

ZÁRÓJELENTÉS

Előzmények és célkitűzések

Pályázatunk elsődleges célkitűzése az adenovírusok rendszertani kérdéseinek tisztázására irányuló vizsgálatok elvégzése volt. A PCR és DNS szekvenálási módszerek utóbbi években tapasztalt rohamos térhódításának eredményeképp az adatbázisokban nyilvánosan hozzáférhető szekvencia, ezen belül különösen a vírusokból származók mennyisége is gyorsuló ütemben nő. Így a modern taxonómia kialakítása során a genetikai rokonsági viszonyokra egyre nagyobb hangsúly kerülhet.

Kutatócsoportunk tagjainak javaslatára az *Adenoviridae* családon belül két új nemzetséget létesítettek. A jelenleg elfogadott négy nemzetség közül kettő (*Mast-* és *Aviadenovirus*) az emlősök illetve madarak adenovírusainak besorolására szolgál, míg a két újonnan elfogadott genusba tartozó adenovírusok vegyes gazdaeredetűek. Az *Atadenovirus* genusba eredetileg kérődzőkből és madaraktól izolált adenovírusok kerültek, a *Siadenovirus* pedig madaraktól és az eddig egyetlen, békából izolált adenovírust tartalmazza. Kimutattuk továbbá, hogy az egyelőre szintén egyetlen, halból származó adenovírus izolátum genomszerveződése és törzsfá-rekonstrukciókon elfoglalt helye alapján egy ötödik leszármazási vonal, és valószínűleg egy újabb genus képviselője. Feltételeztük, hogy a siadenovírusok a kételtűekkel, az atadenovírusok pedig a hullókkal együtt fejlődött adenovírus leszármazási vonalnak felelnek meg.

A fenti hipotézisek bizonyításán kívül, terveztük még az egyes nemzetségeken belül az adenovírus fajok pontosabb meghatározását, illetve annak vizsgálatát, hogy a humán adenovírusok fajba sorolásának kritériumaira tett javaslatunk alapján az állati adenovírusok beosztása is elvégezhető-e megnyugtató módon.

Eredmények

A Nemzetközi Vírusrendszertani Bizottság (ICTV) Nyolcadik Jelentésében, ami 2005 júliusában jelent meg, ismét mi írtuk az *Adenoviridae* fejezetet. Ez az első olyan ICTV Jelentés, amelyben az általunk javasolt beosztás szerint már hivatalosan is négy nemzetség szerepel. Az *Adenoviridae* Munkacsoport vezetésére (legfeljebb hat évre) szóló megbízatásom a második ciklus befejeztével, 2005-ben lejárt. Nagy megtiszteltetés, hogy a következő 3 évre témacsoportunk másik tagját (Harrach Balázst) nevezték ki új vezetőnek, ezzel is megerősítve a rendszeren megújításában végzett eddigi munkánk elismerését.

Mastadenovirus

A *Mastadenovirus* genus tagjai közül a majom-adenovírusok (simian adenovírus = SAdV) jellemzése során két vírusgenom teljes szekvenciáját meghatároztuk és elemeztük. Ezek világviszonylatban is az első, teljesen jellemzett adenovírusok óvilági majomból. Az egyik vírus (SAdV-3) genomszerveződése és filogenetikai számítások alapján a legősibb típus és egyben faj (SAdV-A) az eddig vizsgált főemlős-adenovírusok közül. Cikkünket a legjobb virológiai szaklapok egyike, a *Journal of General Virology* közölte. A másik vírus (SAdV-1) eredményeink szerint legközelebb a hasmenést okozó Human adenovirus F fajhoz, azaz a HAdV-40-es és 41-es típushoz áll, és ezekhez hasonlóan két fiber gén található benne. Ugyanakkor filogenetikai távolsága és az E3 és E4 régiójának jellegzetes szerkezete arra utal, hogy önálló adenovírus faj képviselőjének tekintendő. Ezzel kapcsolatos közleményünk ugyancsak *Journal of General Virology*-ban jelent meg.

