

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

**Rágcsálók és denevérek adenovírusainak
genetikai elemzése**

PhD értekezés

Vidovszky Márton

2015

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Témavezető és témabizottsági tagok:

.....
Dr. Harrach Balázs
MTA Agrártudományi Kutatóközpont
Állatorvos-tudományi Intézet
témavezető

Dr. Benkő Mária
MTA Agrártudományi Kutatóközpont
Állatorvos-tudományi Intézet
témabizottság tagja

Készült 8 példányban. Ez a(z) sz. példány.

.....
Vidovszky Márton

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések	5
2. Összefoglalás	6
2.1. Summary.....	7
3. Bevezetés.....	8
4. Irodalmi áttekintés	10
4.1. Az adenovírusok általános jellemzése.....	10
4.2. Az adenovírusok morfológiája.....	11
4.3. Az adenovírusok replikációja.....	12
4.4. Az adenovírusok genomja	13
4.5. Az adenovírusok rendszertana	14
4.6. Adenovírusok előfordulása rágcsálókban	15
4.7. Adenovírusok előfordulása denevérekben	16
5. Anyag és módszer	18
5.1. Minták eredete.....	18
5.1.1. Rágcsáló minták eredete	18
5.1.2. Denevér minták eredete	18
5.2. Vírusizolálás.....	19
5.3. A virális-DNS tisztítása	19
5.4. Restriktív endonukleáz emésztés	20
5.5. Polimeráz láncreakció.....	20
5.5.1. Célgén és primerek	20
5.5.2. A PCR optimalizálása	21
5.6. Molekuláris klónozás	22
5.7. A DNS szekvenálása	23
5.8. Bioinformatika, filogenetikai számítások	24
6. Eredmények.....	27
6.1. Új adenovírusok kimutatása.....	27
6.1.1. Rágcsálók új adenovírusai	27
6.1.2. Denevér-adenovírusok azonosítása	29
6.2. Genom analízis	34
6.2.1. Murin adenovírus 2	34
6.2.2. Mókusz-adenovírus 1.....	35
6.2.3. Denevér-adenovírus 2	37

7. Megbeszélés	39
7.1. Új adenovírusok.....	39
7.1.1. Rágcsálók adenovírusai	39
7.1.2. Denevérek adenovírusai.....	41
7.2. Genom analízis	49
7.2.1. Murin adenovírus 2	49
7.2.2. Mókus-adenovírus 1.....	57
7.2.3. Denevér-adenovírus 2	59
8. Új tudományos eredmények	64
9. Irodalomjegyzék	65
10. Tudományos publikációk.....	76
10.1. Lektorált, impakt faktorral rendelkező tudományos közlemények	76
10.2. Konferencia összefoglalók.....	76
10.3. A disszertációval szorosan nem összefüggő, adenovírus témájú közlemények.....	77
11. Köszönetnyilvánítás.....	78

1. Rövidítések

AdV	adenovírus	adenovirus
BAdV	bovin adenovírus	bovine adenovirus
bp	bázispár	base pair
BtAdV	denevér-adenovírus	bat adenovirus
CAdV	canin adenovírus	canine adenovirus
DBP	DNS-kötő fehérje	DNA-binding protein
EDS	tyúkok tojáshozam csökkenés szindrómája	egg drop syndrome
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav	ethylenediamine-tetraacetic acid
FAdV	tyúk-adenovírus	fowl adenovirus
FrAdV	béka-adenovírus	frog adenovirus
HAdV	humán adenovírus	human adenovirus
ICTV	Nemzetközi Vírusrendszertani Bizottság	International Committee on Taxonomy of Viruses
ITR	fordított vég-ismétlődés	inverted terminal repeat
MAdV	murin adenovírus	murine adenovirus
MQ	Millipore MilliQ ultradesztillált víz	Millipore MilliQ distilled water
nt	nukleotid	nucleotide
ORF	nyitott leolvasási keret	open reading frame
PCR	polimeráz láncreakció	polymerase chain reaction
RNáz	ribonukleáz	ribonuclease
rpm	fordulat per perc	revolutions per minute
SnAdV	kígyó-adenovírus	snake adenovirus
SqAdV	mókus-adenovírus	squirrel adenovirus
TAdV	pulyka-adenovírus	turkey adenovirus
TP	terminális fehérje	terminal protein

2. Összefoglalás

A denevérekben és rágcsálókban előforduló adenovírusok (AdV) diverzitásának becsléséhez széleskörű, PCR-es szűrővizsgálatot végeztünk, melynek során hazai mintákon kívül Németországban elhullott denevéreket és mókusokat is vizsgáltunk. Eddig ismeretlen adenovírusokat mutattunk ki és részlegesen jellemeztünk két hazai rágcsáló faj, nevezetesen a pirókegér (*Apodemus agrarius*) és a mezei pocok (*Microtus arvalis*) egyedeiben. Egy harmadik, új AdV-t állatkertben tartott kapibarában, azaz vízidisznóban (*Hydrochoerus hydrochaeris*) találtunk. Vadon élő pirókegerekben többször kimutattuk a nemrégiben Szlovákiában leírt murin adenovírus 3-at (MAdV-3) is, továbbá német mókusokból származó minták vizsgálatával a kontinensen először bizonyítottuk a korábban csak Nagy-Britanniában felismert mókus-AdV-1 jelenlétét. Ennek genomjából 20.602 bázispár (bp) méretű, 17 gént magában foglaló szakasz nukleotid-sorrendjét is meghatároztuk. A hazánkban előforduló összes denevérfajt reprezentáló, több mint 150 minta szűrése során 13 új AdV jelenlétét derítettük fel. Tizenhét denevérfaj egyedeiből származó, közel 200 német mintát is vizsgáltunk. Ezekben, 18 a tudomány számára új és 3 korábban más országokban már kimutatott adenovírust mutattunk ki.

Két vírus teljes genom-szekvenciájának meghatározásában és elemzésében vettem részt. Ezek egyike a házi egérből izolált MAdV-2 volt, melyet svájci együttműködésben vizsgáltunk. A MAdV-2 genomja meglepően hosszúnak (35.203 bp) bizonyult főként a másik két MAdV-hoz viszonyítva. Megállapítottam, hogy a jelentős méretkülönbség elsősorban a gének hosszának, és nem azok nagyobb számának tudható be. A filogenetikai számítások alapján kiderítettük, hogy a MAdV-2 nagyobb mértékben különbözik a másik két MAdV-tól, mint azok egymástól, ezért indokolt a besorolására fenntartott új vírusfaj (*Murine mastadenovirus B*) bevezetése. A másik vírus a közönséges törpedenevérből (*Pipistrellus pipistrellus*) Németországban izolált, 2-es típusú denevér-adenovírus (BtAdV-2) volt, amelyet német kutatókkal vizsgáltunk. Ennek genomanalízise és filogenetikai elemzése során megállapítottam, hogy szintén önálló fajt (*Bat mastadenovirus B*) képvisel. Erre vonatkozó javaslatainkat a Nemzetközi Vírusrendszertani Bizottság által elfogadták.

Igazoltam, hogy a hazai pirókegerekben talált MAdV-3-ban az E1B 19K gén teljes, vagyis a hasonló mastadenovírusokéval közel azonos hosszúságú, 174 aminosavból álló változata van jelen. Ezzel szemben a szlovákiai MAdV-3 izolátum GenBank-ban található genomjában ez a gén egy stop kodont eredményező mutáció következtében csonka. A 23 aminosavat követő stop kodon utáni rész azonban homológ a 19K fehérjék megfelelő szakaszával.

2.1. Summary

Comprehensive PCR screenings were made to estimate the diversity of adenoviruses (AdVs) in rodents and bats. Besides the domestic samples, we tested dead bats and squirrels originating from Germany. We detected and partially characterized previously unknown AdVs in the individuals of two local rodent species, the striped field mouse (*Apodemus agrarius*) and the common vole (*Microtus arvalis*). A third novel AdV was detected in the sample of a zoo animal, namely a capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*). In the Hungarian population of the striped field mouse, we demonstrated the presence of murine adenovirus 3 (MAdV-3), which has been described in Slovakia recently. The presence of the squirrel AdV-1 (SqAdV-1), a virus that had been detected only in Great Britain previously, was proven by us in Germany during the examination of dead captive squirrels. The sequence of a 20,602-bp-long genome fragment of the SqAdV-1, encompassing 17 genes, was determined. By screening a collection of more than 150 samples, representing every bat species that is known to occur in Hungary, we revealed the presence of 13 novel AdVs. We also tested a sample collection from Germany with about 200 samples representing 17 bat species. Eighteen novel AdVs were detected in these samples. Additionally, we demonstrated the presence of 3 AdVs, which have already been reported in other countries previously.

I participated in the determination and analysis of the full genomic sequence of two AdVs. In a Swiss collaboration, we studied the MAdV-2, isolated from house mouse. The length of its genome (35,203 bp) was found to be surprisingly long, especially compared to the other two MAdVs. The substantial size difference could primarily be attributed to the longer length rather than the greater number of the genes. The phylogeny reconstructions also confirmed that the MAdV-2 is more different from the other two MAdVs than those from each other. Thus the introduction of a new viral species (*Murine mastadenovirus B*) was justified. The other AdV was the bat adenovirus 2 (BtAdV-2) isolated from a common pipistrelle (*Pipistrellus pipistrellus*) in Germany. In collaboration with the German colleagues, we sequenced and annotated the entire genome of BtAdV-2. The phylogenetic analyses also supported our conclusion that this virus represents a new species (*Bat mastadenovirus B*). Our taxonomic proposals were approved by the International Committee on Taxonomy for Viruses (ICTV).

I proved that in the MAdV-3, circulating among the Hungarian striped field mice, a full variant of the E1B 19K gene is present. This gene has a length (174 amino acid) almost identical to that of its counterparts in other AdVs, while the Slovakian prototype MAdV-3 strain, deposited to the GenBank contains a truncated version of the E1B 19K. Due to a mutation, a stop codon is present after the 23rd aa. However, the rest of the aa sequence is also homologous with the corresponding part of the 19K proteins of other AdVs.

3. Bevezetés

Az adenovírusok (AdV) burok nélküli, közepes méretű (70-90 nm), ikozaéder alakú, duplaszálú DNS-vírusok. DNS-ük lineáris felépítésű. Az első AdV-okat amerikai katonák garatmandulájából (adenoid) izolálták, innen ered az elnevezésük. Az AdV-okra jellemző, hogy primér fertőzéskor csupán enyhe felső légúti panaszokat okoznak enyhe lázzal kísérve. Állatorvosi viszonylatban néhány AdV komolyabb megbetegedéseket is okozhat, ezek oka az AdV gazdaváltása lehet, mely során az új gazdaszervezet még nem megfelelően alkalmazkodott a vírushoz.

Munkám kezdetekor a murin adenovírusok (MAdV-ok) közül csupán az 1-es típus (MAdV-1) teljes genomszekvenciája volt ismert (Davison et al., 2003). Ez a vírus bizonyos egérvonalak újszülött egyedeiben encephalomyelitist okoz (Hartley & Rowe, 1960; Guida et al., 1995). Ezzel szemben a szintén régóta ismert, de genomszekvencia szinten még nem vizsgált MAdV-2 enyhébb, főként hasmenéses tüneteket eredményez. A két vírus genomja közötti jelentős eltérést a vírus-DNS restrikciós enzimes analízise alapján feltételezték (Jacques et al., 1994a). Mivel a rágcsálók adenovírusai jó modellek lehetnek az AdV-ok humán gyógyászatban való esetleges felhasználásának vizsgálatához, célul tűztük ki a MAdV-2 teljes genomjának molekuláris feltérképezését. Miközben a MAdV-2 genomanalízisen dolgoztunk, Szlovákiában egy MAdV-3-as típust is izoláltak (pirókegéből), teljes genomszekvenciáját megfejtették és értelmezték (Klempa et al., 2009). Máig csupán ez a 3 MAdV genom ismert.

Hasmenéses tüneteket mutató vörös mókusokból (európai mókus vagy közönséges erdeimókus, *Sciurus vulgaris*), hazai kutatókkal együttműködve írtak le új AdV-t (Sainsbury et al., 2001). A mókusok Észak-Nyugat Angliából származtak. Ezt követően több esetet is leírtak Cumbria-ban (Duff et al., 2007), Anglesey szigetén Wales-ben (Everest et al., 2008), Skóciában (Everest et al., 2010a) és Nagy-Britannia további tartományában is (Everest et al., 2010b). Az elhullott állatok béltartalmának elektronmikroszkópos vizsgálatával AdV-nak látszó partikulumokat találtak, amiből látszólag sikerült AdV-t izolálni egér eredetű sejtenyészeten. A második passzázst követően azonban a vírus replikációja leállt. Az „izolált” vírus hexon génjének egy rövid szakaszának szekvenciáját meghatározták. A filogenetikai elemzések kimutatták, hogy a mókus-adenovírus 1 (SqAdV-1) mastadenovírus, jól elkülönül az eddig ismert AdV-októl, és külön fajt képvisel (Sainsbury et al., 2001; Benkő et al., 2005; Martínez-Jiménez et al., 2011). Nagy-Britannián kívül, Németországban, ottani kollégáinkkal együttműködve elsőként mutattunk ki AdV-t mókusokban (Peters et al., 2011). Az első kísérletekkor úgy tűnt, hogy sikerült izolálniuk a vírust, ezért kezdtük el a genomjának szekvenálását. A későbbi passzázsok során azonban a vírus nem szaporodott

tovább. Fontosnak tartottuk további szűrővizsgálatok elvégzését más rágcsálófajok AdV-aira, újabb potenciális AdV modellek felfedezése érdekében.

A denevérek népszerű alanyai a víruskutatásoknak, hiszen bizonyítottan rendkívül sok és érdekes vírus hordozói. Adenovírust eddig csak külföldön izoláltak denevérből, így elhatároztuk a magyarországi denevérfauna minden fajra kiterjedő átfogó AdV szűrését. A denevér-AdV-okkal való munkánk kezdetekor csupán Japánban (rjúkjú szigetek repülőkutyaiból, *Pteropus dasymallus yayeyamae*), volt ismeretes AdV izolátum (BtAdV-1). Szűrővizsgálataink kezdetekor egy németországi denevér-AdV izolálása kapcsán keresték meg laboratóriumunkat a vírus molekuláris jellemzésében való segítség kérésével. Ezt a vírust közönséges törpedenevérből (*Pipistrellus pipistrellus*) izolálták, és a BtAdV-2 nevet kapta. A BtAdV-2 genom-analízise óta Kínában (*Myotis ricketti*-ből – BtAdV-3) és Indiában (Leschenault-repülőkutyaiból, *Rousettus leschenaultii*) is izoláltak AdV-t, de a BtAdV-ok közül máig is csak a BtAdV-3 AdV genom-szekvenciáját határozták meg a BtAdV-2-n kívül.

4. Irodalmi áttekintés

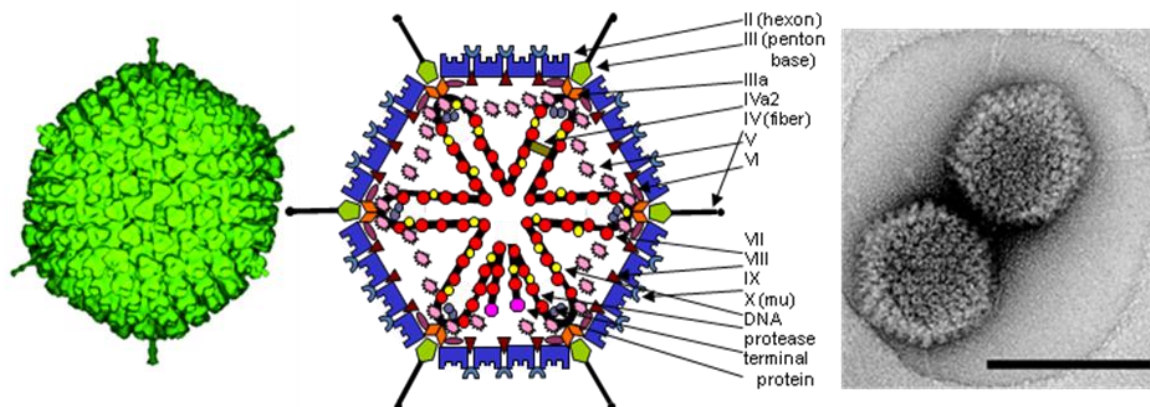
4.1. Az adenovírusok általános jellemzése

Az adenovírusokat több mint hat évtizeddel ezelőtt fedezték fel frissen bevonult amerikai katonák között tömegesen jelentkező felsőlégúti megbetegedések célzott, oktani vizsgálata során. Kiderült, hogy ugyanez az ágens műtétilag eltávolított garatmandulákból (adenoide) készített sejttenyészetek spontán degenerációját is okozhatja. A jellegzetes sejtlekerekedést kiváltó citopatogén vírusnak ezért az adenovírus nevet adták (Rowe et al., 1953). Az első humán AdV-ok felismerését hamar követte az állati AdV-ok izolálása is. Ezek egy részét állati szövettényészetek készítése közben sikerült izolálni. Az újonnan kimutatott vírusokat szerológiai módszerekkel különítették el egymástól. Jelenlegi ismereteink szerint AdV-ok az egész világon minden főbb gerinces osztály képviselőiben előfordulhatnak (Russell & Benkő, 1999). Kimutatásukra napjainkban a PCR és ezt követő szekvenálás a leggyorsabb és leghatékonyabb módszer. Úgy tűnik, hogy az AdV-ok DNS-függő DNS-polimeráz (pol) enzimjének legmegőrzöttebb aminosavjai alapján tervezett, úgynevezett konszenzus primerekkel működő, kétkörös (nested) PCR bármely gerinces gazdában előforduló AdV kimutatására alkalmas lehet (Wellehan et al., 2004).

