

ELTE Biológia Doktori Iskola
Klasszikus és molekuláris genetika program
Programvezető: Dr. Orosz László, MTA levelező tagja

GALAMB PARAMYXOVÍRUS-1 TÖRZSEK MOLEKULÁRIS GENETIKAI VIZSGÁLATA, FILOGENETIKÁJA ÉS EVOLÚCIÓJA

Doktori értekezés

Írta:
Ujvári Dorina

Témavezető: Dr. Lomniczi Béla
állatorvostudomány doktora
MTA Állatorvostudományi Kutatóintézete, Budapest

Budapest
2008

TARTALOM

RÖVIDÍTÉSEK	4
1. BEVEZETÉS	5
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	7
2.1. A baromfipestis története	7
2.2. A betegség elnevezése	8
2.3. A baromfipestis definíciója	8
2.4. A betegség jelentősége	9
2.5. A kórokozó morfológiája és felépítése	10
2.6. Taxonómia	12
2.7. Az NDV csoportjai és elterjedésük	13
2.8. Az NDV által kódolt fehérjék és funkcióik	16
2.9. A patogenitás molekuláris alapjai	17
2.10. NDV fertőzésre fogékony fajok és a vírus rezervoárjai	19
2.11. NDV fertőzés galambokban	22
2.12. RNS-vírusokkal kapcsolatos filogenetikai problémák	23
2.13. Filogenetikai módszerek	24
3. CÉLKITŰZÉSEK	27
4. ANYAG ÉS MÓDSZER	29
4.1. Vírustörzsek	29
4.2. Vírus-szaporítás	29
4.3. Vírus RNS tisztítása	29
4.4. A genom 3' végének meghosszabbítása	30
4.5. Reverz transzkripció	30
4.5.1. Reverz transzkripció RE-analízishoz, és filogenetikai vizsgálatokhoz	30
4.5.2. Reverz transzkripció a genom teljes nukleotidsorrendjének meghatározásához	30
4.6. A genom 5' végének meghosszabbítása	31
4.7. Polimeráz-láncreakció (PCR)	31
4.7.1. Oligonukleotidok tervezése és szintézise	31
4.7.2. PCR-ek RE-analízishoz, és filogenetikai vizsgálatokhoz	31
4.7.3. PCR-ek a genom teljes nukleotidsorrendjének meghatározásához	32
4.8. Agaróz gélelektroforézis	34
4.9. PCR-termék emésztése restriktációs endonukleázokkal, fizikai térképezés	34
4.10. PCR-termék tisztítása agaróz gélből	35
4.11. Klónozás	35
4.12. Rekombináns plazmidok tisztítása	36
4.13. Szekvenálás	36
4.14. Szekvencia- és filogenetikai analízis	36
5. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁS	38
5.1. Galamb-NDV törzsek csoportosítása az F gén részleges nukleotid-sorrendje alapján	38
5.1.1. Filogenetikai analízis	38
5.1.2. Aminosav szubsztitúciós analízis	45
5.1.3. A gPMV-1 törzsek evolúciójával és eredetével kapcsolatos megállapítások	48
5.2. Galamb-NDV törzsek csoportosítása az F gén restriktációs endonukleáz analízise alapján	53
5.2.1. Restriktációs endonukleázok, és kiválasztásuknak szempontjai	53
5.2.2. RE-analízissel vizsgált galamb-NDV törzsek és csoportosításuk	54
5.2.3. Az IQ alcsoport	60
5.2.4. Az EU _k alcsoport és variánsai	60

5.2.5. Az EU _r alcsoport és variánsai.....	61
5.2.6. Az ÉA alcsoport és variánsai	61
5.2.7. A Vīb/2 alcsoport	62
5.2.8. RE-analízis: egy új diagnosztikai módszer galamb-NDV törzsek azonosítására és csoportosítására	62
5.3. Az IT-227/82 galamb-NDV törzs teljes genomjának szekvenciája	65
5.3.1. Filogenetikai vizsgálatok.....	65
5.3.2. A genom mérete	67
5.3.3. Genom-terminusok	70
5.3.4. Gén-start és gén-vég szekvenciák	71
5.3.5. Intergénikus régiók	71
5.3.6. Nukleoprotein (NP).....	74
5.3.7. Foszfoprotein (P), V- és W fehérje	74
5.3.8. Mátrix (M) protein	76
5.3.9. Fúziós (F) protein.....	77
5.3.10. Hemagglutinin-neuraminidáz (HN) protein.....	78
5.3.11. RNS-polimeráz (L=large) protein	80
6. ÖSSZEFOGLALÁS.....	83
IRODALOMJEGYZÉK.....	85
KÖZLEMÉNYEK.....	98
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	99

RÖVIDÍTÉSEK

AI	Avian influenza
AIV	Avian influenza virus
APMV	Avian paramyxovirus
as	aminosav
BG	bolgár
BP	baromfipestis
bp	bázispár
cDNS	complementer-DNS
DEPC	dietil-pirokarbonát
DNS	dezoxiribonukleinsav
EU _k	korai európai
EU _r	recens európai
ÉA	észak-amerikai
F	fúziós protein
gPMV-1	galamb paramyxovírus-1
HN	hemagglutinin-neuramidáz
HR	heptad repeat
ICPI	intracerebrális oltást követő patogenitási index
IQ	iraki
kbp	kilobázispár
L	RNS-függő RNS polimeráz (large)
M	mátrix protein
Mke	monoklonális ellenanyag
mRNS	messenger-RNS
ND	Newcastle disease
NDV	Newcastle disease virus
NLS	nukleáris lokalizációs szignál
NP	nukleoprotein
nt	nukleotid
P	foszfoprotein
PCR	polimeráz láncreakció
RE	restrikciós endonukleáz
RNP	ribonukleoprotein
RNS	ribonukleinsav
RT	reverz-transzkripció
SD	szudáni

1. BEVEZETÉS

A címben megjelölt „paramyxovírus-1” törzsek tulajdonképpen a galambhoz *adaptálódott* Newcastle-betegség vírus (*Newcastle disease virus*, NDV) leszármazottai. Maga az NDV, a *Paramyxoviridae* (PMV) víruscsaládban, a madarakban élő (avian) vírustörzsek 1. szerotípusának (APMV-1) egyetlen tagja. A Newcastle-betegség vagy baromfipestis (Varga és mtsai, 1999) a házityúk és egyéb fácánfélék egyik legsúlyosabb, akár 100%-os mortalitással járó fertőző megbetegedése. Kórokozója az NDV *virulens* (patogén) törzsei, amik az egész világon elterjedtek: a baromfitartó országok több mint 60%-ban enzootiásan fordulnak elő, annak ellenére, hogy az NDV *gyengébb* vagy *avirulens* törzseiből készült hatékony és olcsó vakcinák állnak rendelkezésre. Galambokban az első súlyos veszteségekkel járó járványeseteket (kitöréseket) az 1980-as évek elején Olaszországban írták le (Biancifiore és Fioroni, 1983). Főként postagalamb röptetések és díszgalamb kiállítások révén néhány év alatt szinte mindenhol elhurcolták, mára pedig a legtöbb országban enzootiássá vált.

Az új faj meghódítása katasztrofális gazdasági következményekkel járt, ugyanakkor érdekes *evolúciós eseménynek* számít. Először, mert ugyan régóta ismert volt, hogy kísérleti fertőzés során a galambok biztosan megbetegíthetők, mégis még tömeges csirkepusztulást okozó baromfipestis-járványok alkalmával is a házkörüli galambok csak ritkán estek áldozatul, feltehetően azért, mert korábban sosem került sor adaptálódásra. Másodszor, mert a csirkén kívül most már a házi galamb is *virulens* NDV törzsek rezervoárjává vált, sőt, nagy valószínűséggel, vadonéló fajok felé is folyamatos kapcsolatot teremt. Harmadszor, az adaptációnak tulajdonítható, hogy a galamb-típusú törzsek a *csirkére* nézve csökkent virulenciájúnak mutatkoztak, és mezeli körülmények között visszafertőzés nem fordult elő.

Elvileg egyébként bármelyik madárfaj fogékony lehet NDV-re, amire az is utal, hogy eddig több mint 200 fajban találtak is NDV ellenanyagokat. Igaz viszont, hogy egyes vadon élő madarak sporadikus *megbetegedését* csak csirkejárványokkal kapcsolatban észlelték, az ellenanyagok előfordulása pedig avirulens törzsek *aszimptomatikus* fertőzésének tulajdonítható. Ezek az NDV sajátos *ökológiájával* magyarázhatók. Nevezetesen azzal, hogy az NDV *elsődleges* (természetes) rezervoárja a vadon élő vízimadarak, bennük azonban csak ártalmatlan, *apatogén* NDV törzsek élnek. Ezzel szemben a vírus *patogén* törzsei kizárólag *csirkében* fordulnak elő, amely *másodlagos* (emberi tevékenység nyomán kialakult mesterséges) rezervoárnak tekinthető. Ami a patogén törzsek *eredetét* illeti, témacsoportunk által végzett vizsgálatok is rámutattak arra, hogy a csirkéket előbb apatogén törzsek kolonizálták, majd évtizedek múltán bennük alakultak patogénné, ahogy ez a madárinfluenza

vírus egyes szubtypusainál is történik. A filogenetikai vizsgálatok az NDV törzsek *járványtani* vonatkozásai mellett a gazdaváltások egyes sajátosságait is tisztázták. Az elmúlt 80 évben, a világ különböző pontjairól származó NDV törzseket legalább 8 genotípusba, illetve számos terület-specifikus, és/vagy időbeni megoszlást mutató csoportba lehetett besorolni. Például a *korai* genotípusok virulens tagjai (II.-IV.) már a 2. Világháború előtt is okoztak járványokat, azonban ezeket a 1960-as éveket követően—*újabb* genotípusok (V.-VIII.) váltottak fel, a korábbi vírusok pedig zömmel kipusztultak. Érdekes, hogy *autonóm*, önállóan terjedő NDV fertőzéseket eredményező *gazdaváltást* kizárólag ezek az újabb NDV törzsek hajtottak végre. Így három különböző genotípus közreműködésével három új, *harmadlagos* rezervoár született. Közülük legfontosabb a *VI. genotípus* gazdaváltása, amelynek eredményeképpen a *galambokban* jött létre csirkétől epidemiológiailag független baromfipestis. A Közép-és Dél-Amerikában honos V. genotípus észak-amerikai *kormoránokban* telepedett meg, míg a Távol-Keleten uralkodó VII. genotípus Kínában *libákat* kolonizált.

Jelen munkában a *galamb típusú NDV törzsek* (az irodalomban *pigeon paramyxovirus 1*, PPMV-1 néven szerepel) filogenetikai vizsgálata révén kerestem választ arra, hogy milyen fokú genetikai változatosság jellemző ezekre a mindössze három évtizedes múlttal rendelkező vírusokra, és betekintést kívántam nyerni kialakulásuk körülményeibe. Ezen kívül megbízható és egyszerű diagnosztikai módszert kívántam kidolgozni, ezért a klasszikus NDV törzsekre laboratóriummunkban alkalmazott restrikciós enzim vágáshely-analízist (röviden és továbbiakban RE-analízis) adaptáltam galamb-NDV törzsekre. Egy galamb-NDV törzs teljes genomjának analízisével pedig arra kerestem a választ, hogy milyen genetikai változások vezethettek a vírus galambokhoz történő adaptációhoz.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A baromfipestis története

Az első baromfipestisként (BP) ismert járványt 1926-ban, Indonéziában, Jáva szigetén (Kraneveld, 1926, idézi Seal, 1995), és Angliában, Newcastle-upon-Tyne környékén észlelték (Doyle, 1927, idézi Lomniczi, 1998). A betegség neve (Newcastle disease (ND)) is ettől az időszaktól, egészen pontosan 1926-tól datálódik, a Newcastle környékén kitört járvány kapcsán ekkor sikerült ugyanis a betegséget etiológiai alapon elkülöníteni a hasonló tünetekkel járó baromfiinfluenzától. Az etiológiai alapú elkülönítéskor (Doyle, 1927, idézi Lomniczi, 1998) olyan egyértelmű ND-specifikus jegyekre derült fény, mint a galamb fogékonysága az NDV-re, és rezisztenciája a madárinfluenza vírussal (Avian influenza virus (AIV)) szemben. A BP története azonban nem az 1920-as években kitört járványokkal kezdődött, erre irodalmi bizonyítékok is vannak. A két betegség, az AI és az ND a századfordulón még egyetlen, baromfipestisnek nevezett kórképként élt a köztudatban. A legkorábbi olyan esetleírás, amely a galambok érintettsége miatt valószínűleg BP volt, a XIX. század első feléből származik (Petényi, 1833, idézi Lomniczi, 1998). Macpherson egy 1896-ban, Skócia nyugatra fekvő szigetein észlelt, csirkék elhullásával járó betegségről számolt be (Macpherson, 1956, idézi Alexander és mtsai, 2004), mely nagy valószínűséggel szintén BP lehetett. Az 1900-as évek elejéről is vannak bizonyítékok Magyarországon kitört, NDV okozta járványról (Halász, 1912, idézi Lomniczi, 1998). Az 1930-as években, az USA-ban enyhe, légúti, és gyakran idegrendszeri tünetekkel járó, vírus által okozott csirkebetegségről számoltak be, melyet pneumoencephalitis-nek neveztek (Beach, 1942, idézi Alexander és mtsai, 2004). Később szerológiai tesztek kimutatták, hogy a fertőzés háttérében szintén az NDV áll (Beach, 1944, idézi Alexander és mtsai, 2004). Az USA-beli esetek után a világ számos részén, főleg vad vízimadarakból, de csirkékből is izoláltak enyhe tünetekkel járó, vagy tünetmentes fertőzéstől származó avirulens NDV törzseket.

Az 1920-as évek utáni évtizedekben három pandémiát írtak az NDV számlájára. A pandémia-teória a köztudatban él ma is, bár molekuláris epidemiológiai vizsgálatok alapján bebizonyosodott, hogy a pandémia kifejezés az NDV egész világot érintő járványaira használva nem helytálló, mivel nem egyetlen vírus járta be a világot (Lomniczi és Czeglédi, 2005) (részleteket lásd a „2.12. RNS-vírusokkal kapcsolatos filogenetikai problémák” című fejezetben). Az ún. első pandémia 1926-tól tartott nagyjából az 1950-es évek végéig, ekkorra a BP az egész világon szétterjedt. Eredetéként a Távols-Keletet jelölték meg. Második pandémiának az 1960-as években kezdődött globális járványt tekintették, és egyes szerzők

szerint szintén a Távols-Keletről indult, majd a Közels-Keleten és Kelet-Európán át 1970-ben érte el Nyugat-Európát (Alexander, 2003). Harmadik világvjárványának az NDV galambhoz adaptálódott variánsának elterjedését tekintik, mely az 1970-es évek végén kezdődött, a 80-as évek elején bukkant fel Európában, majd az egész világon szétterjedt.

2.2. A betegség elnevezése

A betegség a magyar nyelvben *baromfipestis* néven honosodott meg az 1800-as évek végén, ez az elnevezés a többivel ellentétben utal arra, hogy az áldozat baromfi, és súlyos betegségről van szó. Az angol „Newcastle disease” (ND) elnevezés - mint már említettem – az 1926-os angliai járványtól datálódik. Doyle a „Newcastle disease” elnevezést ideiglenesnek szánta, azonban a nemzetközi irodalomban az 1950-es évek végén ez az elnevezés, és annak fordításai terjedtek el. Magyar hatósági rendeletekben is a *Newcastle-betegség* elnevezést használják (Lomniczi, 2004). Az NDV a madár paramyxovírusok kilenc szerotípusa közül az 1. szerotípusba tartozó egyetlen faj, a kórokozóra így az APMV-1 (avian paramyxovirus type 1) terminológiát is gyakran használják.

2.3. A baromfipestis definíciója

Az NDV törzsek három virulencia-csoportba tartozhatnak az általuk csirkében kialakított tünetek szerint: velogén, mezogén és lentogén törzseket különíthetünk el. A *velogén* (virulens) törzsek kétféle kórformát okozhatnak. A *neurotróp* kórformánál az idegrendszeri tünetekhez légzőszervek is társulnak, míg a *viscerotróp* kórforma bélgyulladásal, vérzésekkel, és gyors elhullással jár, gyakran idegrendszeri tünetek nélkül. A virulens törzsek által kialakított járványra 100%-os mortalitás jellemző. A *mezogén* törzsek mérsékelt virulenciával rendelkeznek, elsősorban légzőszervi tüneteket alakítanak ki. Járványokat ritkán, legfeljebb fiatal csirkék között okozhatnak, az ilyen járványok 50%-os mortalitással jellemezhetők. Ebbe a csoportba tartozik néhány vakcinatörzs, mint pl. a Roakin, a Mukteswar és a Hertfordshire törzsek. A *lentogén* törzsek alacsony virulenciájúak, és igen enyhe légzőszervi tüneteket okoznak. Közéjük tartoznak a napjainkban leginkább használatos vakcinatörzsek is (LaSota, B-1). A fentieken kívül létezik egy ún. *avirulens* csoport is, melyre jellemző az enterális tropizmus, és tünetmentes fertőzéseket idéz elő.

Mivel a BP kialakításáért felelős NDV-nek nem minden törzse tekinthető kórokozónak, ezért a betegség definiálása elengedhetetlen. A diagnosztikai gyakorlatban a törzsek virulenciájának mérésére mesterséges fertőzési tesztekkel vezettek be (Alexander, 2003). 1992

óta BP-nek tekintik azt a fertőzést, ahol az NDV törzs *ICPI-je* (*intracerebrális oltást követő patogenitási indexe*) meghaladja a 0,7-et, a járványokozó virulens törzseké általában 1,6-2,0 közötti értéket mutat. A 0,7-es ICPI határ bevezetése óta a mezogén törzsek okozta fertőzést is BP-nek tekintjük, addig csak a velogén törzsek általi fertőzést neveztük betegségnek. A BP-t kialakító NDV törzsek köre így egyes vakcinatörzsekkel (H és Komarov) és galambparamyxovírus-1 (gPMV-1) törzsekkel bővült. 2000-ben az OIE a fenti definíciót az *F génen található proteolitikus vágáshely* szekvencia-meghatározásának lehetőségével egészítette ki. Eszerint BP-t okozó NDV törzsnek kell tekinteni a vírust, ha F2 proteinjének C-terminálisán több bázikus aminosav mutatható ki, és az F1 fehérje N-terminálisán, a 117. pozícióban fenilalanin (F) található (részleteket lásd a „2.9. A patogenitás molekuláris alapjai” című fejezetben). A két definíció között lényegi különbség nincs, a szekvencia-analízis a biológiai teszt alternatívája, előnye, hogy vele állatkísérleteket lehet kiváltani. A szekvencia-vizsgálat hátránya, hogy amennyiben a leírt jellegzetes aminosav mintázat hiányzik, a törzs virulenciáját ICPI-teszttel kell meghatározni.

2.4. A betegség jelentősége

A BP a tyúkidomúak legnagyobb morbiditással és mortalitással (közel 100%) járó fertőző megbetegedése, a legnagyobb károkat okozó betegség a baromfitartásban. Gyorsan terjedő, szinte megállíthatatlan járványokat idéz elő. A betegség ellen való védekezés elsődleges célja a fertőzés megelőzése vakcinázás révén, illetve a kórokozó behurcolása esetén a terjedés megakadályozása forgalmi zárlatokkal, és az állomány kiirtásával. Az intenzív védekezés mellett is a világ országainak kétharmadában a fertőzés enzootiás (www.oie.int).

Manapság is gyakran irányul a figyelem új kórokozók megjelenésére, és az általuk okozott új betegségekre, illetve kórokozók tucatjainál figyelhetők meg a terjedés fokozódásával, és a betegség súlyosbodásával járó átalakulások. Az NDV tipikusan ez utóbbi kórokozók csoportjába tartozik, emiatt az NDV-fertőzést az ún. *emergens, vagy feljövőben lévő fertőzések* kategóriájába sorolják, mellyel külön tudományterület (emerging infections) is foglalkozik. A BP-t okkal tekinthetjük a múlt század legjelentősebb baromfibetegségének. A BP a világ országainak több mint felében enzootiás, és harmincon felül van azon országok száma, ahová a fertőzést az elmúlt évtizedben legalább egyszer importálták. Az adatok bejelentésen alapulnak, így a fennmaradó országoknak sem mindegyike tekinthető BP-mentesnek. A betegség, mely elválaszthatatlan a csirketartás alakulásától, eddig két nagy

periódusra osztható, közöttük a határvonalat az 1950-es évektől általánossá váló vakcinázás képezi. A betegség első periódusában adott volt egy nagy terjedő-képességű, és közel 100%-os mortalitású vírus, másfelől fogékony csirkék tömegei, mint egy rendkívül dinamikus növekedést mutató iparág főszereplői. A csirkék tekintetében a világtermelés nagyjából 25 évenként megduplázódott, ennek ellenére az első periódus a BP győzelmével végződött, a 20-as évek nagy ázsiai járványait követő évtizedekben a fertőzés az egész világon megjelent. Az 1950-es években bevezetett olcsó tömegvakcinázási eljárásoknak pozitív és negatív hatásuk is volt. Pozitív hatásként értékelhető, hogy a baromfitermelés növekedése világszerte folytatódhatott; egyes területeken, például Kelet-Ázsiában a korábinál még gyorsabb ütemben. Ugyanakkor a vakcinázás eredményeként várható lett volna, hogy a fertőzés visszaszorul, és a vírussal fertőzött területek csökkennek, mivel a fogékony gazda egy valamennyire védett gazdára „cserélődött ki”. Ehelyett hamarosan nyilvánvalóvá vált, hogy a csirkék ilyen intenzitású világtermelése mellett a vakcinázás már nem elégséges a fertőzés visszaszorításához, ez csakis drágább eradikációs eszközökkel (állatirtások, forgalmi zárlatok) valósítható meg (Lomniczi és Czeglédi, 2005).

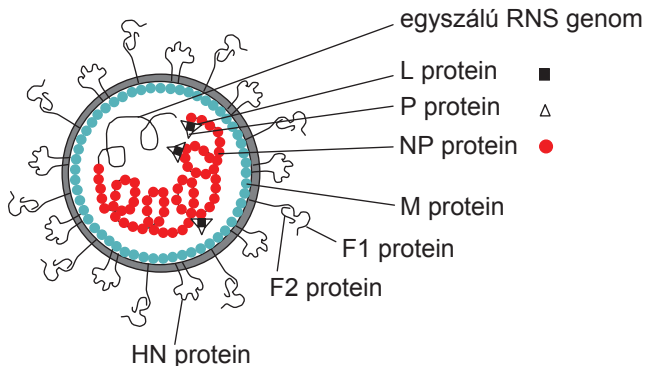
A fertőzés felszámolási kísérleteit tekintve mára a világ két részre szakadt. A *fejlett országokban* az olyan nagy kártétellel járó, és nagy terjedő-képességű fertőző betegségeknek, mint amilyen a BP, még a kórokozóját sem tűrik el, ezért behurcolások alkalmával *teljes eradikációval* lépnek fel ellene. A *fejldő országokban* a nagy baromfisűrűségű területek enzootiás fertőzései mára már kezelhetetlenné váltak, így megelégszenek a betegséget megelőző vakcinázással. A csirketartás gyors ütemű növekedése arról tanúskodik, hogy a BP elleni vakcinázás a vírussal folyamatosan fertőzött országokban is képes rentábilissá tenni a termelést, azonban az NDV-fertőzés globális előfordulása kétségtelenné teszi, hogy egy sikeres kórokozóval állunk szemben. Ez arra utal, hogy a vírus alkalmazkodik az új helyzetekhez, és fennmaradása érdekében a saját maga számára előnyös változásokon megy keresztül (Lomniczi és Czeglédi, 2005).

2.5. A kórokozó morfológiája és felépítése

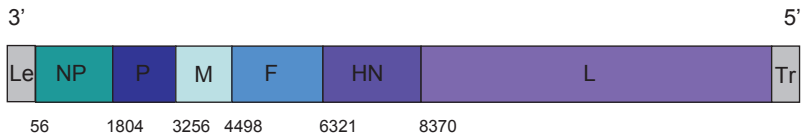
A baromfipestis, vagy más néven Newcastle-betegség kórokozója a Newcastle disease virus (NDV). Az NDV helikális felépítésű, a nukleokapszidot lipoprotein burok veszi körül. A vírus egyszálú, nem szegmentált, negatív polaritású RNS genommal rendelkezik, mely több mint 15 ezer nukleotidból (nt) áll. A genom mérete megfelel a paramyxovírusok ún. 6-os szabályának (rule of six), mely szerint a hatékony replikációhoz és transzkripcióhoz a

genomot alkotó nukleotidok számának oszthatónak kell lennie 6-tal (Kolakofsky és mtsai, 1998). Az NDV mindössze 6 génnel rendelkezik, ezek a nukleoprotein (NP), a foszfoprotein (P), a mátrix (M) proteint, a fúziós (F) proteint, a hemagglutinin-neuraminidáz (HN), és az RNS-függő RNS polimeráz (L = large) kódolják 3'→5' irányban. RNS-szerkesztés révén két további fehérje is képződik a P génről. Az ún. szerkesztési helyen (editing site) 1 illetve 2, a templát által nem kódolt guanin épül be a mRNS-be, és kereteltolódással a V (+1 guanin) és a W (+2 guanin) fehérjék szintetizálódnak (Steward és mtsai, 1993). A genomot a 3' vég felől az ún. leader (vezető), míg az 5' oldalon az ún. trailer (követő) szekvencia határolja, melyek a replikációhoz és transzkripcióhoz szükséges szabályozó régiókat tartalmazzák (1. ábra).

a.)



b.)



1. ábra. a.) Az NDV sematikus rajza. NP: nukleoprotein, P: foszfoprotein, M: mátrix protein, F1 és F2: fúziós protein két alegysége, HN: hemagglutinin-neuraminidáz, L: RNS-polimeráz. **b.)** Az NDV genomjának térképe. Az alul lévő számok a gének kezdő pozícióit mutatják. Le: leader (vezető) szekvencia; Tr: trailer (követő) szekvencia; 3': az RNS 3' vége; 5': az RNS 5' vége

2.6. Taxonómia

Az NDV a *Mononegavirales* rend *Paramyxoviridae* családjának tagja. Korábban a *Rubulavirus* genushoz sorolták (Rima és mtsai, 1995), azonban az NDV a *Rubulavirus* genus más tagjaival szemben jelentős különbségeket mutat. Ezek között említendő a gének első nukleotidjának hexamer fázisai ($6n+x$), melyek genuson belül konzerváltak mondhatóak a *Paramyxoviridae* családban (1. táblázat), azonban az NDV-ben a *Rubulavirus* genus tagjaitól ezek szignifikánsan eltérnek (de Leeuw és Peeters, 1999). A másik fontos különbség, hogy míg a *Rubulavirus* genuson belül a P génről szerkesztés nélkül a V fehérje, és mRNS szerkesztés révén kereteltolódással a P fehérje íródik át, addig az NDV P génjéről szerkesztés nélkül a P fehérje, és kereteltolódással a V fehérje képződik (Steward és mtsai, 1993). Az NDV P génjével kapcsolatos további észrevétel, hogy a szerkesztési hely (editing site) szekvenciája jobban hasonlít a *Morbillivirus* és *Respirovirus* genusokban lévőkre, mint a *Rubulavirus* genus tagjaiban észlelt szerkesztési hely szekvenciáira, annak ellenére, hogy az NDV ez utóbbi genussal áll közelebbi rokonságban (de Leeuw és Peeters, 1999). Az említett különbségek miatt de Leeuw és Peeters javasolták az NDV új genusba történő sorolását (de Leeuw és Peeters, 1999). 2002-ben az NDV-t az újonnan létrehozott, kizárólag madár (avian) paramyxovírusokat (APMV) tömörítő *Avulavirus* genushoz sorolták (Mayo, 2002). Madár paramyxovírusokon belül összesen kilenc antigénszerkezeti csoportot, azaz szerotípust (fajt) különböztetünk meg, ezek közül az NDV az APMV-1 szerotípus egyetlen tagja. Tenyésztett (pulyka) és vadon élő (pl. vízi-) madarakban további szerotípusok (APMV-1-9) is előfordulnak, de csak enyhébb, vagy tünetmentes fertőzést okoznak.

1. táblázat: A *Paramyxoviridae* család *Paramyxovirinae* alcsaládjába tartozó reprezentatív vírusok genomjának adatai

Genus és vírusok	A genom hossza (nt)	Fehérjeszintézis a P gén szerkesztése révén	A gének első nukleotidjainak hexamer fázis pozíciója						
			NP	P	M	F	SH	A*	L
<i>Avulavirus</i>									
NDV	15 186	P→V	2	4	4	4	-	3	6
APMV-6**	16 236	P→V	2	2	2	2	2	4	4
<i>Rubulavirus</i>									
MuV	15 384	V→P	2	1	6	1	1	1	6
SV5	15 246	V→P	2	1	6	1	2	1	6
SV41	15 450	V→P	2	1	1	1	-	1	6
<i>Respirovirus</i>									
bPIV3	15 480	P→V	2	1	1	1	-	1	2
hPIV3	15 462	P→V	2	1	1	1	-	1	2
SeV	15 384	P→V	2	1	1	1	-	1	2
<i>Morbillivirus</i>									
MeV	15 894	P→V	2	2	4	3	-	3	2
RDV	15 882	P→V	2	2	4	3	-	3	2
<i>Henipavirus***</i>									
HeV	18 246	P→V	2	3	4	4	-	4	3
NiV	18 234	P→V	2	3	4	4	-	4	3

*Az A (attachment proteint kódoló) gén lehet HN, N vagy G vírustól függően.

** Az adatok Chang és mtsai, 2001 cikkéből származnak

*** Az adatok Wang és mtsai, 2000; Chan és mtsai, 2001 és Harcourt és mtsai, 2000 cikkekből származnak

Rövidítések: APMV-6: Avian paramyxovírus-6; MuV: Mumps vírus; SV5: Simian vírus 5; SV41: Simian vírus 41;

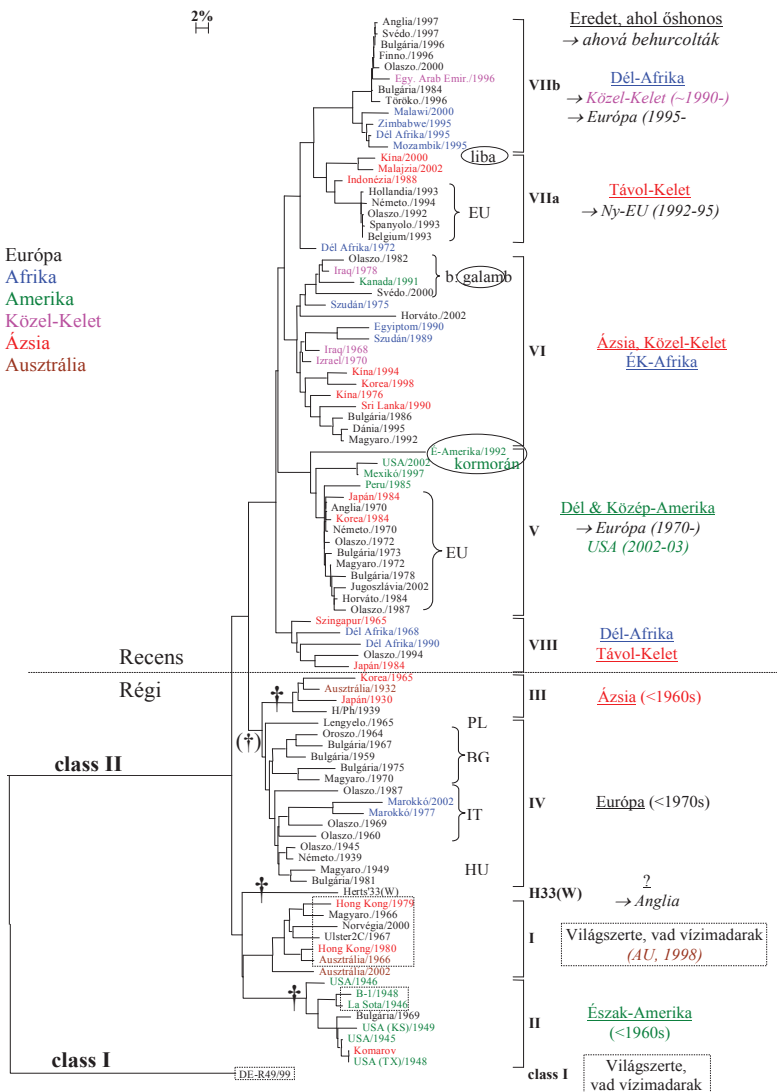
bPIV3: Bovine parainfluenza vírus 3; hPIV3: Human parainfluenza vírus 3; SeV: Sendai vírus; MeV: Measles vírus;

RPV: Rinderpest vírus; HeV: Hendra vírus; NiV: Nipah vírus

2.7. Az NDV csoportjai és elterjedésük

Az NDV-nek két nagy ága van, a *class I* és *class II főcsoportok*. A két főcsoport genetikai távolsága megközelíti az 50%-ot. A *class I* csoport tagjai apatogének, és főleg az NDV elsődleges rezervoárjának számító vadon élő vízimadarakból izolálják őket világszerte (a rezervoárokról részletesen a „2.10. NDV fertőzésre fogékony fajok és a vírus rezervoárjai” című fejezetben). A *class I*-en belül nemrégiben 9 genotípust írtak le, azonban a genotípusokra osztás egyelőre megrekedt a steril csoportosítás szintjén, járványtani információt – úgy, mint területi és/vagy időbeni kötődés, vagy gazdaspecifitás - nem társítottak hozzájuk (Kim és mtsai, 2007).

A *class II* főcsoport további két nagy ágra oszlik, az elkülönülés időbeni: az *NDV régi és recens ága* a 60-as évek előtti, illetve utáni időszak vírusait foglalják magukba (2. ábra). A *class II* főcsoporton belül ez ideig összesen 8 genotípust írtak le földrajzi és/vagy időbeli elkülönülés alapján, és ezeken belül számos altípus különböztethető meg egymástól, ezeket területspecifitás, gazdaspecifitás, illetve időbeli szegregáció jellemzi (Ballagi-Pordány és mtsai, 1996; Lomniczi és mtsai, 1998; Herczeg és mtsai, 1999, 2001; Yang és mtsai, 1999; Yu és mtsai, 2001; Gould és mtsai, 2001, 2003; Czeglédi és mtsai, 2002; Mase és mtsai, 2002; Aldous és mtsai, 2003; Wehmann és mtsai, 2003a, b; Tsai és mtsai, 2004; Bogoyavlenskij és mtsai, 2005).



2. ábra. A múlt század BP járványait okozó NDV törzsek genetikai csoportosítása, és területi előfordulása. Az ábra Lomniczi és Czeplédi, 2005 cikkéből származik. A genotípusok római számmal, a nagyobb földrajzi régiók és vírusaik különböző színekkel vannak jelölve. A vírus eredeténél az aláhúzott az őshonos, míg a dőlt betűs a vírus által behurcolással befertőzött területet jelzi. A † a kihalt genotípusokat jelöli. A harmadlagos gazdákat oválisok jelzik. A szaggatott keretben lévő törzsek avirulensek, a többi virulens.

