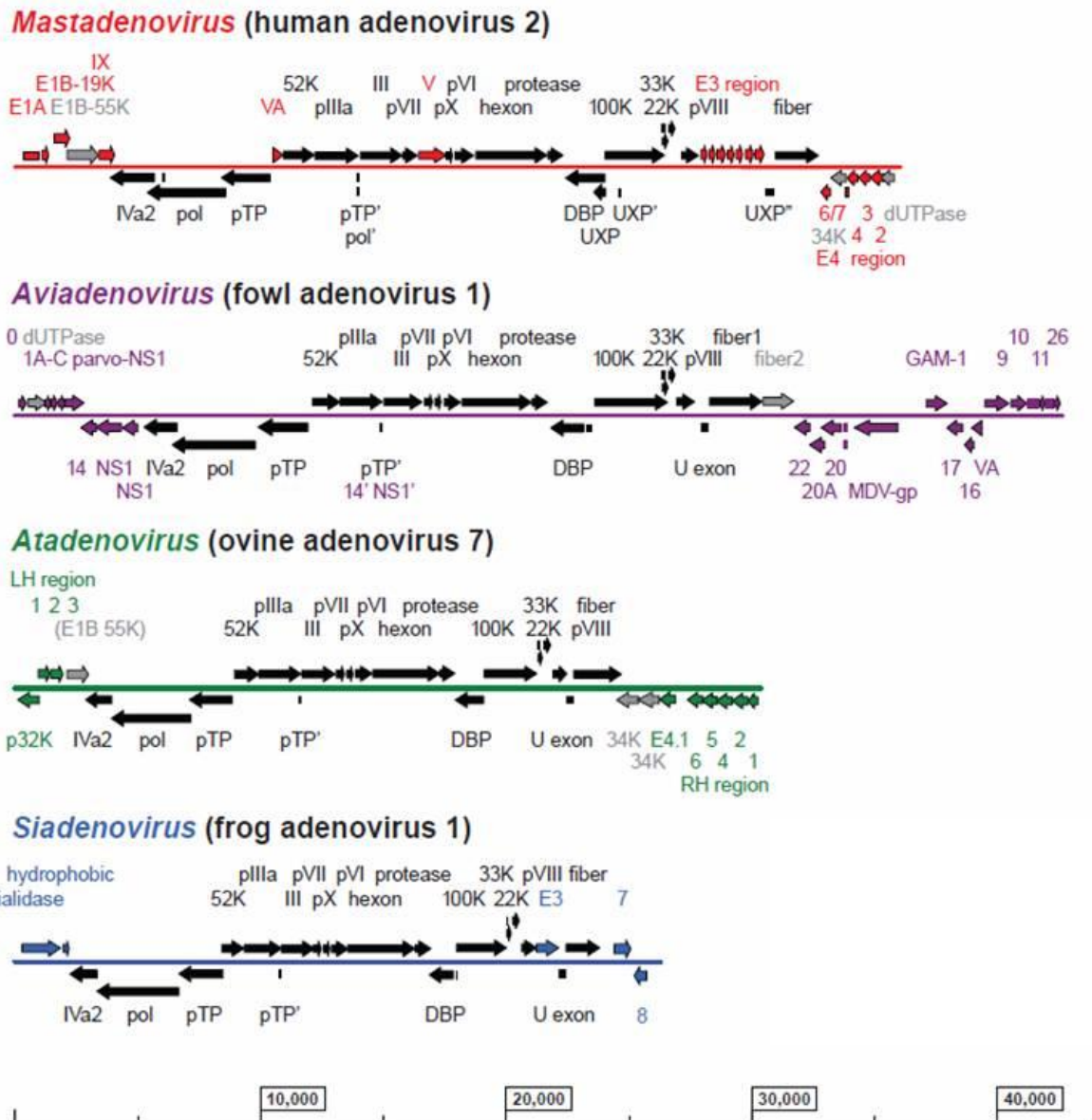
Az MLP által vezérelt transzkriptumokban az ún. háromosztatú leaderről a késő (strukturális) fehérjék egy része prekurzorként fejeződik ki, és az adenovirális proteáz hasítása után éri el aktív formáját (Ding *et al.*, 1996). Az AdV-oknál elfogadott nomenklatúra szerint a prekurzor fehérjéket „p” jelöli. A vírus genomjában kódolt proteáz aktivitása esszenciális a fertőzőképes virionok kialakulásához (Weber, 1995). Az egyes prekurzor fehérjéken a proteáz hasítási helyek konszenzus szekvenciájuk alapján a következők lehetnek: 1-es típus ((M/L/I)XGG'X) és 2-es típus (M/L/I/N/Q)XGX'G) (Ruzindana-Umunyana *et al.*, 2002; Davison *et al.*, 2003).

Az emlős állatok AdV-ainak genom-szerveződése alapvetően a HAdV-okéhoz hasonló. Ezzel szemben a néhány kórózdőben, madarakban és ősbibb gerincesekben előforduló AdV-ok genomvégein található gének nagy részének funkciója ismeretlen, így joggal feltételezhető, hogy e vírusok replikációjának korai szakaszában a mastadenovírusokétól jelentősen eltérő folyamatok zajlanak. Ezekre vonatkozóan jelenleg még nagyon kevés ismerettel rendelkezünk.

2.1.4 Az adenovírusok rendszertana és evolúciója; adenovírusok hüllőkben és kétéltűekben

Az *Adenoviridae* családot az egyes AdV csoportok filogenetikai megoszlása és jellegzetes genom-szerveződése (2. ábra) alapján jelenleg öt nemzetségre osztják (Harrach *et al.*, 2011). Egy-egy nemzetségen belül vírushajokat különítünk el alapján a gazdafaj szerint. Az azonos fajba sorolt vírustípusok homológ génjei között a szekvencia eltérés nem haladja meg az 5–15%-ot. Tehát a gazdaeredet az AdV fajok elkülönítésének csak egyik kritériuma. Ritkán előfordul, hogy több gazdafajból is kimutatható egy adott vírushaj tagja, ám ilyen esetekben általában a gazdák rendszertanilag közel esnek egymáshoz (Benkő *et al.*, 2000; Harrach *et al.*, 2011). A *Mastadenovirus* genust írták le elsőként, és ide csak emlősökben előforduló AdV-ok tartoznak. Az eddig tanulmányozott genomok mérete 30 288 és 37 860 bp közé esik. Átlagos G+C tartalmuk 43,6 és 63,9% közötti, az ITR-ek hossza 93–371 bp (Harrach *et al.*, 2014). A *Mastadenovirus* tekinthető a legalaposabban tanulmányozott nemzetségnek, mivel ide tartoznak a HAdV-ok is. A felismert szerotípusok nagy száma miatt az utóbbi időkben a szerológiai próbák helyett részleges vagy teljes genom-szekvenciák alapján tipizálják az új izolátumokat. Egyes szerzők a nyilvánvalóan rekombináns HAdV-okat is új típus számmal látják el, de ez a gyakorlat nincs hivatalosan elfogadva (Walsh *et al.*, 2010).

A másik régóta elismert nemzetség az *Aviadenovirus*, amely kizárólag madarak AdV-ait tartalmazza. Az ide sorolt vírusok genomjának mérete 42 940 és 45 781 bp közötti, általában magas (44,7-67,6%) G+C tartalommal (Kaján *et al.*, 2012; Harrach, 2014; Marek *et al.*, 2014). A viszonylag nagy genom-méretet az annak két végén található nagyszámú, a nemzetségre vagy egyes vírushajokra, típusokra jellemző gének eredményezik (2. ábra). Az ITR-ek hossza 39-118 bp. Aviadenovírusokat kezdetben csak baromfiból izoláltak, de mostanra számos egyéb madárfaj képviselőinek specifikus AdV-a ismert már.



2. ábra Az első négy elfogadott AdV nemzetség genomtérképének összehasonlítása. Az egyes géneket nyilak jelölik. A fekete színűek a genom középső régiójában megtalálható, minden nemzetségben egységesen megőrzött gének. A szürke nyilak által jelöltek egynél több, de nem minden nemzetségben is előfordulnak. A különböző színekkel jelölt gének és ORF-ek az egyes nemzetségekre vagy vírustípusokra jellemzőek (Harrach *et al.*, 2011).

A nemrégiben alapított *Ichtadenovirus* nemzetségnek egyelőre mindössze egyetlen tagja van, melyet fehér tokból (*Acipenser transmontanus*) izoláltak. Ennek az AdV-nak a genomja az eddigi leghosszabbnak (48 395 bp) bizonyult meglehetősen alacsony G+C tartalommal (42,7%), mely összhangban van a gazdaszervezet genomjának G+C arányával (Doszpoly, 2011). Az ITR szekvenciák hossza 126 bp. Feltételezhető, hogy a halak AdV-ai mind ebbe a csoportba illenek majd, de célzott vizsgálatok ellenére sem sikerült mindeddig más halfajban AdV-t kimutatni (Harrach, 2014).

Két további genus, a *Siadenovirus* és az *Atadenovirus* gazdaeredet szempontjából nagy változatosságot mutat, amennyiben mindkettő több gerinces osztály képviselőiben

előfordulhat. A máig is egyetlen ismert béka-AdV (FrAdV-1) genom-szintű vizsgálata kiderítette, hogy az a korábban az *Aviadenovirus* nemzetségbe sorolt, de kivételesnek tartott TAdV-3-mal alkot monofiletikus csoportot (Pitcovski *et al.*, 1998; Davison *et al.*, 2000). Mindkét vírus genomjának bal végén található egy, a bakteriális szialidáz enzimekével homológ gén, amely csak ezekre az AdV-okra jellemző (2. ábra). Innen ered a *Siadenovirus* elnevezés. A nemzetségnek sokáig csak ez a két tagja volt, de újabban számos további siadenovírus típus előfordulását írták le, többek között ragadozó madarakban (Kovács és Benkő, 2009), széncinegében (Kovács *et al.*, 2010), papagájokban (Kato *et al.*, 2009; Wellehan *et al.*, 2009), délsarki halfarkasban (*Stercorarius maccormicki*) (Park *et al.*, 2012) és pintyekben (Joseph *et al.*, 2014). Egy érdekes esetben elkobzott teknősök tömeges megbetegedése és elhullása kapcsán is egy új siadenovírus típust mutattak ki (Rivera *et al.*, 2009). A siadenovírusok genomja az eddig ismert legkisebb méretű (mindössze 26 163–26 340 bp), alacsony (34,2-38,5%) G+C tartalommal és rövid (29-39 bp) ITR-ekkel. Az egész *Adenoviridae* családban megőrzött génkészleten kívül mindössze öt olyan gént tartalmaznak, mely a genusra jellemző. Ezek közül 2-2 gén a genom bal és jobb oldalán, míg egy a mastadenovírusok E3 régiójának helyén található (2. ábra). Noha kezdetben feltételezték, hogy ez a kétélűekkel együtt fejlődött leszármazási vonal (Benkő and Harrach, 2003; Davison *et al.*, 2003), a siadenovírusok gerinces gazda eredetét, az előzőekben ismertetett másik három nemzetséggel szemben, pillanatnyilag tisztázatlannak tekintjük (Kovács és Benkő, 2011). A gazdaváltást támasztja alá a genusba tartozó vírusok erősen patogén volta. Ezek ugyanis súlyos megbetegedéseket okozhatnak mind madarakban (Pitcovski *et al.*, 1998; Joseph *et al.*, 2014), mind pedig teknősökben (Rivera *et al.*, 2009; Schumacher *et al.*, 2012).

A másik, vegyes gazdaeredetű nemzetség az *Atadenovirus*. Ennek a genusnak a hivatalos elfogadtatása több mint 30 évet vett igénybe. Az ide sorolt vírusokat már a '60-as években izolálták szarvasmarhából hazánkban (Bartha, 1969). A genus első tagjait korábban az *Aviadenovirus*, illetve a *Mastadenovirus* nemzetség, mint kivételeket tartalmazta. Csak a molekuláris alapú törzsfarekonstrukciós módszerek alkalmazásának elindulásakor sikerült bebizonyítani, hogy valójában egy jól elkülönülő csoportról van szó (Harrach *et al.*, 1997; Dán *et al.*, 1998; Harrach és Benkő 1998). Mivel e nemzetség kezdetben felismert tagjainak genomjában magas A+T arány volt megfigyelhető (G+C tartalmuk mindössze 33,6-43%), az *Atadenovirus* nevet kapta. Feltételezték, hogy ez a csoport a hullókkal együtt fejlődött AdV leszármazási vonalnak felel meg (Harrach, 2000). Erre a gabonasiklóból (*Pantherophis guttatus*) izolált AdV genomjának elemzése szolgáltatja az első bizonyítékot (Benkő *et al.*, 2002; Farkas *et al.*, 2002, Farkas *et al.*, 2008). Meglepő módon, a kígyó-AdV-1 (snake adenovirus 1, SnAdV-1) 27 751 bp méretű genomja kiegyensúlyozott (50,21%) G+C aránnyal rendelkezett. A viszonylag rövid (27 751–33 213

bp) genom-méret és jellegzetes szerveződés a nemzetség valamennyi tagjaira jellemző (2. ábra). Az ITR-ek szintén rövidek, az eddig ismertek mérete 42 és 59 bp között van (kivétel: SnAdV-1, 118 bp) (Both, 2011). A mastadenovírusokban található E1A és E3 régió, valamint az V-ös és a IX-es szerkezeti fehérjét kódoló gén hiányzik. Az E1A régió helyén, de az *I* szálon, a csak erre a nemzetségre jellemző, p32K szerkezeti fehérje génje van. Ettől jobbra, az *r* szálon az E1B régió LH1– génjei találhatóak. A genom jobb végéhez közel elhelyezkedő E4 régió az *Atadenovirus* genuson belül is jelentős különbségeket tartalmazhat. A genom e szakaszában a leggyakoribbak a duplikációs és inzerciók események (Farkas *et al.*, 2008).

További, új atadenovírusokat mutattak ki különböző gyíkfajok képviselőiben is PCR-rel (Wellehan *et al.*, 2004; Papp *et al.*, 2009). A hüllőkből nyert, rövid (kb. 300 bp) szekvenciák G+C aránya szintén inkább kiegyensúlyozottnak (45-57%) mutatkozott a nem-hüllő gazdafajok atadenovirusaiban megfigyelhető 36-40%-kal szemben. A filogenetikai számítások és a nemzetségre jellemző gének megléte alapján eddig minden pikkelyes hüllőből atadenovírust lehetett kimutatni. Ez megerősíti azt a feltételezést, hogy az atadenovírusok hüllőkben alakultak ki, és később váltottak gazdát, legalább háromszor evolúciójuk során. Ezek a gazdaváltások kerdőzöket (Harrach, 2000), erszényeseket (Thomson *et al.*, 2002) és madarakat (Harrach *et al.*, 2008) érintettek.

Az AdV-ok előfordulását hüllőkben először egy elhullott nilusi krokodil (*Crocodylus niloticus*) szerveiben (Jacobson *et al.*, 1984), később pusztai varánuszban EM vizsgálattal mutatták ki (Jacobson és Kollias, 1986). Ezeket a vírusokat azonban sem izolálni, sem molekuláris módszerekkel vizsgálni még nem sikerült. Az első hüllő-AdV izolátum gabonasiklókból (*Pantherophis guttatus*) származik (Juhász és Ahne, 1992) és genomjának teljes szekvenálása után a SnAdV-1 elnevezést kapta. A SnAdV-1-et sikerült még izolálni a vörösfarkú boából (*Boa constrictor*) és királypítóból (*Python regius*) is (Ogawa *et al.*, 1992). AdV-ok jelenlétét további kígyófajokban is leírták az alább felsoroltak szerint: vörösfarkú boa (Jacobson *et al.*, 1985, Ramis *et al.*, 2000), rózsaboa (*Lichanura trivirgata*) (Schumacher *et al.*, 1994), hondurasi pálmavipera (*Bothriechis marchi*) (Raymond *et al.*, 2002), öves királlysikló (*Lampropeltis zonata*) (Raymond *et al.*, 2003), homoki vipera (*Vipera aspis aspis*) (Papp *et al.*, 2009), kaliforniai királlysikló (*Lampropeltis getula californiae*), sárga bikasikló (*Pituophis catenifer*) (Garner *et al.*, 2008), Hagen üregi vipera (*Parias hageni*) (Farkas és Gál, 2008). Különbő gyíkfajok egyedeiben megfigyelt AdV-okról szintén számos közlemény született: pusztai varánusz (*Varanus exanthematicus*) (Jacobson és Kollias, 1986), Jackson háromszarvú kaméleon (*Chameleo jacksonii*) (Jacobson *et al.*, 1990), belföldi szakállas agáma (*Pogona vitticeps*) (Jacobson *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2002; Wellehan *et al.*, 2004; Parkin *et al.*, 2009), hegyi kaméleon (*Chameleo montinum*) (Kinsel *et al.*, 1997), leopárdgekkó (*Eublepharis macularis*) (Wellehan *et al.*, 2004), tokee gekkó (*Gekko gekko*), zsírfarkú gekkó (*Hemyspilon caudicinctus*), kényelvű szkink (*Tiliqua scincoides*)

(Wellehan *et al.*, 2004), gila (*Heloderma suspectum*) (Wellehan *et al.*, 2004, Papp *et al.*, 2009), smaragd varánusz (*Varanus prasinus*) (Papp *et al.*, 2009) mexikói viperagyík (*Heloderma horridum*) (Papp *et al.*, 2009), *Ctenophorus nuchalis*, törpe szakállas agáma (*Pogona minor minor*) (Hyndman és Shilton, 2011). De gyíkokból AdV-t izolálni először és eddig csak 2008-ban sikerült gilából és mexikói viperagyíkból (Papp *et al.*, 2009).

2007-ben az USA-ban és hazánkban szinte egy időben egy újabb AdV-t detektáltak vörös- és sárgafülű ékszerteknősökben (*Trachemis scripta elegans*, *T. s. scripta*). Hasonló vírusokat a Testudinoidea szuperfamilia alá sorolt több teknősfaj egyedeiben is kimutattak (Dospoly *et al.*, 2013). Noha izolálni nem sikerült a vírust, több genomszakasz szekvenciájának elemzése alapján egyértelmű, hogy egy új AdV leszármazási vonalról van szó, ami feltehetőleg egy új genus (javasolt neve Testadenovirus) kialakítását teszi majd szükségessé (Farkas és Gál, 2009; Dospoly *et al.*, 2013). Egyelőre nem tisztázott, hogy esetleg milyen további AdV leszármazási vonalak létezhetnek, amelyek a Squamata és Testudines rendeken kívüli hüllők csoportjaival fejlődtek együtt.

Az AdV-os fertőzöttség az ősbibb gerincesekben nem okoz tipikus tüneteket. Leggyakrabban levertség, étvágytalanság és lesóványodás fordul elő (Marschang, 2011). Az esetenként megfigyelhető idegrendszeri tüneteket, opisthomuszt, instabil mozgást, gyíkok esetében a kloáka és a hasi régió talajtól való elemelésének nehézségeit májkárosodás következményének tartják. Újszülött vörösfarkú boa SnAdV-1-gyel történt kísérleti fertőzése nyomán elhullást tapasztaltak. Kórboncoláskor a legszembeötlőbb elváltozásokat a májban találták, ahol világos foltokat okozó elhalásos gócok voltak jelen (Jacobson *et al.*, 1985). Kórbonctani elváltozások előfordulhatnak a duodénumban is, ahol a bél-nyálkahártya bővítésége tűnik fel. Szöveti vizsgálat során jellegzetes lelet a basophil festődésű magzárványok megjelenése a máj- és bélsejtekben (Julian és Durham, 1982; Jacobson *et al.*, 1996).

Hüllők AdV fertőzöttségének egyre gyakoribb észlelésével szemben mindössze egyetlen kételtűből származó AdV ismeretes, amelyet 1973-ban leopárdbékából (*Rana pipiens*) izoláltak (Clark *et al.*, 1973).

2.2 Parvovírusok

2.2.1 A parvovírusok biológiai jelentősége

A parvovírusok (PV) mind a gerincesek, mind a gerinctelenek számos képviselőjében előforduló, változatos replikációs stratégiával rendelkező vírusok. A cirkovírusok felfedezéséig a legkisebb méretű állati vírusoknak számítottak. Erre utal elnevezésük is (latin *parvus* szó=kicsi). Az állatokat fertőző legellenállóbb vírusok közé sorolhatók (Bräuniger *et al.*, 2000).

A legelső gerinces eredetű PV-okat 1965-ben írták le, amikor AdV-ok izolálása során a sejt kultúra kontaminációját tapasztalták (Atchison *et al.*, 1965). Azt is megfigyelték, hogy csak AdV-sal való együttes fertőzés esetén sikerült izolálni ezeket a kisméretű, DNS-tartalmú, de az AdV-októl eltérő tulajdonságú partikulumokat. Tehát ezek valószínűleg főemlős dependoparvovírusok lehettek. Az sem volt még nyilvánvaló, hogy ezek a vírusok rokonai a hasonlóan kisméretű, viaszmosolyban (*Galleria mellonella*) egy évvel korábban francia nyelven leírt vírusoknak (Meynadier *et al.*, 1964).

Napjainkra az emlősöket fertőző PV-okra vonatkozóan áll rendelkezésünkre a legtöbb ismeret. A humán fertőzések közül egyértelmű tüneteket – a vérbanki donor regisztrációs száma alapján - B19 névre keresztelt vírus esetén sikerült megállapítani. E vírusnak magzatkárosító hatása jól ismert, amennyiben az ún. *hydrops fetalis* miatt spontán vetélést okoz (Anand *et al.*, 1987; Enders *et al.*, 2004). Felnőttekben ízületi fájdalmakat is előidézhet. Gyermekekben a fertőzés általában *enteritis* és az ún. „lepkehimlő” kórképként manifesztálódik, ami általában enyhe lefolyású betegség. Háziállataink közül a PV-os fertőzés sertések esetében bír kiemelkedő jelentőséggel. A porcin parvovírus (PPV) gyakran állhat a fertőző meddőség hátterében (Joo *et al.*, 1977). A vírus a magzatok 55 napos koráig átjut a placentán, és azok elhalását, jellegzetes mumifikálódását okozza (Nielsen *et al.*, 1991; Wolf *et al.*, 2008). Az állatorvosi gyakorlatban a húsevőket fertőző PV-ok is fontosak. A kutyákat fertőző canine parvovirus (CPV) és a macskák kórokozója, a feline panleukopenia virus (FPV) jellegzetes vérzéses enteritis kórképet okoz kölyökállatokban (Goddard és Leisewitz, 2010). Más ragadozóknak, így menyétfélékben (Mustelidae) is leírtak számos, betegséget is okozó PV-t, így a nyércek bélgyulladását okozó vírust. Ez az aleuti betegséggel hozható összefüggésbe (Parrish *et al.*, 1984), mely a szőrmeiparban okoz károkat. A rágcsálók PV-os megbetegedései leginkább a laborállat egészségügy szempontjából bírnak kiemelkedő jelentőséggel, melyek kialakításában a „minute virus of mice” (MVM), a H-1 PV és a „Kilham rat PV” játszik szerepet (Jacoby *et al.*, 1996).

Az emlősök mellett a házi szárnyasok körében is jól ismert néhány PV-okozta megbetegedés. Házityúkban és pulykában is megfigyelhető az ún. ED (major enteritic disease) tünetegyüttes, melynek az egyik legfontosabb kórokozója vélhetően a csirke- és

pulyka-PV (Kisary *et al.*, 1984; Zsák *et al.*, 2008; Palade *et al.*, 2011). Vizi szárnyasok esetében a házi lúd Derzsy-féle betegségének PV-os oktanát 1967-ben leírták (Derzsy, 1967; Schetter, 1971). Hasonló PV okoz hasonló betegséget pézsmarécében (*Cairina moschata*) (Le Gull-Reculé és Jestin, 1994; Brown *et al.*, 1995; Zádory *et al.*, 1995; Glávits *et al.*, 2005). A kórkép ugyancsak reprodukciós zavarokban nyilvánulhat meg; általában a fiatal állatok torz fejlődése figyelhető meg. Emellett idegrendszeri tünetek, pl. opisthotonus, is jellemzőek lehetnek.

A gerincteleneket fertőző PV-ok, az ún. densovírusok közül fontos megemlíteni egyes garnélarákok (*Penaeus monodon*, *P. chinensis*, *P. stylirostris*) fertőzőttségét; a „hepatopancreatic virus” (HPV) (Lightner és Redman, 1985; Lightner *et al.*, 1993) a garnélarákok szaporodási rátájának komoly visszaesését okozza. A selyemtermelés szempontjából, főleg a műselyem elterjedése előtt bírt még nagy jelentőséggel a selyemlepkéket fertőző *Bombyx mori* densovirus (Shimizu, 1975).

A PV-ok kórokozó képességén kívül jelentős még esetleges onkolitikus aktivitásuk is (Tijssen *et al.*, 2011). Ezzel párhuzamosan egyre fontosabb szerep jut nekik a génterápiás alkalmazásokban, kiváltképp a *Dependoparvovirus* genus tagjainak (Skubis-Zegadlo *et al.*, 2013). A rendkívül kisméretű genom miatt azonban ezen alkalmazásuk meglehetősen korlátozott az inzert méretét tekintve. A densovírusok alkalmazásának rovarkártevők elleni biológiai védekezésben juthat szerep (Tal és Attathom, 1993).

2.2.2 A parvovírusok morfológiája és strukturális jellemzői

A PV-ok kisméretű, szimpla szálú, lineáris DNS genommal rendelkező, burok nélküli vírusok. A virion átmérője 21,5–25,5 nm közötti, míg a genom méret ismert határai 4–6,3 Kb (Tijssen *et al.*, 2011). A kapszid ikozaéder formájú, és 60 fehérje alegységből épül fel. Ezek az ún. fő kapszidfehérjék (VP), melyek méretük szerint általában három csoportra különíthetők el. Ez alapján beszélünk VP1, VP2 és VP3 fehérjékről (Kaufmann *et al.*, 2004). Ez a szám azonban eléggé változatos, egyes virionokban csupán 2, míg egyes brevidensovírusok és pefudensovírusok esetében akár 5 VP is található (Tijssen *et al.*, 2011). A különböző VP fehérjék általában csupán az N-terminális régió kiterjedésében különböznek egymástól. Egy jellegzetes, konzervatív motívum is megtalálható a PV kapszidfehérjéken, ez az ún. „phospholypase A2” (PLA) domén. Úgy tűnik, hogy a PLA2 aktivitása nélkülözhetetlen ahhoz, hogy a PV genom a késői endoszómákból a sejtmagba kerüljön (Zádory *et al.*, 2001). A kapszid külső megjelenése is nagyon különböző lehet, egyes esetekben sima (többnyire a densovírusok esetében), de lehet kismértékben (CPV) vagy nagymértékben „gyűrött” (adeno-associated virus 1, AAV1) a felszíne.

2.2.3 A parvovírusok genomszerveződése és replikációja

A PV genom szerveződése az egész vírusszaládban jól megőrzöttnek mondható, annak ellenére is, hogy a genom-szekvencia még az azonos funkciójú fehérjéket kódoló gének esetében is nagy változatosságot mutathat (Shackelton *et al.*, 2005). A genom általában két fő ORF-ből áll, melyek közül a *rep* felelős a nem-strukturális proteinek (NS) kódolásáért, míg a *cap* a kapszidot alkotó, szerkezeti fehérjéket kódolja. A gerincesek PV-aiban és néhány ízeltlábú PV-ban is a két ORF ugyanazon a szálon helyeződik, míg egyes rovarokat fertőző vírusok esetében ambiszensz helyzetűek (Tijssen *et al.*, 2011; Pham *et al.*, 2013). A genom két szélét másodlagos struktúrát képző szekvenciák határolhatják, melyeknek egy része jellegzetes, hajtú-szerű szerkezetet képez. Ezek szekvenciája lehet eltérő a genom két végén, de meg is egyezhet, ilyenkor ITR-ekről beszélünk.

A mindössze két ORF meglehetősen változatos méretű és funkciójú fehérjék kódolására képes. Ebből is következik, hogy a PV-ok transzkripció mechanizmusai összetettek, gyakori az alternatív splicing és az ún. „leaky scanning”, esetleg mindkettő együttes előfordulása. A transzkripció stratégiák genusról genusra változnak, gyakran még az egyes genusokon belül is többfélék lehetnek (pl. *Dependoparvovirus*). Alternatív splicing esetén a donor és akceptor helyek lehetnek az általános, konzervatív szignáltól teljesen eltérő, ún. alternatív felismerési helyek is. A „leaky scanning” leginkább a densovírusokra jellemző (Tijssen *et al.*, 2011).

Jelentős változatosságot mutat a transzkripció szabályzó elemek száma és elhelyezkedése is. Az *Erythroparvovirus*, *Amdoparvovirus* és *Bocaparvovirus* nemzetségek tagjainak genomjában csak egy promóter régió található, a bal oldali ITR-hez közel. Ebben az esetben minden módosítás poszt-transzkripcionálisan történik. Más genusokban előfordul két (*Protoparvovirus*, *Ambidensovirus*), esetleg három (*Dependoparvovirus*, *Brevidensovirus*) promóter is. Az mRNS-ek általában poliadeniláltak, ám a poliadenilációs szignál helye és száma még genuson belül is nagyon különböző, akár csak azok erőssége. Sok esetben alternatív poliadenilációs szignál felelős a folyamatért (Yoto *et al.*, 2006), mely stop kodonokkal fedhet át.

A PV-ok receptor-mediált endocitózissal jutnak be a gazdasejtbe, ám a dekapszidáció folyamata kevésbé tisztázott. A replikáció minden esetben a sejtmagban zajlik, és csak akkor mehet végbe, ha a sejt S fázisban van. Ez arra enged következtetni, hogy szoros kapcsolat van a vírus és a gazdasejt replikációs folyamatai között. A replikációra jellemző az ún. rolling „hairpin” mechanizmus, mely nevét a szimpla szálú DNS replikációjának iniciációjához használt hajtú-szerű struktúrákról kapta. A folyamathoz nélkülözhetetlen az NS1 fehérje aktivitása (Qiu és Pintell, 2008).

2.2.4 A parvovírusok rendszertana; parvovírusok hüllőkben és kétéltűekben

A PV-ok rendszertana épp jelentős átalakításon esett át a régi felosztás elavultsága és újragondolása miatt. A 2013 októberében tett javaslatokat 2014-ben elfogadta a Nemzetközi Vírustaxonomiai Bizottság (International Committee on Taxonomy of Viruses - ICTV). Az új rendszertannak köszönhetően az egyes PV-ok besorolhatóak pusztán a DNS-szekvencia ismerete alapján, melyhez azonban mindkét ORF meghatározása szükséges (Cotmore *et al.*, 2014). Ezenkívül minden nemzetség nevébe beillesztették a „parvovirus” vagy „densovirus” szavakat azok alcsaládba tartozása szerint. Számos, a család eddig be nem sorolható tagja is helyet kapott egy-egy új, esetleg régi genusban. Az új definíciók alapján egy nemzetségbe tartoznak mindazon PV-ok, melyek *rep* gén alapján megállapított as szekvenciája legalább 30% egyezést mutat. Nem sorolhatók egy nemzetségbe azok a vírusok, amelyeknél ez a szám kisebb, mint 30%. Mind a két ORF egybefüggő szekvenciájának az ismeretére pedig azért van szükség, hogy a transzkripció tulajdonságok, melyek – mint feljebb már említettem – meglehetősen karakterisztikusak a közel-rokon PV-ok esetében, szintén vizsgálhatók legyenek taxonómiai besorolásakor. Egyes ízeltlábú PV-ok besorolásakor azonban a genomszerveződés nagyobb hangsúlyt kap az as sorrendnél, mivel előbbi – vélhetően a gazdafajok sokfélesége miatt – megőrzöttebbnek tűnik. Ezen kívül természetesen ugyanúgy számítanak a szerológiai adatok is, de a vírusok genus szintű megbízható besorolásához már nincs szükség azok feltétlen izolálására.

Hasonlóan az AdV-okhoz, a PV-oknál is bevezették a faj fogalmát, mely legalább 85% azonosságot vár el a *rep* ORF as sorrendjében. Minden faj esetében kettős nevezéktant alakítottak ki. Az első név vonatkozik a gazdafaj szélesebb taxonómiai hovatartozására (angol nyelven), míg a második vonatkozik a nemzetségre, ahova az adott faj tartozik. Az egyes vírusszámokat arab számok, esetenként az angol ABC betűi különböztetik meg (pl. az egykori mink parvovirus 1 ma már a *Carnivore amdoparvovirus 1* fajba tartozik).

A régi rendszertannak csupán egyetlen aspektusa maradt változatlan; a *Parvoviridae* család két alcsaládra való szétválasztása azok gazdaeredete szerint. Így az ízeltlábúakat fertőző PV-ok a *Densovirinae*, a gerinceseket fertőzők pedig a *Parvovirinae* alcsaládba tartoznak, melyek filogenetikai számításokkal is egyértelműen elkülöníthetők.

2.2.4.1 *Densovirinae* alcsalád

A gerincteleneket fertőző PV-ok összesen 5 nemzetségbe sorolhatóak be. Ezek közül a *Penstyldensovirus*, *Hepadensovirus* és az *Ambidensovirus* újonnan alakított nemzetségek. A *Penstyldensovirus* és *Hepadensovirus* kizárólag garnélarák PV-okat

tartalmaznak, melyeket korábban vagy besoroltak a *Parvovirus* vagy *Brevidensovirus* nemzetségbe, vagy sehová nem voltak besorolhatók. A *Hepadensovirus* tagjainak meglehetősen nagyméretű a genomja (>6 Kb), és három promótert is tartalmaz (Sukhumsirichart *et al.*, 2006). A *Penstyldensovirus* tagjainak csupán egyetlen egy típusú kapszidproteinje van, mely egyúttal a legkisebb méretű ilyen fehérje a *Parvoviridae* családban (Kaufmann *et al.*, 2010). Az *Ambidensovirus* nemzetségre jellemző, hogy tagjaik a legkisebb mértékű rokonságot mutatják egymással *rep* fehérjéjük as szekvenciája alapján, talán ezért is sorolták őket eddig két eltérő nemzetségbe is; a megszűnt *Densovirusba* és *Pefudensovirusba*. A távoli filogenetikai rokonság ellenére azonban ezeket a vírusokat egyértelműen egyesíti ambiszensz irányultságú genomjuk (egyedül az egész családban) és két, jellegzetes módon a genom ITR szekvenciái előtt helyeződő promóterük (Cotmore *et al.*, 2014). A régi rendszertanban is meglévő, és ugyanazon fajokat tartalmazó *Iteradensovirus* nemzetséget jellemzi, hogy megegyező arányban csomagolódnak a negatív és pozitív irányú ssDNS genomok a virionokba. Csupán egyetlen promóterük van mindkét ORF-et megelőzve (Tijssen *et al.*, 2011). A *Brevidensovirus* szintén olyan nemzetség, mely a régi rendszertanban is létezett. Nevét tagjainak kisméretű (kb. 4 Kb) genomjáról kapta, valamint arról, hogy VP4 fehérjéjük a legrövidebb az alcsaládban. ITR szekvenciájuk nincs, a palindróma méretében és nt sorrendjében is eltér a genom két végén. Azonban mindkét végen egyaránt hajtú-szerű struktúrát formáznak.

Az új rendszertan elfogadása után, 2014-ben a *Densovirinae* alcsalád még tovább bővült; tengeri sünökből és tengeri csillagokból írtak le egy új densovírus ágat. Ezek a legelső vírusok, melyekről bebizonyosodott, hogy fertőznek tüskésbőrűeket (Echinodermata) (Gudenkauf *et al.*, 2014). Egyúttal ezek az első olyan densovírusok, melyek nem ízeltlábú eredetűek.

2.2.4.2 *Parvovirinae* alcsalád

A gerinceseket fertőző *Parvovirinae* alcsalád az új rendszertan szerint 8 nemzetségre osztható fel, melyek közül három új.

A *Protoparvovirus* nemzetséget a régi *Parvovirus* genusból alakították át. Az elnevezés arra utal, hogy az ide besorolt PV-okat fedezték fel először (Cotmore *et al.*, 2014). A nemzetségbe tartozó vírusoknak két promóterük van, és az érett virionokba sokkal nagyobb mértékben csomagolódnak a negatív irányú szál, mint a pozitív. Az *Erythroparvovirus* nemzetség tagjainak egyetlen promóterük van, és két, eltérő erősségű poliadenilációs szignáljuk. A genom közepén található egy alternatív szignál, szekvenciája nem egyezik meg az általános poli-A konszenzussal (Guan *et al.*, 2011). Az *Amdoparvovirus* nemzetség tagjai csak a Carnivora rendbe tartozó állatokat fertőzik, leginkább kutyaféléket és

menyétféléket. Az érett virionba kizárólag negatív irányultságú DNS kerül, míg genomszerveződésük nagyon hasonlít az *Erythroparvovirus* tagjaiéra. A *Bocaparvovirus* genus tagjait eleinte szarvasmarhákból és kutyafélékből izolálták (**Bovin-Canin**). A genomot határoló palindróm szekvenciák eltérnek, ám mind a kettő hajtú-szerű struktúrát alakít ki. Az NS1 proteint kódoló *rep* gén C-terminálisával átfedésben helyezkedik el egy, csak erre a genusra jellemző alternatív ORF, mely az NP1 proteint kódolja. Úgy tűnik, ez a fehérje a gazdaszervezet immunválaszának befolyásolásában játszik fontos szerepet, mivel több interferon transzkripciójának szabályozását végző protein gátlására is képes (Zhang *et al.*, 2012).

Az újonnan bevezetett nemzetségek egyike az *Aveparvovirus*, ahová két olyan madár PV-t soroltak át, melyek eredetileg a *Parvovirus* (ma *Protoparvovirus*) nemzetség tagjai voltak. Ezek genomja egy vagy több, rövid, a két fő ORF között elhelyezkedő, ám azokkal soha nem átfedő alternatív ORF-et is tartalmaz, amely a *Protoparvovirus* genus tagjaiban nem fordul elő. Ezen kívül a filogenetikai számítások is alátámasztják az *Aveparvovirus* klád külön genusként való elfogadását (Zsák *et al.*, 2008; Day és Zsák, 2010). Új genus még a *Tetraparvovirus*, melynek tagjait korábban egy új, Partetravirus névre keresztelt nemzetséggként akarták elfogadtatni. Az új szabályok alapján, valamint a *Primate tetra virus 1* egyik típusa, a human parvovirus 4 után kapta a nevét (tetra=4) (Cotmore *et al.*, 2014). Egy alternatív ORF-et tartalmaz a genomjuk, mely a *cap* ORF-fel van teljes átfedésben, és a terméke kb. 10 kDa molekulatömegű (Tse *et al.*, 2011). A harmadik új nemzetségbe, a *Copiparvovirus*-ba azokat a porcin PV-okat sorolták be, melyeket csupán 2010-ben írtak le először, és egyik korábbi genusba sem lehetett őket besorolni (Cheung *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010). Kiderült, hogy ezek a vírusok a legközelebbi rokonai egy 2001-ben, az Egyesült Államokban leírt, sehova be nem sorolható bovin PV-nak (Allander *et al.*, 2001). Itt is leírtak egy alternatív ORF-et a genom középső régiójában, azonban ez – még a hasonló elhelyezkedés ellenére sem – mutat semmilyen mértékű homológiát a *Tetraparvovirus* NP1 szekvenciájával.

2.2.4.3 Genus *Dependoparvovirus*; parvovírusok hüllőkben

A *Dependoparvovirus* (korábban *Dependovirus*) az a nemzetség, mely eddig a legszélesebb gazdaspektrummal bír. Míg az eddig ismertetett genusok kizárólag az emlősök vagy madarak osztályának egy, vagy akár több rendjét fertőzik, a dependoparvovírusok előfordulnak hüllőkben, madarakban és számos emlősrendben is, így főemlősökben, rágcsálókban, úszólábúakban, denevérekben és ragadozóknak. Nevüket onnan kapták, hogy genomjuk hatékony replikációjához a gazdasejt egy ún. helper-vírussal való egyidejű fertőzése szükséges (Tijssen *et al.*, 2011). A helper-vírus, az eddigi esetek alapján herpesz-

vagy AdV, ám nincs kizárva, hogy más nagyméretű DNS-vírus – mely rendelkezik a genomjában kódolt DNS-polimerázzal és a sejtmagban replikálódik – képes betölteni ezt a funkciót. A dependoparvovírusok így függetlenek a sejtciklustól, fertőzhetnek sejteket az S fázison kívül is. Abban az esetben, ha a sejt kultúrát olyan vegyületekkel kezelik (pl. hydroxiurea), mely a sejt DNS-replikációjára hat, előidézhető helper-vírus jelenléte nélkül is a replikáció (Schlehofer *et al.*, 1983; Jakobson *et al.*, 1987). Fiziológias körülmények között eddig csak az anseriform (vízi szárnyas) dependoparvovírusokról bizonyosodott be, hogy autonóm replikációra is képesek, így a Derzsy-betegség vírusa (goose parvovirus) és a duck parvovirus (ma már mindkettő egyetlen fajba, az *Anseriform dependoparvovirus 1*-be tartozik) (Le Gall-Reculé és Jestin, 1994; Brown *et al.*, 1995; Zádori *et al.*, 1995).