Az adenovírussal való primér fertőzés általában csak enyhe felsőlégúti panaszokkal és alacsony lázzal jár. A vírus gyakran nem eliminálódik teljesen, hanem éveken, évtizedeken át a szervezetben marad (perzisztencia). Immunhiányos, vagy szervátültetés, illetve sugárterápia miatt immunszupresszált egyéneknél az adenovírusok akár halálos kimenetelű betegséget is okozhatnak (Benkő, 2008). Az adenovírusokra általában jellemző a gazdaspecificitás, de ismert néhány olyan AdV típus is, amely több faj egyedeit is megbetegítheti. Ilyen például az állatorvosi szempontból igen jelentős pulyka-AdV-3 (TAdV-3), ami pulykákban vérzéses bélgyulladást, fácánokban úgynevezett „márványláp” betegséget, míg házityúkban lép-megnagyobbodással járó betegséget (splenomegalia) okozhat. Tyúkokban a tojáshozam csökkenéssel járó szindrómát (egg drop syndrome; EDS) a kacska-AdV-1 (DAdV-1) idézi elő, amelynek jelenlétét számos vad madárfaj és vízi szárnyasok egyedeiben is kimutatták (Bartha et al., 1982; Bartha, 1984; Ivanics et al., 2001). Külön említendő a kutyák fertőző májgyulladásának (infectious canine hepatitis) vírusa a canin AdV-1 (CAdV-1), amelytől szerológiailag el nem különíthető a CAdV-2, az úgynevezett „kennel-köhögés” kórokozója. A két CAdV genomja azonban jellegzetes eltéréseket mutat. A CAdV-ok előfordulását több ragadozófaj egyedeiben is kimutatták, így többek között rókában, farkasban, sakálban, medvében, mosómedvében és bűzös borzban (szkunk) is (Kiss et al., 1996b; Bronson et al., 2014).

4.2. Az adenovírusok morfológiája

Az adenovírusok membránburok nélküli, közepes méretű (70–90 nm átmérőjű), duplaszálú DNS-vírusok. A vírusrészecske (virion) ikozaéder alakú. A fehérjetokot (kapszidot) 252 morfológiai egység (kapszomer) alkotja. A 240 fő-kapszomer (hexon) közül 120 az ikozaéder háromszögletű lapjain, míg 120 az éleken helyezkedik el. A hexonok három azonos alegységből (homotrimer) épülnek fel (1. ábra). A virion belseje felé tekintő, hidrofób talapatukat rendkívül megőrzött aminosav motívumok alkotják. Ezzel szemben a virion felszínén elhelyezkedő, hidrofil hurok (loop) régiók nagyon változatosak, szerotípusonként eltérő aminosav szakaszokat (1-től 7-ig számozott, úgynevezett hipervariábilis régiókat) tartalmaznak. A hexon fehérjék tehát nemzetség-, faj-, és típus-specifikus antigén epitópokat hordoznak. Az ikozaéder 12 csúcsán található kapszomereket pentonnak nevezzük. Ezek a pentonbázisból (pentonalap) és az abból kinyúló fiberből állnak. Az emlősök adenovírusaiban csúcsonként egy fiber fordul elő, míg a madarak aviadenovírusainak pentonbázisából (egy vagy két gén által kódolt) két fiber indul. Nemrégiben leírtak egy gyík-adenovírust, amelynek néhány pentonalapján 3 fibert lehetett megfigyelni (Pénzes et al., 2014). A fiber fehérje szintén homotrimer, azaz 3 azonos alegységből áll. Szerkezetileg is három részre osztható, nevezetesen a pentonbázisba ékelődő farkra (tail), a típusonként változatos (9–75 nm) hosszúságú szárra (shaft) és a disztálisan elhelyezkedő, globuláris fejre (knob). A vírus a fiber feji részével kapcsolódik a sejtfelszíni receptorhoz, ami a HAdV-2, és számos más AdV esetén a CAR (coxsackie-adenovirus-receptor). A szár megtört vagy ívelt is lehet, így segítve az integrinekhez való kapcsolódást. A fiber felelős egyes AdV-ok hemagglutinációs képességéért is.



1. ábra: A humán AdV-2 szerkezetének és felépítésének 3D modellje és sematikus rajza. A tyúk-AdV-9 elektronmikroszkópos képe; megfigyelhető, hogy a csúcsokon két fibernyúlvány foglal helyet. A mércé 100 nm-t jelöl (Harrach et al., 2011).

A vírus magját (core) a virális DNS, és az azzal komplexet alkotó V, VII, X jelű és a terminális fehérje alkotja (San Martin, 2012). A IIIa, VI és VIII jelű fehérjék helyzetét a virionban csak valószínűsíteni lehet. Feltehetően a IIIa két monomerje áthatol az éleknél elhelyezkedő hexonokon. A VI-os fehérjék a pentonbázisokat körülvevő hexonok alatt gyűrűt alkotnak, míg a VIII-as fehérje a hexonok belső felületén helyezkedik el. A VI-os és VIII-as fehérjék a kapszidhoz képest meglehetősen hosszú vírusgenom feltekeredésében és rögzítésében a hisztonokhoz hasonló, de egyelőre pontosan nem tisztázott módon vesznek részt. Ezek felelősek a mag és a kapszid összekapcsolódásáért is (Russell, 2009).

4.3. Az adenovírusok replikációja

Az adenovírusok replikációs ciklusára vonatkozó ismereteink alapvetően a humán AdV-ok (HAdV-2 és 5) vizsgálatából erednek, és nyilvánvalóan nem vonatkoztathatók a víruscsalád minden tagjára. A fiber feji részének a megfelelő sejtreceptorhoz való kapcsolódását követően a pentonbázis RGD motívuma kölcsönhatásba lép a sejtfelszíni integrinokkal, és a virion endocitózissal a sejtbe jut. Az endoszómában a kapszid lebomlik, majd a vírus szabaddá vált DNS-e a sejtmagba szállítódik. Itt a gazdasejt II-es típusú RNS-polimeráz enzimjének segítségével megkezdődik az mRNS transzkripció. A vírus korai géntermékei leállítják a gazdasejt saját DNS-, RNS- és fehérje-szintézisét, és előkészítik a virális DNS-replikációját. Az mRNS-ek érése alatt splicing folyamatok mennek végbe, így bizonyos gének kifejeződésekor a genomon egymástól távolabb elhelyezkedő exonokról fordítódik le a fehérje. Ilyen pl. a mastadenovírusoknál a DNS-polimeráz, a IVa2, a pTP vagy a 33K fehérje génje. Megjegyzendő, hogy a splicing mechanizmus jelenségét épp az adenovírusok génkifejeződésének tanulmányozása során fedezték fel (Berget et al., 1977; Chow et al., 1979). A sejtmagban felhalmozódó új virionok tipikus sejtmagzárványokat képeznek, amelyekben elektronmikroszkóppal megfigyelhetők a párhuzamos sorokba rendeződött kapszidok, az úgynevezett parakristályok. A virionok éréséhez szükséges a vírus által kódolt proteáz (endopeptidáz) enzim működése. A prekurzorként keletkező, és a proteáz hasítása nyomán érő fehérjéket az AdV-ok esetében p előtag jelöli (pl. pTP, pIIIa, pVI, stb.). Összeépülésük után a virionok sokáig sejthez kötve maradhatnak, de a sejt lízise után ki is szabadulhatnak.

Az AdV-ok szinte utolérhetetlen hatékonysággal termelik fehérjéiket, ezért alaposan tanulmányozott vektorok, sőt kereskedelmi forgalomban is kapható már HAdV-5 alapú eukarióta génkifejező rendszer. Eredményes alkalmazásuk elképzelhető mind a humán orvoslás, mind az állategészségügy terén génterápiában, daganat-ellenes kezelésekben és különböző kórokozók elleni modern, rekombináns vakcinák fejlesztésében.

4.4. Az adenovírusok genomja

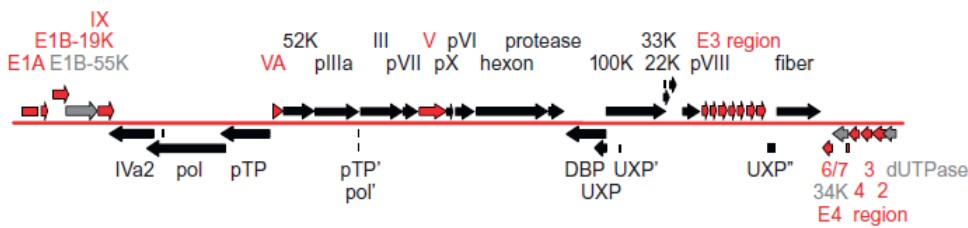
Az adenovírusok lineáris, duplaszálú-DNS genomja közepes hosszúságú. Az eddig tanulmányozott AdV-ok DNS-ét 26 és 48 ezer bp közöttinek találták, meglehetősen változatos (33,6% és 67,6% közötti) G+C tartalommal (Harrach, 2014). A genomvégeken úgynevezett fordított ismétlődő végszakaszok (ITR) vannak, melyek hossza az ismert vírusoknál 30 és 371 bp közötti lehet. A gének kifejeződésének időbelisége alapján a genomot korai (early) és késői (late) régiókra oszthatjuk, melyeket angol elnevezésük alapján E vagy L betűvel jelölünk. A DNS-molekula mindkét szála kódol, így megkülönböztetjük a jobbra illetve balra átíródó, *r* és *l* szálat, melyek 5' végéhez kovalens kötéssel kapcsolódik egy-egy terminális fehérje (TP) molekula.

Az AdV-ok genomjának középső része az egész víruscsalád valamennyi tagjában nagyfokú megőrzöttséget mutat. Ezt az E2A és B korai régió, valamint az ezek között elhelyezkedő L régió alkotja (Rusvai et al., 2000). Az E2A kódolja a DNS-kötő fehérjét (DBP), az E2B pedig a pTP-t, a DNS-függő DNS-polimerázt és a IVa2 fehérjét, ami többek között a genomiális-DNS kapszidba épüléséért (encapsidation) felelős. Az L régió, amely az mRNS átíródása alapján több transzkripciós egységre osztható, a virion felépítő szerkezeti fehérjék génjeit tartalmazza. Elnevezésük a legrégebb óta és legintenzívebben kutatott HAdV-ok megfelelő régióinak neve alapján történt. Itt található az V-ös fehérje génje, amely kivételnek számít, mivel csak a *Mastadenovirus* nemzetség tagjaiban fordul elő.

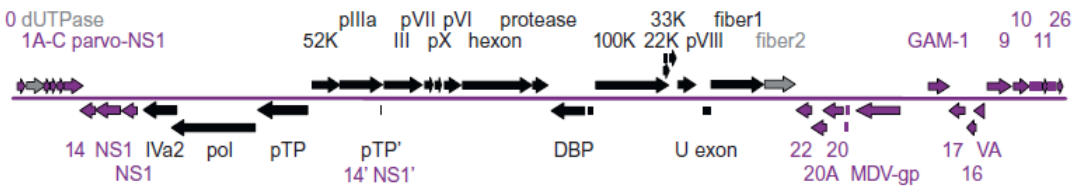
A genom két szélső részét alkotó régiók mind méretük, mind genetikai tartalmuk tekintetében igen változatosak. Az itt található gének többsége csak egy-egy nemzetségen belül megőrzött, de néha még azonos nemzetségek vagy fajok tagjai között is nagy változatosságot, esetenként csak kisfokú hasonlóságot mutatnak. A *Mastadenovirus* genus tagjaiban a genom bal végén, az *r* szálon az E1 régió, míg a genom jobb végén, az *l* szálon az E4 régió található. E két régió génjei a vírusreplikáció beindításában és a gazdasejt transzkripciós mechanizmusának megváltoztatásában játszanak fontos szerepet. A pVIII és fiber fehérjék génje között találjuk az E3 régiót, amelynek mérete és tartalma szintén nagyon változatos lehet. A *Mastadenovirus* genus tagjai közül a rágcsálók adenovirusaiban találjuk a legegyszerűbb E3 régiót, esetenként mindössze egyetlen nyitott leolvasási kerettel (ORF), míg egyes főemlős-AdV-okban akár 9 gén is található itt. Az E3 régió génjei a gazdaszervezet vírus elleni védekező mechanizmusának kikerülését hivatottak szolgálni.

Az egyes AdV nemzetségek egy-egy tipikus képviselőjének genomtérképét mutatja be a 2. ábra, amelyen a változékony régiók mérete és genetikai tartalma jól összehasonlítható. Az ábrán nem szerepel a legújabban bevezetett *Ichtadenovirus* nemzetség, mert a fehér tok-AdV teljes genom-szekvenciáját még nem közölték.

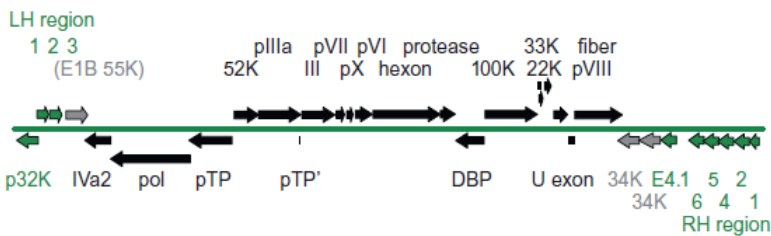
Mastadenovirus (human adenovirus 2)



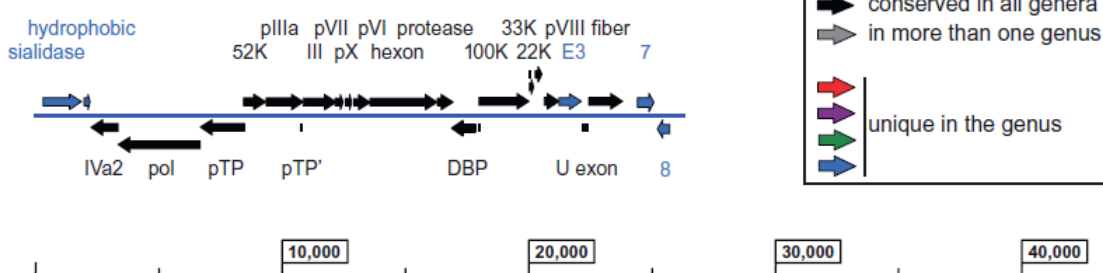
Aviadenovirus (fowl adenovirus 1)



Atadenovirus (ovine adenovirus 7)



Siadenovirus (frog adenovirus 1)



2. ábra: Négy adenovírus nemzetség egy-egy tipikus képviselőjének sematikus genomterképe. A géneket nyilak jelzik, amelyeknek színe az adott gén megőrzöttségét mutatja. Fekete: a család eddig megismert minden tagjában előfordul; szürke: egynél több nemzetségben; színes: csak az adott nemzetség tagjaiban előforduló gén (Harrach et al., 2011).

4.5. Az adenovírusok rendszertana

Az *Adenoviridae* családot jelenleg öt nemzetségre osztják, melyek közül három megfelel a gerinces gazda-eredet alapján történt beosztásnak (Harrach et al., 2011). Így a *Mastadenovirus*, az *Aviadenovirus* és az *Ichtadenovirus* nemzetségek tartalmazzák azokat az AdV-okat melyeknek a gazdái csak emlősök, madarak vagy a fehér tok (Harrach & Kaján, 2011; Mei et al., 2011). A mastadenovírusok közé tartozik az eddig ismert összes rágcső- és denevér-adenovírus is (Klempa et al., 2009; Li et al., 2010b) A legújabban elfogadott

Ichtadenovirus nemzetség egyetlen tagja a fehér tok (*Acipenser transmontanus*) adenovirusa (Kovács et al., 2003; Benkő & Doszpoly, 2011).