Az NDV régi vonalát az I.-IV. genotípusok képezik. Az I. genotípus tagjait főként az NDV elsődleges rezervoárjából, a vadon élő vízimadarakból izolálják. Természetes körülmények között csak apatogén tagjai vannak, azonban Ausztráliában vakcinázatlan csirkeállományokba betelepülve virulens változatuk is kialakult (Gould és mtsai, 2001).

A II. genotípus törzsei Észak-Amerikában voltak elterjedtek a csirkeállományokban, a 40-es években fedezték fel őket. A csoport érdekessége, hogy az egyetlen olyan genotípus, ahol mindhárom virulencia típusba (lentogén, mezogén és velogén) tartozó törzsek megtalálhatóak. A jól ismert lentogén vakcinatörzsek (LaSota és B-1), illetve a mezogén Komarov vakcinatörzs is a II. genotípushoz tartozik (Czeglédi és mtsai, 2003).

A III. genotípus a fennmaradt kevés izolátum alapján csak a Távol-Keleten fordult elő. A III. genotípus a 30-as évektől kezdve volt jelen, és még a 80-as években is izoláltak a csoporthoz tartozó törzseket, annak ellenére, hogy addigra már a régióban új NDV törzsek váltak dominánssá (Lee és mtsai, 2004; Tsai és mtsai, 2004). A III. genotípus virulens törzseket tartalmaz (egyetlen kivétel a mezogén H-vakcinatörzs). Tagjai elvileg mára már mindenütt kihaltak, azonban Kínában sporadikus esetek kapcsán manapság újra felbukkannak III. genotípusú törzsek (Liu és mtsai, 2003; Qin és mtsai, 2008).

Habár a III. és IV. genotípusok közel állnak egymáshoz, külön csoportba sorolásukat földrajzi szegregációjuk indokolja. A IV. genotípus vírusai kizárólag Európában fordultak elő, és ha szórványosan is, de egészen a 80-as évekig maradtak fenn. Szintén csak virulens tagjai ismertek (Czeglédi és mtsai, 2002; Herczeg és mtsai, 2001).

Az NDV class II csoportjának másik nagyobb ága, a *recens ág az V.-VIII. genotípusokat foglalja magába*. Az új genotípusok a 60-as évek járványaiban tűntek fel, és nagyjából mindenhol egy évtized alatt lecserélték a korábbiakat. Csak virulens törzsek tartoznak ide, az V.-VIII. genotípusok fő rezervoárjai a csirkék, de egyes alcsoportjaik új rezervoárokat kolonizáltak (kormorán, galamb, liba) (részletesen lásd a „2.10. NDV fertőzésre fogékony fajok és a vírus rezervoárjai” című fejezetben).

Az V. genotípus Dél- és Közép-Amerikában őshonos, innen indult többször is hódító útjára. A 70-es évek elején díszmadarakkal került Angliába, később az egyik legsúlyosabb járványt okozta Európában (Aldous és mtsai, 2003; Alexander, 2003). A volt Jugoszlávia utódállamainak területén kizárólag ez a genotípus három évtizede tart fenn enzootiás fertőzést (Wehmann és mtsai, 2003b).

A VI. genotípus tagjai közel-keleti járványokban bukkantak fel a 60-as években, majd Afrika észak-keleti részén és Ázsiában is uralkodóvá váltak. A 80-as évek második felében,

kelet-európai országokban is megjelentek az V. genotípus mellett, és szinte teljesen leváltották azt.

A VIIa és VIIb genotípusok a '80-as évek óta vannak jelen, elsősorban távol-keleti járványokban fordulnak elő. Egy, a VIIa-hoz tartozó indonéziai változat 1992-től kezdődően Nyugat-Európán vonult végig (Lee és mtsai, 2004; Lomniczi és mtsai, 1998). A VIIb egyik változata pedig Afrika déli részén és a Közel-Keleten telepedett meg, újabban pedig sporadikusan Európában bukkan fel, Bulgáriába, Angliába és Olaszországba is behurcolták (Czeglédi és mtsai, 2002; Herczeg és mtsai, 2001).

A VIII. genotípus vírusai a 60-as évek óta vannak jelen Dél-Afrikában, de újabban a Távol-Keleten is izolálják őket (Herczeg és mtsai, 1999; Tsai és mtsai, 2004).

2.8. Az NDV által kódolt fehérjék és funkcióik

Az NP fehérje mintegy 2600 példányban található meg a virionban. Az RNS genomot burkolja be, egy NP fehérje 6 nt-dal kapcsolódik. Az NP fehérje az RNS genommal együtt alkotja a ribonukleoprotein (RNP) komplexet, ehhez, mint templáthoz kapcsolódnak a replikációban és transzkripcióban résztvevő P és L proteinek, bármelyik összetevő hiányában lehetetlen az NDV replikációja és transzkripciója.

A P fehérje az RNS-polimeráz kofaktoraként vesz részt a vírus replikációjában és transzkripciójában. A P génről két másik fehérje is átíródik 1, illetve 2 guanin inszertálódása révén. A V fehérje szerepet játszik a vírus replikációjában, a vírus egyik virulencia faktora (Mebatsion és mtsai, 2001). Alfa/béta antagonista tulajdonsága is ismert (Park és mtsai, 2003a), és ezzel kapcsolatosan részt vesz a gazda-specifitás kialakulásában (Park és mtsai, 2003b). A P génről átíródó harmadik fehérje, a W protein szerepe a mai napig nem ismert.

Az M protein a legnagyobb mennyiségű fehérje a vírusban. A fehérje a vírus burkának belső feléhez rögzül, és kölcsönhatásban van az NP fehérjével, a kettős lipidmembránnal, és a nyúlványfehérjék (F és HN) citoplazmatikus részével (Yusoff és Tan, 2001). A szabad M proteinek a fertőzött sejt sejtmagjában vannak jelen, melyet a fehérjén található nukleáris lokalizációs szignálok tesznek lehetővé. Az M protein fő feladata a virion összeépítése (Peeples, 1991).

A F fehérje I. típusú membrán glikoprotein. A sejt proteázai által végrehajtott aktiválást követően az F fehérje a membránfúziót (penetráció) hajtja végre (Morrison, 2003). A F protein az NDV fő virulenciafaktora.

A HN protein II. típusú membrán glikoprotein. A fehérje a szíalsav (N-acetil-neuraminsav) tartalmú sejtfelszíni receptorokhoz kapcsolódik, neuraminidáz aktivitása révén bontja a szíalsavat, és konformációváltozása révén indukálja az F protein által végrehajtott membránfúziót. A HN protein hemagglutinin aktivitással is rendelkezik, a vörösvérsejtek vírus-specifikus receptoraihoz kapcsolódik, és keresztkötések révén agglutinálja azokat. Mind az F, mind a HN fehérje antigénként szolgál a fertőzött szervezet immunrendszere számára.

Az L fehérje a P proteinnel együtt alkotja az aktív RNS-polimerázt, egy L proteinhez 5-10 P fehérje kapcsolódik.

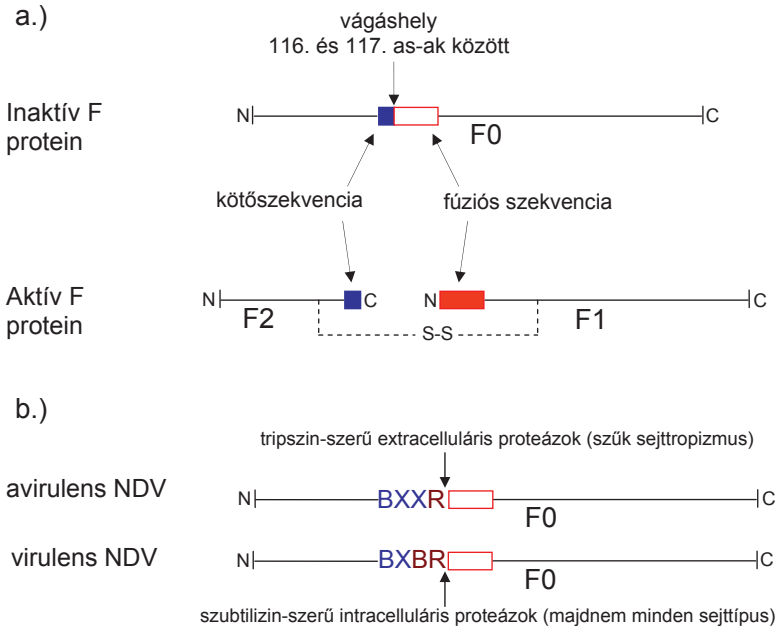
2.9. A patogénitász molekularis alapjai

Az NDV, és más burokkal rendelkező vírusok esetében a fertőzéshez szükség van a vírusburok és a sejtthártya fúziójára. Az NDV ezt két nyulványfehérjéje, az F és a HN proteinek segítségével hajtja végre. A HN fehérje felismeri a szíalsav - más nevén N-acetil-neuraminsav - tartalmú receptorokat a sejt felszínén, hozzájuk kapcsolódik (adszorpció), és neuraminidáz aktivitása révén bontja a szíalsavat. A HN protein további szerepe, hogy indukálja az F fehérje által végrehajtott membránfúziót.

A fúzió (penetráció) az F fehérjén lévő fúziós szekvencia segítségével valósul meg. A fúziós szekvencia mindaddig inaktív, amíg az F fehérje (F0) proteolitikus hasítás révén F0→F2+F1 formába nem jut. Az enzimatikus vágás az F fehérje 116. és 117. aminosavai között, közvetlenül a fúziós szekvencia mellett következik be, ezáltal a fúziós szakasz az F1 molekula végére jut, az így aktivált fehérje pedig a megfelelő háromdimenziós térszerkezet révén képes végrehajtani a fúziót. Az NDV *virulenciáját* elsősorban az *F protein proteolitikus vágáshelyének aminosav-sorrendje határozza meg* (Nagai és mtsai, 1976; Toyoda és mtsai, 1987), mely az irodalomban az F fehérje 112.-117. aminosavai által határolt szekvencia, habár a celluláris proteolitikus enzimek által felismert szekvencia mindössze a 113-116. pozíciók által határolt 4-as-ból álló motívumra koncentrálódik. Az, hogy milyen aminosav motívum található a vágáshelyen meghatározza, hogy mely proteolitikus enzim képes azt felismerni, és a kötőszekvenciához történő kapcsolódás után a fehérjét a megfelelő helyen történő hasítással aktiválni. Az NDV F fehérjéjéhez köthető aktiválódási stratégia nagyon hasonlít a madárinfluenza vírus (AIV = Avian influenza virus) HA (hemagglutinin) fehérjéje által követett stratégiához, felderítése is többnyire ennek köszönhető. *Virulens NDV törzsek* F fehérjéjén található *kötőregió dibázikus*, szekvenciája ¹¹³BXBR¹¹⁶, ahol „B” bázikus aminosav, NDV törzsek esetében arginin (R), vagy lizin (K). Ezt a BXBR motívumot ismerik

fel a szubtilizin-szerű proteázok (pl. furin), és a 116. és 117. as-ak közötti vágással aktiválják az F proteint (Stieneke-Grober és mtsai, 1992; Lomniczi, 2004). Szubtilizin-szerű proteázok majdnem minden sejtben megtalálhatók. A *virulens NDV törzs* ezáltal képes a szervezetben *generalizált fertőzést* létrehozni, vagyis a vírus patogenitásának alapja a szubtilizin-szerű intracelluláris proteázokra való fogékonyság. Az intracelluláris proteázoknak köszönhetően az újonnan összeépült vírusok még a sejtből történő kiszabadulásuk előtt aktiválódnak, vagyis fertőzőképesek, így a szomszédos sejtek sejtthártyájának összeolvasztása révén sejtről sejtre közvetlenül is tudnak terjedni.

Az *avirulens NDV törzsek* F proteinjében lévő *kötőrégió monobázikus* jellegű, és a ¹¹³BXXR¹¹⁶ konszenzus as-szekvenciával írható le. A BXXR motívumot a szubtilizin-szerű celluláris proteázok nem ismerik fel. Ezt a szekvenciát *extracellulárisan előforduló tripszin-szerű proteázok* képesek felismerni, és a fehérjét a megfelelő helyen, a 116. és 117. as-ak között hasítani. Tripszin-szerű proteázok kizárólag a légző- és az emésztőrendszerben található nyálkahártyák felületére választódnak ki, az *avirulens* vírusok ezért kizárólag az ezeket bélelő hámsejteket képesek megfertőzni (Ito és mtsai, 2001). A szűk sejtropizmus miatt ezek a törzsek csak lokális fertőzést képesek létrehozni, enyhe vagy tünetmentes fertőzést eredményezve (Rott és Klenk, 1988; Lomniczi, 2004). A *virulens* törzsekkel szemben a sejtől kiszabaduló *avirulens* vírusok nem fertőzőképesek, mivel a sejten belül - megfelelő proteolitikus enzim híján - nem történik meg az F fehérje proteolitikus aktiválása, a nyúlványfehérje vágatlan, inaktív formában épül be a virionba. Az *avirulens* vírusok sikere azon múlik, hogy a következő sejthez történő adszorpciókor képesek-e aktiválódni, így csak az utolsó pillanatban válnak fertőzőképesé. Az említett vágáshelybeli különbségen túl *virulens NDV* törzsekben a 117. as pozícióban fenil-alanin (F), míg *avirulens* törzsek esetében leucin (L) van jelen (Collins és mtsai, 1993; Lomniczi, 2004), bár ennek a különbségnek a jelentősége, és a vírus fertőzőképességére gyakorolt hatása nem ismert.



3. ábra. a.) NDV F proteinjének proteolitikus aktiválása. N: N-terminális; C: C-terminális; S-S: diszulfid-híd; a piros téglalap az aktív fúziós szekvenciát, míg a piros vonallal határolt fehér téglalap az inaktív fúziós szekvenciát jelöli.

b.) Avirulens és virulens NDV törzsek proteolitikus aktiválását különböző extracelluláris proteázok hajtják végre, meghatározva ezzel a vírus sejttropizmusát, és azon keresztül a vírus patogenitását.

2.10. NDV fertőzésre fogékony fajok és a vírus rezervoárjai

Az NDV 241 madárfajban képes természetes, vagy mesterséges körülmények között fertőzést létrehozni (Kaleta és Baldauf, 1988). Különbséget kell azonban tennünk az NDV fertőzésre fogékony madárfajok, és az NDV rezervoárjai között. Rezervoárról csak akkor beszélhetünk, ha a vírus tartós fennmaradása biztosított valamely gazda(ák) körében. A vírus új gazdában történő megtelepedésének sikere mindaddig kétséges, amíg annak egyedei között nem tud folyamatos fertőzést elindítani. Vagyis a fertőzőképességhez a vírus biológiai tulajdonságain kívül egy másik nélkülözhetetlen tényező is szervesen hozzájárul. Ez a tényező a vírus-gazda kölcsönhatáson alapul, és egy végtelen terjedési lánc létezésében nyilvánul meg. A vírus fennmaradásának sikere sokkal inkább múlik ennek hatékonyságán, mint az általa okozott betegségen, és annak súlyosságán.

Egy meglehetősen általános érvényű definíció szerint a rezervoár olyan egy, vagy több fajtól álló ökológiai rendszer, melyben a fertőző ágens a végtelenségig fennmarad külső segítség nélkül (Ashford, 2003). A rezervoár fogékony gazdák populációinak hálózata, mely folyamatosan bővül és megújul, akár a térben elszórt populációk találkozása révén, akár a fogékony egyedek rendszeres utánpótlásával.

A rezervoároknak két alapvető kategóriáját különböztetjük meg. Az egyik kategória a *természetes, vagy elsődleges rezervoár*. A természetes rezervoár és a vírus közös történetének túlnyomó része a civilizáció megjelenése előtti időszakra tehető, és emberi beavatkozástól mentesen zajlott. A fentiekből következik a rezervoár ősi jellege is, valószínűleg e rezervoár őseiben keletkezett a ma létező vírusok őse. Az NDV ősi, természetes rezervoárjai a *vadon élő vízimadarak* populációi, összesen mintegy 90 madárfaj, melyek vízi életterük által alkotnak ökológiai rendszert (Alexander, 1995). Az elsődleges rezervoár esetében a fertőzés lokális, a vírus az emésztőrendszerben szaporodik. A vad vízimadarakban található avirulens NDV törzsek tünetmentes fertőzést hoznak létre. Előfordul ugyan, hogy csirkék BP-járványai alatt a vadmadarak is áldozatul esnek a csirkéktől kapott virulens vírusok által okozott NDV fertőzésnek, azonban ezek az esetek csak sporadikusan fordulnak elő.

Az elsődleges rezervoár mellett létezik egy másik gazdatípus is, a *másodlagos rezervoár*, mely rendszerint 1-1 fajtól áll, és amely az NDV esetében egyben *mesterséges rezervoár* is. A tyúkfélék NDV-vel való fertőzöttsége, és rezervoárrá válása a civilizáció terméke, az egyre nagyon mértékű nagyüzemi csirketartás biztosítja a vírus számára a fogékony gazdák folyamatos utánpótlását. A „másodlagos” jelző utal arra, hogy a tyúkfélék, mint rezervoár recensnek tekinthető az ősi, elsődleges rezervoárral szemben, valamint jelzi, hogy a gazdát külső forrásból érkező vírusok kolonizálták, a vírus nem a másodlagos gazdában keletkezett. A csirkéket fertőző NDV törzsek virulensek, a vírus képes generalizált, majdnem minden szervre kiterjedő fertőzést létrehozni. A nemrégiben lezajlott, I. genotípusú avirulens törzsek általi csirketartás kolonizációt, és az utána kialakuló járványt felderítették (Gould és mtsai, 2001), ebből kiderült, hogy a csirkékbe avirulens törzsek jutottak át, és az új gazdában vált a vírus patogénné, ezt támasztja alá az is, hogy vad vízimadarakban nem találták meg az avirulens vírus virulens párját. A vírus patogénné válása tehát a másodlagos gazdában, a csirkében következik be, ugyanakkor a kórokozó virulenssé válása a csirkére nézve rendkívül káros, közel 100%-os mortalitással jár, tulajképpen a vírus evolúciós tévedésének tekinthető (Lomniczi, 2004). A csirketartás körülményeinek köszönhetően azonban a másodlagos rezervoárban a fertőzési lánc fenntartása közel olyan hatékony, mint a természetes gazdában, ez pedig a vírus csirkékben „elért” evolúciós sikerét eredményezi. Az evolúciós sikerhez a

vírus maga is szervesen hozzájárul, még ha történnének is a másodlagos gazda eliminálása révén víruskipusztulások, az NDV bármikor kész a csirke kolonizációjára, ezt eddig három különböző genetikai vonal, a class I főcsoport, valamint a class II-n belüli I. és II. genotípus esetében is megfigyelhettük.

Itt kell említést tennünk egy *speciális rezervoárról, a vakcinázott csirkéről*. A recens ág (V.-VIII. genotípus) megjelenése a csirkék 1950-es években általánossá vált vakcinázásával hozható kapcsolatba. Filogenetikai vizsgálatok egy, a korábbi genotípusok virulens változatainak keletkezési mechanizmusától eltérő stratégiát látszanak igazolni. A recens genotípusok nem a régiék leszármazottai, hanem egy teljesen új genetikai vonal (Lomniczi, 2006). A vakcinázást követően a másodlagos gazda, a vakcinázatlan csirke helyett egy valamennyire védett, vagyis más fogékonyságú gazda jelent meg a színen. Ez a víruspopulációban bekövetkezett beszűkült állapotot eredményezett. Az irodalom bottle-neck effektusnak, vagy magyarul palacknyak hatásnak nevezi azt a jelenséget, amikor egy genetikai változatossággal rendelkező populáció létszáma valamilyen külső hatásra (jelen esetben a gazda vakcinázásának hatására) átmenetileg lecsökken. Ilyen esetben az alapító hatás meglétén, vagy hiányán múlik, hogy a populáció ismét feltámad-e. Ez pedig azon múlik, létezik-e olyan egyed, ami a populáció beszűkülését okozó hatásnak „ellenáll”.

Hipotézisünk szerint (Lomniczi, 2006) az V.-VIII. genotípus keletkezésének hátterében a vakcinázást követően óriási szerep jutott az immunszelekciónak. A régi és recens genotípusok elválása valószínűleg már korábban megtörtént, a régi genotípusok uralkodása alatt, vagy még azelőtt, mindenesetre az 1960-as évek előtt valószínűleg nem vettek részt járványok kialakításában. A vakcinázás következtében, a víruspopuláció beszűkülését követően valószínűleg egyetlen alapító víruson múltott a fennmaradás. Ez az alapító vírus, az V.-VIII. genotípusok közös őse pedig rendelkezhetett az immunitás áttörésének képességével, ebből következik virulens volta is. A vakcinázást követően bekövetkező palacknyak hatást, és az V.-VIII. genotípus közös őseinek alapító létét támasztja alá az a tény is, hogy az „új”, védett gazda megjelenését követően nagyjából egy évtizedes késéssel kezdődött a recens törzsek járványokban való felbukkanása.

Az elmúlt évtizedekben a tyúkfélék BP-e mellé három új madárfaj önállóan terjedő BP-e sorakozott fel, a *galamb*, a *kormorán* és a *liba* esetében a vírus-gazda kölcsönhatás szintén elérte már a rezervoár státuszt, bennük a vírus a csirkékhez hasonlóan generalizált fertőzőzést alakít ki. A különböző genotípushoz tartozó virulens NDV törzsek egymástól térben és időben függetlenül csirkéből mentek át az új gazdára, melyek ezáltal a harmadlagos rezervoárok kategóriáját képezik. A filogenetikai vizsgálatok bizonyítják, hogy ezekben az esetekben a

csirkék kolonizációjánál is recensebb gazdaváltásról van szó, a *harmadlagos gazdák* és az NDV története viszonylag rövid, a törzsfán az új NDV gazdaváltozatok galambok, kormoránok és libák esetében is egyes leszármazási vonalakon belül csak egy-egy alcsoportig küzdötték fel magukat.

A rezervoárok ősi illetve mesterséges voltából a bennük élő vírusok patogenitásának különbségét tekintve a vírus evolúciójának irányára is levonhatunk következtéseket. Eszerint az ősi rezervoárban lévő apatogén vírusállapotot tekinthetjük ősinek. A mesterséges rezervoárban, a csirkében a kolonizációt követően patogén vírusok alakulnak ki, és vannak jelen, a patogenitás így a vírus leszármazott állapota.

2.11. NDV fertőzés galambokban

1981-ben, Olaszországban és Szudánban egy járványos, a tünetek tekintetében baromfipestisre hasonlító súlyos megbetegedés jelent meg a galambokban (*Columba livia*) (Biancifiiori és Fioroni, 1983; Eisa és Omer, 1984). Az irodalomban akkor is, és azóta is többnyire a galambok paramyxovírus-1 (gPMV-1) okozta betegségeként említik, az utóbbi időben azonban már a betegség jelentőségét sokkal kifejezőbb galamb-ND elnevezéssel is lehet találkozni (Varga és mtsai, 1999; Meulemans és mtsai, 2002).

Már az 1920-as évek közepén, a baromfipestis madárinfluenzától történő etiológiai alapú megkülönböztetése kapcsán fény derült arra, hogy a galambok fogékonyságot mutatnak NDV-re, ugyanakkor rezisztensek az AI fertőzéssel szemben (Doyle, 1927, idézi Lomniczi, 1998). Később számos sporadikus esetről számoltak be, ezek azonban csirkéket érintő BP járványok alatt fordultak elő, és a fertőzés galambok között rendszerint nem volt ragályos (Hanson és Sinha, 1951; Stewart, 1971; Pearson és McCann, 1975; Erickson és mtsai, 1980; Kaleta és Bandauf, 1988). A 80-as évek elején kezdődő új betegség azonban a korábbiaktól eltérően posta-, disz- és húsgalambok között gyorsan és önállóan terjedt, csirkék azonban nem, vagy csak kivételesen kapták meg (Alexander és Parsons, 1986; Vindevogel és Duchatel, 1988). A betegség olyan intenzitással terjedt szét Európa szerte, ami a csirkék baromfipestisének terjedéséhez volt hasonlatos (Alexander és mtsai, 1985; Wilson, 1986; Vindevogel és Duchatel, 1988; Kaleta, 1992a, b). A kórokozó laboratóriumi vizsgálatok során NDV-nek bizonyult, az izolátumok jelentős részét azonban csirkékben elvégzett tesztben mindössze közepes virulenciájúnak, mezogénnek találták (Alexander és mtsai, 1985; Alexander és Parsons, 1986; Kissi és mtsai, 1988; Kissi, 1988; Werner és mtsai, 1999; Meulemans és mtsai, 2002). Az NDV törzsek diagnosztizálásában fontos előrelépést jelentett, amikor angol kutatók olyan monoklonális ellenanyagokat (Mke) állítottak elő, amelyek segítségével a galamb patogén PMV-1 törzseket

(gPMV-1) meg lehetett különböztetni a csirkékben előforduló klasszikusabb NDV törzsektől (Alexander és mtsai, 1984). A betegség néhány éven belül világszerte megjelent, és óriási károkat okozott a galambtenyészetekben. Harmadik világjárványnak is nevezték, utalva ezzel – bár, mint már említettem, hibásan - a megelőző évtizedekben csirkéket érintő BP-járványok kiterjedésére (Wilson, 1986; Alexander, 1988). Az inaktivált vakcinákkal történő oltás hatására a betegség visszaszorult ugyan, de a fertőzést nem sikerült felszámolni. A fertőzés az európai állományok egy részében enzootiássá vált, manapság is nagy számban izolálnak gPMV-1 törzseket világszerte (Alexander és mtsai, 1997; Werner és mtsai, 1999; Kommers és mtsai, 2001; Zanetti és mtsai, 2001; Meulemans és mtsai, 2002; Barlic-Maganja és mtsai, 2005; Liu és mtsai, 2006), ráadásul nemcsak háziásított galambokból, hanem vadon élő galambokból, gerlékből és diszmadarakból is (Alexander és mtsai, 1985; Lister és mtsai, 1986; Johnston és Key, 1992; Kaleta, 1992b; Werner és mtsai, 1999). Magyarországon 1983-ban diagnosztizálták a betegséget (Pavozsán és mtsai, 1984), és a következő években, hazánkban izolált gPMV-1 vírustörzseket kutatócsoportunk jellemezte (Kissi és mtsai, 1988).

2.12. RNS-vírusokkal kapcsolatos filogenetikai problémák

Az RNS-vírusok nagyfokú szekvencia-változatosságának oka, hogy a genetikai anyag másolását végrehajtó RNS-polimeráz nem rendelkezik 3'→5' exonukleáz aktivitással, vagyis a DNS-polimeráztól eltérően a hibásan beépült nukleotidokat képtelen eltávolítani, és így javításra sincs lehetőség. Emiatt az RNS-vírusoknál a mutációk gyakorisága 10^{-3} - 10^{-5} szubsztitúció/nukleotid/replikáció, vagyis a DNS-vírusoknál nagyjából 4-6 nagyságrenddel gyorsabban divergálnak. A filogenetikai vizsgálatok segítségével a rokonsági viszonyok felfedésén túl az időviszonyokról is szeretnénk tájékozódni. Azonban az időkalibrációt tekintve a vírusizolálás dátumával óvatosan kell bánni, viszonylag „rövid” evolúciós idő (néhány évtized) alatt is történhetnek olyan változások, amelyek az egyes pozícióban lévő nukleotid-szubsztitúció vissza- illetve továbbalakulása következtében rejtve maradnak előttünk. Ebből következik, hogy minél nagyobb távolságra van egymástól két taxon, az ághosszúságokkal reprezentált idő annál alábecsültebb lesz.

A vírustörzsek közötti különbségek - a nukleotid és aminosav szubsztitúciók - segítségével vizsgálható a törzsek filogenetikai kapcsolata. A filogenetikai csoportosításában általánosan elfogadott kifejezések: típus, genotípus, szubtípus, csoport és alcsoport. Az egyes vírurfajoknál természetesen más és más értékek jelentik a genotípusok, és az azon belüli csoportok határait, általános azonban, hogy az értékeket befolyásolják a kórokozó biológiai tulajdonságai, és földrajzi elterjedtsége, ezek pedig az adott vírus járványtanát is jól jellemzik.

Vagyis a rokonsági viszonyok meghatározásán túl, a szekvencia adatokon alapuló filogenetikai vizsgálatok a betegségek epidemiológiai hátterének felderítéséhez is szolgáltatnak információkat. A filogenetikai analízis során kapott törzsfák egyrészt tájékoztatnak a populáción belüli genetikai diverzitás mértékéről, másrészt olyan fontos adatok nyerhetők a segítségével, minthogy egy adott járvány egy, vagy több genetikai vonalnak tulajdonítható-e. NDV esetében például a pandémia-teória dőlt meg a filogenetikai vizsgálatokból levont következtetésekkel (Lomniczi és Czeglédi, 2005). Mint már korábban említettem, az NDV számlájára három pandémiát írtak az 1920-as évektől kezdve. Az NDV genotípusok azonosításának bevezetése azonban rávilágított arra, hogy míg az első „pandémiát” legalább három korai genotípus (II., III., IV.) vírustörzsei okozták, addig a második „pandémiáért” két recens genotípus, az V. és VI. tehető felelőssé. Vagyis a pandémia kifejezés nem helytálló, mivel nem egyetlen vírus járta be a világot, a globális szinten előforduló járványokat területspecifikus járványtípusok egyidejű, de egymástól független előfordulása jellemezte. A filogenetikai analízis választ szolgáltat olyan kérdésekre is, hogy egy adott területen megjelenő vírus a világ mely részéről hurcoltak oda, esetleg a virulens törzs helyben keletkezett-e enzootiásan jelenlévő avirulens vírus mutációja következtében. Ez utóbbira példa az Ausztráliában vad vízimadár populációból származó, csirkékben virulencia fokozódáson átesett NDV okozta járvány (Gould és mtsai, 2001). A filogenetikai analízis során feltárt különbségek nemcsak a járványtan számára hasznosak, hanem a nt szekvenciák jellegzetességeinek vizsgálatával együtt a vírusok taxonómiai besorolását is segítik. Erre szintén példát szolgáltat az általunk vizsgált NDV, a genom részletes vizsgálatokor észlelt anomáliák (de Leeuw és Peeters, 1999) miatt az NDV nemrégiben a *Rubulavirus* genusból átkerült az újonnan létrehozott *Avulavirus* genusba (Mayo, 2002).

2.13. Filogenetikai módszerek

A filogenetikai analízis módszerei lehetnek *távolság-mátrix (kvantitatív) és karakter (kvalitatív) alapú megközelítések*. Mindkettő eredményeként filogenetikai fát kapunk, amely nem más, mint a vizsgált taxonómiai egységek, esetünkben vírustörzsek közötti rokonsági viszonyok grafikai ábrázolása. A távolság-mátrix alapú megközelítéseknél (pl. UPGMA, Fitch-Margoliash módszer, Wagner-féle távolság módszer) a kiindulási alap egy távolság-mátrix, ami tartalmazza a vizsgált adatok (esetünkben nukleinsav szekvenciák) becslt, páronkénti összehasonlításából származó távolság értékeit. Távolság mátrixok képzésének egyik legegyszerűbb módja a súlyozatlan párok kialakítása mértani átlagok alkalmazásával

(UPGMA), ahol a legkisebb távolságot mutató taxonpár kiválasztásával, azokat egyben közös össel rendelkező, legközelebbi rokonoknak is tekintjük. A többi taxon távolsága ehhez viszonyítva határozható meg. A módszer alapvető hibája, hogy a különböző taxonok közötti eltérő szubsztitúciós rátából származó hatást nem veszi figyelembe. Széles körben elterjedt távolság-mátrix alapú alkalmazás az ún. *neighbor-joining módszer* (Saitou és Nei, 1987), mely lényegében egy ún. cluster-analízis, és kiküszöböli a fentebb említett problémát. A módszer a minimális evolúció hipotézise alapján a leghasonlóbb két szekvenciát kiválasztva, pontértékük számtani közepével jellemzett hipotetikus taxont hoz létre. A következő lépésben ismét összeveti az összes taxont (szekvenciát), beleértve az előző lépésben a két legközelebbi taxonból újonnan létrehozott hipotetikus taxont is, és a két legközelebbit megint összevonja, ezáltal a taxonok száma minden lépésben eggyel csökken. Az átalakított távolság-mátrix használata azonban a fa torzulását eredményezheti, mert nem veszi figyelembe, hogy a nt szubsztitúcióknak többféle típusa is létezhet (egyszeres, többszörös, koincidentális, paralel, konvergens, back). Emiatt bizonyos korrekciókra van szükség ahhoz, hogy kiküszöböljük az evolúciós távolság alulértékelését.

Az általunk erre a célra alkalmazott *két-paraméteres Kimura korrekciós modell* (Kimura, 1980) azon a tapasztalaton alapul, hogy statisztikailag gyakrabban fordulhat elő tranzíció (purin \leftrightarrow purin: A \leftrightarrow G; pirimidin \leftrightarrow pirimidin: T \leftrightarrow C) egy vizsgált DNS-szakaszon, mint transzverzió (purin \leftrightarrow pirimidin: A, G \leftrightarrow C, T), ennek következtében a modell a tranzíciót alacsonyabb, míg a transzverziót magasabb pontszámmal értékeli. A fák megbízhatóságát „bootstrap” *analízissel* (Felsenstein, 1985) vizsgáltuk, mely véletlenszerű mintavételezéssel generál – esetünkben 100 – egymástól független fát, majd ezekből egy konszenzus fát készít, és minden ágra megadja, hogy ez a generált fák mekkora hányadában szerepelt. Általában a 90% feletti „bootstrap” érték mellett nevezhető a kapott fa elágazásrendszere, és az azt létrehozó filogenetikai módszer megbízhatónak, az 50% alatti „bootstrap” értékek már nem mindig tükrözik megfelelően a filogenetikai kapcsolatokat, ezért érdemes egyéb módszerrel is elemezni a rendelkezésre álló adatokat, a valós filogenetikai viszonyok megállapításához.

A filogenetikai vizsgálatok másik módja az egyedi karakterek összehasonlításán alapuló módszer (parsimony). Az eljárás a szekvenciák nukleotid-, vagy aminosav pozícióit, mint karaktereket direkt módon hasonlítja össze. A módszer lényege a takarékosság, eszerint az a fa tükrözi leginkább a valós leszármazást, amelyik a legkisebb számú evolúciós változás igényli a taxonómiai egységek közötti különbségek magyarázatára. A kapott törzsfá ágai arányosak az evolúciós változások számával, a távolság alapú módszerekkel nyert filogenetikai fákhhoz képest a „parsimony” fák többletinformációt is hordoznak, mégpedig azt,

hogy pontosan melyik pozíció járult hozzá egy adott ág hosszúságához. A módszer hátránya, hogy a konvergens evolúció modellezésére kevésbé alkalmas.