A nemzetséget a meglehetősen kis genomméret (kb. 4,7 kb) és a genom két végén Y alakú hajtút formázó ITR-ek jellemzik (Tijssen *et al.*, 2011). A családtól szokatlan módon a *cap* ORF sokkal megőrzöttebb a genuson belül, mint a többi nemzetségben, ahol ez inkább a *rep* ORF-ről mondható el. Noha minden faj esetében 3 promótert írtak le, a homológ mRNS-ek méretében, poszt-transzkripcionális érésben és a poliadenilációban is nagy különbségek vannak (Qiu és Pintel, 2008). Az eddig ismert dependoparvovírusok esetében egyenlő arányban helyeződnek a virionba mind a negatív, mind a pozitív irányultságú genomok. Fontos még megjegyezni azt is, hogy a dependoparvovírusok genomja – helper-vírus jelenlétének hiányában – integrálódik a gazdasejt genomjába, és ott látens kórokozóként rejtve marad, amíg a sejtet egy potenciális helper-vírus meg nem fertőzi (Berns és Giraud, 1995). E miatt a tulajdonságuk miatt irányul komoly érdeklődés a dependoparvovírusokra, mint potenciális vektorokra a génterápiában (Trabelsi *et al.*, 2014; Tsang *et al.*, 2014).

A *Dependoparvovirus* nemzetségben csupán egyetlen hulló PV-t tartalmazó faj található, a *Squamate dependoparvovirus 1*, melynek egyetlen típusa a snake adeno-associated virus (SAAV) (Farkas *et al.*, 2004). Gyíkokban PV-os fertőzöttséget kizárólag szakállas agámában írtak le (Jacobson *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2002), mindig AdV-os fertőzöttség mellett. Molekuláris szintű elemzést egyik esetben sem végeztek, így csupán az AdV-sal való együttes jelenlétből és a partikulumok méretéből és formájából következtettek PV fertőzöttségre. Kígyókból először PV-t elektronmikroszkópos vizsgálatok során erdei siklóban (*Elaphe longissima*) és szalagos siklóban (*Elaphe quatuorlineata*) fedeztek föl (Heldstab és Bestetti, 1984). Öves királlysiklóból is kimutattak AdV mellől ilyen fertőzést, ám molekuláris elemzés itt sem történt (Wozniak *et al.*, 2000). Izolálni először gabonasiklóból (*Pantherophis guttatus*) sikerült kígyó PV-t (Ahne és Scheinert, 1989). Később a SnAdV-1-gyel egyetemben PV-t óriáskígyókból (*Python regius*, *Boa constrictor*) szaporítottak szövettenyészetben sikeresen (Ogawa *et al.*, 1992). Erről a két izolátumról akkor derült ki, hogy ugyanazt a vírust tartalmazza, amikor a teljes genomját sikerült meghatározni, ma is

egyedülként a hüllő-PV-ok közül (Farkas *et al.*, 2004). A másik molekuláris adat, mely jelenleg a GenBankban fellelhető, Hagen üregi viperából származik, SnAdV-2-vel való fertőzöttség mellett (Farkas és Gál, 2009). A részleges szekvencia alapján is feltételezhető, hogy ez a SAAV-tól valószínűleg eltérő fajba sorolható vírus.

A *Dependoparvovirus* (korábban Dependovirus) genusról már korábban feltételezték, hogy Diapsida (hüllő-madár közös ős) eredetű (Zádori *et al.* 1995; Farkas *et al.*, 2004). Erre enged következtetni, hogy eddig kizárólag madarakat fertőző dependoparvovírusokról bizonyosodott be, hogy természetes körülmények között is képesek autonóm replikációra. A SAAV replikációs tulajdonságairól ugyan nincs adat, ám a filogenetikai számítások ezt a vírust hozzák ki a genus legbazálisabb tagjának. Ezen felül egyedül a Diapsida-eredetű dependoparvovírusok transzkripciójának vannak közös jellemzői a genusban előforduló mindkét másik stratégiával. Amennyiben a feltételezés igaz, hüllőkben is elő kell, hogy forduljanak autonóm dependoparvovírusok.

Kételtűekből és halakból még soha nem írtak le PV-os fertőzöttséget.

3. Anyag és módszer

3.1 A vizsgálati minták eredete

A vizsgálati minták túlnyomó többsége egy budapesti, kifejezetten hullókre szakosodott állatkereskedésből származott, ahova az ország és Európa különböző területeiről érkeznek állatok tenyészetekből és magánszemélyektől. Ezen felül még több magánszemély is rendelkezésünkre bocsájtotta elhullott állatait, és vizsgáltunk még – általában járművek által elütött – szabadban, leginkább Észak-Magyarországon begyűjtött állatokat is. A 10 csukaorrú aligátor (*Aligator mississippiensis*) májminta az Egyesült Államokból származott. Ennek eredményeképpen 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 esetében a háromból két rend (*Caudata*, *Anura*) volt képviselve. A minták családonkénti és fajonkénti megoszlását szemlélteti az 1. táblázat.

A teljes genom szinten vizsgált két gyík-AdV-t Papp *et al.* izolálta (2009). Mindkét vírust leguán szív sejtvonalon (IgH-2,118 ATCC: CCL-108) és Russell vipera szív sejtvonalon (VH-2, ATCC: CCL-140) szaporították el. Az izolálást a Hohenheim Egyetemen végezték, Stuttgartban. A két gyík-AdV egyikét már 2004-ben leírták gilából (Wellehan *et al.*, 2004), míg a másikat csak 2008-ban, mexikói viperagyíkokból (Papp *et al.*, 2009). Kezdetben a vírusok a helodermatid adenovirus 1 és 2 nevet kapták, de mivel az egyik vírust más gazdában is ki lehetett mutatni, célszerűbbnek tűnt az általánosabb gyík AdV nevet választani. A későbbiekben tehát a gila-AdV a gyík- (lizard) AdV-1 (LAdV-1), míg a viperagyík-AdV a gyík- (lizard) AdV-2 (LAdV-2) nevet kapta.

3.2 A minták feltárása és DNS-izolálás

A mintákat a laboratórium számára gyűjtötték be, így a hosszas fagyasztóban való tárolás, és esetenként a késői felfedezés miatt fellépő gyakori autolízis egyaránt ellehetetlenítette azok szövettani elemzését. A vizsgálatokhoz az elhullott állatok belső szerveiből (máj, vese, belek, tüdő, gonádok) vontunk ki DNS-t. A mintákból a nukleinsav kivonását két módszerrel is végeztük. A nagyobb termetű állatokból vett mintáknál Dán *et al.* (2003) által leírtakat az alábbiak szerint alkalmaztuk, kis módosítással.

1. táblázat A vizsgált hüllő- és kétéltűminták megoszlása fajonként és családonként.

A minta eredete	családok száma	fajok száma	minták száma
Hüllők (Reptilia)	22	70	314
Nyakfordító teknősök (Pleurodira)	2	3	17
Nyakrejtő teknősök (Cryptodira)	5	21	98
Gyíkok (Lepidosauria) ¹	10	27	122
Kígyók (Serpentes)	3	17	66
Ásógyíkok (Amphisbaenia)	1	1	1
Krokodilok (Crocodylia)	1	1	10
Kétéltűek (Amphibia)	12	28	207
Farkos kétéltűek (Caudata)	2	5	28
Békák (Anura)	10	23	179

Steril penge és csipesz segítségével kb. 1 g-os darabokat metszettünk ki, melyeket biztonsági zárral ellátott 2 ml-es mikrocentrifuga csövekbe helyeztünk. Ehhez adtunk 1 ml 1x TE puffert (10 mM Trisz-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) és csövenként egy darab, autoklávval sterilizált, rozsdamentes acél golyót. A szervdarabok aprítását a Tissue-lyser LT (Qiagen®, Hilden, Németország) homogenizáló berendezés segítségével végeztük el. Az így kapott szervdörzselékből 100 µl-t 1,5 ml-es mikrocentrifuga csőbe mértünk át, majd hozzáadtunk 10 µl 10%-os Sarcosyl és 4 µl Proteinase K (20 mg/ml) oldatot, és ezt követően egy éjszakán át 55°C-on inkubáltuk. Másnap 300 µl guanidin-hidroklorid (8 M) és 20 µl ammónium acetát (7,5 M) oldat hozzáadása után 1 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk a csöveket, 15 percenként megforgatva. A nukleinsavat jéghideg (-20°C) abszolút etanol hozzáadásával csaptuk ki, és ezt követően 12 percen keresztül centrifugáltuk Eppendorf 5417C típusú centrifugában 13,000 rpm-en (17.900x g). A felülúszó leöntése után a keletkezett csapadékot jéghideg 70%-os etanollal mostuk, majd az előbbi beállítások szerint 5 percig újra centrifugáltuk. A megmaradt csapadékot rövid szárítás után 50 µl steril Milli-Q vízben szuszpendáltuk.

A kistermetű állatok (pl. kisebb nappali gekkók, törpegekkók és nyílméregbékák) mintáinál a DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen®, Hilden, Németország) gyári kitet

¹ Lepidosauria egy monofiletikus csoport, mely a modern hüllőket tartalmazza, tehát valójában magába foglalja a kígyókat (Serpentes), az ásógyíkokat (Amphisbaenia) és a hidasgyíkokat (Rhyncocephalia) is. Jelen esetben a könnyebb áttekinthetőség végett az általában „gyík” megnevezéssel illetett állatokat gyűjtöttük össze.

alkalmaztuk, melynek használata a gyártó utasításai szerint történt. A DNS-izoláláshoz két protokollt vettünk igénybe. Az állati szerveknél az „Animal tissue” protokoll szerint jártunk el, míg a sejtfelülűző és ultracentrifugált vírus esetén a „Cell culture” protokollt használtuk.

3.3 Polimeráz láncreakció (PCR)

A PCR-ekhez számos hőstabil DNS-polimeráz enzimet kipróbáltunk. Az 1000 bp méret alatti PCR termék előállításához a Go Taq[®] Flexi DNA Polymerase (Promega[®], Fitchburg, WI, USA), AmpliTaq Gold[®] DNA Polymerase (Life Technologies Corporation[®], Carlsbad, CA, USA) REDTaq[®] ReadyMix[™] (Sigma-Aldrich[®], Saint Louis, MO, USA), Dream Taq[®] DNA Polymerase (ThermoFisher Scientific[®], Waltham, MA, USA) enzimet használtuk. Ha ennél hosszabb PCR terméket vártunk, akkor vagy a Phusion[®] High-Fidelity DNA Polymerase (ThermoFisher Scientific[®], Waltham, MA, USA), vagy a PrimeSTAR[®] Max DNA polymerase (Takara Bio Inc, Kyoto, Japán) enzimet alkalmaztuk. A reakciókat a gyártó utasítása szerint állítottuk össze, mindig 50 µl végtérfogatban (kivéve az AdV és PV genomvégek meghatározásánál, amikor a reakció-térfogatot a felére csökkentettük). A hosszabb és nehezen felerősödő szakaszoknál hozzáadtunk még 0,5-1 µl 50 mM MgCl₂-t is. A minta DNS mennyisége a diagnosztikai vizsgálatok során 2 µl volt, míg a teljes genomanalízisek során 2-5 µl között változtattuk a mennyiségét.

A kész reakciókból 10 µl-t agaróz gélen elektroforézissel vizsgáltunk. Molekulatömeg-kontrollként PstI-gyel emésztett λ fág DNS-t vagy GeneRuler[™] 100 bp DNA Ladder Plus (ThermoFisher Scientific[®], Waltham, MA, USA) markert alkalmaztuk. A DNS-t a gélhez adott GelRed[®] (Biotium Inc, Hayward, CA, USA) vagy etídium-bromid festette meg. A gélekről UV fényen történő megvilágítással készítettünk gélfotókat.

A PCR terméket a további vizsgálatokhoz vagy közvetlenül a reakcióelegyből tisztítottuk, vagy a gélből nyertük ki a specifikus fragmentum UV fény alatt történő kivágása után. A tisztításhoz mindkét esetben a NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up kitet használtuk (Machery-Nagel[®], Düren, Németország).

3.3.1 Diagnosztikai szűrés

Az AdV fertőzöttség megállapításához a Wellehan *et al.*, (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 felsokszorozását, és eddig minden nemzetség kimutatásában sikeresnek bizonyult.

A PV diagnosztikához használt primereket a laboratóriumban terveztük (Pénzes és Benkő, 2014). 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. Az erre fejlesztett PCR (Hanson *et al.*, 2006) azon alapszik, hogy az iridovírusok, poxvírusok, herpeszvírusok, baculovírusok és AdV-ok polimeráza két szakaszon is kellő megőrzöttséget mutat primerek tervezéséhez (Ito és Braithwaite, 1991). Ezenkívül még specifikusan herpeszvírusos fertőzöttséget is vizsgáltunk az említett mintákban, egy szintén erre tervezett, konszenzus PCR rendszerrel (VanDevanter *et al.*, 1996).

3.3.2 További virális gének vizsgálata PCR-rel

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 próbáltuk meg további szakaszok felszorzozását. Ezek egyike a *rep* ORF-ből 250 bp hosszú fragmentumokat erősített fel, míg a másik kb. 400 bp hosszúakat. A PCR programok egyes lépéseit és paramétereit a 2. táblázat foglalja össze. A 3. táblázat a primerek szekvenciáit és T_A értéküket tartalmazza.

2. táblázat Az 1000 bp hossz alatti PCR termékek felerősítése során használt PCR program. A primerek tapadási hőmérséklete szerint változtattuk a csillaggal jelölt annelációs hőmérsékletet.

94°C	5 perc		Kezdeti denaturáció
94°C	0,5-1 perc	} 45 ciklus	Denaturáció
46°C*	1 perc		Primer tapadás
72°C	1 perc		Szintézis
72°C	3 perc		Végső szintézis

3. táblázat A szűrés során pozitívnak talált mintákban lévő vírusok további vizsgálatára használt degenerált, konszenzus primerek szekvenciája. Az egyes pozíciókban lévő alternatív nukleotidokat az IUPAC által ajánlott nevezéktan szerint jelöltük. A narancssárga háttérű primereket PV-ok esetén alkalmaztuk, míg a csillaggal jelölt p32K gén csak az *Atadenovirus* nemzetségben van jelen az *Adenoviridae* családon belül.

Gén neve	Primerpár szekvenciája (forward – reverse sorrendben)	PCR termék mérete (bp)	T _A (°C)
p32K*	5'-GAANCCNGGGTCRTANGTRATYTG-3' 5'-GACGGNGARGCNGAYMRAGA-3'	~250	43
Iva2	5'-TGGRAAGCDCADTGYRYDGAAGG-3' 5'-TCYTTWATRTHCCTCTRTC-3'	~300	41
pentonbázis (rövid)	5'-CARVTNTAYTGGTCDHTBCCW-3' 5'-CCGTGATCTGYAAYADARGGDAYAT-3'	~200	38
pentonbázis (hosszú)	5'-GCWYCHCTRCAAGAYACMAC-3' 5'-CCGTGATCTGYAAYADARGGDAYAT-3'	~1000	44
pentonbázis – pVI (teljes pVII és pX ORF szekvencia kinyerése)	5'-AATRTNCCYHTGTTGCAGATCACG-3' - 5'-CCRCARTGSGGNGCTARKC-3'	~1000	46
hexon	5'-ADAATGAHGGDTAYGARGARG-3' 5'-TCCATNAYATCHARDGACCA-3'	~400	38
100K	5'-TGGCARACNGCMATGGAYAT-3' 5'-TTRTARCADGGCATKCKKTGNGG-3'	~500	43
<i>rep</i> (1)	5'-GTDAAYTGGACYAAYGMRAAC-3' 5'-AACATNCKBTCYTSYARNGG-3'	~250	39
<i>rep</i> (2)	5'-TGTGTCARGTMTWTGATGGKAA-3' 5'-CAATTCAGGRTAACATTCNRWACA-3'	~400	43

3.3.3 Teljes genom-analízis

A két LAdV genom szekvenálását németországi kutatókkal együttműködve végeztük, míg a két nyílméreg-béka-AdV és hullő-PV-ok szekvenálása kizárólag a laboratóriumunkban folyt. A fent leírt, különböző adenovirális génekre tervezett degenerált primereket használtuk a kezdeti, rövid szekvenciák kinyeréséhez, míg a PV-oknál először felerősítettük a 250 bázis hosszú szekvenciát a *rep* ORF-ből. Specifikus primereket tervezve erősítettük fel a már szekvenált fragmentumok között lévő, hosszabb szakaszokat. A használt programot a 4. táblázat szemlélteti, ahol az elongációs időt és a primerek tapadásának hőmérsékletét a várt termék hossza és az oligók tapadási hőmérséklete függvényében változtattuk. A specifikus oligókat a Primer 2.0 programmal terveztük. Egyes esetekben egykarú PCR-t is használtunk, a genom szélein lévő szekvenciák felerősítéséhez. A tisztított, rendszerint plazmidba ligált DNS fragmentumok szekvenciáját ún. *primer walking* eljárással határoztuk meg, általában mindkét oldalról. Az AdV genom legvégének nukleotid-sorrendjét terminális-transzferáz enzim alkalmazásával határoztuk meg 5'/3' RACE kit (Roche®, Basel, Svájc) használatával. A reakció során a genom végére „poli-A” farok épül. Ezután olyan PCR-t

végeztünk, amelyben az egyik primer oligo dT, a másik (kifelé irányuló) primer pedig specifikus a vírusra. A PCR ciklusainak számát, a kezdeti denaturáció idejét és a 2 µl 20mM MgCl₂-ot is tartalmazó reakcióelegy térfogatát a felére csökkentettük.

4. táblázat A hosszabb DNS szakaszok felerősítésére alkalmazott Phusion polimeráz enzimmel végzett PCR program.. Az elongációs időt a várt termék hosszától, a tapadási hőmérsékletet a primerek G+C arányától függően állítottuk be. A zárójeles értékek a genomvégek felsokszorozásához használt beállításokat jelenítik meg.

98°C (94°C)	5 perc		Kezdeti denaturáció
98°C (95°C)	0,5 perc	} 44 (25) ciklus	Denaturáció
38-60°C	1 perc		Primer tapadás (kihagyva)
72°C (68°C)	1-8 perc		Szintézis
72°C (68°C)	10 perc (2 perc)		Végso szintézis

3.3.4 A parvovírus végfragmentumok meghatározása PCR-rel

A PV ITR-ek szekvenciáinak meghatározásához a genom végére az 5' végen foszforilált adaptor szekvenciákat ligáltunk T4 RNS ligáz enzimmel (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). A genom 1200. pozíciójába terveztük a specifikus reverz primert, míg a 3111.-be a specifikus „forward” oligót. Mindkét primer tartalmazott ClaI hasítási helyet. Ezt követően –mindkét végen egymástól függetlenül – PCR-t futtattunk le, ahol a másik primer az adapterre tervezett reverz komplementer volt. A reakcióelegy tartalmazott GC enhancert és – a gyári pufferben megtalálható MgCl₂ megkötése miatt – 3 µl 2 mM-os EDTA-t is. A PCR termékeket pGEMt easy (Promega®, Fitchburg, WI, USA) vektorba klónoztuk be, majd az insert méretét a plazmid ClaI-PstI enzimes emésztésével ellenőriztük. A plazmidot SURE 2 (Stratagene®, LaJolla, CA, USA) kompetens *E. coli* törzsbe elektroporációval juttattuk be. A leghosszabb inzerteket a plazmidra specifikus primerekkel szekvenáltuk. A hajtűre tervezett flip- és flop helyzetre specifikus primerekkel PCR-t végezve meghatároztuk a még hiányzó szakaszokat. A másodlagos szerkezet megjelenítésére az mFold nevű programot használtuk (Zuker, 2003).

3.4 Molekuláris klónozás

Előfordult, hogy a PCR termék felerősítésében csak az egyik primer (nem specifikusan, a komplementer DNS szádra is tapadva) vett részt. Az ilyen terméket csak molekuláris klónozás után lehetett szekvenálni. Hasonlóképpen klónozni kellett a hosszabb genomszakaszokat is, mivel az ilyen PCR termékek minősége sokszor nem tette lehetővé a szekvenálást. A harmadik eset, amikor molekuláris klónozást alkalmaztunk, egyazon minta több genotípusú vírussal való szimultán fertőzöttsége volt.

A klónozásokat a CloneJET™ PCR Cloning Kit (ThermoFisher Scientific®, Waltham, MA, USA) használatával hajtottuk végre, a gyártó utasításai szerint. Kompetens sejtként *E. coli* TOP10® (iNtRON Biotechnology, Szöul, Dél-Korea) baktériumtörzset használtuk, a plazmidot hősokkos transzformációval juttattuk be ligálás után. A plazmid tisztítása a QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen®, Hilden, Németország) segítségével történt, a gyártó utasításait követve. A klónozott fragmentumok szekvenálásához a klónozó kit által biztosított primereket használtuk.

3.5 DNS szekvenálás

A nukleotid-sorrend meghatározását a BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems/Life Technologies Corporation®, Carlsbad, CA, USA) használatával végeztük, a gyártó utasításaihoz képest csökkentett térfogatban, ami a tisztított DNS töménységétől függően 5 vagy 10 µl volt. A termékek szekvenciáját mindkét szálon meghatároztuk a megfelelő PCR primerek alkalmazásával. A kész reakciókat automata DNS szekvenálón történő elektroforézisre postán küldtük el a szolgáltató laboratóriumba, ahonnan e-mailben kaptuk vissza az elektroforetogramot.

3.6 Az adatok elemzése

A nukleotid-szekvenciákat a BioEdit 7.2.5 programmal jelenítettük meg, valamint a Staden programcsomag (Staden *et al.*, 1998) Gap4 programjával illesztettük össze és javítottuk szükség szerint. Az újonnan meghatározott szekvenciák specificitását, vagyis azt, hogy azok valóban a PCR során célzott génből származnak, a BLAST homológia kereső programok on-line használatával erősítettük meg (Altschul *et al.*, 1990). Hasonló célokra használtuk még a BioEdit „local BLAST” funkcióját is saját, még nem közölt szekvenciákat tartalmazó adatbázisunkkal szemben futtatva.

A hosszabb genom-szekvenciák annotálását vagy a JavaScript DNA Translator 1.1 interneten elérhető program használatával végeztük el (Perry, 2002), vagy az Artemis Genome Browser ingyenes software-t alkalmaztuk (Rutherford *et al.*, 2000). A splice donor

és akceptor helyeket vagy manuálisan, vagy pedig a Neural Network Splice Site Prediction program segítségével kerestük (Reese *et al.*, 1997). A manuális keresés alapján feltételezett poliadenilációs szignálok validitását a Soft Berry POLYAH program használatával ellenőriztük (Salamov és Solovyev, 1997). Az azonosított fehérjék származtatott as sorrendjében a különböző funkcionális motívumokat és szignálszekvenciákat a SMART programmal vizsgáltuk (Schultz *et al.*, 1998).

A többszörös pozícionális illesztések (multiple alignment) létrehozásához többféle programot is igénybe vettünk. Ezek között szerepelt a MultAlin (Corpet, 1988), a Tcoffee (Notredame *et al.*, 2000) és a Clustal X 2.1-es verziója (Larkin *et al.*, 2007). Az alignmentek árnyékolását a BoxShade (http://embnet.vital-it.ch/software/BOX_form.html) programmal végeztük.

A filogenetikai számításokat – a meglehetősen hosszú távú evolúció vizsgálata miatt – kizárólag as alapon végeztük. A modellszelekciót a ProtTest programmal hajtottuk végre (Darriba *et al.*, 2011) és a PHYLIP v3.696 (Felsenstein, 1989) 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 internetes platform PhyML3 programjával végeztük el (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>, Guindon *et al.*, 2010). Nem végeztünk bootstrap analízist a DNS-polimeráz rövid fragmentuma alapján számolt fa esetében, itt ugyanis – a szekvenciák rövidege és konzervatív as sorrendje miatt – ez a módszer jellegéből adódóan adatvesztéssel járt volna. Mivel a pVII meglehetősen változékony fehérje, amit a gamma eloszlás α paraméterének magas értéke is alátámaszt ($\alpha=2,08$), így ennek a fának sem végeztük el a bootstrapes tesztelését, mivel az a topológia torzítását eredményezte volna. A kész törzsfákat a FigTree v1.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) programmal jelenítettük meg és szerkesztettük.

4. Eredmények

4.1 Adenovírusok

4.1.1 PCR-es szűrés

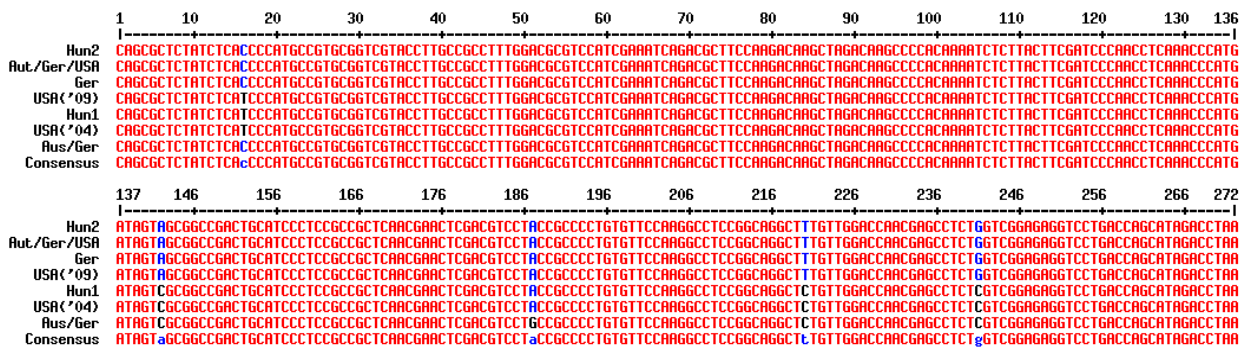
Az AdV-os fertőzöttségre vizsgált 314 hulló mintából 41-et találtunk pozitívnak, ami 13,05%-os prevalenciának felelt meg. Ez 6 féle AdV kimutatását jelentette, melyek közül 3 új, a tudomány számára eddig ismeretlen vírus. A 207 kételtű minta között viszont csupán 7, azaz a vizsgáltak mindössze 3,38%-a volt pozitív. Egy eddig ismeretlen AdV két változatát mutattuk ki. A konszenzus, nested PCR alkalmas módszernek bizonyult a kb. 300 bp méretű fragmentum felerősítésére a DNS-polimeráz génből. Primerek nélkül a termékek 272-278 bp hosszúnak bizonyultak. A pozitív minták gazdafaj szerinti pontos megoszlását szemlélteti az 5. táblázat.

5. táblázat Adenovírusra pozitív minták gazda szerinti megoszlása.

Faj neve	Megvizsgált minták száma	Pozitívok száma	Százalékos fertőzöttség
Hüllők	314	41	13,1%
Szakállas agáma (<i>Pogona vitticeps</i>)	9	8	88,9%
Rövidfarkú törpekaméleon (<i>Rampholeon brevicaudatus</i>)	26	23	88,5%
Hosszúfarkú fűgyík (<i>Takydromus sexlineatus</i>)	3	2	66,7%
Fehértorkú varánusz (<i>Varanus albigularis</i>)	2	1	50%
Közönséges óriáskígyó (<i>Boa constrictor</i>)	7	2	28,6%
Vörös királysikló (<i>Lampropeltis triangulum sinaloae</i>)	3	1	33,3%
Vízisikló (<i>Natrix natrix</i>)	9	1	11,1%
Gabonasikló (<i>Pantherophis guttatus</i>)	4	2	50%
Patkánysikló (<i>Pantherophis obsoletus</i>)	3	1	33,3%
Kételtűek	207	7	3,4%
<i>Dendrobates auratus</i>	14	3	21,4%
<i>Phyllobates vittatus</i>	19	4	21,1%

A vizsgált 9 szakállas agáma mintából 8-ban találtunk AdV-t. Az első 4 pozitív minta mind 2 hónaposnál fiatalabb állatokból származott, melyeknél az elhullást megelőzően étvágytalanságot, vedlési rendellenességet (disecdysis), valamint a mozgást és táplálkozást

egyaránt ellehetetlenítő idegrendszeri tüneteket (opisthotonus), figyeltek meg. Mind a négy állatból nt szinten is megegyező DNS-polimeráz szekvenciákat mutattunk ki, melyek megegyeztek az Egyesült Államokban először, 2004-ben kimutatott agamid AdV 1 (AgAdV-1) szekvenciájával (Wellehan *et al.*, 2004). A másik négy pozitív minta felnőtt állatokból származott, melyek általánosan rossz kondícióban voltak. Súlyos disecdysis, anorexia, dehidrátság és a karmok rendellenes kopása, alkalmanként teljes leválása jellemezte állapotukat. Mind a négy állatból kimutatott, nt szinten is azonos polimeráz szekvenciák azonban egy as különbséget mutattak a másik négy pozitív mintából származó szekvenciákkal. A GenBank-i adatokkal végzett összehasonlítás után kiderült, hogy ugyanezt a nt sorrendű AgAdV-1-et eddig Ausztriában (Küpper-Heiss *et al.*, 2005), az Egyesült Államokban (Parkin *et al.*, 2009) és Németországban (Papp *et al.*, 2009) írták le. Az eddigi AgAdV-1 típusokat és azok összehasonlítását az általunk kimutatott szekvenciákkal a 3. ábra mutatja be.



3. ábra Az agamid adenovirus 1 összes, eddig megfigyelt genotípusa a DNS-polimeráz gén PCR-rel felerősített 272 bp méretű szakaszán. Az Ausztráliából származó szekvencia kivételével, amit egy ausztrál agáma fajtából, a *Ctenophorus nuchalis*-ból mutattak ki (Hyndman és Shilton, 2011), mind belföldi szakállas agámából (*Pogona vitticeps*) származik. A két, általunk kimutatott szekvenciát (Hun 1 és 2) korábban az Egyesült Államokban, Ausztriában, Ausztráliában és Németországban azonosították. A nukleotid szintű változékonyság aminosav szinten csupán két pozícióban mutatkozik meg. Rövidítések: Aus – Ausztrália, Aut – Ausztria, Ger – Németország.

A másik állatfaj, amelynek egyedei között ebben a vizsgálatban szintén 90%-ot megközelítő AdV pozitivitást találtunk, szintén az Iguana kládba tartozó gyíkfaj, nevezetesen a rövidfarkú törpekaméleon (*Rampholeon brevicaudatus*) volt. A kaméleonokban kimutatott szekvencia egy új, eddig nem közölt AdV jelenlétére utal. A 23 alkalommal kimutatott AdV génfragmentum as szinten teljesen azonos volt, ám nt szinten 4 pozícióban is találtunk eltéréseket. Ezek alapján a törpekaméleon-AdV-nak (pygmy chameleon AdV-1, azaz a továbbiakban PCAdV) 5 genotípusa különíthető el, melyek megoszlását és a variábilis pozíciókat a 4. ábra szemlélteti. Az új vírus ezen a rövid szakaszon as szinten a leopárdgekkő eublepharid AdV-1-re hasonlít a legjobban (73%-ban azonosak) (Wellehan *et al.*, 2004).

```

      40           56     224                               264
`1'  CATTGGTCCAGCAAAG...CGAATGAGCTCAAAGTGCTTCCCCAGGGGCATCGGATGGGAGA (6)
`2'  CATTGGTCCAACAAAG...CGAATGAGCTCAAAGTGCTTCCCCAGGGGCATCGGATGGGAGA (4)
`3'  CATTGGTCCAGCAAAG...CGAATGAGCTCAAAGTGCTTCCCCAGGGGCATCGGATGGGAGA (3)
`4'  CATTGGTCCAACAAAG...CGAATGAGCTTAAAGTGCTTCCCCAGGGGCATCGGATGGGAGA (2)
`5'  CATTGGTCCAGCAAAG...CGAATGAGCTCAAAGTGCTTCCCCAAGGCATCGGATGGGAGA (8)

```

4. ábra A rövidfarkú törpekaméleon (*Rampholeon brevicaudatus*) 23 mintájából is kimutatott új AdV 5 féle DNS-polimeráz génrészletének szekvenciája. Az eltérések sárga színnel vannak kiemelve, a sorok végén szereplő számok pedig a genotípus gyakoriságát jelentik. A különbségek aminosav szinten nem okoztak eltérést.

A *Scleroglossa* kládba tartozó fajok egyedeiben is kimutattunk AdV-t több alkalommal is. Gyíkokban további két, a tudomány számára új AdV-t sikerült felfedeznünk. Ezek közül az egyik két hosszúfarkú fűgyík (*Takydromus sexlineatus*) mintájából származott. A vírusra a továbbiakban GLAdV – azaz grass lizard AdV – néven hivatkozom. Ez az első alkalom, hogy AdV-os fertőzöttséget írnak le egy Lacertidae (nyakörvös gyíkok) családba tartozó fajból. A BLAST alapján a GenBankban az anolisz AdV-3 (Ball *et al.*, 2014) egyezett meg vele a legnagyobb mértékben, 78%-ban. A másik, szintén újonnan kimutatott vírus egy fehértorkú varánusz (*Varanus albigularis*) mintájából származott (továbbiakban varanid AdV-2 – VAdV-2). A legtöbb egyezést a Németországban korábban kimutatott varanid AdV-1-gyel (Papp *et al.*, 2009) való összehasonlítás eredményezte (76%).

Kígyókban AdV-t összesen 7 alkalommal mutattunk ki, de ezek mindegyike már korábban ismert vírus volt. A már teljes genomsekvencia szinten is jellemzett SnAdV-1-et (Farkas *et al.*, 2008) 6 alkalommal azonosítottuk. Közöséges óriáskígyók két mintájában is kimutattunk SnAdV-1-et, azonban az egyik minta még további három, as szinten is különböző variánsát is tartalmazta a vírusnak. Ezek közül kettő két (különböző) as-ban, a harmadik pedig három as-ban tért el a GenBanki típustól. Az összesen négy különböző genotípussal fertőzött egyed nem volt idősebb két hónaposnál, és májában idült, elfajulással járó folyamat jeleit figyeltük meg (5. ábra). A másik, szintén SnAdV-1-gyel fertőzött fiatal boa mája is eltért az egészségestől, heveny gyulladás jeleit (oedema és vérbőség) mutatta (5. ábra). A SnAdV-1 GenBank-i típusát kimutattuk még két gabonasiklóban (*Pantherophis guttatus*), egy patkánysiklóban (*Pantherophis obsoletus*) és egy hazai vízisiklóban (*Natrix natrix*) is. Ez utóbbit a Lázberci Tájvédelmi Körzet területén ütötték el, így ez az első olyan hazai adat hullők AdV-os fertőzöttségére vonatkozólag, melyet vadon élő állatból mutattak ki. Akárcsak a vízisikló, a patkánysikló is egy új gazdafajnak számít a SnAdV-1 gazdaspektrumában. A SnAdV-2-t, melyet előttünk több alkalommal is megtaláltak különböző kígyófajokban (Farkas és Gál, 2008; Garner *et al.*, 2008; Papp *et al.*, 2009) mi is kimutattuk egy vörös királysikló mintájából (*Lampropeltis triangulum sinaloae*).



5. ábra Az 1-es típusú kígyó-adenovírussal (SnAdV-1) fertőzött, két közönséges óriáskígyó (*Boa constrictor*) boncolásakor készült fényképek. A bal oldalon látható állatban a SnAdV-1 négyféle variánsát (genotípusát) mutattuk ki. A máj sárgásbarna színű, tömör tapintatú, törékeny volt (idült májelfajulásra utaló jelek). A másik állatban a máj duzzadt, ödémás és bővérű volt (heveny májgyulladásra utaló kórbonctani elváltozások).

A kétéltűek között az összes pozitív eredmény nyílméreg békákból származott, melyek tömegesen pusztultak egy budapesti állatkereskedésben, ahová több, különböző forrásból kerültek. Noha összesen 10 különböző Dendrobatidae fajból voltak mintáink, kizárólag kettőben, a *Dendrobates auratus*-ban és a *Phyllobates vittatus*-ban mutattunk ki AdV fertőzöttséget. Egy teljesen új, 1973 óta csupán a második, kétéltűeket fertőző AdV-t mutattunk ki, melynek két, egymástól 3 as-ban különböző típusát különböztettük meg. Az 1-es típust 6 mintából, két *D. auratus*-ból és négy *P. vittatus*-ból, a 2-es típust csupán egy *D. auratus* mintájából azonosítottuk. A vírusra a továbbiakban a békák 2-es típusú AdV-aként, azaz FrAdV-2-ként hivatkozunk (frog AdV-2). A BLAST homológia keresés során a legnagyobb azonosságot az anolisz AdV-2-vel kaptuk, mely csupán 63% volt (Ascher *et al.*, 2013). További, 60% feletti azonossági értékeket kizárólag nem hüllő eredetű atadenovírusokkal (BAdV-6, OAdV-7) kaptunk.

A BLAST keresések egyúttal azt is felfedték, hogy minden vírus, amivel ebben a munkában foglalkoztunk, az *Atadenovirus* genus tagja lehet.

4.1.2 Részleges genomanalízis; az újonnan kimutatott adenovírusok további génjeinek vizsgálata

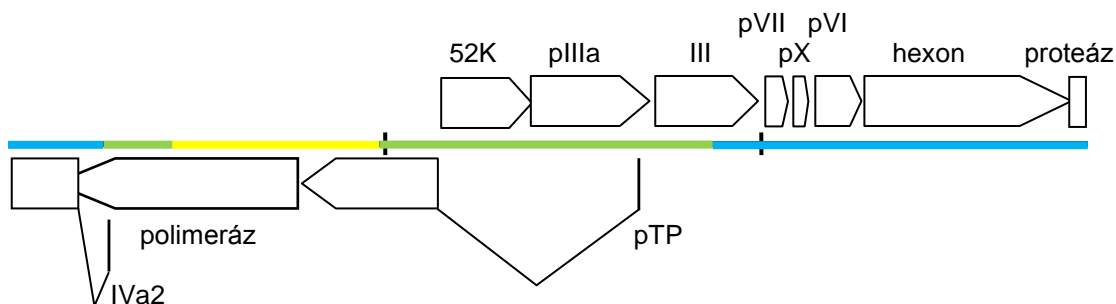
Az előző fejezetben bemutatott összes új, valamint a régebben már kimutatott, de új genotípussal rendelkező AdV genomjából egyaránt megpróbáltunk további szakaszokat is felerősíteni az evolúciós viszonyok részletesebb vizsgálata végett. Ehhez az Anyag és módszer című fejezetben leírt degenerált oligókat vettük igénybe. A 6. táblázat összefoglaló áttekintést ad e kísérletek eredményeiről.

Az *Adenoviridae* családra általánosan jellemző gének közül a pentonalapra és a pVI-ra tervezett primerpár segítségével minden új AdV-ből sikerült felerősíteni a teljes pVII és pX géneket. Mind a két fehérje szekvenciában megvizsgáltuk és azonosítottuk a proteáz vágási helyeket. A pVII fehérje második, genusonként nagyfokú megőrzöttséget mutató hasítási szignálja nem volt egységes az általunk vizsgált vírusokban. A PCAdV 3-as variánsából és a VAdV-2-ből majdnem a teljes pentonbázis gént is sikerült kinyerni, mivel itt a hosszabb fragmentumot felerősítő primer is működött. Ez a PCAdV 3-as variánsából egy 1160 bp hosszú szakaszt eredményezett, míg a VAdV-2 esetén összeért a penton–pVI primerek termékével. Az *Atadenovirus* nemzetségre specifikus p32K génből is meghatároztunk egy 261 bp hosszú fragmentumot a PCAdV 2-es genotípusából, míg 217 bp-t a GLAdV-ből.

A FrAdV-2 1-es variánsából 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 teljes annotációja látható a 6. ábrán. A szekvencia összesen 9 teljes, és 2 részleges feltételezett gént tartalmaz, G+C tartalma pedig 36,63%. Megállapítottuk, hogy az V-ös szerkezeti protein génje itt hiányzik. Az egyes gének között a távolság nagyon rövid, olyannyira, hogy 3 helyen át is fednek egymással. Splicing helyet a IVa2 és pTP génekben fedtünk fel. Proteolitikus hasítási helyeket állapítottunk meg a pIIIa, pVII, pX és pVI fehérjék aminosav szekvenciájában.