A szekvencia alapú, részletes molekuláris elemzések lehetőségének megjelenésével új távlatok nyíltak az adenovírusok rendszerezésében. A genomszerveződés, egyes szekvenciasajátosságok és a filogenetikai rokonság mértéke megfelelő támpontot biztosítanak az AdV nemzetségek egyértelmű elhatárolásához (Harrach et al., 1997). Ezek alapján a további két nemzetségbe olyan, közeli genetikai kapcsolatban álló AdV-okat soroltak, amelyek különböző gerinces osztályba tartozó gazdáiban fordulnak elő. Az *Atadenovirus* nemzetség tagjai fertőzhetnek madarakat, hüllőket, és kérődzőket, sőt egyes már erszényesben is kimutattak (Dán et al., 1998; Harrach, 2000; Benkő et al., 2002; Thompson et al., 2002; Wellehan et al., 2004; Papp et al., 2009). Jelenlegi ismereteink alapján azt feltételezzük, hogy ez a leszármazási vonal a pikkelyes hüllőkkel együtt fejlődött AdV-oknak felel meg. A *Siadenovirus* nemzetségbe sorolták a béka-adenovírust, az eddig ismert egyetlen kétéltűből származó AdV-t (Davison et al., 2000). Egyre nő azoknak a madár-adenovírusoknak a száma, amelyek szintén e csoportba tartoznak, sőt elkobzott teknősökben is kimutattak már siadenovírust. Ezért a *Siadenovirus* nemzetség evolúciós eredetét pillanatnyilag tisztázatlannak tekintjük (Kovács & Benkő, 2011). Magyar és amerikai kutatók a közelmúltban néhány testudinoid teknősfaj egyedeiben egy feltételezhetően újabb nemzetség tagjait fedezték fel (Farkas & Gál, 2009; Doszpoly et al., 2013). A javasolt, hatodik nemzetség (ajánlott név: *Testadenovirus*) ICTV általi hivatalos jóváhagyásához azonban elengedhetetlen legalább egy ilyen AdV teljes genom-szekvenciájának ismerete.

A nemzetségeken belül vírusfajokat különböztetünk meg, amelyek az AdV-ok esetében több, egymással közeli rokonságban álló szerotípust tartalmazhatnak. A vírusrendszertan egyik legnehezebb feladata az egyes vírusfajok elkülönítésére alkalmas kritériumok meghatározása, illetve ezek folyamatos pontosítása, finomítása (Harrach et al., 2011).

Az AdV-ok és gerinces gazdáik közös törzsfajlására vonatkozó elmélet alapja, hogy a gerinces gazdák és a belőlük kimutatott AdV-ok genetikai, rokonsági viszonyai, melyeket törzsfa-rekonstrukcióval lehet kimutatni, rendszerint nagy hasonlóságot mutatnak (Benkő & Harrach, 2003). Az AdV-ok általában szűk gazdaspektrumuk miatt kiváló modellek a gazda-parazita koevolúció kérdésének vizsgálatához.

4.6. Adenovírusok előfordulása rágcsálókban

Noha a rágcsálók az emlősök egyik fajokban leggazdagabb rendjét alkotják, az AdV-ok rágcsálókban való előfordulására vonatkozó szakirodalmi adatok mennyisége viszonylag kevés. Házi egérből (*Mus musculus*) már évtizedekkel ezelőtt két AdV szerotípust izoláltak. A murin adenovírus 1-nek elnevezett (MAdV-1) FL törzs az agyban és a gerincvelőben

található vérerek endotél sejtjeit, és a mononukleáris fagocita rendszer sejtjeit fertőzi (Hartley & Rowe, 1960). Újszülött egereknél (Blailock et al., 1968), valamint bizonyos egértörzsek felnőtt egyedeiben is a fertőzés halálos lehet. A K87-es törzs képviseli a murin adenovírus 2-öt (MAdV-2) (Hasimoto et al., 1966; Sugiyama et al., 1967) amely a béltraktus sejtjeit fertőzi és mind újszülött, mind felnőtt egerekben legfeljebb hasmenést okozhat, bár általában tünetmentes a fertőzés (Sugiyama et al., 1967). További egy MAdV típust izoláltak pirókegéből (*Apodemus agrarius*): a murin adenovírus 3-at (MAdV-3) (Klempa et al., 2009). A MAdV-1-et és MAdV-3-at a Nemzetközi Vírusrendszertani Bizottság (ICTV) külön AdV fajként, MAdV-A és -C néven tartja nyilván. Miután a MAdV-2 teljes genomját szekvenáltuk és elemeztük, javaslatunkra ezt az AdV-t is *Murine mastadenovirus-B*-ként fogadta el az ICTV. Mind a három MAdV a *Mastadenovirus* nemzetségbe tartozik. Az egér-adenovírusok a gén- és daganatterápia vektorok népszerű modell jelöltjei a humán AdV alapú gyógyászati és vakcinázási vektorok fejlesztéséhez (Robinson et al., 2009). A MAdV-3 a MAdV-1-gyel ellentétben nem található meg az idegrendszerben, hanem túlnyomórészt a szívizom sejtekben replikálódik (Klempa et al., 2009). Adenovírusok előfordulását őzegérben (*Peromyscus maniculatus*) (Reeves et al., 1967; Phan et al., 2011) is leírták. E két alkalom leírásából nem derül ki, hogy ezek az őzegér-AdV-ok azonosak-e, mivel a korábban leírt vírusból nem közöltek DNS-szekvenciát. Tüdőgyulladás jeleit mutató tengerimalacok kórbonctani vizsgálata közben az elváltozott tüdőrészekben AdV-nak feltételezhető részecskéket mutattak ki elektronmikroszkóppal. A részecskék AdV jellegét a hexon génre irányuló PCR segítségével meg is erősítették (Pring-Akerblom et al., 1997). Adenovírusok jelenlétét mutatták ki vörös mókusban Nagy-Britannia számos pontján (Sainsbury et al., 2001; Everest et al., 2010a; Everest et al., 2010b; Martínez-Jiménez et al., 2011), Angliában pedig keleti szürkemókusban (*Sciurus caroliensis*) is (Everest et al., 2009).

4.7. Adenovírusok előfordulása denevérekben

Több mint fél évszázaddal ezelőtt az Egyesült Államokban megállapították, hogy a kis barna denevér (*Myotis lucifugus*) számos emberi és állati vírussal való fertőzésre fogékony (Reagan et al., 1950). Jelenleg a denevérek, nagyszámú vírus rezervoárjaiként ismertek. A veszélyes kórokozók mellett, mint a veszettség, az influenza, Nipah, Hendra és Ebola vírusok, amelyeknek hordozói, a denevérekben sokféle további jelentős kórokozó, vagy ártalmatlan vírus is előfordul.

Az elmúlt 5-6 évben végzett vizsgálatok eredményei szerint a denevérekben a többi vírushoz hasonlóan az AdV-ok előfordulása is gyakori (Maeda et al., 2008; Li et al., 2010b). A fajok száma szempontjából, a denevérek rendje (Chiroptera) több mint 1250 ide tartozó fajjal a második leggazdagabb rend közvetlenül a rágcsálók rendje (Rodentia) után. A rend két alrendre oszlik. Az egyik alrend a Megachiroptera, amely mindössze egyetlen családot

foglal magába, a Pteropodidae családba tartozó repülőkutyafélét tartalmazza. Ennek tagjai egyedülálló módon nem rendelkeznek a denevérekre oly jellemző ultrahangos helyzet-meghatározó képességgel. A Microchiroptera alrendbe osztották az összes többi, körülbelül 20 családba tartozó, és ultrahangos helyzet-meghatározó képességgel rendelkező, úgynevezett kis denevéreket. A legújabb javasolt felosztás szerint létrehozott Yinpterochiroptera alrend az eddigi Pteropodidae család mellett a Rhinolophidae – patkós denevéreket, és Hipposideridae – levélorrú denevéreket, valamint a Craseonycteridae – dongódenevéreket, Megadermatidae – álvámpírokat és a Rhinopomatidae – egérfarkú denevéreket is, míg a Yangochiroptera alrend az összes többi családot tartalmazza (Teeling et al., 2005). Magyarországon 28, míg Németországban 25 denevérfaj eddigi előfordulását igazolták.

Az első denevér-AdV-t egy a Yinpterochiroptera alrendbe tartozó Rjúkjú-szigeteki repülőkutyaából (*Pteropus dasymallus yayeyamae*) nyerték Japánban, miközben más vírusok izolálása céljából primér sejtenyészetet készítettek (Maeda et al., 2008). A sejtek passzálása során spontán sejtd degenerációt és jellegzetes sejtlekerekedést tapasztaltak. A DNS-függő DNS-polimeráz és a hexon génre tervezett PCR során felerősített génszakaszok szekvenálásával bizonyították, hogy egy AdV jelenlétéről van szó. Az újonnan felfedezett vírus, melynek a denevér-adenovírus 1 (BtAdV-1) nevet javasolták, genomjának teljes szekvenciáját eddig még nem közölték. 2008-ban egy újabb, BtAdV-2-nek elnevezett denevér-AdV-t izoláltak Németországban Vero sejteken, két elhullott, közönséges törpedenevér (*Pipistrellus pipistrellus*) szerveiből (Sonntag et al., 2009). A harmadik denevér AdV-t (BtAdV-3), szintén egy Yangochiroptera denevérből (*Myotis ricketti* – magyar névvel nem rendelkezik) izolálták Kínában. Ennek publikálták csaknem a teljes genom-szekvenciáját, amelyből csupán az ITR szakaszok hiányoznak (Li et al., 2010b). Indiában, 2012-ben izoláltak egy a Yinpterochiroptera alrendbe tartozó Leschenault-repülőkutyaából (*Rousettus leschenaultii*) egy negyedik denevér-AdV-t, amelyből két gén részleges szekvenciáját közölték (Raut et al., 2012). A BtAdV izolátumokon kívül, 20 különböző denevér-AdV-t mutattak ki világszerte PCR diagnosztikával vagy vírus metagenomikával az Egyesült Államokban, Kínában, Németországban, Magyarországon és Brazíliában (Li et al., 2010a; Li et al., 2010b; Drexler et al., 2011; Lima et al., 2013; Yang et al., 2013). Elérhető továbbá egy különböző spanyolországi denevérekől származó AdV-szekvencia gyűjtemény is a GenBank-ban (Casas et al., 2010). A PCR termékek nagy része a DNS-polimerázból származik.

5. Anyag és módszer

5.1. Minták eredete

5.1.1. Rágcsáló minták eredete

Hazai gyűjtőmunka során, számos elhullott rágcsáló szerveiből kivont DNS-t (26 minta) és más vizsgálatok miatt élve befogott rágcsálóktól (Egyed László mintái) nyert bélsárból vagy végbéltampon mintából kivont DNS-t (38 minta) vizsgáltunk. Több, nem őshonos rágcsáló gazdafajból származó minta AdV vizsgálatát is elvégeztük (Budapesti Állatkert mintái).

Összesen hatvannégy rágcsáló mintát vizsgáltunk, amelyek 14 különböző faj képviseltek (2. táblázat). Három elhullott vörös mókus szerveiből kivont DNS-t kaptunk Németországból, a kimutatott AdV molekuláris jellemzésére. A CMT-93-as egér sejtvonalon elszaporított K87-es MAdV-2 törzs szövettenyészet felülúszóját Dr. Susan Compton bocsátotta rendelkezésünkre a genom részletes vizsgálata céljából (Hamelin et al., 1988). Kutatócsoportunk a vírus teljes genomjának véletlenszerű klónozással történő szekvenálását, valamint a genom annotációját és molekuláris elemzését tűzte ki célul. Munkánk közben, a szekvenálás nagy részének elvégzése után, derült ki, hogy egy svájci kutatócsoport ugyanezt a vírust vizsgálja azonos forrásból kapott anyag alapján. Megegyeztünk, hogy együttműködésben folytatjuk a munkát a gyors és eredményes befejezés érdekében.

5.1.2. Denevér minták eredete

A német minták 17 különböző fajhoz tartozó, elhullott denevérek belső szerveinek homogenizátumából kivont DNS-ből álltak. A mintaszám alapján egy-egy denevérfajt átlagban 11 minta képviselt, de valójában ez a szám 1 és 58 között változott (3. táblázat). A mintákat különböző vírusok diagnosztikai vizsgálatára gyűjtötték Németországban a berlini Robert Koch Intézet részére, de adenovírus jelenlétére mi szűrtük Budapesten. Az egyik mintából, közönséges törpedenevérből, sikerült adenovírust izolálni, és ennek teljes genom-szekvenciáját megállapítani.

A magyarországi minták között, fajilag jól azonosítható denevér kolóniák alól gyűjtött 38 guanó-minta volt, melyet az Aggteleki Nemzeti Park területéről Boldogh Sándor biztosított számunkra. Ez a terület ma a denevér populációk szempontjából Magyarország legjobban feltérképezett területe (Boldogh, 2006). Vizsgáltunk továbbá több mint száz, magyarországi, egyéni bélsár vagy végbéltampon mintát, amelyeket különböző populációsámlálás és vándorlási vizsgálat során gyűjtöttek az ország minden pontjáról Görföl Tamás és Estók Péter. Ezen kívül két denevértetem is a vizsgált magyarországi minták közé tartozott. E mintákat a Budapesti Állatkert bocsátotta rendelkezésünkre.

5.2. Vírusizolálás

A rágcsló AdV-ok izolálási kísérleteihez Vero sejtvonalat, vagy egér rektumkarcinóma sejtvonalat (TMC93) alkalmaztunk. Denevér-AdV izolálási kísérletet nem végeztünk. A Vero sejthez RPMI (Sigma, Steinheim, Németország), míg a TMC93 sejtvonálhoz DMEM (Sigma, Steinheim, Németország) médiumot használtunk, mely 10% borjúsavót (fetal bovine serum – FBS, Sigma, Steinheim, Németország) tartalmazott. A sejtek passzálását 1x PBS-es mosás után (Sigma, Steinheim, Németország), 1x Tripszinnel végeztük (Sigma, Steinheim, Németország). A sejtenyészetet a PCR-rel kimutatott AdV-pozitív bélsárból készített oldattal, vagy (10 perc, 13.000 rpm-es centrifugálás után) 20 µl szervhomogenizátummal fertőztük 24 lukas lemezen és 7-10 passzáláson keresztül figyeltük a sejtkárosító hatást (CPE – cytopathogen effect). Mindkét sejtvonalat 37 °C -on inkubáltuk. Az inkubátorban 5%-os CO₂ szintet tartottunk fenn.

5.3. A virális-DNS tisztítása

A bélsár-mintákból E.Z.N.A. DNA Stool Kit (OMEGA bio-tek) segítségével tisztítottuk a DNS-t, a gyártó ajánlása szerint. Az elhullott állatok különféle belső szerveinek (máj, vese, tüdő és béldarab) borsónyi darabját Retsch/Qiagen™ TissueLyser MM220, vagy Qiagen™ TissueLyser LT mintahomogenizáló gép segítségével homogenizáltuk 1 ml TE pufferben (pH=7,9) 2 ml-es Eppendorf csőben, 4 mm átmérőjű acél csapágygolyóval, 50-es amplitúdóval, 20 percen keresztül. A tampon-minta feldolgozása 1 ml TE pufferben történt fél-egy órás áztatással, menet közben időnkénti egy-két perces vortexelést követően. A DNS kivonási eljárás megegyezett a szervhomogenizátumok DNS kivonásával. A szervhomogenizátumokat 1 percig 13.000 rpm-mel Eppendorf csőben centrifugáltuk 5417C típusú Eppendorf asztali mikrocentrifugában. A felülúszóból 100 µl-t új Eppendorf csőbe pipettáztunk, melyhez 10 µl 10%-os sarcosyl, valamint 4 µl proteináz-K (20 mg/ml) oldatot adtunk. Az így kapott elegyet éjszakán át 55°C-on rázatva inkubáltuk. Másnap 300 µl guanidine-HCl és 20 µl ammónium-acetát (7,5 M) oldatot adtunk az eddigi elegyhez, majd 20 percenkénti óvatos keveréssel egy órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk. Az elegyben lévő nukleinsavakat 1 ml jéghideg abszolút etanollal kicsaptuk, majd 12 percen keresztül 13.000 rpm-mel centrifugáltuk. A felülúszót eltávolítottuk, és a nukleinsavüledéket 1 ml jéghideg 70%-os etanollal mostuk. Öt perces 13.000 rpm-es centrifugálás után a felülúszót ismét eltávolítottuk, és az etanolt, valamint az üledéket nyitott Eppendorf csőben, szobahőmérsékleten szárítottuk. A nukleinsavat 40 µl MQ vízben feloldottuk és a PCR elvégzéséig -20°C-on tároltuk.