Amerikai együttműködésben sikerült egy, a SAdV-1-hez hasonló, de klinikai (hasmenéses) tüneteket mutató emberekből izolált, új emberi adenovírusnak is a teljes genom szekvenciáját meghatározni és elemezni. A munka jelentőségét az adja, hogy közel 10 éve

nem írtak le új humán adenovírust (HAdV). A HAdV-52 felismeréséről, jellemzéséről és filogenetikai vizsgálatáról szóló kéziratot a lektorok által javasolt javítások után, e jelentés készítésének idején küldtük vissza a Journal of Virology részére közlésre. Az új humán vírus, noha sok tekintetben hasonlít a HAdV-F faj tagjaira (például két fiber génje, és hasonlóan rövid E3 régiója van), filogenetikai távolsága esetleges új fajba sorolását indokolja. Ezt alátámasztja a genomszerveződésben megfigyelhető néhány jellegzetesség is. A HAdV-F tagjaiban ugyanis hiányzik két gén, nevezetesen az E3 12,5 K valamint az E4 ORF1 (dUTPáz), melyek a főemlősök összes többi adenovírusában előfordulnak. Jellegzetes eltérés figyelhető meg a vírusgenom jellemzésére szolgáló nukleotid összetételben (G+C arányban) is. A HAdV-40 és 41 illetve a HAdV-52 és SAdV-1 között ez az érték 4–5% különbséget mutat, ami meghaladja a többi HAdV speciesen belüli eltérés mértékét. Úgy tűnik, hogy az adenovírusok faj kategóriájának kialakításához ez a kritérium igen jól alkalmazható.

PCR és szekvenálás segítségével két szarvasmarha-adenovírus (bovin adenovírus = BAdV) azonosítását végeztük el. Az egyik szarvasmarha izolátumot Németországból kaptuk. A német virológus kolléga évtizedekkel ezelőtt, még az NDK-ban izolálta a vírust. Szerológiai vizsgálatokkal megállapította, hogy az ismert BAdV típusok egyikével sem azonos. Laboratóriumunkban a vírusizolátumból nyert PCR termékek nukleotid sorrendje alapján megerősítettük, hogy csakugyan egy új, bovin mastadenovírus típusról van szó. Az eredmény közléséhez még további genomrészek szekvenálását tervezzük. A másik izolátumról megállapítottuk, hogy atadenovírus.

A kutatócsoportunk részvételével leírt 10-es szerotípusú adenovírus (BAdV-10) vizsgálata során genom-szekvenciájának felét meghatároztuk. Az ebben található E3 és E4 régiók részletes összehasonlító elemzését is elvégeztük. Ennek alapján megállapítottuk, hogy a BAdV-10 mind genomszerveződése, mind pedig törzsfa-rekonstrukciókon elfoglalt helye alapján távol áll a többi, ismert BAdV-tól, és érdekes módon az ősi, eger-adenovírussal mutat közelebbi rokonságot. A felismerés jelentőségét abban látjuk, hogy a BAdV-10 előfordulását már több kontinensen (Európában, Észak-Amerikában, Ausztráliában) leírták, és eddigi izolátumai minden esetben elhullott szarvasmarhából származnak. A betegség vérzéses bélgyulladás, hasmenéssel jár. A BAdV-10 a bélfal ereinek endothel sejtjeit károsítja. Az eddigi BAdV-10 törzsek érdekessége még, hogy noha szerológiailag azonosnak látszanak, az elsődleges sejtkapcsolódásért felelős fehérjéjüknek, a fibernek a génje izolátumonként eltérő méretű. Némely törzsben deléciót, másokban részleges kettőződést lehetett megfigyelni. Kézenfekvő feltételezés, hogy a BAdV-10 esetében viszonylag friss gazdaváltás szemtanúi vagyunk, és a megfigyelt variabilitás az új gazdához történő adaptációs folyamat velejárója.

A korábban Angliából kapott mókus-adenovírus témájában egy angol szakdolgozó diák töltött 2004 nyarán két hónapot laboratóriumunkban. Az új mókus-adenovírust izolálni nem sikerült, de több génjét PCR és klónozás után szekvenálni tudtuk. Az eddig megismert genomszakaszból a teljes pVI, hexon és proteáz jellemzését tervezzük publikálni.