3. CÉLKITŰZÉSEK

1. Reprezentatív galamb-NDV törzsek F génjének részleges szekvenciáiból adatbázis létrehozása, majd ennek felhasználásával a törzsek filogenetikai vizsgálata az alábbi kérdések megválaszolása céljából:
 - a. Milyen fokú genetikai diverzitás jellemzi a galamb-NDV törzseket, és miféle epidemiológiai kapcsolatok és jelenségek ismerhetők fel analizisükkel?
 - b. Hogyan viszonyul egymáshoz a galamb-NDV, és a klasszikus NDV természetes viszonyok közötti evolúciós üteme?
 - c. A galamb-NDV törzsek között fennáll-e bármiféle földrajzi és/vagy időbeli elkülönülés?
 - d. A galamb-NDV törzsek monofiletikus csoportot alkotnak-e, azaz a csirke-galamb gazdaváltás egyszeri esemény volt, vagy a gazda kolonizációja egynél több alkalommal történt meg?
 - e. Az 1980-as években kitört járvány egyetlen alapvírus terjedésének volt-e tulajdonítható, vagy egymástól jól elkülönült genetikai vonalhoz tartozó törzsek vettek részt benne?
 - f. Térben és időben hová helyezhető a galamb-NDV törzsek eredete?
 - g. Milyen körülmények között kerülhetett sor a gazdaváltásra?
2. Könnyen elvégezhető, és minden laboratórium számára elérhető restriktív endonukleáz analízis kidolgozása galamb-NDV törzsek vizsgálatára annak érdekében, hogy...
 - a. a galamb-NDV törzseket megkülönböztessük a klasszikus NDV törzsektől.
 - b. galamb-NDV törzseket restriktív fragmentum mintázatuk alapján járványtani jelentéssel bíró alcsoportokba tudjunk sorolni.
3. Egy galamb-NDV törzs genomszekvenciájának meghatározása annak megállapítására, hogy...
 - a. milyen genomszerkezeti sajátosságok jellemzőek a galambhoz, mint harmadlagos rezervoárhoz adaptálódott vírusra.

- b. milyen genom-mérettel rendelkeznek a galamb-NDV törzsek, valamint a genom mérete kapcsolatba hozható-e a vírus gazdatropizmusával.
- c. milyen genetikai változások állhatnak a gazdaváltás hátterében.
- d. a genom-szekvencián azonosíthatók-e az NDV-nél eddig leírt mindazon szakaszok, amelyek a replikáció, transzkripció, és a vírus-gazda kölcsönhatás eseményeinek szabályozásában vesznek részt.

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1. Vírustörzsek

A vizsgált vírustörzsek az MTA Állatorvostudományi Kutatóintézetében Dr. Lomniczi Béla által fenntartott vírusgyűjteményből származnak. A hazai baromfipestis izolátumok az Országos Állategészségügyi Intézet Víruslaboratóriuma, valamint a debreceni, miskolci és békéscsabai Állategészségügyi Intézetek jóvoltából kerültek a fent említett gyűjteménybe. Külföldi járványmentekből, kitérősekből izolált törzsek kutatási együttműködés keretében gazdagították a gyűjteményt. A vizsgált törzsek adatait az eredmények könnyebb követhetősége érdekében az „5. Eredmények és megvitátás” című fejezetben ismertetem, feltüntetve a szekvencia-analízis, illetve a RE-analízis eredményeit is.

4.2. Vírus-szaporítás

10^3 - 10^4 PFE/ml töménységű vírusból 0,1 ml-t oltottunk 9-10 napos embrionált tyúktojás allantoisz üregébe, ahol a hárytát bélelő sejtrétegben szaporodott a vírus. A tojásokat 37°C -on 3 napig inkubáltuk, majd a vírustartalmú allantoisz folyadékot leszívtuk, és felhasználásukig -70°C -on tároltuk.

4.3. Vírus RNS tisztítása

Az NDV-vel fertőzött tyúktojás allantoisz folyadékából 500 μl -t centrifugálással (5 perc, 6500 g) mentesítettünk az esetleges szövetmaradványoktól, majd proteináz K enzimmel (Sigma) kezeltünk 600 μl reakció-térfogatban (10 mM Tris-Cl pH=8; 6 mM EDTA pH=8; 0,5 m/m% SDS; 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ proteináz K) 55°C -on 1 órán át. Ezután 1-szeres térfogatarányú fenol hozzáadásával extraháltuk, a keveréket centrifugáltuk (10 perc, 16500 g), a felül lévő vizes fázist új eppendorf csőbe mértük át, és a műveletet még egyszer megisméltük. Ezután a fenol maradékának eltávolítása céljából az extrakciót 1-szeres térfogatarányú kloroformmal is elvégeztük, majd centrifugálás (10 perc, 16500 g) után a vizes fázist új eppendorf csőbe mértük át. A vírus RNS kicsapása 50 μl 3 M NaAc (pH=5,2) és 800 μl etanol hozzáadásával - 20°C -on történt 1 éjszakán keresztül. A vírus RNS-t 800 μl 70%-os etanollal történő mosás és szárítás után 20 μl DEPC kezelt vízben oldottuk. Az RNS-t felhasználásig -70°C -on tároltuk.

4.4. A genom 3' végének meghosszabbítása

A genom 3' végének meghosszabbítására az RNS-genom 3' végi szekvenciájának meghatározásához volt szükség. Ennek érdekében specifikus DNS oligonukleotidot (17.) (2. táblázat) ligáltunk az RNS-hez. A 40 µl térfogatú reakcióelegy 5 µl RNS-t, 250 ng DNS oligonukleotidot, 5 mM DTT-t, 1 mM ATP-t, 40 U RNasin RNáz inhibitor (Promega), 20 µl 40%-os PEG-et, és 20 U T4 RNS-ligázt (Promega) tartalmazott. A reakció 37°C-on 30 percen át zajlott, majd az RNS-ligázt 96°C-on 3 percig denaturáltuk. A DNS-linkerrel ellátott RNS-t ezután 2,5-szörös mennyiségű etanollal kicsaptuk, és 100 µl 70%-os etanollal történő mosás és szárítás után 20 µl DEPC kezelt vízben oldottuk.

4.5. Reverz transzkripció

4.5.1. Reverz transzkripció RE-analízishez, és filogenetikai vizsgálatokhoz

A RE-analízishez és a filogenetikai vizsgálatokhoz a cDNS szintézis 25 µl reakció-térfogatban történt random hexamer felhasználásával. A reakcióelegy 0,02 U random hexamert (Pharmacia), 0,4 mM dATP-t, dCTP-t, dGTP-t és dTTP-t (Promega), 200 U Moloney murine leukémia vírus reverz transzkriptázt (Invitrogen), az enzimnek megfelelő puffert (50 mM Tris-HCl pH=8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂) és 5 µl RNS-t tartalmazott. A reakció 90 percen át 37°C-on zajlott.

4.5.2. Reverz transzkripció a genom teljes nukleotidsorrendjének meghatározásához

A genom teljes nukleotidsorrendjének meghatározásához a reverz transzkripció 25 µl térfogatban zajlott, a reakcióhoz genom-specifikus oligonukleotidokat (18., 19., 20., 21. és 22.) (2. táblázat) alkalmaztunk. A kiindulási 16 µl-es reakcióelegy 2 pmol oligonukleotidot, 0,4 mM dATP-t, dCTP-t, dGTP-t, valamint dTTP-t és 5 µl RNS-t tartalmazott. A reakcióelegyet 10 percig 65°C-on, majd 1 percig jégen tartottuk. Ezután hozzáadtunk 40 U RNasin RNáz inhibitor, 2 µl 0,1 mM-os DTT-t, és az enzimnek megfelelő puffert (50 mM Tris-HCl, pH 8,3, 75 mM KCl; 3 mM MgCl₂, 0,02 M DTT). Az elegyet 1 percig 42°C-on tartottuk, majd hozzáadtunk 2 U SuperScript II RNáz H⁻ Reverz Transzkriptázt (Invitrogen). A reakció 50 percen keresztül 42°C-on, majd az enzim denaturálása 15 percen át 70°C-on zajlott. Ezután a reakcióelegyet 20 percig jégen tartottuk, majd 2 U RNáz H enzimmel emésztettük az RNS-t 37°C-on 30 percen keresztül. Az RT-reakciókhoz minden esetben DEPC-kezelt vizet használtunk.

4.6. A genom 5' végének meghosszabbítása

A genom 5' végének meghosszabbítása az RNS genom 5' végi nukleotidsorrendjének meghatározása érdekében volt szükséges. Ehhez az 5' RACE kitet (Invitrogen) alkalmaztuk. A szekvencia specifikus oligonukleotiddal (22.) (2. táblázat) történt RT-reakciót követően a cDNS-t GlassMAX oszlopon keresztül tisztítottuk az esetlegesen megmaradt oligonukleotidoktól történő elválasztás céljából. A cDNS-hez 120 µl 6 M-os NaI-oldatot adtunk, majd az elegyet az oszlopon keresztül 13000 g mellett 20 s-ig centrifugáltuk. Ezután háromszor mostuk az oszlopot 400 µl hideg mosópufferrel, majd kétszer 400 µl 70%-os etanollal, a centrifugálás minden esetben a korábbiak szerint zajlott. Az oszlopot centrifugálással szárítottuk (13000 g, 1 perc), majd 50 µl 65°C-os steril vízzel (Sigma) 13000 g mellett 20 s-ig tartó centrifugálással eluáltuk a cDNS-t.

A tisztítás után a cDNS 3' végéhez poli-C farkat szintetizáltunk. A 25 µl végtérfogatú reakcióelegy 10 µl tisztított cDNS-t, 0,2 mM dCTP-t, 1 µl terminális dezoxinukleotidil-transzferázt, és az enzimnek megfelelő puffert (10 mM Tris-HCl, 25 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂) tartalmazott. A reakcióhoz DEPC-kezelt vizet használtunk. Az enzim hozzáadása előtt az elegyet 3 percig 94°C-on inkubáltuk, majd jégre helyeztük. A reakció 10 percen át 37°C-on zajlott. Az enzimet ezután 10 perc alatt 65°C-on inaktiváltuk, majd a reakcióelegyet rövid centrifugálást követően jégre helyeztük. A reakcióelegyből 5 µl-t közvetlenül használtunk fel a PCR során.

4.7. Polimeráz-lánreakció (PCR)

4.7.1. Oligonukleotidok tervezése és szintézise

Az oligonukleotidokat laboratóriumunkban korábban szekvenált gPMV-1, illetve egyéb NDV törzsek megfelelő génszakaszainak szekvenciái alapján terveztük OLIGO 4.0 szoftver segítségével. Az oligonukleotidokat az MTA Szegedi Biológiai Központ Nukleinsav Szintézis Csoportjával szintetizáltattuk.

4.7.2. PCR-ek RE-analízishez, és filogenetikai vizsgálatokhoz

A RE-analízishez és a filogenetikai analízishez alkalmazott PCR-ek az 1.-2., 3.-4., 5.-6., 9.-10., 11.-12., 13.-14. és 15.-16. oligonukleotid párok (2. táblázat) felhasználásával 100 µl reakció-térfogatban zajlottak. A reakcióelegy 5 µl random hexamer alkalmazásával készült cDNS-t, 0,1 mM dATP-t, dCTP-t, dGTP-t, valamint dTTP-t, mindkét oligonukleotidból 30

pmol-t, 2U Taq DNS-polimerázt (Perkin-Elmer), és az enzimnek megfelelő puffert (10mM Tris-HCl pH=8,3, 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂) tartalmazott.

Fészkes PCR alkalmazásakor az 5. és 6. oligonukleotidok felhasználásával készült első PCR-terméket 50-szeresére hígítottuk, és a fészkes PCR reakcióhoz ebből a hígításból használtunk 5 µl-t. A fészkes PCR a 7.-8. primerpárral (2. táblázat) szintén 100 µl reakció-térfogatban zajlott. A reakcióelegy 0,1 mM dATP-t, dCTP-t, dGTP-t és dTTP-t, mindkét oligonukleotidból 30 pmol-t, 2U Taq DNS-polimerázt, és az enzimnek megfelelő puffert (10 mM Tris-HCl pH=8,3, 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂) tartalmazott. A reakciók PTC-200 Peltier Thermal Cycler készülékben zajlottak. A PCR-ek körülményeit a 3. táblázat tartalmazza.

4.7.3. PCR-ek a genom teljes nukleotidsorrendjének meghatározásához

A genom teljes nukleotidsorrendjének meghatározása céljából készült PCR-ek 50 µl-es reakció-térfogatban zajlottak a 18.-23., 24.-25., 26.-27., 28.-29. és a 30.-31. oligonukleotid párok (2. táblázat) felhasználásával. A reakcióelegy 5 µl genom-specifikus primer segítségével készült cDNS-t, 0,2 mM dATP-t, dCTP-t, dGTP-t, valamint dTTP-t, mindkét oligonukleotidból 10 pmol-t, 2,5 U PfuTurbo DNS-polimerázt (Stratagene) (24.-25., 26.-27. és 28.-29. primerpárok esetén) vagy 1 U Cloned Pfu polimerázt (Stratagene) (18.-23. és 31.-31. primerpárok esetén), és az enzimnek megfelelő puffert (20 mM Tris-HCl (pH=8,8), 2 mM MgSO₄, 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1% Triton X-100, 0,1 mg/ml BSA) tartalmazott. A reakciók PTC-200 Peltier Thermal Cycler készülékben zajlottak. A PCR-ek körülményeit a 3. táblázat tartalmazza.

A PfuTurbo és Cloned Pfu polimerázzal amplifikált PCR-termékeket 2U Taq DNS-polimerázzal kezeltük, annak érdekében, hogy a tompa 3' végekre adenin kerüljön, ezáltal alkalmassá váljon pCR-XL-TOPO vektorba (Invitrogen) illetve pCR 4-TOPO történő klónozásra. A reakció 72°C-on 15 percen át zajlott.

2. táblázat: Reverz transzkripciókhoz és PCR-ekhez használt oligonukleotidok, szekvenciák és pozíciók

Az F gén restriktációs enzim analíziséhez használt primerek és pozíciók

1. 5'-YGAYTCMATCCGCARGATACAAGGRTCTG-3' (4837-4865)
2. 5'-ATCTGATCGAGGGYATTRTTCCCAAGCCA-3' (6189-6161)
3. 5'-TGAITCWATYCGIARGAIAACAAGRKTCTG-3' (4837-4865)
4. 5'-ATCTGRYCIAGTGTRTTATTTCCCAAGCCA-3' (6189-6161)

Az F gén részleges szekvencia-analíziséhez használt külső primerek és pozíciók

5. 5'-GGGRAAGARAGTGACWTTTGACA-3' (4033-4055)
6. 5'-TKGGATAAWCCRYRGTGACCTC-3' (5064-5042)

Az F gén részleges szekvencia-analíziséhez használt belső primerek és pozíciók

7. 5'-CCYRAATCAYRYGRYRCATAA-3' (4418-4442)
8. 5'-KCRGCRTTYTGKKTGGCTGTAT-3' (4989-4967)

Az F gén *Hin*fl, *Bst*OI és *Rsa*I vágáshelyeinek felderítéséhez használt primerek és pozíciók

9. 5'-GGYGCRYTYATYGGYRTRTRGCTCT-3' (4898-4923)
10. 5'-YTGAGTMTGTGAGTCRTAYARDATAGG-3' (5386-5360)
11. 5'-AAGYTAGGTGTRGGRAAYARYCAAC-3' (5297-5321)
12. 5'-TYATYTRCARTTDGCRAACTGA-3' (5732-5708)
13. 5'-CATTCCCTATGTCCTGGTATTTA-3' (5598-5622)
14. 5'-GTCTTTTGTGTCCTTTGCTT-3' (6147-6125)
15. 5'-CYYTGRAYAARTTRGMRGARAGCA-3' (5973-5996)
16. 5'-ATGABYGAMKHCYGYTRYGGTGA-3' (6413-6390)

Az IT-227/82 galamb PMV-1 törzs 3' végének meghosszabbításához használt linker

17. 5'-AACTCTCAAACGCCGCGCAAAGGAAAA-3'

Az IT-227/82 galamb PMV-1 törzs reverz transzkripciójához használt primerek és pozíciók

18. 5'-TTTTCTTTTGC GCGCGGCTTTGAGAGTT-3'
19. 5'-ACCAAACAGAGAATCCGTAAG-3' (1-21)
20. 5'-TGT GCC AAG ATG GAC TCA TCT AGG ACA AT-3' (3287-3315)
21. 5'-CTTATCAAATTAACGGGGCTG-3' (6749-6769)
22. 5'-GCCATCCTGGCGTTGTTGTTTC-3' (13394-13414)

Az IT-227/82 galamb PMV-1 törzs genomjának amplifikálásához használt primerek és pozíciók

18. 5'-TTTTCTTTTGC GCGCGGCTTTGAGAGTT-3'
23. 5'-TGAGAGCACCTTGCTGAGCGGTTTGT-3' (341-314)
24. 5'-ACGGGTAGAAGGTGTGAATC-3' (56-75)
25. 5'-TC CAT GCT GAT ATT GAG CTG-3' (4604-4623)
26. 5'-TCTTGTGAGCTGGCAATGG-3' (3601-3620)
27. 5'-CACACTCGTCAGGAGCGGTA-3' (8519-8499)
28. 5'-CCTCTAGGTTGTGATATACTGTGC-3' (7147-7170)
29. 5'-TTAGACAAGAGCGTCCCGTGCC-3' (14355-14334)
30. 5'-GATACCTGTTCAAGGAATAGGA-3' (13608-13631)
31. 5'-GGCCACGCGCTGACTAGTACGGIIGGGIIGGGIIG-3'

3. táblázat: PCR-ek során alkalmazott oligonukleotidok, és az amplifikálások körülményei

Az F gén restrikciós enzim analiziséhez alkalmazott primerek és a PCR körülményei

1.-2.	94 °C 3 min, 35x(94 °C 45 s, 53 °C 1 min, 72 °C 2 min), 72 °C 10 min
3.-4.	

Az F gén részleges szekvencia-analiziséhez alkalmazott primerek és a PCR körülményei

5.-6.	94 °C 3 min, 35x(94 °C 45 s, 53 °C 1 min, 72 °C 2 min), 72 °C 10 min
-------	--

Az F gén részleges szekvencia-analiziséhez alkalmazott belső primerek és a PCR körülményei

7.-8.	94 °C 3 min, 20x(94 °C 45 s, 53 °C 1 min, 72 °C 1 min), 72 °C 10 min
-------	--

Az F gén *Hin*fl, *Bst*OI és *Rsa*I vágáshelyeinek felderítéséhez alkalmazott primerek és a PCR körülményei

9.-10.	
11.-12.	94 °C 3 min, 20x(94 °C 45 s, 53 °C 1 min, 72 °C 1 min), 72 °C 10 min
13.-14.	
15.-16.	

Az IT-227/82 gPMV-1 törzs genomjának amplifikálásához alkalmazott primerek és a PCR körülményei

18.-23.	94 °C 3 min, 30x(94 °C 45 s, 61 °C 1 min, 72 °C 1 min) 72 °C 10 min
24.-25.	94 °C 3 min, 30x(94 °C 45 s, 58 °C 1 min, 72 °C 5 min) 72 °C 10 min
26.-27.	94 °C 3 min, 30x(94 °C 45 s, 62 °C 1 min, 72 °C 5 min) 72 °C 10 min
28.-29.	94 °C 3 min, 30x(94 °C 45 s, 62 °C 1 min, 72 °C 8 min) 72 °C 10 min
30.-31.	94 °C 3 min, 30x(94 °C 45 s, 60 °C 1 min, 72 °C 2 min) 72 °C 10 min

4.8. Agaróz gélelektroforézis

A PCR-termékek mennyiségét és méretét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük 2,5%-os, illetve 0,8%-os agaróz (Promega) gélben, melyet 0,5-szörös töménységű TBE-pufferrel készítettünk (Sambrook és mtsai, 1989). A PCR-termékekből 8 µl-t mértünk a gélbe, az elektroforézis 0,5-szörös TBE-pufferben 200 V feszültség mellett történt. A kapott fragmentumok méretének viszonyításához 100 bp-os illetve 1 kbp-os molekulatömeg markert használtunk (Gibco). A gélét az elektroforézist követően 1,5 mg/ml etidium-bromid oldattal festettük, mostuk, majd a DNS-t UV-lámpa segítségével tettük láthatóvá. Arhiváláshoz a gélét Kodak Digital Science DC120 kamerával fényképeztük, melyhez a Kodak Digital Science 1D programot használtuk.

4.9. PCR-termék emésztése restrikciós endonukleázokkal, fizikai térképezés

Az 1.-2. és a 3.-4. oligonukleotid párokkal amplifikált PCR-termékeket *Hin*fl, *Bst*OI és *Rsa*I restrikciós endonukleázokkal emésztettük, külön-külön. Először a PCR-termékeket 1 ml n-butanol hozzáadásával kicsaptuk, majd hidegen 10 percig 16500 g-vel centrifugáltuk. Ezután a pelletet szárítottuk, 18 µl steril desztillált vízben oldottuk, és 3 részre osztottuk. Az emésztés 20 µl-es reakció-térfogatban történt, a reakcióelegy a PCR-terméken kívül a megfelelő restrikciós enzim puffert (Promega), és 8-12 U *Hin*fl, *Bst*OI vagy *Rsa*I (Promega)

enzimet tartalmazott. A reakció 37°C-on 2,5 órán át zajlott. A restriktációs fragmentumok elválasztása agaróz gélelektroforézissel történt a fent említett módon kisebb módosításokkal, a gél 2:1 arányú MetaPhor agaróz (Cambrex Bio Science Rockland, INC.) és Analytical Grade agaróz (Promega) felhasználásával készült, és az elektroforézis időtartama 2,5 h volt. A restriktációs fragmentumokból és vágáshelyekből fizikai térképet szerkesztettünk a Harward Graphics program segítségével.

4.10. PCR-termék tisztítása agaróz gélből

A teljes genom szekvenciájának meghatározásához készült PCR-termékeket elektroforetikus elválasztás után üveg mikroszálás szűrőn (Whatman) keresztül tisztítottuk. A PCR-terméket mérettől függően 2,5%-os illetve 0,8%-os agaróz gélben futtattuk, a gél 1-szeres töménységű TAE-pufferrel készítettük (Sambrook és mtsai, 1989). Az elektroforézis 200 V mellett szintén 1-szeres töménységű TAE-pufferben történt. A gél az elektroforézist követően 1,5 mg/ml ethidium-bromid oldattal festettük, majd a DNS-t UV-lámpa segítségével tettük láthatóvá. Ezután a megfelelő méretű PCR-terméket a gélből kivágtuk, a szűrővel ellátott oszlopra helyeztük, és 3 percen át 4000 g-vel centrifugáltuk. A kinyert PCR-termék mennyiségét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük.

4.11. Klónozás

A 24.-25., 26.-27., és 28.-29. oligonukleotid-párokkal készült PCR-termékeket pCR-XL-TOPO vektorba (Invitrogen), a 18.-23. és 30.-31. primerpárokkal amplifikált PCR-termékeket pCR 4-TOPO vektorba (Invitrogen) klónoztuk agaróz gélből történt tisztítás után. 4 µl tisztított PCR-termékhez 1 µl vektort, és 1 µl - a gyártó által rendelkezésre bocsátott - sóoldatot adtunk, majd az elegyet 5 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezután a pCR-XL-TOPO vektor esetén 1 µl stop-oldatot (Invitrogen) adtunk a ligátumhoz. A ligátumból pCR-XL-TOPO, illetve pCR 4-TOPO vektor alkalmazása esetén 6, illetve 2 µl-t adtunk TOP 10 kompetens *E. coli* baktériumtörzshöz (Invitrogen), és az elegyet jégén tartottuk 45 percen keresztül. Ezután a TOP 10 kompetens *E. coli*t hősokknak tettük ki 42°C-on 3 percen keresztül, rázógépből 37°C-on 1,5 órán át növesztettük, majd a transzformált baktériumtörzset 50 µg/ml kanamycint tartalmazó LB-táptalajon (Sambrook és mtsai, 1989) növesztettük egy éjszakán keresztül.

4.12. Rekombináns plazmidok tisztítása

A rekombináns plazmidok tisztításához a QIAprep Spin Miniprep kitet (QIAGEN) alkalmaztuk. A kanamycin antibiotikumot tartalmazó táptalajon felnőtt baktériumtelepeket 5 ml LB-táptalajban (Sambrook és mtsai, 1989) 1 éjszakán keresztül növesztettük, majd másnap eppendorf-csőben kétszer 1,5 ml baktériumkultúrát centrifugáltunk 16500 g mellett 5 percig. A felülúszó eltávolítása után a baktériumokat 250 µl P1 pufferben (QIAGEN) szuszpendáltuk, majd a sejteket 250 µl P2 puffer (QIAGEN) hozzáadásával tártuk fel. Az elegyhez 350 µl N3 puffert (QIAGEN) mértünk, majd 17000 g mellett 10 percig szobahőmérsékleten centrifugáltuk. A felülúszót ezután a gyártó által rendelkezésre bocsátott oszlopra mértük, és 17000 g mellett 30 s-ig centrifugáltuk. Az oszlopot 0,5 ml PB pufferrel (QIAGEN) mostuk, és a centrifugálást az előzőek szerint ismételtük. Ezután az oszlopot 0,75 ml PE pufferrel (QIAGEN) mostuk, és ismét centrifugáltuk 30 s-ig 17000 g mellett. Az oszlopot további 1 perces centrifugálással szárítottuk, 50 µl steril vizet mértünk rá, és a plazmidot 1 perces, 17000 g mellett történő centrifugálással eppendorf csőbe eluáltuk. A plazmid méretét és mennyiségét 0,8%-os TBE-gélben agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük.

4.13. Szekvenálás

A 7.-8., 9.-10., 11.-12., 13.-14. és 15.-16. oligonukleotidok segítségével felszorzozott PCR-termékek direkt szekvenálása mindkét irányból bémunka keretében a gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpontban, és a németországi Genotype GmbH cégnél történt.

A rekombináns plazmidok inszertjeinek szekvenálása „primer walking” technikával történt a Genotype GmbH és a Medigenomics cégeknél, a szekvenáláshoz szükséges oligonukleotidok tervezésével és szintézisével együtt.

4.14. Szekvenacia- és filogenetikai analízis

A szekvenálás eredményét vizuálisan ellenőriztük az esetleges hibák kiszűrése végett, és szükség esetén a szekvenációkat a Lasergene programcsomag (DNASTAR Inc, Madison, WI, USA) EditSeq programjával szerkesztettük. A szekvenációk illesztéséhez a - szintén a Lasergene programcsomaghhoz tartozó - Megalign programot használtuk, mely a Clustal algoritmust alkalmazza (Higgins és Sharp, 1989). A módszer lehetőséget nyújtott a törzsek közötti genetikai távolság meghatározására, és a nukleinsav szekvenációkból származtatott

aminosav szekvenciák elemzésére. A SeqPup program segítségével az illesztett szekvenciákat tartalmazó fájl formátumát msf-re változtattuk. A filogenetikai fát a *TREECON for Windows 1.1* verziójával (Van de Peer és De Wachter, 1994) konstruáltuk, melyhez a távolság mátrix alapú neighbor-joining algoritmust (Saitou és Nei, 1987) alkalmaztuk. Az evolúciós távolság alulbecslésének kiküszöbölése érdekében a Kimura két-paraméteres korrekciós modellt (Kimura, 1980) alkalmaztuk, mely különbözőképpen értékeli a statisztikailag gyakrabban előforduló tranzíciót (purin-purin, illetve pirimidin-pirimidin csere), és a ritkábban bekövetkező transzverziót (purin-pirimidin, illetve pirimidin-purin csere). A törzsfák megbízhatóságát 100 „bootstrap” értékkel ellenőriztük (Felsenstein, 1985).

5. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁS

5.1. Galamb-NDV törzsek csoportosítása az F gén részleges nukleotid-sorrendje alapján

5.1.1. Filogenetikai analízis

A galamb eredetű NDV törzsek F génjének filogenetikai analíziséhez 68 reprezentatív izolátumot választottunk ki azok *Hinf*I, *Bst*OI és *Rsa*I restrikciós endonukleázokkal történt emésztéssel adott mintázata alapján (részletesen lásd az „5.2. Galamb-NDV törzsek csoportosítása az F gén restrikciós endonukleáz analízise alapján” című fejezetet).

Az izolátumok többsége házigalambból, néhányuk vadon élő galambból, díszmadárból, baromfiból és fácánból származik. A vizsgálati anyag az 1978 és 2002 közötti időszakot öleli fel, és a törzseket három földrészről, összesen 16 országban izolálták.

A galamb-NDV izolátumok filogenetikai vizsgálatához a korábban már egyéb NDV törzsek analíziséhez kiválasztott szakaszt, az F gén egy variábilis régióját (F gén 47.-420. nt) alkalmaztuk. A filogenetikai analízishez alkalmazott szakaszt több szempont alapján választottuk ki. Mivel vizsgálataink tárgya gyorsan divergálódó RNS-vírus, és célunk a vírustörzsek közötti finomabb különbségek kimutatása volt, kézenfekvő módon variábilis régiót választottunk. Az F gén 47.-420. nt közötti szakaszának további előnye, hogy a génbankban (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) elhelyezett nagy mennyiségű NDV szekvencia segítségével eredményeink több, ugyanezen szakaszt vizsgáló kutatócsoport adataival is összevethetők és kiegészíthetők. Kérdésként merülhet fel, hogy rokonsági kapcsolatok feltárására alkalmas-e a filogenetikai vizsgálatokhoz kiválasztott gén, megfelel-e a kijelölt régió, annak hosszúsága, illetve reprezentálja-e az egész genomot a választott szakasz. A kérdés megválaszolását számos vizsgálat célozta direkt, vagy indirekt módon NDV esetében is. Az F, HN (Sakaguchi és mtsai, 1989; Toyoda és mtsai, 1989) és M gének (Seal, 1995) teljes hossza alapján készült filogenetikai fák, és a laboratóriumunkban részleges F gén alapján konstruált fák hasonló topológiával rendelkeztek (Wehmann, 2000). Annak igazolására, hogy az általunk filogenetikai vizsgálatokhoz alkalmazott szakasz jól reprezentálja-e az NDV törzsek közötti rokonsági viszonyokat, laboratóriumunkban is történtek kísérletek. Kutatócsoportunk egyik tagja genotípusonként néhány reprezentatív törzs esetében az F gén variábilis részén kívül egy konzervatívabb régiót (F gén 1226.-1503. nt) is filogenetikai vizsgálatnak vetett alá. A különböző szakaszok alapján konstruált filogenetikai fák hasonló elágazásrendszerrel rendelkeztek, bár – nem meglepő módon - a variábilis régió

elemzésével kapott fán nagyobb ághosszúságok voltak tapasztalhatók (Wehmann, 2000). Témacsoportunk egy másik tagja az NDV további öt génjének részleges szekvencián alapuló filogenetikai analizisét végezte el annak megállapítására, hogy a fúziós fehérje (F) génjével feltárt genetikai csoportokat (genotípusok és altípusok) a többi génfa reprodukálja-e. Eredményei azt mutatták, hogy az NDV bármely génjének szinte bármely szakasza alkalmas ugyanazon rokonsági viszonyok reprodukálására (Czeglédi, 2007).

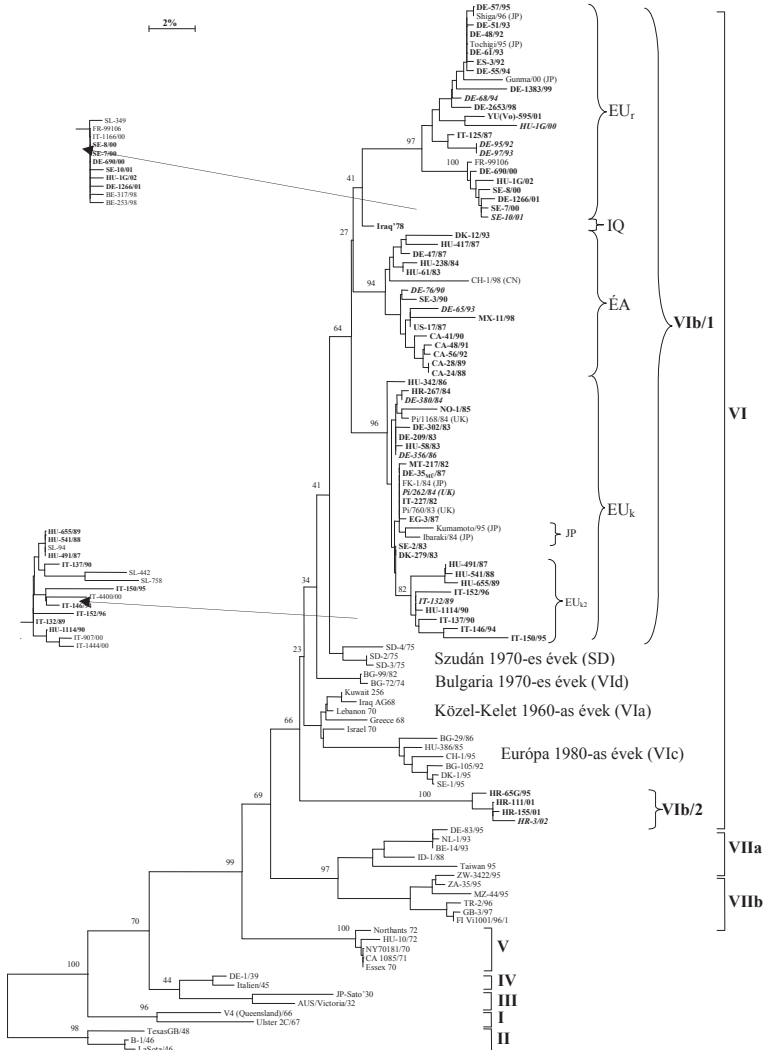
A filogenetikai vizsgálatokhoz a vírus RNS-extrakcióját követően az RNS-t reverz transzkripció során random hexamer segítségével cDNS-sé írtuk át. Ezután a cDNS-t a klasszikus NDV törzsekre tervezett 5.-6. degenerált oligonukleotid-párokkal sokszoroztuk fel, melynek eredményeként egy 1032 bp hosszúságú PCR-terméket nyertünk. Ezt a PCR-terméket 50-szeresre hígítottuk, és szintén klasszikus NDV törzsekre tervezett belső, 7.-8. degenerált primerek segítségével fészkes PCR-reakció keretében egy 572 bp-os szakaszt amplifikáltuk. A fészkes PCR segítségével egyrészt nagyobb mennyiségű, másrészt specifikusabb terméket nyertünk. Az így kapott PCR-terméket gélből való tisztítás után bér munka keretében szekvenáltattuk mindkét irányból elindulva. A szekvenciákat vizuálisan ellenőriztük, szükség esetén szerkesztettük, illesztettük, és végül az F gén 47.-420. nt közötti szakasz felhasználásával filogenetikai fát generáltunk. A fa megbízhatóságát 100 „bootstrap” értékkel ellenőriztük. A vizsgált törzsek adatait, szekvenciájuk génbanki elérhetőségét, és a filogenetikai vizsgálatok alapján történt csoportosításukat a 4. táblázat tartalmazza.