5.4. Restriktációs endonukleázos emésztés

A MAdV-2 K87-es törzsének tisztított DNS-ét a szekvenálásához molekulárisan klónoztuk. A korábban közölt hasítási mintázat alapján (Jacques et al., 1994a) a BglIII restriktációs endonukleáz tűnt ideálisnak, mivel ez néhány ezer bp méretű darabokra vágja a MAdV-2 DNS-t. Az emésztést 40 µl végtérfogatban, a gyártó (Fermentas, AG., Vilnius, Litvánia, ma már a Thermo Scientific Ltd. cégcsoport tagja) által javasolt pufferrel, 37°C-on 2 órán keresztül végeztük. Agarózgél elektroforézissel becsült DNS-koncentrációjuk alapján, a plazmid DNS-ből 5 µl, a vírus-DNS-ből 12 µl mennyiséget emésztettünk. A reakcióelegy tartalmazott még 4 µl 10x puffert, a maradék térfogatot pedig MQ víz tette ki. Az így kapott hosszabb fragmentumokat pBS KS (plazmid Bluescript; Fermentas) vektorba ligáltuk. Mivel a pBS polilinker szakasza (multiple cloning site) nem tartalmaz BglIII vágási helyet, a vektor emésztéséhez BamHI-et használtunk, amely a BglIII vágási hellyel kompatibilis ragadós véget eredményez. A hosszabb szakaszokat igény szerint tovább emésztettük EcoRI és PstI restriktációs enzimekkel. A keletkezett termékek megfelelő hosszát minden esetben 1%-os agaróz gélen vizsgáltuk elektroforézissel. A gélt 0,5x TBE (Tris-Bórsav-EDTA pH=8) puffer felhasználásával készítettük. A gél a DNS festésére GelRed-et (Biotium Inc., Hayward, CA, USA) is tartalmazott. Az elektroforézist 60-110V-on végeztük. Az UV fényel átvilágított gélről digitális kamerával készítettünk fényképeket (Kodak Gel Logic 212 imaging system).

5.5. Polimeráz láncreakció

5.5.1. Célgének és primerek

Az AdV-DNS általános kimutatására olyan kétkörös PCR-t használtunk, amelynek során erősen degenerált, konszenzus primerek a DNS-függő DNS-polimeráz gén egyik legmegőrzöttebb, kb. 320 bp hosszú szakaszát erősítik fel (Wellehan et al., 2004). A módszer általános szűrésre alkalmas, de a nem specifikus termékek esetenkénti keletkezése miatt a PCR termékek szekvenálása elengedhetetlen. A tapasztalatok szerint ez a PCR mind az öt eddig elfogadott AdV nemzetség tagjait kimutatja.

Az újonnan felismert AdV-ok genomjából minél hosszabb szakaszok szekvenálása céljából (MAdV-2, SqAdV-1), további génszakaszokra célzott egykörös, vagy kétkörös PCR-eket alkalmaztunk. E PCR-ek általában csak a *Mastadenovirus* nemzetség tagjainak felerősítésére voltak alkalmasak. Nested PCR-t alkalmaztunk a IVa2 (Pantó et al., 2015; Vidovszky et al., 2015) valamint a pVIII gén egy megőrzött szakaszára. Ezekkel a PCR-ekkel a IVa2 génből kb. 250 bp, a pVIII génből kb. 450 bp hosszú szakasz nyerhető. Egykörös PCR-t alkalmaztunk a hexon génen (Kiss et al., 1996a), amely kb 300 bp, valamint a pentonbázison (Pantó et al., 2015) ami kb 200 bp hosszú szakaszt erősít fel. A pVIII gén esetén újonnan tervezett primereket használtunk, melyek szekvenciája a következő:

pVIIIoutre: 5'-CNG GNG GKC CNG ARW AVG GNT-3', pVIIIoutfo: 5'-ATH CCM ACV CCB TAY RTD TGG-3', pVIIIinre: 5'-CAC RAA YTC NYS NAC RAA YTG-3', pVIIIinfo: 5'-ATG AAY TGG YTN AGY GCN GG-3'. A konszenzus primerek tervezéséhez a közeli rokonságú AdV-ok homológ fehérjéinek aminosav szekvenciáiból pozicionális illesztéseket (alignment) végeztünk a MultAlin programmal online az INRA szerverén (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>). A primerek kiválasztásakor olyan, erősen megőrzött aminosav motívumokat választottunk, amelyek lehetőleg kevés (1–2) kodonnal rendelkező as-ból álltak. Az oligonukleotidokban az összes lehetséges kodon variáció szerepelt.

Az általános primerekkel felerősített szakaszokat szekvenáláskor az addig megismert szekvenciák alapján tervezett, specifikus primerekkel kötöttük össze. A hosszabb genomszakaszokat úgynevezett primer-sétával szekvenáltuk, amelynek során kb 500–700 bp-onként újabb primert alkalmaztunk. A primer tervezéshez a Primer Designer version 2 (Scientific and Education Software) programot, illetve oligonukleotid szintézissel foglalkozó különböző cégek honlapjain elérhető tervező felületeket használtunk. Ilyenek például a Thermo Scientific (<http://www.thermoscientificbio.com/webtools/tmc/>) vagy az Integrated DNA Technologies (<https://eu.idtdna.com/PrimerQuest/Home>) honlapján találhatóak. A programok a primerek tervezésekor figyelik a megfelelő G+C arányt és olvadási hőmérsékletet (T_m). Továbbá, az önmagukban vagy párban történő „inaktiválódásuk” kizárása érdekében a programok vizsgálják a primerek dimer-alkotó képességét és hajtóképzési hajlandóságukat. A paraméterek manuálisan is állíthatóak, az adott szekvencia sajátosságai szerint.

5.5.2. A PCR optimalizálása

A minták elsődleges szűréséhez a PCR-eket 200 μ l térfogatú PCR csövekben végeztük Tpersonal (Biometra Ltd., Göttingen, Németország) PCR készülékekkel. A konszenzus PCR-ekhez többféle Taq polimeráz enzimet, legtöbbször DreamTaqTM (Thermo Scientific Ltd.), vagy REDTaqTM (Sigma, Steinheim, Németország) DNS-polimerázt használtunk, vagy ezek ReadyMIXTM változatát, mely már tartalmazza a gélfestéket, bizonyos mennyiségű $MgCl_2$ -ot és dNTP-t. A reakcióelegy végtérfogata kezdetben 50 μ l volt, összetétele pedig a következő: 1–1 μ l 50 pmol/ μ l koncentrációjú konszenzus primer, 2,5 μ l REDTaqTM, vagy 0,25 μ l DreamTaqTM enzim, 2 μ l $MgCl$ (25 mM), 5 μ l 10x puffer, 1,5 μ l dNTP (10 mM) és 2 μ l minta-DNS. MQ vízzel 50 μ l-re egészítettük ki az elegy térfogatát. ReadyMIXTM használata esetén a $MgCl_2$, dNTP, puffer és enzim helyett az elegy 25 μ l ReadyMIXTM-et tartalmazott. A későbbiekben a végtérfogatot 25 μ l-re csökkentettük, így azonos hatékonyság mellett költségmegtakarítást értünk el.

A hosszabb (>500 nt) szakaszok felerősítésére a Phusion DNS-polimeráz (Finnzyme Ltd., Espoo, Finnország) enzimet használtuk. Ehhez az 50 µl össztérfogatú reakcióelegy a következő összetevőkből állt: 1–1 µl 50 pmol/µl koncentrációjú specifikus primerek, 10 µl 5x puffer, 1,5 µl dNTP (10mM), 2 µl minta-DNS és 0,5 µl Phusion DNS-polimeráz enzim. A reakciók programját (hőmérséklet és időtartam) a 1. táblázat mutatja.

A PCR-termékek láthatóvá tételét 1%-os agaróz gélen elektroforézissel vizsgáltuk. A pozitív mintákból a keletkezett DNS-fragmentumot a QIAquick Gel Extraction (Qiagen, Düsseldorf, Németország), vagy NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel, Düren, Németország) használatával tisztítottuk.

1. táblázat a PCR programok paraméterei

lépés	hőmérséklet	időtartam	ciklus
kezdeti denaturáció	98°C	5 perc (p)	1
denaturáció	98°C	30 másodperc (mp)	
primer kötődés	46°C–72°C	30–60 mp	45
szintézis	72°C	1–6 p	
terminális szintézis	72°C	3–10 p	1

A PCR programokban a primer kötődési hőmérsékletét az egyes primerekre azok degeneráltsági mértékétől és olvadási hőmérsékletétől függően állítottuk be (1. táblázat). A pol PCR esetekben, ahol degenerált primereket használtunk, ez az érték 46°C volt. A már ismert szekvenciákra tervezett specifikus primereknél esetenként úgynevezett 2 lépéses PCR-t alkalmaztunk. Ezekben az esetekben a primer kötődése is a szintézis hőmérsékletén (72°C) zajlott. A szintézis időtartama a felerősíteni kívánt szakasz hosszától függött (30 mp/1000 bp).

5.6. Molekuláris klónozás

Molekuláris klónozást végeztünk, ha a PCR termékek szekvenálása után többszörös nukleotid-hullámokat kaptunk, és feltételeztük, hogy a minta esetleg több AdV-t tartalmazhat.

A klónozást CloneJET™ PCR cloning kit (Fermentas Life Sciences) segítségével végeztük a gyártó használati útmutatója alapján. A tisztított DNS-fragmentumot a megfelelően előkészített vektorral T4 ligáz segítségével egyesítettük. A ligálási reakciót kémiaailag kompetens *Escherichia coli* (TOP10, iNtRON Biotechnology) baktériumba juttattuk hősokkos transzformációval. Három µl ligátumot adtunk előhűtött pipettával a jégen felolvasztott baktérium szuszpenzió 50 µl-éhez, majd azt jégen inkubáltuk 30 percig. Ezután

a csöveket 90 mp-re, 42°C-os vízfürdőbe tettük, majd 5 percig ismét jégen inkubáltuk. A baktérium szuszpenzióhoz 1 ml előmelegített SOC (Super Optimal Broth with Catabolite) médiumot adtunk, és egy órán át 37°C-on ráztuk. A baktérium sejteket ampicilin tartalmú LB (Lysogeny broth) tápagar lemezen szélesztettük, és egy éjszakán át 37°C-on inkubáltuk. Másnap a jól elkülönülő baktérium telepeket, melyek az ampicilin rezisztencia génnel rendelkező plazmidot tartalmazták, ampicilin tartalmú, folyékony LB tápoldatba helyeztük, és rázatva inkubáltuk egy éjszakán át 37°C-on.

A plazmid-DNS-t alkáli miniprep módszerrel tisztítottuk (Sambrook et al., 1989). A baktérium tenyészet 1,5 ml-ét 13.000 rpm-mel 30 mp-ig centrifugáltuk, majd a felülúszót gondosan eltávolítottuk. Az üledéket 100 µl I-es oldat (50 mM glükóz, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl pH=8) hozzáadása után 30 mp-ig erősen vortexeltük, majd 200 µl frissen készített II-es oldatot (0,2 N NaOH, 1% SDS) mértünk rá. Az elegyet 5 percig jégen inkubáltuk. Ezután 150 µl III-as oldat (3 M KAc, pH=4,8) hozzáadását követően 10 percig inkubáltuk jégen. Tíz perc 13.000 rpm-es centrifugálás után a DNS-t tartalmazó felülúszót új Eppendorf csőbe tettük, és 800 µl 96%-os etanolt adtunk hozzá. Ismételt 10 perces 13.000 rpm-es centrifugálás után a felülúszót eltávolítottuk és a keletkezett üledéket 600 µl 70%-os etanollal mostuk. Hét perces 13.000 rpm-es centrifugálás után a felülúszót ismét leöntöttük és szobahőmérsékleten szárítottuk. A plazmid-DNS-t 2,5% RNáz tartalmú MQ vízben oldottuk fel és -20°C-on tároltuk. A klónokból nyert plazmid-DNS-ek mértetét 1%-os agaróz gél-elektroforézissel ellenőriztük. Ezek után a beépített DNS-szakasz (inzert) restriktions enzim kivágását elvégeztük.

A MAdV-2 genom molekuláris klónozását alapvetően ugyanezekkel a módszerekkel, pBluescript plazmiddal végeztük.

5.7. A DNS szekvenálása

A tisztított PCR termékeket mindkét oldalról szekvenáltuk 4 pmol/µl koncentrációjú primerekkel. A klónozott génszakaszokat a vektortól függően T3, T7 vagy pJETfo vagy pJETre primerekkel szekvenáltuk. A primer-séta során a DNS-t átfedésekkel, folyamatosan új szekvenáló primerek tervezésével, mindkét oldalról szekvenáltuk, míg a teljes szakaszt át nem értük mindkét szálon. A szekvenáláshoz a BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit-et (Applied Biosystem Ltd., Warrington, Egyesült Királyság) alkalmaztuk a gyártó által javasolt útmutató szerint. Az elvégzett szekvenálási reakció után a mintákat kapilláris elektroforézisre a Szegedi Biológiai Központ által üzemeltetett szekvenáló cégnek (BayGen Intézet) küldtük, ahol automata DNS-szekvenáló gépen (ABI Prism® 3500 Genetic Analyzer) elemezték. Az eredményeket elektronikus úton ab1 kiterjesztésű file-ok formájában kaptuk meg.

5.8. Bioinformatika, filogenetikai számítások

Az ab1 formátumban kapott elektroforetogramokat és az automatikusan megfejlesztett szekvencia adatokat a BioEdit programmal (BioEdit Sequence Alignment Editor v5.0.7; Hall, 1999) jelenítettük meg, ellenőriztük minőségét és javítottuk az esetleges hibákat. A teljes vagy részleges genom-szekvenciák töredékeit vagy kézzel, vagy a Staden (Staden, 1996) szekvencia elemző programcsomagot alkalmazva, a Gap4 programmal illesztettük össze.

Az újonnan kimutatott nukleotid-szekvenciák AdV eredetét elsősorban, a BLASTX homológiakereső programmal vizsgáltuk az NCBI honlapján a GenBank adatbázis szekvenciáihoz hasonlítva. A további pontosítás érdekében a szekvenciákat összehasonlítottuk az általunk meghatározott, de még le nem közölt AdV szekvenciákból álló belső adatbázisunkkal a BioEdit programcsomag BLASTX programjának segítségével is.

A MAdV-2 és BtAdV-2 teljes, valamint a SqAdV-1 részleges genomszekvenciáját a JavaScript DNA Translator 1.1 (Perry, 2002) programmal fordítottuk le mind a hat leolvasási keretben. Az így nyert ORF-ek génként való működését homológiájuk, elhelyezkedésük és méretük alapján valószínűsítettük. Azoknál a géneknél, amelyekről már tudott, hogy intronokat is tartalmaznak, a potenciális splicing donor és akceptor helyeket egyedi vizsgálattal határoztuk meg a konszenzusos szignálokat keresve, valamint a korábbi meghatározások eredményeivel összehasonlítva. A pozicionális illesztéseket a MultAlin és Genedoc programokkal végeztük.

Filogenetikai számításokhoz három különböző módszert is alkalmaztunk. Mivel rövid génszakaszok esetében, a valószínűséget számító bonyolultabb módszerek megbízható alkalmazásához az adatmennyiség nem bizonyult elégségesnek, inkább a távolsági analízist (protein distance matrix) alkalmaztuk, amely ugyan csupán távolságot számít, azonban megbízható eredményeket adott. Ehhez a PHYLIP programcsomag Protdist programját használtuk (Felsenstein, 1989), majd a Fitch programot teljes átrendezés (global rearrangement) funkcióval, amely az első számítás eredményeként nyert fa minden ágának helyzetét egyenként újra vizsgálja.

Hosszabb szekvenciaadatok, illetve teljes gének esetében a legnagyobb valószínűség (maximum likelihood), illetve a Bayes módszert alkalmaztuk. A legnagyobb valószínűség módszer a matematikai statisztika egyik leggyakrabban használt becslési eljárása. A módszer célja, hogy adott mérési értékekhez (jelen esetben egy törzsfa), az ismeretlen paramétereknek olyan becslését adja meg, amely mellett az adott érték a legnagyobb valószínűséggel következik be. A Bayes-elméleten alapuló Bayes-statisztika (bayesian method) szintén becslést végez. Ez a módszer azonban egy feltételes valószínűség és a fordítottja között állít fel kapcsolatot. Sokkal több paraméterrel számol, és itt a becsülni kívánt paraméter nem egy rögzített érték, hanem egy valószínűségi változó. E számításokat a Topali 2.5 programcsomag MrBayes programjával végeztük. A filogenetikai

számításokban a Bayes-módszert az ismeretlen változók sokasága miatt nem tudtuk megbízható eredménnyel használni (bizonytalan elágazásokat mutatott), így a későbbiekben nem alkalmaztuk.