6. táblázat Az újonnan kimutatott, de nem izolált adenovírusokból eddig meghatározott genomszekvenciák összesítő táblázata. A p32K és a 100K génje közötti genomszakaszon található gének közül a + jellel jelölteknek a teljes, míg az R-rel jelölteknek csak részleges szekvenciáját sikerült kinyerni. A vírusok neve illetve gazda eredete után, zárójelben látható szám az adott vírusból nyert összesített szekvencia méretét mutatja bázispárban.

	p32K	LH1-3	IVa2	pol	pTP	52K	pIIIa	III	pVII	pX	pVI	hex	pr.	DBP	100K
AgAdV-1 (1588)				R				R	+	+	R	R			
GLAdV (1448)	R			R				R	+	+	R				
PCAdV/1 (1093)				R				R	+	+	R				
PCAdV/2 (1851)	R			R				R	+	+	R				
PCAdV/3 (1432)				R				R							
SnAdV-1 (boa) (1073)				R				R	+	+	R				
SnAdV-1 (gabonas.) (1073)				R				R	+	+	R				
SnAdV-2 (272)				R											
VAdV-2 (4699)				R				R	+	+	+	R			R
FrAdV-2/1 (8161)				R	+	+	+	R							
FrAdV-2/2 (12033)			R	R	R	+	+	+	+	+	+	+	R		R



6. ábra A 2-es típusú béka-adenovírus (FrAdV-2) két genetikai variánsából a IVa2 és a proteáz gén közötti genomszakaszból nyert szekvenciák egyesítése alapján összeállított részleges genomterkép sematikus rajza. A függőleges vonalak 5000 bp méretű szakaszokat jeleznek. A két genotípus átlagban 99,4%-os nukleotid-sorrend azonosságot mutatott. A vízszintes vonal színe a szekvencia eredetére utal. Sárga színű az 1-es variánsból, kék a 2-es genetikai változatból, míg zöld a mindkét vírusból kinyert szekvenciájú genomrészlet jelölése. A nyilak mérete az egyes gének hosszával arányos. A feltételezett splicing helyek a szokásos módon jelölve.

4.1.3 A két izolált gyík adenovírus teljes genomjának vizsgálata

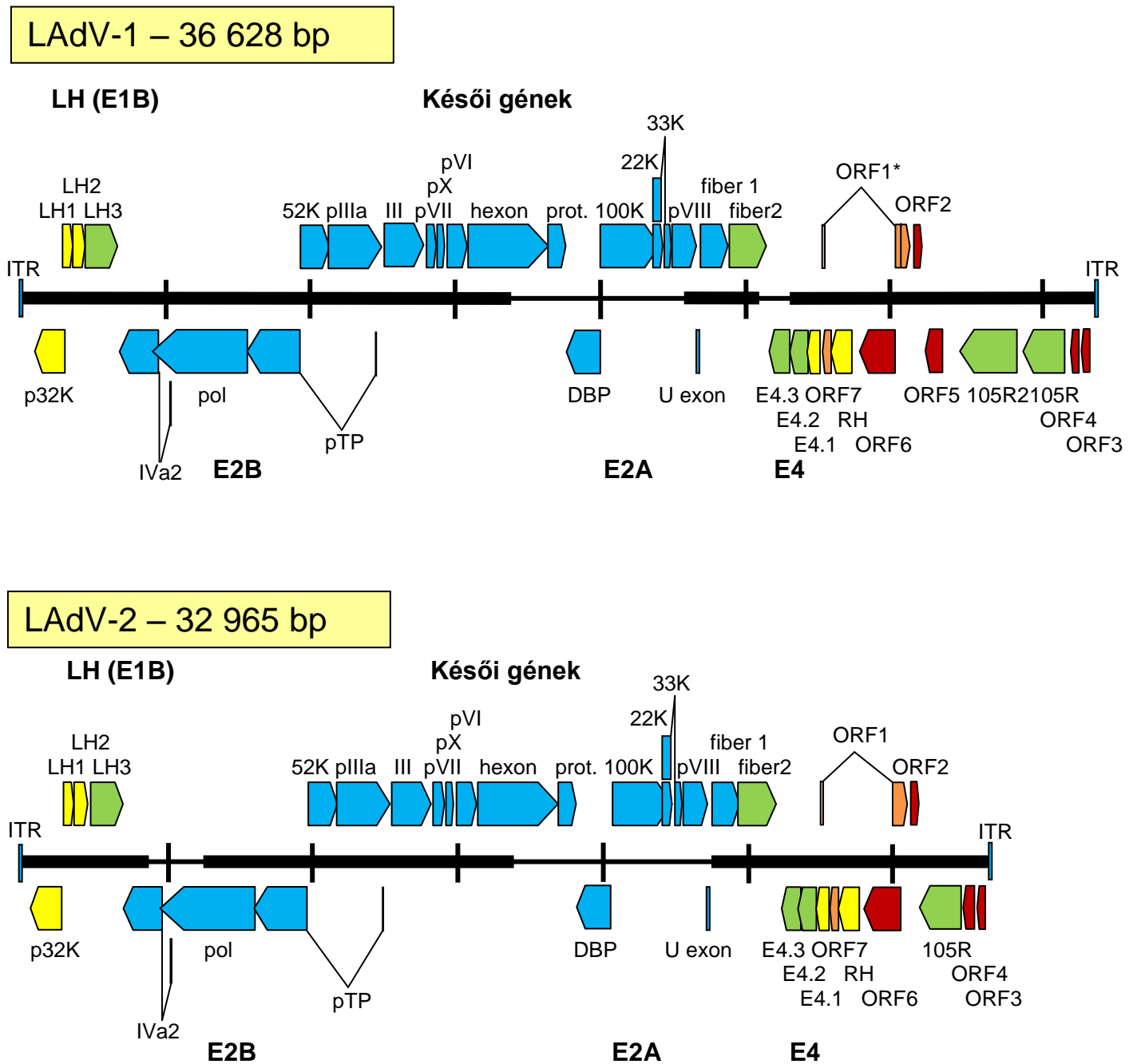
A két Németországban izolált gyík-AdV teljes genomját – beleértve az ITR-eket is – meghatároztuk (7. ábra). A két vírus hossza eltér, 36 628 bp a LAdV-1 és 32 965 bp a LAdV-2 esetén. A teljes genom G+C tartalma 43,99% (LAdV-1) és 44,16% (LAdV-2) volt. Az ITR-ek hossza 125 ill. 126 bp. Az egyes gének közötti távolság meglehetősen rövid, a LAdV-1-ben 5, a LAdV-2-ben pedig mindössze 4 alkalommal haladja meg az 50 bp-nyi távolságot, és 12 valamint 11 esetben át is fednek egymással.

Mindkét genom legelső génje az *I* szálon az *Atadenovirus* nemzetségre specifikus p32K. Azonosítottuk a szintén genus specifikus 3 LH gént is az *r* szálon. A genomok

középső régiója a családra jellemző szerveződést mutat. Az E2B régió génjei közül splicingot figyeltünk meg a IVa2 és pTP esetében, valamint az U-exonban, melynek csak a donor helyét sikerült azonosítani. A prekursor fehérjék as szekvenciájában megkerestük és megvizsgáltuk a proteáz vágási helyeket. A konzervatív régióban mindkét vírusban két fiber gént is azonosítottunk, ami eddig nem látott tulajdonság az *Atadenovirus* nemzetségen belül. Hasonlóan azonban a genus többi tagjához az V-ös és IX-es szerkezeti fehérjék génjével homológ ORF-et nem sikerült egyik genomban sem kimutatni. Nem találtunk az E3 régióval homológ genomszakaszt sem. Az *I* szálon viszont – a többi atadenovírushoz hasonlóan – az E4 régióban három E4 ORF-et is azonosítottunk. A két genom fehérjéit hasonlítja össze egy hüllő- és egy nem hüllő-, valamint az újonnan kimutatott béka atadenovírussal a 7. táblázat.

Az E4 régiót követő genomszakasz bizonyult mindkét vírusban a legvariábilisabbnak. A régió szerveződésének összehasonlítása a többi atadenovíruséval a 8. ábrán tekinthető meg. 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 atadenovírustól, csupán egyetlen RH gént azonosítottunk mindkét genomban (8. ábra). Ennek hossza azonban több mint kétszerese volt a SnAdV-1 homológjának, és hasonlóan a nem hüllő eredetű atadenovírusok RH génjeihez, egy ún. F-box motívumot fedeztünk fel benne (Both, 2008). A motívum az N-terminálistól távol, a gén közepén található (9. ábra). Az F-box motívumot megelőző metioninnál szétvágva, a fehérjét két RH-ként kezelve, törzsfa-rekonstrukciót végeztünk a gén evolúciójának részletesebb vizsgálatához (14. ábra). Az ORF as szekvenciájának BLASTp összehasonlítása a GenBank-beli szekvenciákkal is eltérő eredményre vezet; az N-terminális felőli rész 41% azonosságot mutat a BAdV-4 RH1 génjével, míg az F-box motívumtól jobbra eső szakasz 53%-ban egyezik meg a SnAdV-1 RH génjével (mindkét vírusban).

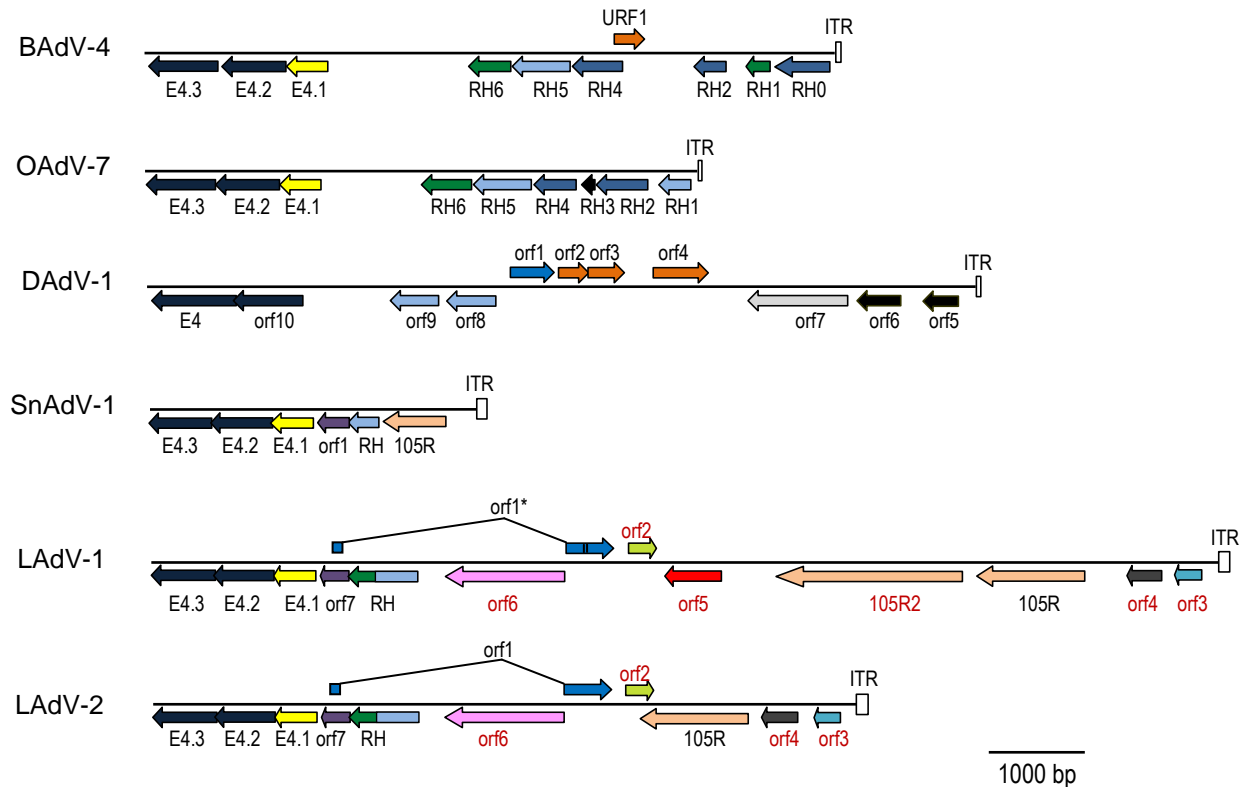
Az E4 régiótól jobbra eső szakaszban található ORF7-nek egyetlen homológjaként a SnAdV-1 ORF1 génjét azonosítottuk. Ugyanez a helyzet az ORF1 génnel, melynek egyetlen homológja a DAdV-1 ORF1 génje. A 105R-nek azonban két homológja is van. Az egyik a SnAdV-1 105R génje, a másik pedig egy mastadenovírus, a mókuscickányok 1-es típusú AdV-ának genomjában található. Itt azonban, az atadenovírusokkal ellentétben nem az *I*, hanem az *r* szálon helyeződik (Schöndorf *et al.*, 2003). A LAdV-1 genomjában a 105R gének két homológja is megtalálható.



7. ábra A két gyík-adenovírus genetikai térképének összehasonlító ábrája. 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 (több, mint 10%-kal) rövidebb, mint a LAdV-1 genomja. Az egyes géneket méretarányosan nyilak jelölik az átíródás irányával megegyező irányultsággal. A kék szín az *Adenoviridae* családban valamennyi tagjában megőrzött géneket jelöli. Zölddel jelöltek az egynél több genusra, míg sárgával az *Atadenovirus* nemzetségre jellemző gének. A narancssárgával jelöltek a genuson belül csak néhány fajban vannak jelen, míg a pirossal jelölt nyilak az új, csak a LAdV-ra jellemző fajspecifikus gének. Az ORF1 gén jelen van mindkét vírusban, azonban a LAdV-1 esetében két stop kodon szakítja meg (függőleges vonal). A pseudogént csillaggal (*) jelöltük. 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 vírus teljes annotációját mi végeztük el.

7. táblázat Az 1-es és 2-es típusú gyík-adenovírus (LAdV-1 és 2) fehérjéinek méretbeli összehasonlítása a 2-es típusú béka-adenovírus (FrAdV-2) általunk meghatározott régiójával, valamint egy hüllő (kígyó-adenovírus 1 – SnAdV-1) és egy nem hüllő (ovín adenovírus-7 – OAdV-7) adenovírus homológ fehérjéivel. A csillaggal (*) jelölt adatok csak részleges génszakaszokból nyert értékek.

Fehérje neve	LAdV-1	LAdV-2	SnAdV-1	FrAdV-2	OAdV-7
p32K	334	335	343	-	286
LH1	119		118	-	120
LH2	133	132	132	-	127
LH3	370		373	-	382
IVa2	447		443	(289*)	446
polimeráz	1075		1085	1085	1071
pTP	606		610	608	641
52K	330		322	346	335
pIIIa	609		615	528	568
pentonbázis (III)	451		450	460	452
pVII	129	128	115	127	111
pX	88		84	67	71
pVI	226		223	208	221
hexon	909		909	923	911
proteáz	201		201	(75*)	201
DBP	389		397	-	382
100K	675		679	-	625
22K	110		180	-	133
33K	180	178	104	-	59
pVIII	278		278	-	218
U exon	57		58	-	54
fiber 1	331		415	-	543
fiber 2	431	433	nincs	-	nincs
E4.3	234	225	217	-	237
E4.2	212		216	-	218
E4.1	148		149	-	142
ORF7 (SnAdV1: ORF1)	101		112	-	nincs
105R	510, 647	471	178	-	nincs



8. ábra Az 1-es és 2-es típusú gyík AdV (LAdV-1, 2) genomjának jobb vége, összehasonlítva a többi ismert atadenovírus homológ régiójával. A nyilak méretarányosak a gének hosszával. A homológ géneket azonos szín jelzi. A LAdV-okra fajspecifikus ORF-ek neve pirossal szedett. A LAdV-1 genomjában található orf1, mely homológ az 1-es típusú kacsza adenovírus (DAdV-1) és a LAdV-2 ORF-1 génjével pseudogén, erre utal a csillag jelölés. A gént megszakító két stop kodont függőleges vonal szemlélteti. További rövidítések feloldása: AdV – adenovírus, B - bovine (szarvasmarha), O - ovine (juh), Sn - snake (kígyó).

2_RH1	MEIYWTE	SKSFREK	WLAGVD	-----	-----	EKCKRCY	TPLCLKE	KAI	--	CCFSCYLN	-----
1_RH1	MEIYWTE	SKSFREK	WLAGVD	-----	-----	EKCKLCY	KPLCLKE	KAI	--	CCFSCYLN	-----
2_RH2	MGHFASL	VALIKR	ILLLLDP	VDIASF	ALAI	PDSLSI	IESILFL	RDN	IKRYS	SPLR	KKNRAL
1_RH2	MGPFASL	VS	LIKKIL	LLLKP	VDVASF	ALAI	PDSLP	IESILFL	RDN	LKRY	SPLR
	*	:	:	*	:	:	*	:	:	*	:
2_RH1	C	----	ENWREN	PLEN	---	CCMCAC	NPLL	LLTMH	PKYAS	CFCE	HHV
1_RH1	C	----	ENWREN	PLEN	---	CCMCAC	NPLL	LLTMH	PKYAS	CFCE	HHV
2_RH2	C	STSR	TQNW	CLKS	R	TKSGH	CLN	CLLN	PGCL	T	IPPE
1_RH2	C	STSR	TQNW	CLKS	R	TKSGH	CLN	CLLN	PGCL	T	IPPE
	*	:	:	*	:	:	*	:	:	*	:

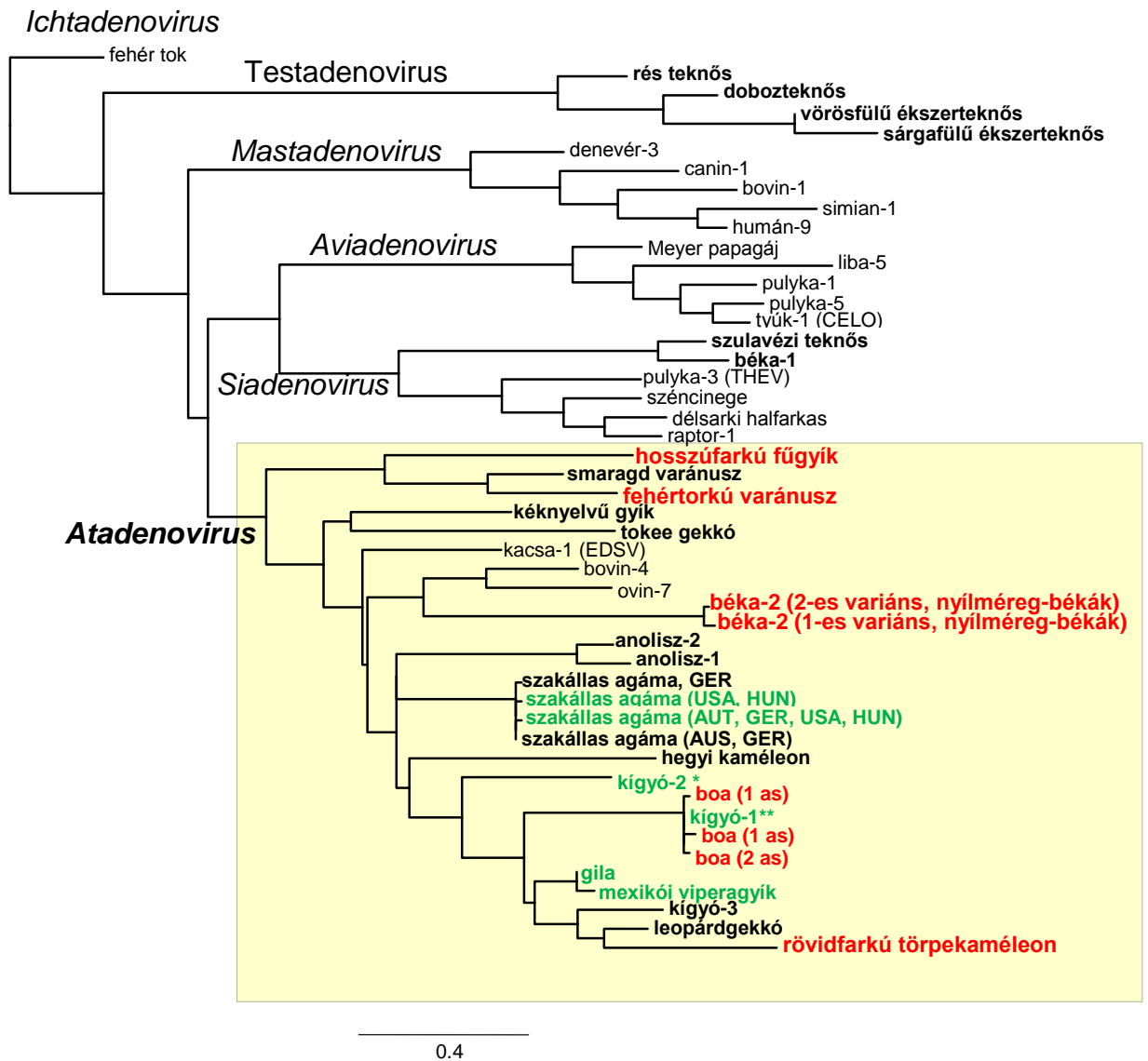
9. ábra A két gyík adenovírus RH génje kétfelé bontva az F-box motívumot megelőző metioninnál, és az így belőlük készített illesztés. Pirossal jelöltük az F-box motívumot, valamint azokat a leucin reziduúkat, melyek a teljes gén N-terminális közelében helyezkednek el. Sárgával jelöltek a megegyező aminosavak, míg a *, :, . különböző megőrzöttség-szinteket jelentenek. Feltételezhető, hogy az átlagosnál jóval hosszabb RH gén valójában két, korábban különálló, RH gén összeolvadásának eredménye.

4.1.4 Filogenetika és G+C tartalom

Törzsfa-rekonstrukciót készítettünk több, különböző tulajdonságú és funkciójú fehérje as szekvenciája alapján az egyes vírusok taxonómiai helyének és evolúciós viszonyainak tisztázása érdekében. Ezek közül 4 fehérje alapján készített fát mutatunk be. A szűrővizsgálat során a DNS-polimerázból meghatározott 90-92 as hosszú szakasz alapján számoltunk törzsfát, mivel ebből állt rendelkezésünkre a legtöbb homológ szekvencia a GenBankból (10. ábra). Egy strukturális fehérje, a pentonbázis szekvenciája alapján is végeztünk törzsfa-rekonstrukciót; a fa alapjául szolgáló, 223 as hosszú szekvencia rendelkezésünkre állt a teljes genom szinten vizsgált két gyík-AdV mellett mindkét új béka-AdV-ből, valamint a VAdV-2-ből, és a PCAdV-ből is (11. ábra). A genus-specifikus p32K gén teljes vagy részleges szekvenciáját 4 új vírusból is sikerült meghatározni. A PCAdV és GLAdV részleges p32K szekvenciájával homológ szakasszal végeztünk törzsfa-rekonstrukciót (71 as), ahol a hullő eredetű atadenovírusok monofiletikus csoportot képeznek a kérődző- vagy madáreredetűekkel szemben (12. ábra). Egy másik szerkezeti fehérje, a pVII teljes as szekvenciája alapján készült a negyedik törzsfa (13. ábra). A teljes ORF-et sikerült meghatározni az összes általunk vizsgált AdV-ből, a SnAdV-2 kivételével. Mind a négy fa megerősíti, hogy minden AdV, mellyel PhD munkám során foglalkoztunk, az *Atadenovirus* nemzetség tagja.

A LAdV-1 és -2 RH génjének mind az előző fejezetben leírt érdekes szerkezete, mind pedig a BLAST alapján kapott eltérő hasonlósági eredmények arra engedtek következtetni, hogy a törzsfa-rekonstrukciókhoz célszerű a teljes as szekvenciát két szakaszra bontani. Ennek eredményét mutatja be a 14. ábra, amelyen jól látható, hogy a két vírus azonos (RH 1-es vagy 2-es) szakasza közelebbi rokona egymásnak, mint a tulajdon első vagy másik felüknek.

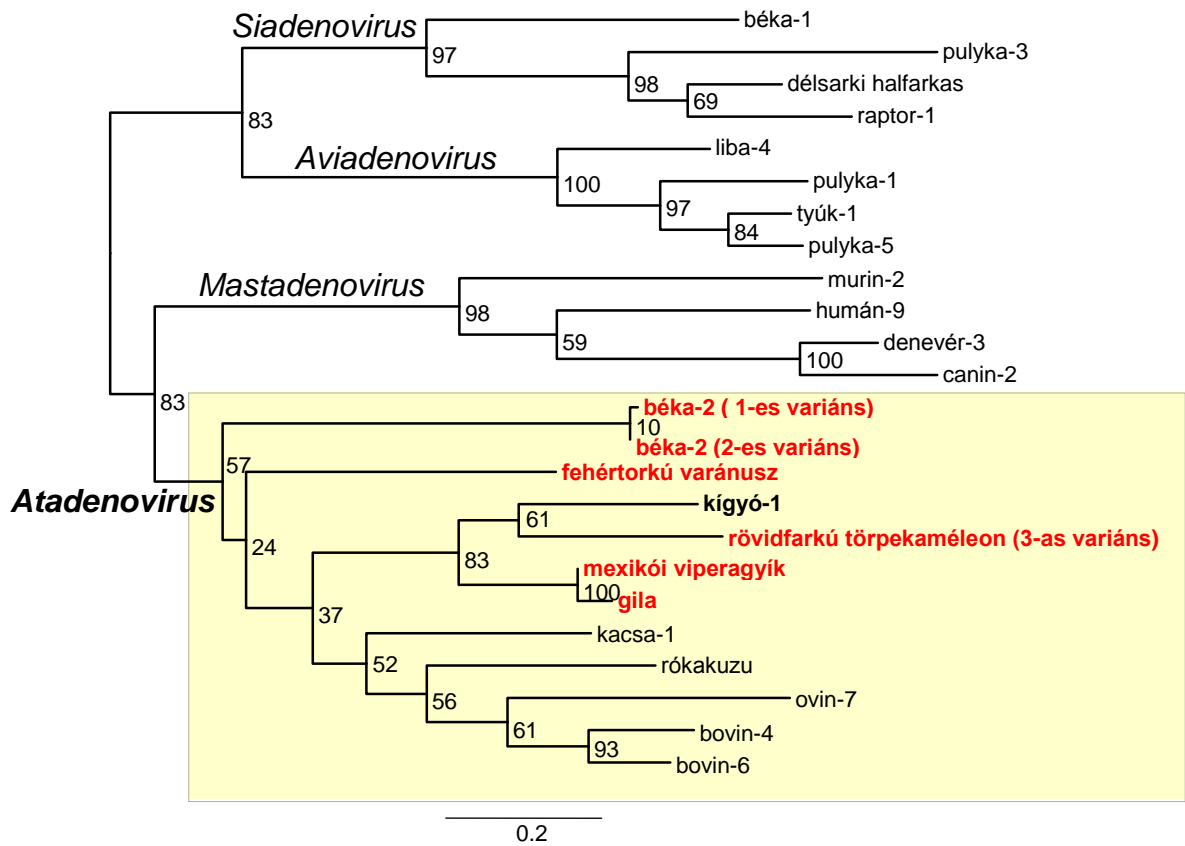
A bázis-összetételt megvizsgáltuk az összes, ebben a tanulmányban szereplő vírus esetében. Két kiválasztott részlet, nevezetesen a részleges DNS-polimeráz és a teljes pVII gén, valamint a teljes, eddig meghatározott genomszekvenciákról ill. teljes genomok G+C tartalmáról ad áttekintést a 8. táblázat. Mind a két gén esetében megfigyelhető, hogy a pikkelyes hullő eredetű atadenovírusok G+C tartalma általában kiegyensúlyozottnak tekinthető, vagy annál magasabb (aláhúzással jelölt értékek), míg a nem hullőből származó atadenovírusokban alacsony a G+C arány (vastagon szedett értékek). Ez utóbbi vírusok között a kacsá-AdV kivételnek számít, ám teljes genomját vizsgálva már igaz rá a tendencia.



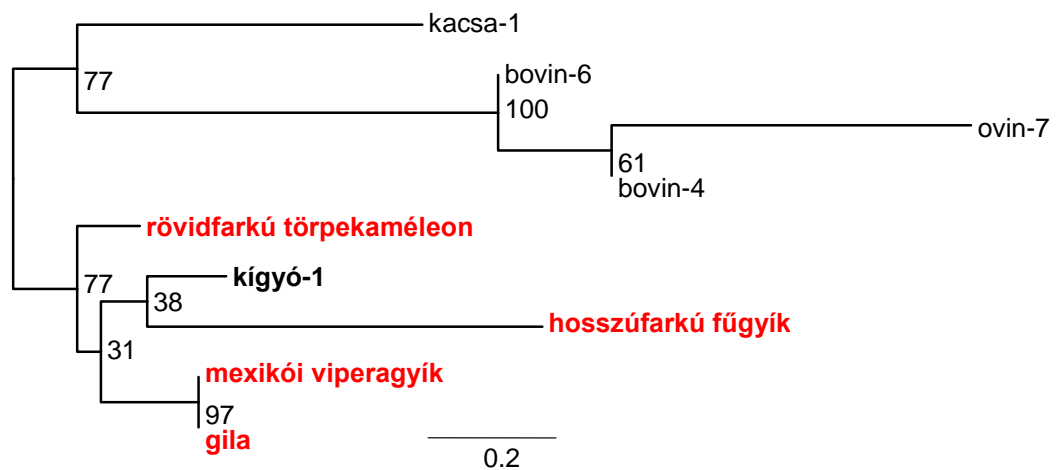
* kaliforniai királysíkló, homoki vipera, Hagen üregi vipera, vörös királysíkló

** közönséges óriás kígyó, királypiton, gabonasíkló, patkánysíkló, vizisíkló

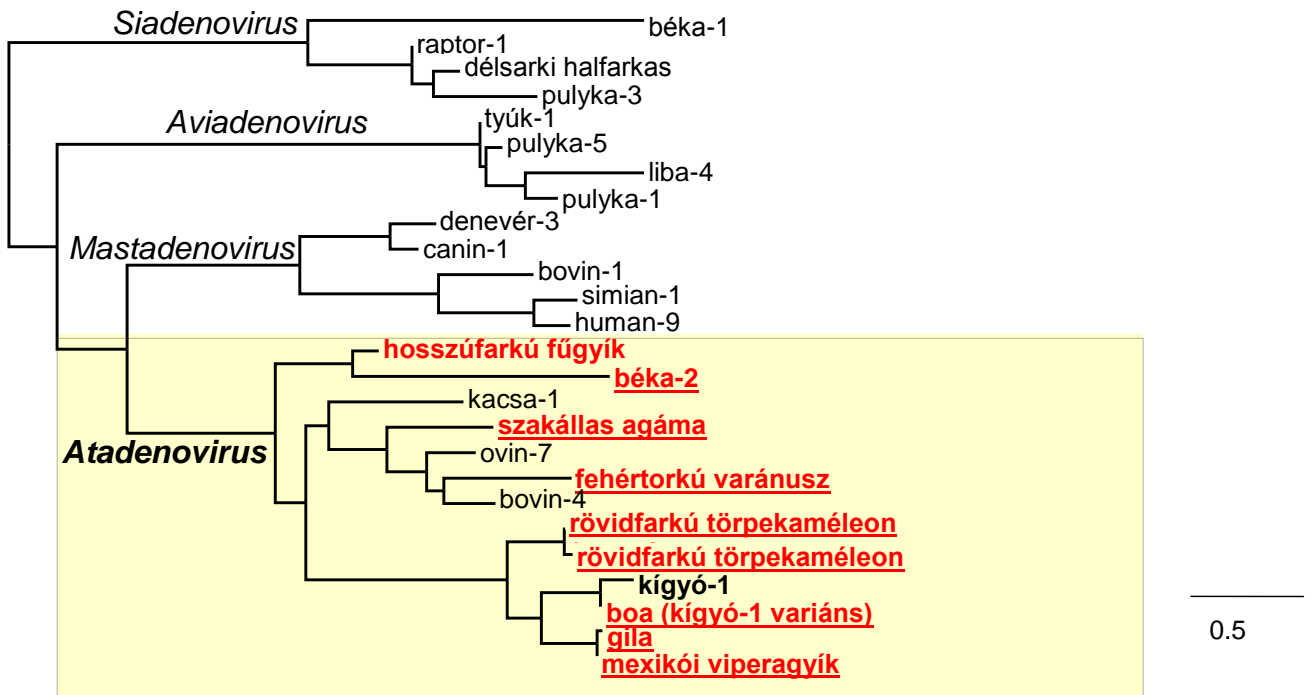
10. ábra A DNS-polimeráz fehérje kb. 92 as hosszú szakasza alapján számolt törzsfa-rekonstrukció (maximum likelihood, LG+I+G, $\alpha=0,61$, $p=0,16$). Az újonnan kimutatott hulló adenovírusok neve pirossal jelölve, akárcsak a korábban már kimutatott vírusok új gazdafajai. Zölddel jelöltek az általunk ismételt kimutatott vírusok, melyek korábban már ismertek voltak, valamint a két teljes genom szinten vizsgált gyík-adenovírus. Minden hulló- vagy kételtű adenovírus félkövérrel szedett. Bootstrap analízist nem végeztünk, mivel az ilyen meglehetősen rövid, és nagyon konzervatív (ez az alacsony α értéken is jól megfigyelhető) szekvenciák esetében a módszer természetéből adódó adatvesztés a topológia torzítását okozta volna.



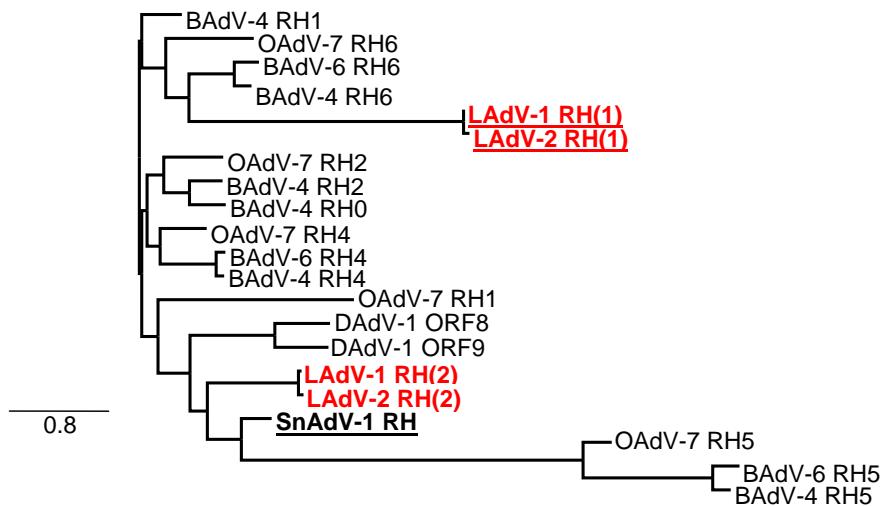
11. ábra A pentonbázis strukturális fehérje 223 as hosszú szakasza alapján készült törzsfarekonstrukció (maximum likelihood, LG+I+G, $\alpha=0,73$, $\rho=0,20$, bootstrap 100 ismétléssel). Az általunk meghatározott szekvenciák pirossal jelöltek.



12. ábra Az *Atadenovirus* nemzetségre specifikus p32K fehérje 71 as hosszú szakasza alapján készült törzsfarekonstrukció (maximum likelihood, LG+G+F, $\alpha=1,44$ bootstrap 100 ismétléssel). A hulló eredetű vírusok neve félkövérrel szedett, míg az általunk szekvenáltak vagy kimutatottak pirossal vannak kiemelve.



13. ábra A teljes pVII fehérje as sorrendje alapján készült törzsfa (maximum likelihood, WAG+I+G+F, $\alpha=2,08$, $\rho=0,03$). Az általunk szekvenált vírusok neve pirossal jelölve, a hulló-eredetű atadenovírusok neve félkövérrel szedve. Aláhúzással jelöltük azokat az atadenovírusokat, amelyekben a pVII 2. proteáz vágáshelyének szekvenciája eltér a genusra eddig jellemzőnek hitt konszenzustól.



14. ábra Az összes atadenovírus RH génje alapján készült törzsfarekonstrukció (protein distance matrix, categories model, global rearrangement) eredménye, ahol a két gyík-adenovírus RH génjeit (pirossal jelölt) az F-box motívum előtti metioninnál kettébontottuk. A törzsfa-rekonstrukció eredménye alátámasztja, hogy valószínűleg a nagyon hosszú RH gén két fele eltérő evolúciós úton alakult ki. A hulló eredetű szekvenciák neve félkövérrel kiemelt, az F-box motívumot nem tartalmazó RH gének nevei aláhúzottak. Rövidítések: BAdV – bovin adenovírus, DAdV – kacsza-adenovírus, LAdV – gyík-adenovírus, OAdV – ovin adenovírus, SnAdV – kígyó-adenovírus..

8. táblázat Atadenovírusok két genomszakaszának G+C tartalma. A zöld háttérű cellákban a pikkelyes hullókból származó atadenovírusok láthatóak. Az újonnan kimutatott vírusokat pirossal jelöltük. A 45% alatti értékek félkövérrel szedve, az 55% felettiek aláhúzva. A pipa jel a teljes genom alapján megállapított G+C tartalmat jelzi.

Vírus neve	DNS-polimeráz (~300 bp)	pVII (teljes gén)	Eddig ismert összes szekvencia
Hosszúfarkú-fügyík-AdV	47%	50,1%	48,%
Rövidfarkú törpekaméleon-AdV	43,8-44,5%	47,4-47,1%	42,7-45,5%
Fehértorkú varánusz-AdV	<u>57,3%</u>	<u>62,1%</u>	<u>61%</u>
Kígyó-AdV 1	51,1%	55,3%	49,8%
Boa-AdV (kígyó-AdV-1 variáns)	51,3-51,5%	55,3%	53,1%
Szakállas agáma-AdV	<u>57,4-58,1%</u>	<u>61,7%</u>	<u>57-57,6%</u>
Gyík-AdV-1 (gila)	43,8%	54,9%	44% ✓
Gyík-AdV-2 (mexikói viperagyík)	45,8%	52,7%	44,2% ✓
Béka-AdV-2 (nyílméreg-béka)	36,5%	34,4%	36,6%
Kacsa-AdV-1	47,4%	49,9%	43% ✓
Bovine-AdV-4	37,1%	38,5%	35,2% ✓
Ovine-AdV-7	32,4%	37,5%	33,6% ✓

4.2 Parvovírusok

4.2.1 Szűrővizsgálatok

A PV-ok kimutatásához általam tervezett primerek használatával több esetben sikerült a hullómintákból pozitív eredményt elérni. A 165 vizsgált hulló minta közül 7 volt pozitív (4,2%). Ezek megoszlását szemlélteti a 9. táblázat. 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. Ez az egyed egy kifejtett nőstény példány volt, amelyben kétoldali petefészek-gyulladásra utaló kórtani tüneteket (bővérűség, rendellenes szikanyag képződés) lehetett megfigyelni. A másik három, AdV-ra is pozitív egyed mindegyike fiatal (1–2 hónapos) állat volt. Elhullásuk előtt súlyos tüneteket (étvágytalanság, rendellenes vedlés, opisthotonus) mutattak. Az eltérő időben gyűjtött mintákban a

szekvencia adatok alapján ugyanazt a PV-t mutattuk ki, amelyek nt szinten is azonosnak bizonyultak. A későbbiekben ennek a PV-nak a teljes genomszekvenciáját meghatároztuk. PV jelenlétét sikerült kimutatni egy rövidfarkú törpekaméleon mintájából is, mely egyúttal AdV-ra is pozitív volt. A kaméleonfélék (*Chameleonidae*) családjába tartozó egyedekben első alkalommal sikerült PV-ok jelenlétét megfigyelni.

