

OTKA K72484 téma zárójelentése

**A pathogenitásért és az állati sejtek manipulálásáért felelős,
új adenovírus fehérjék keresése**

Az adenovírusok pontos működésének megértéséhez alapvetően fontos genetikai állományuk, azaz teljes genomszekvenciájuk megismerése, az egyes gének és az általuk kódolt fehérjék funkciójának felderítése. Ezt az ideális állapotot még a humán adenovírusok (HAdV-ok) esetében sem sikerült elérni, az állatok adenovírusaira vonatkozóan pedig alig van adat. Saját kutatásaink viszont jelzik, hogy az állati AdV-ok diverzitása sokkal nagyobb, mint azt bárki sejtette volna. Állatorvosként valljuk, hogy a vírusok működésének megértését nagyban segítheti az összehasonlító megközelítés, azaz az emberekben talált adenovírusokhoz képest (logikailag teljesen érthetően) sokkal nagyobb eltéréseket és változatosságot mutató állati AdV-ok tanulmányozása. Így megérthetjük a HAdV-oknál látott jelenségeket (pl. egyes gének nélkülözhetősége), strukturális és biológiai tulajdonságokat (pl. ha két, különböző fiber fehérje van egy vírusban, akkor azoknak alternatív szerepük lehet). Ugyanakkor a HAdV-oknál tanulmányozott fehérjék homológjai egy adott állati AdV-ban feltehetően hasonló funkcióval rendelkeznek. A sokat ígérő összehasonlító vizsgálatoknak három fontos feltétele van. 1. Meg kellene ismerni az állati AdV-ok diverzitásának mértékét (kb. hány világosan elkülönülő típus lehet egyetlen gerinces fajban, illetve mennyire fednek át a különböző állatfajok adenovírusai, azaz mennyire képesek átlépni a fajhatárt). 2. A vírustípusnál még jobban elkülönülő vírusfajok mindegyikéből legalább egy AdV teljes genomját meg kell ismerni és értelmezni (bioinformatikai elemzéssel megállapítani a géneket, azok kifejeződését, beleértve a splicing előfordulását). 3. Fel kell deríteni a legfontosabb evolúciós és koevolúciós irányokat, hogy következtetni lehessen egyes fehérjék szerepére (pl. egy új gazdában másként működhet, vagy szükségtelen lehet olyan fehérje, ami az eredeti gazdában nélkülözhetetlen). A diverzitás és összehasonlító genomikai vizsgálatainkkal sokkal előbbre jutottunk, mint terveztük. Ugyanakkor az egyedi fehérjék szerepének vizsgálata nehezebbnek bizonyult a várnál, elsősorban a remélt és tervezett külföldi együttműködések nehézkes beindulása miatt. Ennek ellenére sikerült előre lépünk a pathogenitásért és az állati sejtek manipulálásáért felelős, elsősorban a korai gének által kódolt új AdV fehérjék keresése és a sejthez kapcsolódást alapvetően meghatározó fehérje, a fiber megismerése terén, mely eredményeinket az alábbiakban foglalom össze.

Svájci együttműködéssel szekvenáltuk és elemeztünk a 2-es típusú egér-adenovírus (MAdV-2) teljes genomját. Mind a filogenetikai számítások, mind primitív