Atadenovirus

Az Észak-Írországból tipizálás céljából kapott szarvasmarha adenovírus izolátumról kiderítettük, hogy a BAdV-6-tal csaknem azonos, tehát valójában az *Atadenovirus* nemzetség tagja. Mivel ez a BAdV-6 előfordulásának első megfigyelése az Egyesült Királyságban, munkánkat a Veterinary Record közölte.

Részt vettünk egy olyan, rendkívül érzékeny, kétkörös (nested) PCR kifejlesztésében, ami az adenovírusok saját DNS-polimeráz génjének egy rövid szakaszát erősíti fel, rendkívül degenerált, család-specifikus, konszenzus primer párok segítségével. Az eljárást (polnest PCR) a laboratóriumunkban megtalálható több tucat adenovírus mintán teszteltük, és eddig ezek mindegyike pozitív reakciót adott. Ennek alapján a módszert az adenovírusok általános kimutatására alkalmasnak ítéljük. A rendkívüli érzékenység (és főként a primerek

degeneráltsága) miatt a módszer specificitás szempontjából kifogásolható, ezért rutin diagnosztikai célra csak fenntartásokkal ajánlható. Kimagaslóan értékesnek tekintjük viszont minden olyan esetben, melyben adenovírusok jelenlétének gyanúja áll fenn. A PCR második körében keletkező termék rendszerint közvetlenül (a PCR primerek segítségével) szekvenálható, és a rövid, alig 300 bázispár (bp) méretű génszakaszból származtatott aminosav szekvencia alapján törzsfa-rekonstrukció készíthető. Az esetek döntő többségében már ennek az igen rövid szekvencián alapuló filogenetikai fának alapján meghatározható, hogy a kimutatott vírus nagyjából melyik nemzetségbe tartozik. Ezután már genus specifikus primerek használatával további genomszakaszokat lehet felerősíteni és elemezni.

Németországból kapott négy hullőmintát vizsgáltunk, és megállapítottuk, hogy a patkánysiklóból származó mintában az általunk korábban részletesen vizsgált gabonasikló-adenovírussal azonos vírus van jelen, továbbá a három (különböző tenyészetből származó) szakállas agáma minta az USA-ban kimutatott agáma-adenovírussal csaknem teljesen azonos. Az egyetlen ismert szakállas agáma-adenovírus izolátumot is megkaptuk, és genom szekvenálását megkezdjük. Ez a vírus ugyanis rendszeresen megbetegedést okoz az agáma tenyészetekben mind Európában, mind pedig Észak-Amerikában.

Usutu vírus illetve madárinfluenza-vírus szűrés céljára gyűjtött több száz hazai, osztrák és svájci madármintát is tanulmányoztunk a polnest PCR alkalmazásával adenovírus jelenlétére. A gyűjtött minták nagyobb része elhullott madaraktól származott, és talán ennek is köszönhető, hogy a vártnál nagyobb számban, megközelítőleg a minták 10%-ában pozitív reakciót kaptunk. Érdekes módon, a különféle fajokban, melyek között házi és vízi szárnyasok mellett számos ragadozó- és énekes madár is volt, a baromfiban megfigyeltekhez hasonlóan három genusba sorolható adenovírusok fordultak elő. A rövid génszakasz alapján új típust, és feltehetőleg új vírusfajt is képviselő atadenovírusnak tűnő vírus jelenlétét mutattuk ki kormorán, feketeterítő, zöldike, veréb és varjú eredetű mintákban. Több mint fél tucat osztrák feketeterítő mintában ugyanaz a nagyon ősi vírus fordul elő, melynek pontos nemzetségbe sorolását egyelőre még nem sikerült elvégezni, de nagy valószínűséggel ez is atadenovírus. Részletesebb vizsgálata jelenleg folyamatban van.