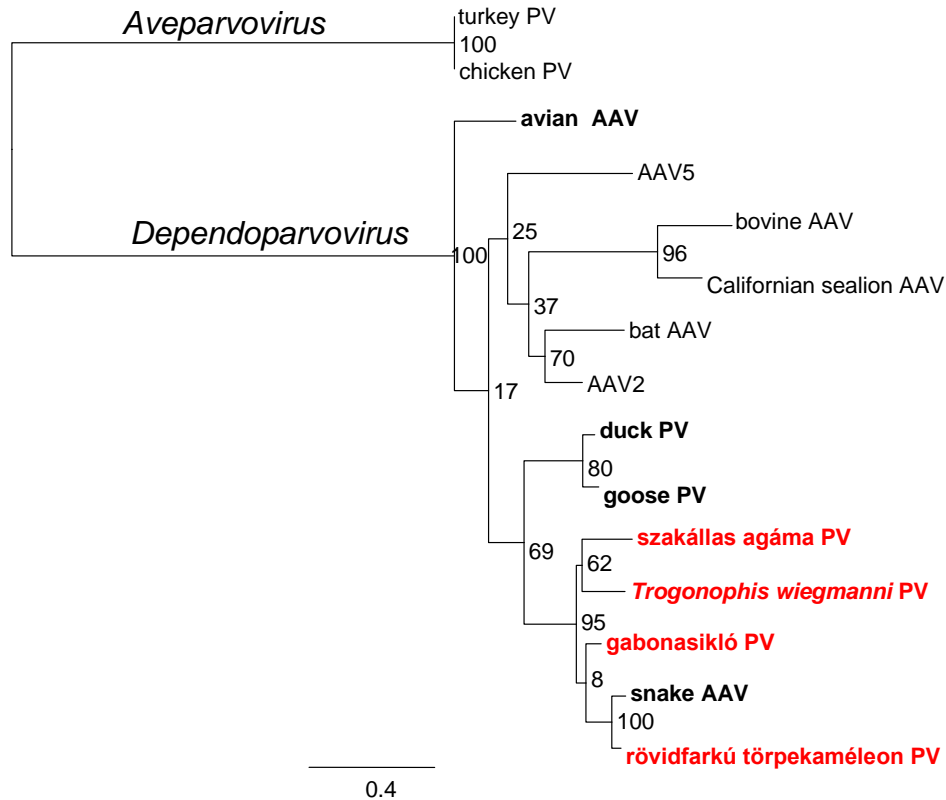
PV-ra pozitívnak bizonyult az egyetlen ásógyík (*Trogonophis wiggmanni*) mintája, mely egyúttal negatív volt mind AdV-ra, mind herpeszvírusra és más, saját DNS-polimeráz enzimmel rendelkező DNS-vírusra is. Az ásógyík-alkatúak alrendjének (*Amphisbaenia*) tagjaiban korábban soha nem mutattak ki sem PV-t, sem bármilyen más vírust (Pénzes és Benkő, 2014).

A kígyók mintái közül egyetlen bizonyult pozitívnak, nevezetesen egy kifejlett, tartós anorexia után elhullott gabonasikló. Az állat egyúttal fertőzött volt a SnAdV-1-gyel is. A kimutatott PV szintén a tudomány számára új, eddig le nem írt vírus.

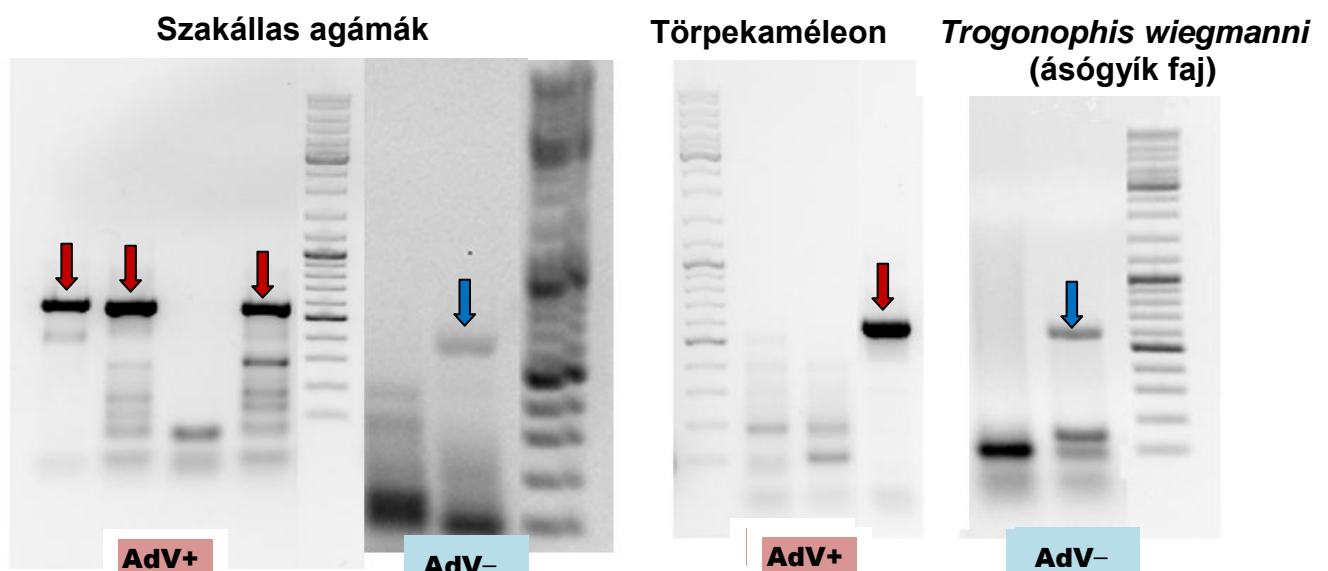
A *cap* rövid szekvenciája alapján történő BLAST homológia-keresés során is már egyértelmű volt, hogy mind a négy új vírus a *Dependoparvovirus* nemzetség tagja. Ezt a törzsfa-rekonstrukció eredménye is alátámasztotta (15. ábra). A nagyméretű DNS-vírusok jelenléte teljesen hiányzott két pozitív, biztosan dependoparvovírust tartalmazó minta esetében is (9. táblázat). A gélfotók elemzésekor megállapíthattuk, hogy ez a két minta a PCR során a többi mintához képest jelentősen kevesebb terméket produkált (16. ábra).

9. táblázat A pozitív parvovírus minták gazda szerinti megoszlása.

Gazdafaj neve	Megvizsgált minták száma	Pozitívok száma	Pozitivitás helper vírusra (PV+ minták közül)
Szakállas agáma (<i>Pogona vitticeps</i>)	9	4	3 AdV+
Rövidfarkú törpekaméleon (<i>Rampholeon brevicaudatus</i>)	26	1	1 AdV+
Gabonasikló (<i>Pantherophis guttatus</i>)	4	1	1 AdV+
Sakktábla ásógyík (<i>Trogonophis wiggmanni</i>)	1	1	–



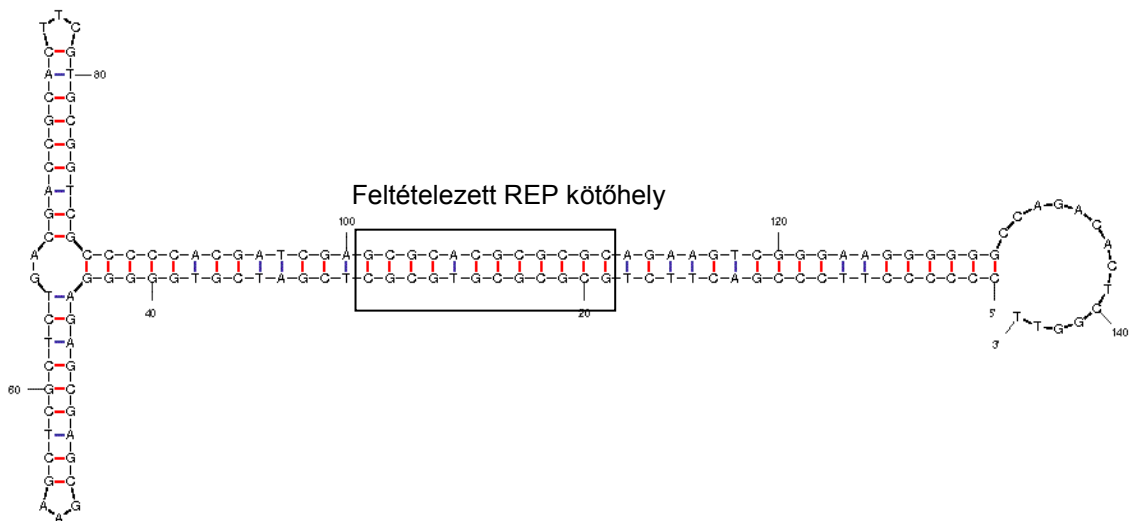
15. ábra A dependoparvovírusok törzsfája a VP1 fehérje 161 aa hosszúságú, a PCR-es szűrővizsgálatok során felerősödött szakasza alapján (maximum likelihood, LG+G+F, $\alpha=0,77$, bootstrap 100 ismétléssel). Outgroupként szerepel a ma már az *Aveparvovirus* nemzetségbe sorolt tyúk- és pulyka parvovírus. A Diapsida (hüllő és madár) eredetű dependoparvovírusok neve félkövérrel szedve. Az újonnan kimutatott hüllő-parvovírusok pirossal jelöltek. A kapszid protein a családon belül túlságosan nagymértékű megőrzöttséget mutat a pontos filogenetikai viszonyok feltérképezéséhez, ám a vírusok genus szintű besorolására alkalmas (rövidítések: AAV – adeno-associated virus, PV – parvovirus)



16. ábra Gélfotók a parvovírus-specifikus PCR-es szűrésének eredményéről. Jelentős különbség látható az adenovírusra pozitív (piros nyilak), illetve negatív (kék nyilak) minták reakciói során keletkezett PCR termék mennyiségében. A 100 bp léptékű molekulatömeg-kontroll első vastag sávja 500 bp-nak, míg a második az 1000 bp-nak megfelelő méretet jelenti.

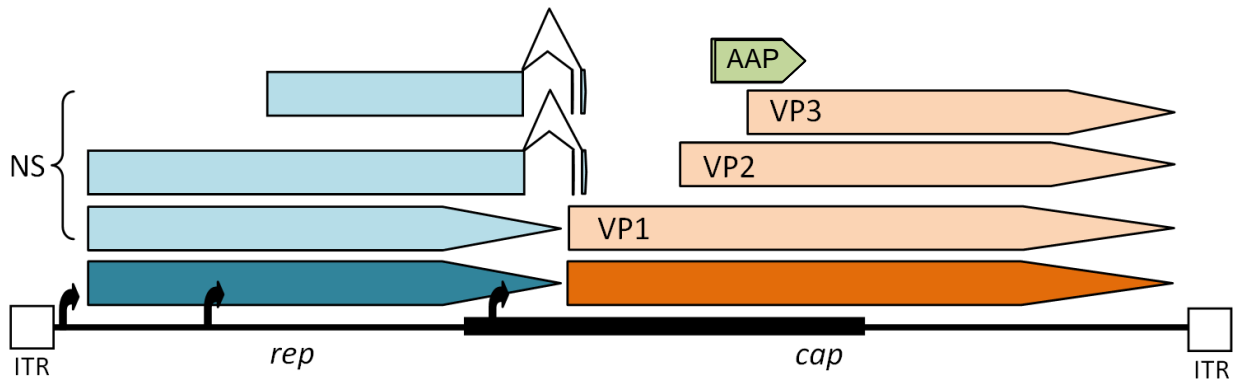
4.2.2 Részleges és teljes genom-analízis

Az ásógyík minta kivételével, mely feltehetően túl kevés vírus DNS-t tartalmazott, a másik három új vírusból sikerült felerősíteni a 300, illetve 360 nt hosszú szakaszt a *rep* ORF-ből is. Ugyancsak sikeres volt e szakasznak a *cap*-ból a szűréshez használt PCR segítségével nyert rövid fragmentummal való összekötése. Így sikerült a törpekaméleon PV-ből (pygmy chameleon PV - PCPV) 1487 nt, a gabonasikló PV-ből (corn snake PV - CSPV) pedig 1821 nt szekvenciát kinyerni. A szakállas agáma PV (bearded dragon PV - BDPV) teljes genomját meghatároztuk, beleértve az ITR-ek másodlagos struktúráját, így teljes hossza 4590 nt. Az ITR-ek szerkezetét mutatja be a 17. ábra, a genom térképe pedig a 18. ábrán tekinthető át. Annak a szakasznak a részletes annotációja, mely átfed a másik két PV esetén meghatározottal a 19. ábrán található.



17. ábra A szakállas agáma parvovírus bal oldali, flop helyzetű ITR-jének hajtú-szerű struktúrája. A másodlagos szerkezetet 130 nt alkotja, melyet további 127 nt egyszálú szakasz követ (nincs az ábrán). A feltételezett REP kötőhelyt keretezés jelöli (Tijssen et al., 2011).

A 257 bázis hosszú ITR-ek között elhelyezkedő genomrégio hossza 4076 nt. A genomban két fő ORF található, hasonlóan valamennyi eddig megismert PV genomjához. A *rep* hossza 1519 nt, és a 385. nt-től az 1903. nt-ig terjed. A *cap* 2179 nt hosszú (2100-4278). A két ORF közötti, nem kódoló régió hossza 17 nt. A genomban három feltételezett promótert sikerült találnunk, melyek az AAV2 p5, p19 és p40 promótereivel homológok. Az eddig megismert dependoparvovírusokhoz hasonlóan egy splicing donor és két akceptor hely figyelhető meg (19. ábra). Az intronon belül egy belső poliadenilációs szignált mutattunk ki. Az intron hossza az első akceptor helyig 175 nt volt.



18. ábra A szakállas agáma parvovírus genomjának sematikus rajza. A genom hossza 4590 bázis. A fekete nyilak jelölik a három promotert. A sötétkékkel jelzett *rep* génről fejeződnek ki a világoskék nyilakkal jelölt NS fehérjék, a narancssárga színű *cap* génről pedig a világos narancssárga jelölésű VP (kapszid) proteinek. A kapszid összeépüléséhez nélkülözhetetlen assembly-activating protein (AAP) ORF-e zölddel jelölt. A megvastagított vonal jelzi azt a szakaszt, amelynek nukleotid-sorrendjét a másik két hulló-parvovírusból (gabonasikló parvovírus, törpekaméleon parvovírus) is meghatároztuk.

Azonosítottuk mindhárom VP fehérje start kodonját is. Megtaláltunk egy alternatív ORF-et, a kapszid összeépülését irányító fehérje (assembly-activating protein, AAP) rejtett, a *cap*-be ágyazott génjét, mely egy 177 as hosszú fehérjét kódol. A genom végén, a VP fehérjék stop kodonja után megőrzött poliadenilációs szignált azonosítottunk, amelyben, ellentétben a belső poliadenilációs szignálokkal, a konzervatív GT motívumot is megtaláltuk.

A másik két új hulló-PV-ből felerősített genomszakasz mindkét esetben tartalmazta a p40 promotert, amely a harmadik a dependoparvovírusok genomjában. A splicing helyek száma és elhelyezkedése a BDPV-ben lévőkhöz hasonló volt, akárcsak a belső poliadenilációs szignálé és a VP fehérjék start kodonjaié (19. ábra). Azonosítottuk a genom közepén elhelyezkedő, feltételezett, másodlagos poliadenilációs szignált is. Mind a két részleges szekvenált hulló-PV-ban sikerült felfedezni az AAP-t is, hasonlóan a *cap* ORF-be ágyazódva. Hossza a PCPV-ban 168 as volt, míg a CSPV-ban valamivel hosszabb, 171 as a fehérje mérete. A két fő ORF között elhelyezkedő nem kódoló régió hossza a CSPV esetében 18, a PCPV-ban 17 nt. A 19. ábrán látható nt alignment a három új hulló-PV részletes annotációját mutatja.

A fehérjék as sorrendjét a konzervatív motívumok és domének azonosítása céljából megvizsgáltuk. Az NS1 fehérjében megtaláltuk mindhárom replikációs motívumot. A VP1 fehérjében, mindhárom vizsgált hulló-PV-ban, megtaláltuk a foszfolipáz A2 (PLA2) as motívumot (20. ábra).

	1704		1803
CSPV	TGTTTCGTTTAAATTATAAATTGGCCCAAATTCGGTAAGGTGACTGAACAGGAAGTAAAAGAAATTTATTACTTGGGGCGTGGTTTAAATATCGACAT		
BDPV	TGTTTAGTTGAATAAGAACTGGAACCTGATTTTGGAAAAGTGACCTTGGACGAAGTCAAAGAAATTTATTACCTGGGGTAGAGATAATCCAGTACAAGT		
PCPV	-----CCTTTGGGAAGGTCACAGAACAGGAAGTTAAAGAGTTATTACTTGGGGCGGAGCCTAGACATTGAAGT		
		p40 promóter TATA box	
	1804		1800
CSPV	TCCGTATCAGTTCGGGTTCTACT-----TCCGGTAGCTATAAAAGCGGGGCTCCGAGGACGCTGCCTCATTTTCTTTGGAGCCGCGA		
BDPV	ACCGTATCAGTTCAGTACCCTCTGTAGCCAGCCCCCTCAGAAAAGTATAAATGA-GGTGCTGGCAAGCGCCCGCCATTCTGACGGCGCGGGCGA		
PCPV	ACCTCACCAGTTTAGAGTGCCAGTG-----TCTGGCGCTATAAAAGCGGGCCCTGAGGCGGAAGCTATTCTTCGGATGAGCAGCCAA		
		Feltételezett donor hely	
	1904		2003
CSPV	G----CAAGAAGGAC----GTGAATCCCCAAATATCTGCCGCGACCAAGTACGTATGTAATTTAGT---CGATAAAGCTTCTGTTTCTGAATTGGCTAAA		
BDPV	AGAGACGAGATCGACCAAGTTGGTGTCTGCTGAATGATTCTCTAACAGGTATTGTAACAATATTAC---TGAAACGTGTCAATACGCGTGAAATTGCTCAA		
PCPV	AG-GAGAAGGTCGACGCTTGTGACTCTCTAACAGGTATG-CTAATAACATTGATAAGTCAGCTACCGGGAGGGAAGCTTCTAGAGATTGCTACT		
		belső polyA site az intronban	
	2004		2103
CSPV	ACAAATCAATGTATGTTACATCATGCTTTTGAATGTACCGAGTGTATCCTGAATTGTTGGATGACATGGATAAGGAACAAATAAGCTTACTGATAATAG		
BDPV	AATAATCAATGTATGTTACACCACGCTTTAATTGTTCTGAATGTTACCCTGAATTGTTGGATGATTGTGACATGGAAACAAATAAGTATTGATAATAG		
PCPV	ACCAATCAGTGTATGTTGACCATACCTTTTCTGACTGAATGTTATCTGAATTGGTGTGATGACTTGTGAAGGAACAAATAA-CTTATTGATAATAG		
	VP1		
		Feltételezett akceptor helyek	
	2104		2203
CSPV	ACATGGATTTTTCGATGATTTCTTTACAGATAAATACAAAGAGACCTATAAGAGCTTCTAAGCCCGTCAACCCAAAGCCGGTTCAACAAATAGCGA		
BDPV	CTATGGATTTTCTCGATTTCTTGTAGGTGAAAAATACGAGGAGCTGCTAAAGAGTTGGGAAACCGATTAAACCCCTCTCCCGTTCAACAAATAGC--		
PCPV	ACATGGATTTTTCGATGATTTTGTAGCAATAAATAAAGAACTGTAGAAGAAGCTCTATAACCCGTTAACCCACCACCCGTTCAACACGGAAGC--		
	2204		2303
CSPV	AAAGCATTCTGAACCTGGCTCGAGGGGTCTGTGTTGCCTGGCTATAGGTATCTGGGCCTGGTAATAGCTTGGACCGTGGAGAACCCTAACGAGGCG		
BDPV	CACGCAGACAG---CAGACGCG---GTCTAGTGGTTCCAGGTTATAAATACCTCGGTCCATTCAACGGATTAGACAAGGGCGAGCCTGTCAACGCACT		
PCPV	-----AGG-----GGTCTGGTGGTGCCTGGTACCCTGATCTTGGCCCTGGTAATAGCTTGGACCGTGGAGAGCCGTTAACCAAGCA		
	2304		2403
CSPV	GACGCAGCTGCCGAGAACACGACATCTCTACAACAAACACTCGAAGTTGGAGACAATCCGTACGTAAGTACAACCACGCGGACGAAAACTACAGT		
BDPV	GACCGCGCTGCCCTTGAACACGACAAAGCTATAACGAGCTTCTCGAGGCTGGAGACAACCCCTACATCAAGTACAACCACGCGGACGCGCTTTTCAAG		
PCPV	GACGCAGCAGTAAAAAGCACGATATCGAATACGATAAACAGCTTCAAGCAGGAGACAACCCGTACATCAAGTACAACCACGCGGACGCGGATTCACAA		
	2404		2503
CSPV	CCGATTTACAAGGTGACGTGATTTTGGCGGGAACGACGACAAACCGGCTTTTCAAGCCAAGAAGCGCCTACTAGAACCCTTGGTCTAGTAGAAGCGCC		
BDPV	AACGCTTGAAGGAGATACTAGTTTGGTGGTAACCGGCTAACCGGCTTTTCAATTCAAGAAGCGGTTGCTCGAGCCGTTTGGAGCGGTCGAGCAGCC		
PCPV	AGGACTTCAAGGAGATAAAGTCTAGCCGGCAACCGGCAACGCTCTTTCAAGGCAAAAAGACTCTGCTAGAGCCTTTGGCCCTAGTAGAGCA--C		
	VP2		
	2504		2603
CSPV	CCTACCAGGCAAAACCGGATAAGGGGAAGGTAGACGACT-ACCTCCCAAAGCGAAAAGGCTAACACAGACCTTTTCAA---TCCACCCCGCTAAAG		
BDPV	CCAGCCGAAAAAGCGCCGAAAGC-GAAAGACACCCGAAGAGTGGTGTAGCTCAAGAAAAGACTCAACCAACAAAGGTTCCAGATACCAGCTCCAGG		
PCPV	CCGGGCGGC-AACCGTCTGATAAAA-GAAAACCTCCACCAGGACTACTAACTCCACCAAAACACCTAAAAAGCAGAAATTTCAAATACCAGCTC----		
		AAP alternatív start kodonok	VP3
	2604		2703
CSPV	AGACCCAGGAGAAGGGTCTTCTGCGCAGTCTGGA---GGTAGCCAGCCGGTCCGATACTAGCGGCTCATCTGCTATGGCTGAAGGAGGAGGGCGGACCA		
BDPV	ACAATCTGATCAGATTCTCTTCCACCTCAGGATCCGGCGTACTGACGGCTCCAGTTCTAGCGCATCAATACAATGGCTCAAGGAGGTGGCGGACCA		
PCPV	-----CTCCTAATCAGGCTGAC---AAGTTCAGCAGGCTCCGATACTAGCGGCACATCTATCTGGCTTCAAGGAGGAGGCGGACCA		
	2704		2803
CSPV	CTGGCAAGCGATCAACAAGGTGCGGAGGAGTGGTAATTCCTCCGGTATTGGCATTGCGATACCCAATGGCTGGGAGACCAGCTATTACAAAGTCTGA		
BDPV	ATGGCAGACGATAACCAAGGCGCGAGGAGTGGTAATGCTCGGGAGATTGGCATTGCGATACCCAATGGCTGGGCGACCCAGCTATTACAAATCTA		
PCPV	ATGGCAGATGATAACAGGGCGCGGAGGAGTGGTAATTCCTCAGGTGATTGGCATTGCGATACCCAATGGCTGGGAGACCAGCTATTACAAAGTCTGA		
	2804		2903
CSPV	CCCGAACTTGGTACTCCCAAGTTATGGGAATCACCTCTATAAACCCATCACCTTTGATGGCACTACCGGAGGCGGAAGTACGACGAGCTATGCAGTTA		
BDPV	CCAGAACTTGGTCTGCCCTTACGGGAATCATCTACTCGCCATCAACTTTGATGGAAACCAAGGGAACCGAAACCCAGCCGCTTACTGCGGATA		
PCPV	CCAGAACTTGGTGTCTCCCACTACGGGAATCATCTACTCGGCTATCAATTTTACGGCACAGCGGCGGGGCTAATGCAGCTATGCAGGATA		
	2904		3003
CSPV	TCCACCCCTGGGATACTTTGACTTTAACCGATTCCATTGTCACTTCTCCACGCTGACTGGCAAGACTCGTCAACAACCACGTGGGCATCCGACCC		
BDPV	CGCTACCCCTGGGCTACTTTGACTTTAACCGATTCCACTGCCACTTTTCCCGGAGACTGGCAAGACTCATTAAACAACCATCCGGAATACGACCA		
PCPV	CAAGACCCCTGGGGTATTTGACTTTAACCGATTCCACTGCCACTTTTACCCAGACTGGCAGGACTCATCAATAACCACACAGGATCAGACCT		
	3004		3103
CSPV	AAAGGACTTAAATTTAAACTCTTAACTGCAAGTCAAGGAAGTACGCAACAAGACTCGCAAGACCATCGCAATAACCTCACCAGCACCGTACAGG		
BDPV	GTCCGACTCAAATTCAGCTGTTCAACATCCAGGTCAAGGAAATCACAGTACAAGATTGACCAAAACGATCGCAACAATCTCACCAGCACCGTACAGG		
PCPV	AAAGGACTCAAAGTTAAAGTCTTCAACTGCAAGTCAAGGAAATACACGCAAGATTGACCAAAACGATCGCAACAATCTCACCAGCACCGTACAGG		
		AAP stop kodon	
	3104		3203
CSPV	TGTTTGGGACGAGAACTACGAGTTACCGTATGTCTTAGGATCGGCTACTCAAGAACTTTCCCGCTTTTCCCAACGACATTTTATGTTGCCTCAGTA		
BDPV	TCTTTGGGACGAGCAGCAGCTCCCGTACGTATTAGGAAATGCCACGACGAGGACGTTTCTCCTTTCCGGCTGAAGTCTTTTCAAGTGCCTCAGTA		
PCPV	TGTTTGGGACGAGAACTACGACCTCCCTATGTGCTTAGCGGTGCTACACAAGGACGTTTCTCCTTTTCCAAATGATGTTTTTATGCTGCCTCAATA		

19. ábra A gabonasikló parvovírus (corn snake parvovirus – CSPV), szakállas agáma parvovírus (bearded dragon parvovirus – BDPV) és rövidfarkú törpekaméleon parvovírus (pygmy chameleon parvovirus – PCPV) genom homológ szakaszának annotációja. A cisz szabályozóelemek helyzetét sárga háttér, a start kodonokat zöld háttér, a stop kodonokat piros háttér jelöli. A splicinggal kapcsolatos szekvencia motívumok félkövérrel szedettek és aláhúzottak. A sötét- és világoskék háttér az AAP (assembly activating protein) fehérje alternatív start és stop kodonját mutatja.

AAV2	43	RGLVLP	PGYKY	LGP	FNGL	LDK	GE	FPV	NEA	DA	AA	LE	HD	KAM	DR	QL	DS	GG	NP	YL	KYN	HAD	AE	FQ	ER	LK		
BtAAV	40	RGLVLP	PGYKY	LGP	FNGL	LDR	GE	FPV	NA	AD	AA	AK	KH	DE	EY	DR	LL	KAG	DN	PYL	AY	NH	AD	AE	FQ	KD	LS	
BAAV	42	RGLVLP	PGYKY	LGP	FNGL	LDK	GE	FPV	NF	AD	EA	VA	RE	HD	LS	YQ	KQ	LE	AG	DN	PYL	KYN	HAD	AE	FQ	EK	LA	
Cs1AAV	46	RGLVLP	PGYKY	LGP	FNGL	LR	GE	FPV	NA	AD	AA	QR	HD	RO	YD	RI	LQ	QG	GN	PYL	TY	NH	AD	AE	FQ	EEL	LQ	
AAV5	42	RGLVLP	PGYNY	LGP	GNGL	DR	GE	FPV	NR	AD	EA	VA	RE	HD	IS	YNE	Q	LE	AG	DN	PYL	KYN	HAD	AE	FQ	EK	LA	
DPV	51	RGFVLP	PGYKY	LGP	GNGL	DK	GE	FPV	NK	AD	SV	AL	EH	DK	AM	DQ	QL	KAG	DN	PY	IK	KH	AD	Q	E	ID	NL	LQ
GPV	51	RGFVLP	PGYKY	LGP	GNGL	DK	GE	FPV	NK	AD	SV	AL	EH	DK	AM	DQ	QL	KAG	DN	PY	IK	KH	AD	Q	E	ID	S	LQ
AAAV	52	RGLVLP	PGYNY	LGP	FNGL	DK	GE	FPV	NE	AD	AA	LE	HD	KAM	DLE	TK	DGH	NP	YF	EY	NH	AD	AE	FQ	ER	LK		
SAAV2	41	RGLVLP	PGYKY	LGP	GNGL	DR	GE	FPV	NQ	AD	AA	KE	HD	IS	YDK	QL	KV	GD	NP	YV	KYN	HAD	AE	FQ	QK	LE		
CSPV	41	RGLVLP	PGYRY	LGP	GNGL	DR	GE	FPV	NE	AD	AA	RE	HD	IS	YN	KQ	LE	VG	DN	PY	VK	YN	HAD	AE	FQ	QK	LE	
PCPV	33	RGLVLP	PGYRY	LGP	GNGL	DR	GE	FPV	NQ	AD	AA	KK	HD	IE	YDK	QL	Q	AG	DN	PY	IK	KH	AD	AE	FQ	KD	LQ	
SAAV	42	RGFVLP	PGYRY	LGP	GNGL	DR	GE	FPV	NK	AD	EA	AK	KH	DQ	EY	DQ	QL	KAG	DN	PY	IK	KH	AD	AE	FQ	KD	LQ	
BDPV	39	RGLVLP	PGYKY	LGP	FNGL	DK	GE	FPV	NA	AD	AA	LE	HD	KAM	NE	LE	EA	GD	NP	YL	KYN	HAD	AE	FQ	ER	LQ		

20. ábra A foszfolipáz A2 (PLA) domén a dependoparvovírusok VP1 fehérjéjének N-terminálisához közeli szakaszán. Az újonnan kimutatott hullő-parvovírusokat sárga háttér jelzi. A piros keret a Ca²⁺ kötőhelyet jelöli. (rövidítések: AAV – adeno-associated virus, AAVV – avian adeno-associated virus, BAAV – bovine adeno-associated virus, BDPV – bearded dragon parvovirus, BtAAV – bat adeno-associated virus, Cs1AAV – California sealion adeno-associated virus, CSPV – corn snake parvovirus, DPV – duck parvovirus, GPV – goose parvovirus, PCPV – pygmy chameleon parvovirus, SAAV – snake adeno-associated virus, SAAV2 – serpentine adeno-associated virus 2)

4.2.3 Taxonómia, evolúció és törzsfarekonstrukció

A PV-ok egyértelmű rendszertani besorolásához mind a két fő ORF ismerete szükséges, ezért csak a BDPV taxonómiai helyét vizsgáltuk. A *rep* származtatott as sorrendje a legmagasabb értékű azonosságot (58%) a SAAV homológ szekvenciájával mutatta, de a GenBankban található dependoparvovírusok egyikével sem volt ez az érték kevesebb, mint 34%. A VP1 fehérjében a BDPV és a SAAV közötti azonosság 70% volt, de egyik dependoparvovírusal sem csökkent 56% alá.

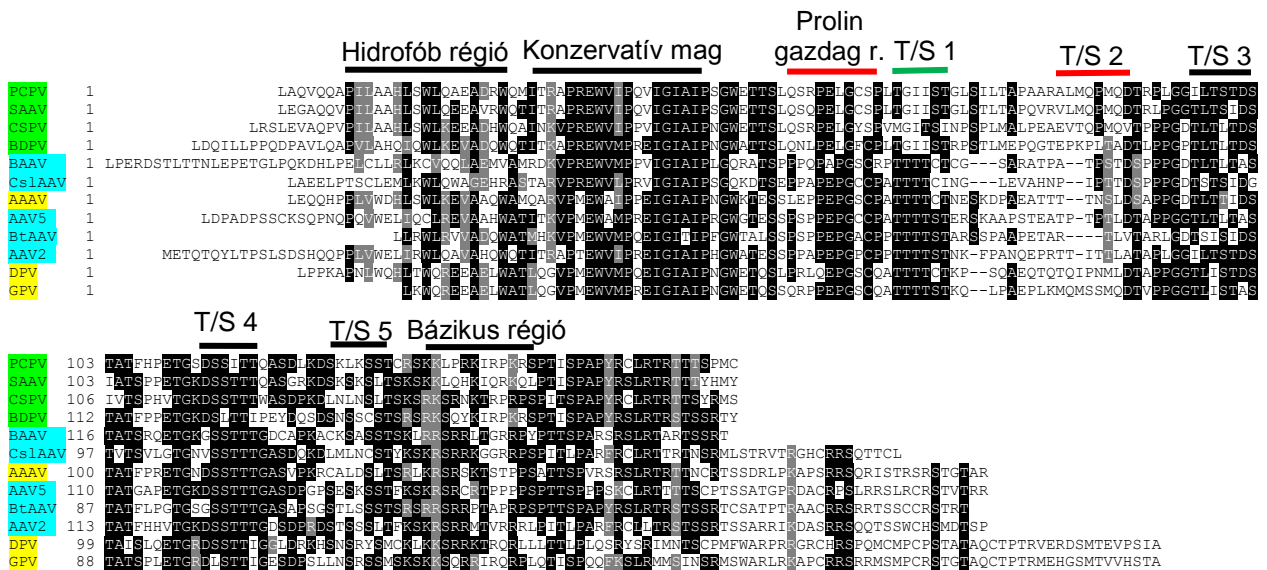
Mind a három új hullő-PV genom annotálásakor megfigyeltük, hogy intronjaik (az első splice akceptor helyig számítva) sosem érik el a 200 nt hosszúságot (10. táblázat).

Azonosítottuk és megvizsgáltuk az AAP hosszát is minden, eddig elfogadott dependoparvovírus faj esetében, ám ezek között nem találtunk evolúciós összefüggést. Az alignment alapján a fehérje mind a hosszát, mind a szekvenciáját illetően meglehetősen variábilisnak tűnik, azonban a korábban a humán-főemlős gazdafajokból izolált *Adeno-associated dependoparvovirus 1* és *2* fajba tartozó (AAV 1-13) vírusok esetén már meghatározott funkcionális motívumok jól felismerhetőek (21. ábra).

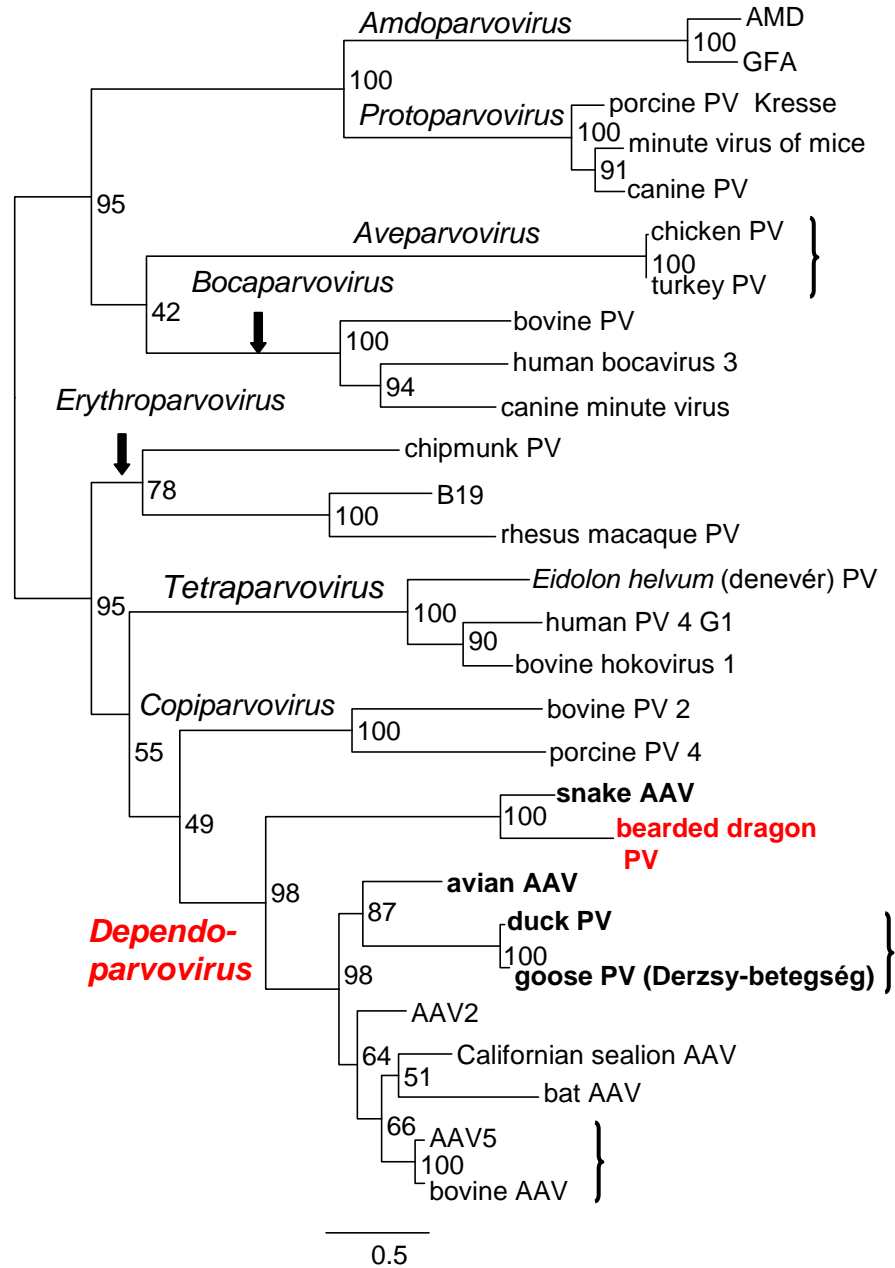
A PV-ok evolúciós viszonyainak vizsgálata céljából törzsfarekonstrukciót végeztünk a teljes *rep* gén származtatott as sorrendje alapján (22. ábra). A szakállas ágama PV egyértelműen a *Dependoparvovirus* genus tagja, és együtt a SAAV-sal a klád legősibb leágazását képezi. Az AAP teljes as szekvenciája alapján készült törzsfán a hullő-PV-ok egy monofiletikus csoportot képeznek (23. ábra).

10. táblázat Intronok hossza a különböző dependoparvovírusokban. Megfigyelhető, hogy az első intron hossza a hüllőkben a legrövidebb (narancssárga háttér), alig haladja meg a 180 nt hosszúságot. A madarak esetében közepesen hosszú, itt 200 és 220 nt közé esik (kék háttér). Az emlősök dependoparvovirusaiban hossza megközelíti vagy meg is haladja a 300 nt-ot.