A becslésen alapuló módszerek különféle modelleket (pontozási mátrixot) használnak, attól függően, hogy milyen jellegű a vizsgálat. Az as-on alapuló törzsfarekonstrukciókhoz készített aminosav helyettesítési mátrix modellekből számos létezik. Legismertebbek a WAG (elnevezése a szerzők **W**helan and **G**oldman után), a JTT (elnevezése **J**ones DT, **T**aylor WR és **T**hornton JM szerzők után; Jones et al., 1992), illetve a legújabb, és a legtöbb fehérje összehasonlításán alapuló modell, az LG (elnevezése Si Quang **L**e és Olivier **G**ascuel szerzők után; Le & Gascuel, 2008). Az, hogy melyik modell illik legjobban az adott adathalmazhoz, számítként különbözik, így a lehető legjobb eredmény érdekében modellválasztási számítás végeztünk először.

A becslésen alapuló számítások azt számítják, hogy egy adott törzsfarekonstrukciónak mekkora a valószínűsége. A kiinduláshoz a legegyszerűbb, távolság alapú, úgynevezett neighbour joining módszerrel számol egy törzsfát, melynek során egy csillag alakú fából kiindulva a legközelebbi szomszédokat összekapcsolja, és helyettesíti ezeket az átlagukkal. Ezt ismételteti a teljes fa kialakulásáig. A neighbour joining módszernél megbízhatóbb a fehérje távolsági mátrix analízis, ezért mi azzal számítottuk a kiindulási „alapfát” (user tree), és azt adtuk be a számoláshoz kiindulási értéknek. Amennyiben szeretnénk látni a kapott eredményünk megbízhatóságát, úgynevezett bootstrap számítás végeztünk, amelynek a lényege, hogy a meglévő pozicionális illesztésből véletlenszerű mintákat vesz, ezekre végzi el a számítás, majd statisztikát készít. A bootstrap számítás általában 100 mintavétellel végeztük. Ennek természetesen csak a hosszabb szekvenciákra alapuló számításoknál van értelme. Rövid szekvenciák esetében a kapott értékek olyan alacsonyok, hogy nem relevánsak.

A távolsági analíziseket és a legnagyobb valószínűség számításokat, amennyiben bootstrap értékeket is akartunk számolni, a MobyLe internetes portálon végeztük, a Pasteur Intézet honlapján (<http://mobyLe.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py#welcome>). Utóbbi a PhyML program (phylogenies by maximum likelihood) alkalmazásával számoltuk (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>, Guindon et al., 2010). Modellválasztásra eleinte a Topali programcsomagot használtuk, majd áttértünk a ProtTest program használatára (Darriba et al., 2011), amely többféle modellt ismer, beleértve a legújabb LG-t is. Ezek a modellválasztó programok kiszámolják azt is, hogy az illesztésben vannak-e (és milyen arányban) megőrzött aminosavak (I=invariable), hogy kell-e gamma-eloszlást alkalmazni a számítás során (G=gamma distribution), és ha igen, milyen értékkel, (ezeket a modell-szelekció által számított értékeket meg lehet adni a MobyLe PhyML számításokhoz), végül pedig a

gyakorisági (F=frequency) értékeket is. Az alkalmazott eljárást (pl.: LG+I+G+F) a filogenetikai számítások eredményét (törzsfát) mutató ábrák aláírásában tüntettem fel.

A kész törzsfákat a FigTree v1.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) programmal jelenítettük meg és szerkesztettük.

6. Eredmények

6.1. Új adenovírusok kimutatása

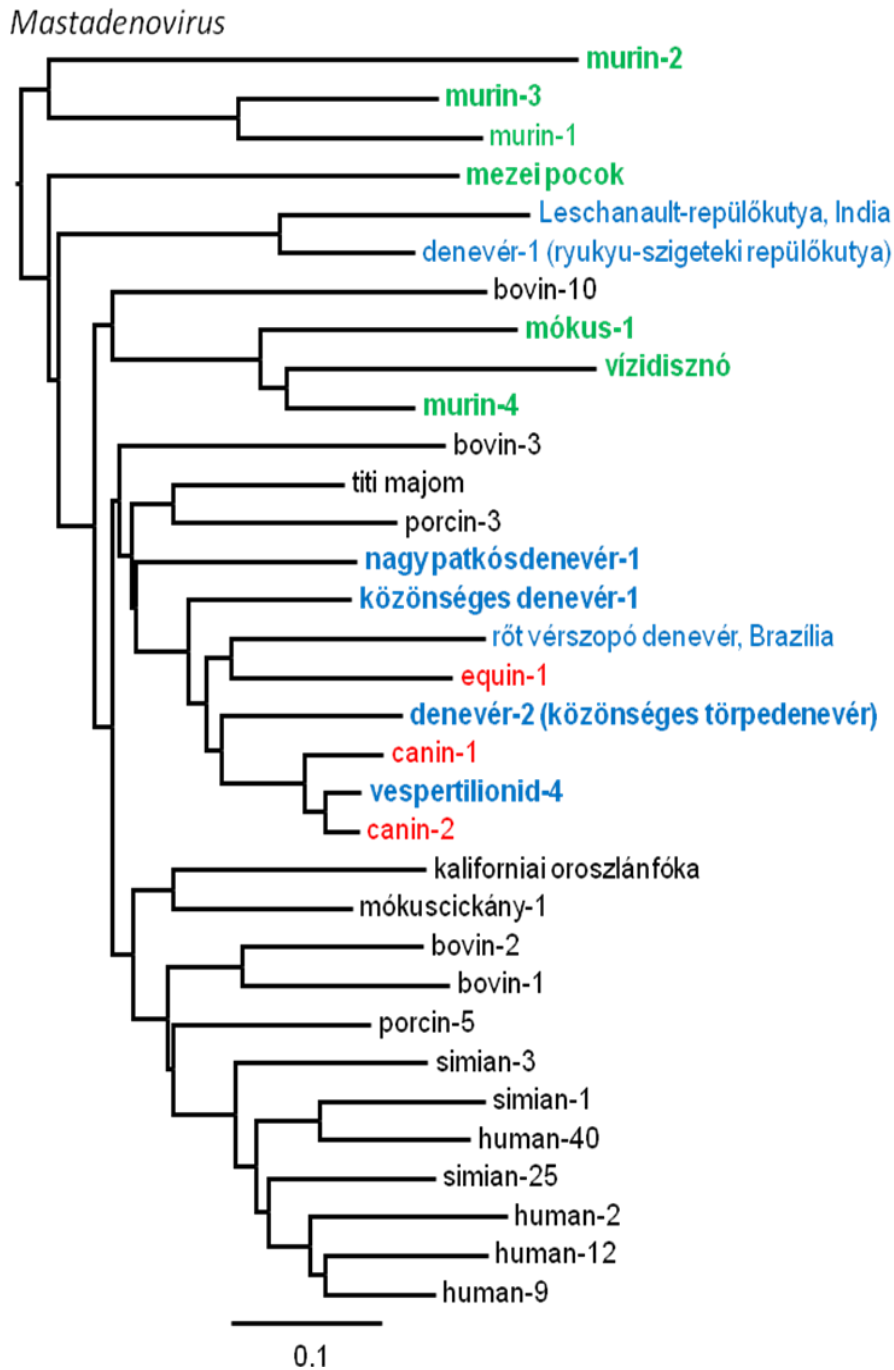
6.1.1. Rágcsálók új adenovirusai

6.1.1.1. Rágcsáló adenovírusok szűrése

A vírusizolálási kísérleteink során sajnos nem sikerült AdV-t izolálnunk. A rágcsálóminták közül, 17 bizonyult PCR-pozitívnak, ami 26,56%-os pozitivitást jelent (2. táblázat). A pozitív mintákból a mezei pocok, a vízidisznó és egy pirókegér minta szervminta, míg a többi 14 pirókegér bélsárminta volt.

2. táblázat. Rágcsálók vizsgálata adenovírusos fertőzöttségre.

	tudományos név	általános név	mintaszám	pozitívak
Egéralkatúak alrendje (Myomorpha)				
Egérfélék családja (Muridae)				
1.	<i>Apodemus agrarius</i>	pirók erdeieger	19	15
2.	<i>Apodemus flavicollis</i>	sárganyakú erdeieger	1	0
3.	<i>Apodemus sylvaticus</i>	közönséges erdeieger	1	0
4.	<i>Mus musculus</i>	házi egér	16	0
5.	<i>Rattus norvegicus</i>	vándorpatkány	5	0
Hörcsögfélék családja (Cricetidae)				
6.	<i>Lemmus lemmus</i>	közönséges lemming	3	0
7.	<i>Ondatra zibethicus</i>	pézsmapocok	1	0
8.	<i>Microtus arvalis</i>	mezei pocok	2	1
Földikutyafélék családja (Spalacidae)				
9.	<i>Nannospalax leucodon</i>	földi kutya	1	0
Sülalkatúak alrendje (Hystricomorpha)				
Tengerimalacfélék családja (Caviidae)				
10.	<i>Cavia porcellus</i>	tengerimalac	3	0
11.	<i>Dolichotis patagonum</i>	nagy mara	2	0
15.	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	kapibara/vízidisznó	3	1
Mókusalkatúak alrendje (Sciuromorpha)				
Pelefélék családja (Gliridae)				
13.	<i>Glis glis</i>	nagy pele	2	0
Mókusfélék családja (Sciuridae)				
14.	<i>Sciurus vulgaris</i>	vörös mókus	5	0



3. ábra. A részleges DNS-polimeráz fehérjén alapuló, mastadenovírusokat tartalmazó távolsági mátrix-szal számított törzsfá-rekonstrukció, melyen az összes új rágcsáló AdV szerepel. A főemlős-AdV-okból fajonként egy képviselőt tüntettünk fel. Az AdV tagot az ábrán kihagytuk a névből a rövidítés kedvéért. A denevér-AdV-okat kékkel, a rágcsáló-AdV-okat zölddel, az új, általunk vizsgáltakat félkövérrel jelöltük. A feltételezhetően denevér eredetű, de ma már más gazdában megtalált AdV-ok pirossal láthatók.

Egy mezei pocok és egy vízidisznó adenovírusa új AdV-nak bizonyult (szerv minták). Tizenöt pol pozitív pirókegér-mintából kettő új (általunk murin AdV-4-nek [MAdV-4] nevezett) AdV-t, míg a többi 13 mintából a MAdV-3-at sikerült kimutatni (3. ábra). A 15 pozitív

pirókegér-mintából 1 szervminta, míg 14 bélsárminta volt. A vízidisznó és a MAdV-4 esetében a IVa2 gén egy szakaszát is sikerült felerősíteni két körös (nested) PCR segítségével, míg a pocok-minta esetében negatív eredményt kaptunk a IVa2 PCR során.

A MAdV-3 vizsgálatokor specifikus PCR-t terveztünk az E1B 19K gén felerősítésére, mellyel a hazai pirókegér több hazai populációjában jelenlévő MAdV-3-ból egy olyan E1B 19K gént tudtuk felerősíteni, mely a GenBank-ba benyújtott MAdV-3 E1B 19K szekvenciánál sokkal hosszabb (23 aminosav helyett 174 aminosav).

Németországi mókusokban talált AdV-ról szekvencia szinten bizonyítottuk, hogy mastadenovírus, és feltételezhetően azonos vagy nagyon hasonló a Nagy-Britanniában kimutatott vírushoz, mivel a korábban nyert hexon gén-szekvencia (Benkő Mária, személyes közlés) 100%-ban megegyezett az általam nyert szekvenciával (Peters et al., 2011).

6.1.2 Denevér-adenovírusok azonosítása

Összesen 28 denevérfaj képviselőit vizsgáltuk (17 faj Németországról, 28 faj Magyarországról), mely fajok közül 18-ból mutattuk ki AdV jelenlétet. Tíz vizsgált fajból nem sikerült AdV-t kimutatnunk, habár e fajok némelyike meglehetősen magas mintaszámmal képviseltette magát (a legtöbb 19 minta volt), akár mindkét országból is (3. táblázat). A pozitív minták gazdafajai közé tartozik 3 faj, mely a Rhinolophidae családba tartozik és a legújabb rendszertani rendszerezés szerint a Yinpterochiroptera alrendbe sorolható. Az összes többi minta valamely Yangochiroptera alrendbe tartozó család tagjától származik (Vespertilionidae és Miniopteridae), habár AdV-ra pozitív csak a Vespertilionidae családból származó minták között volt.

A DNS-függő DNS-polimeráz génre irányuló PCR-ek termékeinek direkt szekvenálása több esetben azt mutatta, hogy többféle AdV is lehet a mintában. A PCR termékek molekuláris klónozása és a klónok szekvenálása bizonyította, hogy némely minta különböző mértékben eltérő AdV változatokat tartalmaz. Minden esetben két, egymástól jól elkülönülő AdV-t és egy vagy kettő további, néhány, de legalább egy aminosavban eltérő variánst találtunk. Az AdV variánsok eltérése egy-egy denevérfajon belül 2-5 nt illetve 1-4 aminosav volt. Három denevérfajnál tapasztaltuk ezt. A kereknyergű patkósdenevér (*Rhinolophus euryale*) esetében 4 különböző AdV-t, a szoprán törpedenevérből (*Pipistrellus pygmaeus*) 3 AdV-t és a szőröskarú koraidenevérből (*Nyctalus leisleri*) szintén 4 AdV változatot mutattunk ki.

A polimeráz PCR termékeket szekvenálva, a primer szekvenciák eltávolítása után 269-275 bp hosszúságú szakaszt kaptunk. Összesen 34 különböző AdV-t mutattunk ki, melyekből csupán 3 volt korábban már kimutatott AdV-sal teljesen megegyező (a részleges pol génben). Így összesen 31 eddig ismeretlen új AdV-t találtunk. Ezek mindegyike a *Mastadenovirus* nemzetségbe tartozik.

3. táblázat. AdV jelenlétére vizsgált denevér-minták

tudományos név	általános név	vizsgált minták		pozitív minták száma/ hány féle vírus				
		H	G	pol poz.	IVa2 poz	H	G	
alrend Yinpterochiroptera								
család Rhinolophidae								
1.	<i>Rhinolophus euryale</i>	kereknyergű patkósdenevér	3	-	1/4	-	1	-
2.	<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	nagy patkósdenevér	10	-	3/1	-	1	-
3.	<i>Rhinolophus hipposideros</i>	kis patkósdenevér	13	-	3/1	-	1	-
alrend Yangochiroptera								
család Miniopteridae								
4.	<i>Miniopterus schreibersii</i>	hosszúszárnyú denevér	10	-	-	-	-	-
család Vespertilionidae								
5.	<i>Barbastella barbastellus</i>	nyugati pisedenevér	3	2	-	-	-	-
6.	<i>Eptesicus nilssonii</i>	északi késeidenevér	1	5	-	1/1	-	1
7.	<i>Eptesicus serotinus</i>	közönséges késeidenevér	9	13	2/1	1/1	1	1
8.	<i>Hypsugo savii</i>	alpesi denevér	1	-	-	-	-	-
9.	<i>Myotis alcathoe</i>	nimfadenevér	3	-	-	-	-	-
10.	<i>Myotis bechsteinii</i>	nagyfülű denevér	19	-	-	-	-	-
11.	<i>Myotis blythii</i>	hegyesorrú denevér	7	-	1/1	-	1	-
12.	<i>Myotis brandtii</i>	Brandt denevér	5	2	-	-	-	-
13.	<i>Myotis dasycneme</i>	tavi denevér	5	-	2/1	-	1	-
14.	<i>Myotis daubentonii</i>	vízi denevér	11	4	-	-	-	-
15.	<i>Myotis emarginatus</i>	csonkafülű denevér	5	-	1/1	-	1	-
16.	<i>Myotis myotis</i>	közönséges denevér	13	1	4/1	-	1	-
17.	<i>Myotis mystacinus</i>	bajuszos denevér	2	17	-	1/1	-	-
18.	<i>Myotis nattereri</i>	horgasszörű denevér	8	5	-	-	-	-
19.	<i>Nyctalus lasiopterus</i>	óriás koraidenevér	4	-	-	-	-	-
20.	<i>Nyctalus leisleri</i>	szőröskarú koraidenevér	1	3	-	1/4	-	1
21.	<i>Nyctalus noctula</i>	rőt koraidenevér	4	58	2/1	20/5	1	4
22.	<i>Pipistrellus kuhlii</i>	fehérszélű törpedenevér	3	4	-	1/1	-	-
23.	<i>Pipistrellus nathusii</i>	durvavitorlájú törpedenevér	3	11	-	2/2	-	-
24.	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	közönséges törpedenevér	3	42	-	6/4	-	2
25.	<i>Pipistrellus pygmaeus</i>	szoprán törpedenevér	8	3	1/1	1/3	1	1
26.	<i>Plecotus auritus</i>	barna hosszú-fülű denevér	7	11	-	1/1	-	-
27.	<i>Plecotus austriacus</i>	szürke hosszú-fülű denevér	2	1	1/1	-	1	-
28.	<i>Vespertilio murinus</i>	fehértorkú denevér	2	12	-	1/1	-	1
Összesen 28 magyarországi faj és 17 németországi faj			165	194	21/14	36/24	11	11

Rövidítések: H, minták Magyarországról, G, Németországból; pol poz, hány minta lett pozitív a polimeráz génre való vizsgálat során/azokból hány féle vírust különítettünk el; IVa2 poz, hány minta lett pozitív IVa2 génre vizsgálva. Az azonosított AdV-ok összesített összegénél figyelembe kell venni, hogy 4 alkalommal több faj egyedeiben is kimutatott vírust találtunk. A kimutatott AdV-ok kisebb száma a pozitív mintákéhoz képest azt jelenti, hogy a különböző pozitív mintákban azonos AdV-t találtunk. Ha ez a szám nagyobb, akkor ugyanabban a mintában több különböző AdV változatot találtunk, amelyeket molekuláris klónozással külön szekvenálni tudtunk.