Siadenovirus

A polnest PCR-rel angliai ragadozómadár tenyészetekben elhullott egyedek olyan mintáit vizsgáltuk, melyeket a madarakban eddig leírt három (*Avi*-, *At*- és *Siadenovirus*) genusba tartozó adenovírusok specifikus kimutatására kidolgozott háromféle PCR-rel német kutatók előzőleg negatívnak találtak. A rövid DNS-polimeráz génszakasz után sikerült PCR segítségével a hexon gén egy hosszabb részletének szekvenciáját is meghatározni. Mindkét génrészlet analízise arra utalt, hogy az általunk raptor adenovírusnak elnevezett vírus önálló, új siadenovírus fajt képvisel. Genomjának további vizsgálata egy szakdolgozat és egy PhD munka témája lett. A penton géntervezett, siadenovírusokra specifikus (konszenzus) primerekkel nem sikerült pozitív PCR eredményt kaptunk, annak ellenére, hogy e degenerált primerek a referencia vírusnak használt, a pulykák vérzéses hasmenését okozó THEV (turkey hemorrhagic enteritis virus) megfelelő szakaszát nagy hatékonysággal felerősítették. További PCR primereket terveztünk minél több és hosszabb genomszakasz kinyerése céljára. A siadenovírus nemzetség két ismert tagjának (béka-adenovírus és THEV) teljes nukleotid szekvenciája rendelkezésre áll, így ezek összehasonlítása alapján a genom néhány területén találtunk olyan, primer szekvenciának megfelelő szakaszokat, amelyek a két vírusban nukleinsav szinten is tökéletesen megegyeznek. A fenti megközelítések kombinációjából álló stratégiával a feltehetően 26–28 ezer bp méretű genomból mostanra mintegy 10 ezer bp nukleotid sorrendjét sikerült meghatározni.

A madárminták szűrése során további új siadenovírus jelölteket találtunk szécinege, csonttollú, cserregő nádiposzáta, galamb és feketeterítő mintában. Ezeknek az általában nem

izolálható vírusoknak a jellemzésére különösen nagy gondot fordítunk, mivel a *Siadenovirus* nemzetségnek eddig mindössze két tagja volt. Genomjuk a máig ismert legkisebb adenovírus genom, amennyiben az egész víruscsalád minden egyes tagjára jellemző 16 plusz egy konzervált génen kívül mindössze öt, genus specifikus génjük illetve ORF-jük van. Ezek közül kettő (a genus elnevezését adó szialidáz-szerű, valamint egy hidrofób fehérjét kódoló gén) a mastadenovírusok E1 régiójának helyén, a genom bal végén található. Siadenovírus specifikus a pVIII és fiber gén közötti, úgy nevezett E3 régió is, amely mindössze egyetlen, eddig ismeretlen funkciójú ORF-et tartalmaz. Végül a genom jobb végén két, ugyancsak siadenovírus specifikusnak látszó ORF (ORF 7 és 8) található. A vegyes gazdaeredet (madarak és béka) miatt csak feltételezhettük, hogy a siadenovírusok esetleg a kételtűekkel együtt fejlődött adenovírus leszármazási vonalat képviselhetik. Ezt alátámasztotta a viszonylag kicsi és egyszerű genom, szemben a madarak adenovírusait tartalmazó *Aviadenovirus* nemzetség tagjaival, amelyeknek 45 ezer bp körüli genomja a mastadenovírusokéhoz viszonyítva is nagy. A kételtű eredet bizonyításához igyekeztünk minél több elpusztult kételtűből is mintát beszerezni. Sajnos ez nem könnyű vállalkozás, és az eddig vizsgálatra érkezett csekély számú mintában nem sikerült még adenovírust kimutatni. A jelentés készítésekor még nem ismerjük a díszállat boltból származó, elhullott, tűzhasú gőtek pozitív PCR mintájából kinyert PCR termék szekvenciáját, de mint korábban említettük, a módszer érzékenysége miatt nem ritka a téves (nem specifikus) pozitív eredmény.