4. Táblázat: Galamb-NDV törzsek csoportosítása filogenetikai analízissel

A galamb-NDV törzs elnevezése		Gazda	Mke	Szekvencia	Génbanki szám
Elnevezés	Eredeti elnevezés				
Iraq/78	BVC/78	galamb	P	IQ	AY150092
IT-227/82	25/01.03./1982	galamb	P	EU _{k1}	AY150093
MT-217/82	KS 286/1982	galamb		EU _{k1}	AY150094
DE-209/83	1377/1983	galamb		EU _{k1}	AY150095
DE-302/83	VG 71/1/73	galamb		EU _{k1}	AY150096
DK-279/83	PD-992/1983	galamb	P	EU _{k1}	AY150097
HU-58/83	V 14506/1983	galamb	P	EU _{k1}	AY150098
HU-61/83	14736/1983	galamb	P	ÉA ₂	AY150099
SE-2/83	V 2683/1983	galamb	P	EU _{k1}	AY150100
DE-380/84	WNK/1984	csirke		EU _{k1}	AY150101
HR-267/84	V 509/1984	galamb		EU _{k1}	AY150102
HU-238/84	15347/1984	galamb	P	ÉA ₂	AY150103
Pi/262/84 (GB)	PD 298/1984	csirke		EU _{k1}	AY150104
NO-1/85	F 1084/1985	galamb	P	EU _{k1}	AY150105
DE-356/86	1390/1986	papagáj		EU _{k1}	AY150106
HU-342/86	18183/1986	galamb	P	EU _{k1}	AY150107
DE _{MO} -33/87	626/2/1987	galamb	P	EU _{k1}	AY150109
DE-47/87	G 242/1987	galamb	P	ÉA ₂	AY150110
EG-3/<87	Ae 23<1987	galamb	P	EU _{k1}	AY150111
HU-417/87	V 23/1987	galamb		ÉA ₂	AY150113
HU-491/87	V 96/1987	galamb	P	EU _{k2}	AY150114
IT-125/87	76 (Udine)/1987	galamb (hobbi)	P	EU _{re2}	AY150115
US-17/87	MN 2446/88/1987	galamb		ÉA ₁	AY150116
CA-24/88	V 3754/1988	galamb		ÉA ₁	AY150117
HU-541/88	481/1988	galamb		EU _{k2}	AY150118
CA-28/89	V 6773/1989	galamb		ÉA ₁	AY150119
HU-655/89	597/1989	galamb		EU _{k2}	AY150120
IT-132/89	39 (Vicenza)/1989	gerle	P	EU _{k2}	AY150121
CA-41/90	V 9948/1990	galamb		ÉA ₁	AY150122
IT-137/90	108 (Padova)/1990	galamb (hobbi)	P	EU _{k2}	AY150125
SE-3/90	VF 66/1990	galamb	P	ÉA ₁	AY150126
HU-1114/90	HU-1114/90	galamb		EU _{k2}	AY252120
DE-72/90	KP 87b/1990	papagáj		EU _{k1}	AY150123
DE-76/90	KP 232a/1990	papagáj		ÉA ₁	AY150124
CA-48/91	V 14274/1991	galamb		ÉA ₁	AY150127
CA-56/92	V 20337/1992	galamb		ÉA ₁	AY150128
DE-48/92	R 8/1992	galamb	P	EU _{re1}	AY150129
DE-95/92	UP 3488/1992	kakadu		EU _{re2}	AY150130
ES-3/92	4436/1992	galamb	P	EU _{re1}	AY150132
DE-51/93	R 67/1993	galamb	P	EU _{re1}	AY150133
DE-61/93	R 6/1993	csirke	P	EU _{re1}	AY150135
DE-65/93	R 165/1993	kacsa (hízó)	P	ÉA ₁	AY150136
DE-97/93	UP 697/1993	kakadu		EU _{re2}	AY150137
DK-12/93	181731-4/1993	galamb		ÉA ₂	AY150138

A galamb-NDV törzs elnevezése		Gazda	Mke	Szekvencia	Génbanki szám
Elnevezés	Eredeti elnevezés				
DE-55/94	R 205	galamb	P-szerű	EU _{re1}	AY150140
DE-68/94	R 12 ⁶	csirke (hobby)	P	EU _{re1}	AY150141
IT-146/94	58 (Savona) ³	galamb	P	EU _{k2}	AY150142
DE-57/95	R 171 ⁶	galamb	P	EU _{re1}	AY150143
IT-150/95	273 (Teramo) ³	galamb	P	EU _{k2}	AY150145
IT-151/95	364 (Verona) ³	fácán	P	EU _{k2}	AY150146
HR-65/95			P-negatív	VIb/2	AY150144
IT-152/96	12 (Vicenza) ³	gerle	P	EU _{k2}	AY150147
IT-153/96	219 (Vicenza) ³	galamb (hobby)	P	EU _{k2}	AY150148
MX-11/98	220 ⁷	galamb		ÉA ₁	AY150152
DE-2653/98				EU _{re1}	AY150149
DE-1383/99				EU _{re1}	AY150153
DE-690/00				EU _{re2}	AY150154
HU-1G/00	Gal 1/00 ¹	gerle		EU _{re2}	AY150155
SE-6/00	IF 84 ²	galamb (szabadon élő)	P	EU _{re2}	AY150156
SE-7/00	IF 96 ²	galamb (szabadon élő)	P	EU _{re2}	AY150157
SE-8/00	IF 97 ²	galamb (szabadon élő)	P	EU _{re2}	AY150158
DE-1266/01				EU _{re2}	AY150160
SE-10/01	IF 11 ²	csirke	P	EU _{re2}	AY150161
HR-111/01			P-negatív	VIb/2	AY150162
HR-155/01			P-negatív	VIb/2	AY150163
YU(Vo)-595/01	595/2001	galamb (szabadon élő)		EU _{re2}	AY150164
HR-3/02	3/2002	gerle	P-negatív	VIb/2	AY150165
HU-1/02				EU _{re2}	AY190518

A szekvencia-vizsgálat alapján a galamb-NDV törzsek zöme *egyetlen genetikai ághoz, a VIb/1-hez* tartozik a csirkék NDV törzseinek VI. genotípusán (Ballagi-Pordány és mtsai, 1996; Lomniczi és mtsai, 1998; Czeglédi és mtsai, 2002) belül (4. ábra). Néhány, egymástól független, galambokat érintő járványból származó horvátországi törzs azonban egy nagyon divergált, *a VIb/1-gyel polifiletikus viszonyban lévő csoportot* alkot, melyet önkényesen *VIb/2-nek* neveztünk el (4. ábra). A dendrogram alapján a VIb/1 csoporton belül négy alcsoport különíthető el egymástól a törzsek izolálásának ideje és/vagy földrajzi eredete szerint, ezeket önkényesen *iraki (IQ), észak-amerikai (ÉA), korai európai (EU_k), és recens európai (EU_r)* csoportoknak neveztük el.



4. ábra. A filogenetikai fa a gPMV-1 és egyéb NDV törzsek rokonsági viszonyait szemlélteti az F gén 47.-420. nt közötti szakaszát alapul véve. Az ághosszak a törzsek közötti genetikai távolsággal arányosak %-ban mérve. Az általunk szelvényelt törzsek neveit vastagon, a nem házigalambból származó izolátumok neveit ferdén szedtük. A VI-tól különböző genotípusokból csak néhány reprezentatív törzset mutatunk. A genotípusokat és szubtípusokat az ábra jobb oldalán tüntettük fel.

Az Irak'78 törzs a filogenetikai analízis alapján az IQ alcsoport egyetlen ismert tagja, a legkorábbi galamb-NDV törzs, Irakban galambok vírusos encephalomyelitisre kapcsán herpeszvírussal együtt izolálták (Tantawi és mtsai, 1979; Kaleta és mtsai, 1985). A galamb-NDV izolátumok jelentős részét az 1980-as évek első felében, Európában izolálták, e törzseket a származási idejük és helyük miatt EU_k csoportnak neveztük el. Ez a csoport tehető felelőssé az Európában a 80-as évek elején kezdődő, galambokat érintő kiterjedt járványért. Az EU_k csoporton belül további két variáns különíthető el, az EU_{k1} és az EU_{k2}. Az EU_{k1} variánshoz a járvány korai, főként 1985 előtti időszakából származó európai (brit, dán, horvát, magyar, máltai, német, norvég, olasz, svéd) izolátumok tartoznak (részletesen lásd a 4. táblázatot), azonban a csoport tartalmaz egyiptomi és japán (Mase és mtsai, 2002) törzseket is. A japán izolátumok közül kettő (FK-1/84 és Nagano-8/84) számos Európában izolált vírussal, köztük az EU_k alcsoport legkorábbi tagjával, az IT-227/82-vel is identikus, mely már a járvány kezdetén direkt epidemiológiai kapcsolatot feltételez Európa és Japán között. A járvány elején, 1984-ben Észak-Amerikában izolált törzsek (Pearson és mtsai, 1987) (galamb/US(NY)/84 (EF520716), és galamb/US(MD)/3981/84 (AY008326)) az általunk vizsgált szakasszal egészben vagy részben (F gén 97.-130. nt) átfedő szekvenciájuk alapján szintén az EU_{k1} variánshoz tartoznak.

A diverzifikáció erőteljesebb jelei a 80-as évek vége felé két kládnál is mutatkoznak. Ezek egyike az EU_k alcsoporton belül az EU_{k2}-nek nevezett variáns, melyhez 1986 és 1996 között izolált magyarországi és olaszországi törzseken kívül - az általunk vizsgált szakasszal átfedő génbanki szekvenciájuk alapján - néhány szlovén izolátum (Barlic-Maganja és mtsai, 2005) és 2000-ben izolált olaszországi törzsek (Terregino és mtsai, 2003) is tartoznak (4. ábra). Az EU_{k2} variánshoz tartozó vírusok a mai napig jelen vannak a régióban.

A másik, jelentős diverzitást mutató csoportot Japánban, 1984 és 2000 között izolált törzsek alkotják (Mase és mtsai, 2002), ezt a variánst a törzsfán JP-vel jelöltük.

Az Észak-Amerikából (Kanada és az Egyesült Államok), Mexikóból, illetve néhány európai országból (Németország és Svédország) származó izolátumok az ÉA₁ variánshoz tartoznak a VIb/1 szubtípus ÉA alcsoportján belül. Az ÉA₁ variánshoz tartozó kanadai és amerikai izolátumok között nyilvánvaló járványtani kapcsolat áll fenn, ahogy azt korábban is leírták (Ide, 1987).

Néhány törzs - melyeket Európában (Dánia, Németország és Magyarország), illetve Kínában (CH-1/98) izoláltak - az ÉA alcsoport ÉA₂ variánsához tartozik. Bár ez utóbbi, ÉA₂ variáns nem tartalmaz „valódi” észak-amerikai izolátumokat, és kezelhetnének az ÉA alcsoporttól különálló, egyedi, jellemzőbb elnevezéssel bíró monofiletikus csoportként is,

azonban az ide sorolt törzsek RE-analízissel nyert mintázata (lásd az „5.2.2. RE-analízissel vizsgált galamb-NDV törzsek és csoportosításuk” című fejezetet), illetve F fehérjéjük aminosav-szubsztitúciós vizsgálatának eredményei (lásd az „5.1.2. Aminosav szubsztitúciós analízis” című fejezetet) alapján indokoltnak tartjuk az ÉA alcsoport egyik variánsaként kezelni. Az ÉA alcsoportot, és a járványért felelős EU_k alcsoportot összehasonlítva észrevehető, hogy már a járvány elejéről, 1983-ból származó izolátumok genetikai távolsága viszonylag nagy, 4,2-5,4% közötti (HU-61/83 távolsága az EU_k törzsekkel szemben) (5. táblázat), ami azt mutatja, hogy különböző genetikai vonalakhoz tartozó galamb-NDV vírusok cirkulálnak szimultán a járvány kitörése óta.

Az EU_r alcsoportba a 1987 és 2002 közötti időszakból, Európából (Magyarország, Németország, Olaszország, a volt Jugoszlávia területe és Svédország) származó törzseken kívül génbanki szekvenciájuk alapján Franciaországban és Japánban izolált galamb-NDV törzsek is tartoznak. Az általunk vizsgált szakasszal részben átfedő (196 nt) génbanki szekvenciája alapján néhány belga (Meulemans és mtsai, 2002), szlovén (Barlic-Maganja és mtsai, 2005), és egy 2000-ben izolált olasz törzs (Terregino és mtsai, 2003) is ebbe az alcsoportba sorolható (4. ábra). Megemlítendő, hogy Svédországban, ahol a baromfit nem vakcinázzák NDV ellen, a csirkék nagy arányban bizonyultak NDV-szeropozitívnak, később a régióban galambokból, a csirkékben talált vírusokkal közeli rokonságot mutató (<0,5%-os távolság) törzseket izoláltak, mely a galamb-NDV csirkére való átmenetét jelzi (Czifra, nem közölt eredmények). Ennek az egyedi vírusnak a gyors terjedését mutatja Franciaországban, Németországban és Magyarországon történt 2002-es előfordulása.

A VIb/2 kládhoz csupán három izolátum tartozik, mindegyik Horvátországból származik. A csoporthoz tartozó házi-, és szabadon élő galambból, valamint vadgalambból izolált kisszámú törzs mindegyike tipikus „galamb-PMV betegség” eredményezett, azonban nem mutatták a gPMV-1 törzsekre jellemző monoklonális ellenanyagokhoz való affinitást (P csoport).

5. táblázat: A gPMV-1 törzsek és VI. genotípusú NDV törzsek genetikai távolsága (%)

Alcsoport	Vlb/1					Vlb/2	NDV		
	IQ	EU _{k1}	EU _{k2}	ÉA	EU _r		SD	Vla	Vlc
IQ	0								
EU _{k1}	2,5-4,2	0-2,5							
EU _{k2}	4,7-5,3	0,8-6,5	0,3-5,0						
ÉA	3,3-6,2	3,6-7,7	4,7-11,4	0-7,0					
EU _r	3,6-7,1	5,3-10,0	6,8-11,5	5,3-10,5	0-6,8				
Vlb/2	10,0-11,0	10,3-13,7	11,9-14,7	10,6-15,0	10,9-14,7	0,3-2,2			
SD	3,3-3,6	3,6-6,3	4,7-9,6	4,2-8,0	6,2-9,6	10,3-12,3	0,3-2,7		
Vla	3,6-5,0	4,5-7,2	5,6-11,2	5,3-9,0	6,8-11,2	9,4-11,3	2,5-4,8	0,5-2,7	
Vlc	6,5-7,4	8,0-10,9	9,3-13,9	7,7-11,8	10,5-14,2	11,2-13,6	6,8-8,0	4,7-6,8	1,1-3,9

5.1.2. Aminosav szubsztitúciós analízis

A filogenetikai vizsgálat alapján meghatározott csoportokat nem csupán megerősítette, hanem finomította is egy további vizsgálat, az aminosav-szubsztitúciós analízis, mely szintén az F gén 47.-420. nt közötti szakaszára irányult. A nt szekvenciákból származtatott aminosav (továbbiakban as) szekvenciákat Megalign programmal hoztuk létre, a konszenzus aszszekvenciát a legkorábbi VI. genotípusú csoport, a Vla tagjainak fehérjeszekvenciájából generáltuk. A dendrogramon tapasztalt elkülönülésekkel egyetértésben a klasszikus VI. genotípusú törzsekhez viszonyítva a galamb-NDV törzseknél egyrészt Vlb, másrészt alcsoport-specifikus mutációk vannak jelen. Ezek a mutációk lehetnek nem-szinonimek és szinonimek, azaz as változást okoznak, illetve nem okoznak. Az 5. ábra a Vlb szubtípus alcsoportjainak és variánsainak néhány reprezentatív törzsét, és azok as mintázatát mutatja. A szinonim – vagyis a különböző tripletek által kódolt, kémiaiilag azonos – as-akat az egyes pozíciókban „*“ jellel különböztetjük meg.

A V1b (V1b/1 és V1b/2) szubtypust az A₇₅A*-ot eredményező szinonim nt-változás (GCG helyett GCA triplet) különbözteti meg a klasszikus, csirke eredetű VI. genotípusú törzsektől. A V1b/1 csoport tagjai az egyéb VI. genotípusú törzsektől két további változás, a C₂₇C*-ot (TGT helyett TGC kodon a kanadai izolátumok, és a DE-65/93 törzs kivételével) és a P₆₇P*-ot (CCA helyett CCG) eredményező szinonim nt-cserék alapján különböztethetők meg. A V1b/2 csoport a VI. genotípusú csirke NDV törzsektől a C₂₇R és az R₁₁₂K as cserék alapján különböztethető meg, a 112. pozícióban levő lizint (K) nemcsak VI. genotípusú, de egyetlen más genotípushoz tartozó törzs esetében sem észleltük.

Szinonim és nem-szinonim mutációk alapján a V1b/1 szubtypus alcsoportjai között további különbségek tapasztalhatók. Az EU_k alcsoportot az M₁₄T, és néhány törzs kivételével az I₁₉T és az R₁₁₂G as szubsztitúciók különítik el a többi háromtól. Korábban a gPMV-1 törzsek karakterizálására a 112. pozícióban lévő R→G as cserét jelölték meg (Collins és mtsai, 1994), azonban a 112. pozícióban lévő glicin kizárólag az EU_k alcsoport jellemzője a V1b/1 szubtypuson belül. Ráadásul a glicint más-más triplet kódolja az EU_k két variánsánál, GGG az EU_{k1}, és GGA az EU_{k2} esetében. Az EU_{k2} variánst az EU_{k1}-től az R₈M as szubsztitúció különbözteti meg.

Az ÉA alcsoport két kanadai izolátum kivételével az L₁₃P illetve a G₁₁₁E as cserékkel jellemezhető, míg két variánsa, az ÉA₁ és ÉA₂ az L₂₈Q, illetve L₂₈P as szubsztitúciók alapján különböztethető meg egymástól. Az ÉA és EU_r alcsoportok közös jellemzője a V₅₀I as csere. Az EU_r alcsoportot az M₂₀T* as szubsztitúció, illetve az E₈₂E*-ot (GAA helyett GAG kodon), a K₁₁₅K*-ot (AAA helyett AAG) és az I₁₂₂I*-ot (ATC helyett ATA) eredményező szinonim mutációk különböztetik meg a többi háromtól. Az A₄₉V, a G₁₁₁V és a Q₁₁₄K as cserék az EU_r alcsoport EU_{r1} variánsát különböztetik meg az EU_{r2} variánstól.

Mivel NDV-vel foglalkozó más kutatócsoportok sok esetben nem pontosan az általunk szekvenált szakaszt vizsgálják, hanem csupán az F fehérjén lévő proteolitikus vágáshely szekvenciájára (as 112.-117.), és közvetlen környezetére koncentrálnak, érdemes külön megemlíteni a galamb-NDV törzsekre jellemző, proteolitikus vágáshelyet érintő as szubsztitúciókat, és szinonim mutációkat. A V1b/1 szubtypus tagjai könnyen azonosíthatók a 113. as-at kódoló triplet vizsgálatával, a VI. genotípusban lévő AGA helyett AGG szekvencia található a V1b/1 törzsekben, mely mutáció as cserét nem okoz. A V1b/1 szubtypus EU_k alcsoportjánál egyetlen törzs kivételével a 112. pozícióban glicin szerepel a többi alcsoport lizinjével szemben, amelyet az EU_{k1} variánsnál GGG, az EU_{k2} variáns esetében GGA triplet kódol. Szintén a V1b/1 szubtypuson belül az EU_r alcsoportnál egy további szinonim mutációval találkozunk a V1b/1 specifikus, 113. pozícióban elhelyezkedő as-at érintő

szinonim mutáción kívül, az egyéb alcsoportokban lévő AAA helyett AAG triplet szerepel itt, mindkét kodon lizint (K) kódol a 115. pozícióban. Az EU_r alcsoport EU_{r1} variánsa a fenti két szinonim mutáción túl egy újabbat is hordoz, mely a 115. pozícióban lévő glutamin (Q) helyett lizint (K) kódol. Az ÉA alcsoport törzsei a 111. pozícióban lévő glutaminsavval azonosíthatók, mely aminosav ugyan nem tartozik a proteolitikus vágáshelyhez, azonban feltételezhető, hogy a vágáshelyet kódoló nt-sorrend meghatározásával a közvetlen szomszédságba eső szekvenciára is szert tettünk, így vizsgálni is tudjuk azt. Ebből a feltételezésből kiindulva érdemes megemlíteni az EU_{r1} variáns szintén 111. pozícióban lévő, nem szinonim mutáció következtében kialakuló valint (V), mely további segítséget nyújt egy gPMV-1 törzs EU_{r1} variánsként történő azonosításában. A V1b/2 csoport a 112. pozícióban arginin (R) helyett lizint (K) hordoz, mely a mai napig elérhető szekvencia adatok alapján egyedülálló a V1b/2 csoportnál az NDV-n belül.

5.1.3. A gPMV-1 törzsek evolúciójával és eredetével kapcsolatos megállapítások

Annak ellenére, hogy a V1b/1 és V1b/2 csoportok legdivergáltabb tagjai közötti genetikai távolság eléri a 15%-ot, mindkét szubtípus a VI genotípushoz tartozó NDV őskötől származik. A V1b/1 csoporton belül maximálisan 11,5%-os szekvencia divergenciát tapasztaltunk (IT-150/95 és HU-1G/00 között), azonban több bizonyíték is a csoporthoz tartozó izolátumok monofiletikus eredete mellett szól:

- A dendrogram alapján ezek a törzsek mindannyian egy diszkrét genetikai vonalhoz tartoznak (bootstrap érték 64%).
- A VI. genotípusú klasszikus NDV törzsek és a gPMV-1 törzsek F génjét összehasonlítva a vizsgált régióban három V1b/1 csoportspecifikus mutációt találtunk (T₈₁C, A₂₀₁C és G₂₂₅A), ezek aminosav változást nem okoztak (C₂₇C*, P₆₇P* és A₇₅A*).
- A galamb-NDV törzsek restrikciós analízise során (részletesen lásd a „5.2. Galamb-NDV törzsek csoportosítása az F gén restrikciós endonukleáz analízise alapján” című fejezetet) megállapítottuk, hogy a V1b/1 csoport törzseiben hiányzik az 1601. pozícióban a BstOI vágáshely, és ezt minden vizsgált esetben ugyanaz a nt-változás okozza (CC[↓]TGG→CTTGG).

A homológ as-ak közös szerzett jegyek tekinthetők, segítségükkel betekintést nyerhetünk a különböző genetikai vonalak rokonsági és időbeni viszonyaiba. Annak

érdekében, hogy meghatározzuk a galamb-NDV törzsek földrajzi eredetét, összehasonlítottuk az F polipeptid részleges (1.-124. as) szekvenciáját gPMV-1 törzsek, és négy különböző, jól körvonalazott VI. genotípusú genetikai vonal esetében (5. ábra).

A VIa csoportba tartoznak a legkorábbi VI. genotípusú NDV törzsek, melyeket a Közel-Keleten, csirkék közt dúló NDV járványok kapcsán izoláltak a 60-as évek végén. Az SD vírusok Szudánból, míg a BG (VI_d) szubtípus tagjai Bulgáriából származnak a 70-es évek közepéről, mindkét csoport egy nagyobb észak-kelet afrikai vonalhoz tartozik, mely egyiptomi és etiópiai izolátumokat is magába foglal (Wehmann, 2000). A VIc csoportba a 80-as években, illetve azután Kelet- és Nyugat-Európában sporadikus esetek kapcsán izolált törzsek tartoznak (Czeglédi és mtsai, 2002).

A konszenzus as-szekvenciát – mint már említettem - a legkorábbi VI. genotípusú csoport, a VIa tagjainak fehérjeszekvenciájából generáltuk. Célunk az volt, hogy homológ aspozíciókat, vagyis közös szerzett jegyeket találjunk a VIb, és bármely egyéb VI. genotípusú genetikai vonal között. Két szinonim nt-csere (T₅₈T* és D₇₂D*) a gPMV-1 törzseknel és az SD csoportnál egyaránt tapasztalható (5. ábra). Az L₂₁L*, a C₂₅C*, az S₁₀₇S* és az R₁₁₃R* változások jellemzőek a VIb/1 szubtípuson kívül az SD és BG (VI_d) csoportra is. A 107. pozícióban lévő, TCT triplet által kódolt szerin (S) egyedi a VI. genotípusú klasszikus csirke eredetű törzsekben, az I-V. genotípusú törzsekben treonin (T), míg a VIIa és VIIb genotípusokban a TCC kodon által meghatározott szerin (S*) van jelen (Herczeg és mtsai, 1999). Érdekes módon a VIb/1 és VIb/2 csoportokban is a VII. genotípusnál tapasztalt TCC triplet által kódolt S* szerepel a 107. pozícióban, szemben a VI. genotípusú csirke eredetű törzsek TCT nt-sorrend által meghatározott szerinjével. A galamb-NDV törzsek, és egyéb VI. genotípusú genetikai vonalak homológ as pozíciói, a filogenetikai fa leágazása, és a genetikai távolságok is arra utalnak, hogy a négy VI. genotípusú alcsoport közül az SD csoportnak van időben a legközelebbi közös őse a VIb/1 csoporttal.

A filogenetikai és aminosav szubsztitúciós vizsgálatokon túl járványtani megfigyelések is alátámasztják a galamb-NDV északkelet-afrikai eredetét. A legelső ismert galamb-NDV izolátumot, az Irak'78-at herpeszvírussal együtt izolálták encephalomyelitis tüneteit mutató galambból. Ez a tény feljogosít arra, hogy újragondoljuk a korábbi feltételezést, mely szerint herpeszvírus okozta a galamb encephalomyelitis-ét. A legkorábbi ismert gPMV-1 törzs iraki származása azt sugallta, hogy a betegség eredete a Közel-Keleten keresendő (Kaleta és mtsai, 1985). Valójában a gazdaváltási eseményt ahhoz a területhez kell kötnünk, ahol a VI. genotípus enzootiás fertőzést tartott fenn a csirke populációban, valamint adott volt a csirkék és galambok érintkezése. A hagyományos galambtenyésztés, – elsősorban, mint élelmiszer –

és az intenzív élőmadár kereskedelem olyan faktorok, melyek megkönnyítik a kórokozó fajok közötti átmenetét. Valójában az egyik legelső, gPMV-1 fertőzésnek tulajdonított járvány 1982-ben, Szudánban tört ki, és gyorsan terjedt a galambok között (Eisa és Omer, 1984; Ballouh és mtsai, 1985). Habár egy szudáni galamb izolátum Mke vizsgálatok alapján átmenetet képez az NDV és a tipikus gPMV-1 között (Alexander és mtsai, 1985), a törzs genetikai kapcsolatát más gPMV-1 törzsekkel nem derítették fel. A járványtani megfigyelések, a filogenetikai vizsgálatok, kiegészítve az as szubsztitúciós analízissel bizonyítják, hogy *a galamb specifikus NDV V1b/1 típusa Északkelet-Afrikában alakult ki. Az általunk vizsgált asak, mint közös szerzett jegyek a V1b/1 szubtypust az SD vonalhoz kötik, sokkal inkább, mint a közel-keleti (V1a) kládhoz.*

A galambok között önállóan terjedő PMV-1 fertőzés számos kérdést vet fel, nevezetesen hogy hol, mikor és hányszor történt meg a vírus csirkeről galambra történő átmenete, illetve ez az átmenet házi vagy vadgalambokat érintett-e. A V1b/1 és V1b/2 csoportok polifiletikus viszonya arra utal, hogy a vírus *csirke→galamb gazdaváltása* a VI. genotípuson belül *legalább kétszer megtörtént*. Nem világos azonban, hogy a gazdaváltás természetes fertőzés során jött létre fertőzött csirkek és szabadon élő galambok között, vagy emberi közreműködés nyomán fertőzött csirkek és háziastított galambok között a két faj ház körüli együtt tartása és élő-állat piacok közvetítésével.

Habár a V1b/2 vírusok elterjedtsége és járványtana – mivel gyűjteményünk nagyon korlátozott a csoportot illetően – felderítetlen maradt, valószínűsíthető, hogy a V1b/2 törzsök egy újabb csirke-galamb gazdaváltást reprezentálnak, a V1b/1 és V1b/2 más-más vírus-poolból indultak ki a VI. genotípuson belül. A csoport tagjai nem mutatják a gPMV-1 specifikus Mke-okkal való kötődést. Gyűjteményünk mindhárom, V1b/2-höz tartozó törzsét Horvátországban izolálták, azonban kialakulásukban a helyi csirkek NDV törzseinek szerepe kizárható, a volt Jugoszlávia területén az elmúlt 25 évben kizárólag az V. genotípusba tartozó törzsök fordultak elő (Wehmann és mtsai, 2003b).

Az új gazdában való megtelepedést követően a V1b/1 és a V1b/2 szubtypusok egymástól gyökeresen eltérő evolúciós utakat jártak be, köszönhetően a területi szórásnak, és a járványokban való részvételnek. Eredményeinkből kiderül, hogy a genetikailag több alcsoportra és variánsra osztható V1b/1 szubtypus már a járvány elején is létezett, a 80-as évek elején izolált törzsök genetikai távolsága azt mutatja, hogy a betegséget megelőzően a törzsök között nagymértékű diverzifikálódás ment végbe.

A Vlb/1 szubtypussal szemben a Vlb/2 esetében nyilvánvalóan hosszú evolúciós folyamat zajlott le, azonban a törzsek szignifikáns diverzifikációja és területi szóródása nélkül. Ez utóbbi folyamat meglehetősen szokatlan olyan erősen kontagiózus vírus esetében, mint az NDV, ezért okkal feltételezhető, hogy a csoport tagjainak megjelenése a palacknyak-hatásnak (angolul bottle-neck effect) tulajdonítható, feltételezhetően az általános vakcinázást követően az NDV recens genotípusainak térhódítása is ennek köszönhető (lásd a „2.10. NDV fertőzésre fogékony fajok és a vírus rezervoárjai” című fejezetet).

A betegség megjelenésének idejét ismerjük, azonban azt, hogy mikor ment át a vírus csirkéről galambra, csak találgatni tudjuk. Korábbi tapasztalatok alapján, járvány idején, mezei körülmények között az NDV F génjének evolúciós változási üteme 1%/évtized (Czeglédi és mtsai, 2002; Wehmann és mtsai, 2003b), és ez a tapasztalati tény segíthet nekünk, hogy az NDV galambokat érintő gazdaváltását időben el tudjuk helyezni. Amennyiben a gazdaváltás a 70-es években történt, az azóta eltelt idő túl rövidnek bizonyul, hogy olyan nagy genetikai távolság alakuljon ki a gPMV-1 törzsek között, amekkorát a különböző alcsoportokba tartozó törzsek között tapasztaltunk (5. táblázat). Példának okáért az ÉA alcsoporthoz tartozó HU-61/83 törzs, és az azonos évben - a járvány második esztendejében - izolált EU_k törzsek közötti genetikai távolság 4,2-5,4%, aminek kialakulásához – az 1%/évtized ütemet figyelembe véve – minimum 40-50 év szükséges. Az első gPMV-1 törzsek izolálása óta eltelt időhöz képest mért nagy szekvencia divergencia kétféleképpen magyarázható. Az egyik hipotézis szerint *a gazdaváltási esemény és a betegség megjelenése között hosszú idő telt el, mely alatt a csirke vírus az új gazdához adaptálódott*. Ez alatt az idő alatt a galambokban csupán tünetmentes fertőzés alakult ki, azonban az sem kizárt, hogy előfordultak sporadikus esetek enyhe tünetekkel, azonban ezek akkor elkerülték a figyelmet. Az adaptáció során a gPMV-1 galamb-patogenitása nőtt, míg betegség-okozó képessége csirkék esetében szignifikánsan csökkent (Alexander és Parsons, 1986; Werner és mtsai, 1999; Meulemans és mtsai, 2002). A másik hipotézis szerint *a vírus evolúciós tempója a gazdaváltást követően felgyorsult*, ezt láthattuk már Influenza A vírus esetében (Scholtissek és mtsai, 1993; Scholtissek, 1995; Webster, 1999). Scholtissek szerint legalább két esemény szükséges egy vírus új gazdában történő stabil megtelepedéséhez. Elsődlegesen nyilvánvalóan szükséges az új gazda adott vírussal történő fertőződése. A másik esemény a vírus polimeráz génjében kialakuló *mutátor mutáció*, ennek eredményeként olyan labilis törzs alakul ki, melynek utódai nagy divergenciát mutatnak egymáshoz, és a szülővírushoz képest is. Ezek között a vírusok között nagyobb valószínűséggel fordulnak elő olyanok, melyek gyorsan képesek adaptálódni az új gazdához, vagy bármilyen egyéb szokatlan környezethez

(Scholtissek és mtsai, 1993). Munkánk alapján nem igazolható egyik hipotézis sem, ehhez további vizsgálatok szükségesek.

A különböző Vīb/1 alcsoportok létezése a betegség korai fázisában a galambok Newcastle-betegségének komplex epidemiológiai hátterére utal. *Az 1980-as évek elején kezdődő járványhullámban az EU_k alcsoport vírusai vettek részt*, és az alcsoport Irak'78 törzssel szembeni genetikai távolságát (2,5-4,2%) tekintve nagyon valószínűtlen, hogy az Irak'78 lett volna a járványért felelős alapvírus. A járványt okozó EU_k alcsoport gyorsan terjedt a mediterrán területeken (Egyiptom, Málta és Olaszország) és Európában éppúgy, mint a világ más részein, Japánban és az USA-ban. Az, hogy az EU_k alcsoport világszerte jelen volt – sokszor ugyanaz a törzs a világ két, egymástól távoli pontján bukkant fel – sokkal inkább tulajdonítható emberi tevékenység eredményének, mint természetes úton való terjedésnek, a gazda gyakori szállítása (házasított galambok kiállítása és kereskedelme) a legszélesebb körű és leghatékonyabb vírussterjedést teszi lehetővé.

Bár a ₁₁₂GRQKR₁₁₆ vágáshelyet hordozó korai gPMV-1 vírusok (EU_k) manapság is keringenek a galambok között (Werner és mtsai, 1999; Zanetti és mtsai, 2001), nyilvánvaló, hogy a térségben napjainkra az EU_r vírusok váltak uralkodóvá. Az EU_r alcsoport 1990-es évek végi térhódítását mások is leírták (Mase és mtsai, 2002; Meulemans és mtsai, 2002), és az a tendencia, hogy az EU_r alcsoport kiszorította az EU_k vírusokat, következménye lehet a betegség korai fázisában alkalmazott vakcinázásnak. Sajnálatos módon azonban, mivel a betegséget két évtizeden át nem tekintették NDV-nek, - ezt bizonyítja az is, hogy főként a gPMV-1 elnevezés élt a köztudatban – nem is vakcináztak ellene olyan széleskörűen, ahogyan az NDV ellen kell. Ráadásul a szabadon élő galambok vakcinázása megoldhatatlan, mely szintén hozzájárult ahhoz, hogy a galamb eredetű NDV enzootiássá vált az európai házigalamb populációban (Kaleta, 1992a, b).