Az új adenovírusok elnevezésénél a következő nomenklatúrát alkalmaztuk. Amennyiben az adott AdV-t csak egy gazdafajban találtuk meg, akkor a névnél a gazdafaj angol nevét használtuk, és 1-től kezdve számoztuk. Amennyiben az AdV-t több gazdafaj mintájából is kimutattuk, az elnevezésre a legközelebbi közös rendszertani csoport nevét használtuk. Pl. amikor ugyanazt a vírust több, a Vespertilionidae családba tartozó denevérfajból is kimutattuk, akkor az elnevezésnél a családnevet használtuk, és 'vespertilionid adenovirus' nevet kapta a megfelelő számmal. Különböző családokhoz tartozó denevérekből sosem találtunk azonos AdV-t. Ha legalább egy aminosavban különbözött két AdV ezen a rövid polimeráz génszakaszon, már új típus nevet (számot) adtunk. Amennyiben csak nukleotid szekvenciában, de aminosav szinten nem különböztek, azokat a vírusokat csupán ugyanazon típus genetikai variánsaiként kezeltük.

Három különböző, a Vespertilionidae családba tartozó denevérfaj németországi mintáiból, egy bajuszos denevér (*Myotis mystacinus*), egy durvavorlájú törpedenevér (*Pipistrellus nathusii*) és négy rőt korai denevér (*Nyctalus noctula*) mintából mutattuk ki a „vespertilionid adenovirus 1”-et (4. táblázat). Egy másik új AdV-t, a „vespertilionid adenovirus 2”-t szintén egy rőt korai denevér mintából, valamint egy közönséges törpedenevér mintából mutattuk ki. Mindkét minta Németországból származott és a vírusok aminosav szinten nem, de nukleotid szinten 4 bp különbséget mutattak. Öt különböző közönséges törpedenevér mintából két határozottan eltérő új AdV-t tudunk kimutatni, melyek különböztek a szekvenált BtAdV-2-től is, amit szintén ennek a gazdafajnak egy mintájából mutattak ki és izoláltak (Sonntag et al., 2009), valamint még egyet, mely csupán 1 aminosavban különbözik a BtAdV-2-től a részleges pol szakaszon. Ezek alapján az AdV-okat „common pipistrelle adenovirus 2–4”-nek (közönséges törpedenevér-adenovírus 2–4) neveztük el, meghagyva az 1-et az izolált, publikált és már teljes genom szinten megfejtett, disszertációmban részletesen kifejtett közönséges törpedenevér-adenovírusnak.

Csupán három olyan denevérfaj volt, a közönséges késeidenevér (*Eptesicus serotinus*), a rőt korai denevér és a szoprán törpedenevér, amelyek mindkét országból származó mintái közt voltak pozitívak. Bár a németországi és magyarországi azonos denevérfajok mintákban talált szekvenciák egyike sem volt azonos, érdekes, hogy a német közönséges késeidenevér mintában talált AdV megegyezett egy korábban Kínában, a legnagyobb vespertilionid denevérben (melynek nincs magyar elnevezése, great evening bat – *Ia io*) talált AdV szekvenciával.

Mindkét AdV, amit a német rőt korai denevér mintákban találtunk (az egyiket egy, a másikat 7 mintából mutattuk ki), különbözött a két magyar mintából is kimutatott rőt korai denevér-AdV szekvenciájától. Ezeket az AdV-okat „common noctule adenovirus 1–3”-nak neveztük el. A szoprán törpedenevérek esetében a magyar mintából származó AdV szekvencia nem volt azonos egyik szekvenciával sem, amit a német szoprán törpedenevér-

minta molekuláris klónozása során nyertünk. Hét további AdV-t találtunk Magyarországról. Pond adenovirus 1-nek neveztük el, a két, különböző földrajzi helyről származó magyar tavi denevér (*Myotis dasycneme*) mintáiból kimutatott AdV-t, és „Goeffroy’s bat adenovirus 1”-nek egy magyar csonkafülű denevér (*Myotis emarginatus*) mintában talált AdV-t. Találtunk egy AdV-t egy magyarországi hegyesorrú denevér (*Myotis blythii*) mintában is, melyet „lesser mouse-eared bat adenovirus 1”-nek neveztünk el. A „greater mouse-eared bat adenovirus 1”-nek elnevezett vírust 4 különböző közönséges denevérből (*Myotis myotis*) mutattuk ki, melyek Magyarország különböző földrajzi helyeiről származtak. A magyarországi patkósdenevérek családjának (*Rhinolophidae*) képviselőjében, a már korábban említett kereknyergű patkósdenevérből molekuláris klónozással kinyert AdV-okon kívül, három kis patkósdenevér (*Rhinolophus hipposideros*) és három nagy patkósdenevér (*Rhinolophus ferrumequinum*) mintából is mutattunk ki AdV-t, ennek megfelelően ezeket „lesser horseshoe bat adenovirus 1” és „greater horseshoe bat adenovirus 1”-nek neveztük el. Magyarországi mintákban szürke hosszúfülű-denevér (*Plecotus austriacus*) AdV-t is sikerült kimutatnunk, melyet „grey long-eared bat adenovirus 1”-nek neveztünk el.

Egy német barna hosszúfülű-denevér (*Plecotus auritus*) mintában találtuk meg a „brown long-eared bat adenovirus 1”-et, és ugyanebből az országból a „Nathusus’s pipistrelle adenovirus 1”-et durvavitorlájú törpedenevérből (*Pipistrellus nathusii*). Az utolsó két AdV-t egy fehérszélű törpedenevérből (*Pipistrellus kuhlii*) a „Kuhl’s pipistrelle adenovirus 1”-et, és egy északi késeidenevérből (*Eptesicus nilsonii*) a „northern bat adenovirus 1”-et találtuk. Mindkét minta Németországból származik. Az újonnan talált AdV-ok nevei és a gazdafajaik nevei a 4. táblázatban láthatóak.

4. táblázat. A kimutatott AdV-ok és a gazdafajok

Nr.	Az AdV neve	gazdafaj (származás, törzsnév)	GenBank azonosító szám.	korábbi kimutatás, + GenBank azonosító
1.	brown long-eared bat AdV-1	szürke hosszúfülű-denevér (1G)	KM043094	
2.	common noctule AdV-1	rőt koraidenevér (1H, BS24)		rőt koraidenevér (H) (HUN/2007) GU198877
3.	common noctule AdV-2	rőt koraidenevér (7G, 119/08)	KM043110	
4.	common noctule AdV-3	rőt koraidenevér (1G, 150/08)	KM043111	
5.	common pipistrelle AdV-2	közönséges törpedenevér (2G, 141/07)	KM043096	
6.	common pipistrelle AdV-3	közönséges törpedenevér (1G, 202/09)	KM043108	
7.	common pipistrelle AdV-4	közönséges törpedenevér (2G, 199/09)	KM043109	
8.	Geoffroy's bat AdV-1	csonkafülű denevér (1H)	KM043084	
9.	greater horseshoe bat AdV-1	nagy patkósdenevér (1H)		nagy patkósdenevér (H) (HUN/2009) GU289918
10.	greater mouse-eared bat AdV-1	közönséges denevér (4H)	KM043106	
11.	Kuhl's pipistrelle AdV-1	fehérszélű törpedenevér (1G)	KM043100	
12.	lesser horseshoe bat AdV-1	kis patkósdenevér (1H)		kis patkósdenevér (H) (Teresztenye/2010) JN167522
13.	lesser mouse-eared bat AdV-1	hegyesorrú denevér (1H)	KM043086	
14.	lesser noctule AdV-1	szőröskarú koraiden. (1G, 239/08 cl. 1)	KM043102	
15.	lesser noctule AdV-2	szőröskarú koraiden. (1G, 239/08 cl. 3)	KM043104	
16.	lesser noctule AdV-3	szőröskarú koraiden. (1G, 239/08 cl. 4)	KM043105	
17.	lesser noctule AdV-4	szőröskarú koraiden. (1G)	KM043103	szőröskarú koraidenevér (Sp) JX065124
18.	Med. horseshoe bat AdV-1	kereknyergű patkósdén. (1H, BS12 cl. 1)	KM043079	
19.	Med. horseshoe bat AdV-2	kereknyergű patkósdén. (1H, BS12 cl. 2)	KM043080	
20.	Med. horseshoe bat AdV-3	kereknyergű patkósdén. (1H, BS12 cl. 5)	KM043081	
21.	Med. horseshoe bat AdV-4	kereknyergű patkósdén. (1H, BS12 cl.12)	KM043082	
22.	Nathusius's pipistrelle AdV-1	durvavitorlájú törpedenevér (1G, 140/07)	KM043095	
23.	northern bat AdV-1	északi denevér (1G)	KM043101	
24.	particoloured bat AdV-1	fehértorkú denevér (1G)	KM043099	
25.	pond bat AdV-1	tavi denevér (2H)	KM043083	
26.	serotine bat AdV-1	közönséges késeidenevér (2H, BS14)	KM043085	
27.	soprano pipistrelle AdV-1	szoprán törpedenevér (1H)	KM043090	
28.	soprano pipistrelle AdV-2	szoprán törpedenevér (1G, 176/09 cl. 4)	KM043091	
29.	soprano pipistrelle AdV-3	szoprán törpedenevér (1G, 176/09 cl. 5)	KM043092	
30.	soprano pipistrelle AdV-4	szoprán törpedenevér (1G, 176/09 cl. 7)	KM043093	
31.	vespertilionid AdV-1	rőt koraidenevér (4G, 191/07) bajuszos denevér (1G)	KM043087 KM043088	
32.	vespertilionid AdV-2	durvavitorlájú törpedenevér (1G, 154/09) közönséges törpedenevér (1G, 157/08)	KM043089 KM043097	
33.	vespertilionid AdV-3	rőt koraidenevér (1G, 121/08)	KM043098	
33.	vespertilionid AdV-3	rőt koraidenevér (7G, 162/09)	KM043112	óriás koraidenevér (Sp) JX065126
34.	vespertilionid AdV-4	közönséges késeidenevér (1G, 492/08)	KM043107	great evening bat (Cn) JQ308807

Rövidítések: Med.: Mediterranean; cl.: clone/klón; H.: Hungary/Magyarország; G.: Germany/Németország; Sp.: Spanyolország; Cn.: China/Kína; Ha egy fajban több AdV-t is találtunk, a minták azonosítása miatt a törzsnévet is feltűntettük.

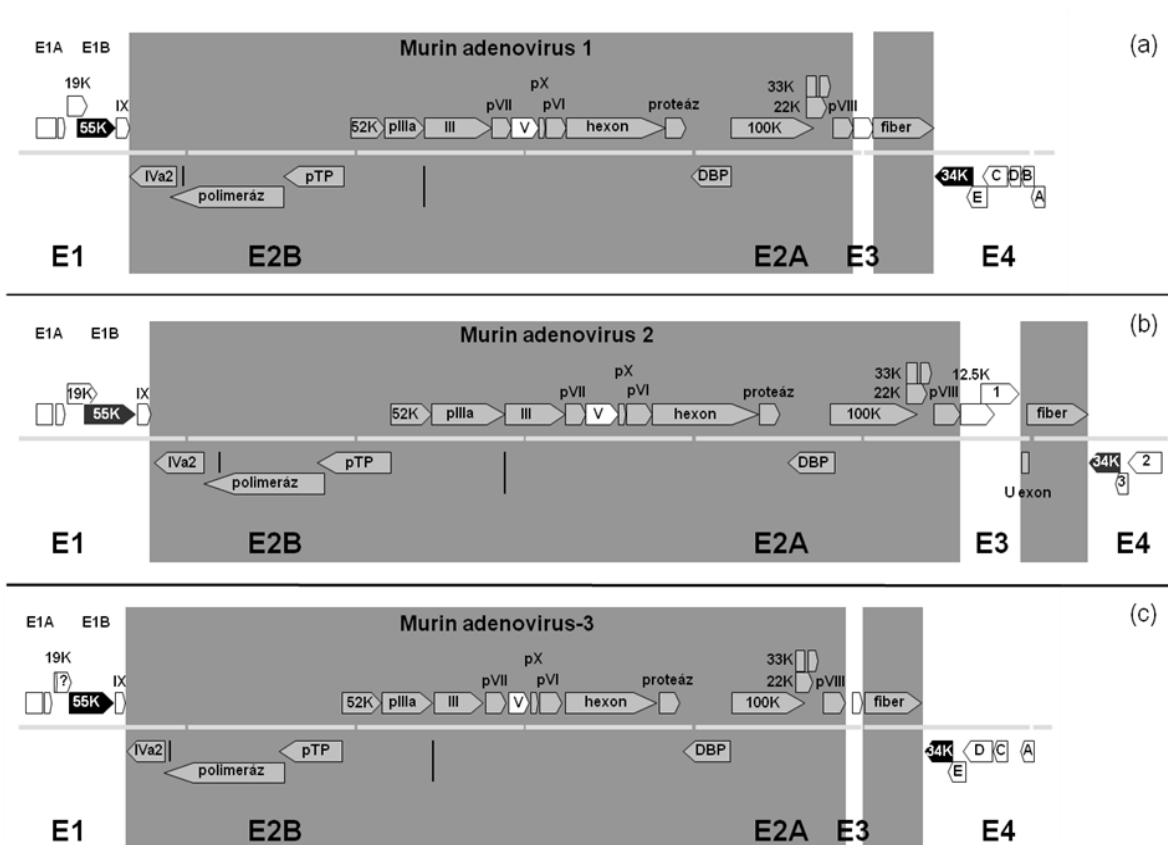
Kilenc mintában, három korábban leírt AdV-szekvenciát találtunk. Egy elhullott szőrös karú koraidenevér mintájából a Spanyolországban, ugyanebben a fajban korábban kimutatott AdV szekvenciával azonos szekvenciájú PCR terméket nyertünk (Casas et al., 2010; JX065124). Ezt a gazda alapján „lesser noctule adenovirus 4”-nek neveztük el. Hét példány rőt korai denevér mintájából ugyanazt az AdV-t mutattuk ki, amit Spanyolországban korai denevérben találtak (Casas et al., 2010; JX065126). A többféle gazda miatt a „vespertilionid adenovirus 3” nevet adtuk. Végül egy olyan AdV-t találtunk közönséges kései denevérben, amelynek szekvenciája megegyezett egy korábban Kínában leírt AdV szekvenciájával (great evening bat; Chen et al., 2012; JQ308807). Ez lett a „vespertilionid adenovirus 4”.

Minden egyes mintánál, amely a pol génre újnak bizonyult, megkíséreltük egy másik génszakasz felerősítését is, a IVa2 génjére irányuló PCR vizsgálatokkal. Ez a pol alapján újnak bizonyuló minták (38) hozzávetőlegesen kétharmadánál volt eredményes (11 német és 11 magyar minta esetében). Ez a 22 minta 15 fajhoz tartozott (3. táblázat). Egyik tisztított és szekvenált IVa2 PCR termék sem mutatott kevert szekvenciára utaló jeleket, még annak a 3 mintának az esetében sem, amelyeknél a pol gén szekvenciája több variánst tartalmazott.

6.2. Genom analízis

6.2.1. Murin adenovírus 2

A MAdV-2 K87 genomja 35.203 bp hosszúnak bizonyult, és viszonylag magas G+C (63,35%) tartalom jellemzi (GenBank szám: HM049560). Az ITR-ek 121 bp hosszúak. A 28 gént a másik két MAdV-val és a SqAdV-1-el összehasonlítva az 5. táblázat sorolja fel.



4. ábra. A MA Δ V-2 genomterképe méretarányosan összehasonlítva a másik két murin AdV genomjával. Az *Adenoviridae* család összes tagjában megőrzött génkészletet sötétszürke háttér jelöli. A középen futó világosszürke, vízszintes vonalak az 5 kb-nak megfelelő szekvencia szakaszokat jelzik. A szürke nyilak az összes AdV-ban előforduló géneket jelölik. Fekete nyilak jelölik az egynél több, de nem az összes nemzetség tagjaiban megtalálható géneket. (Az E1B 55K-nak és az E4 34K-nak megtalálhatóak homológjai az *Atadenovirus* nemzetségben). A fehér nyilak a specifikus géneket jelölik.