Aviadenovirus

Az *Aviadenovirus* nemzetségbe tartozó vírusok közül egy pulyka- és liba-adenovírus teljes genom-szekvenciájának meghatározása van folyamatban. A hazai izolálású pulyka-adenovírus genomját kétféle (*Bam*HI és *Pst*I) restriktációs enzimmel történt vágás után molekulárisan klónoztuk, és bakteriális plazmidban szekvenáljuk. A legalább 42 ezer bp méretűnek becsült genom megközelítőleg 50%-ának nukleotid sorrendjét meghatároztuk már. Megállapítottuk, hogy genomszerveződése alapján a két, korábban vizsgált tyúk-adenovírus (FAdV-1 és 9) közeli rokonának tekinthető, de önálló fajt képvisel. Mivel a pulyka-adenovírus genomjának mindkét végét is sikerült klónozni, elméletileg lehetőségünk van átfedő szakaszok segítségével olyan vektorok előállítására, amelyekből permisszív sejtekbe történő transzfektálás után rekombináns adenovírusok hozhatók létre. A THEV-vel ellentétben ez a pulyka-adenovírus csirke-embrió máj-szövettenyésztésben is jól szaporítható, így a THEV elleni rekombináns vakcina kidolgozásához felhasználható lehet.

A pályázat keretében vizsgált liba-adenovírus szintén hazai izolátum. Ennek genom-szekvenálását a Medical Research Council glasgow-i Virologiai Intézetével együttműködésben végezzük, úgy nevezett sörétespuska technikával. A módszer lényege, hogy az ultrahang hatására darabolt genomból az optimális, 500-1000 bp méretű fragmentumokat agarózgél-elektroforézis után izoláljuk, majd klónozzuk, és a klónokat előzetes válogatás nélkül szekvenáljuk. A kapott szekvenciákat a Staden program segítségével, átfedő szakaszok mentén egyesítjük. A rendkívül hatékony és gyors módszer hátránya az, hogy költséges. A véletlenszerű megközelítés miatt ugyanis bizonyos genomterületek akár 10-20-szoros számban is megjelennek, mire a teljes genom összeáll. Jelenleg 41 ezer bp feletti szakasz már kész, és feltehetőleg a bal genomvég szekvenciáját is sikerült meghatároznunk, bár ez utóbbi, vadonatúj eredmény még megerősítést igényel.

A polnest PCR módszerrel szűrt pozitív madármintákban legnagyobb számban aviadenovírust lehetett kimutatni. Ezek közül néhány azonosnak bizonyult a 12 ismert tyúk-adenovírus szerotípus valamelyikével, nagyobb részük azonban csak hasonlóan látszik de nem azonos velük. A pozitív mintákat az aviadenovírusok hexon génjének részleges felerősítésére szolgáló PCR segítségével tovább vizsgáljuk. Az érdekesebb minták között található nagyköcsag, jégmadár, vörösbegy, rigó, galamb, seregély eredetű. Pozitív lett több

papagájfaj, beleértve egy állatkerti tukumán amazont, mintája is. Eddigi vizsgálataink alapján megállapítottuk, hogy a madár-adenovírusok igen nagy változékonyságot mutatnak. Az ismert tyúk-adenovírus típusokhoz tartozó izolátumok között megfigyelhető szekvencia variáció aláhúzza a tyúk-adenovírus faj kategóriájának gyakorlati hasznát.

Ötödik adenovírus nemzetség

A hal-adenovírus genom-szekvenálása a tervezettnél kissé lassabban haladt, mivel nagyon kevés DNS állt rendelkezésünkre, és a végek klónozása nem sikerült. A kígyó-adenovírus genomvégeinek meghatározásánál bevált módszerrel, nevezetesen az egyirányú PCR használatával sikerült ugyan a víruscsaládra jellemző, konzervált gének közül a legbaloldalibb elhelyezkedésű (úgy nevezett IVa2 gén) végéig eljutni, és ettől balra egy, az eddig ismert adenovírus (sőt a Génbankban fellelhető összes) fehérjék egyikére sem hasonlító feltételezett fehérje génjét felfedezni. Jelenleg a target DNS mennyiségét a REPLI-g® Mini nevezetű kit (Qiagen, Biomarker) segítségével próbáljuk növelni, abban bízva, hogy a kit terminális fehérje nélküli (és így könnyebben klónozható) genomvégek képződését is elősegíti. A polnest PCR segítségével vizsgáltunk dízshal kereskedésből származó, különféle elhullott halakat és Dániából kapott lepényhalmintát is. Mind a hazai tenyésztésű dízshalakból, mind a dán hal proliferatív bőrelváltozásából vett minta negatív maradt.