Filogenetikai és aminosav szubsztitúciós vizsgálatainkból a galamb eredetű NDV törzsek eredetével és járványtanával kapcsolatos számos részletre fény derült. A törzsek nagy része egy jól elkülönülő genetikai ághoz, a Vīb/1-hez tartozik a csirkék NDV törzseinek VI. genotípusán belül. A Vīb/1 további, járványtani jelentéssel bíró, időben és/vagy földrajzilag elkülönülő alcsoportokra, és azokon belül további variánsokra osztható. A gPMV-1 vírusok nagyon kis hányada, összesen három, Horvátországban izolált törzs a Vīb/1-gyel polifiletikus viszonyban álló Vīb/2 csoportot alkotja. A Vīb/1 és Vīb/2 csoportok különállása alapján bizonyított, hogy a gPMV-1 törzsek többszörös, legalább két gazdaváltási esemény nyomán jöttek létre. A gPMV-1 törzsek nagy genetikai változása az izolálási idejüket tekintve két

evolúciós hipotézist vet fel. Az egyik szerint a gazdaváltási esemény időben jóval megelőzte a betegség és a járvány jelentkezését, a galambok közt önállóan terjedő betegség kialakulását megelőzően tünetmentes fertőzés, vagy sporadikus megbetegedések fordultak csupán elő. A másik hipotézis a gazdaváltást követően a vírus evolúciós tempójának felgyorsulását feltételezi, mely esetlegesen egy, a polimeráz gént érintő mutátor mutációnak köszönhető. A gPMV-1 törzsek eredete nagy valószínűséggel Északkelet-Afrikához köthető.

5.2. Galamb-NDV törzsek csoportosítása az F gén restriktív endonukleáz analízise alapján

5.2.1. Restriktív endonukleázok, és kiválasztásuknak szempontjai

A galamb-NDV törzsek restriktív enzim (továbbiakban RE) analízissel történő csoportosításához laboratóriumunkban egyéb NDV törzsek F génjének RE-vizsgálatához korábban már alkalmazott enzimeket használtuk. Az enzimválasztásnál a szempontok a következők voltak: egy RE-vel történő emésztés során a kapott fragmentumok száma ne haladja meg az 5-6-ot, és a fragmentumok mérete a könnyű értékelhetőség szempontjából egymástól jól elkülöníthető legyen, illetve a RE-mintázat nem tartalmazzon se túl kicsi, se túl nagyméretű fragmentumokat. Az enzimek kiválasztásához a génbankban fellelhető NDV szekvenciák nyújtottak segítséget. A fenti szempontok alapján NDV törzsek csoportosítására három enzimet (*Hinf*I, *Bst*OI és *Rsa*I) alkalmaztunk rutinszerűen (Ballagi-Pordány és mtsai, 1996; Lomniczi és mtsai, 1998; Herczeg és mtsai, 1999; Czeglédi és mtsai, 2002; Wehmann és mtsai, 2003a, b;), és ezek galamb-NDV izolátumok egyéb NDV törzsektől való elkülönítésére, és további csoportosítására is megfelelőnek bizonyultak. A RE-analízis előnye, hogy nagyszámú minta gyors feldolgozására alkalmas, és segítségével kiszűrhetők a kevert fertőzések. A laboratóriumba érkező, a beküldő által galambból izolált és/vagy monoklonális ellenanyagokkal végzett vizsgálat alapján galamb-NDV törzsnek tekintett izolátumokat ezért rutinszerűen RE-analízisnek vetettük alá, bizonyítandó, hogy valóban galamb-NDV törzssel van dolgunk.

A vírus RNS-extraktóját követően az RNS-t reverz transzkripció során random hexamer segítségével cDNS-sé írtuk át, majd a génbankban található NDV törzsek szekvenciái alapján tervezett 1. és 2. degenerált primerekkel az F gén egy 1353 nt hosszúságú részét amplifikáltuk. Néhány galamb-NDV törzs amplifikálásához az 1. és 2. degenerált primerek nem voltak alkalmasak, ekkor a rendelkezésre álló gPMV-1 szekvenciák alapján újabb, gPMV-1 specifikus degenerált oligonukleotidokat (3. és 4.) terveztünk. A PCR-

termékeket gélelektroforézissel történő ellenőrzést követően *HinfI*, *BsrOI* és *RsaI* enzimekkel emésztettük külön-külön, a hasított fragmentumokat gélelektroforézissel választottuk el egymástól, majd a kapott RE-vágáshelyek és fragmentumok alapján fizikai térképet szerkesztettünk.

Vizsgálataink során számos esetben előfordult, hogy korábban még nem látott fragmentum mérettel és eloszlással talákoztunk. Ezekben az esetekben szükség volt a feltételezett változást okozó RE-vágáshely meglétének vagy hiányának bizonyítására, illetve az újonnan megjelenő vágáshelyek felderítésére (925., 958. és 1350. *HinfI*, 893., 953. és 1427. *BsrOI*, és 1591. *RsaI*). Ennek érdekében a kérdéses szakaszt szekvencia-analízisnek vetettük alá. A vírus RNS-ről készült cDNS-t a kívánt szakasz függvényében a 9.-10., 11.-12., 13.-14. illetve 15.-16. oligonukleotid-párok segítségével sokszoroztuk fel. A PCR-terméket agaróz gélen történő elektroforézissel ellenőriztük, majd bér munka keretében direkt szekvenáltattuk.

5.2.2. RE-analízissel vizsgált galamb-NDV törzsek és csoportosításuk

Több mint száz, 1978 és 2002 között izolált törzset vizsgáltunk RE-analízissel. A törzsek összesen 16 országból, a Közel-Keletről, Európából és Észak-Amerikából származtak, többségük más kutatók vizsgálatai alapján Mke-okkal a klasszikus NDV törzsekhez képest jelentős antigénszerkezeti eltéréseket mutató P-csoportba sorolható (Alexander és mtsai, 1985; Lana és mtsai, 1988; Collins és mtsai, 1989). Jelentős részüket (83 törzs) házigalambból, kisebb hányadukat vadgalambból izolálták, de az Mke eredmények alapján baromfiból, illetve díszmadaraktól, és állatkerti madaraktól származó törzseket is bevontunk a vizsgálatba. Az általunk vizsgált törzsek adatait, és a RE-analízis eredményeit összevetve a filogenetikai vizsgálatok eredményével a 6. táblázat tartalmazza.

6. Táblázat: Galamb-NDV törzsek adatai, csoportba sorolásuk RE-analízis alapján

A galamb-NDV törzs elnevezése		Gazda	Mke	Szekvencia	RE-analízis
Elnevezés	Eredeti elnevezés				
Iraq'78	BVC'78	galamb	P	IQ	IQ
IT-111/82	PA 5679 (Piacenza) ^{1*}	galamb			EU _{k1a}
IT-227/82	25/01.03./1982	galamb	P	EU _{k1}	EU _{k1a}
MT-217/82	KS 286/1982	galamb		EU _{k1}	EU _{k1a}
BE-276/83	PD-250/83 (Alex)	galamb			EU _{k1a}
DE-209/83	1377/1983	galamb		EU _{k1}	EU _{k1b}
DK-279/83	PD-992/1983	galamb	P	EU _{k1}	EU _{k1b}
GB-257/83	PD 561/1983	galamb	P		EU _{k1a}
HU-48/83	69-1F/1983	galamb	P		EU _{k1b}
HU-52/83	14383/1983	galamb	P		EU _{k1b}
HU-53/83	14389/1983	galamb	P		EU _{k1b}
HU-54/83	14443/1983	galamb	P		EU _{k1b}
HU-55/83	14478/1983	galamb	P		EU _{k1b}
HU-57/83	14498/1983	galamb	P		EU _{k1b}
HU-58/83	V 14506/1983	galamb	P	EU _{k1}	EU _{k1b}
HU-59/83	14568/1983	galamb	P		EU _{k1b}
HU-60/83	14697/1983	galamb	P		EU _{k1b}
HU-61/83	14736/1983	galamb	P	ÉA ₂	ÉA ₂
HU-62/83	14769/1983	galamb	P		EU _{k1b}
HU-63/83	14892/1983	galamb	P		EU _{k1b}
HU-64/83	14957/1983	galamb	P		EU _{k1b}
HU-65/83	1245V/1983	galamb	P		EU _{k1b}
HU-66/83	1389/1983	galamb	P		EU _{k1b}
NL-210/83	1383/1983	galamb	P		EU _{k1a}
Pi/760/83 (GB)		galamb	P		EU _{k1b}
SE-2/83	V 2683/1983	galamb	P	EU _{k1}	EU _{k1b}
DE-380/84	WNK/1984	csirke		EU _{k1}	EU _{k1b}
HR-267/84	V 509/1984	galamb		EU _{k1}	EU _{k1b}
HU-67/84	20V/1984	galamb	P		EU _{k1b}
HU-68/84	184V/1984	galamb	P		EU _{k1b}
HU-238/84	15347/1984	galamb	P	ÉA ₂	ÉA ₂
HU-461/84	53V/1984	galamb	P		EU _{k1b}
HU-462/84	232V/1984	galamb	P		EU _{k1b}
Pi/262/84 (GB)	PD 298/1984	csirke		EU _{k1}	EU _{k1a}
Pi/1168/84 (GB)		galamb	P		EU _{k1b}
NO-1/85	F 1084/1985	galamb	P	EU _{k1}	EU _{k1b}
DE-356/86	1390/1986	papagáj		EU _{k1}	EU _{k1b}
HU-396/86	1212V/1986	galamb	P		EU _{k2}
DE _{M0} -33/87	626/2/1987	galamb	P	EU _{k1}	EU _{k1b}
DE _{M0} -35/87	490/1987	galamb	P		EU _{k1a}
DE-47/87	G 242/1987	galamb	P	ÉA ₂	ÉA ₂
EG-3/<87	Aè 23<1987	galamb	P	EU _{k1}	EU _{k1a}
EG-6/<87	Aè 28<1987	galamb	P		EU _{k1a}
HU-417/87	V 23/1987	galamb		ÉA ₂	ÉA ₁
HU-449/87	20048/1987	galamb	P		EU _{k1b}
HU-451/87	20123/1987	galamb	P		EU _{k1a}
HU-491/87	V 96/1987	galamb	P	EU _{k2}	EU _{k1b}
HU-512/87	368V/1987	galamb			EU _{k1b}

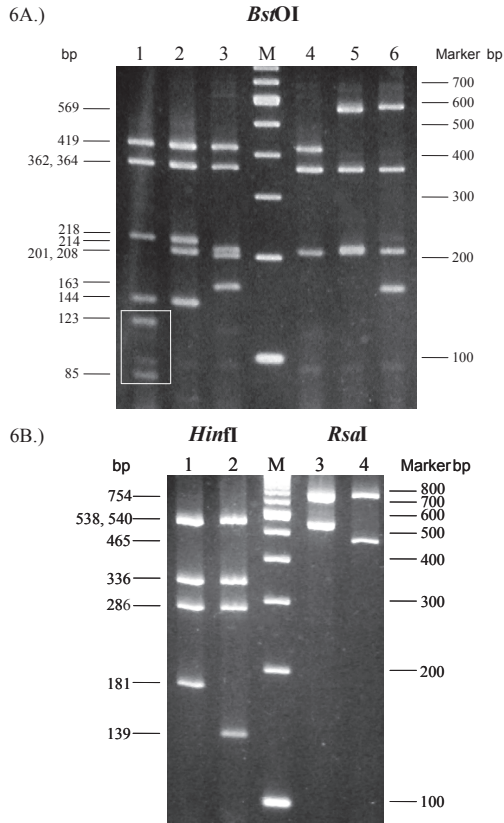
A galamb-NDV törzs elnevezése		Gazda	Mke	Szekvencia	RE-analízis
Elnevezés	Eredeti elnevezés				
IT-125/87	76 (Udine)/1987	galamb (hobby)	P	EU _{re2}	EU _{r2}
US-17/87	MN 2446/88/1987	galamb		ÉA ₁	ÉA ₁
CA-23/88	V 3702/1988				ÉA ₁
CA-24/88	V 3754/1988	galamb		ÉA ₁	ÉA ₁
HU-541/88	481/1988	galamb		EU _{k2}	EU _{k1b}
IT-131/88	211 (Vicenza)/1988	galamb	B		EU _{k1b}
CA-26/89	V 4728/1989				ÉA ₁
CA-28/89	V 6773/1989	galamb		ÉA ₁	ÉA ₁
CA-37/89	V 8468/1989	galamb			ÉA ₁
HU-655/89	597/1989	galamb		EU _{k2}	EU _{k1b}
IT-132/89	39 (Vicenza)/1989	gerle	P	EU _{k2}	EU _{k2}
IT-133/89	165 (Venezia)/1989	galamb	P		EU _{k2}
CA-41/90	V 9948/1990	galamb		ÉA ₁	ÉA ₁
IT-137/90	108 (Padova)/1990	galamb (hobby)	P	EU _{k2}	EU _{k2}
SE-3/90	VF 66/1990	galamb	P	ÉA ₁	ÉA ₁
HU-1114/90	HU-1114/90	galamb		EU _{k2}	EU _{k2}
DE-71/90	KP 84ab/1990	papagáj			EU _{k2}
DE-72/90	KP 87b/1990	papagáj		EU _{k1}	EU _{k2}
DE-73/90	KP 88ab/1990	papagáj			EU _{k2}
DE-74/90	KP 97ab/1990	papagáj			EU _{k2}
CA-48/91	V 14274/1991	galamb		ÉA ₁	ÉA ₁
CA-56/92	V 20337/1992	galamb		ÉA ₁	ÉA ₁
DE-48/92	R 8/1992	galamb	P	EU _{re1}	EU _{r1}
DE-91/92	UP 3338/1992	papagáj			EU _{r2}
DE-92/92	UP 3391/1992	papagáj			EU _{r2}
DE-93/92	UP 3394/1992	papagáj			EU _{r2}
DE-95/92	UP 3488/1992	kakadu		EU _{re2}	EU _{r2}
ES-3/92	4436/1992	galamb	P	EU _{re1}	EU _{r1}
DE-96/93	UP 054/1993	kakadu			EU _{r2}
DE-51/93	R 67/1993	galamb	P	EU _{re1}	ÉA ₂
DE-60/93	R 3/1993	papagáj	P		EU _{r1}
DE-62/93	R 18/1993	csirke	P		EU _{r1}
DE-63/93	R 35/1993	pingvin (állatkerti)	P		EU _{r1}
DE-64/93	R 39/1993	papagáj (állatkerti)	P		EU _{r1}
DE-65/93	R 165/1993	kacsa (hízó)	P	ÉA ₁	ÉA ₁
DE-66/93	R 166/1993	csirke	P		ÉA ₁
DE-97/93	UP 697/1993	kakadu		EU _{re2}	EU _{r2}
DK-12/93	181731-4/1993	galamb		ÉA ₂	ÉA ₁
DK-13/93	181178-3/993	galamb			EU _{r1}
DE-54/94	R 145 ⁶	galamb	P-szerű		EU _{r1}
DE-55/94	R 205	galamb	P-szerű	EU _{re1}	EU _{r1}
DE-56/94	R 260	galamb	P		EU _{k2}
DE-67/94	R 8 ⁶	csirke	P-szerű		EU _{r1}
DE-68/94	R 12 ⁶	csirke (hobby)	P	EU _{re1}	EU _{r1}
IT-145/94	50 (Pavia) ³	galamb (hobby)	P		EU _{k2}
IT-146/94	58 (Savona) ³	galamb	P	EU _{k2}	EU _{k2}
DE-57/95	R 171 ⁶	galamb	P	EU _{re1}	EU _{r1}
DK-14/95	75060 ²	galamb			EU _{r1}
IT-151/95	364 (Verona) ³	fácán	P	EU _{k2}	EU _{k2}

A galamb-NDV törzs elnevezése		Gazda	Mke	Szekvencia	RE-analízis
Elnevezés	Eredeti elnevezés				
HR-65/95			P-negatív	Vib/2	Vib/2
DE-86/96	2897	galamb			EU _{r1}
IT-152/96	12 (Vicenza) ³	gerle	P	EU _{k2}	EU _{k2}
IT-153/96	219 (Vicenza) ³	galamb (hobby)	P	EU _{k2}	EU _{k2}
MX-11/98	220 ⁷	galamb		ÉA ₁	ÉA ₁
SE-6/00	IF 84 ²	galamb (szabadon élő)	P	EU _{re2}	EU _{r3}
SE-8/00	IF 97 ²	galamb (szabadon élő)	P	EU _{re2}	EU _{r3}
SE-9/00	IF 105 ²	galamb (szabadon élő)			EU _{r3}
SE-10/01	IF 11 ²	csirke	P	EU _{re2}	EU _{r3}
HR-111/01			P-negatív	Vib/2	Vib/2
HR-155/01			P-negatív	Vib/2	Vib/2
HU-1/02				EU _{re2}	EU _{r3}
HU-2/02					EU _{r3}
HU-3/02					EU _{r3}

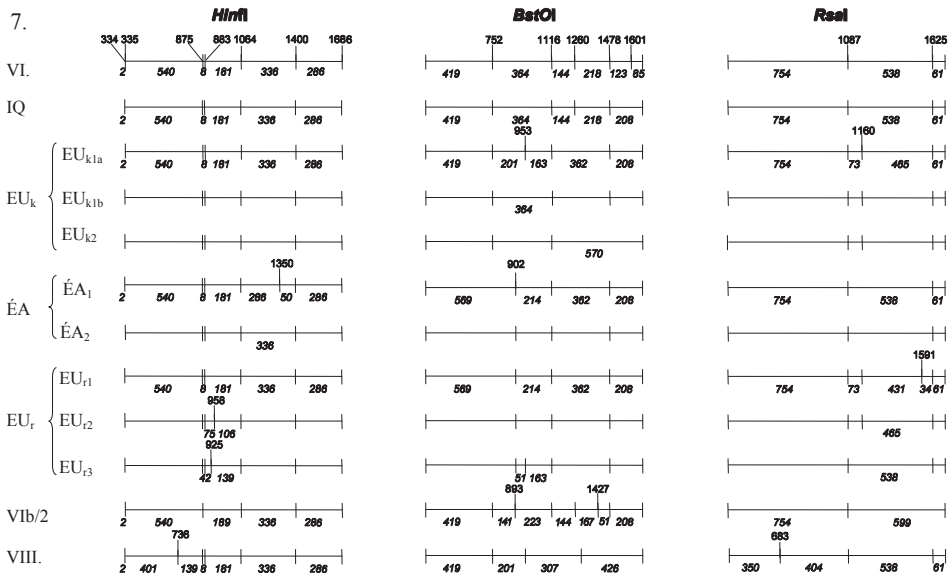
A galamb-NDV törzsek RE-analízissel kapott fragmentum-eloszlási mintázata a VI. genotípuson belül a VIa szubtípus mintázatából származtatható. A galambok ND-szerű megbetegedését megelőzően a VIa szubtípus – mely a galamb variáns őseinek tekinthető, és amelyhez a VI. genotípus legkorábbi ismert törzsei tartoznak - a Közel-Keleten és Északkelet-Afrikában volt elterjedt, azonban az ezt követő években ázsiai országokban is felbukkant (Wehmann, 2000). A VIa csoportba tartozó NDV törzsek - az F gén *Hinfl*, *BstOI* és *RsaI* enzimekkel külön-külön végzett hasításával konstruált fizikai térképei alapján - egy sor egyedi vágáshellyel jellemezhetők a többi genotípussal összehasonlítva (Ballagi-Pordány és mtsai, 1996; Lomniczi és mtsai, 1998; Herczeg és mtsai, 1999). A galamb-NDV törzsekre a VIa szubtípushoz képest szintén egyedi vágáshely progresszív megjelenése vagy eltűnése jellemző. A törzsek RE-analízis alapján egy jól elkülöníthető, gPMV-1 törzsekre jellemző markerrel karakterizálható csoportot alkotnak a VI. genotípuson belül, melyet Vib szubtípusnak neveztünk el. Az említett marker az F gén 1601. pozíciójában lévő *BstOI* vágáshely, amely a VI. genotípusú csirke eredetű NDV törzseknél jelen van, a gPMV-1 törzseknél viszont hiányzik. A vágáshely eltűnése fontos diagnosztikai jegyként alkalmazható, ha ugyanis egy NDV törzs F génjénél VI. genotípusra jellemző vágáshely eloszlást tapasztalunk, ugyanakkor az 1601. pozícióban hiányzik a *BstOI* vágáshely, akkor ugyanolyan, ha nem nagyobb biztonsággal azonosíthatjuk gPMV-1 törzsként, mintha Mke-okkal vizsgáltuk volna.

A galamb-NDV törzseket RE-analízissel kapott mintázatuk alapján a filogenetikai analízissel egybevágóan öt nagyobb csoportba soroltuk a Vib szubtípuson belül, ezeket a

származási helyük és/vagy izolálási idejük alapján iraki (IQ), észak-amerikai (ÉA), korai európai (EU_k), recens európai (EU_r) és Vlb/2 csoportoknak neveztük el. Az öt nagy csoporton belül további nyolc variáns különböztethető meg a fragmentum eloszlás alapján. A Vlb szubtípusba tartozó alcsoportok, és az azokon belüli variánsok részleges F génjének hasításával kapott RE-fragmentum mintázatai a 6A. és 6B. ábrán, fizikai térképei a 7. ábrán láthatók.



6. ábra. Az F gén restriktív fragmentum mintázata reprezentatív gPMV-1 alcsoportokban és variánsokban. **A.)** *BsrOI* enzimmel kapott mintázatok. 1: VI. genotípus, a fehér keretben láthatóak a 85 és 123 bp hosszúságú fragmentumok, melyek fúziója jellemző minden gPMV-1 törzsrre, 2: IQ alcsoport, 3: EU_{k1a} variáns, 4: EU_{k1b} variáns, 5: ÉA₁, ÉA₂, EU_{r1} és EU_{r2} variáns, 6: EU_{r3} variáns, M: 100 pb-os marker (a Vlb/2 csoport *BsrOI* mintázatát nem mutatjuk). **B.)** *HinI* és *RsaI* enzimekkel kapott mintázatok. 1: *HinI* mintázat VI. genotípus, IQ alcsoport, EU_{k1a}, EU_{k1b}, EU_{r2}, ÉA₂ és EU_{r1} variáns esetében, 2: *HinI* mintázat EU_{r3} variáns esetében (a 42 bp-os fragmentumot nem mutatjuk), 3: *RsaI* mintázat VI. genotípus, IQ alcsoport, ÉA₁, ÉA₂ és EU_{r3} variánsok esetében (az 61 bp-os fragmentumot nem mutatjuk), 4: *RsaI* mintázat EU_{k1a}, EU_{k1b}, EU_{r2} és EU_{r1} variánsok esetében, M: 100 pb-os marker (az ÉA₁ és EU_{r2} variánsok, és a Vlb/2 csoport *HinI* mintázatát, valamint az EU_{r1} variáns, és a Vlb/2 csoport *RsaI* mintázatát nem mutatjuk).



7. ábra. A Vib subtypus alcsoportjainak és variánsainak RE-analízissel készült fizikai térképei. Az ábrán feltüntetjük a VI. genotípust, és az 1601. pozícióban a Vib-hez hasonlóan szintén BstOI vágáshely hiányt mutató VIII. genotípus fizikai térképét is. A térképek feletti számok a megfelelő RE-k által kivágott fragmentum utolsó nukleotidját jelölik az F génen, kivéve a 334. pozíciót, ami az amplifikált régió kezdőpontja. A fizikai térképek alatti dőlt számok a kivágott fragmentumok méretét jelölik (nt).

5.2.3. Az IQ alcsoport

Az IQ alcsoporthoz egyetlen izolátum, az Irak'78 tartozik. Az Irak'78 RE-mintázata mindössze egy különbséget mutat a VIa csoporttal szemben, hiányzik az 1601. pozícióban levő *BstOI* vágáshely (Wehmann, 2000). Ez minden, későbbiekben ismertetett alcsoportba tartozó galamb NDV izolátum jellemzője, így a gPMV-1 törzsek diagnosztikai markerének tekinthető. A *BstOI* vágáshely eltűnése a VIa genotípusnál jelenlévő 123 és 85 bp-os fragmentum helyett egy 208 bp-os hosszúságú fúziós fragmentumot eredményez. Ezt a fragmentumot egyetlen korábbi járványból származó, II.-VIII. genotípusokhoz tartozó NDV törzs RE-analízise során sem láttuk (Ballagi-Pordány és mtsai, 1996; Lomniczi és mtsai, 1998; Herczeg és mtsai, 1999, 2001; Czeglédi és mtsai, 2002; Wehmann és mtsai, 2003a, 2003b), így az 1601. pozícióban levő *BstOI* vágáshely eltűnése, és az általa eredményezett 208 bp-os fragmentum valóban a galamb-NDV törzsek karakterisztikus jegyének tekinthető.

5.2.4. Az EU_k alcsoport és variánsai

A galamb-NDV izolátumok jelentős részét az 1980-as évek első felében, Európában izolálták, ezek RE-mintázatuk alapján az EU_k alcsoporthoz tartoznak. Az EU_k alcsoport két vágáshely különbséget mutat az Irak'78 törzshöz képest. Az egyik változás a *BstOI* vágáshely hiánya az F gén 1260. pozíciójában, mely egy 362 bp (144+218 bp) hosszúságú fúziós fragmentumot eredményez, és ez a vágáshely hiány minden további VIb/1 alcsoportra és variánsra jellemző. A másik változás az 1160. pozícióban megjelenő *RsaI* vágáshely, melynek eredménye a korábbi 538 bp-os helyett egy 73 bp és egy 465 bp hosszúságú fragmentum. Az EU_k alcsoporton belül RE-analízissel további három variáns különböztethető meg: EU_{k1a}, EU_{k1b} és EU_{k2}. Az első két variáns hasonló elnevezésének oka, hogy filogenetika vizsgálatok során nem különülnek el egymástól. Az EU_{k1b} alcsoport mindössze - a fentebb már említett - két vágáshelyben (1160. *RsaI* és 1260. *BstOI*) különbözik az IQ alcsoporttól, míg az EU_{k1a} variáns esetében az IQ alcsoporttal szembeni két különbségen túl megjelenik a 953. pozícióban egy *BstOI* vágáshely, mely egy 201 és egy 163 bp-os fragmentumot eredményez a 364 bp hosszúságú fragmentum helyett.

Az EU_{k2} variánsban az 1160. és 1260. pozíciókban jelenlévő változásokon túl a *BstOI* vágáshely hiánya tapasztalható az 1478. pozícióban, melynek eredménye egy 570 bp (362+208 bp) hosszúságú fúziós fragmentum.

5.2.5. Az EU_r alcsoport és variánsai

Az EU_r alcsoport RE-mintázata két további vágáshelyben különbözik az EU_k alcsoporttól, a 752. pozícióban eltűnik, míg a 902.-ben megjelenik egy *Bst*OI vágáshely. Ennek következményeként a 419 és 364 bp-os fragmentumok helyett 569 és 214 bp hosszúságú fragmentumok keletkeznek. Az EU_r alcsoport különböző variánsai számos egyedi vágáshelyet hordoznak, melyek lehetővé teszik a további csoportosítást. Az EU_{r1} variáns egy *Rsa*I vágáshellyel rendelkezik az 1591. pozícióban, mely a 465 bp-os fragmentum helyett egy 431 és egy 34 bp hosszúságú fragmentumot eredményez. Az EU_{r2} variánsnál egy *Hin*FI vágáshely található a 958. pozícióban, mely a 181 bp-os szakaszt 75 és 106 bp hosszúságú részekre osztja. Az EU_{r3} variánshoz csak 2000 után izolált törzsek tartoznak. Az EU_{r3} variánsnál hiányzik az 1160. pozícióban az *Rsa*I vágáshely, ennek eredménye egy 538 bp méretű fúziós fragmentum a 73 és 465 bp méretű fragmentumok helyett. Az EU_{r3} variánsnál esetenként egy *Hin*FI vágáshely van jelen a 925. helyen, 42 és 139 bp-os fragmentumokat eredményezve a 181 bp hosszúságú fragmentum helyett. Jelen van a 953. pozícióban egy *Bst*OI vágáshely, melyet már láthattunk az EU_{k1a} variánsnál, azonban a 902. pozícióban lévő *Bst*OI vágáshely szimultán jelenléte miatt itt egy 51 és egy 163 bp hosszúságú fragmentumot láthatunk az agaróz gélen.

5.2.6. Az ÉA alcsoport és variánsai

Az ÉA és az EU_r alcsoportok alapvetően az 1160. pozícióban előforduló *Rsa*I vágáshely hiánya, illetve megléte alapján különböztethetők meg egymástól. Mint már említettem, az EU_{r3} variánsnál szintén hiányzik az 1160. pozícióban az *Rsa*I vágáshely, azonban az EU_{r3} specifikus *Hin*FI és *Bst*OI vágáshelyek a 925. és 953. pozíciókban lehetővé teszik a variáns megkülönböztetését az ÉA alcsoport tagjaitól. Az ÉA₁ és ÉA₂ variánsok között mindössze egy vágáshely különbség tapasztalható. Az „igazi” ÉA variánsnál, az ÉA₁-nél - ahová zömmel az észak-amerikai kontinensről származó törzsek tartoznak - az 1350. pozícióban megjelenik egy *Hin*FI vágáshely, míg az ÉA₂ variáns esetében – ahol európai, de filogenetikai és aminosav szubsztitúciós vizsgálatok alapján az ÉA csoporthoz tartozó törzsek vannak (részletesen lásd az „5.1.1. Filogenetikai analízis” és „5.1.2. Aminosav szubsztitúciós analízis” című fejezetekben) – ez a vágáshely a többi alcsoporthoz (IQ, EU_k, EU_r és V1b/2) hasonlóan hiányzik. A 1350. pozíció *Hin*FI vágáshelyének megjelenése egy 286 és egy 50 bp-os fragmentumot eredményez az ÉA₁ variáns törzseinél a 336 bp hosszúságú helyett.

5.2.7. A V1b/2 alcsoport

A V1b/2 csoport tagjait 1995 és 2002 között Horvátországban izolálták. A csoport azért kapta a V1b/2 nevet, mert filogenetikai vizsgálatok alapján nem alkot monofiletikus csoportot az IQ, EU_k, EU_r és ÉA alcsoportokat magába foglaló V1b/1 szubtypussal (erről bővebben az „5.1.1. Filogenetikai analízis” című fejezetben esett szó). A V1b/1 csoporthoz hasonlóan a V1b/2 csoportnál szintén hiányzik az 1601. pozícióban a *Bst*O1 vágáshely. A V1b/2-t a V1b/1 csoporttól alapvetően két vágáshely különbözteti meg. Az egyik a *Hin*fl vágáshely hiánya a 883. pozícióban, melynek eredménye egy 189 bp méretű fúziós fragmentum (8+181 bp). A másik jellegzetes különbség a V1b/1 csoport tagjaival szemben a *Rsa*I hely eltűnése az 1625. pozícióban, mely egy 599 bp-os fúziós fragmentumot (538+61 bp) eredményez. A V1b/2 csoport további érdekessége, hogy jelen van a VI. genotípusnál, illetve a V1b/1 csoport IQ és EU_k alcsoportjainál tapasztalt 752. *Bst*O1 vágáshely, és a VI. genotípusnál, valamint az IQ alcsoportnál az 1260. pozícióban meglévő *Bst*O1 hely. A V1b/2 csoportnál megjelenik két, korábban nem tapasztalt *Bst*O1 vágáshely is, a 893. pozícióban lévő a 364 bp-os fragmentumot egy 141 és egy 223 bp méretű darabra szabja, míg az 1427. helyen lévő a 218 bp méretű fragmentumot bontja 167 és 51 bp méretű részekre.

5.2.8. RE-analízis: egy új diagnosztikai módszer galamb-NDV törzsek azonosítására és csoportosítására

A galamb-NDV törzsek RE-analízise azon túl, hogy egy új diagnosztikai módszert kínál galamb-NDV törzsek azonosítására, az epidemiológiai háttér felderítése terén is számos eredményt hozott. A RE-analízis legfontosabb eredménye, hogy minden galamb-NDV törzsnél hiányzik az 1601. pozícióban a *Bst*O1 vágáshely, mely közös tulajdonsága mind a V1b/1, mind a V1b/2 szubtypushoz tartozó NDV törzseknek. Az IQ alcsoport és a V1b/2 szubtypus kivételével minden további alcsoport jellemezhető az 1260. pozícióban a *Bst*O1 vágáshely hiányával. Megállapítható, hogy egyetlen enzimmel, a *Bst*O1-gyel végzett RE-vizsgálat elegendő a galamb eredetű NDV törzsek, vagyis a V1b (V1b/1 és V1b/2) szubtypusba tartozó törzsek azonosításához, ezt az 1601. pozícióban a *Bst*O1 vágáshely eltűnése, és ennek eredményeként kialakuló 208 bp-os, illetve e fragmentum hiányában az EU_{k2} variáns esetében egy további, az 1478. *Bst*O1 vágáshely eltűnésével kialakuló 570 bp-os fúziós fragmentum teszi lehetővé. Megjegyzendő, hogy a jelenleg is cirkuláló VIIa (Lomniczi és mtsai, 1998) és VIII. genotípushoz (Herczeg és mtsai, 1999) tartozó csirke eredetű NDV törzseknél szintén hiányzik az 1601. *Bst*O1 vágáshely, de ezeknek a vírusoknak a RE-mintázata egy 426 bp-os

fragmentumot tartalmaz (218+123+85 bp) az 1478. pozícióban szintén hiányzó, és az 1260. helyen meglévő *Bst*OI vágáshelyeknek köszönhetően, így ez a hasonlóság nem okoz diagnosztikai problémát. Ráadásul a különböző genotípusokban az 1601. pozícióban a *Bst*OI vágáshely megszűnéséért felelős nt-változás más, mint a VIb esetében, melynek összes alcsoportjánál CTTGG nt-sorrenddel találkozunk. Az eltérő nt szubsztitúciók alátámasztják, hogy e vágáshely eltűnése a VIb, VIIa és a VIII. genotípusban nem értékelhető közös szerzett jegyként (angolul shared derived character), hanem a vágáshely megszűnése konvergens evolúció következménye. A galamb-NDV törzsekben – mint fentebb említettem - a vágáshely eltűnését minden esetben azonos (CC[↓]TGG→CTTGG) nt szubsztitúció eredményezte, mely viszont a VIb/1 szubtypushoz tartozó törzsek közös szerzett jegyének tekinthető, vagyis a törzsek monofiletikus eredetét támasztja alá. Megjegyzendő, hogy az egymástól távoli genotípusokban - mint a VIb és az I. vagy II. genotípus - az identikus helyeken történő vágáshely megjelenés (mint a 953. pozícióban a *Bst*OI, vagy az 1160. helyen az *Rsa*I vágáshely) homopláziának tekintendő (nem változás nélkül öröklötték egy közös őstől, hanem párhuzamos és konvergens evolúció eredményeként alakult ki ugyanaz a jegy), és nem kezelhető öröklött hasonlóságként.