genomszerveződése alapján ez a legősibb mastadenovírusnak bizonyult (Hemmi et al., 2011). A Nemzetközi Vírusrendszertani Bizottsághoz (ICTV) új faj (*Murine adenovirus B*) létesítésére tettünk javaslatot, amit el is fogadtak (<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2012>). Közben Csehországban leírtak (Klempa et al., 2009) egy új, harmadik egér-adenovírust (MAdV-3) is. A három MAdV típus összehasonlító elemzése a sejtmanipulációért felelősnek tartott korai gének 3-as /E3/ régiójában található gének között komoly különbségeket tárt fel. Míg a MAdV-2-ben azonosítottuk a többi mastadenovírusban előforduló 12,5K génjét, ez a MAdV-1 és 3-ban nincs jelen. A MAdV-2 második E3 génje sem közös eredetű a MAdV-1 és -3 egyetlen (és egymáshoz hasonló, de méretben mégis különböző) E3 génjével (funkciójuk ismeretlen). A másik korai régióban, az E4-ben, a MAdV-1-ben leírt ORFA-E gének közül a B nincs meg a MAdV-3-ban, míg MAdV-2-ben egyikkel homológ gén sem található. Az eddig csak Csehországban pirókegérből (*Apodemus agrarius*) izolált MAdV-3 törzs és egy általunk ugyanennek a fajnak hazai példányaiban PCR-rel kimutatott MAdV-3 között további jellemző különbségeket találtunk. A csehországi MAdV-3 E1B 19K génjében egyetlen pontmutáció egy mindössze 23 aminosav hosszúságú fehérje keletkezését teszi csak lehetővé, míg a hazai vad törzsben ez a gén a másik két MAdV típus azonos génjénél tapasztalt „normál” méretet (174 aa) mutatta. Ez a fehérje *in vitro* körülmények között nem nélkülözhetetlen a vírusnak, tehát funkciója nincs közvetlen összefüggésben a replikációval. Az E1B 19K fehérje a fertőzött sejteket megvédi a transzformáló növekedési faktor (transforming growth factor, TGFbeta1) által indukált, programozott sejthaláltól (apoptózistól). Feltételezzük, hogy az ezekben a korai génekben megfigyelt különbségek felelősek lehetnek a három MAdV eltérő pathogenitásáért: a MAdV-1 törzsek egyértelműen kórokozók, a MAdV-2 viszont nem okoz megbetegedést, a MAdV-3 speciális szívkárosító hatással rendelkezik. Ezt okozhatta akár a vírus megváltozott (hibás) sejtmanipulációja is, hiszen az adenovírusoknál ismert jelenség, hogy bizonyos korai gének mesterséges deléciója a pathogenitás növekedését eredményezi. A hazai vad típusú MAdV-3 izolálását jelenleg is próbáljuk egy PCR-rel pozitívnak talált pirókegérből, hogy vizsgálhassuk az E1B 19K mutáció hatását (a két vírus biológiája közti különbséget). További rágcső-adenovírusokat, köztük egy feltételezett MAdV-4-et is találtunk PCR segítségével. A genomkülönbségek és az izolátumok további összehasonlító vizsgálati lehetőségeket, valamint génterápiás kísérletekhez jó kísérleti állat modellt ígérnek (Robinson et al., 2009), amelyhez partnernek máris jelentkeztek érdeklődő holland vállalkozások. A MAdV kutatások során olyan hatékony együttműködés alakult ki a Zürichi Egyetem kutatóival, hogy velük és tucatnyi, más európai adenovírus-kutató laboratóriummal, valamint néhány ipari partnerrel közösen

Marie Curie Initial Training Grant pályázatot nyújtottunk be és nyertünk el közös alap kutatásokra, gyógyászati célú vírusvektor fejlesztésre és kezdő kutatók képzésére.

Egy hazai izolálású liba-AdV teljes genomját szekvenáltuk és elemeztük, egyúttal újra értelmeztük és pontosítottuk az összes eddig közölt aviadenovírus genom-szerveződést is, melynek során számos eddig le nem írt splicing meglétét ismertük fel (Kaján et al., 2012). Időközben osztrák kutatókkal (Marek et al., 2012) kezdtünk együttműködni, melynek során különböző baromfi-adenovírusok új generációs szekvenálással nyert genomjainak elemzését végezzük, immár az új genom értelmezésre támaszkodva.