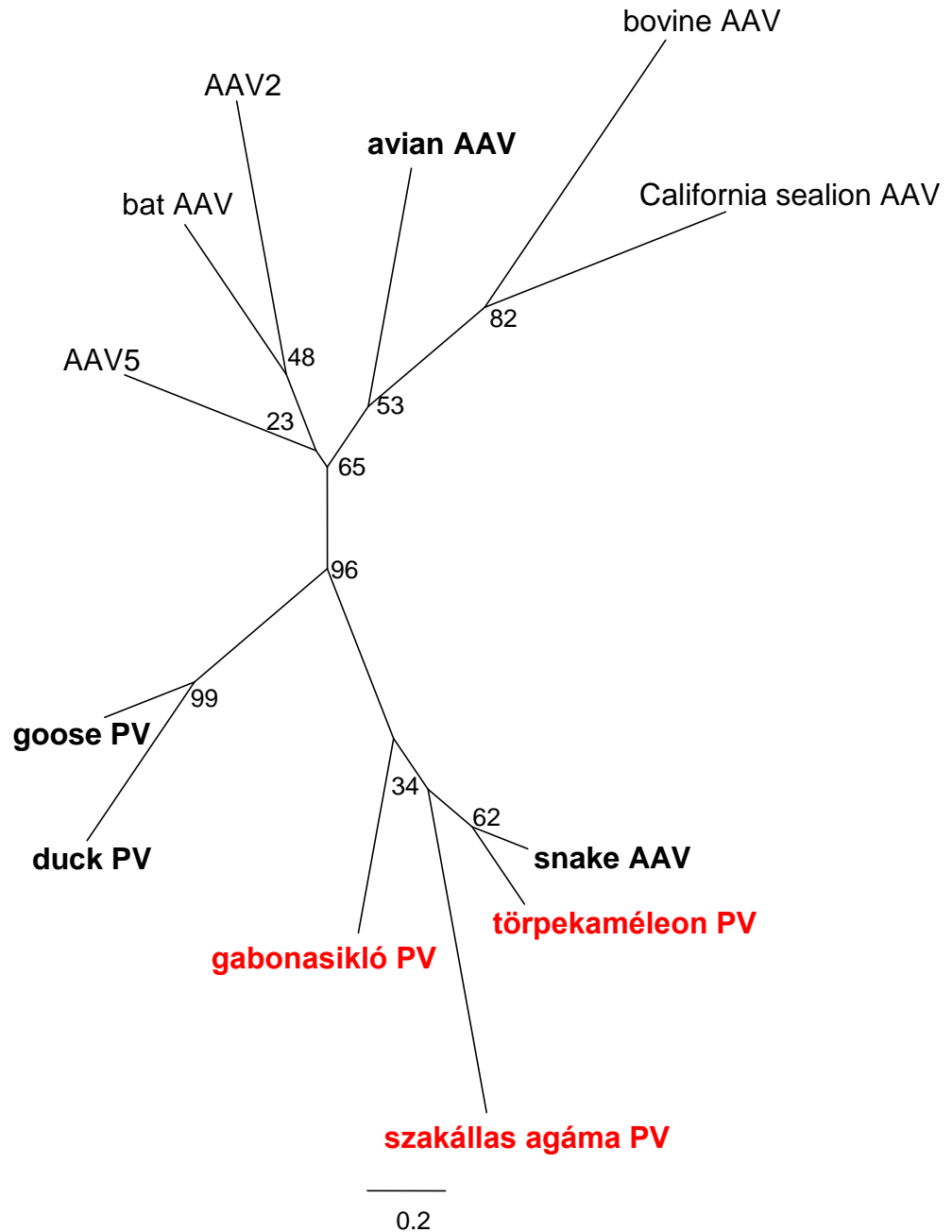
Vírus neve	Intron hossza az első akceptor helyig (bázisban megadva)	További nukleotidok száma a második akceptor helyig
AAV-2	322	27
AAV-5	295	27
Avian AAV	205	30
Liba PV	215	33
Kacsa PV	215	33
Kígyó AAV	160	14
Gabonasikló PV	178	12
Szakállas agáma PV	175	15
Törpekaméleon PV	186	24



21. ábra Dependoparvovírusok AAP (assembly-activating protein) as szekvenciái alapján készült illesztés. A BDPV jelöli az új szakállas agáma parvovírust, a PCPV a törpekaméleon parvovírust, és a CSPV az újonnan kimutatott gabonasikló parvovírust. A hüllő parvovírusok zölddel, a madarak vírusai sárgával, az emlősöké pedig késsel jelöltek. A vízszintes vonalak jelölik az azonosított funkcionális motívumokat (Naumer *et al.*, 2012). A fekete színűek minden dependoparvovírusban megőrzöttek, a piros hiányzik a diapsida-eredetű PV-okból (kivétel: AAV), a zöld pedig csak a hüllő-eredetűekben nem kimutatható. (rövidítések: AAV – adeno-associated virus, AAV – avian adeno-associated virus, BAAV – bovine adeno-associated virus, BtAAV – bat adeno-associated virus, CslAAV – Californian sealion adeno-associated virus, DPV – duck parvovirus, GPV – goose parvovirus, r. – régió, T/S – treonin-szerin gazdag régió)



22. ábra A parvovírusok (PV) *Parvovirinae* alcsalád tagjainak teljes replikációs proteinje alapján készült törzsfa (maximum likelihood, RtRev+I+G+F, $\alpha=1,29$, $\rho=0,03$, bootstrap 100 ismétléssel). Minden genust lehetőség szerint három, különböző fajba tartozó típus képvisel, melyeket a hivatalos nevükön mutatunk be. Az egy fajba sorolható vírusok neveit kapcsos zárójel fogja közre. Az általunk újonnan kimutatott szakállas agáma PV neve pirossal van kiemelve, míg félkövér betűtípussal jellettek azok a dependoparvovírusok, melyek Diapsida gazdafajokat fertőznek. Az NS fehérjék a VP proteinekénél sokkal megőrzöttebbek a *Parvoviridae* családban. Emiatt ennek a fehérjének a szekvenciája alkalmas egyedül mind a genuson belüli, mind a genuson kívüli evolúció pontos feltérképezésére. (rövidítések: AMDV – Aleutian mink disease virus, AAV – adeno-associated virus, GFAV – gray fox amdovirus, PV – parvovirus)



23. ábra A kizárólag a *Dependoparvovirus* nemzetségre jellemző, a kapszid összeszerelődéséért felelős fehérje (assembly-activating protein - AAP) alapján készült törzsfa-rekonstrukció (maximum likelihood, HIVb+G+F, $\alpha=0,95$, bootstrap 100 ismétléssel). Félkövér betűtípussal emeltük ki a diapsida-eredetű dependoparvovírusok neveit, pirossal pedig az újonnan kimutatott vírusokat. (rövidítések: AAV – adeno-associated virus, PV – parvovirus)

5. Megbeszélés

5.1. Adenovírusok

5.1.1 Az adenovírusok előfordulása

Az AdV-ok kimutatására tervezett PCR-ek kezdetben a hexon gén felismerésére irányultak, ám ezek általában nem mutattak túl a genus-specificitáson. A legelső olyan diagnosztikai módszert, mely már többféle nemzetséghez tartozó AdV-t is képes volt kimutatni, nem a hexon, hanem a vírus DNS-függő DNS-polimeráz génjére tervezték. A módszer erősen degenerált, konszenzus primerekkel működött, és alkalmazásával sikerült először szekvenciát nyerni az erszéyes rókában (*Trichosurus vulpecula*) talált AdV-ból, melyről ezáltal vált megállapíthatóvá, hogy atadenovírus (Thomson *et al.*, 2002). Ez a PCR rendszer alkalmasnak bizonyult egy-egy szakasz kinyerésére az egyetlen ismert hal-AdV, valamint az első kígyó-AdV izolátum genomjából, és így lehetőség nyílt az ősbibberincekben előforduló AdV-ok első megismert szekvenciáinak összehasonlítására (Benkő *et al.*, 2002). A PCR hatékonyságának fokozása céljából egy kétkörös (nested) rendszert is kidolgoztak. A primerek szekvenciáját az AdV-ok DNS-polimerázának legjobban megőrzött as motívumai alapján tervezték. Használatukkal korábban nem ismert szekvenciákat sikerült kinyerni több gyík faj AdV fertőzésre gyanús egyedéből (Wellehan *et al.*, 2004). Erről, a napjainkban általánosan használt PCR-ről feltételezzük, hogy alkalmas lehet az *Adenoviridae* család bármelyik genusába tartozó vírus kimutatására.

AdV-ok jelenlétét hüllőkben a 80'-as évek óta már többször leírták fény- és/vagy elektron-mikroszkópos leletek alapján (Jacobson *et al.*, 1984; Jacobson és Kollias, 1986), míg a vírusok izolálása csak néhány esetben volt sikeres. Az első szekvencia adatokra egészen 2002-ig kellett várni. 2014-re ez a szám a GenBank-i adatok alapján 32-re nőtt, ami jól mutatja a terület dinamikus fejlődését. A hüllőkben eddig talált AdV-ok három leszármazási vonalhoz tartoznak. Túlnyomó többségük pikkelyes hüllőkből származik és az *Atadenovirus* nemzetségbe sorolható. Az eredeti feltételezés, hogy ez a nemzetség a hüllőkkel együtt fejlődött AdV-okat tartalmazza, kissé módosult és jelenleg az *Atadenovirus*-t a pikkelyes hüllőkkel (Squamata) együttfejlődött genusnak tekintjük (Wellehan *et al.*, 2004; Farkas *et al.*, 2008; Papp *et al.*, 2009; Harrach *et al.*, 2011). Nemrégiben egy újabb leszármazási vonalhoz tartozó AdV-okat mutattak ki egyes teknősfajok egyedeiben (Farkas és Gál, 2009; Doszpoly *et al.*, 2013). A feltehetően új genusként elkülöníthető vírusoknak a Testadenovirus nevet javasolták (Doszpoly *et al.*, 2013). Egy, a *Siadenovirus* nemzetségbe tartozó, korábban nem ismert AdV-t írtak le az Egyesült Államokba illegálisan becsempészett, majd elkobzott Sulawesi teknősök (*Indotestudo forstenii*) tömeges

megbetegedése és elhullása kapcsán (Rivera *et al.*, 2009). A különböző állatkertekben elhelyezett állatoktól más rokon fajok képviselői is megbetegedtek, és több körülmény is arra utalt, hogy ez a fertőzés gazdaváltás eredménye volt (Schumacher *et al.*, 2012). Kétéltűekből a FrAdV-1 1973-as izolálása óta eltelt 40 év alatt nem került elő újabb AdV.

A vizsgálataink során kimutatott 41 hulló-AdV 13,05%-os fertőzöttségi arányt jelent, ami meglehetősen magas. AdV-ok esetén hasonló fertőzöttségi rátát csak madár-AdV-oknál figyeltek meg korábban (Harrach *et al.*, 2008). A kimutatott, összesen 6 különböző AdV fele arányban (3) a tudomány számára új. A pozitív minták között is kiemelkedő a szakállas agámák 90%-ot közelítő, és rövidfarkú törpekaméleonok hasonlóan nagymértékű fertőzöttsége.

Az AgAdV-1-ből nyert szekvenciákat Magyarországon kívül az alábbi négy országban írták le: az Amerikai Egyesült Államokban (Wellehan *et al.*, 2004; Parkin *et al.*, 2009), Ausztriában (Kuebber-Heiss *et al.*, 2005), Németországban (Papp *et al.*, 2009) és legutóbb Ausztráliában (Hyndman és Shilton, 2011). A szakállas agáma a legnépszerűbb kedvtelésből tartott hulló az Egyesült Államokban (Jacobson *et al.*, 2006), és ez valószínűleg nincs másképp Európában sem. Feltételezzük, hogy a kereskedelemben pillanatnyilag nem létezik fertőzés-mentes tenyészetből származó szakállas agáma. Az AgAdV-1-nek világszerte előfordulnak genetikai variánsai, melyek – ahogy azt eredményeink is alátámasztják – nem korlátozódnak elkülönülő földrajzi régiókra. Ennek oka valószínűleg az állatok intenzív tenyésztése, tartása és kereskedelme. Egy másik ok lehet, hogy olyan régen még nem folyik a koevolúció, hogy már teljesen elkülönülő típusok is keletkeztek volna. Feltételezzük azonban, hogy mégis elég régóta van jelen a fertőzés ahhoz, hogy bizonyos számú pontmutáció már megjelenjen. Noha a fertőzést az Egyesült Államokban régóta összefüggésbe hozzák megbetegedésekkel és elhullással, gyakran élő, egészséges példányokban is kimutatható a vírus, ezért a kórokozó-képesség megállapítása további vizsgálatokat igényel.

A vizsgálatunk során pozitívnak talált egyedek közül 4 idős, általánosan gyenge, rossz kondícióban lévő egyed volt. Elképzelhető, hogy leromlott állapotuk miatt a korábban meglévő, perzisztens AdV fertőzés generalizálódott, ezért tudtuk a vírust kimutatni. Más a helyzet a négy fiatal, súlyos idegrendszeri tüneteket mutató egyeddel. Elképzelhető, hogy ezekben az AdV-okozta heveny, súlyos májkárosodás váltotta ki a betegséget. Jelenlegi ismereteink szerint az AgAdV-1 fiatal állatokban okozhat megbetegedést, esetleg elhullást is. Az ausztrál közlemény szerint egy, részleges DNS-polimeráz gén szekvenciájában a mi egyik AgAdV varánsunkkal megegyező AdV változatot mutattak ki egy másik ausztrál agámafajból (*Ctenophorus nuchalis*).

Ugyancsak 90%-ot megközelítő volt a törpekaméleonok fertőzöttsége is. Ezek azonban mind felnőtt, látszólag egészséges példányok voltak. A szinte miniatűr testméret és

az előzetes, fagyasztóban való tárolás az alapos makro- és mikrokórbonctani vizsgálatot megakadályozta. Tény, hogy a kaméleonok élettartama általában nagyon rövid, pár hónaptól max. 2-3 évig terjed (Schaefer 1971; Karsten *et al.*, 2008). Mivel a minták állatkereskedés előtti története ismeretlen, az állatok bármilyen korúak lehettek. A PCAdV 5, csupán nt szinten eltérő variánsa szintén elképzelhető, hogy a különböző helyekről begyűjtött vagy tenyésztett példányok átgondolatlan összeeresztésének eredménye. Az állatok általában 5-6 fős csoportokban érkeztek laboratóriumunkba, és minden esetben több variánsát is ki tudtuk mutatni a PCAdV-nek. Mindenesetre ez az első alkalom, hogy bármilyen adat rendelkezésünkre áll a törpekaméleonok – ezek szerint nagymértékű – AdV fertőzöttségére vonatkozóan.

A varánuszfélék családjának (Varanidae) tagjai közül AdV fertőzöttség gyanúját már nagyon korán leírták pusztai varánuszban (Jacobson és Kollias, 1986). A molekuláris kimutatás azonban csak több mint 20 évvel később egy smaragd varánuszról történt (Papp *et al.*, 2009). A rövid szekvencia alapján ez a vírus olyan távolinak mutatkozott az ismert atadenovírusoktól, hogy Papp *et al.*, (2009) megkérdőjelezték a genusba tartozását. A fehértorkú varánuszról újonnan kimutatott vírus tisztázza ezt a kérdést. A részleges genomszekvenciák alapján a törzsfá-rekonstrukciók mutatják, hogy a smaragd varánusz AdV-sal együtt az *Atadenovirus* nemzetség egy bazális kládjának a tagja. A harmadik új hullóAdV, a GLAdV, mely a legelső AdV a hazánkban is élő nyakörvösgyík-félékből, szintén közeli rokonságot mutat a varánuszAdV-ekkel a rövid polimeráz fragmentum alapján. A két, egymástól független alkalommal kimutatott GLAdV nt szinten azonosnak bizonyult.

Az egyes AdV-ok általában szűk gazdaspektrumúak, esetenként inkább fajspecifikusnak tekinthetők. Érdekes módon a kígyó-AdV-ok a kivételek csoportját gazdagítják. Az első molekulárisan vizsgált hullóAdV, és egészen PhD munkám kezdetéig az egyetlen teljes genomszekvencia, a gabonasiklókból származó SnAdV-1 volt (Juhász és Ahne, 1992; Farkas *et al.*, 2008). A vírust több, eltérő taxonómiai háttérű kígyófajból is kimutatták, többek között közönséges óriáskígyóból (Jacobson *et al.*, 1985), királypítóból (Ogawa *et al.*, 1992) és ismét gabonasiklókból (Abbas *et al.*, 2011), de a polimeráz gén felsokszorozott rövid szakaszán az eredeti szekvenciához képest 2 as eltéréssel. Vizsgálataink során a SnAdV-1-et mi is megtaláltuk gabonasiklóban és közönséges óriáskígyókban, továbbá két új gazdafaj képviselőiben is, nevezetesen egy patkánysiklóban és egy vízisiklóban. A vízisiklóban való kimutatás a legelső hazai, vadon előforduló észlelése bármilyen hulló-AdV-nak. Mindkét faj a Colubridae tagja, ami a legnagyobb diverzitású és legszélesebb elterjedési területtel bíró kígyócsalád. A SnAdV-1 közönséges óriáskígyóban kimutatott négy genotípusa, és ezek szimultán előfordulása egy egyedben, valamint a gabonasiklóban leírt további változatai (Abbas *et al.*, 2011) a vírus és a gazda hosszú koevolúciós múltjára engednek következtetni. Szerológiai felmérés alapján a SnAdV-

1 fertőzés gyakran előfordul élő, egészségesnek látszó kígyókban is (Ball *et al.*, 2014b). Esetleges kórokozó hatására vonatkozóan nincs megbízható adat, de esetenként zárványtesztelés májgyulladásal hozható összefüggésbe.

A SnAdV-2 előfordulását is több kígyófaj egyedeiből is kimutatták. Legelőször kaliforniai királysiklóból írták le (Garner *et al.*, 2008), majd két viperafajból (Viperidae), a Hagen üregi viperából (Farkas és Gál, 2008) és az áspis viperából (Papp *et al.*, 2009) mutatták ki. A vörös korallsikló egy újabb fajjal növeli a SnAdV-2 gazdaspektrumát a Colubridae családból.

A kígyó-AdV-ok látszólag laza gazdaspecificitással rendelkeznek. Ennek lehetséges oka a kígyók extrém gyors morfológiai evolúciójában keresendő (Castoe *et al.*, 2013). Az állatok adaptív radiációjához a szelekciós nyomás leginkább külsejükre hatott, míg immunrendszerük és celluláris receptoraik nem voltak kitéve ilyen fokú szelekciós nyomásnak.

Kétéltűekből a világon második alkalommal sikerült AdV-t kimutatnunk. Meglepő módon ennek az új vírusnak mind a két változata jobban hasonlított a madár vagy kerdőző eredetű atadenovírusokra. A viszonylag nagyszámú kétéltű-minta ellenére a pozitívitas alacsonynak mondható a hullókhöz képest. Az összes pozitív egyed egyetlen családba, a nyílméreg-békák családjába (Dendrobatidae) tartozik. Azon belül azonban két, nem különösebben közeli rokonságban lévő nemet képviselnek. Próbálkozásaink ellenére a vírust a békák környezetében (a terráriumból származó víz- és ürülékmintákból) nem sikerült kimutatnunk, ami arra utal, hogy vírusürítés nem, vagy csak alacsony koncentrációban volt. Elhullások fordultak elő, ha helyhiány miatt több nyílméreg-béka faj egyedeit közös terráriumba helyezték.

5.1.2 A pozitív mintákból meghatározott további szekvenciák; teljes- és részleges genom-analízis

A LAdV-1 és -2 az első teljes gyík-AdV genom, valamint gyíkokból az első két teljes virális genomszekvencia. A hullók atadenovírusainak részletesebb genom-vizsgálatához hasznosnak bizonyultak az általunk kifejlesztett PCR rendszerek. A legsikeresebb primerpár, amely mindegyik, ebben a vizsgálatban szereplő, nem izolált vírusról működött, a pentonbázis és pVI génje közötti szakaszra irányult. A FrAdV-2 genomjából meghatározott mintegy 14 ezer bp szekvencia szintén kiemelkedő jelentőségű, mert ez csupán a második kétéltű gazdában talált AdV. Hosszabb genomszakaszok ismerete elengedhetetlen a vírusok egyértelmű besorolásához. Azoknál a vírusoknál, melyek izolálására kevés az esély, különösen fontosak a konszenzus primerekkel működő PCR-ek. A FrAdV-2 vizsgálatát

nehezítette, hogy az állatok mérete miatt a DNS izolálásra alkalmas szövet mennyisége is limitált volt.

A LAdV-1 genomja az eddigi leghosszabb az *Atadenovirus* nemzetségben, míg a LAdV-2 a DAdV-1 után harmadik (11. táblázat). Ezzel szemben a SnAdV-1 DNS-e a legrövidebb a genusban. Emiatt kezdetben feltételezték, hogy a genomok hossza és a kódolt fehérjék száma az evolúciójuk során nő. A két gyík-AdV genom cáfolja ezt.

11. táblázat Az atadenovírusok genomméretének és génjeik számának összehasonlítása a két gyík-adenovíruséval. A piros háttér jelöli a legmagasabb értéket, míg a két gyík-adenovírust sárga háttér emeli ki.

	Bovin-4	Ovin-7	Kacsa-1	Kígyó-1	Gyík-1	Gyík-2
genom hossza (bp)	31301	29576	33213	27751	36628	32965
gének száma	32	29	31+1 pseudogén	28	35+1 pseudogén	34

A két LAdV mellett a FrAdV-2 genomjának konzervatív régiójából meghatározott szakaszon is nagyon rövidek a gének közötti távolságok, mely tulajdonság szintén az *Atadenovirus* nemzetség jellemzője (Farkas *et al.*, 2008; Harrach *et al.*, 2011). Például a két gyík-AdV esetében a hexon és a pVI génje között mindössze 22 nt található, ez a távolság egy aviadenovírusban (FAdV-1) 59, egy mastadenovírusban (BAdV-1) 51 nt volt. A FrAdV-2 genomjában ugyancsak mindössze 21 bp. A szomszédos gének közötti átfedés is gyakori a nemzetség tagjaiban és előfordult a három vizsgált vírus genomjában is.

5.1.2.1 A LAdV-1 és -2 ITR szekvenciái

Az AdV-ok genomvégeinek klónozását és szekvenálását általában nehezíti az 5' véghez tapadó TP. A RACE kit alkalmazásával közvetlenül határoztuk meg az ITR szekvenciákat, melyeknek a DNS replikáció kezdeti szakaszában szabályozó fehérjék kötőhelyeként szolgálnak (Hatfield és Hearing, 1993; Hay *et al.*, 1995; Van der Vliet, 1995). Az ITR hossza genusonként és vírustípusonként is nagy változatosságot mutat. Legrövidebbnek az atadenovírusokban és siadenovírusokban tűnt; rendszerint nem érte el a 60 bp-t (12. táblázat). Ez alól korábban a SnAdV-1 118 bp hosszú ITR-e volt az egyetlen kivétel (Farkas *et al.*, 2008). A két LAdV-ban a szekvencia 125 és 126 bp, így a LAdV-2-é az eddig ismert leghosszabb atadenovírus ITR. Megjegyzendő, hogy a kérődzőkben és madarakban előforduló atadenovírusokkal kapcsolatban gazdaváltást feltételezünk, míg az atadenovírusokat a pikkelyes hüllőkkel együtt fejlődött leszármazási vonalnak tekintjük.

12. táblázat AdV ITR-ek hossza a különböző nemzetségekben. Zöld háttérrel vannak kiemelve a hüllőket fertőző atadenovírusok.

Vírus neve	ITR szekvenciák hossza	Genus
Bovin-AdV-4	59 bp	<i>Atadenovirus</i>
Bovin-AdV-6	42 bp	
Ovin-AdV-7	46 bp	
Kacsa-AdV-1	53 bp	
Kígyó-AdV-1	118 bp	
Gyík-AdV-1	125 bp	
Gyík-AdV-2	126 bp	
Pulyka-AdV-5	118 bp	<i>Aviadenovirus</i>
Tyúk-AdV-5	86 bp	
Humán-AdV-1	102 bp	<i>Mastadenovirus</i>
Kutya-AdV-1	161 bp	
Béka-AdV-1	36 bp	<i>Siadenovirus</i>
Délsarki halfarkas-AdV	30 bp	

5.1.2.2 E1 régió

Az atadenovírusok genus-specifikus génje, a p32K (Both, 2011), egyes baktériumok ún. SASP (Small Acid Soluble Protein) fehérjével mutat rokonságot (Élő *et al.*, 2003). A nagyszámú bázikus as jelenléte alapján feltételezik, hogy a SASP-okhoz hasonlóan a p32K szerepe is a DNS csomagolása és sejtmagba juttatása. A fehérje N-terminális részén található első proteolitikus vágási hely szekvenciája a két LAdV-ban különbözik. A LAdV-2-ben és a SnAdV-1-ben a szekvenciája GGAVR, míg LAdV-1-ben a valin helyett leucin található. A p32K egy rövid szakaszát sikerült felerősíteni a PCAdV 2-es genotípusából és a GLAdV-ből is, így a második, megőrzöttebb proteolitikus vágási helyet azonosítottuk mind a négy hüllő-AdV esetén (24. ábra). A GLAdV kivételével (LDAL'G) ez mindhárom vírusban megegyezik az eddigi összes atadenovírus p32K fehérjében leírtakkal ((I/M)DGL'G).

```

213                                     284
LAdV-1  ERIPSRGRKLIILTGLFGTGVGVVLDLLLGSPNLNLTGRLIRLIIISLIPGGSLLIINTIDGLGYLLGKFQDNPL
LAdV-2  ERIPSRGRKLIILTGLFGTGVGVVLDLLLGSPNLNLTGRLIRLIIISLIPGGSLLIINTIDGLGYLLGKFQDNPL
PCAdV   ERIPQGRKLIILTGLFGTAVGVVLDILLGSPGLTTRLRIRLIIGLVPGGSLLIIGTMDGLGYIMGMFQNNPL
GLAdV   EKVPARGRRLIMTGLFGTALGIVMDVLLGSPRLTTRMLRLIINMLPAGGLIILGGLDALGYLLIDTFKGNVL

```

24. ábra A hüllő-adenovírusok p32K fehérjéjének részleges aminosav-szekvenciájából készült illesztés. A feltételezett proteolitikus hasítási szignált piros betűk, valamint keretezés jelöli. A szignál mind a négy esetben a 2-es típusú vágáshelyek konszenzusával egyezik meg. A megőrzött aminosav reziduumok szürke háttérrel jelöltek. (GLAdV – fűgyík-adenovírus, LAdV – gyík adenovírus, PCAdV – törpekaméleon AdV)

A p32K gént jobbra az *r* szálon követi mindkét LAdV-ban három gén, melyek jelenléte szintén a nemzetség tipikus tulajdonsága (Both, 2011). Az LH1-nek egyedül a

DAdV-1 genomjában nincs homológja. Az LH2 fehérjével homológ proteint semmilyen organizmusban nem írtak le, így funkcióját nem ismerjük. Az LH3 gén terméke strukturális fehérje, melynek jelenlétét sikerült kimutatni az OAdV-1 kapszidjában (Gorman *et al.*, 2005). A fehérje homológ a mastadenovírusok E1B 55K fehérjével, melynek anti-apoptotikus hatása van (Vrati *et al.*, 1996). Ezt nem sikerült bebizonyítani az OAdV-7 esetén, a fehérje meglehetősen magas kópiaszáma ellenére sem, így valódi funkciója továbbra is ismeretlen (Gorman *et al.*, 2005). Spanyolországban Carmen San Martin kutatócsoportja a LAdV-2 kapszidjában is azonosította mint strukturális proteint (Pénzes *et al.*, 2014).

5.1.2.3 E2 és L régió

A LAdV-1 és -2 genom a központi régióban 16 gént tartalmaz. A konzervatív genomszakasz jobb végén, az I szálon található a DBP (DNS-kötő fehérje) génje. A fehérje minden atadenovírusban, így a két LAdV-ban is kevesebb, mint 400 as-ból áll. Az *Atadenovirus* és a *Siadenovirus* nemzetségek kivételével a fehérje hossza általában meghaladja a 400 as-at.

A konzervatív régió bal szélén, az I szálon elhelyezkedő E2B régió 3 gént tartalmaz. A régiót majdnem teljes hosszában a FrAdV-2 genomjából is meghatároztuk. Mindhárom AdV pTP génjében megtaláltuk a splicingra utaló szekvenciákat, ami az egész családra jellemző. A bal genomvég felé haladva következik a DNS-polimeráz gén, amely úgy tűnik, nem splice-olt, szemben a mastadenovírusokéval (Davison *et al.*, 2003). A régió következő génje a IVa2, mely kifejeződés szempontjából intermedier. Szekvenciájában mindhárom vírusgenomban intron található. Az első 6 (LAdV-1 és 2) illetve 5 (FrAdV-2) as-at kódoló exon a DNS-polimeráz gén szekvenciájával átfedésben helyezkedik el. A IVa2 hasonló szerveződése általános a *Mastadenovirus* genusban (Reddy *et al.*, 1998), azonban egy atadenovírus, az OAdV-7 transzkripció mintázatának vizsgálatakor kísérletesen sem tudták kimutatni splicing meglétét (Khatri és Both, 1998).

Mind a két LAdV-ban, mind a FrAdV-2-ben azonosítottuk a proteolitikus hasítási helyeket a prekursor fehérjék szekvenciájában. Az L régió második génjében, a pIIIa-ban a vágáshely meglepő eltérést mutatott a hullő- és nem hullő-eredetű atadenovírusokban. A fehérje C-terminálisához közel található konszenzus az atadenovírusokban (M/L/I)XGX'G as sorrendű. Az OAdV-7-ben az LIGH'G as szekvencia található a fehérje C-terminálistól 20 as távolságra (Vrati *et al.*, 1996). A szekvencia legjobban a SnAdV-1 esetén tér el, mivel ellentétben a többi atadenovírossal nem leucinnal kezdődik (VSGT'G) (Farkas *et al.*, 2008). A LAdV-1 és 2-ben ezzel azonos motívum volt. A FrAdV-2-ben viszont LLGD'G, ami a DAdV-1-ben található motívummal egyezett meg. A vágáshely követni látszik a hullő-nem hullő atadenovírus elkülönülést.

A pVII és pX fehérjéken feltételezett proteolitikus hasítási helyeket 6 új hüllő- és egy kétéltű AdV esetén tudtuk elemezni. Eddig minden pVII fehérjében két hasítási helyet írtak le (Davison *et al.*, 2003). Az N-terminális felőli mindig 2-es típusú. Ez megőrzöttnek bizonyult az általunk vizsgált vírusokban is. A második vágási hely genusonként specifikus. A mast- és siadenovírusokban kivétel nélkül 1-es típusú, míg az aviadenovírusokban 2-es típusú. Az atadenovírusokban a 2-es típusnak egy rendhagyó típusát mutatták ki, melyet sokáig 3-as típusként emlegettek (Vrati *et al.*, 1996; Davison *et al.* 2003). A proteáz szubsztrát-specificitását vizsgálva azonban kiderült, hogy ez is 2-es típusúnak számít (Ruzindana-Umuyana *et al.*, 2002). Az általunk vizsgált hüllő- és kétéltű-AdV-ok pVII fehérjéi, a GLAdV kivételével, a 2-es típusú vágási hely eredeti konszenzusával összhangban lévő, és nem a rendhagyó hasítási helyet tartalmazzák ((L/I)RGT'G) (25. ábra). Érdekes, hogy a SnAdV-1-nek a közönséges óriáskígyóból kimutatott változatában szintén ezt a hasítási szekvenciát (IRGT'G) találtuk, szemben a teljes genom szinten vizsgált SnAdV-1-gyel (IRAT'G). Ezek alapján elmondható, hogy a vágáshelyek alaptípusa továbbra is megőrzött az egyes genusokban, azonban a motívum még típuson belül is változatos szekvenciával rendelkezhet.

A variábilis mérettel és szekvenciával rendelkező pX fehérje a legkisebb AdV magprotein. Megőrzöttséget kizárólag a proteolitikus vágási helyet követő transzmembrán domén mutat. A vágáshelyek száma eltérő lehet (1-3), de gyakran genusonként jellemző (Davison *et al.*, 2003). Az atadenovírusokban egy proteáz vágáshely mutatható ki, melynek konszenzusa (M/L/I)XGG'X (1-es típus). Már a SnAdV-1 hasítási helye is, de még inkább az általunk vizsgált új hüllő atadenovírusok támasztják alá, hogy a szignál különbözik a hüllő- és nem hüllő eredetű atadenovírusokban (26. ábra). Utóbbiakban ugyanis egységesen az MRGG'F motívum mutatható ki, míg a nem-hüllő eredetűeké LXGG'F konszenzussal rendelkezik. A FrAdV-2 pX fehérjében az LKGG'F szekvencia figyelhető meg, mely azonos a DAdV-1-ben leírttal, mely ugyancsak megerősíti a fent leírtakat. A fehérje átlagosan hosszabb a hüllő eredetű AdV-okban (76-88 as szemben a 66-72-vel), mely alól egyetlen kivétel az AgAdV-1 pX (64 as), mint az eddigi legrövidebb atadenovírus pX (26. ábra).

	2-es típus	2-es típus
Aviadenovirus		
tyúk-1	MSILISP ^{DN} NRGWG	--ANMRY-----RRRAS ^{MR} GVGRRR-----LTLRQLLGLGSRRRRRSR
pulyka-5	MSVLISP ^{DN} NRGWG	--AGMRY-----RRRTS ^{MR} GVGRRR-----MTLRQLLGLGARRRRRTR
pulyka-1	MSILISP ^{DN} NRGWG	--AAMRR-----RCRSS ^{MR} GVGLRRRR--TTTVRPLTLRSLGLGARRRRRGR
liba-4	MSILISP ^{DN} NRGWG	--TMMRRSRSRSTMRRRPA ^{MR} GTGVRRRIRRALTAAPMTIRLLGLG-RRLLPRT
Mastadenovirus		1-es típus
humán-7	MSILISP ^{DN} NTGWG	-----LYAPTK ^{MY} GGAR-----IRATQHPVVRVGRH
simian-1	MSILISP ^{DN} NTGWG	-----LGS-GK ^{MY} GGAK-----RRSSQHPVVRVGRH
canin-1	MAILISP ^{DN} NTGWG	-----LGT-HKL ^F GGAK-----QKSDQHPVYVQAH
denevér TJM	MAILISP ^{DN} NTGWG	-----LGS-HR ^L GGAK-----QKSDQHPVVFRAH
Atadenovirus		2-es típus /deviáns 2-es típus
gyík-1	MSILISP ^{DN} TGWG	-----LGNCR ^I RGTA-----RFTLGTVPVVRHYYRA
gyík-2	MSILISP ^{DN} TGWG	-----LGNCR ^I RGTA-----RFTLSTPVPVVRHYYRA
t. kaméleon (1)	MSILISP ^{DN} TGWG	-----VGNAR ^I RGTL-----HWSDIQPVVRVQK
t. kaméleon (2)	MSILISP ^{DN} TGWG	-----VGNAR ^I RGTL-----HWSDIQPVVRVQK
boa (kígyó-1 var.)	MSILISP ^{DN} TGWG	-----LGNCR ^I RGTL-----TFTDSTPVSVRH
kígyó-1	MPILISP ^{DN} TGWG	-----LGKLR ^I RATGL-----TFTDSTPVSVRH
bovin-4	MSILMSP ^{DN} TGWG	-----IGTAL ^M RATGV-----KFSKRQPVVRVP
ovin-7	MSILVSP ^{DN} TGWG	-----IGTSS ^M RATGL-----KFSKKQPVVRVP
varánusz-2	MSILMSP ^{DN} TGWG	-----CSIGTGR ^I RGTV-----VFTPAQPVVRVS
agáma-1	MSILISP ^{DN} TGWG	-----IGTSL ^L RGTL-----RYRRAQPVVHSHYRS
kacsa-1	MSILMSP ^{DN} TGWG	-----LGTRL ^L RATGL-----RFSEREFPVVRVS
fűgyík-1	MSILISP ^{DN} TGWG	-----VGSRL ^M RATGVRAADLARLSCLRHLQGLGTHFSRQQPVVRVP
béka-2	MSILISP ^{DN} TGWG	-----VKCSTRGKIGTNL ^I RGTP-----RFTRETFPVNVTK
Siadenovirus		1-es típus
raptor-1	MSSIVYSP ^{DS} RGWIGNTAMR	-----AY ^L I ^G GGAL-----EPSDVYTVRVRE
szkua-1	MASIVYSP ^{DS} RGWIGNSAMRD	-----Y ^L L ^V GGAL-----EPSDVYTVRVRE
pulyka-3	MHSVYSP ^{DS} RGWIGNSSMRD	-----Y ^L L ^I GGAL-----QPSDIYTVRVRE
béka-1	MTAVLLSP ^{DN} RGWIGARMRGSG	-----V ^L L ^V GGAS-----APSDVYTEHVRG

25. ábra Proteolitikus hasítási helyek az AdV-ok pVII fehérjében. Aláhúzással jelöltek az általunk szekvenált vírusok nevei. Az első, minden genusban megőrzött hasítási helyet kék hátterezés és keret jelöli. Zöld háttér jelöli a genus specifikus hasítási helyek közül azokat, melyek megfelelnek az eddig leírtaknak. Az atadenovírusokban először felismert, nem rendhagyó szekvenciájú konszenzusok sárgával hátterezettek, akárcsak a vírus neve, melyből kimutattuk őket.

BAdV-4	MKVVHVLKPSRRRKRSTRKKIFLKRYSTPIVLNKE ^{LTGGFL} PALIP ^I IAAAISAAPAIAGTVIAAQNAKRS	71
BAdV-6	MKVVHVLKPSRRRKRSTR-KHFLKYSTPFVLKKE ^{LQGGFL} PALIP ^I IAAAIGAAPAIAGTVIAAQNAKAFLN	72
OAdV-7	MKVVHVLKSPHRRRHTRRYKLLKINLSPYILPKEL ^{QGGFL} PALIP ^I IAAAISAAPAIAGTVIAAKNANRS	71
DAdV-1	MRRSRSYGGLRYGHSVVRYRRSSQVRRARRRRR ^{LKGGFL} PAI ^I PLIAAAISAAPAIAGTVIAAKNAR	67
VAdV-2	MAVRLKIVKLQRRRRRPPVRRTPKRTDRSLARRRRGR ^{MRGGFL} PLLIP ^L LSAAIGAAPAIAGTVLMAKNQNRG	76
SnAdV-1	MARLRAKRTSYRRRRRTTRTRTVTRTARS ^T VRRRGGRIVYRTSKTTRVGTTR ^{MRGGFL} PLLAP ^L ILAAAIGSIPGI ^V IAAKQK	84
GLAdV	MVRLVRLRRTRRRRRRIVSS ^T LLVPRRRRTGNRNKRVRIGTRR ^{MRGGFL} PLLIP ^L IAAAIGAI ^P GIAGT ^I IAAKQS	78
PCAdV	MVTVRVRRPYHRRQRRRTRVTRTETVVRARSSNGRRRIVYQTSKMTKVGNNRR ^{MRGGFL} PLL ^L LLGPI ^I ASAIGAVPG ^I VMAAKSR	87
LAdV-1	MARLRLVTCRTARTHTRRRPRRRVTRSRVT ^R TRTRVTRRGGHNVYK ^T MRKTAKIGSRR ^{MRGGFL} PLLAP ^L ILAAAIGAI ^P GI ^V VVAARQK	88
LAdV-2	MARLRLVTCRTARTHTRRRPRRRVTRSRVT ^R TRTRVTRRGGHNVYK ^T MRKTAKIGSRR ^{MRGGFL} PLLAP ^L ILAAAIGAI ^P GI ^V VVAARQK	88
AgAdV-1	MVTAVVIKRRRRRPRRRYVYTSRPRCALRRRRRM ^{MRGGFL} PLLAP ^L ILAAAIGSIPGI ^V VMAAKQR	64
FrAdV-2	MVVRRRRSKRTKRS ^P VSHIRRRRRPRRRNSNRK ^{LKGGFL} PALIP ^I IAAAIGTIPGIAGAVIASKQNR	66

26. ábra Az atadenovírusok eddig ismert teljes pX aminosav szekvenciái. Megfigyelhető, hogy minden hulló eredetű atadenovírusban (ezek a nevek félkövér betűkkel) egységesen az MRGG^F hasítási szignál (sárga háttér) található, ellentétben a nem-hulló eredetűekkel. A proteolízis után aktiválódó megőrzött transzmembrán domén dőlttel szedett. Az általunk szekvenált vírusok nevei szürke háttérűek. (Rövidítések: AgAdV – szakállas agáma-AdV, BAdV – bovin AdV, DAdV – kacsa-AdV, FrAdV – béka-AdV, GLAdV – fűgyík-AdV, LAdV – gyík-AdV, PCAdV – törpekaméleon-AdV, SnAdV – kígyó-AdV, VAdV – varánusz-AdV.)

Az L régió génjei közül a pentonbázis szekvenciáját sikerült meghatározni a két LAdV mellett a FrAdV-2 és a PCAdV genomjából. A motívum, mely a fiber farok kötődési helyeként szolgál, meglehetősen megőrzött, és RLSNLLG az as szekvenciája a humán AdV-okban (Roberts *et al.*, 1986b). A szekvencia a két gyík AdV-ban RINNMLG, a PCAdV-ben RLNNMLG, melyek jobban emlékeztetnek a SnAdV-1-ben leírtra (RISNMLG) (Farkas *et al.*, 2002). A FrAdV-2-ben a legnehezebben felismerhető a motívum, mely egy as-val rövidebb is: RNMQLG. A többi ismert atadenovírushoz hasonlóan az RGD motívum, mely a sejtfelszíni integrinokkal létesít kapcsolatot, nem volt jelen (Mathias *et al.*, 1994).