Galamb-NDV törzseknél a klasszikusabb csirke genotípusokkal szemben számos RE-hely változást, vágáshely megjelenést és eltűnést tapasztaltunk. Ezek a változások az időben haladva progresszív jelleget mutattak, a kialakult RE-vágáshely változások mellé újabb változások sorakoztak fel. A galamb-NDV izolátumok RE-mintázatának sokfélesége a galamb eredet (VIb) azonosításán túl lehetővé teszi az izolátumok járványtani jelentéssel bíró alcsoportokba, és azokon belül további variánsokba történő sorolását. A galamb-NDV törzseknél látott vágáshelyek, illetve azok hiánya esetlegesen egyéb NDV genotípusoknál is előfordulnak, azonban más genotípusokban ezek egészen más kombinációban szerepelnek, ennél fogva más fragmentum méreteket és eloszlást eredményeznek (Ballagi-Pordány és mtsai, 1996), így ez nem csökkenti a RE-analízis, mint a galamb-NDV törzsek diagnosztikai módszerének értékét.

Míg a *Bst*OI enzimmel történt hasítással kapott RE-mintázat önmagában is alkalmas a galamb-NDV törzsek azonosításához, a további csoportosításhoz nem elég a *Bst*OI enzimmel végzett vizsgálat, ugyanis ezen enzim kizárólagos használatával nem tudunk különbséget tenni az EU_r és ÉA alcsoportok között. Hasonló a helyzet a másik két enzim, a *Hinf*I és az *Rsa*I önmagában való alkalmazása esetén is. A *Hinf*I-gyel nyert RE-mintázat az Irak'78 törzs (IQ), az EA_k alcsoport, valamint EU_{r1} és az ÉA₂ variánsok esetében azonos, míg az *Rsa*I önmagában való alkalmazása az Irak'78 törzs, az ÉA alcsoport és az EU_{r3} variáns, illetve az

EU_k alcsoport és az EU₂ variáns között nem tesz különbséget. Azonban a *HinfI*, *BstOI* és *RsaI* enzimekkel vizsgált vágáshely-kombinációk alapján teljes biztonsággal megállapítható az egyes galamb-NDV izolátumok hovatarozása. A három enzimmel végzett RE-vizsgálat segítségével a V_{Ib} szubtípuson belül öt földrajzi és/vagy időbeli elkülönülést mutató alcsoportot (IQ, EU_k, EU_r, ÉA és V_{Ib}/2), és három alcsoporton belül további nyolc variánst azonosítottunk. A RE-analízissel képzett alcsoportok és variánsaik létjogosultságát az F gén kódoló régiójának részleges szekvenciája alapján végzett filogenetikai vizsgálatok, és az aminosav szubsztitúciós analízis is megerősíti (lásd az „5.1.1. Filogenetikai analízis” és az „5.1.2. Aminosav szubsztitúciós analízis” című fejezeteket), a RE-analízissel, és filogenetikai vizsgálatokkal kapott csoportok egymással nagymértékben kongruensnek bizonyultak. A V_{Ib} szubtípus F génjének RE-analízissel kapott mintázata kapcsán meghatároztuk az 1601. pozícióban a *BstOI* vágáshely eltűnését eredményező nt-sorrendet különböző alcsoportokhoz tartozó reprezentatív gPMV-1 törzsekben. A kapott nt-szekvenciák homológ volta alátámasztotta a V_{Ib}/1 csoport monofiletikus eredetét.

Az F-gén RE-analízise *HinfI*, *BstOI* és *RsaI* enzimekkel egy egyszerű, megbízható, és minden laboratórium számára elérhető módszer galamb eredetű és - laboratóriumunkban végzett korábbi vizsgálatok alapján - egyéb NDV izolátumok azonosítására és csoportosítására. Mivel a vizsgált törzsek 16 országból, három földrésről származnak, és széles időintervallumot reprezentálnak (1978-2002), a RE-analízis alapján rajzolt fizikai térképek referenciaként szolgálhatnak bármilyen ismeretlen galamb-NDV törzs besorolásához. A betegség felbukkanását követően a galamb eredetű törzsek azonosítására monoklonális ellenanyagokat fejlesztettek ki (Alexander és mtsai, 1985), és a mai napig ez volt az egyetlen, ám kizárólag referencia laboratóriumokban hozzáférhető diagnosztikai módszer. Mke vizsgálatok alapján a galamb-NDV törzsek a P (pigeon) csoportba tartoznak. Esetenként előfordul, hogy gPMV-1 törzset Mke-okkal nem a P csoportba tartozóként azonosítanak, az általunk vizsgált törzsek közül például a galambból izolált IT-131/88 törzs Mke vizsgálatok alapján a B csoportba tartozik, míg a V_{Ib}/2 alcsoport törzsei P-negatívnak bizonyultak, azaz az Mke vizsgálat nem azonosít sikeresen minden galamb-NDV izolátumot. Az Mke vizsgálat további hiányossága, hogy a gPMV-1 izolátumok csoportosítására alkalmatlan. A RE-analízis minden, a filogenetikai vizsgálatok alapján V_{Ib} csoportba sorolt izolátumot sikeresen azonosított galamb-NDV törzsként, és megfordítva is igaz, minden RE-vizsgálattal gPMV-1-nek bizonyult törzset a V_{Ib} szubtípusba sorolt a filogenetikai analízis. Eredményeink alapján kimondható, hogy a RE-analízis megbízható diagnosztikai módszer galamb eredetű NDV törzsek azonosítására.

5.3. Az IT-227/82 galamb-NDV törzs teljes genomjának szekvenciája

5.3.1. Filogenetikai vizsgálatok

Annak érdekében, hogy fényt derítsünk a galamb-NDV törzsek, és más NDV izolátumok közötti genom-szintű különbségekre, meghatároztuk az egyik legrégebbi galamb izolátum, nevezetesen az IT-227/82 törzs teljes genomjának nukleotidsorrendjét.

A mai napig az NDV-n belül két osztályt (class I és class II) és a class II-n belül nyolc genotípust írtak le (Ballagi-Pordány és mtsai, 1996; Lomniczi és mtsai, 1998; Herczeg és mtsai, 1999, 2001; Yang és mtsai, 1999; Yu és mtsai, 2001; Gould és mtsai, 2001, 2003; Czeglédi és mtsai, 2002, 2003; Mase és mtsai, 2002; Aldous és mtsai, 2003; Wehmann és mtsai, 2003a, b; Huang és mtsai, 2004; Tsai és mtsai, 2004; Bogoyavlenskiy és mtsai, 2005). Ez idáig 15 NDV törzs teljes genomját analizálták (de Leeuw és Peeters, 1999; Huang és mtsai, 2004; Zou és mtsai, 2005; Czeglédi és mtsai, 2006; Kattenbelt és mtsai, 2006), és számos további NDV törzs genomjának nukleotidsorrendje található meg a génbankban. A génbankban fellelhető NDV genomoknak génenkénti, kódoló régiók felhasználásával elvégzett filogenetikai analízise különböző topológiájú dendrogramokat eredményezett (nem mutatjuk). Az egymástól eltérő elágazásrendszerrel rendelkező törzsfák kétféleképpen magyarázhatók. Az egyik magyarázat az NDV törzsek közötti rekombinációs esemény lehet, azonban laboratóriumunkban 70 NDV törzs bevonásával végzett vizsgálatok nem utaltak NDV törzsek közötti rekombinációra (Czeglédi, 2007). Az utóbbi években megjelent néhány tanulmányban génbanki NDV szekvenciák alapján NDV törzsek közötti rekombinációt írtak le (Chare és mtsai, 2003; Han és mtsai, 2008), azonban a szekvenciák eredete (egyetlen plakkból származott-e a vizsgált NDV törzs, milyen oligonukleotidokat alkalmaztak a cDNS amplifikációjához, illetve a génbankban elhelyezett végső szekvenciákat hány szekvenciareészletből szerkesztették meg) nem tisztázott. Qin és munkatársai szintén az NDV-t érintő rekombinációs eseményről számoltak be, és vizsgálataik metodikai háttere alapján már nem zárható ki, hogy valóban létezik rekombináció NDV törzsek között (Qin és mtsai, 2008). A másik magyarázat a különböző topológiájú törzsfákra a kevert fertőzés lehet, vagyis a gazda, melyből az NDV izolátum származik, egyszerre többféle NDV törzssel fertőzött, erre laboratóriumunkban is számtalan esetben adódott példa. Mivel a génbanki törzsek esetében nem tisztázott, hogy rekombinációs esemény eredményei, vagy kevert fertőzésből származnak, ezért az összehasonlításához csak azokból a génbanki NDV szekvenciákból válogattam, melyeknél a különböző gének kódoló szekvenciáinak filogenetikai vizsgálata azonos topológiájú dendrogramokat eredményezett, vagyis az adott NDV törzs mindegyik génje

alapján ugyanabba a genotípusba tartozik. Az összehasonlításban felhasznált NDV törzsek adatait a 7. táblázat tartalmazza.

7. Táblázat: Az összehasonlításához felhasznált NDV törzsek adatai

NDV törzs	Genotípus	Genom mérete (nt)	Virulencia	Génbanki szám
DE-R49/99	Class I.	15198	L	DQ097393
N.Ireland/Ulster/67	I.	15186	L	AY562991
PHY-LMV42	I.	15186	L	DQ097394
I-2	I.	15186	L	AY935499
B-1/46	II.	15186	L	AF309418
LaSota/46	II.	15186	L	AF077761
Italien	IV.	15186	V	EU293914
Herts/33	IV.	15186	V	AY741404
U.S.(CA)211472/02	V.	15192	V	AY562987
U.S.(F1)/44083/93	V.	15192	V	AY562986
U.S./Largo/71	V.	15192	V	AY562990
U.S.(CA)/1083(Fontana)/72	VI.	15192	V	AY562988
goose paramyxovirus SF02	VII.	15192	V	NC005036
ZJ-1	VII.	15192	V	AF431744

^aL: Lentogén, M: Mezogén, V: Velogén

Az IT-227/82 gPMV-1 törzs genomjának nt-sorrendjét öt, egymással részlegesen átfedő szakasz szekvenálásával határoztuk meg. Génbanki gPMV-1 törzsek, illetve ezek hiányában egyéb NDV törzsek szekvenciái alapján tervezett szekvenancia-specifikus oligonukleotidok felhasználásával RT-reakció során a genomiális RNS-t cDNS-sé írtuk át, majd szintén génbanki gPMV-1 és NDV törzsek nt-sorrendje alapján tervezett primerekkel a genom nagy részét három, egymással átfedő, több ezer pb hosszú termékeket eredményező PCR során amplifikáltuk. A genom terminusait 3' és 5' RACE (rapid amplification of cDNA ends) módszerekkel sokszoroztuk fel. A PCR-termékeket pCR-XL-TOPO és pCR 4-TOPO vektorokba klónoztuk, majd bér munka keretében szekvenáltattuk. A filogenetika vizsgálatok a „4.14. Szekvenancia- és filogenetikai analízis” című fejezetben leírtak szerint történtek. Az IT-227/82 törzset részleges és teljes génszekvenciákkal is összehasonlítottuk, attól függően, hogy egyéb gPMV-1 törzsekből milyen szekvenciák álltak rendelkezésre a génbankban (nem mutatjuk). Az IT-227/82 törzs mindegyik génje alapján a VI. genotípusba, azon belül is a VIb szubtípusba tartozik.

5.3.2. A genom mérete

Az elsőként szekvenált régi típusú NDV törzsek (LaSota/46, B1/47 és Beaudette C) genomjának mérete 15186 nt hosszúságúnak bizonyult (Krishnamurthy és Samal, 1998; de Leeuw és Peeters, 1999). A VII. genotípusú, libából izolált ZJ1 törzs genom-szekvenciájának közlésekor azonban egy új NDV genom méretre derült fény, a ZJ1 genomja 15192 nt-ból áll, a 6 nt többlet az NP gén 5' irányban elhelyezkedő nem kódoló régiójában található az 1647 és 1648 nt között (a nt pozíciók a LaSota/46 törzsre vonatkoznak) (Huang és mtsai, 2004). Egy másik VII. genotípusú NDV törzs, a liba paramyxovírus SF02 genomja szintén 15192 nt hosszúságúnak bizonyult, a 6 nt többlet ugyanabban a pozícióban helyezkedik el, mint a ZJ1 törzs esetében (Zou és mtsai, 2005). A laboratóriumunkban szekvenált DE-R49/99, class I-be tartozó törzs vizsgálatakor kiderült, hogy létezik egy harmadik genom méret is az NDV-n belül. A DE-R49/99 törzs genomja 15198 nt hosszúságú, az NP gén nem kódoló régiójában nincs 6 nt többlet, azonban a P gén kódoló régiója egy 12 nt hosszú inszertet tartalmaz a class II-be tartozó NDV törzsek P génjéhez képest (Czeglédi és mtsai, 2006). A génbankban található NDV genomok mérete 15186 nt az I., II. és IV. genotípusú törzsek esetében, illetve 15192 nt az V. és VI. genotípusba tartozó törzseknél. Kérdésként merült fel, hogy a Vlb genotípusú IT-227/82 galamb izolátum szintén nagyobb genommal rendelkezik-e, és a genom méret köthető-e a vírus gazdatropizmusához, bizonyos genotípusokhoz, kapcsolatban áll-e a virulenciával, illetve filogenetikai jegyek tekinthető-e.

Vizsgálataim alapján az IT-227/82 galamb-NDV törzs genomjának mérete 15192 nt hosszúságú, a 6 nt többlet az NP gén 5' irányban lévő nem kódoló részén található a ZJ1 és az SF02 törzsekhez hasonlóan az 1647.-1648. nt pozíciók közé ékelődve. A genom mérete megfelel a „rule of six”-nek, vagyis a hatos szabálynak, mely szerint a replikáció és transzkripció hatékonyságának feltétele a genom nt-számának hattal való oszthatósága.

Huang és munkatársai közlése szerint nem tartalmazzák a 6 nt többletet az I., II., III., IV. és V. genotípushoz tartozó NDV izolátumok, míg a 6 nt többlet jelen van a VI., VII., VIII. és IX. genotípusú törzseknél (Huang és mtsai, 2004). Megállapításaik némileg ellentmondásban állnak a génbankban található NDV törzsek felhasználásával végzett filogenetikai vizsgálatainkkal. A génbankban található NDV törzsek szekvenciái, illetve a Vlb genotípusú IT-227/82 törzs szekvenciája alapján kimondható, hogy a class II-höz tartozó I., II. és IV. genotípusú NDV izolátumok 15186 nt hosszúságú, míg az V., VI. és VII. genotípusú izolátumok 15192 nt hosszúságú genommal rendelkeznek az NP gén 5' nem kódoló régióját érintő 6 nt hiánynak, illetve többletnek köszönhetően (8. ábra). Laboratóriumunkban az I.-

VIII. genotípushoz tartozó 23 NDV törzs bevonásával végzett vizsgálat megerősítette a génbankban található teljes hosszúságú NDV genomok, és az IT-227/82 genomja alapján tett megállapításunkat, továbbá kimutatta, hogy a III. genotípusú törzseknél nincs, míg a VIII. genotípusúaknál van 6 nt többlet az NP gén nem kódoló régiójában (Czeglédi és mtsai, 2006). Huang és munkatársai, illetve a saját vizsgálataink alapján tett megállapítások közötti különbségek a következőkkel magyarázhatóak. Huang és munkatársai szerint a CA1083/72 NDV izolátum az F gén részleges szekvenciája (génbanki szám: AF419397) alapján az V. genotípusba tartozik. Ugyanezen izolátum NP génjének részleges szekvenciája felhasználásával készült illesztés szerint az izolátum nem tartalmazza a 6 nt többletet, azonban a szekvenciárészlet rövidsége miatt ez nem mondható ki teljes bizonyossággal. Ugyanezen törzs az NP gén felhasználásával általam végzett filogenetikai vizsgálatok alapján (nem mutatom) a VI. genotípushoz tartozik, és egy hosszabb NP szekvenciárészlet vizsgálva (génbanki szám: AY562988) tartalmazza az NP gén 5' nem kódoló régiójában a 6 nt többletet. Huang és munkatársai egy másik megállapítása szerint a 6 nt többlettel rendelkező FJ-1/85 NDV izolátum a IX. genotípushoz tartozik - mely a régi típusú NDV törzsekkel van közelebbi rokonságban - az F gén részleges szekvenciájának filogenetikai vizsgálata alapján, míg az NP gén részleges szekvenciája alapján a VII. genotípus tagja. A fenti anomáliák szintén rekombinációval vagy kevert fertőzéssel magyarázhatóak, azonban ilyen esetekben a konklúziót tekintve megbízhatóbb információkat nyerünk, ha a 6 nt többletet az azt hordozó NP gén szekvenciája alapján felállított filogenetika viszonyokhoz párosítjuk.

A 6 nt többlet, vagyis a 15192 nt hosszúságú genom méret a class II 60-as évek után megjelenő monofiletikus vonalához köthető, mely az V.-VIII. genotípusokból áll, így ez a marker az új genotípusok közös szerzett jegye, szünapomorfiaként értékelhető. A 6 nt többlettel nem rendelkező, 15186 nt-os genom méret a class II régi genotípusainak (I.-IV.), illetve a 15198 nt hosszúságú class I csoport jellemzője, vagyis a 6 nt-os inszert hiánya ősi formának tekinthető (8. ábra).

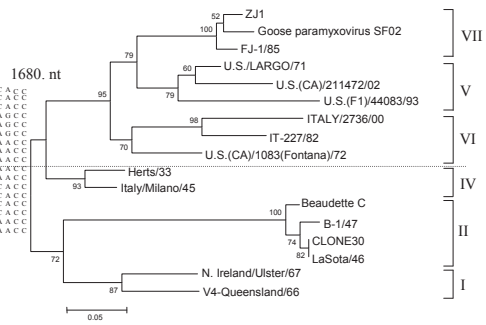
1615. nt

```

ACAGGAGCCACACC AAAACCCCGCCGCAAAAAC TCCCCACACTCCCGGACCCACAACCCGGCACGACCACAGCC
GCAGGATACACCAAAACCTCCGCCCCAAAACCTCCCAACACTCCCGGACCCACAACCCGGCACGACCACAGCC
ACAGGGTAAACCCGAAACCTCCGCCCCAAAACCTCCCAACACTCCCGGACCCACAACCCGGCACGACCACAGCC
ACAGGGTGGCCCCAAATCCCTCCGCCCCGAAACCCCTCCCTCACTCCCGGACCCACAAGCCCTGCCATGGCCGAGCC
ACAGGGCCACCCCCAAATCCCGCCCCGAAACCCCTCCCTCACTCCCGGACCCACAAGCCCTGCCATGGCCGAGCC
ACAGGATGGCCCCAAATCCCGCCCCGAAACCCCTCCCTCACTCCCGGACCCACAAGCCCTGCCATGGCCGAGCC
ACAGGGCCATCCCAAATCCCTCCGCCCCGAAACCCCTCCCAAAAATCCCGGACCCACAAGCCCTGCCATGGCCGAAACC
ACAGGGTCAGCCCCAAACCTCCGCCCCGAAATCTCCCAAAAATCCCGGATTCACAGCTCTGCCATGGCCGAAACC
ACAGGGTCACTCCCAAACCTCCGCCCCGAAATCTCCCAAAAATCCCGGATTCACAGCTCTGCCATGGCCGAAACC
ACAGGAGCACCCCAACCCCTCCGCCCCGAAACCTCCCAACCCCTGATCCGAGCCGAGCCGATGGCCGAAACC
ACAGGAGCACCCCAACCCCTCCGCCCCGAAACCTCCCAACCCCTGATCCGAGCCGAGCCGATGGCCGAAACC
ACAAAATATCCCAAATACCCCTGACCCGTAATGCG...ACCCCTCGATTTGGGGCTCTATATGACCACACC
ACAGAGAGATCCCAAATGGCTCACCCGTAATGCG...ACCCCTCGATTTGGGGCTCTATATGACCACACC
ACAAAATATCCCAAATGGCTCACCCGTAATGCG...ACCCCTCGATTTGGGGCTCTATATGACCACACC
ACAAAATATCCCAAATGGCTCACCCGTAATGCG...ACCCCTCGATTTGGGGCTCTATATGACCACACC
ATGAAATCATCCCAATCCCGCGTCGCAACCC...ACCCCTCAATCCGAGTCCCAACAGCCGAAACC
ATGAGGTCATCCCAAATTCCTTGCCGACCC...ACCCCTCAATCCGAGTCCCAACAGCCGAAACC

```

1647. nt 1648. nt



8. ábra. Az NP gén 5' nem kódoló régiójának illesztése a különböző NDV genotípusok reprezentatív törzseinek felhasználásával. A feltüntetett nt pozíciók a LaSota/46 törzs nt szekvenciájának felelnek meg. A törzsek sorrendje az illesztésben ugyanaz, mint a dendrogramon. Az illesztésben a '.' nt hiánynak felel meg.

Kérdésként merült fel, hogy a 6 nt hosszúságú inszert befolyásolja-e a vírus valamely biológiai tulajdonságát, virulenciáját, illetve gazdatropizmusát. Mivel a 6 nt többlet nem kódoló régióban helyezkedik el, ezért kicsi a valószínűsége, hogy biológiai tulajdonság kialakításában részt vesz. Korábban már említettem, hogy a recens genotípusok (V.-VIII.) tagjai között avirulens törzsek nem fordulnak elő, azonban az egyik harmadlagos gazda, a galamb vírusai (VIIb genotípus) általában csirkére nézve közepes virulenciájúak. A régi genotípusok (I.-IV.) tagjai között azonban mindhárom virulenciatípus előfordul, az ide tartozó törzsek pedig nem tartalmazzák a 6 nt hosszúságú inszert, függetlenül attól, hogy az adott törzs apatogén, közepes virulenciájú vagy patogén. Vagyis a 6 nt többlet úgy tűnik, nem vesz részt az NDV virulenciájának kialakításában.

Egy másik fontos kérdés, hogy a vírus gazdatropizmusát befolyásolja-e a 6 nt hosszúságú inszert megléte, illetve hiánya. Az NDV-nek két nagy rezervoárja van: ezek egyike a vadon élő vízimadarak, a másik pedig a csirkék. A vadon élő vízimadár az NDV ősi, elsődleges gazdája, míg a csirke egy, - a vízimadárnál recensebb - másodlagos gazda. Harmadlagos gazdáknak tekinthetők a galambok, a kormoránok, illetve újabban a libák, melyekben VI., V. és VII. genotípusú vírusok telepedtek meg, külön-külön (Lomniczi, 2006). E genotípusok mindegyike 15192 nt hosszúságú genommal rendelkezik a klasszikus, ugyanazon genotípusokba tartozó csirke vírusokhoz hasonlóan. Ezek alapján úgy tűnik, hogy a genomok méretében tapasztalt különbség nem áll kapcsolatban a gazdatropizmussal sem.

5.3.3. Genom-terminusok

A vírus genomjának 3' és 5' vége tartalmazza az ún. „leader” és „trailer” szekvenciákat. Ezek a szekvenciák tartalmazzák a replikációhoz és transzkripcióhoz nélkülözhetetlen szabályozó régiókat (Kolakofsky és mtsai, 1998). Az IT-227/82 galamb-NDV törzs „leader” szekvenciája 55 nt hosszú hasonlóan a többi vizsgált NDV törzshöz (de Leeuw és Peeters, 1999). Az IT-227/82 „trailer” régiója 113 nt-ból áll, ezt eddig egyedül a Beaudette C törzs esetében írták le (Krishnamurthy és Samal, 1998), a többi vizsgált NDV törzs „trailer” szekvenciája 114 nt hosszúságú (de Leeuw és Peeters, 1999). A különböző NDV törzsek „trailer” szekvenciáinak méretbeli eltérése nem okoz változást a genom teljes méretében (lásd bővebben az „5.3.4. Gén-start és gén-vég szekvenciák” c. fejezetben). A „leader” szekvencia első nyolc, illetve a „trailer” szekvencia utolsó nyolc nt-ja egymás komplementerei, és ez minden vizsgált NDV genomra igaz, igazolva, hogy ezeknek a régióknak valóban szerepe lehet a genomikus és antigenomikus replikáció szabályozásában (Marcos és mtsai, 2005).

5.3.4. Gén-start és gén-vég szekvenciák

Az IT-227/82 és a többi összehasonlításban felhasznált NDV törzsek gén-start és gén-vég szekvenciáinak adatait a 8. táblázat mutatja. A gén-start és gén-vég szekvenciák erősen konzerváltak az NDV törzsekénél. A gén-start szekvenciák minden gén esetében azonosak az összes vizsgált NDV genomban (UGC₍₃₎AUCU₍₂₎). A P és M gének esetében a gén-vég szekvencia minden vizsgált NDV genomban azonos, azonban a többi gén (NP, F, HN és L) gén-vég szekvenciájában kisebb különbségek tapasztalhatók. Az L gén esetében a gén-vég szekvencia az IT-227/82 és a Beaudette C törzsekénél egy nt-dal hosszabb (AAUCU₍₇₎ AAUCU₍₆₎ helyett), mint a többi vizsgált NDV törzs esetében, azonban a "trailer" szekvenciájuk egy nt-dal rövidebb, így ez az eltérés nem okoz változást a genom teljes méretében.

5.3.5. Intergénikus régiók

Az összehasonlításhoz felhasznált NDV törzsek intergénikus régióinak adatait szintén a 8. táblázat mutatja. Az NP és P gének közötti szakasz egy nt hosszúságú az IT-227/82 törzsben ugyanúgy, mint a vizsgálatba bevont IV., V., VI. és VII. genotípusú törzsek esetében. Ugyanezen két gén közötti intergénikus régió két nt hosszú a class I főcsoportban, valamint az I. és II. genotípusú izolátumokban, kivételt képez az I. genotípusú I-2 izolátum, melynél egy nt hosszúságú az intergénikus régió. Mivel e törzsek NP génjének gén-vég szignálja egy nt-dal rövidebb, mint az egy nt hosszúságú NP-P intergénikus régióval rendelkező törzseké, ezért itt sem okoz genom-méretbeli változást az eltérés (8. táblázat). Úgy tűnhet, hogy az NP és P gének közötti intergénikus régió hossza és a virulencia között szignifikáns összefüggés van, vagyis az intergénikus régió két nt hosszú avirulens, és egy nt hosszú közepes virulenciájú, illetve virulens törzsek esetén. Újabbban közelebbről az ausztrál I. genotípusú NDV genomok (pl. az I-2 izolátum) NP-P gének közötti intergénikus régiói azonban két nt hosszúságúak függetlenül a törzs virulenciájától. Az F és HN gének közötti régió hossza 31 nt, míg a HN és L gének közötti 47 nt az IT-227/82 törzsnél, ugyanúgy, mint a vizsgált NDV törzsek többségénél, azonban előfordulnak e géneket tekintve 32 és 48 nt hosszúságú intergénikus régióval rendelkező izolátumok is (8. táblázat). Az intergénikus régiók hosszbeli különbségei minden esetben kompenzáltak a tőlük upstream (3') irányban lévő gén-vég szekvencia hosszával, így a teljes genom méretét nem befolyásolják az eltérések.

8. táblázat: Génbankban található NDV genomok összehasonlítása az IT-227/82 gPMV-1 törzssel

Törzs	Gén	Gén szekvencia	Kódoló régió	Fehérje hossza (as)	Gén start (nt)	Gén vég (nt)	Intergénikus régió (nt)
DE-R49/99	NP	56-1801	122-1588	489	10	10	2
N.Ireland/Ulster/67		56-1801	122-1588	489	10	10	2
PHY-LMV42		56-1802	122-1588	489	10	11	1
I-2		56-1801	122-1588	489	10	10	2
B-1/46		56-1801	122-1588	489	10	10	2
LaSota/46		56-1801	122-1588	489	10	10	2
Italien		56-1802	122-1588	489	10	11	1
Herts/33		56-1802	122-1588	489	10	11	1
U.S.(CA)211472/02		56-1808	122-1588	489	10	11	1
U.S.(F1)/44083/93		56-1808	122-1588	489	10	11	1
U.S./Largo/71		56-1808	122-1588	489	10	11	1
IT-227/82		56-1808	122-1588	489	10	11	1
U.S.(CA)/1083(Fontana)/72		56-1808	122-1588	489	10	11	1
goose paramyxovirus SF02		56-1808	122-1588	489	10	11	1
ZJ-1		56-1808	122-1588	489	10	11	1
DE-R49/99	P	1804-3266	1887-3083	399	10	11	1
N.Ireland/Ulster/67		1804-3254	1887-3071	395	10	11	1
PHY-LMV42		1804-3254	1887-3071	395	10	11	1
I-2		1804-3254	1887-3071	395	10	11	1
B-1/46		1804-3254	1887-3071	395	10	11	1
LaSota/46		1804-3254	1887-3071	395	10	11	1
Italien		1804-3254	1887-3071	395	10	11	1
Herts/33		1804-3254	1887-3071	395	10	11	1
U.S.(CA)211472/02		1810-3260	1893-3077	395	10	11	1
U.S.(F1)/44083/93		1810-3260	1893-3077	395	10	11	1
U.S./Largo/71		1810-3260	1893-3077	395	10	11	1
IT-227/82		1810-3260	1893-3077	395	10	11	1
U.S.(CA)/1083(Fontana)/72		1810-3260	1893-3077	395	10	11	1
goose paramyxovirus SF02		1810-3260	1893-3077	395	10	11	1
ZJ-1		1810-3260	1893-3077	395	10	11	1
DE-R49/99	M	3268-4508	3302-4393	364	10	10	1
N.Ireland/Ulster/67		3256-4496	3290-4381	364	10	10	1
PHY-LMV42		3256-4496	3290-4381	364	10	10	1
I-2		3256-4496	3290-4381	364	10	10	1
B-1/46		3256-4496	3290-4381	364	10	10	1
LaSota/46		3256-4496	3290-4381	364	10	10	1
Italien		3256-4496	3290-4381	364	10	10	1
Herts/33		3256-4496	3290-4429	380	10	10	1
U.S.(CA)211472/02		3262-4502	3296-4387	364	10	10	1
U.S.(F1)/44083/93		3262-4502	3296-4387	364	10	10	1
U.S./Largo/71		3262-4502	3296-4387	364	10	10	1
IT-227/82		3262-4502	3296-4387	364	10	10	1
U.S.(CA)/1083(Fontana)/72		3262-4502	3296-4387	364	10	10	1
goose paramyxovirus SF02		3262-4502	3296-4387	364	10	10	1
ZJ-1		3262-4502	3296-4387	364	10	10	1

Törzs	Gén	Gén szekvencia	Kódozó régión	Fehérje hossza (as)	Gén start (nt)	Gén vég (nt)	Intergénikus régión (nt)
DE-R49/99	F	4510-6301	4556-6214	553	10	11	31
N.Ireland/Ulster/67		4498-6289	4544-6202	553	10	11	31
PHY-LMV42		4498-6289	4544-6202	553	10	11	31
I-2		4498-6289	4544-6202	553	10	11	31
B-1/46		4498-6289	4544-6202	553	10	11	31
LaSota/46		4498-6289	4544-6202	553	10	11	31
Italien		4498-6288	4544-6202	553	10	10	32
Herts/33		4498-6288	4544-6202	553	10	10	32
U.S.(CA)211472/02		4504-6295	4550-6208	553	10	11	31
U.S.(F1)/44083/93		4504-6295	4550-6208	553	10	11	31
U.S./Largo/71		4504-6295	4550-6208	553	10	11	31
IT-227/82		4504-6295	4550-6208	553	10	11	31
U.S.(CA)/1083(Fontana)/72		4504-6295	4550-6208	553	10	11	31
goose paramyxovirus SF02		4504-6295	4550-6208	553	10	11	31
ZJ-1		4504-6295	4550-6208	553	10	11	31
DE-R49/99	HN	6333-8333	6424-8178	585	10	10	48
N.Ireland/Ulster/67		6321-8322	6412-8259	616	10	11	47
PHY-LMV42		6321-8321	6412-8259	616	10	10	48
I-2		6321-8322	6412-8145	578	10	11	47
B-1/46		6321-8322	6412-8142	577	10	11	47
LaSota/46		6321-8322	6412-8142	577	10	11	47
Italien		6321-8322	6412-8124	571	10	11	47
Herts/33		6321-8322	6412-8124	571	10	11	47
U.S.(CA)211472/02		6327-8328	6418-8130	571	10	11	47
U.S.(F1)/44083/93		6327-8328	6418-8130	571	10	11	47
U.S./Largo/71		6327-8328	6418-8130	571	10	11	47
IT-227/82		6327-8328	6418-8130	571	10	11	47
U.S.(CA)/1083(Fontana)/72		6327-8328	6418-8130	571	10	11	47
goose paramyxovirus SF02		6327-8328	6418-8130	571	10	11	47
ZJ-1		6327-8328	6418-8130	571	10	11	47
DE-R49/99	L	8382-15084	8393-15004	2204	10	10	
N.Ireland/Ulster/67		8370-15072	8381-14992	2204	10	10	
PHY-LMV42		8370-15072	8381-14992	2204	10	10	
I-2		8370-15072	8381-14992	2204	10	10	
B-1/46		8370-15072	8381-14992	2204	10	10	
LaSota/46		8370-15072	8381-14992	2204	10	10	
Italien		8370-15072	8381-14992	2204	10	10	
Herts/33		8370-15072	8381-14992	2204	10	10	
U.S.(CA)211472/02		8376-15078	8387-14998	2204	10	10	
U.S.(F1)/44083/93		8376-15078	8387-14998	2204	10	10	
U.S./Largo/71		8376-15078	8387-14998	2204	10	10	
IT-227/82		8376-15079	8387-14998	2204	10	11	
U.S.(CA)/1083(Fontana)/72		8376-15078	8387-14998	2204	10	10	
goose paramyxovirus SF02		8376-15078	8387-14998	2204	10	10	
ZJ-1		8376-15078	8387-14998	2204	10	10	

5.3.6. Nukleoprotein (NP)

Az NP gén által kódolt fehérje a paramyxovírusokban, így az NDV-ben is az RNS-hez szorosan kötve található. Egy nukleoprotein molekula 6 nt-dal kapcsolódik, a nukleoproteinnel bevont RNS-t ribonukleoprotein (RNP) komplexnek nevezzük. A replikáció és a transzkripció templátja az RNP-komplex, a meztelen RNS sem replikálódni, sem átíródni nem képes (Kolakofsky és mtsai, 1998). Az IT-227/82 NP génje a többi vizsgált NDV törzshöz hasonlóan 1753 nt hosszúságú, a genomban az 56.-1808. nt-ok között foglal helyet (8. táblázat). Az NP gén 5' nem kódoló szakaszán egy 6 nt hosszúságú inszert (CCCCAA) van jelen az NDV V.-VIII. genotípusához hasonlóan, mely 15192 nt méretű genomot eredményez a 15186 nt hosszúságú helyett. Az IT-227/82 cDNS szekvenciából származtatott NP fehérjéje 489 aminosavból (as) épül fel, ez egybevág a többi NDV törzs azonos fehérjéjének hosszával. A fehérje N-terminálisán lévő 401 as konzerváltak bizonyult, míg a 402. pozíciótól kezdve a C-terminális rész meglehetősen variabilis, más kutatócsoportok tapasztalataihoz hasonlóan (Seal és mtsai, 2002; Pham és mtsai, 2004; Seal és mtsai, 2005).