Befejeztük az egyetlen ismert hal-AdV genom-szekvenálását. Meglepő módon ez hosszabb (48.395 bp), mint az összes eddig megismert AdV genomja, és egyetlen ismert korai gént sem tudunk benne azonosítani. A fiber gének, még hozzá négy példányban, rendhagyó helyen, a genom bal végén található. E gének közös eredete kétségtelen, de annyira kicsi közöttük a hasonlóság, hogy valószínűleg mára már eltérő a funkciójuk. A genom jobb végén nagyszámú ismeretlen funkciójú, feltételezett gén található. A felismerhető funkciójú fehérjét kódoló gének közül az egyik szulfotranszferáz-szerű fehérjét kódol. Bakteriális génkifejező vektorba építve a várt méretű fehérje keletkezését kimutattuk. A kifejezett fehérje feltételezett enzim hatásának vizsgálatához megtettük az előkészületeket. Szulfotranszferáz géneket vírusokban eddig még nem mutattak ki.

Német kutatókkal együttműködésben elvégeztük a közönséges törpedenevérből (*Pipistrellus pipistrellus*) izolált denevér-AdV-2 teljes genomjának elemzését (Kohl et al., 2012). Ennek lapján feltételeztük, hogy a simaorrú denevérek adenovirusaiból származik a kutya-adenovírus. Ugyanis a két vírusban teljesen megegyező tartalmú, sajátos E3 és E4 régiók találhatóak. Hasonló szerveződést csak az azóta publikált 1-es típusú ló-AdV-nál látunk, ám abban hiányzik még a 12.5K gén is. A közeli közös evolúciós eredetet a kutya- és ló-AdV-ok fokozott pathogenitása is megerősíti.

Elvégeztük egy mexikói viperagyíkból (*Heloderma horridum*) Németországban izolált AdV teljes szekvenálását. Minden eddig szekvenált atadenovírusban (származzon az madárból, kérődzőből vagy hüllőkből) az E4 34K génje két példányban fordul elő. Mastadenovírusokban is előfordul két vagy akár három homológ E4 34K gén is, pl. a sertés-AdV-5-ben (245R, 253R) vagy a szarvasmarha-AdV-1-ben (E4 34K, ORFE, ORFD). Ám ezek annyira különbözőek, hogy nem valószínű, hogy egy víruson belül mindegyik hasonló eredetű génnek azonos a funkciója. Ennek tükrében meglepő az atadenovírus 34K homológok megőrzöttsége. Például mindegyik tartalmazza a jellegzetes HCHC domént. Tudott, hogy a HAdV-oknál a 34K és az E1B 55K protein heterodimert és speciális komplexet formál (Cul5-alapú E3 ubiquitin-ligáz

komplex) bizonyos sejtfehérjék, pl. p53, Mre11, DNS ligáz IV, integrin $\alpha 3$, és valószínűleg mások lebontásához, ezáltal optimális celluláris környezetet biztosítva a vírus replikációjához és a perzisztencia fenntartásához. Meglepő azonban, hogy atadenovírusoknál az E1B 55K-val homológiát mutató fehérje, amit e vírusokban LH3-nak hívnak, bizonyítottan szerkezeti fehérjeként (is?) funkcionál. Az a tény, hogy mindkét fehérje homológja előfordul az atadenovírusokban, míg az avi-, si- és ichtadenovírusokban egyik sem, arra utal, hogy minden bizonnyal ezek is heterodimert alkotnak, és a mastadenovírusoknál felismert sejtmanipulációs hatást kifejtik. A mexikói viperagyík adenovírusának genomjában, annak jobb végén, öt, új, teljesen ismeretlen funkciójú gént találtunk, valamint néhány olyat, amely más atadenovírusokban (pl. kígyó-AdV-1-ben és bovin atadenovírusokban) is előfordul.