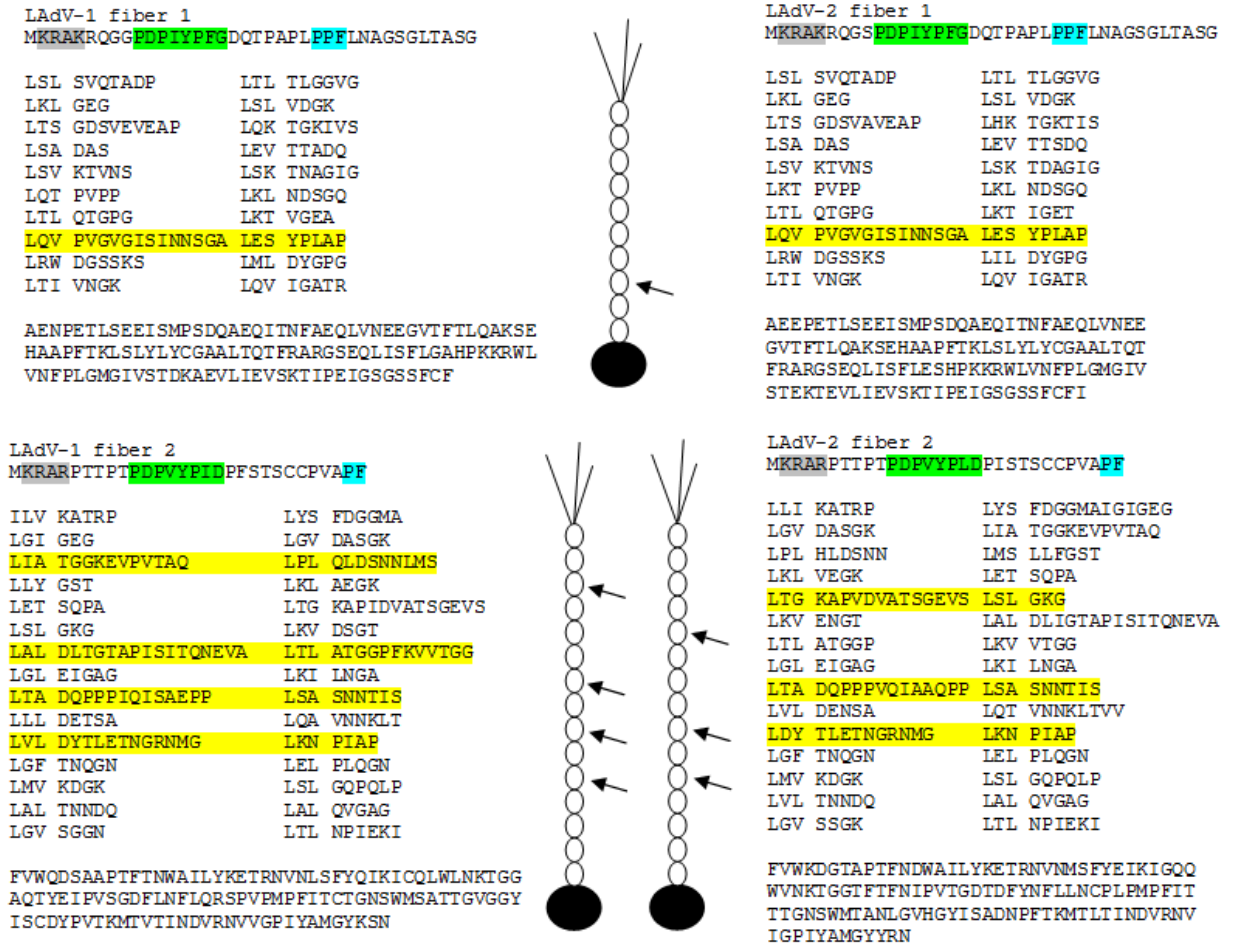
Az L régió szerveződése a továbbiakban nem mutatott eltérést a többi AdV-hoz képest. A szintén az L régió részét képző fiber gént a következő fejezet tárgyalja.

5.1.2.4 Fiber

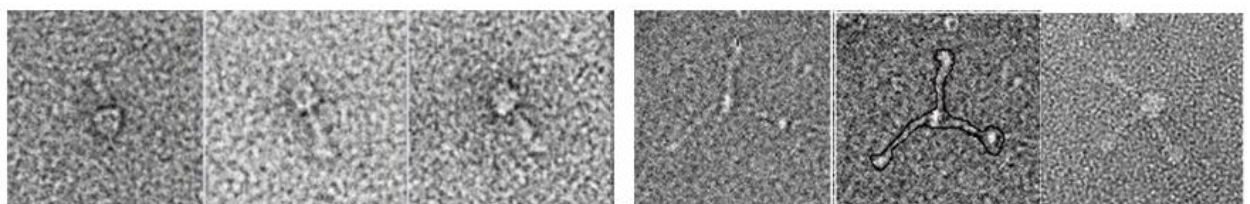
Az antenaszerű fiber génje az utolsó tagja az MLP-ről kifejeződő géneknek az L régióban. A fehérje az N-terminális közeli farki, az ezt követő szár, és végül a C-terminális felőli feji végből áll (Louis *et al.*, 1994). Ez utóbbi a legvariábilisabb, mivel a gazdasejt receptorához való kötődés a feladata. A pentonbázishoz csatlakozó farki rész a legmegőrzöttebb. A szár régió egy hármass β -spirál, mely váltakozó számú álméltlődésekből áll. Általában 16 as alkot egy periódust (van Raaij *et al.*, 1999).

Meglepetésünkre, mindkét LAdV-ban két, kissé eltérő méretű fiber gént találtunk. Az első gén egy rövidebb (fiber1), míg a második egy kb. 1,5x hosszabb fehérjét (fiber2) kódol. Két fiber gént korábban csak a *Mastadenovirus* és az *Aviadenovirus* genus tagjaiban mutattak ki. Két, tandem pozícióban lévő fiber gén fordul elő a HAdV-40 és 41-ben (Yeh *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2012) és néhány majom-AdV-ban (Kovács *et al.*, 2005; Chiu *et al.*, 2013), de ezek termékei - egy rövidebb és egy hosszabb fiber fehérje – egyesével, alternatív pentonbázisokba ágyazva jelennek meg a virionban. A mastadenovírusok csúcsonként egy fibert és túlnyomó többségük genomként egy gént tartalmaz. Ezzel szemben, az *Aviadenovirus* genus tagjaiban a pentonbázis az eddig megfigyelték szerint két fiber fehérje trimert hordoz, függetlenül attól, hogy azokat egy vagy két gén kódolja (Hess *et al.*, 1995; Chiocca *et al.*, 1996; Kaján *et al.*, 2012; Marek *et al.*, 2012).

A LAdV-ok fibereinek szerkezeti predikcióit és modelljét a 27. ábra mutatja be, míg elektronmikroszkópos felvételeik a 28. ábrán láthatók. Mindkét LAdV-ban az első fiber gén volt rövidebb. A származtatott fehérje 331 as-ból állt. A két vírus rövidebb fibere között 95% azonosságot állapítottunk meg. Mindkettő a SnAdV-1 fiberéhez állt a legközelebb, 51-52% as-sorrend azonossággal.



27. ábra Az 1-es (LAdV-1) és a 2-es (LAdV-2) típusú gyík-AdV fiber proteinjeinek aminosav-sorrendjei és szerkezeti predikciója. A régiók farok-szár-fej sorrendben ábrázoltak, megfelelően a szerkezet vázlatos rajzával. A farok régió magi lokalizációs szignálját sűrű, a pentonbázis-kötő motívumot zöld, az ismeretlen funkciójú PPF motívumot kék háttér jelöli. A szárnban a tripla β -spirál szabálytalan fordulatai sárgával vannak kiemelve.



fiber1

fiber2

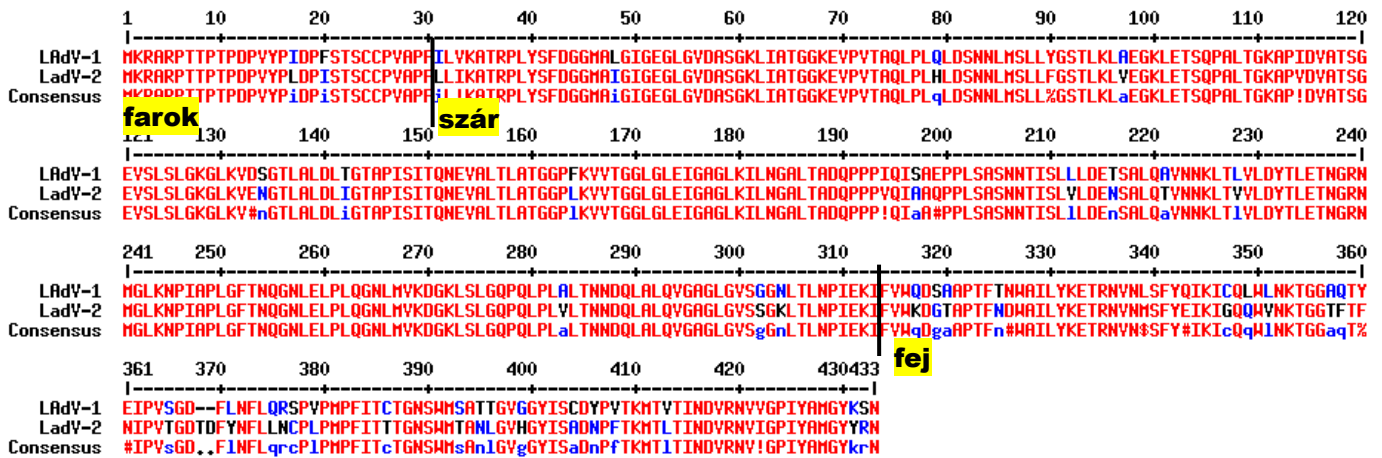
28. ábra Elektronmikroszkópos felvételek a 2-es típusú gyík-adenovírus pentonjairól. Az első három felvételen az 1-es, a jobboldali három a 2-es fiber látható (Rosa Menéndez-Conejero felvételei).

Az N-terminális felőli farok régióban kimutatható a megőrzött nukleáris lokalizációs szignál (NLS), mindkét esetben KRAK motívummal (Hong és Engler, 1991). Szintén megőrzött mindkét vírusban a pentonbázishoz való kötődést szolgáló motívum (PDPIYPPFG), valamint az ismeretlen funkciójú PPF szekvencia is (Caillet-Boudin, 1989). A szár 10, viszonylag szabályos ismétlődést tartalmaz, melyek közül csak egy hosszabb fordul elő. A predikciók alapján megállapított szárhossz megfelel a Carmen San Martin kutatócsoportja által végzett elektronmikroszkópos vizsgálatok során tapasztaltaknak. A SnAdV-1 fibere jóval hosszabb, 14 ismétlődést tartalmaz (Farkas *et al.*, 2008). A fej régiót csak hozzávetőlegesen tudtuk kijelölni, mivel a mastadenovírusokra jellemző, a fej kezdetét jelző TLWT motívum az atadenovírusokban nincs jelen. A fej régió mindössze 123 as hosszú, mely meglehetősen rövid, akárcsak a többi atadenovírusban. Ez a régió a mastadenovírusokban kb. 180 as, az aviadenovírusokban 200 as feletti, ugyanekkor SnAdV-1-ben csak 111 as.

A 2-es fiber as szekvenciája mutatta a legnagyobb eltérést a LAdV-1 és 2 homológ génei között; csupán 87%-ban azonosak as szinten, míg a többi gén esetén ez nem esik 92% alá (29. ábra). A különbségek zöme a fej régióra korlátozódik. A többi AdV-sal összehasonlítva mindkettő a denevér-AdV-3 (Li *et al.*, 2010) fiberével eredményezte a legmagasabb egyezést (31% - LAdV-1, 35% - LAdV-2), ami egy mastadenovírus. A farki régióban az NLS szekvenciája egyértelműen azonosítható (KRAR), akárcsak a pentonbázis-kötő motívum (PDPVYPID ill. PDPVYPLD). A PPF motívumból azonban mindkét esetben csak PF van jelen. Mindkét 2-es fiber szár 15 ismétlődést tartalmaz, ám a 16 as-ankénti rendezett struktúra kevésbé nyilvánul meg. A LAdV-1 esetén 4, a LAdV-2 esetén 3 „törés” mutatható ki benne. A TLWT motívumból pusztán a triptofán (W) van jelen.

Az AdV-ok strukturális diverzitását vizsgálják a madridi Spanyol Nemzeti Biotechnológiai Központ Szerkezeti Biológiai Intézetében. Mivel a LAdV-2 mind genom-szerveződése, mind pedig gazdaeredete alapján különlegesnek tűnt, együttműködést kezdeményeztek a LAdV-2 proteomikai tanulmányozására. A virionban mindkét fiber fehérje jelenlétét sikerült kimutatni. A pentonokról készült EM felvételeken is kétféle struktúrát figyeltek meg; bizonyos pentonbázisokon egyetlen rövid fiber, míg másokon 3, hosszabb fiber látható. Valószínűsíthető tehát, hogy a fiber1 áll egyedül, míg a fiber2 hármásával helyezkedik el. A tény, hogy nem sikerült az univerzális integrin-kötő RGD motívumot kimutatni a pentonbázisban, arra enged következtetni, hogy a fiberek többféle receptorhoz is képesek kötődni. A HAdV-41 esetén bebizonyosodott, hogy csak a hosszabb fiber képes a CAR-hoz csatlakozni (Roelvink *et al.*, 1998), míg a FAdV-1 csak működő hosszú fiberek esetén képes CAR-ral rendelkező emlős sejtek fertőzésére (Guardado-Calvo *et al.*, 2007). A rövid fiberek receptorát még nem ismerjük, de minden bizonnyal egy másik receptorról van szó. Az RGD motívum nem található meg sem a HAdV-41, sem a FAdV-1 pentonbázisában.

Feltételezhető tehát, hogy a LAdV-ok különböző fiberei is az univerzálisabb kötődést szolgálják.



29. ábra A két gyík AdV fiber2 fehérjéjének pozicionális illesztése. Megfigyelhető, hogy a két vírus fehérjei közötti legjelentősebb eltérés a fej, valamint a szár régió fejhez közelebb eső szakaszában van jelen.

Végig kell még azt is gondolni, hogy több fiber hogyan helyezkedhet el egy pentonbázison. Azoknak az aviadenovírus fibereknek az as szekvenciájában, melyekből kettő van egy vertexen, egy ún. poliglicin stretch található, mely glicin reziduumok sorozatos ismétlődése a farki régiókban. Az ilyen motívumok a rugalmas fehérjerégiókat jellemzik (Miller *et al.*, 2009). A LAdV fiberekben nincs ilyen G-stretch, azonban 2-es fiber farki régiója meglepően rövid. A szár struktúrája a hármásával elhelyezkedő fiber-2 esetén sokkal rendezetlenebb. Valószínű, hogy a LAdV-1 és 2 fiberei számára ezek, az EM felvételen is jól látható elcsúszások biztosítják a hosszú szárok számára a receptor kötéséhez szükséges hajlékonyságot.

5.1.2.5 E4 régió és a genomok jobb vége

Legvariábilisabbnak a fiberektől jobbra elhelyezkedő „E4” régiót és az ezt követő szakaszt találtuk. Az atadenovírusokra jellemzőnek tűnt, hogy ez a szakasz rövidebb, mint a mast- vagy aviadenovírusok esetében, ám hosszabb, mint a siadenovírusokban (Davison *et al.*, 2003; Farkas *et al.*, 2008). Mindkét LAdV-ban az itt található gének száma jóval meghaladja a többi atadenovírusét. Azt, hogy mennyire dinamikus itt az evolúció, jól tükrözi a két LAdV közti 3645 bp különbség, mely a LAdV-1 kettővel több génjében jelentkezik a LAdV-2 itt található 13 génjén felül.

Közvetlenül a fibert követően, az / szálon azonosítottuk a három E4 gént, melyek helyzete és hossza nem tért el jelentősen a SnAdV-1-étől. Azonosítottuk az E4.1 gént is, melynek homológja minden atadenovírusban megtalálható, kivéve a DAdV-1-et, ahol egy

leolvasási keret-elcsúszás miatt ez az ORF feltehetően nem működik génként (Hess *et al.*, 1997).

Az I szálon következő ORF7 egy rövid gén, melynek csupán a SnAdV-1 genomjában van homológja. Eddig úgy gondoltuk, hogy az ORF jelenléte specifikus tulajdonsága a SnAdV-1-nek, azonban, amennyiben az atadenovírusok pikkelyes hüllő-eredetét vesszük alapul, ez valószínűleg egy pleizomorf tulajdonsága a hüllő-atadenovírusoknak.

Az I szálon található RH (right hand) régió megléte szintén tipikus tulajdonsága a genusnak. A régióban gyakoriak a duplikációs események. Típustól függően az eddig vizsgált atadenovírusokban az RH gének száma 1 és 6 közötti. A SnAdV-1 genomjában egyetlen RH gén található, így az alacsony számot tekintjük ősi tulajdonságnak. Ezt a két LAdV egyetlen RH génje is alátámasztja. A nem-hüllő atadenovírusok RH génjében kimutattak egy ún. F-box motívumot (Both, 2008). Ez az egyetlen része a fehérjének, ami eukarióta-eredetű fehérjékkel homológiát mutat, ahol a sejtciklus szabályzásában játszanak szerepet az egyes ciklin fehérjék ubikvitinizációjával, azaz degradációra való kijelölésével (Bai *et al.*, 1996; Patton *et al.*, 1998). Feltételezhető tehát, hogy a nem-hüllő atadenovírusokban a gazdaváltás a sejtciklus befolyásolását követeli meg, emiatt vannak jelen ezek az RH génjeikben (Both, 2008). A LAdV RH gének szerveződése viszont felveti a kérdést, hogy vajon a gén duplikációja utáni másodlagos összeolvadásról van-e szó, vagy csupán ez az a köztes állapot, amelyből a további RH gének keletkeztek. Valószínűbbnek véljük, hogy a stop kodon másodlagosan tűnhetett el, melyre bizonyíték a meglehetősen sok egyező motívum a gén két felében. Feltehetően az F-box motívum már jelen volt a jobbra eső ős-RH-ban amikor az összeolvadás megtörtént, ez megmagyarázná, miért esik olyan távol a jelenlegi fehérje N-terminálistól.

A genom RH régiójától jobbra lévő 8 ill. 6 gén közül csupán 3-nak ill. 2-nek van homológja más AdV-okban. Az r szálon elhelyezkedő ORF1 egyetlen homológja a DAdV-1 ORF1 génje, melynek funkciója tisztázatlan, és eddig a DAdV-1-re specifikusnak gondolták (Hess *et al.*, 1997). A LAdV-2-ben a protein 147 as hosszú, a LAdV-1-ben viszont csak 92 as. Megfigyeltük azonban, hogy a teljes frame megtalálható itt is, ám 136 as után beékelődő 23 bázis 4 stop kodont is tartalmaz, „elrontva” ezzel a leolvasási keretet. Mind a két LAdV annotálása közben megfigyeltük, hogy az eleinte start kodonnak gyanított metionin előtt a leolvasási keret még 220 ill. 221 bp hosszan folytatódik. Mind a két LAdV-ban találtunk egy potenciális splice akceptor helyet az upstream stop kodonhoz közel. Az ORF-től balra elhelyezkedő összes potenciális donor helyet megvizsgáltuk, hogy a hozzájuk tartozó leolvasási keret ugyanolyan megőrzött-e mindkét vírusban. Végül egyetlen ilyen ORF-et sikerült találni, mely a donor hely előtt 33 as-at kódol, közel ugyanabban a pozícióban helyezkedik el mindkét vírusban, a szekvenciája pedig csupán 1 as-ban különbözik. A feltételezett intron hossza 2339 ill. 2337 bp. A DAdV-1 esetén, mely ORF1 génje 69%-os

egyezést mutat a LAdV ORF1 génekkel, nem tartalmaz akceptor helyet, és csupán 18 bp helyezkedik el a start kodon és az azt megelőző stop kodon között. Mivel az ORF1 funkciója tisztázatlan, nehéz megmondani, hogy mi lehet a LAdV-ok splice-olt ORF1 génjének biológiai jelentősége. Ami a LAdV-1 ORF1 génjének pseudogénné válását illeti, valószínűsítjük, hogy nagyon újkeletű mutációról van szó, ahol az sem zárható ki, hogy a jelenlegi állapot csupán a sejtenyészeten való passzálások eredménye és a vad típusú vírusban nincs ilyen mutáció. Ez megmagyarázná, hogy miért maradt meg a frame többi része – beleértve a donor helyet is – ép állapotban. Továbbá arra engedne következtetni, hogy az ORF1 terméke a patogenitásban játszik szerepet.

A 105R gént először a mókuscickány-AdV-ban mutatták ki (Schöndorf *et al.*, 2003) (*Mastadenovirus*), ahol az *r* szálon helyezkedik el és egy 435 as hosszú fehérjét kódol. Homológiát más mastadenovírusokban nem, de a SnAdV-1 genomjában azonosították (Farkas *et al.*, 2008), ahol szintén a genom jobb végéhez közel, ám az ellentétes (*l*) szálon helyezkedik el. A fehérje mérete mindössze 178 as. A két LAdV 105R génje egyaránt 471 as hosszú terméket kódol, melynek szekvenciája 94%-ban egyezik egymással, és közelebb állnak a mókuscickány AdV 105R génjéhez (30% azonosság), mint a SnAdV-1-éhez (27%). Az N-terminális részükben, mellyel homológ szakaszt a másik két vírus fehérjéje nem tartalmaz, egy Ig domén mutatható ki, mely a V-típusú immunglobulinok közé tartozik. Ig doméneket eddig csak aviadenovírusokban írtak le (Davison *et al.*, 2003; Kaján *et al.*, 2010; Kaján *et al.*, 2012). Az Ig doméneken kívüli részek között azonban homológia nem mutatható ki, ezért valószínű, hogy a domént is eltérő evolúciós úton vették fel. V-típusú Ig domént tartalmaznak többek között egyes T-sejt felszíni glikoproteidek, sejtadhéziós molekulák (JAM-ok), és a CAR receptorok (Smith és Xue, 1997). Feltételezhető, hogy a 105R fehérjének, amennyiben részt vesz a virion felépítésében, fontos szerepe van a receptorhoz való kötődésben és a vírus-immunrendszer kölcsönhatásokban. Egyedülálló módon az AdV-k között a LAdV-1 genomjában két gén is homológiának bizonyult a 105R-rel. A 105R 2 as szekvenciája 26% ill. 20% azonosságot mutat a SnAdV-1 és a mókuscickány AdV 105R-rel, és 19%-ot a LAdV-2 105R-rel. A LAdV-1 105R 1-gyel ez az érték 25%. A származtatott fehérje hossza 647 as, így ez az eddigi leghosszabb 105R gén. Feltételezhetően ez is a vírus-immunrendszer interakciókhoz kötődő fehérje lehet; a BLAST homológia keresés alapján 33% azonosság mutatható ki NK sejtek felszíni receptoraival, valamint kétféle Ig domén (Ig, C-típusú Ig) is fellelhető benne.

A további 5, a LAdV fajon kívüli homológokkal nem rendelkező ORF génként való működését és funkcióját csak feltételezni tudjuk. Az *r* szálon jobbra haladva még egy ORF található, az ORF2, mindkét vírusban. Homológia keresés alapján a kódolt fehérje a C-típusú lektinek családjába tartozik, mely családba tartozó proteinek vírusokban (pox- és asfarvírusok) és egyes eukarióta immunsejtekben (NK sejtek felszíni receptorai, lymphociták

CD69 receptorai) vannak jelen. Pontos funkciójuk a vírusokban nem ismert, de feltételezhető, hogy az immunrendszerrel való kölcsönhatásokban van szerepük (Fukuda *et al.*, 1999; Neilan *et al.*, 1999; Wilcock *et al.*, 1999; Alfonso *et al.*, 2000). A LAdV-1 ORF2 nagymértékű hasonlóságot mutat különböző teknősfajok ezen családba tartozó fehérjéivel, míg a LAdV-2-ben a hasonlóság inkább poxvírusokkal és emlősök C-lektin fehérjéivel jelentős. Ez az első eset, hogy AdV-okban e fehérjecsalád génjére emlékeztető ORF-et találnak.

Az ORF4 as szekvenciájában mindkét vírusban kimutatható egy ún. coiled-coil motívum a 36. és a 60. as között. Az ilyen motívumok jellemzőek a transzkripció faktorokra, és általában a génexpresszió szabályzásában játszanak fontos szerepet (Mason és Arndt, 2004). A mastadenovírusok IX-es jelű fehérjéjében, melynek a többi genus egyik tagjában sincs homológja, is leírtak ilyen motívumot. A IX-es jelű fehérjének, mint szerkezeti fehérje, a kapszid stabilizálásában van szerepe, de transzkripció faktoroként az MLP aktiválásában is részt vesz (Lutz *et al.*, 1997; Rosa-Calatrava *et al.*, 2011). Feltételezhető, hogy – homológok hiányában – az ORF4-ről keletkező fehérje ezzel azonos szerepet tölt be a LAdV-okban. Két további, csak LAdV specifikus ORF (ORF3, ORF6) funkciója ismeretlen, szekvenciájuk alapján erre következtetni sem tudunk. Ugyanez mondható el a csak a LAdV-1-ben megtalálható ORF5-ről is. Az ORF6 a régió harmadik (LAdV-1), valamint a második (LAdV-2) legnagyobb méretű fehérjéjét kódolja, mely 415 as hosszú.

5.1.3 Filogenetika és törzsfá-rekonstrukció

Bármelyik fehérje alapján készített törzsfán jól látható, hogy az öt nemzetség tagjai monofiletikusak, a genusok jól elkülönülnek egymástól. A törzsfák egyúttal nyilvánvaló bizonyítékok a vírusok és gazdafajok közötti koevolúcióra is (Benkő és Harrach, 2003). A diagnosztikai vizsgálatok során meghatározott rövid DNS-polimeráz szekvencia alkalmasnak bizonyult a genus-szintű besorolásra (10. ábra). A nemzetségen belüli evolúció vizsgálatához azonban nem volt megfelelő, csupán durvább következtetéseket lehetett ez alapján levonni. Ennek oka a szekvencia rövidsége mellett annak megőrzöttsége is. A régióra tervezett primerek ezért feltehetően minden AdV nemzetség tagjait felismerik. Az újonnan kimutatott PCAdV a legtöbb hulló atadenovírust tartalmazó monofiletikus csoportba került. Ezzel szemben úgy tűnik, a szintén újonnan kimutatott GLAdV és VAdV-2, a korábban leírt VAdV-1-gyel együtt (Papp *et al.*, 2009), egy külön monofiletikus, eddigi legősibb ágát adják az atadenovírus-kládnak. Ez nem látszik a hosszabb szekvenciával készült törzsfán (11. és 13. ábra), viszont egyértelműen bizonyítja a vírus atadenovírusokhoz való tartozását. Úgy tűnik, a GLAdV a jelenleg ismert legősibb atadenovírus, ami megerősíti a genus Squamata-eredetét. A két LAdV részleges polimeráz,

pentonbázis, valamint teljes pVII szekvenciája – noha gazdafajaik a Varanoidea szuperfamilia tagjai – a többi pikkelyes hüllő-AdV között helyezkedik el. Figyelembe kell venni azonban, hogy a VAdV-2 bazális helyzete nem áll fent sem a pVII (13. ábra), sem a pentonbázis alapján készült törzsfák (11. ábra) esetében sem. Valószínű, hogy a DNS-polimeráz génnek e rövid, megőrzött szakasza nincs kitéve olyan mértékű szelekciós nyomásnak, mint a genom többi része.

A régi zootaxonomiai rendszerek az Iguania kládot (leguánok, agámák és kaméleonok) a pikkelyes hüllők egy bazális csoportjaként kezelték, de egyre inkább bebizonyosodik, hogy nem tartható az Iguania–Scleroglossa testvércsoport szintű elkülönülés (Albert *et al.*, 2009; Wiens *et al.*, 2012; Pyron *et al.*, 2013). Sőt, előbbi egy meglehetősen apomorf kládnak tűnik beágyazva a korábban Scleroglossa néven egyesített pikkelyes hüllők közé. Ezzel az eredménnyel összhangban vannak az AdV törzsfák is. A Lacertidae családot – az Iguaniától eltérően – mindig apomorf, a Varanoidea szuperfamilia testvércsoportjaként kezelték, ennek ellenére egyre inkább a család ősből mivolta látszik beigazolódni. Ezt erősítette a pikkelyes hüllők AdV-ainak evolúciós vizsgálata.

A FrAdV-2 a DNS-polimerázon alapuló rekonstrukció során monofiletikus csoportban jelent meg a nem-hüllő eredetű AdV-okkal (10. ábra). Ez valószínűsíti, hogy a vírus nem a kételtűekkel együtt fejlődött, hanem gazdaváltás eredményeként került a nyílméreg-békákba. Noha a pentonbázis alapján a vírus őseinek tűnik, ez mégsem zárja ki a gazdaváltás tényét, mivel a GLAdV pentonbázis szekvenciáját nem ismerjük. Feltételezhető, amit a pVII alapján készült fa is megerősít, hogy egy nagyon régi gazdaváltásról van szó.

A pVII alapján készült törzsfarekonstrukción megfigyelhető (13. ábra), valamint a prekursor fehérje 2. proteolitikus vágáshelye alapján elkülöníthető (25. ábra) csoportok nem feleltethetők meg egymásnak. Úgy tűnik, hogy a hasítási hely többször is oda-vissza alakulhatott evolúciója során (13. ábra).

A genus-specifikus p32K részleges as szekvenciáján alapuló fán megfigyelhető a hüllő-, illetve nem-hüllő atadenovírusok monofiletikussága (12. ábra). Ez a többi fán nem mutatkozott ilyen egyértelműen.

Az RH génekkal végzett rekonstrukció három nagy kládot különít el (14. ábra). Ezek közül a legbazálisabb tartalmazza a LAdV RH(1) génjét a kérődző-AdV-ok RH6 és a BAdV-4 RH1 génje mellett. A másik két klád közelebb van egymáshoz. A LAdV RH(2) ugyanabba a csoportba került, mint a SnAdV-1 RH génje, valamint a DAdV-1 két RH homológja. Ez megerősíti azt a feltételezést, hogy a két gén másodlagosan olvadt össze, mivel azok eltérő evolúciós eredettel bírnak. Mivel mindhárom kládban megtalálhatók olyan RH gének, melyek már tartalmazzák az F-box motívumot, valószínűsíthető, hogy a nem-hüllő atadenovírusok olyan ősektől származnak, ahol már kialakult ez a motívum. Lehetséges az is, hogy a SnAdV-1 RH génje másodlagosan veszítette el azt.

5.1.4 G+C tartalom

Az *Atadenovirus* nemzetség neve az elsőként tanulmányozott, ide tartozó vírusok genomjának magas A+T arányára utal. Az eddig szekvenált hüllő-atadenovírusok azonban mind kiegyenlített (~45-50%) G+C aránnyal rendelkeznek (Wellehan *et al.*, 2004; Farkas *et al.*, 2008; Papp *et al.*, 2009; Hyndman és Shilton, 2011; Ascher *et al.*, 2013; Ball *et al.*, 2014a). Ezt megerősítik az általunk kimutatott új atadenovírusok is (8. táblázat). Ez a különbség a G+C arányban a hüllő és nem-hüllő gazdák között szintén alátámasztani látszik az atadenovírusok hüllő eredetét. Ugyanis mind DNS- (Shackelton *et al.*, 2006) mind RNS- (Poss *et al.*, 2006) vírusok esetén megfigyelték, hogy a genom bázis-összetéte az A+T irányba eltolódik, ha új gazdafajt fertőznek meg. Elképzelésünk szerint tehát a megnövekedett A+T arány az új, nem hüllő gazdaszervezethez való adaptálódást szolgálhatta. Az *Atadenovirus* nemzetségen kívül még a *Siadenovirus*-ra jellemző a nagyon alacsony (34,9-38,5%) G+C arány. E nemzetség evolúciós gazdaeredete pillanatnyilag tisztázatlan, és minden eddigi esetet gazdaváltásnak tekintenek. Ezt alátámasztja, hogy minden siadenovirust beteg vagy elhullott állatból mutattak ki (Kovács *et al.*, 2010; Harrach *et al.*, 2011). Hasonló megbetegedéseket atadenovírusok is okozhatnak kérődzőkben (Woods *et al.*, 1996; Debey *et al.*, 2001; Graham *et al.*, 2005) és madarakban is (Das és Pradhan, 1992; Bidin *et al.*, 2007; Cha *et al.*, 2013). A FrAdV-2 extrém alacsony G+C tartalma is alátámasztja az elképzelést, miszerint ez a fertőzöttség gazdaváltás útján jött létre. Ezzel összhangban van az is, hogy a vírust komoly mértékű elhullás során mutattuk ki metamorfózison nemrég átesett, fiatal példányokban.

Mind az újonnan kimutatott hüllő AdV-ok, mind a már korábban leírtak DNS szekvenciája a 45-55%-os G+C tartalom mellett is bizonyos fluktuációt mutat. Kiemelkedik a VAdV-2 és az AgAdV-1 55% feletti G+C tartalma. A jelenség oka esetleg a gazdafaj genomjának G+C tartalmával lehet összefüggésben.

5.2 Parvovírusok

5.2.1 PCR-es szűrővizsgálatok; prevalencia és diverzitás

Az általunk tervezett és használt PCR rendszer egyértelműen alkalmasnak bizonyult a hüllőkben előforduló dependoparvovírusok rutin kimutatására. Azokban az esetekben is sikeres volt a kimutatás, ahol helper vírus hiányában PV csak kis mennyiségben volt jelen (16. ábra). Hasonlóan hatékony primereket a *rep*-re nem sikerült tervezni. Két eltérő, degenerált primer garnitúrát alkalmaztunk egy rövid szakasz felerősítésére is. Az ásógyik mintából egyik primer párral sem sikerült a génszakasz felerősítése. Ez vagy a minta

alacsony vírustartalmának tudható be, vagy a kromoszómális DNS-be integrálódott genomszakaszt detektáltunk a *cap* PCR-rel (Belyi *et al.*, 2010).

A szűrővizsgálattal alacsony (4,2%) prevalenciát figyeltünk meg az általunk vizsgált hüllőkben. Fajokra lebontva, a fertőzöttség a szakállas agámák esetében volt a legmagasabb. Négy új vírussal növeltük, azaz megháromszoroztuk a hüllőkből molekuláris úton kimutatott PV-ok számát. Ezek az első molekuláris adatok gyíkok PV-os fertőzöttségéről. A törpekaméleon-PV a legelső eset, hogy kaméleon-félékben (Chameleoniae) PV jelenlétét diagnosztizálják. Korábban csak egyetlen fajban, a szakállas agámában figyelték meg PV-ok jelenlétét (Jacobson *et al.*, 1996). Mivel akkor molekuláris alapú kimutatás nem történt, nem tudjuk megmondani, hogy a PhD munkám során kimutatott új BDPV ugyanez a vírus lehet-e.

A gabonasikló-PV a molekulárisan kimutatott kígyó-dependoparvovírusok között mindössze a harmadik a sorban. Korábban már több, a Colubridae családba tartozó siklófajban is leírták PV-szerű partikulumok jelenlétét, azonban molekuláris vizsgálatok nélkül (Heldstab és Bestetti, 1984; Ahne és Scheinert, 1989).

A *Trogonophis wiegmanni* PV amellet, hogy egy teljesen új, eddig le nem írt PV, egyúttal a legelső vírus, melyet ásógyíkokból (*Amphisbaenia*) mutatnak ki. Az *Amphisbaenia* elnevezésű csoport taxonómiai helyzete vitatott a herpetológusok körében, emiatt besorolása is folyamatosan változik. A jelenleg a pikkelyes hüllőkön belül suborder rangon nyilvántartott csoport tagjai a föld alatt élő, ásó életmódot folytató, megnyúlt testű, csökevényes végtagokkal rendelkező hüllők (Kearney, 2003). Filogenetikai elemzések alapján a csoport monofiletikus, és az óvilági teresztriális gyíkokkal (*Lacertidae*) van közeli rokonságban (Townsend, 2004; Wiens, 2012). A morfológiai alapú taxonómiai vizsgálatok szerint viszont más végtag nélküli pikkelyes hüllőkkel, így dibamidákkal és kígyókkal tartozhatnak egy csoportba (Conrad, 2008). Az új ásógyík PV, hasonlóan a többi hüllő-PV-hoz, a *Dependoparvovirus* nemzetség tagja.

5.2.2 Replikációs tulajdonságok

A 7 pozitív minta közül kettőben sem sikerült kimutatni semmilyen nagyméretű DNS-vírus jelenlétét. Helpertől független replikációra képes dependoparvovírusokat eddig kizárólag vízimadarokban írtak le (Le Gall-Reculé és Justin, 1994; Brown *et al.*, 1995; Zádori *et al.*, 1995). A GPV-t és a DPV-t korábban a csirke- és pulyka-PV-okkal (ma *Aveparvovirus* genus) gondolták egy nemzetségbe tartozónak. A teljes genomjuk analízise során azonban kiderült, hogy egyértelműen az akkor még csak főemlősökben ismert AAV-kal tartoznak egy genusba (Zádori *et al.*, 1995). Ez a felfedezés vezetett ahhoz az elgondoláshoz, hogy az autonóm replikációra képtelen, emlős AAV-ok valójában madár eredetű (ekkor még hüllő-PV-ok létezéséről nem voltak információk), autonóm őseiktől származnak (Zádori *et al.*, 1995; Lukashov és Goudsmit, 2001). A legelső hüllő-PV, a SAAV teljes genomjának szekvenáláskor végzett filogenetikai vizsgálatok alapján azonban utóbbi bizonyult ősiabbnak, így emiatt valószínűsítik a *Dependoparvovirus* diapsida-eredetét (Farkas *et al.*, 2004). Noha kísérletes bizonyíték máig nem áll rendelkezésre, eredményeink azt támasztják alá, hogy a hüllők dependoparvovírusai szintén képesek önálló replikációra.

5.2.3 A szakállas agáma parvovírus genomszerveződése; a hosszabb genomszakaszok részletes elemzése

5.2.3.1 Általános jellemzők és transzkripció

A szakállas agámákból kimutatott PV még csak a harmadik teljes virális genom, melyet gyíkokból határoztak meg, és az első, melyet nem izoláltak előzőleg. Emellett az első olyan gyík vírus, melynek genomszerveződése, és ezáltal evolúciója és taxonómiai hovatartozása is jól vizsgálható (az első kettő a – szintén ennek a munkának a keretében vizsgált – LAdV-1 és 2).

A genom hossza (4590 nt) – hasonlóan a SAAV-hoz – rövidebb, mint a *Dependoparvovirus* nemzetség többi tagjánál megfigyelt (Farkas *et al.*, 2004). A főemlősöket fertőző AAV2 genomja 4675 nt hosszú, melyből mindkét végen 143 nt-ot tesznek ki az ITR-ek. A SAAV genomja 4432 nt, ahol a genom mindkét végén 154 nt esik az ITR-ekre. A két ITR közötti régió alapján a BDPV jelenleg a legrövidebb genomú tagja a *Dependoparvovirus*-nak. A 257 nt-ból álló ITR-ek viszont a harmadik leghosszabbak a GPV és a DPV ITR-jei után (457, ill. 444 nt). Az ITR-eken belül 130 palindróm nt alkotja a hajtú-szerű, szabályos Y alakú másodlagos szerkezetet. Legközelebbi rokonának, a SAAV-nak a hajtúi jóval rövidebbek, ám a másodlagos szerkezet kialakításában közel ugyanannyi, 122 nt vesz részt. A Rep fehérje kötődési helyéül szolgáló szignál a dupla szálú szakaszban 18 nt-ra helyezkedik el a

trs-től (terminal resolution site), ahol a Rep elvágja a kétszálú DNS-t (Qiu és Pintell, 2008). Ez a távolság csupán egy nt-dal rövidebb a SAAV-ban. Az AAV-ok ITR szekvenciáinak minősége fontos szerepet játszik a gazdasejt genomjába történő integráció során (Galli és Cervelli, 2014). Elképzelhető, hogy a BDPV ITR-ek hosszú, egyszálú szakaszának is ez a funkciója.

A BDPV genom-szerveződése nem tér el jelentősen a dependoparvovírusokra jellemzőtől. A két ORF közötti, nem kódoló régió hossza megőrzött a *Dependoparvovirus* genusban, jellemzően 15–18 nt (Li *et al.*, 2010). Ebbe a tartományba mindhárom általunk vizsgált hulló-PV beleillik. A genus jellegzetessége a három RNS promóter megléte (Tijssen *et al.*, 2011). A BDPV genomban sikerült mindhárom promótert azonosítani. A TATA boxok pozíciói alapján 323 nt-nál a p5, 803 nt-nál a p19, és 1852 nt-nál a p40 helyezkedik el. Ezekről számítva az NS proteinek transzlációs start helyei 53 és 224 nt-ra következnek, míg a p40 TATA boxtól a VP1 start kodon 242 nt-ra található. Ezek az értékek 50, 164 és 284 a SAAV-nál (Farkas *et al.*, 2004) és 79, 104 valamint 411 a GPV és DPV esetén (Zádori *et al.*, 1995).

A BDPV genom az 1.704–3.203 nt közötti szakasza összehasonlítható a másik két hulló-PV-ével. A *rep* ORF-re tervezett primerek közül különböző garnitúrák működtek a CSPV és a PCPV esetén, így előbbiből 1.821, utóbbiból 1.500 bázis hosszú szakaszt nyertünk ki (19. ábra). A P40-nek megfelelő promóter a CSPV esetén 226, a PCPV esetén 244 nt-dal előzi meg a VP1 start kodonját.