Az NP fehérje 447.-455. as közötti részén egy neutralizációs epitóp található (Mebatsion és mtsai, 2002), mely az IT-227/82 törzsben teljesen konzervált. Az NP N-terminálisán lévő 25 as érintett a foszfoproteinnel (P) történő kapcsolódásban (Kho és mtsai, 2004), ez a régió az IT-227/82-ben erősen megtartott. A C-terminális 49 as-a egy másik lehetséges szakasz, melyen keresztül az NP és P kapcsolatot létesít, azonban az előbb említett régióal kevésbé fontos (Kho és mtsai, 2004). A C-terminális oldalon egy konzervatív (P₄₇₁L) és néhány nem konzervatív as csere (N₄₆₃D, T₄₆₉I, Q₄₇₀H, P₄₇₅S, P₄₇₇H és G₄₇₈E) történt az IT-227/82 törzsben. Az IT-227/82 genomját összehasonlítottam a génbankban rendelkezésre álló egyéb galamb-NDV szekvenciákkal (APMV1/parakeet/Japan/Chiba/97 (AB124596), APMV1/quail/Japan/Chiba/2001 (AB124609), APMV1/pheasant/Japan/Gunma/85 (AB124595), APMV1/chicken/Japan/Niigata/89 (AB124604), 99299 (AJ306302) és 99106 (AJ306303)), és az NP fehérjében ezen szakaszok alapján nem találtam galamb-specifikus asakat.

5.3.7. Foszfoprotein (P), V- és W fehérje

A P protein az RNS-függő RNS polimeráz kofaktoraként vesz részt az RNS replikációjában és transzkripciójában. Az IT-227/82 P génje 1451 nt hosszú, a többi vizsgált NDV törzs P génjéhez hasonlóan, és az 1810.-3260. nt pozíciók között található a genomban (8. táblázat). A cDNS szekvenciából származtatott P protein 395 as-ból áll, ahogyan az összes

class II-be tartozó NDV-nél is tapasztalható. Ezzel szemben a class I csoport eddig ismert tagjainak P fehérjéje 399 as-ból épül fel, mely egy 12 nt hosszúságú, a P gén kódoló részében található inszertnek köszönhető (Seal és mtsai, 2005; Czeglédi és mtsai, 2006). Erősen variábilis régiók találhatóak a P fehérje 56.-107. és 136.-196. as-ak közötti szakaszain. A P protein 247. és 291. as pozíciói által határolt szakasz fontos szerepet játszik mind az NP-P, mind pedig a P-P interakcióban (Jahanshiri és mtsai, 2005). Ez a régió konzervált az IT-227/82 törzsben, mindössze egy nem konzervatív (L₂₄₉S) és két konzervatív (V₂₄₈I és V₂₇₁L) as cserét tapasztaltam. Az IT-227/82 genomját összehasonlítva a génbankban található egyéb galamb-NDV szekvenciákkal (99299 (AJ415882) és 99106 (AJ415883)), és találtam néhány olyan aminosavat, melyek galamb specifikusnak bizonyultak: E₁₀, T₉₀, A₉₁, K₉₃, D₁₀₃, S₁₅₅, S₂₀₉, S₂₄₉ és L₃₁₄.

A P gén transzkripciója során egy, illetve két – a templát által nem kódolt – guanin inszertálódhat az ún. szerkesztési helynél (editing site) az mRNS-be, így keret-eltolódással a P fehérjén (+0 guanin) kívül két másik fehérje, a V protein (+1 guanin) és a W protein (+2 guanin) mRNS-e is képződik. A P, V és W fehérjék amino-terminális vége közös, karboxi-terminálisuk különbözik mind hosszban, mind pedig aminosav-összetételben (Steward és mtsai, 1993). A szerkesztési hely szekvenciája (478.-485. nt) az IT-227/82 izolátumnál erősen megtartott (UUUUUCCC).

Napjainkig kevés információ áll rendelkezésre a V és W fehérjék funkciójáról. Mai ismereteink szerint a V fehérje közreműködik a replikációban, és virulencia faktorként is szerepet játszik (Mebatsion és mtsai, 2001). A V protein alfa/béta interferon antagonistaként is funkcionál (Huang és mtsai, 2003), és kapcsolatba hozható a gazdatropizmussal is (Park és mtsai, 2003b). A cDNS szekvenciából származtatott V fehérje hossza az IT-227/82 törzsnél 239 as, ami megegyezik az eddig vizsgált összes class II-höz tartozó NDV törzs V fehérjéjének hosszával. A class I csoportnál a cDNS szekvenciából származtatott V protein 245 as hosszú, egyrészt a P gén kódoló régiójában található 12 extra nt-nak, másrészt a stop kodonban létrejött mutációnak köszönhetően (nem közölt eredmény). Az IT-227/82 törzs V proteinjében két erősen variábilis szakaszt találtam, egyik az 56.-107. as-ak közötti régió, amely a P fehérjével identikus rész, a másik a 136. és a 196. as pozíciókkal határolt szakasz. A paramyxovírusok, így az NDV V fehérjéjének C terminális részén is hét konzervatív cisztein található, és ez a domén két Zn²⁺ iont köt meg (Liston és Briedis, 1994; Paterson és mtsai, 1995; Steward és mtsai, 1995). Az IT-227/82-ben az összes cisztein megtartott. Két négy as hosszúságú motívum található a paramyxovírusok V proteinjében, a ₁₈₁HRRE₁₈₄ és a

¹⁹⁹WCNP₂₀₂, melyek konzerváltak. Az IT-227/82 törzsben ezek a motívumok is megtartottak. Az IT-227/82 törzset összehasonlítva génbanki galamb-NDV törzsek szekvenciáival a P fehérjénél már említettekén kívül (as 1.-103.) az alábbi as-ak bizonyultak galamb specifikusnak a V proteinben: K₁₃₆, P₁₄₃, V₁₅₅, R₁₆₃ és S₁₇₀.

Az IT-227/82 törzs cDNS szekvenciájából származtatott W fehérjéje 227 as-ból áll. Ugyanez a hossz tapasztalható a VI. genotípusú U.S.(CA)/1983(Fontana)/72, valamint a VII. genotípusú ZJ1 és liba paramyxovírus SF 02 törzsek esetében, és ez a leghosszabb W fehérje a vizsgált törzseknel. A W fehérje hossza rendkívül variábilis még genotípuson belül is, azonban ugyanaz a hossz többféle genotípusban is előfordulhat (pl. 179 as a II. és V. genotípusban). Úgy tűnik, hogy a W fehérje hossza nem áll kapcsolatban sem a virulenciával, sem a gazdatropizmussal, és nem alkalmazható filogenetikai jegyként. Két erősen variábilis régió található a W proteinben, az egyik a P és V fehérjék megfelelő szakaszával identikus szekvenciájú, 56.-107. as-ak közötti régió, a másik a 136. és 196. as-ak által határolt szakasz. Adataimat génbanki szekvenciákkal összehasonlítva a P és W fehérje közös szakaszain kívül a G₁₃₅, A₁₄₃, V₁₅₈, K₁₇₀, C₂₀₁ és V₂₁₀ as-akat találtam galamb specifikusnak a W fehérjében.

5.3.8. Mátrix (M) protein

Az M protein komplexet képez az NP fehérjével, és a lipidburok belső felületéhez, valamint a felszíni glikoproteinek (F és HN) membránba merülő részéhez is kötődik (Rima, 1989). Az M fehérje a virionok összeszerelésében, illetve azoknak a sejtől való kijutásában vesz részt (Peebles, 1991). Az IT-227/82 M génjének hossza 1241 nt - hasonlóan a többi vizsgált NDV törzshöz - és a genomban a 3262. és a 4502. nt pozíciók között található (8. táblázat). A cDNS szekvenciából származtatott M fehérje 364 as-ból épül fel, ahogyan más NDV törzseknel is (Seal és mtsai, 2000). Kivételt képez ez alól a Herts/33 törzs, melyben az M fehérje hosszát 380 as-nak találták, azonban lehetséges, hogy ez a kirívó eredmény szekvenálási hiba következménye.

Az M fehérje elsősorban a fertőzött sejt sejtmagjában lokalizálódik (Hamaguchi és mtsai, 1985; Faaberg és Peebles, 1988). A nukleuszba történő transzportban és lokalizációban a fehérjén található nukleáris lokalizációs szignál (NLS) vesz részt. Az NLS a paramyxovírusokban két darab 2-2 bázikus aminosav párból áll, ezek néhány aminosavból álló szekvenciával határolódnak el egymástól. Az NLS az NDV-ben a 247. és 263. as pozíciók között található (Coleman és Peebles, 1993), szekvenciája az IT-227/82 törzsben ²⁴⁷RKGKKVTFDKIEGKLR₂₆₃. Az IT-227/82 törzs M proteinjének NLS szekvenciája a

259. pozícióban bázikus aminosav helyett glicint tartalmaz, és ugyanez a helyzet más vizsgált NDV törzsek esetében is, azonban a bázikus aminosav hiánya a 259. helyen nem befolyásolja a nukleáris lokalizációt (Coleman és Peeples, 1993). A C-terminálishoz közel, a 352. és 364. as-ak között található egy másik bázikus as-akban gazdag régió, de mutációs vizsgálatok alapján úgy tűnik, ez a szakasz nem vesz részt a nukleáris lokalizációban (Coleman és Peeples, 1993). Az IT-227/82 genomját összehasonlítottam a génbankban rendelkezésre álló egyéb galamb-NDV szekvenciákkal (99299 (AJ415887), 99106 (AJ415888), US/3981/84 (AY131276), US/21402/98 (AY131278) és US/84 (AY131282)), és az M fehérjénél két galamb-NDV specifikus as-at találtam: R₃₆ és I₁₉₆.

5.3.9. Fúziós (F) protein

Az F protein I. típusú membrán glikoprotein, a fehérje a C-terminális részével merül a membránba. Az F protein fő funkciója a pH függő sejt-fúzió irányítása (Morrison, 2003). Az IT-227/82 törzs F protein génje 1792 nt hosszúságú – ez a hossz jellemző a többi vizsgált NDV törzsrre is, - a genomban elfoglalt helye a 4504. és 6295. nt pozíciók közé esik (8. táblázat). A cDNS-ből származtatott F fehérje 553 as-ból épül fel, ugyanezt tapasztaltuk minden ismert szekvenciájú NDV törzs esetében. Az F fehérje hat lehetséges glikozilációs helyet tartalmaz, ezek a 85., 191., 366., 447., 471. és 542. as pozíciókban találhatók, és közülük négy glikozilált (McGinnes és mtsai, 2001). E helyek mutációja az F protein csökkent fúziós aktivitását és/vagy sejt felszíni expresszióját eredményezi (McGinnes és mtsai, 2001). Az IT-227/82 törzs F proteinjének összes glikozilációs helyét konzerváltak találtam. Az F2 peptid első harminc as-a az F fehérje legvariábilisabb része (Toyoda és mtsai, 1989; Seal, 2004; Seal és mtsai, 2005), ennek ellenére ebben a régióban mindössze 2 szubsztitúció (M₁₄T és I₁₉T) történt az IT-227/82 törzsben. A törzs F proteinjének összes ciszteinje megtartott.

Az NDV virulenciáját elsősorban az F proteinjének 112. és 116. as-ak közötti szakasza határozza meg (Nagai és mtsai, 1976; Toyoda és mtsai, 1987), habár a megfelelő celluláris proteolitikus enzim kötőhelye a 113.-116. pozíciók által határolt régióra korlátozódik (Lomniczi, 2004). Az F proteint hasító celluláris enzimek által felismert kötőhely az IT-227/82 törzsben dibázikus, szekvenciája ¹¹²GRQKR¹¹⁶, ez az as sorrend egyedi, a V_{Ib} genotípus EU_k alcsoportjának jellemzője. A 117. as pozícióban az IT-227/82 törzsben leucin (L) helyett fenil-alanin (F) szerepel, ami szintén a törzs virulens jellegét igazolja. Az F protein fúziós peptidjén (as 117.-142.) belül, a 123. helyen létrejövő szubsztitúció befolyásolja a

fehérje fúziós képességét (Sergel és mtsai, 2001), míg a 128. pozícióban bekövetkező változás a fehérje konformációját módosítja (Sergel-Germano és mtsai, 1994). Mindkét rész megtartott az IT-227/82 törzsben. A 154. pozícióban létrejövő as-csere blokkolja a proteolitikus vágást (Sergel és mtsai, 2001), ezt az as-at is konzervatívnak találtam az IT-227/82 törzsben. A fehérje C-terminális részén, a 496.-526. as pozíciók közötti szakaszon helyezkedik el a transzmembrán domén (Morrison, 2003), ezen belül egy nem konzervatív (S₅₁₁P) és egy konzervatív (F₅₁₄L) szubsztitúciót találtam az IT-227/82 törzsben.

Számos heptád-ismétlődés található az F fehérjében, ezek a felszínen történő expresszióban és a fehérje megfelelő konformációjának létrejöttében játszanak szerepet (Morrison, 2003). A 130. és 170. as-ak között elhelyezkedő HR1 (heptad repeat 1) szakasz konzervatívnak bizonyult az IT-227/82 törzsben, csupán egy nem konzervatív cserét találtam (A₁₃₂S). A HR2 régió a transzmembrán doménnel szomszédos, a 467. és 502. as-ak fogják közre. Ezen a szakaszon egy konzervatív (K₄₈₀R) és egy nem konzervatív (S₄₈₆R) szubsztitúció történt az IT-227/82-ben. A HR3 régió a 263. és 289. as-ak között található. Bizonyított, hogy a szakaszon belül a L₂₆₈A csere csökkent fúziós képességet eredményez, míg a L₂₈₉A szubsztitúció szükségtelenné teszi a HN fehérje fúzióban történő részvételét (Sergel és mtsai, 2000). A HR3 régió, és benne a 268. és 289. pozíció teljesen megtartott az IT-227/82 törzsben.

A 24 as-ból álló citoplazmatikus fark a fehérje C-terminális végén teljesen konzervatívnak bizonyult az IT-227/82-ben. Az F proteinen található neutralizációs epitópok a 157. és 171. as-ak által határolt szakaszon, illetve a 72., 78., 79. és 343. pozíciókban található (Yusoff és mtsai, 1989), érdekes módon kivétel nélkül teljesen konzervatívnak bizonyultak az IT-227/82 törzsben. Az IT-227/82 genomját összehasonlítva génbanki galamb-NDV szekvenciákkal (Japan/Gunma/2000 (AB070434), Japan/Kumamoto/95 (AB070417), Japan/Ibaraki/84 (AB070392), Japan/Shiga/96 (AB070424), dove/Italy/2736/00 (AY562989), Pigeon/Argentina/Tigre 6/99 (AY734535) és P85-4-26 (AY372139)) két VIB specifikus as-at találtam: I₂₀₈ és H₂₅₉.

5.3.10. Hemagglutinin-neuraminidáz (HN) protein

A HN II. típusú membrán glikoprotein, a fehérje az N-terminális végével merül a membránba. A fehérje három funkcióval bír. Felismeri a szialinsav-tartalmú receptorokat a sejt felszínén, hozzájuk kapcsolódik, és neuraminidáz aktivitása révén bontja a szialinsavat. Indukálja az F fehérje által végrehajtott membránfúziót. A fehérje hemagglutinin aktivitása

révén képes a vörösvérsejtek vírus-specifikus receptoraihoz kötődni, és keresztkötések révén agglutinálja azokat.

Az IT-227/82 törzs HN protein génje 2002 nt hosszúságú, - hasonlóan a többi vizsgált NDV törzshöz - a genomban elfoglalt helye a 6327. és 8328. nt pozíciók közé esik (8. táblázat). A HN fehérje hossza NDV törzsekben igen változatos a kódoló régióban jelen lévő vagy hiányzó stop-kodonoknak köszönhetően. Ezek módosítják a kódoló-régió, és ezen keresztül a fehérje hosszát, de nem befolyásolják a gén, és a teljes genom méretét (Sakaguchi és mtsai, 1989). Egy NDV törzs HN proteinjének hosszát általában számszerűen (pl. 577 as), vagy az eddig tapasztalt legrövidebb fehérjehosszhoz (571 as) rendelt extenzióval (pl. 571+6 as) adják meg. A HN fehérje az IT-227/82 izolátumnál 571 as-ból áll. Ugyanezen fehérje az I. genotípusnál sokféle lehet, laboratóriumunkban vizsgált törzsek, és génbanki szekvenciák alapján leggyakrabban a 616 as hosszúsággal találoztunk, de előfordul ebben a csoportban 572, 578, 580, 582 és 585 as-ból álló HN fehérje is. A II. genotípusnál a protein hosszúsága 577 as, míg a IV., V., VI. és VII. genotípusnál 571 as (8. táblázat). A class I csoportba tartozó NDV törzsek HN fehérjéjének hossza az I. genotípushoz hasonlóan nagy változatosságot mutat, találunk itt 572, 574, 580, 585 és 616 as-ból álló HN fehérje-hosszúságokat is. Korábban az I. genotípus esetében csak a 616 as HN fehérjehossz volt ismert, és a class I csoportból nem volt elérhető HN gén-szekvencia a génbankban. Az addig megismert HN gének szekvenciái alapján elmondható volt, hogy a HN fehérje hossza különbségeket mutat avirulens és virulens NDV törzsekben, virulens izolátumoknál rövidebb, míg avirulenseknél hosszabb. Azóta általunk szekvenált és egyéb, génbankban megjelent I. genotípusú és class I csoportba tartozó avirulens NDV törzsek HN génjének nt-sorrendje alapján kijelenthető, hogy a HN fehérje hossza nem áll kapcsolatban a patogenitással, ezt alátámasztották ugyanazon vírus különböző HN fehérje hosszal rendelkező mutánsaival végzett kísérletek is (Römer-Oberdörfer és mtsai, 2003; de Leeuw és mtsai, 2005).

A HN fehérje diszulfid-híd képzésben résztvevő ciszteinjei (Pitt és mtsai, 2000) az IT-227/82 törzsben konzerváltak. A 27. és 54. as pozíciók között található transzmembrán régióban két konzervatív szubsztitúció (M₃₅V és A₄₅V) történt. Az R₁₇₄, I₁₇₅, D₁₉₈, N₂₃₄, R₂₃₅, K₂₃₆, S₂₃₇, C₂₃₈, S₂₃₉, E₄₀₁, R₄₁₆, R₄₉₈, Y₅₂₆ és E₅₄₇ as-ak a fehérje neuraminidáz és/vagy hemagglutinin aktivitásában érintettek (Crennell és mtsai, 2000; Deng és mtsai, 1999; Iorio és mtsai, 2001; Connaris és mtsai, 2002). Az összes említett pozícióban lévő as megtartott az IT-227/82 törzsben. A HN fehérje 6 N-glikozilációs helyet tartalmaz, közülük négy használt a 119., 341., 433., és 481. helyeken, míg az 508. és 538. pozíciókban lévők nincsenek használatban (McGinnes és Morrison, 1995). Az IT-227/82 törzsben az összes N-glikozilációs

helyet konzerváltak találtam. A HN fehérjén két heptád-ismétlődés található, a HR A a 74. és 88. as-ak között, a HR B a 96. és 110. as-ak közé ékelődve helyezkedik el. A heptád-ismétlődéseket érintő L_{74A} és V_{81A} szubsztitúciók megnövekedett neuraminidáz és hemagglutinin aktivitást eredményeznek, azonban csökkentik a fehérje fúzió indukáló képességét. Az L_{74M} csere következtében csökken a neuraminidáz aktivitás, míg I_{102A} szubsztitúció a vad típusú fehérjénél magasabb hemagglutinin, és alacsonyabb fúzió indukációs aktivitással rendelkezik (Stone-Hulslander és Morrison, 1999). Az IT-227/82-ben a HR A és HR B régió is teljesen megtartott. A 218.-226. as-ak közötti szakaszon létrejövő mutációk negatívan befolyásolják a fehérje receptorhoz való kapcsolódásának képességét (Corey és mtsai, 2003), ez a régió az IT-227-ben szintén konzervatívnak bizonyult. Az I_{133L} vagy az I_{140A} szubsztitúciók csökkentik a protein fúzió indukáló képességét (Gravel és Morrison, 2003). Az E₂₅₈, Y₃₁₇, Y₂₆₂, S₄₁₈, S₂₃₇, Y₂₉₉ és E₄₀₁ as-ak a szíalsavhoz, mint szubsztráthoz való kapcsolódásban játszanak szerepet. Az N₁₉₀, S₂₀₂, Q₂₀₄, Y₁₈₈ és N₂₃₄ as-ak a HN fehérjénél a katalitikus hely megfelelő konformációjának kialakításában elengedhetetlenek (Crennell és mtsai, 2000). Az említett as-ak mindegyike megtartott az IT-227/82-ben. Öt neutralizációs epitópot azonosítottak a HN fehérjén, ezek a 193.-201., a 345.-353., és az 513.-521., as-ak között, illetve a 494. és 569. as pozíciókban található (Iorio és mtsai, 1991). Az IT-227/82-ben három szubsztitúció (E_{346G}, D_{348E} és D_{569G}) érinti a HN fehérje e szakaszait. Az IT-227/82 genomját összehasonlítottam a génbankban rendelkezésre álló egyéb részleges galamb-NDV szekvenciákkal (99299 (AJ415886), 99106 (AJ415885), Gxp40 (AY636140), Gxp35 (AY636139) és Gxp22 (AY636138)), és a HN fehérjében nem találtam galamb specifikus as-akat.

5.3.11. RNS-polimeráz (L=large) protein

Az L protein a P fehérjével kapcsolódik, és együtt alkotják az aktív vírus polimerázot, melynek templátja a ribonukleoprotein komplex (NP fehérje az RNS-hez kötve) (Poch és mtsai, 1990). Az L gén az IT-227/82 törzsben 6703 nt hosszúságú – ez a hossz jellemző a többi vizsgált NDV törzsre is, - a genomban elfoglalt helye a 8376. és 15078. nt pozíciók közé esik (8. táblázat). A cDNS-ből származtatott L fehérje 2204 as-ból épül fel, ugyanezt tapasztaltuk minden ismert szekvenciájú NDV törzs esetében. A *Mononegavirales* rendbe tartozó vírusok között az RNS-polimeráz fehérjékben nagyfokú szekvencia hasonlóság tapasztalható, és hat domén ismerhető fel rajtuk, melyek valószínűleg esszenciálisak a polimeráz aktivitáshoz (Poch és mtsai, 1990). A domén I a fehérje 223.-412. as pozíciói

között található, a többi vizsgált NDV törzshöz képest nem történt as szubsztitúció az IT-227/82 e régiójában. Az N-terminális részen lévő 400 as kapcsolódik a P fehérjével, a régió heterogenitása az NDV-n belül kapcsolatos lehet a P fehérje variabilitásával (Holmes és Moyer, 2002; Rima, 1989). Az 503. és 607. as-ak között elhelyezkedő domén II erősen konzervált az IT-227/82-ben, mindössze egy nem konzervatív szubsztitúció (N₅₃₅S) tapasztalható a vizsgált NDV törzsekkel összehasonlítva. A domén II tartalmazza a PreA motívumot, mely az RNS-templát megkötésében fontos régió (Müller és mtsai, 1994), és ez az IT-227/82 törzsben teljesen megtartott. A domén III (as 634.-854.) a hat közül a legkonzervatívabb, négy RNS-polimeráz motívumot tartalmaz: A (as 637.-649.), B (as 708.-733.), C (as 746.-755.) és D (as 816.-828.). Ezek a motívumok valószínűleg mind az RNS-polimerizációban, mind a templát felismerésben fontos szerepet játszanak. Az IT-227/82 törzsben az A, B, C és D motívum is teljesen megtartott. A domén IV a fehérjében a 905.-1070. as-ak között található, és néhány szubsztitúció (A₉₄₇T, V₁₀₃₂A és I₁₀₃₃V) kivételével a régió konzervatív az IT-227/82-ben. Az 1109. és 1356. as-ak között helyet foglaló domén V szintén megtartott az IT-227/82-ben, mindössze egyetlen szubsztitúció (N₁₁₁₀T) tapasztalható a többi NDV törzssel összehasonlítva. A domén VI a fehérjén az 1744.-1821. as-ak között található, és ezen belül egy purin-kötő motívum fedezhető fel, mely szintén szerepet játszik az RNS-templát kötésben (Müller és mtsai, 1994). A motívumban három konzervált aminosav van a paramyxovírusokon belül, ezek az 1756., 1780., és az 1782. pozíciókban találhatók. Mindhárom aminosav megtartott az IT-227/82-ben. Az IT-227/82 genomját összehasonlítottam a génbankban rendelkezésre álló egyéb galamb-NDV szekvenciákkal (chicken/Kenya/KRC-139/94 (AY505066), dove/Italy/2736/00 (AY562989), 99106 (AJ415891) és 99299 (AJ415892)) és az alábbi as-ak bizonyultak VIb specifikusnak: S₂₇₅, S₃₄₀, T₁₀₇₉, R₂₁₂₀ és E₂₁₇₃.

Munkám során öt részletben klónoztam egy galamb-NDV törzs, nevezetesen az IT-227/82 genomját, és a nukleotidsorrend meghatározása után vizsgáltam a törzsben az NDV-re jellemző szabályozó régiókat, a genom, és az NDV különböző fehérjéinek hosszát, a fehérjéken felismerhető funkcionális motívumokat, illetve a fehérje megfelelő konformációjának kialakításában részt vevő as-akat. Az IT-227/82 a recens genotípusok genomméretével rendelkezik, 15192 nt-ból áll. A vizsgált szabályozó szakaszokon lényeges eltérést nem tapasztaltam, az NDV-ben konzervatívnak leírt szakaszokat általában megtartottnak találtam az IT-227/82-ben néhány konzervatív és nem konzervatív as szubsztitúció kivételével, azonban ezek funkcionális hatása nem ismert egyelőre, további

vizsgálatot igényel. Génbanki VIb genotípusba tartozó NDV törzseket az IT-227/82-vel összehasonlítva meghatároztam azokat az as-akat, melyek a mai napig rendelkezésre álló adatok alapján egyedinek tekinthetők a galamb specifikus vírusokban, ezek szerepe a vírus galamb specifitásának kialakításában, különös tekintettel egy esetleges, az L génben felfedezhető mutátor mutációra szintén további vizsgálatokat igényel.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A több mint 100 galamb NDV törzs fúziós fehérje (F) génjének részleges szekvencia analizisével elért eredményeket az alábbiakban foglalom össze.

1) A *járványtani* kapcsolatokkal, és *evolúciós* folyamatokkal kapcsolatban:

a) A galamb eredetű törzsek zöme egy jól körülhatárolt *monofiletikus* ághoz, a V1b/1-hez tartozik a csirkék NDV törzseinek VI. genotípusán belül.

b) A V1b/1 szubtípus négy, időben és/vagy földrajzilag elkülönülő *alcsoporthoz* (iraki, korai európai, recens európai és észak-amerikai), és ezeken belül további variánsokra osztható.

c) Az 1980-as évek elején kezdődő, galambokat érintő kiterjedt járványért a *korai európai* alcsoport vírusai tehetők felelőssé.

d) Újabb, Horvátországból származó galamb-NDV törzsek a V1b/1-től független, és meglehetősen eldivergált V1b/2 alcsoportba tartoznak.

e) A V1b/1 és V1b/2 alcsoportok különállásából látható, hogy a galamb-NDV törzsek *többszörös* - legalább két - gazdaváltási esemény következtében alakultak ki.

f) A filogenetikai vizsgálatok, az aminosav szubsztitúciós analízis, és járványtani megfigyelések alapján a galamb-NDV törzsek eredete Északkelet-Afrikához köthető.

g) Az aminosav-szubsztitúciós analízis során meghatároztuk a V1b/1 szubtípusra, illetve annak alcsoportjaira jellemző közös szerzett aminosav mintázatot, mely megerősítette, illetve kiegészítette a más módon kapott csoportok létezését.

2) A laboratóriumunkban NDV törzsek csoportosítására alkalmazott *restrikciós endonukleáz analízist* sikeresen adaptáltuk galamb-NDV törzsekre.

a) Meghatároztam a galamb-NDV törzseknel jelen lévő, de klasszikus NDV törzsek F génjén korábban nem észlelt *Hin*fl, *Bst*OI és *Rsa*I enzimek vágáshelyeinek pontos helyét.

b) A *Hin*fl, *Bst*OI és *Rsa*I enzimekkel történő analízissel nemcsak a galamb-NDV törzsek azonosítására (az F gén 1601. pozíciójában a *Bst*OI vágáshely hiánya), hanem azok további csoportosítására is lehetőség nyílt. Ezek a csoportok megfelelnek a filogenetikai analízis során felismert alcsoportoknak és variánsoknak.

c) Az általunk kidolgozott restrikciós endonukleáz analízis az első könnyen kivitelezhető, minden laboratórium számára elérhető, és megbízható diagnosztikai módszer galamb eredetű NDV törzsek azonosítására és csoportosítására.

3) Az IT-227/82 jelű, galambból származó NDV törzs genomját sikerült öt átfedő részletben klónozni, és a *teljes nukleotid-sorrendet* megállapítani.

a) Az IT-227/82 galamb-NDV törzs genomja 15192 nukleotidból áll, ez megfelel a recens genotípusoknál (V-VIII.) tapasztalt genomméretnek: 6 nukleotiddal hosszabb, mint a 'standard'-nak számító, 'régí' NDV törzseké (15186 nukleotid). Az inszert - mely szünapomorfiaként értékelhető - a többi recens genotípushoz hasonlóan az NP gén 5' irányban lévő nem kódoló szakaszán található, az 1647. és 1648. nt-ok közé ékelődve.

b) Az IT-227/82 törzs genomján azonosítottam az NDV-re jellemző szabályozó régiókat. Az IT-227/82 „trailer” régiójánál eltérést tapasztaltam, az átlagos 114 nt helyett 113 nt-ból áll, azonban ez a genom méretét nem módosítja, mivel az IT-227/82 L génje az átlagosnál 1 nt-dal hosszabb.

c) Az IT-227/82 törzs nukleotid szekvenciából származtatott NP, P, V, M, F és L fehérjéjének hossza megegyezik a többi NDV törzs azonos fehérjéjének hosszával. A P gén alternatív transzkriptumáról készülő W fehérje 227 aminosavból áll, ezt egyedül a VI. és VII. genotípusú törzseknél láttuk, és ez az eddig vizsgált leghosszabb W fehérje. Az IT-227/82 törzs nukleotid szekvenciából származtatott HN fehérjeje a IV., V., VI. és VII. genotípusú törzsekhez hasonlóan 571 aminosavból áll.

d) Az egyes fehérjék térszerkezetének kialakításában, a fehérje-fehérje kölcsönhatásokban, és a fehérjéken felismerhető funkcionális motívumokban fontos aminosavak általában megtartottak az IT-227/82-ben. Az említett régiókon néhány konzervatív és nem konzervatív aminosav-szubsztitúciót tapasztaltam, ezek funkcionális hatása további vizsgálatokat igényel.

IRODALOMJEGYZÉK

- Aldous, E.W., Mynn, J.K., Banks, J., Alexander, D.J. (2003): A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates by phylogenetic analysis of a partial nucleotide sequence of the fusion protein gene. *Avian Pathol.* 32, 239–257.
- Alexander, D.J., Russell, P.H., Collins, M.S. (1984): Paramyxovirus type 1 infections of racing pigeons: 1 characterisation of isolated viruses. *Vet. Rec.* 114, 444-446.
- Alexander, D.J., Russell, P.H., Parsons, G., Abu Elzein, E.M., Ballouh, A., Cernik, K., Engstrom, B., Fevereiro, M., Fleury, H.J.A., Guittet, M., Kaleta, E.F., Kihm, U., Kusters, J., Lomniczi, B., Meister, J., Meulemans, G., Nerome, K., Petek, M., Pokomunski, S., Polten, B., Prip, M., Richter, R., Sághy, E., Samberg, Y., Spanoghe, L., Tumova, B. (1985): Antigenic and biological characterisation of avian paramyxovirus type 1 isolates from pigeons- an international collaborative study. *Avian Pathol.* 14, 365-376.
- Alexander, D.J., Parsons, G. (1986): Pathogenicity for chickens of avian paramyxovirus type 1 isolates obtained from pigeons in Great Britain during 1983-85. *Avian Pathol.* 15, 487-493.
- Alexander, D.J. (1988): Historical aspects. In: Alexander, D.J. (ed.): Newcastle disease. Kluwer Academic Publishers. Boston, pp. 1-10.
- Alexander, D.J. (1995): The epidemiology and control of avian influenza and Newcastle disease. *J. Comp. Pathol.* 112, 105-126.
- Alexander, D.J., Manvell, R.J., Lowings, J.P., Frost, K.M., Collins, M.S., Russell, P.H., Smith, J.E. (1997): Antigenic diversity and similarities detected in avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates using monoclonal antibodies. *Avian Pathol.* 26, 399-418.
- Alexander, D.J. (2003): Newcastle disease, other avian paramyxovirus and pneumovirus infections. In: Saif, J.M., Barnes, H.J., Glisson, J.R., Fadly, A.M., McDougald, L.R., Swayne, D.E. (Eds), *Diseases of Poultry*. 11th ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, pp. 63-99.
- Alexander, D.J., Bell, J.G., Alders, R.G. (2004): A technology review: Newcastle disease. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/006/y5162e/y5162e00.pdf>
- Asford, R.W. (2003): When is a reservoir not a reservoir. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 1495-1496.