Filogenetikai számítások

A vizsgálataink során meghatározott új szekvenciákkal folyamatosan végeztünk filogenetikai számításokat. Ezek a számítások teljes mértékben alátámasztották az egyes adenovírus vonalak, azaz genusok és a gerinces gazdák közötti leszármazási viszonyok hasonlóságára vonatkozó megfigyeléseinket. Megerősítettük továbbá azt a korábbi feltételezésünket is, hogy néhány esetben gazdaváltás történik, amikor egy-egy gerinces osztály tagjait az osztálynak megfelelő, szokásos adenovírus nemzetség tagjain kívül más nemzetségbeli adenovírusok fertőzik. Ilyen feltételezett gazdaváltás esetén az adenovírus általában a megszokottnál súlyosabb, esetenként halálos kimenetelű fertőzést illetve megbetegedést okozhat. További vizsgálatokat igényel annak kiderítése, hogy a feltételezett gazdaváltásra miért látunk gyakrabban példát a kérődzők és különösen a madarak körében. A házi és vad kérődző fajokban a mastadenovírusokon kívül rendszeresen és gyakran figyelhető meg atadenovírus, nem ritkán komoly betegséget is okozva. A különféle madarakban az *Aviadenovirus* nemzetség mellett szintén az *Atadenovirus*, és ezen felül még a *Siadenovirus* tagjai gyakoriak. Házityúkban és feketerigóban mind a három genus képviselőit kimutattuk már. Mivel különösen ez utóbbi genus tagjait eddig madárból izolálni nem nagyon sikerült, a polnest PCR kidolgozása és használata nagy előrelépést jelent az adenovírusok biodiverzitásának felmérése terén.

Az adenovírusok filogenetikai vizsgálatát tárgyaló módszertani közleményünk közel egy évtizede jelent meg először a Humana Press gondozásában kiadott, *Methods in Molecular Medicine* című sorozat *Adenovirus Methods and Protocols* című kötetének részeként. A kötet második kiadása 2006 decemberében jelent meg. Ebben ismét mi írtuk a *Phylogenetic Analysis of Adenovirus Sequences* című fejezet javított, bővített változatát.

Egyéb eredmények

A pályázat négy éve alatt laboratóriumunkban egy külföldi és több magyar szakdolgozat, valamint két PhD értekezés készült el adenovírus témában. Jelenleg három TDK-ás illetve szakdolgozatos diák és négy PhD hallgató dolgozik a megkezdett projekteken, ezért nagyon bízunk témacsoportunk következő OTKA pályázatának támogatásában is.

2006. év folyamán két nemzetközi konferencián vettünk részt. A 8. Nemzetközi Adenovírus találkozót Zürichben szervezték. E konferencia tudományos bizottságának tagja

voltam. A konferencia részvevőinek döntő többsége arra szavazott, hogy a 2009-ben esedékes 9. Nemzetközi Adenovírus Konferenciát mi rendezzük meg Budapesten. Az Európai Állatorvos Viroológusok Társaságának (ESVV) általában háromévenként megrendezésre kerülő nemzetközi kongresszusa 2006-ban Lisszabonban volt. Nagy megtiszteltetésnek tekintjük, hogy az ESVV is Budapesten szeretné tartani következő kongresszusát, és ennek szervezésére minket kértek fel.

Említésre érdemesnek tartom még, hogy az Elsevier (korábban az Academic Press) gondozásában készülő Encyclopedia of Virology című kézikönyv 2008-ban tervezett megjelenésű, új kiadásában két adenovírusos fejezet megírására is csoportunk tagjait kérték fel.

A pályázat kezdete óta a zárójelentés készítésének időpontjáig az OTKA támogatás számának feltüntetésével nyolc (ebből hét angol, egy pedig magyar nyelvű) közlemény jelent meg impakt faktoral rendelkező folyóiratban, amelyeknek összesített impakt faktora (a megjelenés évének értékével számolva): 15,98. Egy közlemény átdolgozás után benyújtva a Journal of Virology-hoz. Megjelent továbbá három könyvfejezet (ezekből egy magyar nyelvű, hazai kiadású).