Sikerrel befejeztük a molekulárisan nem jellemzett, de különböző szerotípusnak elfogadott óvilági, nem-emberszabású majom-adenovírusok (SAdV-1-től SAdV-20-ig) összehasonlító molekuláris és filogenetikai elemzését vírusszerekbe való sorolásuk céljából. Ezt négy génjük (IVa2, DNS polimeráz, penton-bázis és hexon) részleges szekvenálásával, és a kapott szekvenciák filogenetikai analízisével végeztük. Besorolásukra öt új faj felállítását javasoljuk (SAdV-B-től SAdV-F-ig, miután a SAdV-A fajt már korábban elfogadtattuk). A fajok elkülönítéséhez alkalmas jegyek között van a fiber-gének száma (1 vagy 2), a genom G+C %-a, az E3 CR1alfa és béta fehérjék esetleges fúziója, a hemagglutinációs tulajdonságok, a replikációt biztosító sejttenyészetek. Az azonosított új fajok képviselői közül a SAdV-13 tűnik a legérdekesebbnek, mely önállóan képvisel új fajt. Gyakorlatilag minden főemlős-AdV E3 régiójában van RID-alfa és RID-béta gén. A RID („receptor internalization and degradation”) proteinek neve arra a tulajdonságukra utal, hogy (egymással komplexet képezve) elősegítik számos sejt-receptor lebontását a HAdV-ok esetében. Az a tény, hogy mindkettő megtalálható a SAdV-13 genomjában, határozottan hasonló komplex képzési tulajdonságra és funkcióra utal ebben a nem-emberszabású majom-AdV-ban is. Ugyanakkor az emberszabású majmok adenovírusaira jellemző E3 19K gén hiányzik a SAdV-13-ból (és a többi nem-emberszabású majom-AdV-ból). Az E3 CR1-béta proteint (ami a SAdV-13 genomjában is jelen van) eredetileg „halálfehérjének” nevezték, mivel a sejt manipulálását úgy végzi, hogy megfelelően időzített apoptózist idéz elő az érett virionok sejtéből való kiszabadulását elősegítendő. A SAdV-13 penton-bázis fehérjéjéből viszont hiányzik az RGD motívum, amely a fiber kapcsolódása után a sejt integrinjeihez kötődve a vírus internalizációt elindítja. A HAdV-40 és -41 kivételével (melyekben mutált motívum található) minden főemlős adenovírusában van RGD motívum. A SAdV-13 mellett viszont az összes nem-főemlős állat adenovírusából is hiányzik. Feltételezzük, hogy a SAdV-13 sejtbe jutását más receptorok segítik. Hosszabb

genomszakaszokon szekvenáltunk egy általunk talált újvilági majom-adenovírust is, mely a vártnak megfelelően ősbibbnek tűnik minden óvilági majom-adenovírusnál (beleértve a HAdV-okat).

A *Human adenovirus D* vírusfaj egyes típusai járványos keratoconjunctivitist képesek okozni, de ezek között korábban a HAdV-22 nem szerepelt. A Japánban és Németországban járványokból izolált HAdV-22 genomjának közelebbi tanulmányozásával kiderült, hogy e vírusnak csupán egy rövid szakasza, a szerológiai válaszáért felelős hexont kódoló rész azonos a HAdV-22 szekvenciájával, míg genomjának többi része meglepően sok más HAdV-D-be tartozó szerotípusból „rakódott össze”. Részt vettünk az Amerikai Légierő virológusai által végzett teljes genom-analízisben. A kötőhártya szöveteihez való kapcsolódási képességért a fiber felelős (míg az antigenitásért a hexon loop 1 és 2 régiói). A homológ rekombináció lehetőség a vírus számára, hogy egy adott környezetben elkerülje a szervezet védekezését, és új sejt-tropizmus és virulencia-típus révén hatékonyabban terjedjen. E vírus rekombináns (HAdV-53) megindította a széleskörű rekombináns keresést (Walsh et al., 2009).

A HAdV-36-ot többen összefüggésbe hozták járványszerűen terjedő kóros elhízással. Amerikai együttműködésben genom-szintű elemzését elvégeztük, de sajnos nem találtunk olyan jellegzetes eltérést akár az E3 vagy az E4 régióban, melyre bioinformatikai módszerekkel vissza lehetett volna vezetni az elhízásra való hajlamot (Arnold et al., 2010).

További eddig ismeretlen AdV-okat mutattunk ki eddig még sosem, vagy kevéssé vizsgált fajokban, többek között német közönséges mókusban, több magyar denevér fajban, papagájfélékben (Vidovszky és Boldogh, 2011; Ballmann és Vidovszky, 2013). Legtöbbször nem állt rendelkezésünkre izolátum, ezért PCR-rel nyertük ki a mintából a szekvenálendő genomszakaszokat.