- Ballagi-Pordány, A., Wehmann, E., Herczeg, J., Belák, S., Lomniczi, B. (1996): Identification and grouping of Newcastle disease virus strains by restriction site analysis of a region from the F gene. *Arch. Virol.* *141*, 243-261.
- Ballouh, A., Abu Elzein, E.M., Elmubarak, A.K. (1985): Outbreak of the pigeon paramyxovirus serotype 1 in the Sudan. *Vet. Rec.* *116*, 375.
- Barlic-Maganja, D., Krapez, U., Mankoc, S., Toplak, I., Rojs, O.Z. (2005): Fusion and matrix protein gene sequence analysis of paramyxoviruses of type 1 (PMV-1) isolated from pigeons in Slovenia. *Virus Genes* *31*, 265-273.
- Biancifiori, F., Fioroni, A. (1983): An occurrence of Newcastle disease in pigeons: virological and serological studies on the isolates. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* *6*, 247-252.
- Bogoyavlenskiy, A., Berezin, V., Prilipov, A., Usachev, E., Lyapina, O., Levandovskaya, S., Korotetskiy, I., Tolmacheva, V., Makhmudova, N., Khudyakova, S., Tustikbaeva, G., Zaitseva, I., Omirtaeva, E., Ermakova, O., Daulbaeva, K., Asanova, S., Kydyrmanov, A., Sayatov, M., King, D. (2005): Molecular characterization of virulent Newcastle disease virus isolates from chickens during the 1998 NDV outbreak in Kazakhstan. *Virus Genes* *31*, 13-20.
- Chan, Y.P., Chua, K.B., Koh, C.L., Lim, M.E., Lam, S.K. (2001): Complete nucleotide sequences of Nipah virus isolates from Malaysia. *J. Gen. Virol.* *82*, 2151-2155.
- Chang, P.C., Hsieh, M.L., Shien, J.H., Graham, D.A., Lee, M.S., Shieh, H.K. (2001): Complete nucleotide sequence of avian paramyxovirus type 6 isolated from ducks. *J. Gen. Virol.* *82*, 2157-2168.
- Chare, E.R., Gould, E.A., Holmes, E.C. (2003): Phylogenetic analysis reveals a low rate of homologous recombination in negative-sense RNA viruses. *J. Gen. Virol.* *84*, 2691-2703.
- Coleman, N.A., Peeples, M.A. (1993): The matrix protein of Newcastle disease virus localizes to the nucleus via a bipartite localization signal. *Virology* *195*, 596-607.
- Collins, M.S., Alexander, D.J., Brockman, S., Kemp, P.A., Manvell, R.J. (1989): Evaluation of mouse monoclonal antibodies raised against an isolate of the variant avian paramyxovirus type 1 responsible for the current panzootic in pigeons. *Arch. Virol.* *104*, 53-61.
- Collins, M.S., Bashiruddin, J.B., Alexander, D.J. (1993): Deduced amino acid sequences at the fusion protein cleavage site of Newcastle disease viruses showing variation in antigenicity and pathogenicity. *Arch. Virol.* *128*, 363-370.

- Collins, M.S., Strong, I., Alexander, D.J. (1994): Evaluation of the molecular basis of pathogenicity of the variant Newcastle disease viruses termed 'pigeon PMV-1 viruses'. *Arch. Virol.* *134*, 403-411.
- Connaris, H., Takimoto, T., Russell, R., Crennell, S., Moustafa, I., Portner, A., Taylor, G. (2002): Probing the sialic acid binding site of hemagglutinin-neuraminidase of Newcastle disease virus: identification of key amino acids involved in cell binding, catalysis, and fusion. *J. Virol.* *76*, 1816-1824.
- Corey, E.A., Mirza, A.M., Levandowsky, E., Iorio, R.M. (2003): Fusion deficiency induced by mutations at the dimer interface in Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase is due to a temperature-dependent defect in receptor binding. *J. Virol.* *77*, 6913-6922.
- Crennell, S., Takimoto, T., Portner, A., Taylor, G. (2000): Crystal structure of the multifunctional paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase. *Nat. Struct. Biol.* *7*, 1068-1074.
- Czeglédi, A., Herczeg, J., Hadjiev, G., Doumanova, L., Wehmann, E., Lomniczi, B. (2002): The occurrence of five major Newcastle disease virus genotypes (II, IV, V, VI and VIIIb) in Bulgaria between 1959 and 1996. *Epidemiol. Inf.* *129*, 679-688.
- Czeglédi, A., Wehmann, E., Lomniczi, B. (2003): On the origins and relationships of Newcastle disease virus vaccine strains Hertfordshire and Mukteswar, and virulent strain Herts'33. *Avian Pathol.* *32*, 271-276.
- Czeglédi, A., Ujvári, D., Somogyi, E., Wehmann, E., Werner, O., Lomniczi, B. (2006): Third genome size category of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus) and evolutionary implications. *Virus Res.* *120*, 36-48.
- Czeglédi, A. (2007): Baromfipestis vírus (NDV) genotípusok filogenetikája és evolúciója. PhD-értekezés, ELTE Doktori Iskola, Klasszikus és molekuláris genetika program.
- de Leeuw, O., Peeters, B. (1999): Complete nucleotide sequence of Newcastle disease virus: evidence for the existence of a new genus within the subfamily Paramyxovirinae. *J. Gen. Virol.* *80*, 131-136.
- de Leeuw, O.S., Koch, G., Hartog, L., Ravenshorst, N., Peeters, B.P. (2005): Virulence of Newcastle disease virus is determined by the cleavage site of the fusion protein and by both the stem region and globular head of the haemagglutinin-neuraminidase protein. *J. Gen. Virol.* *86*, 1759-1769.

- Deng, R., Wang, Z., Mahon, P.J., Marinello, M., Mirza, A.M., Iorio, R.M. (1999): Mutations in the NDV HN protein that interfere with its ability to interact with the homologous F protein in the promotion of fusion. *Virology* 253, 43-54.
- Eisa, M., Omer, E.A. (1984): A natural outbreak of Newcastle disease in pigeons in the Sudan. *Vet. Rec.* 114, 297.
- Erickson, G.A., Brugh, M., Beard C.W. (1980): Viscerotropic velogenic Newcastle disease in pigeons: clinical disease and immunization. *Avian Dis.* 24, 257-267.
- Faaberg, K.S., Peeples, M.E. (1988): Strain variation and nuclear association of Newcastle disease virus matrix protein. *J. Virol.* 62, 586-593.
- Felsenstein, J. (1985): Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791.
- Gould, A.R., Kattenbelt J.A., Selleck, P., Hansson, E., Della-Porta, A.J., Westbury, H.A. (2001): Virulent Newcastle disease in Australia: molecular epidemiological analysis of viruses isolated prior to and during the outbreaks of 1998-2000. *Virus Res.* 77, 51-60.
- Gould, A.R., Hansson, E., Selleck, K., Kattenbelt, J.A., Mackenzie, M., Della-Porta, A.J. (2003): Newcastle disease virus fusion and haemagglutinin-neuraminidase gene motifs as markers for viral lineage. *Avian Pathol.* 32, 361-373.
- Gravel, K.A., Morrison, T.G. (2003): Interacting domains of the HN and F proteins of Newcastle disease virus. *J. Virol.* 77, 11040-11049.
- Hamaguchi, M., Nishikawa, K., Toyoda, T., Yoshida, T., Hanaichi, T., Nagai, Y. (1985): Transcriptive complex of Newcastle disease virus. II. Structural and functional assembly associated with the cytoskeletal framework. *Virology* 147, 295-308.
- Han, G.Z., He, C.Q., Ding, N.Z., Ma, L.Y. (2008): Identification of a natural multi-recombinant of Newcastle disease virus. *Virology* 371, 54-60.
- Hanson, R.P., Sinha, S.K. (1951): Epizootic of Newcastle disease in pigeons and studies on transmission of the virus. *Poultry Science* 31, 404-408.
- Harcourt, B.H., Tamin, A., Ksiazek, T.G., Rollin, P.E., Anderson, L.J., Bellini, W.J., Rota, P.A. (2000): Molecular characterization of Nipah virus, a newly emergent paramyxovirus. *Virology* 271, 334-349.
- Herczeg, J., Wehmann, E., Bragg, R.R., Travassos Dias, P.M., Hadjiev, G., Werner, O., Lomniczi, B. (1999): Two novel genetic groups (VIIb and VIII) responsible for recent Newcastle disease outbreaks in Southern Africa, one (VIIb) of which reached Southern Europe. *Arch. Virol.* 144, 2087-2099.

- Herczeg, J., Pascucci, S., Massi, P., Luini, M., Selli, L., Capua, I., Lomniczi, B. (2001): A longitudinal study of velogenic Newcastle disease virus genotypes isolated in Italy between 1960 and 2000. *Avian Pathol.* 30, 163-168.
- Higgins, D.G., Sharp, P.M. (1989): Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. *Comp. Appl. Biosci.* 5, 151-153.
- Holmes, D.E., Moyer, S.A. (2002): The phosphoprotein binding site resides in the N terminus of the L polymerase subunit of Sendai virus. *J. Virol.* 76, 3078-3083.
- Huang, Y., Wan, H.Q., Liu, H.Q., Wu, Y.T., Liu, X.F. (2004): Genomic sequence of an isolate of Newcastle disease virus isolated from an outbreak in geese: a novel six nucleotide insertion in the non-coding region of the nucleoprotein gene. *Arch. Virol.* 149, 1445-1457.
- Huang, Z., Krishnamurthy, S., Panda, A., Samal, S.K. (2003): Newcastle disease virus V protein is associated with viral pathogenesis and functions as an alpha interferon antagonist. *J. Virol.* 77, 8676-8685.
- Ide, P.R. (1987): Virological studies of paramyxovirus type 1 infection of pigeons. *Can. Vet. J.* 28, 601-603.
- Iorio, R.M., Syddal, R.J., Sheehan, J.P., Bratt, M.A., Glickman, R.L., Riel, A.M. (1991): Neutralization map of the hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of Newcastle disease virus: domains recognized by monoclonal antibodies that prevent receptor recognition. *J. Virol.* 65, 4999-5006.
- Iorio, R.M., Field, G.M., Sauvron, J.M., Mirza, A.M., Deng, R., Mahon, P.J., Langedijk, J.P. (2001): Structural and functional relationship between the receptor recognition and neuraminidase activities of the Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase protein: receptor recognition is dependent on neuraminidase activity. *J. Virol.* 75, 1918-1927.
- Ito, T., Goto, H., Yamamoto, E., Tanaka, H., Takeuchi, M., Kuwayama, M., Kawaoka, Y., Otsuki, K. (2001): Generation of a highly pathogenic Avian influenza A virus from an avirulent field isolate by passaging in chickens. *J. Virol.* 75, 4439-4443.
- Jahanshiri, F., Eshaghi, M., Yusoff, K. (2005): Identification of phosphoprotein:phosphoprotein and phosphoprotein:nucleocapsid protein interaction domains of the Newcastle disease virus. *Arch. Virol.* 150, 611-618.
- Johnston, K.M., Key, D.W. (1992): Paramyxovirus-1 in feral pigeons (*Columba livia*) in Ontario. *Can. Vet. J.* 33, 796-800.

- Kaleta, E.F., Alexander, D.J., Russell, P.H. (1985): The first isolation of the avian PMV-1 virus responsible for the current panzootic in pigeons? *Avian Pathol.* *14*, 553-557.
- Kaleta, E.F., Baldauf, C. (1988): Newcastle disease in free-living and pet birds. In: Alexander, D.J. (Ed.), *Newcastle disease*. Kluwer Academic Publishers, Boston, MA, pp. 197-246.
- Kaleta, E.F. (1992a): Unique features of the pigeon PMV-1 infection. In: Kaleta, E.F., Heffels-Redmann, U. (Eds.), *Workshop on Avian Paramyxoviruses*, vol. 27-29. Rauischholzhausen, Germany, pp. 250-261.
- Kaleta, E.F. (1992b): Paramyxoviruses in free-living and captive birds - a brief account. In: Kaleta, E.F., Heffels-Redmann, U. (Eds.), *Workshop on Avian Paramyxoviruses*, vol. 27-29. Rauischholzhausen, Germany, pp. 262-271.
- Kattenbelt, J.A., Stevens, M.P., Gould, A.R. (2006): Sequence variation in the Newcastle disease virus genome. *Virus Res.* *116*, 168-184.
- Kho, C.L., Tan, W.S., Tey, B.T., Yusoff, K. (2004): Regions on nucleocapsid protein of Newcastle disease virus that interact with its phosphoprotein. *Arch. Virol.* *149*, 997-1005.
- Kim, L.M., King, D.J., Curry, P.E., Suarez, D.L., Swayne, D.E., Stallknecht, D.E., Slemons, R.D., Pedersen, J.C., Senne, D.A., Winker, K., Afonso, C.L. (2007): Phylogenetic diversity among low-virulence Newcastle disease viruses from waterfowl and shorebirds and comparison of genotype distributions to those of poultry-origin isolates. *J. Virol.* *81*, 12641-12653.
- Kimura, M. (1980): A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* *16*, 111-120.
- Kissi, B., Erdei, J., Palya, V., Sággy, E., Meder, M., Tanyi, J., Lomniczi, B. (1988): Magyarországon galambból izolált paramyxovírus-1 törzsek virulenciája és a törzsek azonosítása monoklonális ellenanyagokkal. *Magyar Állatorv. Lapja* *43*, 357-360.
- Kissi, B. (1988): Studies on the virulence of pigeon paramyxovirus-1 (PMV-1). I. Changes in the virulence of pigeon PMV-1 strains isolated in Hungary upon passage in chickens, embryonated hen's eggs and pigeons. *Acta Vet. Hung.* *36*, 283-292.
- Kolakofsky, D., Pelet, T., Garcin, D., Hausmann, S., Curran, J., Roux, L. (1998): Paramyxovirus RNA synthesis and the requirement for hexamer genome length: the rule of six revisited. *J. Virol.* *72*, 891-899.
- Kommers, G.D., King, D.J., Seal, B.S., Brown, C.C. (2001): Virulence of pigeon-origin Newcastle disease virus isolates for domestic chickens. *Avian Dis.* *45*, 906-921.

- Krishnamurthy, S., Samal, S.K. (1998): Nucleotide sequences of the trailer, nucleocapsid protein gene and intergenic regions of Newcastle disease virus strain Beaudette C and completion of the entire genome sequence. *J. Gen. Virol.* 79, 2419-2424.
- Lana, D.P., Snyder, D.B., King, D.J., Marquardt, W.W. (1988): Characterization of a battery of monoclonal antibodies for differentiation of Newcastle disease virus and pigeon paramyxovirus-1 strains. *Avian Diseases* 32, 273-281.
- Lee Y.J., Sung, H.W., Choi, J.G., Kim, J.H., Song, C.S. (2004): Molecular epidemiology of Newcastle disease viruses isolated in South Korea using sequencing of the fusion protein cleavage site region and phylogenetic relationships. *Avian Pathol.* 33, 482-491.
- Lister, S.A., Alexander, D.J., Hogg, R.A. (1986): Evidence for the presence of avian paramyxovirus type 1 in feral pigeons in England and Wales. *Vet. Rec.* 118, 476-479.
- Liston, P., Briedis, D.J. (1994): Measles virus V protein binds zinc. *Virology* 198, 399-404.
- Liu, H., Wang, Z., Son, C., Wang, Y., Yu, B., Zheng, D., Sun, C., Wu, Y. (2006): Characterization of pigeon-origin Newcastle disease virus isolated in China. *Avian Dis.* 50, 636-640.
- Liu, X.F., Wan, H.Q., Ni, X.X., Wu, Y.T., Liu, W.B. (2003): Pathotypical and genotypical characterization of strains of Newcastle disease virus isolated from outbreaks in chicken and goose flocks in some regions of China during 1985-2001. *Arch. Virol.* 148, 1387-1403.
- Lomniczi, B. (1998): Egy régi vita a baromfipestisről. *Magyar Állatorv. Lapja* 120, 631-638.
- Lomniczi, B., Wehmann, E., Herczeg, J., Ballagi-Pordány, A., Kaleta, E.F., Werner, O., Meulemans, G., Jorgensen, P.H., Mante, A.P., Gielkens, A.L.J., Capua, I., Damoser, J. (1998): Newcastle disease outbreaks in recent years in Western Europe were caused by an old (VI) and a novel genotype (VII). *Arch. Virol.* 143, 49-64.
- Lomniczi, B. (2004): A madárinfluenza és a baromfipestis (Newcastle-betegség): patogenitás, epidemiológia és evolúció - megjegyzések a betegségek definíciójához. *Magyar Állatorv. Lapja*, 126, 87-100.
- Lomniczi, B., Czeglédi, A. (2005): A baromfipestis története 1. Az NDV molekuláris epidemiológiája és evolúciója. *Magyar Állatorv. Lapja* 127, 707-719.
- Lomniczi, B. (2006): A baromfipestis története: 2. Az NDV ökológiája és a betegség kialakulása. *Magyar Állatorv. Lapja* 128, 13-27.
- Marcos, F., Ferreira, L., Cros, J., Park, M.S., Nakaya, T., Garcia-Sastre, A., Villar, E. (2005): Mapping of the RNA promoter of Newcastle disease virus. *Virology* 331, 396-406.

- Mase, M., Imai, K., Sanada, Y., Sanada, N., Yuasa, N., Imada, T., Tsukamoto, K., Yamaguchi, S. (2002): Phylogenetic analysis of Newcastle disease virus genotypes isolated in Japan. *J. Clin. Microbiol.* *40*, 3826-3830.
- Mayo M.A. 2002. Virus taxonomy – Houston 2002. *Arch. Virol.* *147*, 1071-1076.
- McGinnes, L.W., Morrison, T.G. (1995): The role of individual oligosaccharide chains in the activities of the HN glycoprotein of Newcastle disease virus. *Virology* *212*, 398–410.
- McGinnes, L., Sergel, T., Reitter, J., Morrison, T. (2001): Carbohydrate modifications of the NDV fusion protein heptad repeat domains influence maturation and fusion activity. *Virology* *283*, 332-342.
- Mebatsion, T., Versteegen, S., De Vaan, L.T.C., Römer-Oberdorfer, A., Schrier, C.C. (2001): A recombinant Newcastle disease virus with low-level V protein expression is immunogenic and lacks pathogenicity for chicken embryos. *J. Virol.* *75*, 420-428.
- Mebatsion, T., Koolen, M.J., de Vaan, L.T., de Haas, N., Braber, M., Romer-Oberdorfer, A., van den Elzen, P., van der Marel, P. (2002): Newcastle disease virus (NDV) marker vaccine: an immunodominant epitope on the nucleoprotein gene of NDV can be deleted or replaced by a foreign epitope. *J. Virol.* *76*, 10138-10146.
- Meulemans, G., Van den Berg, T.P., Decaesstecker, M., Boschmans, M. (2002): Evolution of pigeon Newcastle disease virus strains. *Avian Pathol.* *31*, 515-519.
- Morrison, T.G. (2003): Structure and function of a paramyxovirus fusion protein. *Biochim. Biophys. Acta* *1614*, 73-84.
- Müller, R., Poch, O., Delarue, M., Bishop, D.H., Bouloy, M. (1994): Rift Valley fever virus L segment: correction of the sequence and possible functional role of newly identified regions conserved in RNA-dependent polymerases. *J. Gen. Virol.* *75*, 1345-1352.
- Nagai, Y., Klenk, H.D., Rott, R. (1976): Proteolytic cleavage of the viral glycoproteins and its significance for the virulence of Newcastle disease virus. *Virology* *72*, 494-508.
- Park, M.S., Shaw, M.L., Munoz-Jordan, J., Cros, J.F., Nakaya, T., Bouvier, N., Palese, P., Garcia-Sastre, A., Basler, C.F. (2003a): Newcastle disease virus (NDV)-based assay demonstrates interferon-antagonist activity for the NDV V protein and the Nipah virus V, W, and C proteins. *J. Virol.* *77*, 1501-1511.
- Park, M.S., Garcia-Sastre, A., Cros, J.F., Basler, C.F., Palese, P. (2003b): Newcastle Disease Virus V Protein Is a Determinant of Host Range Restriction. *J. Virol.* *77*, 9522-9532.
- Paterson, R.G., Leser, G.P., Shaughnessy, M.A., Lamb, R.A. (1995): The paramyxovirus SV5 V protein binds two atoms of zinc and is a structural component of virions. *Virology* *208*, 121-31.

- Pavozsán, J., Bitay, Z., Sághy, E., Meder, M. (1984): Galambok paramyxovírus okozta járványos megbetegedésének előfordulása a hazai postagalamb állományokban. Magyar Állatorv. Lapja 39, 405-408.
- Pearson, G.L., McCann, M.K. (1975): The role of indigenous wild, semi-domestic and exotic birds in the epizootiology of velogenic viscerotropic Newcastle disease in southern California, 1972-1973. J. Am. Vet. Med. Assoc. 167, 610-614.
- Pearson, J.E., Senne, D.A., Alexander, D.J., Taylor, W.D., Peterson, L.A., Russell, P.H. (1987): Characterization of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus-1) isolated from pigeons. Avian Dis. 31, 105-111.
- Peeples, M.E. (1991): Paramyxovirus M proteins: pulling it all together and taking it on the road. In: Kingsbury D.W., editor. 'The paramyxoviruses'. New York: Plenum; p. 427-456.
- Pham, H.M., Chang, K.S., Mase, M., Ohashi, K., Onuma, M. (2004): Molecular characterization of the nucleocapsid protein gene of Newcastle disease virus strains in Japan and development of a restriction enzyme-based rapid identifying method. Arch. Virol. 149, 1559-69.
- Pitt, J.J., Da Silva, E., Gorman, J.J. (2000): Determination of the disulfid bond arrangement of Newcastle disease virus hemagglutinin neuraminidase. J. Biol. Chem. 275, 6469-6478.
- Poch, O., Blumberg, B.M., Bougueleret, L., Tordo, N. (1990): Sequence comparison of five polymerases (L proteins) of unsegmented negative-strand RNA viruses: theoretical assignment of functional domains. J. Gen. Virol. 71, 1153-1162.
- Qin, Z.M., Tan, L.T., Xu, H.I., Ma, B.C., Wang, Y.L., Yuan, X.Y., Liu, W.J. (2008): Pathotypical characterization and molecular epidemiology of Newcastle disease virus isolates from different hosts in China from 1996 to 2005. J. Clin. Microbiol. 46, 601-611.
- Rima, B. (1989): Comparison of amino acid sequences of the major structural proteins of the paramyxo- and morbilliviruses. In: Kolakofsky D., Mahy B.M.J. (Eds.), Genetics and Pathogenicity of Negative Strand Viruses. Elsevier, Amsterdam, pp. 254-263.
- Rima, B., Alexander, D.J., Billeter, M.A., Collins, P.L., Kingsbury, D.W., Lipkind, M.A., Nagai, Y., Orvell, C., Pringle, C.R., Muelen, V. (1995): Paramyxoviridae. In F.A. Murphy, C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, S.A. Ghabrial, A.W. Jarvis, G.P. Martelli, M.A. Mayo and M.D. Summers (Eds.), Virus Taxonomy. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (pp. 268-274) Vienna: Springer-Verlag.

- Rott, R., Klenk, H.D. (1988): Molecular basis of infectivity and pathogenicity of Newcastle disease virus. In *Newcastle Disease*, pp. 98-112. Edited by D. J. Alexander. Boston: Kluwer Academic Publishers.
- Römer-Oberdörfer, A., Werner, O., Veits, J., Mebatsion, T., Mettenleiter, T.C. (2003): Contribution of the length of the HN protein and the sequence of the F protein cleavage site to Newcastle disease virus pathogenicity. *J. Gen. Virol.* *84*, 3121-3129.
- Saitou, N., Nei, M. (1987): The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* *4*, 406-625.
- Sakaguchi, T., Toyoda, T., Gotoh, B., Inocencio, N.M., Kuma, K., Miyata, T., Nagai, Y. (1989): Newcastle disease virus evolution. I. Multiple lineages defined by sequence variability of the hemagglutinin-neuraminidase gene. *Virology* *169*, 260-272.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Scholtissek, C., Ludwig, S., Fitch, W.M. (1993): Analysis of influenza A virus nucleoproteins for the assessment of molecular genetic mechanisms leading to new phylogenetic virus lineages. Review. *Arch Virol.* *131*, 237-50.
- Scholtissek, C. (1995): Molecular evolution of influenza viruses. Review. *Virus Genes* *11*, 209-15.
- Seal, B.S. (1995): Analysis of matrix protein gene nucleotide sequence diversity among Newcastle disease virus isolates demonstrates that recent disease outbreaks are caused by viruses of psittacine origin. *Virus Genes* *11*, 217-224.
- Seal, B.S., King, D.J., Meinersmann, R.J. (2000): Molecular evolution of the Newcastle disease virus matrix protein gene and phylogenetic relationships among the paramyxoviridae. *Virus Res.* *66*, 1-11.
- Seal, B.S., Crawford, J.M., Sellers, H.S., Locke, D.P., King, D.J. (2002): Nucleotide sequence analysis of the Newcastle disease virus nucleocapsid protein gene and phylogenetic relationships among the Paramyxoviridae. *Virus Res.* *83*, 119-129.
- Seal, B.S. (2004): Nucleotide and predicted amino acid sequence analysis of the fusion protein and hemagglutinin-neuraminidase protein genes among Newcastle disease virus isolates. Phylogenetic relationships among the Paramyxovirinae based on the attachment glycoprotein sequences. *Funct. Integr. Genomics* *4*, 246-257.
- Seal, B.S., Wise, M.G., Pedersen, J.C., Senne, D.A., Alvarez, R., Scott, M.S., King, D.J., Yu, Q., Kapczynski, D.R. (2005): Genomic sequences of low-virulence avian paramyxovirus-1 (Newcastle disease virus) isolates obtained from live-bird markets in

- North America not related to commonly utilized commercial vaccine strains. *Vet. Microbiol.* *106*, 7-16.
- Sergel-Germano, T., McQuain, C., Morrison, T. (1994): Mutations in the fusion peptide and heptad repeat regions of the Newcastle disease virus fusion protein block fusion. *J. Virol.* *68*, 7654-7658.
- Sergel, T.A., McGinnes, L.W., Morrison, T.G. (2000): A single amino acid change in the Newcastle disease virus fusion protein alters the requirement for HN protein in fusion. *J. Virol.* *74*, 5101-5107.
- Sergel, T.A., McGinnes, L.W., Morrison, T.G. (2001): Mutations in the fusion peptide and adjacent heptad repeat inhibit folding or activity of the Newcastle disease virus fusion protein. *J. Virol.* *75*, 7934-7943.
- Steward, M, Vipond, I.B., Millar, N.S., Emmerson, P.T. (1993): RNA editing in Newcastle disease virus. *J. Gen. Virol.* *74*, 2539-2547.
- Steward, M., Samson, A.C., Errington, W., Emmerson, P.T. (1995): The Newcastle disease virus V protein binds zinc. *Arch Virol.* *140*, 1321-1328.
- Stewart, G.H. (1971): Naturally occurring clinical Newcastle disease in the racing pigeon (*Columba livia*). *Veterinary Record* *89*, 225-226.
- Stieneke-Gröber, A., Vey, M., Angliker, H., Shaw, E., Thomas, G., Roberts, C., Klenk, H.D., Garten, W. (1992): Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. *EMBO J.* *11*, 2407-2414.
- Stone-Hulslander, J., Morrison, T.G. (1999): Mutational analysis of heptad repeats in the membrane-proximal region of Newcastle disease virus HN protein. *J. Virol.* *73*, 3630-3637.
- Tantawi, H.H., Al Falluji, M.M., Sheikhly, F. (1979): Viral encephalomyelitis of pigeons: identification and characterization of the virus. *Avian Dis.* *23*, 785-793.
- Terregino, G., Cattoli, C., Grossele, B., Bertoli, E., Tisato, E., Capua, I. (2003): Characterization of Newcastle disease virus isolates obtained from Eurasian collared doves (*Streptopelia decaocto*) in Italy. *Avian Pathol.* *32*, 63-68.
- Toyoda, T., Sakaguchi, T., Imai, K., Inocencio, N.M., Gotoh, B., Hamaguchi, M., Nagai, Y. (1987): Structural comparison of the cleavage-activation site of the fusion glycoprotein between virulent and avirulent strains of Newcastle disease virus. *Virology* *158*, 242-247.

- Toyoda, T., Sakaguchi, T., Hirota, H., Gotoh, B., Kuma, K., Miyata, T., Nagai, Y. (1989): Newcastle disease virus evolution. II. Lack of gene recombination in generating virulent and avirulent strains. *Virology* *169*, 273-282.
- Tsai, H.J., Chang, K.H., Tseng, C.H., Frost, K.M., Manvell, R.J., Alexander, D.J. (2004): Antigenic and genotypical characterization of Newcastle disease virus isolated in Taiwan between 1969 and 1996. *Vet. Microbiol.* *104*, 19-30.
- Van de Peer, Y., De Wachter, R. (1994): TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comp. Appl. Biosci.* *10*, 569-570.
- Varga, J., Tuboly, S., Mészáros, J. (1999): A háziállatok fertőző betegségei II. Állatorvosi járványtan, Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, 439-448.
- Vindevogel, H., Duchatel, J.P. (1988): Panzootic Newcastle disease virus in pigeons. In: Alexander, D.J. (Ed.), *Newcastle Disease*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, pp. 184-196.
- Wang, L.F., Yu, M., Hansson, E., Pritchard, L.I., Shiell, B., Michalski, W.P., Eaton, B.T. (2000): The exceptionally large genome of Hendra virus: support for creation of a new genus within the family Paramyxoviridae. *J. Virol.* *74*, 9972-9979.
- Webster, R.G. (1999): Antigenic variation in influenza viruses. In: Domingo, E., Webster, R., Holland, J. (Eds.), *Origin and Evolution of Viruses*. Academic Press, San Diego, pp. 377-390.
- Wehmann, E. (2000): Baromfipestis vírustörzsek molekuláris genetikai vizsgálat a törzsazonosítás céljából, filogenetikai összefüggések felderítésére. PhD-értekezés, ELTE Doktori Iskola, Klasszikus, molekuláris és evolúciógenetika program.
- Wehmann, E., Czeglédi, A., Werner, O., Kaleta, E.F., Lomniczi, B. (2003a): Occurrence of genotypes IV, V, VI and VIIa in Newcastle disease outbreaks in Germany between 1939 and 1995. *Avian Pathol.* *32*, 157-163.
- Wehmann, E., Ujvári, D., Mazija, H., Velhner, M., Ciglar-Grozdanić, I., Savić, V., Jermolenko, G., Čač, Ž., Prukner-Radović, E., Lomniczi, B. (2003b): Genetic analysis of Newcastle disease virus strains isolated in Bosnia-Herzegovina, Croatia, Slovenia and Yugoslavia reveals the presence of only a single genotype, V, between 1979 and 2002. *Vet. Microbiol.* *94*, 269-281.
- Werner, O., Römer-Oberdörfer, A., Kollner, B., Manvell, R., Alexander, D.J. (1999): Characterisation of avian paramyxovirus type 1 strains isolated in Germany during 1992 and 1996. *Avian Pathol.* *28*, 79-88.

- Wilson, G.W. (1986): Newcastle disease and paramyxovirus 1 of pigeons in the European Community. *World's Poult. Sci. J.* *42*, 143-153.
- Yang, C.Y., Shieh, H.K., Lin, Y.L., Chang, P.C. (1999): Newcastle disease virus isolated from recent outbreaks in Taiwan phylogenetically related to viruses (genotype VII) from recent outbreaks in Western Europe. *Avian Dis.* *43*, 125-130.
- Yu, L., Wang, Z., Jiang, Y., Chang, L., Kwang, J. (2001): Characterization of newly emerging Newcastle disease virus isolates from the People's Republic of China and Taiwan. *J. Clin. Microbiol.* *39*, 3512-3519.
- Yusoff, K., Nesbit, M., McCartney, H., Meulemans, G., Alexander, D.J., Collins, M.S., Emmerson, P.T., Samson, A.C. (1989): Location of neutralizing epitopes on the fusion protein of Newcastle disease virus strain Beaudette C. *J. GenVirol.* *70*, 3105-3109.
- Yusoff, K., Tan, W.S. (2001): Newcastle disease virus: macromolecules and opportunities. *Avian Pathol.* *30*, 439-455.
- Zanetti, F., Mattiello, R., Garbino, C., Kaloghlian, A., Terrera, M.V., Boviez, J., Palma, E., Carillo, E., Berinstein, A. (2001): Biological and molecular characterization of a pigeon paramyxovirus type-1 isolate found in Argentina. *Avian Dis.* *45*, 567-571.
- Zou, J., Shan, S., Yao, N., Gong, Z. (2005): Complete genome sequence and biological characterizations of a novel goose paramyxovirus-SF02 isolated in China. *Virus Genes* *30*, 13-21.

KÖZLEMÉNYEK

A doktori értekezés alapját képező közlemények

- Ujvári, D.**, Wehmann, E., Kaleta, E.F., Werner, O., Savić, V., Nagy, É., Czifra, G., Lomniczi, B. (2003): Phylogenetic analysis reveals extensive evolution of avian paramyxovirus type 1 strains of pigeons (*Columba livia*) and suggests multiple species transmission. *Virus Res.* 96, 63-73.
- Ujvári, D.**, Skáre, J., Fehérvári, T., Pálfi, V., Wehmann, E., Lomniczi, B. (2004): Magyarországon izolált galamb-paramyxovírus-1 törzsek genetikai jellemzése. *Magyar Állatorv. Lapja* 126, 39-47.
- Ujvári, D.**, Wehmann, E., Herczeg, J., Lomniczi, B. (2006): Identification and subgrouping of pigeon type Newcastle disease virus strains by restriction enzyme cleavage site analysis. *J. Virol. Methods* 131, 115-21.
- Ujvári, D.** (2006): Complete nucleotide sequence of IT-227/82, an avian paramyxovirus type-1 strain of pigeons (*Columba livia*). *Virus Genes* 32, 49-57.

A témában megjelent egyéb közlemények

- Wehmann, E., **Ujvári, D.**, Mazija, H., Velhner, M., Ciglar-Grozdanić, I., Savić, V., Jermolenko, G., Čač, Ž., Prukner-Radovčić, E., Lomniczi, B. (2003): Genetic analysis of Newcastle disease virus strains isolated in Bosnia-Herzegovina, Croatia, Slovenia and Yugoslavia reveals the presence of only a single genotype, V, between 1979 and 2002. *Vet. Microbiol.* 94, 269-281.
- Czeglédi, A., **Ujvári, D.**, Wehmann, E., Péntes, Z., Palya, V., Lomniczi, B. (2004): Kísérletek a baromfipestis-vírus genetikai módosítására. I. Minigenom rendszer kidolgozása. *Magyar Állatorv. Lapja* 126, 606-616.
- Czeglédi, A., **Ujvári, D.**, Somogyi, E., Wehmann, E., Werner, O., Lomniczi, B. (2006): Third genome size category of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus) and evolutionary implications. *Virus Res.* 120, 36-48.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenek előtt köszönöm témavezetőmnek, Dr. Lomniczi Bélának, hogy helyet adott nekem témacsoportjában, irányította munkámat, és hogy beszélgetéseink során betekintést nyerhettem az evolúció és a járványtan világába.

Köszönöm Dr. Wehmann Enikőnek, hogy segített a laboratóriumban alkalmazott molekuláris biológiai módszerek elsajátításában.

Köszönettel tartozom továbbá Dr. Czeglédi Alíznek és Somogyi Eszternek a jó hangulatú közös munkáért.