6.2.2. Mókus-adenovírus 1

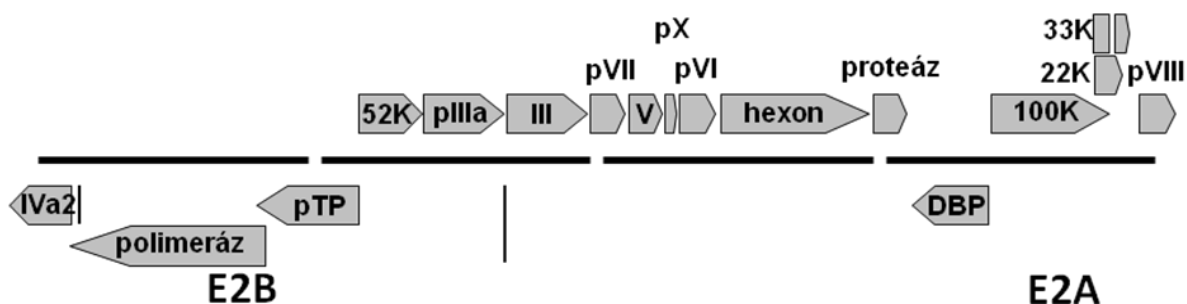
A Németországban kimutatott és vizsgált SqAdV-1 genomjának 20.602 bp hosszúságú, a IVa2 és a pVIII gének közti szakaszát szekvenáltuk (Peters et al., 2011). A vírust nem sikerült izolálni, így az alkalmazott véletlenszerű klónozást sokkal kevesebb DNS-sel kellett végeznünk, ami nehezítette a munkát, és hozzájárult ahhoz is, hogy még nem áll rendelkezésünkre a teljes genom-szekvencia. Az ismert régió G+C aránya 45,72%, ami kiegyensúlyozottnak tekinthető. Ezen a szakaszon 17 gént azonosítottunk (5. táblázat). A IVa2 és pVIII génekből csak rész szekvencia áll a rendelkezésünkre. A szekvencia szinten megismert gének mérete általában megfelelt a *Mastadenovirus* nemzetség többi tagjának homológ génjével. A gének elhelyezkedését az 5. ábra mutatja.

5. táblázat. A MAdV-2 és SqAdV-1 génjeinek összehasonlítása a többi MAdV-ban és a HAdV-2-ben található génekkel; a MAdV-ok genom méretkülönbsége a gének hosszára és nem a gének számának eltérésére vezethető vissza

		MAdV-2 (35.203)	MAdV-1 (30.944)	MAdV-3 (30.570)	SqAdV-1 (20.602)#	HAdV-2 (35.937)
Gén/ORF	méret (aminosav)	a kódoló szekvenciák helye	méret (as)			
ITR	121 bp	1..121, 35082..35203	93 bp	126 bp	-	102 bp
E1A	263	348..975, 1068..1231	253	187	-	289
E1B 19K	333 az N-terminális régió (150 as) homológ	1505..2506	175	23 (174)	-	175
E1B 55K	608	1885..3711	447	432	-	495
IX	99	3774..4073	96	86	-	140
IVa2	478 (476)	4133..5556, 5910..5922 c (4133..5556, 5920..5926 c)	440	383	-	449
pol	1274	5296..9117, 14362..14364 c	1214	1202	1154	1198
pTP	743	8925..11153, 14362..14364 c	636	627	~607*	671
52K	492	11174..12652	359	359	340	415
pIIIa	541	12689..14314	494	498	537	585
III	498	14501..15997	489	490	473	571
pVII	165	16065..16562	199	209	110	198
V	336	16673..17683	228	205	345	369
pX	81	17731..17976	74	74	83	80
pVI	252	18100..18858	237	226	236	250
hexon	922	19016..21784	910	909	909	968
proteáz	214	21797..22441	204	203	206	204
DBP	480	22507..23949 c	461	461	432	529
100K	844	23861..26395	743	721	701	805
33K	172	26094..26315, 26749..27045	193	186	215	228
22K	210	26094..26726	170	172	119	195
pVIII	261	27155..27940	215	218	-	227
E3 12,5K	303	27933..28844	-	-	-	107
E3 ORF	181 (nem homológ) 160 (nem homológ)	28801..29346 (28754..29236)	161	84	-	-
U exon	59	29444..29622 c	-	-	-	54
fiber	787	29621..31984	613	567	-	582
E4 34K	322	32024..32992 c	266	265	-	294
E4 ORFE	200 (nem homológ)	32757..33359 c	168	178	-	-
E4 ORFD	391 (nem homológ)	33382..34557 c	259	284	-	-
E4 ORFC	-		145	143	-	-
E4 ORFB	-		116	-	-	-
E4 ORFA	-		132	129	-	-

*, A splicing akceptor hely bizonytalan; #, részleges szekvencia

Mókus-adenovírus 1

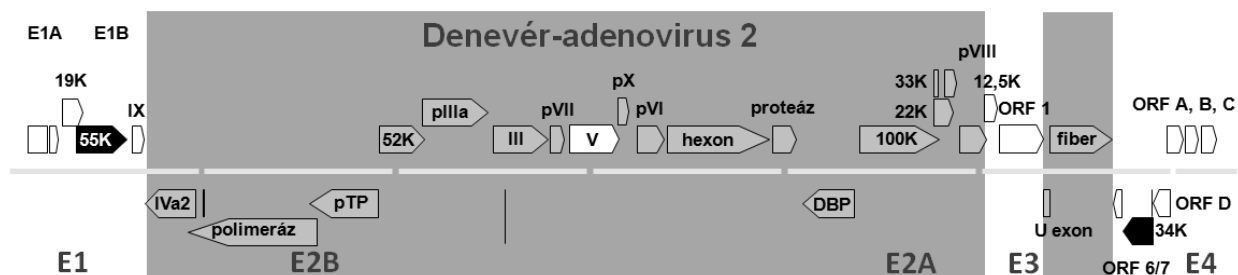


5. ábra. A SqAdV-1 középső, megismert genomszakaszának térképe. A középen futó vízszintes vonalak az 5 kb-nak megfelelő szekvencia szakaszokat jelzik.

6.2.3. Denevér-adenovírus 2

A Németországban izolált BtAdV-2 teljes genomjának szekvenciáját újgenerációs szekvenálással (piroszekvenálással) állapították meg, amelyhez 454 Genome Sequencer FLX (454 Life Sciences, Branford, CL, USA) gépet használtak. Az összeállított genomszekvenciát elemeztem, és a többi mastadenovírus genomhoz hasonlítva megállapítottam a géneket, ORF-eket és a feltételezhető splicing helyeket (GenBank benyújtási szám: JN252129). A genom 31.616 bp hosszú, átlagos 53,5% G+C tartalommal, 146 bp hosszú ITR-rel rendelkeznek, és 31 feltételezhető gént tartalmaz (6. ábra).

Az ICTV-hez benyújtott javaslatunk alapján az új AdV-t, a bat adenovirus 2 (BtAdV-2) típust, a *Mastadenovirus* nemzetségbe tartozó új AdV fajként fogadták el *Bat mastadenovirus B* néven (Harrach et al., 2011). A BtAdV-2 génjeit is összehasonlítottuk más AdV-ok génjeivel, amit a 6. táblázat mutat be.



6. ábra. A BtAdV-2 genomtérképe. A jelölések a 4. ábránál leírtaknak megfelelőek.

6. táblázat. A BtAdV-2 feltételezett génjeinek összehasonlítása a BtAdV-3, a CAdV típusok, az EAdV-1 és a HAdV-2 génjeivel

Gén/ORF	BtAdV-B		BtAdV-A	CAdV-A		EAdV-A	HAdV-C
	BtAdV-2 (31.616)	a kódoló szekvenciák elhelyezkedése	BtAdV-3 (>31.680) ¹	CAdV-1 (30.288)	CAdV-2 (31.323)	EAdV-1 (32.690)	HAdV-2 (35.937)
		méret (as)					
ITR	1..146, 31471..31616	[146 bp]	NM	[199 bp]	[198 bp]	[106 bp]	[102 bp]
E1A	490..1000, 1085..1305	243	217	230	232	188	289
E1B 19K	1474..2016	180	182	169	169	179	175
E1B 55K	1836..3170	444	459	444	444	453	495
IX	3237..3548	103	106	103	103	121	140
IVa2	3545..4881, 5160..5172 c	449	442	446	446	350	449
pol	4654..8061, 12628..12636 c	1138	1142	1149	1150	1164	1198
pTP	7917..9740, 12628..12636 c	610	609	608	610	638	671
52K	9777..10970	397	438	389	388	417	415
pIIIa	10843..12591	582	574	563	567	572	585
III	12660..14093	477	525	477	477	480	571
pVII	14125..14508	127	134	170	172	132	198
V	14582..15895	437	433	421	428	441	369
pX	15852..16133	93	69	68	69	68	80
pVI	16186..16932	248	273	238	249	246	250
hexon	17000..19723	907	908	905	905	913	968
proteáz	19735..20355	206	206	206	206	206	204
DBP	20399..21783 c	461	472	454	454	454	529
100K	21796..23895	699	682	689	689	714	805
33K	23732..23860, 24099..24401	143	164	149	149	200	228
22K	23732..24262	176	155	128	128	218	195
pVIII	24405..25094	229	222	224	224	227	227
E3 12,5K	25081..25431	116	(118)	117	119	-	107
E3 ORF1	25454..26626	390	382	216	364	376	-
U exon	26658..26821 c	55	67	55	55	54	54
fiber	26820..28493	557	555	543	542	835	582
E4	28508..28725, 29512..29533 c	79	96	86	86	94	150
E4 34K	28748..29533 c	261	260	265	259	257	294
E4 ORFD	29534..29986c	150	130	124	124	125	-
E4 ORFC	29862..30275	137	124	132	123	132	-
E4 ORFB	30302..30661	119	119	128	134	125	-
E4 ORFA	30746..31141	131	187	153	131	130	-

Rövidítések: c, a gén a komplementer száron van kódolva; NM, nincs meghatározva; ¹, a genom végek nincsenek pontosan meghatározva.

7. Megbeszélés

7.1. Új adenovírusok

7.1.1. Rágcsálók adenovírusai

Minden kimutatott rágcsáló-AdV a *Mastadenovirus* nemzetségbe tartozik. Ez egybevágg a korábbi eredményekkel, eddig ugyanis szinte minden emlősből kimutatott AdV mastadenovírus volt. Ez alól kivételt képeznek a kérődzők és egy erszényes róka (rókakuzu - *Trichosurus vulpecula*) amelyekben atadenovírusokat (is) találtak (Bartha 1969; Harrach et al., 1997; Thomson et al., 2002). A világon elsőként mutattuk ki AdV jelenlétét vízidisznóban, amely a tengerimalacfélék (Caviidae) családjába tartozik. Hasonlóképpen, a hörcsögfélék (Cricetidae) családjába tartozó mezei pocokból, szintén senki nem mutatott ki AdV-t ezelőtt (Vidovszky et al., 2011). Két pozitív minta esetében pirókegérből egy eddig ismeretlen AdV-t sikerült kimutatnunk, melynek a murin AdV-4 nevet javasoljuk. Ezen felül igazoltuk a MAdV-3 jelenlétét a magyar vadon élő állományban is. A 19 vizsgált mintából 15 lett pozitív, ami a vírus jelentős elterjedésére enged következtetni. Mintagyűjtésünk során igyekeztünk minél szélesebb rendszertani körből vizsgálni a rágcsáló mintákat. A 14 fajhoz tartozó 64 vizsgált rágcsáló-minta a rágcsálók rendjének három alrendjét képviselte. Mind a három alrend legalább egy mintájában sikerült AdV-t kimutatni. Nevezetesen az Egéralkatúak (*Myomorpha*) alrendjéből pirókegérből és mezei pocokból, a Sülalkatúak (*Hystricomorpha*) alrendjéből vízidisznóból, a Mókusalakatúak (*Sciuromorpha*) alrendjéből vörös mókusból. Így lehetőségünk volt a vírusok filogenetikai viszonyainak vizsgálatára is (3. ábra). AdV jelenléte vörös mókusban azonban csak a németországi mintákból volt kimutatható. A filogenetikai rekonstrukciók alapján kijelenthetjük, hogy a rágcsáló AdV-ok mind ősiek, de nem monofiletikusak. Érdekes módon a törzsfa-rekonstrukciókon a BAdV-10 is a rágcsálók adenovírusai között jelent meg. A BAdV-10 erősen patogén és minden eddigi izolátuma elhullott állatokból származik. Mindezek alapján feltételezhetjük a BAdV-10 rágcsáló-AdV eredetét (Matiz et al., 1998).

A három MAdV-on kívül rágcsálókból korábban csak tengerimalacból (Pring-Akerblom et al., 1997), közönséges (vörös mókus) és szürkemókusból (Everest et al., 2008; 2009; 2010a; 2010b; 2012; 2013, Sainsbury et al., 2001; Martínez-Jiménez et al., 2011) valamint őzegérből (Reeves et al., 1967; Phan et al., 2011) írtak le adenovírust. Így a felismert rágcsáló-adenovírusok számát jelentősen tudtuk növelni. Elsőként sikerült kimutatnunk a SqAdV-1-et az európai kontinensen is, mivel korábban csak az Egyesült Királyság szigetein mutatták ki, míg mi Németországban befogott állatokból. A németországi SqAdV-1 nem tűnik különbözőnek az egyesült királyságbeli vírustól. Más szerzők azóta AdV

olaszországi jelenléte is leírták közönséges (vörös) valamint szürkemókusban is (Romeo et al., 2014).

A		1	70
MAdV-3Szlovákia	ATGCTGCGTG TTTCCCTTT ACTGACTCCT TTTATGGATT CTTTCCCGC AATTGCAAT TTGCTTTGT		
MAdV-3Magyaró	ATGCTGCGTG TTTCCCTTT ACTGACTCCT TTTATGGATT CTTTCCCGC AATTGCACT TTGCTTTTGC		
	71	140	
MAdV-3Szlovákia	AAGCTACGGG ACATAGGGAA CCATGGTGGT TTCGTTTTTT TGTTCTGTTT GGTTCCTCCG CTTTCGTCA		
MAdV-3Magyaró	AAGCTACGGG ACATAGGGAA CCATGGTGGT TTCGTTTTTT TGTTCTGTTT GGTTCCTCCG CTTTCGTCA		
	141	210	
MAdV-3Szlovákia	CTTGGGGGAT GTAGTGAGGA GTCTTGCTCG GGAACGGGAA ACTGAGTTTC AGATTCTTCT TCCCTCTTGG		
MAdV-3Magyaró	CTTGGGGGAT GTAGTGAGGA GTCTTGCTCG GGAACGGGAA ACTGAGTTTC AGATTCTTCT TCCCTCTTGG		
	211	280	
MAdV-3Szlovákia	ATGATTTTCAG ATGTTGCGCA GGGTACTTTT GCTATGTTGC CTGAGTTCTT GCTTAGTTTG CGTTTTGATG		
MAdV-3Magyaró	ATGATTTTCAG ATGTTGCGCA GGGTACTTTT GCTATGTTAC CTGAGTTCTT GCTTAGTTTG CGTTTTGATG		
	281	350	
MAdV-3Szlovákia	CTGCGGGCCA GGCTATGGTT TCACTTGCGT TTTTGTCATA TCTTATTGAT AGGGCTGTGC AGCAAGGGCC		
MAdV-3Magyaró	CTGCGGGACA GGCTATGGTT TCACTTGCGT TTTTGTCATA TCTTATTGAT AGGGCTGTGC AGCAAGGGCC		
	351	420	
MAdV-3Szlovákia	GCTTTCCTAT TTTACTATTG TGGAGATTGT TTCTTTGCAT CTATGGAGAG CGATCAATTT GCCCCTGAGA		
MAdV-3Magyaró	GCTTTCCTAT TTTACTATTG TGGAGATTGT TTCTTTGCAT CTATGGAGAG CGATCAATTT GCCCCTGAGA		
	421	490	
MAdV-3Szlovákia	CCTACGAGAC CAGCGATGTG GGTCTCCAGG TTGCCAACCT TGGCGGAGGA GGACGAAGAG ACCAGGCCCC		
MAdV-3Magyaró	CCTACGAGAC CAGCGATGTG GGTCTCCAGG TTGCCAACCT TGGCGGAGGA GGACGAAGAG ACCAGGCCCC		
	491	525	
MAdV-3Szlovákia	CAGGCTCGGA GCCGGAGCAC GAGAGCTCGG CCTAA		
MAdV-3Magyaró	CAGGCTCGGA GCCGGAGCAC GAGAGCTCGG CCTAA		
B		1	70
MAdV-3Szlovákia	MLRVFPLLTP FMSDFPAIRN LLLXATGHRE PWWFRFFVLF GFPRFRHLGD VVRSLARERE TEFQILLPSW		
MAdV-3Magyaró	MLRVFPLLTP FMSDFPAIRT LLLQATGHRE PWWFRFFVLF GFPRFRHLGD VVRSLARERE TEFQILLPSW		
	71	140	
MAdV-3Szlovákia	MISDVAQGTf AMLPEFLLSL RFDAAGQAMV SLAFLSYLID RAVQQGPLSY FTIVEIVSLH LWRAINLPLR		
MAdV-3Magyaró	MISDVAQGTf AMLPEFLLSL RFDAAGQAMV SLAFLSYLID RAVQQGPLSY FTIVEIVSLH LWRAINLPLR		
	141	174	
MAdV-3Szlovákia	PTRPAMWVSR LPTLAEEDDEE TRPPGSEPEH ESSA		
MAdV-3Magyaró	PTRPAMWVSR LPTLAEEDDEE TRPPGSEPEH ESSA		

7. ábra. A Szlovákiában izolált és az általunk, hazai pirókegéből kimutatott MAdV-3 törzsek E1B 19K génjeinek szekvenciája. A: nukleotid szekvenciák összehasonlítása, B: az aminosav szekvenciák összehasonlítása. A 24. pozícióban X jelöli a stop kodont. Az eltéréseket kék szín, a megőrzött homológ szakaszt szürke háttér jelöli..