Különbéle ékszer- és doboztechnősökből PCR segítségével új AdV-okat mutattunk ki. Egyelőre csak két rövid génszakasz (a DNS-polimerázból és a hexonból) szekvenciáját sikerült meghatározni, de ezek filogenetikai elemzése az eddig ismertektől határozottan elkülönülő leszármazási vonal meglétét jelzik (Dospoly et al., 2013).

AdV-ok teljes és részleges genom-szekvenálásával számos olyan, eddig ismeretlen gént azonosítottunk, amelyek által kódolt, feltételezett fehérjék szerepét érdemes tovább vizsgálni. A gének PCR segítségével felsokszorozhatók, kifejező vektorba klónozhatók további célzott funkcionális vizsgálatokra. Megkezdtük nyolc ismeretlen funkciójú AdV fehérje funkcionális vizsgálatát. A pulyka-AdV-1 ORF8, az egér-AdV-2 E3 ORF1 és a hal-AdV-ből 6 feltételezett gént lentivírus-alapú kifejező vektorba klónozva küldtük el egy erre specializálódott amerikai laboratóriumba esetleges apoptózist okozó vagy gátló hatásuk vizsgálatára. E fehérjék

felelősek lehetnek a programozott sejthalál előidézésében vagy késleltetésében. (A vírusnak mindkettőre szüksége van, először gátolja az apoptózist, hogy így akadályozza a szervezetet a fertőzött sejt eliminációjában, majd a vírus-replikáció későbbi fázisában már szüksége van a sejt hatékony pusztulására, hogy nagy mennyiségben és könnyen tudjon kiszabadulni.) Az átfogó szűrési munka keretében a humán gyógyászatban esetleg alkalmazható, új típusú sejtmanipuláló fehérjéket is keresnek. Ezen átfogó („pan viral proteome”) munkák azonban egyelőre bizonytalanabban adják a válaszokat, mint reméltük.

Bakteriális kifejező vektorba ültettük a pulyka-AdV-3 fiber génjének különböző mértékben deletált szakaszait (a feji részt kódoló szakaszt mindig meghagyva). A legrövidebb beültetett génszakasszal kristályosítható mennyiségű fehérjét tudtak spanyol együttműködőink termeltetni és sikerült a fiberfej röntgenkristallográfiás szerkezeti meghatározása is. Mivel az AdV fertőzés első lépése a fiber feji részének a sejtekhez való kapcsolódása, a különböző vírusok fiber-szerkezetének pontos meghatározása segíteni fog a különböző genusokhoz tartozó állati AdV-ok közötti pathogenitási különbségek jobb megértésében (pl. hogy milyen típusú sejtreceptorokhoz képesek kötődni). Különösen fontos ez azoknak az általunk is tanulmányozott AdV-oknak az esetében, amelyek két fiber-génnel vagy fehérjével rendelkeznek. Ezért más nemzetségekhez tartozó AdV-ok fiber-génjeit is klónoztuk bakteriális kifejező vektorba struktúra meghatározáshoz.

Mint látható, a pályázati támogatással végzett munkáink számos eredményt hoztak és további kutatási irányokat vetettek fel, amelyeken tovább dolgozunk, és a még le nem közölt eredményeket igyekszünk minél előbb publikálni.

A kutatásokban több szakdolgozó is részt vett, majd diplomája megszerzése után, szerződés-módosítással kutatóként is csatlakozott e témához (Ballmann Mónika, dr. Papp Tibor és Péntes Judit).

A pályázati tervben összesen legalább öt darab impakt faktoros közlemény megírását vállaltuk. Eddig 8 cikk jelent meg e munkáinkból, a kilencedikben kisebb átdolgozást kértek (összesített IF: 27,894). Az adenovírusokra vonatkozó ismereteket összefoglaló jellegű könyvfejezetekben is publikáltuk (Davison és Harrach, 2011; Harrach és Kaján, 2011; Harrach et al., 2011).