A dependoparvovírusok esetében az alternatív splicing fontos szerepet kap a különböző funkciójú fehérjék előállításában (Qiu és Pintell, 2008; Tijssen *et al.*, 2011; Cotmore *et al.*, 2014). Az AAV2-nél az első akceptor hely után az NS fehérje C-terminálisához egy 16, illetve 7 as hosszú fehérjeszakasz kapcsolódik (Qiu és Pintell, 2008). A SAAV esetén az első akceptor helyet követő oligopeptid hossza 5 as, míg a második akceptor hely után rögtön stop kodon következik (Farkas *et al.*, 2004). A donor és akceptor helyek szekvenciája gyakran eltérhet az ismert konszenzustól (Qiu és Pintell, 2008). Az intron hossza az eddig részletesen vizsgált emlős eredetű dependoparvovírusok esetén 300 nt körüli (Ruffing *et al.*, 1994; Chiorini *et al.*, 1999), míg a madarakat fertőzőkben valamivel rövidebb, 205-215 nt között van (Zádori *et al.*, 1995; Estevez és Villegas, 2004). A SAAV-ban csak 160 nt, mely a legrövidebb dependoparvovírus intronhossz (Farkas *et al.*, 2004). Az általunk vizsgált mindhárom hulló-PV-ban szintén jóval 200 nt alatti ez a szám (10. táblázat). A feltételezett donor hely szekvenciája egyedül a CSPV esetén tér el a konszenzustól, míg az akceptor helyeknek – a BDPV kivételével – alternatív szekvenciája van. Az első akceptor hely után csupán a PCPV NS fehérjéjének C-terminálisra kap egyetlen as-ból álló farkat, míg a másik két vírusban stop kodon következik. A második akceptor hely után a BDPV és a CSPV NS fehérjéje 2, míg a PCPV esetében 3 as hosszú toldalékot kap.

Megelőzve a két feltételezett akceptor helyet – hasonlóan a többi dependoparvovírushoz – helyezkedik el a VP1 fehérje start kodonja. Mind a három hüllő-PV genomja 3 VP fehérjét kódol, melyek közül a VP2 fehérje start kodonja alternatív (ACG), hasonlóan a többi PV-hoz (Tijssen *et al.*, 2011).

A *Dependoparvovirus* nemzetség eddig vizsgált tagjait transzkripció profiljuk alapján három csoportra lehet osztani (Qiu és Pintel, 2008). Az első csoportba kizárólag a főemlősök vírusai tartoznak, nevezetesen az AAV1–AAV6, az AAV5 kivételével. Jellemző rájuk a hosszú, 320 nt körüli intron, és az, hogy mRNS-eik kizárólag egy szignálon poliadenilálódnak, mely a genom végén található, közvetlenül a *cap* után. A donor és akceptor helyek szekvenciája alternatív. A második csoport tagjai az ún. AAV5 típusú dependoparvovírusok, ahova a kóródzók és rágcsálók dependoparvovírusai is tartoznak (Lochrie *et al.*, 2006). Ebben a csoportban a két proximális promoterről átíródó mRNS-ek sokkal hamarabb, egy, az intronban található, poliadenilációs helyen poliadenilálódnak. A harmadik promoterről keletkező mRNS-ek keresztülíródnak ezen a szignálon, és csak – hasonlóan az első csoporthoz – a genom 3' végén poliadenilálódnak és esnek át a splicingon. A harmadik csoportba tartozik az avian adeno-associated virus (AAAV) és vélhetően a vízi szárnyasok PV-ai is (Qiu *et al.*, 2005; Qiu *et al.*, 2006). Ebben a csoportban az upstream promoterekről képződött mRNS-eknek csak egy része poliadenilálódik a belső szignálon. A harmadik promoterről keletkező mRNS-ek változó arányban splice-olódnak vagy nem. A GPV esetében feltételezik egy másik, az eredetihez képest upstream helyzetű intron létezését is, mely egy további, kisebb méretű NS fehérje keletkezését teszi lehetővé (Qiu *et al.*, 2005). Mi mind a három általunk vizsgált hüllő-PV-ban azonosítottunk egy belső poliadenilációs szignált az intronban (19. ábra), azonban a transzkripció profil további feltérképezésére irányuló vizsgálatokat nem végeztünk. Emiatt nem tudjuk jelenleg megmondani, milyen százalékban lehet szerepe ennek a szignálnak. A BDPV genomban nem találtunk a GPV-éhoz hasonló, feltételezett upstream helyzetű intront.

5.2.3.2 Fehérjék

A BDPV NS1 fehérjében az I-es replikációs motívum as szekvenciája HMHCVL volt, mely tartalmazza a két megőrzött hisztidint és a további, erősen hidrofób karakterű asakat, akárcsak a SAAV esetében. A két konzervatív hisztidin nemcsak a PV-ok körében, de az egész élővilágban a rolling circle mechanizmusok iniciációjával és terminációjával kapcsolatos (Koonin és Ilyina, 1992). A II-es replikációs motívumban jól kivehetők voltak a tirozin reziduumok. A SAAV esetén a 140., a BDPV esetén 141. pozícióban lévő tirozin az AAV2-ben a 152. pozícióban található meg, és kovalensen képes kötődni a genom 5'

végéhez. A III-as replikációs motívum mindhárom alegységének szekvenciája és pozíciója leginkább a SAAV-ban lévőhöz hasonlít, az NTP-kötőhely szekvenciája meg is egyezik (GPATTGKT).

A VP1 N-terminális végén a BDPV-ban is felismerhető a PLA motívum. Ez a kígyóméregben található foszfolipázzal mutat nagymértékű hasonlóságot, és minden dependoparvovírusban megőrzött (20. ábra). Funkciója a virális genom kijuttatása a késői endoszómákból (Zádori *et al.*, 2001).

A PV-ok kisméretű kapszidja erősen limitálja a genomméretet. Nyilván ezért gyakoriak az ún. alternatív ORF-ek, melyek általában átfednek valamelyik fő ORF-fel, vagy olyan kisméretűek, hogy el tudnak helyezkedni a két fő ORF között húzódó régióban (Allander *et al.*, 2001; Day és Zsák, 2010; Tse *et al.*, 2011). Az AAV2 *cap* génjével végzett kísérletek során úgy találták, hogy a VP3 start kodonja előtti genomszakaszban bekövetkező mutációk esetén nem épül össze működőképes kapszid (Sonntag *et al.*, 2011). Kiderült, hogy egy alternatív (CTG) kezdetű, a *cap* ORF-fel teljes átfedésben lévő, rövid ORF nélkülözhetetlen a kapszid összeépüléséhez a sejtmagvacskában. A mindössze 23 kDa súlyú fehérjét assembly activating proteinnak (AAP) nevezték el, ami egy scaffolding protein. Eddig mind a 13 AAV típusban leírták (Naumer *et al.*, 2012), azonban állati eredetű dependoparvovírusokban még nem vizsgálták. Az AAP összeépülést aktiváló hatása két konzervatív motívum meglététől függ; a fehérje N-terminálisához közeli hidrofób régiótól és a konzervatív magtól (Naumer *et al.*, 2012). A hidrofób régió hossza meglehetősen változatosnak mutatkozott a nem főemlős eredetű dependoparvovírusok között. Míg a főemlős AAV-ok esetén négy, hidrofób aminosavak alkotta szakasz található poláris aminosavakkal körülvéve, addig a hüllő-PV-oknál ezek száma csupán 3, a vízi szárnyasoknál 2-3, azonban az AAV esetén ugyancsak 4, az emlősökhöz hasonlóan. A konzervatív magi régió minden esetben nagyon hasonlóan épült fel. Nem ismert a funkciója a prolin gazdag régióknak, úgy ahogy a treonin/szerin gazdag régióknak sem, azonban előbbi megőrzöttsége és utóbbiak szabályos elhelyezkedése arra enged következtetni, hogy ezek is esszenciális motívumok lehetnek (Naumer *et al.*, 2012). A pikkelyes hüllő-eredetű PV-okból gyakorlatilag hiányzik a prolin gazdag régió, míg a madár-eredetűekben – az AAV kivételével – erősen redukált. A hüllő dependoparvovírusokban a treonin/szerin gazdag régiók közül csupán 3 azonosítható szemben a madarakéban található 4-gyel és az emlős-eredetűek 5-ével (21. ábra).

Az AAP felfedezése előtt is ismert volt, hogy a VP fehérjék C-terminális közeli része nélkülözhetetlen a kapszid kialakulásához (Ruffing *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 2000). Kiderült, hogy ez az esszenciális szakasz csupán az utolsó 29 as-at érinti, ebből is az AAV2 esetében az I682-es as-at körülvevő hidrofób as-akat. Ezek bizonyultak az AAP kötőhelyének (Naumer *et al.*, 2012). A BDPV esetében a feltételezett AAP kötőhely az M689

köré esik (30. ábra). A 7 aminosavból álló motívum szekvenciája megegyezik a SAAV-ban kimutathatóval.

AAV2	664	AKFASFI	TOYSTG	QVSV	EL	EWEL	DK	KENSKR	WNPEI	QV	TSN	INKSV
BtAAV	653	QKNSFI	TOYSTG	QVTVE	LE	EWEL	RKEK	SKRWN	PEI	QV	TSN	ENSA
BAAV	665	ARINSFI	TOYSTG	QVAVKI	EWEL	DK	KENSKR	WNPEI	QV	TSN	CAQD	
Cs1AAV	647	NRINNFI	TOYSTG	QVTVTI	LD	EWEL	DK	KENSKR	WNPEI	QV	TSN	FQTV
AAV5	653	VPVSSFI	TOYSTG	QVTVE	ME	EWEL	RK	KENSKR	WNPEI	QV	TNN	NDPQ
AAAV	672	AKVASFI	TOYSTG	QCTVE	LE	EWEL	RKEK	SKRWN	PEI	QV	TSN	FQNA
DPV	661	QKNSYI	TOYSTG	QCTVE	LV	EWEL	RK	KENSKR	WNPEI	QV	TSN	FQNR
GPV	661	QKNSYI	TOYSTG	QCTVE	LV	EWEL	RK	KENSKR	WNPEI	QV	TSN	FQNR
BdPV	650	TPVNSFI	SEYSTG	QVTVE	LV	EWEL	RK	KENSKR	WNPEI	QV	TSN	FQLSD
SAAV	651	MPQTSFI	TEYSTG	QVTVE	LV	EWEL	RK	KENSKR	WNPEI	QV	TSN	FQTS

* * * *

30. ábra Assembly-activating protein kötőhelyek a VP fehérjék C-terminálisához közel. A kapszid sikeres összeépüléséhez nélkülözhetetlen, valószínűleg az AAP hidrofób doménjének kötőhelyeként szolgáló 7 aminosavat bekereteztük. A csillagok jelölik a megőrzött hidrofób aminosavakat.

5.2.4 Taxonómia és törzsfa-rekonstrukció

Mind a négy, újonnan kimutatott hulló-PV egyértelműen a *Dependoparvovirus* nemzetségbe tartozik, ám hivatalos rendszertani javaslatot csak a BDPV besorolására tehetünk. A BDPV Rep fehérje as sorrendje legközelebbi rokonával, a SAAV-sal 58%-ban azonos, így új fajnak tekinthető. Javasoljuk a *Squamate dependoparvovirus 2* nevet.

A *cap* ORF-ből nyert rövid szekvencia, melyet a PCR vizsgálatok során erősítettünk fel, alkalmas a genus szintű besorolásra, azonban nem alkalmasabb részletesebb evolúciós következtetések levonására (15. ábra). A gyökériként használt *Aveparvovirus* nemzetségtől való határozott elkülönülés jól mutatja, mennyire nem megőrzött az egyes genusok között a *cap* ORF. A *Dependoparvovirus* genuson belül viszont ez a rövid szakasz jól megőrzött. Ezért a PV-ok evolúcióját a *rep* ORF alapján szokás vizsgálni (Tijssen *et al.*, 2011; Cotmore *et al.*, 2014). A VP1 rövid szakasza alapján készült törzsfa is monofiletikus csoportként jeleníti meg az összes pikkelyes hulló-PV-t (15. ábra). Az összes diapsida-eredetű vírus mégsem képez monofiletikus csoportot, mivel az AAV nem esik ebbe a kládba.

Ezzel szemben sokkal jobb felbontást ad a teljes Rep fehérje alapján számolt törzsfa (22. ábra). Az egyes genusok megbízhatóan elkülönülnek, és a BDPV – legközelebbi rokonával, a SAAV-sal együtt – nagyon magas (98) bootstrap értékkel bizonyul a legősibb leágazásnak. A törzsfa alapján monofiletikus csoportot képeznek mind a madarak, mind az emlősök dependoparvovirusai is. Ez teljes mértékben összhangban van azzal, amit Farkas és mtsai (2004) megállapítottak a SAAV evolúciója kapcsán.

Az AAP alapján készült, gyökértelen törzsfa megerősíti a hulló-PV-ok és a vízi szárnyasok dependoparvovirusainak összetartozását, azonban az AAV az emlős eredetűekkel került egy ágra (23. ábra). Ez összhangban van azzal a ténnyel, hogy az

AAAV AAP szerkezete sokkal inkább emlékeztet az emlősök dependoparvovirusaiban, mint a hulló- és vízi szárnyas PV-okban található homológjára.

5.3 Következtetések

PhD munkám elsődleges célja a hullókben és kételtűekben előforduló AdV-ok és PV-ok diverzitásának és evolúciójának, esetlegesen gazda-vírus koevolúciójának vizsgálata volt. Ehhez egyrészt szűrővizsgálatot folytattunk az esetleges új vírusok felderítése és a már ismertek prevalenciájának megállapítása céljából, másrészt genom szinten is vizsgáltuk mind az újonnan kimutatott, nem izolált vírusokat, mind a már rendelkezésünkre álló hulló-AdV izolátumokat.

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 kételtűekben is kimutattunk egy új AdV-t, melynek mint kórokozónak, akár komoly környezetvédelmi jelentősége is lehet.

5.3.1 Adenovírusok

A kimutatott AdV-ok nagy jelentőséggel bírnak a hullókból és kételtűekből eddig felderített AdV-ok számának gyarapítása miatt. AdV előfordulását első alkalommal mutattuk ki rövidfarkú törpekaméleonban, hosszúfarkú fűgyíkban és fehér-torkú varánuszban.

Eredményeim arra utalnak, hogy mind a szakállas agámákban, mind a törpekaméleonokban a fertőzés nem újkeletű. Erre abból következtetünk, hogy mindkét vírusnak számos genotípus variánsa létezik. A szakállas agámákban ez as szinten is manifesztálódik, ami arra utal, 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 melegeggya lehet az új, gyakran patogénebb típusok kialakulásának (Pasmans *et al.*, 2008). Valószínűsíthető, hogy a PCAdV genotípusainak G+C arányában tapasztalható fluktuáció is ennek tudható be; az új típusal való fertőződés a G+C tartalom csökkenését vonja maga után. Ezzel ellentétben a kígyók – egy evolúciósan jóval fiatalabb csoport – AdV-ai képesek átlépni a faji barriert, aminek feltehető okai között szerepel a gazdafajok gyors adaptív radiációja. Ez elsősorban a morfológiai tulajdonságokat érintette, és kevésbé befolyásolta az immunfolyamatok jellegét. A SnAdV-1 gazdaspektrumát 2, míg a SnAdV-2-ét 1 új fajjal gyarapítottuk. A SnAdV-1

kimutatása az egyik új gazdafajból, a vízisiklóból, az első olyan hulló-AdV, amit hazánkban vadon élő állatban mutatnak ki.

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. Több új vírus esetében jól működtek a pentonbázis gén hosszabb szakaszát, valamint a hexon, 100K és IVa2 rövid szakaszát célzó PCR rendszerek is. 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 rendszerek tervezése nehézségekbe ütközik. A pentonbázis as sorrendjének vizsgálata a két LAdV izolátum mellett lehetővé vált két további új gyík (VAdV-2, PCAdV), valamint egy új kétéltű AdV esetében. Hasonlóan a korábban leírt atadenovírusokhoz, az RGD motívum mindegyik pentonbázisból hiányzott.

A pX gén teljes származtatott as szekvenciája alapján egyértelműen látszik, hogy a vágáshely szekvenciája alkalmas a hulló – nem hulló atadenovírusok elkülönítésére, akárcsak a pIIIa proteolitikus hasítási helye, mely szintén megőrzött a hulló atadenovírusokban.

PhD munkám kezdetekor többé-kevésbé elfogadott ténynek számított, hogy az *Atadenovirus* nemzetség Squamata eredetű. Eredményeim megerősítik 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. Elméletünket alátámasztja még a törzsfa-rekonstrukció is; úgy tűnik a jelenleg ismert legősibb atadenovírus a GLAdV.

Bár az atadenovírusokat így mára már négy gerinces osztály képviselőiben is megtalálhatónak bizonyultak, továbbra is a legvalószínűbb, hogy az eredetileg pikkelyes hullókkal együtt fejlődött leszármazási vonalat jelentik. 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 feltételezet gazdaváltásokat követően. Ezzel szemben az RH gének száma az ősi állapotban kevés (1), és az új gazdában, valószínűleg az adaptáció következményeként duplikálódik, illetve multiplikálódik. A genomiális DNS bázis-összetételében való eltolódás (az A+T irányába) szintén tekinthető adaptációs következménynek.

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 őstől nem osztozó AdV csoportoknál is többször megjelent a két fiber. A FAdV-1 csak akkor képes *in vitro* emlős sejtek megfertőzésére, ha a hosszú fiber is jelen van, ám ez utóbbi nem szükséges a homológ (házityúk) sejtek sikeres fertőzéséhez (Roelvink *et al.*, 1998; Guardado-Calvo *et al.*, 2007). Egy, a LAdV-2 rövid polimeráz szekvencia as sorrendjétől csupán egy as-ban különböző AdV-t Ausztráliában kimutattak törpe szakállas agámában (Hyndman és Shilton, 2011). Mindkettőből következhet, hogy a két fiberre a szélesebb gazdaspektrum eléréséhez van szükség. Figyelembe véve, hogy a LAdV-2 számos génjének (F-box motívum az RH-ban, Ig domén a 105R-ekben, C-lektin-homológ ORF2) szerepe az immunrendszer hatásának kivédésével kompetens, az sem zárható ki, hogy a vírus eredetileg a nyugati szakállas agámák vírusa, és éppen adaptálódik a mexikói viperagyíkhöz, mint új gazdafajhoz. A másik meglepő tény, hogy a két LAdV összes homológ fehérjéje (kivétel a csak a LAdV-1-ben előforduló 105R2) közül a fiber2, azon belül is annak szár és feji régiója különbözik egymástól a legnagyobb mértékben, míg a fiber1 jobban megőrzött. Ez azt sugallhatja, hogy a fiber2-nek nagyobb a szerepe a gazdaspecificitásban, illetve a receptor, melyhez kötődni képes variábilisabb, mint az 1-es fiber receptora. Ez esetben a szakállas agámákból kimutatott változat fibereinek vizsgálata alátámasztaná ezt. Ellentmond a fenti elméletnek azonban az eddigi legszélesebb gazdaspektrummal bíró atadenovírus, a SnAdV-1, melynek genomjában ennek ellenére is csupán egy fiber gén található. Figyelembe kell azonban venni a kígyók evolúciójának speciális aspektusait és azt, hogy ugyanekkor a SnAdV-1-ben nem található sem F-box, sem Ig domén. Az egész családban egyedülálló penton struktúrára azonban még nehezebb magyarázatot találni.

A nyílméreg béka-AdV az első kétéltű-eredetű atadenovírus szekvencia. A pikkelyes hüllőkről történt gazdaváltás lehetőségét alátámasztja a vírus filogenetikai helye mindkét törzsfán, valamint DNS-ének alacsony G+C tartalma. A pIIIa és a pX fehérje proteolitikus vágási helyének szekvenciája megegyezik a DAdV-1-ben lévővel, és mindössze egy as-ban különbözik a kérődzők vírusaiban lévőttől.

Az atadenovírusok előfordulása kétéltűekben arra utal, hogy legalább négy jelentős (osztályok közötti) gazdaváltás történhetett evolúciójuk során. Úgy tűnik, ezek egymástól független események voltak, mivel a nem-hüllő atadenovírusok nem képeznek monofiletikus

csoportot a hosszabb szakaszok alapján készült fákön. Feltételezhető tehát, hogy a legkorábbi gazdaváltás a kétélűekre történt, és a kérődzőket érintő mehetett végbe a legkésőbb.

5.3.2 Parvovírusok

PhD munkám során négy új hüllő-PV-t mutattunk ki, melyek közül az ásógyík PV a legelső vírus volt, amit valaha kimutattak bármilyen, az *Amphisbaenia* alrendbe tartozó állatból. Az új vírusok között szerepelt még az első kaméleon PV, és az első olyan gyík PV, melyről molekuláris adatokat nyertünk. A BDPV az első gyík PV, melynek teljes genomját sikerült meghatározni. A genom közel felének szekvenciáját sikerült meghatározni két további hüllő-PV-ből is (CSPV és PCPV), ami lehetővé teszi a hüllők PV-ainak még részletesebb evolúciós vizsgálatát. Mindezek mellett kidolgoztunk egy új PCR módszert a hüllőket fertőző PV-ok gyors és megbízható kimutatására is.

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 ősektől származnak, akkor ez az eredmény erősen támogatja a diapsida eredetre vonatkozó hipotézist. Az önálló replikáció kérdése a jövőben sejtkultúrák kísérletes fertőzésével tovább vizsgálható. Ehhez azonban megfelelő, lehetőleg homológ sejttenyészetekre lenne szükség.

A teljes Rep alapján végzett törzsfá-rekonstrukció során kiderült, hogy a hüllőket fertőző dependoparvovírusok a legősibbek a nemzetségben. A pikkelyes hüllő-eredetű dependoparvovírusok egy monofiletikus csoportot képeznek az AAP as szekvenciája alapján készült törzsfán is. Egy madár dependoparvovírus, az AAVV, azonban kilóg a sorból, ugyanis az emlősök dependoparvovirusaival kerül közös monofiletikus csoportba. A *cap* alapján készült fa sem támogatja az összes diapsida eredetű dependoparvovírus monofiliáját. A fentiek, és az a tény, hogy a Rep alapján a hüllő-PV-ok bizonyulnak ősiibbnak, cáfolja a közös eredetet. Ezek alapján sokkal elképzelhetőbbnek tűnik egy pusztán Squamata eredetű *Dependoparvovirus* nemzetség. Ha feltételezzük, hogy az intronok mérete eredendően rövid, akkor ezzel összhangban van, hogy az intron hossza a dependoparvovírus genomokban egyre hosszabb, a hüllőktől az emlősök felé haladva. Ugyanez a helyzet az AAP egyes motívumaival is: míg a hüllőkből kimutatott vírusok esetében csupán három T/S gazdag régió van, addig a madaraknál már ez a szám 4, és minden emlős dependoparvovírusnál 5. A prolin-gazdag régió funkcióját nem ismerjük, de elképzelhető, hogy jelenléte is a gazdaváltással lehet kapcsolatos.

Alternatív magyarázatként elképzelhető, hogy a *Dependoparvovirus* genus tagjainak őse egy, az egész Amniota csoport közös ősében alakult ki, és egy hosszú koevolúciós folyamat eredménye az, amit most látunk. Ráadásul alkalomszerű gazdaváltások színesíthetik a képet. Amennyiben ez a hipotézis igaz, úgy feltételezhető, hogy az AAV gazdaváltás eredményeként fertőz tyúkalkatúakat. Ezt támasztja alá az AAV AAP emlős dependoparvovírusokra jellemző szerkezete, és az, hogy eddig még nem bizonyították autonóm replikációs képességét. A kérdéskör pontosabb vizsgálatához jó lenne további, nem-pikkelyes hüllőkből származó, de diapsida eredetű dependoparvovírusokat is megvizsgálni – feltéve, ha léteznek ilyenek.

A PV-okkal kapcsolatban ritkán beszélnek gazda-vírus koevolúcióról, mégis úgy tűnik, hogy e kisméretű DNS-vírusok esetében is számolni kell a jelenséggel. A selyemlepke densovírus teljes genomjának vizsgálatakor figyeltek fel arra, hogy mind a gerincesek mind a gerinctelenek PV-ainak genomszerveződése nagyfokú megőrzöttséget mutat, és valószínűleg a jelenlegi diverzitás a gazdafajokkal való koevolúciónak tudható be (Bando *et al.*, 1987). Még ha ez nem is feltétlenül igaz minden genusra, az biztos, hogy legszélesebb gazdaspektrummal a *Dependoparvovirus* rendelkezik, amit jól magyarázna a gazdaszervezetekhez való adaptáció. Ennek a kérdésnek a részletes körüljárásához azonban elengedhetetlen lenne további alacsonyabb rendű gerinces csoportok esetlegesen létező PV-ainak vizsgálata.

6. 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 mutattuk 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 mutattuk 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.

7. Irodalom

- Abbas, M.D., Marschang, R.E., Schmidt, V., Kasper, A., Papp, T.: **A unique novel reptilian paramyxovirus, four atadenovirus types and a reovirus identified in a concurrent infection of a corn snake (*Pantherophis guttatus*) collection in Germany**, Vet. Microbiol. 150. 70-79, 2011.
- Afonso, C.L., Tulman, E.R., Lu, Z., Zsak, L., Kutish, G.F., Rock, D.L.: **The Genome of Fowlpox Virus**, J. Virol., 74. 3815-3831, 2000.
- Ahne, W., Scheinert, P.: **Reptilian viruses: Isolation of parvovirus-like particles from corn snake *Elaphe guttata* (Colubridae)**, J. Vet. Med. B, 36. 409-412, 1989.
- Albert, E.M., San Mauro, D., García-París, M., Rüber, L., Zardoya, R.: **Effect of taxon sampling on recovering the phylogeny of squamate reptiles based on complete mitochondrial genome and nuclear gene sequence data**, Gene, 15. 12-21, 2009.
- Allander, T., Emerson, S.U., Engle, R.E., Purcell, R.H., Bukh, J.: **A virus discovery method incorporating DNase treatment and its application to the identification of two bovine parvovirus species**, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98. 11609-11614, 2001.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J.: **Basic local alignment search tool**, J. Mol. Biol., 215. 1403-1410, 1990.
- Anand, A., Gray, E.S., Brown, T., Clewley, J.P., Cohen, B.J.: **Human parvovirus infection in pregnancy and hydrops fetalis**, N. Engl. J. Med., 316. 183-186, 1987.
- Arnberg, N.: **Adenovirus receptors: implications for targeting of viral vectors**, Trends Pharmacol. Sci., 33. 442-448, 2012.
- Ascher, J.M., Geneva, A.J., Ng, J., Wyatt, J.D., Glor, R.E.: **Phylogenetic analyses of novel squamate adenovirus sequences in wild-caught *Anolis* lizards**, PLoS ONE, 8. e60977, 2013.
- Atchison, R.W., Casto, B.C., Hammon, W.McD.: **Adenovirus-associated defective virus particles**, Science, 149. 754-755, 1965.
- Bai, C., Sen, P., Hofmann, K., Ma, L., Goebel, M., Harper, J.W., Elledge, S.J.: **SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box**, Cell, 86. 263-274, 1996.
- Ball, I., Behncke, H., Schmidt, V., Geflügel, F.T., Papp, T., Stöhr, A.C., Marschang, R.E.: **Partial characterization of new adenoviruses found in lizards**, J. Zoo. Wildl. Med., 45. 287-297, 2014a.
- Ball, I., Ofner, S., Funk, R.S., Griffin, C., Riedel, U., Möhring, J., Marschang, R.E.: **Prevalence of neutralising antibodies against adenoviruses in lizards and snakes**, Vet. J., 202. 176-181, 2014b.

- Bando, H., Kusuda, J., Gojobori, T., Maruyama, T., Kawase, S.: **Organization and nucleotide sequence of a densovirus genome imply a host-dependent evolution of the parvoviruses**, J. Virol., 61. 553-560, 1987.
- Bartha, A.: **Dropped egg production in ducks associated with adenovirus infection**, Avian Pathol., 13. 119-126, 1984.
- Bartha, A.: **Proposal for subgrouping of bovine adenoviruses**, Acta. Vet. Hung., 19. 319-321, 1969.
- Belyi, V.A., Levine, A.J., Skalka, A.M.: **Sequences from ancestral single-stranded DNA viruses in vertebrate genomes: the *Parvoviridae* and *Circoviridae* are more than 40 to 50 million years old**, J. Virol., 84.12458-12462, 2010
- Benkő, M., Élő, P., Ursu, K., Ahne, W., LaPatra, S.E., Thomson, D., Harrach, B.: **First molecular evidence for the existence of distinct fish and snake adenoviruses**, J. Virol., 76. 10056-10059, 2002.
- Benkő, M., Harrach, B., Russell, W.C.: **Family *Adenoviridae*** In: van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB (eds) Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego, CA. pp 227-238, 2000
- Benkő, M., Harrach, B.: **Molecular evolution of adenoviruses**. In: Doerfler W, Böhm P (eds) Adenoviruses: Model and Vectors in Virus Host Interactions. Current Topics in Microbiology and Immunology. 272 Springer, Berlin, Germany. pp. 3-35, 2003.
- Bergoin, M., Tijssen, P.: **Molecular biology of *Densovirinae***, Contrib. Microbiol., 4, 12-32, 2000.
- Berns, K.I., Giraud, C.: **Adenovirus and adeno-associated virus as vectors for gene therapy**, Ann. NY. Acad. Sci., 772. 95-104, 1995.
- Bidin, Z., Lojkic, I., Mikec, M., Pokric, B.: **Naturally occurring egg drop syndrome infection in turkeys**, Acta Vet. Brno, 76. 415-421, 2007.
- Both, G.W.: ***Atadenovirus. Adenoviridae***, In: Tidona CA, Darai G (eds), The Springer Index of Viruses. Springer, New York, NY. pp. 1-12, 2011.
- Both, G.W.: **Identification of a unique family of F-box proteins in atadenoviruses**, Virology, 304. 425-433, 2008.
- Brown, K.E., Green, S.W., Young, N.S.: **Goose parvovirus - an autonomous member of the dependovirus genus?** Virology, 210. 283-291, 1995.
- Brown, K.E., Young, N.S.: **Epidemiology and pathology of erythroviruses**, Contrib Microbiol, 4. 107-122, 2000.

- Bräuniger, S., Peters, J., Borchers, U., Kao, M., Borchers, U.: **Further studies on thermal resistance of bovine parvovirus against moist and dry heat**, Int. J. Hyg. Environ. Health, 203. 71-75, 2000.
- Caillet-Boudin, M. L.: **Complementary peptide sequences in partner proteins of the adenovirus capsid**, J. Mol. Biol., 208. 195-198, 1989.
- Castoe, T.A., de Koning, A.P., Hall, K.T., Card, D.C., Schield, D.R., Fujita, M.K., Ruggiero, R.P., Degner, J.F., Daza, J.M., Gu, W., Reyes-Velasco, J., Shaney, K.J., Castoe, J.M., Fox, S.E., Poole, A.W., Polanco, D., Dobry, J., Vandewege, M.W., Li, Q., Schott, R.K., Kapusta, A., Minx, P., Feschotte, C., Uetz, P., Ray, D.A., Hoffmann, F.G., Bogden, R., Smith, E.N., Chang, B.S., Von, F.J., Casewell, N.R., Henkel, C.V., Richardson, M.K., Mackessy, S.P., Bronikowski, A.M., Yandell, M., Warren, W.C., Secor, S.M., Pollock, D.D.: **The Burmese python genome reveals the molecular basis for extreme adaptation in snakes**, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 17. 20645-20650, 2013.
- Cha, S.Y., Kang, M., Park, C.K., Choi, K.S., Jang, H.K.: **Epidemiology of egg drop syndrome virus in ducks from South Korea**, Poult. Sci., 92. 1783-1789, 2013.
- Cheung, A.K, Wu, G., Wang, D., Bayles, D.O., Lager, K.M., Vincent, A.L.: **Identification and molecular cloning of a novel porcine parvovirus**, Arch. Virol., 155. 801-806, 2010.
- Chiocca, S., Kurzbauer, R., Schaffner, G., Baker, A., Mautner, V., Cotton, M.: **The complete DNA sequence and genomic organization of the avian adenovirus CELO**, J. Virol., 70. 2939-2949, 1996.
- Chiorini, J.A., Kim, F., Yang, L., Kotin, R.M.: **Cloning and characterization of adeno-associated virus type 5**, J. Virol., 73. 1309-1319, 1999.
- Chiu, C.Y., Shigeo, Y., Lu, X., Yu, G., Chen, C.E., Liu, M., Dick, E.J., Carey, K.D., Erdman, D., Leland, M.M., Patterson, J.L.: **A novel adenovirus species associated with an acute respiratory infection outbreak in a baboon colony and evidence of coincident human infection**, M. Bio., 4. 84-13, 2013.
- Chow, L.T., Broker, T.R., Lewis, J.B.: **Complex splicing patterns of RNAs from the early regions of adenovirus-2**, J. Mol. Biol., 134. 265-303, 1979.
- Clark, H.F., Michalski, F., Tweedell, K.S., Yohn, D., Zeigel, R.F.: **An adenovirus, FAV-1, isolated from the kidney of a frog (*Rana pipiens*)**, Virology, 51. 392-400, 1973.
- Conrad, J.L.: **Phylogeny and systematics of Squamata (Reptilia) based on morphology**, Bull. Am. Mus. Nat. Hist., 310. 1-182, 2008.
- Corpet, F.: **Multiple sequence alignment with hierarchical clustering**, Nucl. Acids. Res., 16. 10881-10890, 1988.

- Cotmore, S.F., Agbandje-McKenna, M., Chiorini, J.A., Mukha, D.V., Pintel, D.J., Qiu, J., Soderlund-Venermo, M., Tattersall, P., Tijssen, P., Gatherer, D., Davison A.J.: **The family *Parvoviridae***, Arch. Virol., 159. 1239-1247, 2014.
- Dán, Á., Molnár, T., Biksi, I., Glávits, R., Shaheim, M., Harrach, B.: **Characterisation of Hungarian porcine circovirus 2 genomes associated with PMWS and PDNS cases**, Acta. Vet. Hung., 51. 551-562, 2003.
- Dán, Á., Ruzsics, Zs., Russell, W.C., Benkő, M., Harrach, B.: **Analysis of the hexon gene sequence of bovine adenovirus type 4 provides further support for a new adenovirus genus (*Atadenovirus*)**, J. Gen. Virol., 79. 1453-1460, 1998.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D.: **ProtTest 3: fast selection of best-fit models of protein evolution**, Bioinformatics, 27. 1164-1165, 2011.
- Das, B.B., Pradhan, H.K.: **Outbreaks of egg drop syndrome due to EDS-76 virus in quail (*Coturnix coturnix japonica*)**, Vet. Rec., 131. 264-265, 1992.
- Davison, A.J., Benkő, M., Harrach, B.: **Genetic content and evolution of adenoviruses**, J. Gen. Virol., 84. 2895-2908, 2003.
- Davison, A.J., Harrach, B.: (2002) ***Siadenovirus. Adenoviridae***. In: Tidona CA, Darai G (eds) The Springer Index of Viruses. Springer, Berlin, pp 29-33, 2005.
- Davison, A.J., Telford, A.R., Watson, M.S., McBride, K., Mautner, V.: **The DNA sequence of adenovirus type 40**, J. Mol. Biol., 234. 1308-1316, 1993.
- Davison, A.J., Wright, K.M., Harrach, B.: **DNA sequence of frog adenovirus**, J. Gen. Virol., 81. 2431-2439, 2000.
- Day, J.M., Zsak L.: **Determination and analysis of the full-length chicken parvovirus genome**, Virology, 99. 59-64, 2010.
- Debey, B.M., Lehmkuhl, H.D., Chard-Bergstrom, C., Hobbs, L.A.: **Ovine adenovirus serotype 7-associated mortality in lambs in the United States**, Vet. Pathol., 38. 644-648, 2001.
- Derzsy D.: **A viral disease of goslings. I. Epidemiological, clinical, pathological and etiological studies**, Acta Vet. Acad. Scien. Hung., 17. 443-448, 1967.
- Ding, J., McGrath, W.J., Sweet, R.M., Mangel, W.F.: **Crystal structure of the human adenovirus proteinase with its 11 amino acid cofactor**, EMBO. J., 15. 1778-1783, 1996.
- Doszpoly, A.: **Tokhal-adenovírus és hal-herpeszvírusok genetikai elemzése**, doktori értekezés. Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Doktori Iskola, Budapest, 61-71, 2011.
- Doszpoly A., Wellehan, J.F.Jr., Childress, A.L., Tarján, 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.

- Élő, P., Farkas, S.L., Dán, Á., Kovács, G.M.: **The p32K structural protein of the atadenovirus might have bacterial relatives**, *J. Mol. Evol.*, 56. 175-180, 2003.
- Enders, M., Weidner, A., Zoellner, I., Searle, K., Enders, G.: **Fetal morbidity and mortality after acute human parvovirus B19 infection in pregnancy: prospective evaluation of 1018 cases**, *Prenat. Diagn.*, 24. 513-518, 2004.
- Estevez, C., Villegas, P.: **Sequence analysis, viral rescue from infectious clones and generation of recombinant virions of the avian adeno-associated virus**, *Virus Res.*, 105. 195-208, 2004.
- Farkas Sz., Gál J.: **Adenovírusok okozta sejtzárványos hepatitis és másodlagos parvovírusfertőzés első hazai leírása Hagen-viperában [*Parias (Trimeresurus) hageni*]**, *Magy. Állatorvosok*, 130. 755-761, 2008.
- Farkas, S.L., Benkő, M., Élő, P., Ursu, K., Dán, Á., Ahne, W., Harrach, B.: **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***, *J. Gen. Virol.*, 83. 2403-2410, 2002.
- Farkas, S.L., Gál, J.: **Adenovirus and mycoplasma infection in an ornate box turtle (*Terrapene ornata ornata*) in Hungary**, *Vet. Microbiol.*, 138. 169-713, 2009.
- Farkas, S.L., Harrach, B., Benkő, M.: **Completion of the genome analysis of snake adenovirus type 1, a representative of the reptilian lineage within the novel genus *Atadenovirus***, *Virus. Res.*, 132. 132-139, 2008.
- Farkas, S.L., Zádori, Z., Benkő, M., Essbauer, S., Harrach, B., Tijssen, P.: **A parvovirus isolated from royal python (*Python regius*) is a member of the genus *Dependovirus***, *J. Gen. Virol.* 85. 555-561, 2004.
- Felsenstein, J.: **PHYLIP-Phylogeny inference package**, *Cladistics*, 5. 164-166, 1989.
- Fukuda, M., Hiraoka, N., Yeh, J.C.: **C-type lectins and sialyl Lewis X oligosaccharides. Versatile roles in cell-cell interaction**, *J. Cell. Biol.*, 147. 467-70, 1999.
- Gabriel, M.W., Wengert, G.M., Brown, R.N.: **Pathogens and parasites of *Martes* species. management and conservation implications**, In: Aubry K.B., Zielinski, W.J., Raphael, M.G., Proulx, G., Buskirk, S.W. (Eds) *Biology and Conservation martens, sables, and fishers. A New Synthesis*, Cornell University Press, pp.138-185
- Galli, A., Cervelli, T.: **Inverted terminal repeats of adeno-associated virus decrease random integration of a gene targeting fragment in *Saccharomyces cerevisiae***, *BMC Mol. Biol.*, 15., 2014.
- Gao, G., Alvira, M.R., Somanathan, S., Lu, Y., Vandenberghe, L.H., Rux, J.J., Calcedo, R., Sanmiguel, J., Abbas, Z., Wilson, J.M.: **Adeno-associated viruses undergo substantial evolution in primates during natural infections**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100. 6081-6086, 2003.

- Garner, M.M., Wellehan, J.F.X., Nordhausen, R.W., Barr, B.: **Characterization of enteric infections associated with two novel adenoviruses in colubrid snakes**, J. Herpetol. Med. Surg., 18. 86-94, 2008.
- Glávits R., Zolnai A., Szabó E., Ivanics E., Zarka P., Mató T., Palya V.: **Comparative pathological studies on domestic geese (*Anser anser domestica*) and Muscovy ducks (*Cairina moschata*) experimentally infected with parvovirus strains of goose and Muscovy duck origin**, Acta. Vet. Hung., 53. 73-89, 2005.
- Goddard, A., Leisewitz, A.L.: **Canine parvovirus**, Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract., 40.1041-1053, 2010.
- Gorman, J.J., Wallis, T.P., Whelan, D.A., Shaw, J., Both, G.W.: **LH3, a “homologue” of the mastadenoviral E1B 55-kDa protein is a structural protein of adenoviruses**, Virology, 342. 159-166, 2005.
- Graham, D.A., Calvert, V., Benkő, M., Curran, W., Wylie, M., Snodden, D.A., Moffet, D.A., Papp, T., Adair, B.M., Smyth, J.A.: **Isolation of bovine adenovirus serotype 6 from a calf in the United Kingdom**, Vet. Rec., 156. 82-86, 2005.
- Guan, W., Huang, Q., Cheng, F., Qiu, J.: **Internal polyadenylation of the parvovirus B19 precursor mRNA is regulated by alternative splicing**, J. Biol. Chem., 286. 24793-24805, 2011.
- Guardado-Calvo, P., Llamas-Saiz, A.L., Fox, G.C., Langlois, P., van Raaij, M.J.: **Structure of the C-terminal head domain of the fowl adenovirus type 1 long fiber**, J. Gen. Virol., 88. 2407-2416, 2007.
- Gudenkauf, B.M., Eaglesham, J.B., Aragundi, W.M., Hewson, I.: **Discovery of urchin-associated densovirus (family *Parvoviridae*) in coastal waters of the Big Island, Hawaii**, J. Gen. Virol., 95. 652-658, 2014.
- Guindon S., Dufayard J.F., Lefort V., Anisimova M., Hordijk W., Gascuel O.: **New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0.**, System. Biol., 59. 307-321, 2010.
- Hanson, L.A., Rudis, M.R., Vasquez-Lee, M., Montgomery, R.D.: **A broadly applicable method to characterize large DNA viruses and adenoviruses based on the DNA polymerase gene**, Virol. J., 11. 3-28, 2006.
- Harrach, B.: **Reptile adenoviruses in cattle?** Acta. Vet. Hung., 48. 485-490, 2000.
- Harrach, B.: **Adenoviruses: General features**. In: Reference Module in Biomedical Sciences. Elsevier, San Diego, CA. doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.02523-X. 2014.
- Harrach, B., Benkő, M.: **Phylogenetic analysis of adenovirus sequences; proof of the necessity of establishing a third genus in the *Adenoviridae* family**. In: Wold

- WSM (eds) Adenovirus Methods and Protocols. Methods in Molecular Medicine 21, Humana Press, Totowa. pp 309-339, 1998.
- Harrach, B., Benkő, M., Both, G.W., Brown, M., Davison A.J., Echavarría, M., Hess, M., Jones, M.S., Kajon, A., Lehmkuhl, H.D., Mautner, V., Mittal, S.K., Wadell, G.: **Family Adenoviridae**. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz, EJ (eds.) Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. Elsevier, San Diego, CA. pp 125-141. 2011.
- Harrach, B., Meehan, B.M., Benkő, M., Adair, B.M., Todd, D.: **Close phylogenetic relationship between egg drop syndrome virus, bovine adenovirus serotype 7, and ovine adenovirus strain 287**, Virology., 229. 302-306, 1997.
- Harrach, B., Vidovszky, M., Jánoska, M., Kaján, Gy., Bakonyi, T., Ursu, K., Weissenböck, H., Ejdersund, A., Benkő, M.: **PCR screening of recycled avian samples reveals an amazing wealth of different adenovirus types and species in the wildlife**, XIV. International Congress of Virology, Istanbul, Törökország aug. 10-15, 2008.
- Hatfield, L., Hearing, P.: **The NFIII/OCT-1 binding site stimulates adenovirus DNA replication in vivo and is functionally redundant with adjacent sequences**, J. Virol., 67. 3931-3939, 1993.
- Hay, R.T., Freeman, A., Leith, I., Monaghan, A., Webster, A.: **Molecular interactions during adenovirus DNA replication**, Curr. Top. Microbiol., 199. 31-48, 1995.
- Heldstab, A., Bestetti, G.: **Virus associated gastrointestinal disease in snakes**, J. Zoo Anim. Med., 15. 118-128, 1984.
- Hess, M., Cuzange, A., Ruigrok, R.W.H., Chroboczek, J., Jacrot, B.: **The avian adenovirus penton: two fibres and one base**, J. Mol. Biol., 252. 379-385, 1995.
- Hess, M., Raue, R., Hafez, H.M.: **PCR for specific detection of haemorrhagic enteritis virus of turkeys, an avian adenovirus**, J. Virol. Methods., 81. 199-203, 1998.
- Hess, M., Blocker, H., Brandt, P.: **The complete nucleotide sequence of the egg drop syndrome virus: an intermediate between mastadenoviruses and aviadenoviruses**, Virology, 238. 145-156, 1997.
- Hong, J.S., Engler, J.A.: **The amino terminus of the adenovirus fiber protein encodes the nuclear localization signal**, Virology, 185. 758-767, 1991.
- Hyndman, T., Shilton, C.M.: **Molecular detection of two adenoviruses associated with disease in Australian lizards**, Aust. Vet. J., 89. 232-235, 2011.
- Ilyina, T.V., Koonin, E.V.: **Conserved sequence motifs in the initiator proteins for rolling circle DNA replication encoded by diverse replicons from eubacteria, eucaryotes and archaeobacteria**, Nucleic Acids Res., 20. 3279-3285, 1992.

- Ito, J., Braithwaite, D.K.: **Compilation and alignment of DNA polymerase sequences**, Nucleic Acids Res., 19. 4045-4057, 1991.
- Ivanics E., Palya V., Glavits R., Dan A., Palfi V., Revesz T., Benko M.: **The role of egg drop syndrome virus in acute respiratory disease of goslings**, Avian Pathol., 30. 201-208, 2001.
- Jacobson, E.R., Gardiner, C.H., Foggin, C.M.: **Adeno-like virus in esophageal and tracheal mucosa of a Jackson's chameleon (*Chamaeleo jacksoni*)**, Vet, Pathol., 27. 210-212, 1990.
- Jacobson, E.R., Gardiner, C.H., Foggin, C.M.: **Adenovirus-like infection in two Nile crocodiles**, J. Am. Vet. Med. Assoc., 185. 1421-1422, 1984.
- Jacobson, E.R., Gaskin, J.M., Gardiner, C.H.: **Adenovirus-like infection in a *Boa constrictor***, J. Am. Vet. Med. Assoc., 187. 1226-1227, 1985.
- Jacobson, E.R., Heard, D.J., Isaza, R.: **Future directions in reptile medical education**, J. Vet. Med. Educ., 33. 373-381, 2006.
- Jacobson, E.R., Kollias, G.V.: **Adenovirus-like infection in a savannah monitor**, J. Zoo. Anim. Med., 17. 149-151, 1986.
- Jacobson, E.R., Kopit, W., Kennedy, F.A., Funk, R.S.: **Coinfection of a bearded dragon, *Pogona vitticeps*, with adenovirus- and dependoviruslike viruses**, Vet. Pathol., 33. 343-346, 1996.
- Jacoby, R.O., Ball-Goodrich, L.J., Besselsen, D.G., McKisic, M.D., Riley, L.K., Smith, A.L.: **Rodent parvovirus infections**, Lab. Anim. Sci., 46, 370-380, 1996.
- Joo, H.S., Donaldson-Wood, C.R., Johnson, R.H., Campbell, R.S.F.: **Pathogenesis of porcine parvovirus infection: Pathology and immunofluorescence in the foetus**, J. Comp. Pathol., 87. 383-391, 1977.
- Joseph, H.M., Ballmann ,M.Z., Garner ,M.M., Hanley, C.S., Berlinski ,R., Erdelyi,K., Childress, A.L., Fish, S.S., Harrach, B., Wellehan,J.F.X.: **A novel siadenovirus detected in the kidneys and liver of Gouldian finches (*Erythura gouldiae*)**, Vet. Microbiol., 172. 35-43, 2014.
- Juhász A., Ahne, W.: **Physicochemical properties and cytopathogenicity of an adenovirus-like agent isolated from corn snake (*Elaphe guttata*)**, Arch. Virol., 130. 429-439, 1992.
- Julian, A.F., Durham, J.K.: **Adenoviral hepatitis in a female bearded dragon (*Amphobolurus barbatus*)**, New Zeal. Vet. J., 30. 59-60, 1982.
- Kaján, G.L., Stefancsik, R., Ursu, K., Palya, V., Benkő M.: **The first complete genome sequence of a non-chicken aviadenovirus, proposed to be turkey adenovirus 1**, Virus. Res., 153. 226-233, 2010.

- Kaján, G.L., Davison, A.J., Palya, V., Harrach, B., Benkő, M.: **Genome sequence of a waterfowl aviadenovirus, goose adenovirus 4**, J. Gen. Virol., 93. 2457-2465, 2012
- Karsten, K.B., Andriamandimbiarisoa, L.N., Fox, S.F., Raxworthy, C.J.: **A unique life history among tetrapods: An annual chameleon living mostly as an egg**, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 105. 8980-8984, 2008.
- Katoh, H., Ohya, K., Kubo, M., Murata, K., Yanai, T., Fukushi, H.: **A novel budgerigar-adenovirus belonging to group II avian adenovirus of *Siadenovirus***, Virus. Res., 144. 294-297, 2009.
- Kaufmann, B., Bowman, V.D., Li, Y., Szelei J., Waddell, P.J., Tijssen, P., Rossmann, M.G.: **Structure of *Penaeus stylirostris* densovirus, a shrimp pathogen**, J. Virol., 84. 11289-11296, 2010.
- Kaufmann, B., Simpson, A.A., Rossmann, M.G.: **The structure of human parvovirus B19**, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101. 11628-11633, 2004.
- Kearney, M.: **Systematics of the Amphisbaenia (Lepidosauria: Squamata) based on morphological evidence from recent and fossil forms**, Herpetol. Monog., 17. 1-74, 2003.
- Khatiri, A., Both, G.W.: **Identification of transcripts and promoter regions of ovine adenovirus OAV287**, Virology, 245. 128-141, 1998.
- Kim, D.Y., Mitchell, M.A., Bauer, R.W., Poston, R., Cho, D.Y.: **An outbreak of adenoviral infection in inland bearded dragons (*Pogona vitticeps*) coinfecting with dependovirus and coccidial protozoa (*Isospora* sp.)**, J. Vet. Diagn. Invest., 14. 332-334, 2002.
- Kinsel, M.J., Barbiers, R.B., Manharth, A., Murnane, R.D.: **Small intestinal adeno-like virus in a mountain chameleon (*Chameleo montium*)**, J. Zoo. Wildl. Med., 28. 498-500, 1997.
- Kisary J., Nagy B., Bitay, Z.: **Presence of parvoviruses in the intestine of chickens showing stunting syndrome**, Avian Pathol., 13. 339-343. 1984.
- Koonin, E.V., Ilyina, T.V.: **Computer-assisted dissection of rolling circle DNA replication**, Biosystems, 30. 241-268, 1993.
- Kovács, E.R., Jánoska, M., Dán, Á., Harrach, B., Benkő, M.: **Recognition and partial genome characterization by non-specific DNA amplification and PCR of a new siadenovirus species in a sample originating from *Parus major*, a great tit**, J. Virol. Methods., 163. 262-268, 2010.
- Kovács, E.R., Benkő, M.: **Confirmation of a novel siadenovirus species detected in raptors: partial sequence and phylogenetic analysis**, Virus. Res., 140. 64-70, 2009.

- Kovács, E.R., Benkő, M.: **Complete sequence of raptor adenovirus 1 confirms the characteristic genome organization of siadenoviruses**, *Infect. Genet. Evol.*, 11. 1058-1065, 2011.
- Kovács, G.M., Harrach, B., Zakhartchoukand, A.N., Davison, A.J.: **Complete genome sequence of simian adenovirus 1: an Old World monkey adenovirus with two fiber genes**, *J. Gen. Virol.* 86. 1681-1686, 2005.
- Kübbler-Heiss, A., Benetka, V., Filip, T., Benyr, G., Schilcher, F., Pallan, C., Möstl, K.: **First detection of an adenovirus infection in a bearded dragon (*Pogona vitticeps*) in Austria**, *Wien, Tierärztl. Monat.* 93. 68-72, 2006.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G.: **Clustal W and Clustal X version 2.0.**, *Bioinformatics*, 23, 2947-2948, 2007.
- Le Gall-Reculé, G., Jestin, V.: **Biochemical and genomic characterization of Muscovy duck parvovirus**, *Arch. Virol.*, 139, 121-31, 1994.
- Li, Y., Ge, X., Zhang, H., Zhou, P., Zhu, Y., Zhang, Y., Yuan, J., Wang, L.F., Shi, Z.: **Host range, prevalence, and genetic diversity of adenoviruses in bats**, *J. Virol.*, 84. 3889-3897, 2010.
- Li, Y., Ge, X., Hon, C., Zhang, H., Zhou, P., Zhang, Y., Wu, Y., Wang, L.F., Wang, L.F., Shi, Z.: **Prevalence and genetic diversity of adeno-associated viruses in bats from China**, *J. Gen. Virol.*, 91. 2601-2609, 2010.
- Lightner, D.V., Redman, R.M., Moore, D.W., Park, M.A.: **Development and application of a simple and rapid diagnostic method to studies on hepatopancreatic parvovirus of penaeid shrimp**, *Aquaculture*, 116. 15-23, 1993.
- Lightner, D.V., Redman, R.M.: **A parvo-like virus disease of penaeid shrimp**, *J. Invert. Pathol.*, 45. 47- 53, 1985.
- Lochrie, M.A., Tatsuno, G.P., Arbetman, A.E., Jones, K., Pater, C., Smith, P.H., McDonnell, J.W., Zhou, S.Z., Kachi, S., Kachi, M., Campochiaro, P.A., Pierce, G.F., Colosi, P.: **Adeno-associated virus (AAV) capsid genes isolated from rat and mouse liver genomic DNA define two new AAV species distantly related to AAV-5**, *Virology*, 353. 68-82, 2006.
- Louis, N., Fender, P., Barge, A., Kitts, P., Chroboczek, J.: **Cell-binding domain of adenovirus serotype 2 fiber**, *J. Virol.*, 68. 4104-4106, 1994.
- Lukashov, V.V., Goudsmit, J.: **Evolutionary relationships among parvoviruses: virus-host coevolution among autonomous primate parvoviruses and links between adeno-associated and avian parvoviruses**, *J. Virol.*, 75. 2729-2740, 2001.

- Lutz, P., Rosa-Calatrava, M., Keding, C.: **The product of the adenovirus intermediate gene IX is a transcriptional activator**, J. Virol., 71. 5102-5109, 1997.
- Maassab, H.F., Francis, T., Davenport, F.M., Hennessy, A.V., Minuse, E., Anderson, G.: **Laboratory and clinical characteristics of attenuated strains of influenza virus**, Bull. World. Health. Organ., 41. 589-594, 1969.
- Mangel, W.F., Baniecki, M.L., McGrath W.J.: **Specific interactions of the adenovirus proteinase with the viral DNA, an 11-amino-acid viral peptide, and the cellular protein actin**, Cell. Mol. Life Sci., 60. 2347-2355, 2003.
- Marek, A., Ballmann, M.Z., Kosiol, C., Harrach, B., Schlotterer, C., Hess, M.: **Whole-genome sequences of two turkey adenovirus types reveal the existence of two unknown lineages that merit the establishment of novel species within the genus *Aviadenovirus***, J. Gen. Virol. 95. 156-170, 2014.
- Marek, A., Nolte, V., Schachner, A., Berger, E., Schlotterer, C., Hess, M.: **Two fiber genes of nearly equal lengths are a common and distinctive feature of Fowl adenovirus C members**, Vet. Microbiol., 156. 411-417, 2012.
- Marschang, R.E.: **Viruses infecting reptiles**, Viruses, 3. 2087-2126, 2011.
- Marusyk, R.G., Norrby, E., Lundqvist, U.: **Biophysical comparison of two canine adenoviruses**, J. Virol., 5. 507-512, 1970.
- Mason, J.M., Arndt, K.M.: **Coiled Coil Domains: Stability, specificity, and biological implications**, Chem. Bio. Chem., 5. 170-176, 2004.
- Massi, P., Gelmetti, D., Sironi, G., Dottori, M., Lavazza, A., Pascucci, S.: **Adenovirus-associated haemorrhagic disease in guinea fowl**, Avian Pathol. 24. 415-421, 1995.
- Mathias, P., Wickham, T., Moore, M., Nemerow, G.: **Multiple adenovirus serotypes use alpha v integrins for infection**, J. Virol., 68. 6811-6814, 1994.
- McFerran, J.B., Smyth, J.A.: **Avian adenoviruses**, Rev. Sci. Tech., 19. 589-601, 2000.
- Meynadier, G., Vago, C., Plantevin, G., Atger, P.: **Virose d'un type inhabituel chez le lépidoptère *Galleriatnelloella* L.**, Rev. Zoo. Agric. Appl., 63. 207-209, 1964.
- Miller, J., Rutenber, E., Muchowski, P.J.: **Polyglutamine dances the conformational cha-cha-cha**, Structure, 17. 1151-1153, 2009.
- Naumer, M., Sonntag, F., Schmidt, K., Nieto, K., Panke, C., Davey, N.E., Popa-Wagner, R., Kleinschmidt, J.A.: **Properties of the adeno-associated virus assembly-activating protein**, J. Virol., 86. 13038-13048, 2012.
- Neilan, J.G., Borca, M.V., Lu, Z., Kutish, G.F., Kleiboeker, S.B., Carrillo, C., Zsak, L., Rock, D.L.: **An African swine fever virus ORF with similarity to C-type lectins is non-essential for growth in swine macrophages in vitro and for virus virulence in domestic swine**, J. Gen. Virol., 80. 2693-2697, 1999.

- Nielsen, J., Rønsholt, L., Sørensen, K.J.: **Experimental in utero infection of pig fetuses with porcine parvovirus (PPV)**, Vet. Microbiol., 28. 1-11, 1991.
- Notredame, C., Higgins, D., Heringa, J.: **T-Coffee: A novel method for multiple sequence alignments**, J. Mol. Biol., 302. 205-217, 2000.
- Ogawa, M., Ahne, W., Essbauer, S.: **Reptilian viruses: adenoviruslike agent isolated from royal python (*Python regius*)**, J. Vet. Med. B., 39. 732-736, 1992.
- Page, D.M.R.: **TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers**, Comput. Appl. Biosci., 12. 357-358, 1996.
- Palade, E.A., Kisary J., Benyeda Z., Mándoki M., Balka G., Jakab C., Végh B., Demeter Z., Rusvai M.: **Naturally occurring parvoviral infection in Hungarian broiler flocks**, Avian Pathol., 40. 191-197, 2011.
- Papp T., Fledelius, B., Schmidt, V., Kaján G.L., Marschang, R.E.: **PCR-sequence characterization of new adenoviruses found in reptiles and the first successful isolation of a lizard adenovirus**, Vet. Microbiol., 134. 233-240, 2009.
- Park, Y.M., Kim, J.H., Gu, S.H., Lee, S.Y., Lee, M.G., Kang, Y.K., Kang, S.H., Kim, H.J., Song, J.W.: **Full genome analysis of a novel adenovirus from the South Polar skua (*Catharacta maccormicki*) in Antarctica**, Virology, 422. 144-150, 2012.
- Parkin, D.B., Archer, L.L., Childress, A.L., Wellehan, J.F.X.: **Genotype differentiation of Agamid Adenovirus 1 in bearded dragons (*Pogona vitticeps*) in the USA by hexon gene sequence**, Infect. Genet. Evol., 9. 501-506, 2009.
- Parrish, C.R., Gorham, J.R., Schwartz, T.M., Carmichel, L.E.: **Characterization of antigenic variation among mink enteritis virus isolates**, Am. J. Vet. Res., 45. 2591-2599, 1984.
- Pasmans, F., Blahak, S., Martel, A., Pantchev, N.: **Introducing reptiles into a captive collection: The role of the veterinarian**, Vet. J., 175. 53-68, 2008.
- Patton, E.E., Willems, A.R., Tyers, M.: **Combinatorial control in ubiquitin-dependent proteolysis: don't Skp the F-box hypothesis**, Trends Genet., 14. 236-43, 1998.
- Perry, W.L.: **JavaScript DNA Translator: DNA-aligned protein translations**, Bio. Techniques, 33. 1318-1320, 2002.
- Pham, H.T., Yu, Q., Bergoin, M., Tijssen, P.: **A novel ambisense densovirus, *Acheta domesticus* mini ambidensovirus, from crickets**, Genome Announc., 1. e00914-13, 2013.
- Pitcovski, J., Mualem, M., Rei-Koren, Z., Krispel, S., Shmueli, E., Peretz, Y., Gutter, B., Gallili, G.E., Michael, A., Goldberg, D.: **The complete DNA sequence and genome organization of the avian adenovirus, hemorrhagic enteritis virus**, Virology., 249. 307-315, 1998.

- Poss, M., Ross, H.A., Painter, S.L., Holley, D.C., Terwee, J.A., Vandewoude, S., Rodrigo, A.: **Feline lentivirus evolution in cross-species infection reveals extensive G-to-A mutation and selection on key residues in the viral polymerase**, *J. Virol.*, 80. 2728-2737, 2006.
- Pyron, R.A., Burbrink, F.T., Wiens, J.J.: **A phylogeny and revised classification of Squamata, including 4161 species of lizards and snakes**, *BMC Evol. Biol.*, 13. 93, 2013.
- Qiu, J., Cheng, F., Pintel, D.J.: **Expression profiles of bovine adeno-associated virus and avian adeno-associated virus display significant similarity to that of adenoassociated virus type 5**, *J. Virol.* 80. 5482-5493, 2006.
- Qiu, J., Cheng, F., Yoto, Y., Zádori, Z., Pintel, D.: **The expression strategy of goose parvovirus exhibits features of both the *Dependovirus* and *Parvovirus* genera**, *J. Virol.*, 79. 11035-11044, 2005.
- Qiu, J., Pintel, D.: **Processing of adeno-associated virus RNA**, *Front. Biosci.*, 13. 3101-3115, 2008.
- 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.: **Adenovirus hepatitis in a boa constrictor (*Boa constrictor*)**, *J. Vet. Diagn. Investig.*, 12. 573-576, 2000.
- Raue, R., Hess, M.: **Hexon based PCRs combined with restriction enzyme analysis for rapid detection and differentiation of fowl adenoviruses and egg drop syndrome virus**, *J. Virol. Methods.*, 73. 211-217, 1998.
- Raymond, J.T., Garner, M.M., Murray, S., Nordhausen, R.: **Oroesophageal adenovirus-like infection in a palm viper, *Bothriechis marchi*, with inclusion body-like disease**, *J. Herpetol. Med. Surg.*, 12. 30-32, 2002.
- Raymond, J.T., Lamm, M., Nordhausen, R., Latimer, K., Garner, M.M.: **Degenerative encephalopathy in a coastal mountain kingsnake (*Lampropeltis zonata multifasciata*) due to adenoviral-like infection**, *J. Wildl. Dis.*, 39. 431-436, 2003
- Reddy, P.S., Idamakanti, N., Zakhartchouk, A.N., Baxi, M.K., Lee, J.B., Pyne, C., Babiuk, L.A., Tikoo, S.K.: **Nucleotide sequence, genome organization, and transcription map of bovine adenovirus type 3**, *J. Virol.*, 72. 1394-1402, 1998.
- Reese, M.G., Eeckman, F.H., Kulp, D., Haussler, D.: **Improved splice site detection in Genie**, *J. Comp. Biol.*, 4. 311-323, 1997.
- Richmond, S.J., Caul, E.O., Dunn, S.M., Ashley, C.R., Clarke, S.K.R., Seymour, N.R.: **An outbreak of astroenteritis in young children caused by adenoviruses**, *Lancet*, 1. 1178-1180, 1979.

- Rivera, S., Wellehan, J.F., McManamon, R., Innis, C.J., Garner, M.M., Raphael, B.L., Gregory, C.R., Latimer, K.S., Rodriguez, C.E., Diaz-Figueroa, O., Marlar, A.B., Nyaoke, A., Gates, A.E., Gilbert, K., Childress, A.L., Risatti, G.R., Frasca, S.: **Systemic adenovirus infection is Sulawesi tortoises (*Indotestudo forsteni*) caused by a novel siadenovirus**, J. Vet. Diagn. Invest., 21. 415-426, 2009.
- Roberts, M.M., White, J.L., Grutter, M.G., Burnett, R. M.: **Three-dimensional structure of the adenovirus major coat protein hexon**, Science, 232. 1148-1151, 1986a.
- Roberts, R.J., Akusjarvi, G., Alestrom, P., Gelinis, R. E., Gingeras, T. R., Sciaky, D., Pettersson, U.: **A Consensus sequence for the adenovirus-2 genome**. In: Doerfler DW (ed) Adenovirus DNA: The Viral Genome and Its Expression. Martinus Nijhoff, Boston, MA. pp. 1-51, 1986b.
- Roelvink, P.W., Lizonova, A., Lee, J.G.M., Li, Y., Bergelson, J.M., Finberg, R.W., Brough, D.E., Kovsdi I., Wickham, T.J.: **The coxsackievirusadenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F**, J. Virol., 72. 7909-7915, 1998.
- Rosa-Calatrava, M., Grave, L., Puvion-Dutilleul, F., Chatton, B., Kedingler, C.: **Functional analysis of adenovirus protein IX identifies domains involved in capsid stability, transcriptional activity, and nuclear reorganization**, J. Virol., 75. 7131-7141, 2001.
- Rowe, W.P., Huebner, R.J., Gilmore, L.K., Parrott, R.H., Ward, T.G.: **Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture**, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 84. 570-573, 1953.
- Ruffing, M., Heid, H., Kleinschmidt, J.A.: **Mutations in the carboxy terminus of adeno-associated virus 2 capsid proteins affect viral infectivity: lack of an RGD integrin-binding motif**, J Gen Virol., 75. 3385-3392, 1994.
- Russell, W.C., Benkő, M.: **Adenoviruses (*Adenoviridae*): animal viruses**. In: Granoff A, Webster, R.G. (eds): Encyclopedia of Virology. Academic Press, London, pp. 14-21, 1999.
- Rutherford, K., Parkhill, J., Crook, J., Horsnell, T., Rice, P., Rajandream, M.A., Barrell, B.: **Artemis: sequence visualization and annotation**, Bioinformatics, 16. 944-945, 2000.
- Ruzindana-Umunyana, A., Imbeault, L., Weber, J.M.: **Substrate specificity of adenovirus protease**, Virus Res., 89. 41-52, 2002.
- Salamov, A.A., Solovyev, V.V.: **Recognition of 3'-end cleavage and polyadenylation region of human mRNA precursors**, Bioinformatics, 13. 23-28, 1997.

- San Martin, C., Glasgow, J.N., Borovjagin, A., Beatty, M.S., Kashentseva, E.A., Curiel, D.T., Marabini, R., Dmitriev, I.P.: **Localization of the N-terminus of minor coat protein IIIa in the adenovirus capsid**, J. Mol. Biol., 383. 923-934, 2008.
- Schaefer, N.: **A few thoughts concerning the life span of chameleons**, Afr. J. Herpetol., 8. 21-24, 1971.
- Schettler, C.H.: **Isolation of a highly pathogenic virus from geese with hepatitis**, Avian Dis, 15. 324-326, 1971.
- Schlehofer, J.R., Heilbronn, R., Georg-Fries, B., zur Hausen, H.: **Inhibition of initiator-induced SV40 gene amplification in SV40-transformed Chinese hamster cells by infection with a defective parvovirus**, Int. J. Cancer, 32. 591-595, 1983.
- Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P., Ponting, C.P.: **SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains**, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95. 5857-5864, 1998.
- Schumacher, J., Jacobson, E.R., Burns, R., Tramontin, R.R.: **Adenovirus-like infection in two rosy boas (*Lichanura trivirgata*)**, J. Zoo. Wildl. Med., 25. 461-465, 1994.
- Schumacher, V.L., Innis, C.J., V.M.D., Garner, M.M., Risatti G.R., Nordhausen, W., Gilbert-Marcheterre, K., Wellehan, J.F.X., Childress, A.L., Frasca, S.: **Sulawesi tortoise adenovirus-1 in two impressed tortoises (*Manouria impressa*) and a Burmese star tortoise (*Geochelone platynota*)**, J. Zoo. Wildlife Med., 43. 501-510, 2012.
- Schöndorf, E., Bahr, U., Handermann, M., Darai G.: **Characterization of the complete genome of the Tupaia (tree shrew) adenovirus**, J. Virol., 77. 4345-4356, 2003.
- Shackelton, L.A., Parrish, C.R., Holmes, E.C.: **Evolutionary basis of codon usage and nucleotide composition bias in vertebrate DNA viruses**, J. Mol. Evol., 62. 551-563, 2006.
- Shackelton, L.A., Parrish, C.R., Truyen, U., Holmes, E.C.: **High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus**, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102. 379-84, 2005.
- Sharma, J.M.: **Hemorrhagic enteritis of turkeys**, Vet. Immunol. Immunopathol., 130. 67-71, 1991.
- Shimizu, T.: **Pathogenicity of an infectious flacherie virus of the silkworm, *Bombyx mori*, obtained from sericultural farms in the suburbs of Ina city**, J. Seric. Sci. Jpn., 44. 45-48, 1975.
- Skubis-Zegadło, J., Stachurska, A., Małecki, M.: **Vectorology of adeno-associated viruses (AAV)**, Med. Wieku. Rozwoj., 17. 202-206, 2013.
- Smart, J.E., Stillman, B.W.: **Adenovirus terminal trotein precursor. Partial amino acid sequence and the site covalent linkage to virus DNA**, J. Biol. Chem., 257. 13499-13506, 1982.

- Smith, DK., Xue, H.: **Sequence profiles of immunoglobulin and immunoglobulin-like domains**, J. Mol. Biol., 274.530-545, 1997.
- Song, J.D., Liu, X.L., Chen, D.L., Zou, X.H., Wang, M., Qu, J.G., Lu, Z.Z., Hung, T.: **Human adenovirus type 41 possesses different amount of short and long fibers in the virion**, Virology, 432. 336-342, 2012.
- Sonntag, F., Köther, K., Schmidt, K., Weghofer, M., Raupp, C., Nieto, K., Kuck, A., Gerlach, B., Böttcher, B., Müller, O.J., Lux, K., Hörer, M., Kleinschmidt, J.A.: **The assembly-activating protein promotes capsid assembly of different adeno-associated virus serotypes**, J. Virol., 85.12686-12697, 2011.
- Staden, R., Beal, K.F., Bonfield, J.K.: **The Staden Package**. In: Misener S, Krawetz S (eds) Computer Methods in Molecular Biology. Totowa, Humana Press pp 115-130, 1998.
- Sukhumsirichart, W., Attasart, P., Boonsaeng, V., Panyim, S.: **Complete nucleotide sequence and genomic organization of hepatopancreatic parvovirus (HPV) of *Penaeus monodon***, Virology, 346. 266-277, 2006.
- Tal, J., Attathom, T.: **Insecticidal potential of the insect parvovirus GmDNV**, Arch. Insect Biochem. Physiol., 22. 345-356, 1993.
- Tamanoi, F., Stillman, B.W. : **Function of adenovirus terminal protein in the initiation of DNA replication**, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79. 2221-2225, 1983.
- Thomson, D., Meers, J., Harrach, B.: **Molecular confirmation of an adenovirus in brushtail possums (*Trichosurus vulpecula*)**, Virus. Res., 83. 189-195, 2002.
- Tijssen, P., M. Agbandje-McKenna, J.M. Almendral, M. Bergoin, T.W. Flegel, K. Hedman, J. Kleinschmidt, Y. Li, D.J. Pintel, and P. Tattersall.. **Parvoviridae**. in A.M.Q. King, E. Lefkowitz, M. J. Adams and E.B. Carstens (eds.), Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier, San Diego, CA. pp 405-425, 2011.
- Tolin, S.A., Domermuth, C.H.: **Hemorrhagic enteritis of turkeys: electron microscopy of the causal virus**, Avian Dis., 19. 118-125, 1975.
- Townsend, T., Larson, A., Louis, E., Macey, J.R.: **Molecular phylogenetics of squamata: the position of snakes, amphisbaenians, and dibamids, and the root of the squamate tree**, Syst. Biol., 53. 735-757, 2004.
- Trabelsi, K., Kamen, A., Kallel, H.: **Development of a vectored vaccine against hepatitis E virus**, Vaccine, 32. 2808-2811. 2014. [
- Tsang, V.W., Young, D., During, M.J., Birch, N.P.: **AAV-mediated overexpression of neuroserpin in the hippocampus decreases PSD-95 expression but does not affect hippocampal-dependent learning and memory**, PLoS One, 7. e91050, 2014.

- Tse, H., Tsoi, H.W., Teng, J.L., Chen, X.C., Liu, H., Zhou, B., Zheng, B.J., Woo, P.C., Lau, S.K., Yuen, K.Y.: **Discovery and genomic characterization of a novel ovine partetravirus and a new genotype of bovine partetravirus**, PLoS One 6. e25619, 2011.
- Uhnöo, I., Wadell, G., Svensson, L., Johansson, M.E.: **Importance of enteric adenoviruses 40 and 41 in acute gastroenteritis in infants and young children**, J. Clin. Microbiol., 20. 365-372, 1984.
- Ursu, K., Harrach, B., Matiz, K., Benkő, M.: **DNA sequencing and analysis of the righthand part of the genome of the unique bovine adenovirus type 10**, J. Gen. Virol., 85. 593-601, 2004.
- Van Oostrum, J., Smith, P.R., Mohraz, M., Burnett, R.M.: **The structure of the adenovirus capsid. III. Hexon packing determined from electron micrographs of capsid fragments**, J. Mol. Biol., 198. 73-89, 1987.
- van Der Vliet, P.C.: **Adenovirus DNA replication**. In: Böhm WDP (ed) Molecular Repertoire of Adenoviruses. Springer, Köln, Germany. pp. 24 1995.
- van Raaij, M.J., Mitraki, A., Lavigne, G., Cusack, S.: **A triple β -spiral in the adenovirus fibre shaft reveals a new structural motif for a fibrous protein**, Nature, 401. 935-938, 1999.
- VanDevanter, D.R., Warren, P., Bennett, L., Schultz, E.R., Coulter, S., Garber, R.L., Rose, T.M.: **Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primer PCR**, J. Clin. Microbiol., 34.1666-1671, 1996.
- Walsh, M.P., Seto, J., Jones, M.S., Chodosh, J., Xu, W., Seto, D.: **Computational analysis identifies human adenovirus type 55 as a re-emergent acute respiratory disease pathogen**, J. Clin. Microbiol., 48. 991-993, 2010.
- Wang, F., Wei, Y., Zhu, C., Huang, X., Xu, Y., Yu, L., Yu, X.: **Novel parvovirus sublineage in the family of Parvoviridae**, Virus Genes, 41. 305-308, 2010.
- Wang, S., Cheng, X.X., Chen, S.Y., Zhu, X.L., Chen, S.L., Lin, F.Q., Li, Z.L.: **Genetic characterization of a potentially novel goose parvovirus circulating in Muscovy duck flocks in Fujian Province, China**, J. Vet. Med. Sci., 75. 1127-1130, 2013.
- Weber, J. M.: **Adenovirus endopeptidase and its role in virus infection**, Curr. Top. Microbiol. Immunol., 199. 227-235, 1995.
- Weinberg, M.S., Samulski, R.J., McCown, T.J.: **Adeno-associated virus (AAV) gene therapy for neurological disease**, Neuropharmacology, 69. 82-88, 2013.
- Wellehan, J.F.X., Greenacre, C.B., Fleming, G.J., Stetter, M.D., Childress, A.L., Terrell, S.P.: **Siadenovirus infection in two psittacine bird species**, Avian. Pathol., 38. 413-417, 2009.

- Wellehan, J.F.X., Johnson, A.J., Harrach, B., Benkő, M., Pessier, A.P., Johnson, C.M., Garner, M.M., Childress, A., Jacobson, E.R.: **Detection and analysis of six lizard adenoviruses by consensus primer PCR provides further evidence of a reptilian origin for the atadenoviruses**, J. Virol., 78. 13366-13369, 2004.
- Wiens, J.J., Hutter, C.R., Mulcahy, D.G., Noonan, B.P., Townsend, T.M., Sites, J.W. and Reeder, T.W.: **Resolving the phylogeny of lizards and snakes (Squamata) with extensive sampling of genes and species**, Biol. Letters, 8. 1043-1046, 2012.
- Wilcock, D., Duncan, S.A., Traktman, P., Zhang, W.H., Smith, G.L.: **The vaccinia virus A4OR gene product is a nonstructural, type II membrane glycoprotein that is expressed at the cell surface**, J. Gen. Virol., 80. 2137-2148, 1999.
- Wolf, V.H.G., Menossi, M., Mourão, G.B., Gatti, M.S.V.: **Molecular basis for porcine parvovirus detection in dead fetuses**, Genet. Mol. Res., 7. 509-517, 2008.
- Woods, L.W., Swift, P.K., Barr, B.C., Horzinek, M.C., Nordhausen, R.W., Stillian, M.H., Patton, J.F., Oliver, M.N., Jones, K.R., MacLachlan, N.J.: **Systemic adenovirus infection associated with high mortality in mule deer (*Odocoileus hemionus*) in California**, Vet. Pathol., 33. 125-32, 1996.
- Wozniak, E.J., DeNardo, D.F., Brewer, A., Wong, V., Tarara, R.P.: **Identification of adenovirus and dependovirus-like agents in an outbreak of fatal gastroenteritis in captive born California mountain kingsnakes, *Lampropeltis zonata multicincta***, J. Herpetol. Med. Surg., 10. 4-7, 2000.
- Vrati, S., Brookes, D.E., Strike, P., Khatri, A., Boyle, D.B., Both, G.W.: **Unique genome arrangement of an ovine adenovirus: identification of new proteins and proteinase cleavage sites**, Virology, 220. 186-199, 1996.
- Wu, E., Pache, L., Von Seggern, D.J., Mullen, T.M., Mikyas, Y., Stewart, P.L., Nemerow, G.R.: **Flexibility of the adenovirus fiber is required for efficient receptor interaction**, J. Virol., 77. 7225-7235, 2003.
- Wu, P., Xiao, W., Conlon, T., Hughes, J., Agbandje-McKenna, M., Ferkol, T., Flotte, T., Muzyczka, N.: **Mutational analysis of the adeno-associated virus type 2 (AAV2) capsid gene and construction of AAV2 vectors with altered tropism**, J. Virol., 74. 8635-8647, 2000.
- Yakobson, B., Koch, T., Winocour, E.: **Replication of adenoassociated virus in synchronized cells without the addition of a helper virus**, J. Virol., 61. 972-981, 1987.
- Yeh, H.Y., Pieniazek, N., Pieniazek, D., Gelderblom, H., Luftig, R.B.: **Human adenovirus type 41 contains two fibers**, Virus Res., 33. 179-98, 1994.
- Yoto, Y., Qiu, J., Pintel, D.J.: **Identification and characterization of two internal cleavage and polyadenylation sites of parvovirus B19 RNA**, J. Virol., 80. 1604-1609, 2006.

- Zádori Z., Stefanics R., Rauch, T., Kisary J.: **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, 1995.
- Zádori Z., Szelei J., Lacoste, M.C., Li, Y., Gariépy, S., Raymond, P., Allaire, M., Nabi, I.R., Tijssen, P.: **A viral phospholipase A2 is required for parvovirus infectivity**, *Dev. Cell.*, 1. 291-302, 2001.
- Zhang, Z., Zheng, Z., Luo, H., Meng, J., Li, H., Li, Q., Zhang, X., Ke, X., Bai, B., Mao, P., Hu, Q., Wang, H.: **Human bocavirus NP1 inhibits IFN- β production by blocking association of IFN regulatory factor 3 with IFNB promoter**, *J. Immunol.*, 189. 1144-1153, 2012.
- Zsák, L., Strother, K.O., Kisary, J.: **Partial genome sequence analysis of parvoviruses associated with enteric disease in poultry**, *Avian Pathol.*, 37. 435-441, 2008.
- Zuker, M.: **Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction**, *Nucleic Acids Res.*, 31. 3406-3415, 2003.

8. Az értekezés alapjául szolgáló publikációk és konferencia közlemények

8.1 Publikációk

- 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.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., Doszpoly A.: **Adenovírusos fertőzöttség kimutatása szakállas agámákban (*Pogona vitticeps*) Magyarországon. [Detection of adenoviral infection in bearded dragons (*Pogona vitticeps*) in Hungary. In Hungarian]**, *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]

8.2 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.
- Pénzes 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.
- Pénzes 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.
- Pénzes 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.
- Pénzes 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 Compostella, Spain, 2010.
- Pénzes 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.

9. További publikációk

Tarján Z.L., Péntzes 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.

10. 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 létrejöjjön. 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 átolvasásáért 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 utolsósorban, a családomnak szeretném megköszönni, kiváltképp a nagypapámnak, mert nélküle az idáig vezető út is másképp alakult volna. A kutatások anyagi fedezetét elsősorban az OTKA K100163 támogatása biztosította.