Az OTKA támogatást megköszönve tisztelettel kérem jelentésem szíves elfogadását.

Harrach Balázs
témafelelős

Irodalom

- Arnold J, Jánoska M, Kajon AE, Metzgar D, Hudson NR, Torres S, Harrach B, Seto D, Chodosh J, Jones MS (2010) Genomic characterization of the human adenovirus 36, a putative obesity agent. *Virus Res* 149, 152-161.
- Ballmann MZ, Vidovszky MZ (2013) Tág gazdaspektrumú psittacine adenovírus (PsAdV-2) kimutatása különböző papagájfajok hazai egyedeiben. *Magyar Állatorvosok Lapja* 135, 78-84.
- Davison AJ, Harrach B (2011) Siadenovirus. *Adenoviridae*. Tidona CA, Darai G (eds) *The Springer Index of Viruses*, Springer-Verlag, New York pp 49-56.
- Doszpoly A, Wellehan JFX, Childress AL, Tarján ZL, Kovács ER, Harrach B, Benkő M (2013) Partial characterization of a new adenovirus lineage discovered in testudinoid turtles. *Infect Genet Evol* (benyújtva).
- Harrach B, Benkő M, Both GW, Brown M, Davison AJ, Echavarría M, Hess M, Jones MS, Kajon A, Lehmkühl HD, Mautner V, Mittal SK, Wadell G (2011) Family *Adenoviridae*. King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ (eds) *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier, San Diego pp 125-141.
- Harrach B, Kaján GL (2011) Aviadenovirus. *Adenoviridae*. Tidona CA, Darai G (eds) *The Springer Index of Viruses*, Springer-Verlag, New York pp 13-28.
- Hemmi S, Vidovszky MZ, Ruminska J, Ramelli S, Decurtins W, Greber U, Harrach B (2011) Genomic and phylogenetic analyses of murine adenovirus 2. *Virus Res* 160, 128-135.
- Kaján GL, Davison AJ, Palya V, Harrach B, Benkő M (2012) Genome sequence of a waterfowl aviadenovirus, goose adenovirus 4. *J Gen Virol* 93, 2457-2465.
- Klempa B, Krüger DH, Auste B, Stanko M, Krawczyk A, Nickel KF, Überla K, Stang A (2009) A novel cardiotropic murine adenovirus representing a distinct species of mastadenoviruses. *J Virol* 83, 5749-5759.
- Kohl C, Vidovszky MZ, Mühldorfer K, Dabrowski PW, Radonic A, Nitsche A, Wibbelt G, Kurth A, Harrach B (2012) Genome analysis of bat adenovirus 2: indications of interspecies transmission. *J Virol* 86, 1888-1892.
- Marek A, Nolte V, Schachner A, Berger E, Schlötterer C, Hess M (2012). Two fiber genes of nearly equal lengths are a common and distinctive feature of *Fowl adenovirus C* members. *Vet Microbiol* 156, 411-417.

- Mei Y-F, Harrach B, Wadell G (2011) Mastadenovirus. *Adenoviridae*. Tidona CA, Darai G (eds) *The Springer Index of Viruses*, Springer, New York pp 33-48.
- Robinson M, Li B, Ge Y, Ko D, Yendluri S, Harding T, VanRoey M, Spindler KR, Jooss K. (2009) Novel immunocompetent murine tumor model for evaluation of conditionally replication-competent (oncolytic) murine adenoviral vectors. *J Virol* 83, 3450-3462.
- Vidovszky MZ, Boldogh S (2011) Adenovírusok kimutatása az észak-magyarországi denevérfaunában. *Magyar Állatorvosok Lapja* 133, 747-753.
- Walsh MP, Chintakuntlawar A, Robinson CM, Madisch I, Harrach B, Hudson NR, Schnurr D, Heim A, Chodosh J, Seto D, Jones MS (2009) Evidence of molecular evolution driven by recombination events influencing tropism in a novel human adenovirus that causes epidemic keratoconjunctivitis. *PloS ONE* 4, e5635.