A GenBank-ban lévő MAdV-3 teljes genomjának tanulmányozásakor feltűnt számunkra az E1B 19K gén szokatlan rövidsége a többi AdV-hoz viszonyítva. Gyanús volt, hogy a rövid ORF stop kodonja utáni töredék ORF által kódolt aminosav szekvencia is homológiát mutatott a többi AdV E1B 19K fehérjéjével. Ennek vizsgálatára specifikus primerek tervezésével felerősítettük az E1B 19K gént a saját mintáinkból, és bizonyítottuk, hogy a magyarországi vadállományban található vírusban a gén teljes hosszúságú az izolált vírussal ellentétben, vagyis nem tartalmazza a köztes stop kodont. Az esetleges szekvenálási hibák kizárása céljából zürichi kollégáinkkal (Prof. Detlev H. Krüger jóvoltából) újraszekvenáltuk az izolált MAdV-3 E1B 19K génjét is, de ismételen a stop kodon szokatlan jelenléte igazolódott az izolátumban. Az adott génszakaszon a hazai MAdV-3-hoz viszonyítva további három nt eltérést találtunk, amely egy aminosav eltérést is okozott a

fehérjében. Mivel a stop kodon megjelenését egyetlen nt különbség okozta, feltételezhető, hogy spontán pontmutációról van szó, amely esetleg már az izolálást követő passzázsok során keletkezett. Az E1B 19K génről keletkező fehérje apoptózis gátló hatással rendelkezik (Han et al., 1996). A stop kodon utáni rész homológiája is arra enged következtetni, hogy nemrégiben még a teljes gén jelen lehetett a vírusban. A felismert nt és aminosav különbségeket a 7. ábra mutatja be.

7.1.2. Denevérek adenovírusai

Magyarországról mind a 28 előforduló denevérfajból sikerült mintát gyűjtenünk, míg a Németországban eddig megfigyelt 25 faj közül csak 17-ből. Az északi denevér (*Eptesicus nilsonii*) előfordulását Magyarországon csupán két megfigyelés tanúsítja, ezért említésre méltó, hogy a magyarországi minta ugyan negatívnak bizonyult (Jánoska et al., 2011), de a faj németországi mintájából sikerült AdV-t kimutatnunk.

Németországban 3 elhullott közönséges törpedenevér mintájából mutattak ki PCR-rel egy új AdV-t, melyet bat AdV-2 PPV1-nek neveztek el (Sonntag et al., 2009). A kimutatott vírusra tervezett specifikus primerekkel, real-time PCR-rel igazolták a vírus jelenlétét további 9 közönséges törpedenevérben. A pozitív állatok nagy részénél (10 esetben) a patológiai vizsgálat komoly traumatikus sérüléseket derített ki, pl.: tépett szárnybőrt (6 eset), csonttörést (3 eset), lehorzolt bőrt (2 eset) és hasi vagy rekeszsérvet (2 eset). Két állatban a vese megnagyobbodása, duzzanat volt látható.

Az általam PCR-rel vizsgált, összesen 359 denevér-mintából 57 (15,88%) bizonyult AdV pozitívnak. A pozitív minták aránya a német mintáknál valamivel nagyobb (36/194; 18,55%), míg a magyaroké alacsonyabb volt (21/165; 12,72%). Ez valószínűleg elsősorban a minták eredetének tulajdonítható. A német minták ugyanis mind elhullott állatokból származó belső szervek voltak. A magyar minták jelentősebb része viszont egyéni ürülék vagy végbéltampon-minta volt. Ezeknél a pozitivitás különösen alacsony volt (3/108; 2,7%). Ugyanakkor a hazai denevértörzsi minták alól gyűjtött guanó-minták pozitivitását kiemelkedően magasnak találtuk (17/54; 31,48%). A magyar minták között mindössze 3 elhullott denevér belső szerveiből kivont DNS volt, amelyek közül egy bizonyult pozitívnak.

A denevér minták fajok szerinti megoszlása, noha többé-kevésbé jól tükrözte az egyes denevérfajok előfordulását, mégsem nevezhető reprezentatívnak. A felmérés munkánkban néhány faj nem volt megfelelő számban képviselve. Ezeknek a fajoknak egy része ritkán fordul elő Magyarországon, illetve Németországban, míg más fajok egyedei nehezebben hozzáférhető helyeken, pl fák odvában töltik hibernációjukat vagy nappali pihenésüket az aktív időszakban. Így az ezen fajok mintáinak negatív eredménye nem feltétlenül jelenti azt, hogy ezek a fajok ne rendelkeznének AdV-sal.

A denevérekről, időről időre bebizonyosodik, hogy számos zoonózisért felelős kórokozó, köztük igen veszélyes vírusok hordozói (Kuzmin et al., 2011). A természetes szálláshelyek csökkenése és fokozatos eltűnése a denevéreket az emberekhez egyre közelebb kényszeríti, így egyes fajok kénytelenek beköltözni a templomtornyokba és a házak padlásaira.

A denevérekre hihetetlen nagy biodiverzitás jellemző. Munkánk során meglepően magas AdV pozitivitással (15,88%) találkoztunk (Vidovszky & Boldogh, 2011; Vidovszky et al., 2014, 2015). Az elhullott, vagy legyengült gerinces állatok szűrésekor, a laboratóriumunkban eddig tapasztalt átlag 10%-os AdV pozitivitáshoz képest, ami az emlősök esetében még ennél is kisebb (2–5%), mindenképpen meglepő volt a denevérek ilyen magas pozitívási eredménye. A minták egy részét populációszámolás céljából végzett denevérhálózás, vagy húrcsapdázás közben gyűjtötték egészséges, élő példányokból. Újabb megfigyelések szerint, a denevérek a legtöbb vírust főként vizelettel ürítik (Anthony et al., 2013). A nagyobb denevérkolóniák alól gyűjtött guanó-minták tartalmazzák a denevérek vizeletét is. A kolóniában élő fertőzött egyedek könnyen kontaminálhatják az egész guanó halmot. Szerencsére a denevérek általában fajonként alkotnak kolóniákat, így a fajok közötti kontamináció lehetőségét nagy valószínűséggel kizárhatjuk. A német minták mind elhullott, legyengült egyedektől származó belső szervminták, melyek mindegyike stresszes vagy beteg egyed lehetett. Az ilyen állapot elősegíti a korábbi AdV-os fertőzöttségek generalizálódását. Mindent egybe véve kijelenthetjük, hogy a denevér-mintagyűjteményünk AdV pozitivitása kiemelkedően és meglepően magas összehasonlítva a korábbi eredményekkel, továbbá megállapítható, hogy jóval nagyobb az esély AdV kimutatására a guanóból vagy elhullott állatokból, mint a befogott egészséges példányokból.

Egy adott denevérfaj egyedeiben előfordulhat több AdV típus is, ugyanúgy, mint más állatokban és az emberben is (Harrach et al., 2011, 2014). Ugyanakkor lehetnek olyan AdV-ok, amelyek több denevérfaj egyedeit is fertőzhetik. Néhány pozitív mintában egynél több AdV típus vagy genetikai változat jelenlétét mutattuk ki. Az AdV-ok egy-egy mintában való variabilitásának egyik magyarázata az lehet, hogy a minta telelő kolónia alól származik, és az egyedekben a vírus különféle változatai vannak jelen. Ez ellen a magyarázat ellen szól azonban az a tény, hogy a kevert minták nagyrésze német eredetű, azaz egyedi belső szervekből származott, tehát az előbb említett lehetőséget kizárhatjuk, és elfogadhatjuk, hogy egyetlen denevér példányban egyszerre több AdV típus is létezhet.

Egy frissen kimutatott AdV-t akkor feltételezhetünk új típusnak, ha ezen a rövid poligénszakaszon legalább egy as-ban különbözik a korábbi vírusoktól. A tyúk-AdV-okkal végzett korábbi vizsgálatok ugyanis azt mutatták, hogy a különböző szerotípusú, de azonos vírusfajhoz tartozó FAdV-oknak általában azonos aminosav szekvenciája volt ebben a régióban (Kaján et al., 2011). Tehát egy aminosav különbség már eltérő típust sejtet.

Amennyiben csak olyan nt különbség volt, ami az aminosav sorrendet nem befolyásolta, az AdV-t ugyanazon típus genetikai variánsának tekintettük. Ilyen esetekben alkalmazható a hexon 1-es és 2-es hurok megfelelő génszakaszának PCR-es felerősítése és szekvenálása, amely véglegesen eldöntheti, hogy valóban különböző (szero-) típusok-e ezek a vírusok. Az AdV-okat a gazdafaj angol neve után neveztük el, az *Adenoviridae* családban alkalmazott nevezéktan gyakorlatával összhangban. A hivatalos angol név helyett azonban a jelen magyar nyelvű dolgozatomban, ahol lehet, a magyar fajnevekből képzett víruselnevezéseket használom. Ha olyan AdV-t találtunk, ami megegyezett egy már korábban, másik fajban leírt, vagy általunk más gazdafajban is megtalált AdV-sal, akkor az elnevezéshez a legközelebbi közös taxont használtuk. Ez esetünkben mindig a Vespertilionidae család volt. Ezeket a latinus neveket az eredeti formájukban használom a továbbiakban is.

Három esetben azonos AdV-t mutattunk ki földrajzilag igen távoli mintákban. Két alkalommal a minták eltérő eredete Németország és Spanyolország volt (a szőröskarú koraidenevér-AdV-4 és a vespertilionid AdV-3 esetében), egyszer pedig Németország és Kína (a vespertilionid AdV-4 esetében). Ugyanakkor nem találtunk szekvencia azonosságot a pol szakaszon németországi és magyarországi pozitív mintáknál, még megegyező gazdafaj esetében sem, noha Magyarország közelebb esik földrajzilag Németországhoz, mint Spanyolország. Az európai denevérekre jellemző az északkelet-délnyugat irányú éves migráció, ami inkább biztosít lehetőséget az útvonal által érintett országokban előforduló egyedek közti víruscserére (Hutterer et al., 2005). Két magyarországi rőt koraidenevér mintából is kimutattuk a rőt koraidenevér-AdV-1-et. A németországi rőt koraidenevérből talált AdV szekvencia ezektől 1 as-ban különbözött. Ezt az AdV-t vespertilionid AdV-2-nek neveztük el, mert 4 nt eltéréssel (de azonos aminosav szekvenciával) megtaláltuk egy német közönséges törpedenevér szerveiben is. A felerősített IVa2 szekvenciája a rőt koraidenevér AdV-1-nek és a vespertilionid AdV-2-nek megegyezik. Az, hogy ez a vírus előfordul két németországi denevérfajban és egy aminosav eltéréssel egy magyarországi is, bizonyítja a denevér-AdV-ok nagy távolságú előfordulását.

A kínai *Ia io* faj (great evening bat) és a németországi közönséges késeidenevér minták 95%-os nt és 100%-os aminosav azonossága még érdekesebb. Itt a gazdafajok közötti nagy geográfiai távolság arra enged következtetni, hogy egy újkeletű gazdaváltásról lehet szó. A gazdaváltás jelentősen hozzájárul egyes AdV-oknak nagy földrajzi távolságra való elterjedéséhez. Habár a közönséges késeidenevér és az *Ia io* denevérek távol élnek egymástól, és nincs közös életterük, genetikailag elég közeli rokonok. Közvetítő fajként pedig elképzelhető a közönséges késeidenevér egy alfaja (*Eptesicus serotinus pachyomus*), amelynek élettere átfedi az *Ia io* denevérét (Juste et al., 2013). A három esetből, amikor ugyanazt az AdV-t találtuk földrajzilag egymástól távol eső helyszíneken (szőröskarú koraidenevér-AdV-4, vespertilionid AdV-3 és -4), két esetben (vespertilionid AdV-3 és -4) a

gazdák eltérő fajhoz tartoztak, ami mutatja, hogy a gazdaváltó AdV-ok nagyobb távolságot képesek megtenni.

Brazíliában, egy újvilági vámpír denevérben, rőt vérszopó denevérben (*Desmodus rotundus*) is találtak egy új AdV-t (Lima et al., 2013). Ez a vírus a dél-amerikai kontinens korábbi különállása, és mind a mai napig meglévő nagy földrajzi távolság ellenére sem mutat nagy filogenetikai távolságot a többi denevér-AdV-tól, sőt jól beilleszkedik a Vespertilionidae család képviselőiben kimutatott AdV-ok csoportjába (8. ábra). Ez azért is meglepő, hiszen a rőt vérszopó denevér egy másik családba, a Phyllostomidae családba tartozik, amiből jelenleg ez az egyetlen ismert AdV. Az újvilági levélorrú denevérek (Phyllostomidae) csak Közép- és Dél-Amerikában fordulnak elő. Feltételezzük, hogy ez az AdV gazdaváltással juthatott a vámpír denevérbe, valamelyik simaorrú (Vespertilionidae) denevérből. A simaorrú denevérek eredetileg valahonnan Laurázsiából, esetleg Észak-Amerikából származnak, de mára előfordulnak világszerte. Ezek alapján a vírus az invazív denevérfajokkal kerülhetett az újvilágba, amikor a dél-amerikai kontinens egyesült Észak-Amerikával. Feltételezzük, hogy a dél-amerikai denevérek további vizsgálatával megtalálhatjuk az újvilági Phyllostomidae család eredeti, a denevér család tagjaival az évezredek során együtt evolválódott AdV-át.

Az a tény, hogy az összes denevér-AdV a *Mastadenovirus* nemzetségbe tartozik, megerősíti korábbi hipotézisünket, miszerint a mastadenovírusok az emlősök „saját” vírusai, azaz együtt fejlődtek velük. Mastadenovírust máig csak emlősből mutattak ki, és emlősben a kérődzőkön és egy erszényesen kívül csak mastadenovírust találtak. A kivételt képező kérődzőkbe feltételezhetően a pikkelyes hüllőkből kerülhettek az atadenovírusok (Benkő & Harrach 2003). Egyetlen alkalommal egy erszényes gazdában, nevezetesen a közönséges rókakuzuban is találtak atadenovírust (Thomson et al., 2002). Feltételezhető, hogy ez a vírus is gazdát váltott, de eredete egyelőre tisztázatlan. Még az is lehetséges, hogy csak a táplálékkal került a rókakuzu belébe.

A törzsfa-rekonstrukciók denevérek esetében is alátámasztják az AdV-ok gazdafajaikkal való együtt fejlődését a vonatkozó denevér rendszertan szerint. Legjobban ezt a korábbi Microchiroptera és Megachiroptera alrendekbe tartozó denevérek AdV-ainak tökéletes elkülönülése mutatja. A Vespertilionidae, Hipposideridae, Rhinolophidae és Pteropodidae családok AdV-ai szintén jól elkülönülő csoportokat alkotnak, noha sajnálatos módon nem teljesen monofiletikusak. Mindenesetre, a mi denevér-AdV-okkal kapcsolatos eredményeink a korábbi Megachiroptera–Microchiroptera alrendi elrendezést látszanak alátámasztani az újonnan javasolt Yinpterochiroptera és Yangochiroptera felosztással szemben. A Rhinolophidae és Hipposideridae családok, amelyek az új rendszerezés szerint a Pteropodidae családdal együtt a Yinpterochiroptera alrendbe tartoznak, a denevérgazdák AdV-aira vonatkozó törzsfa-rekonstrukción egyértelműen a korábbi alrend-társukkal, a Vespertilionidae családdal alkotnak inkább közös ágat, mint a jelenlegi alrend-társukkal, a

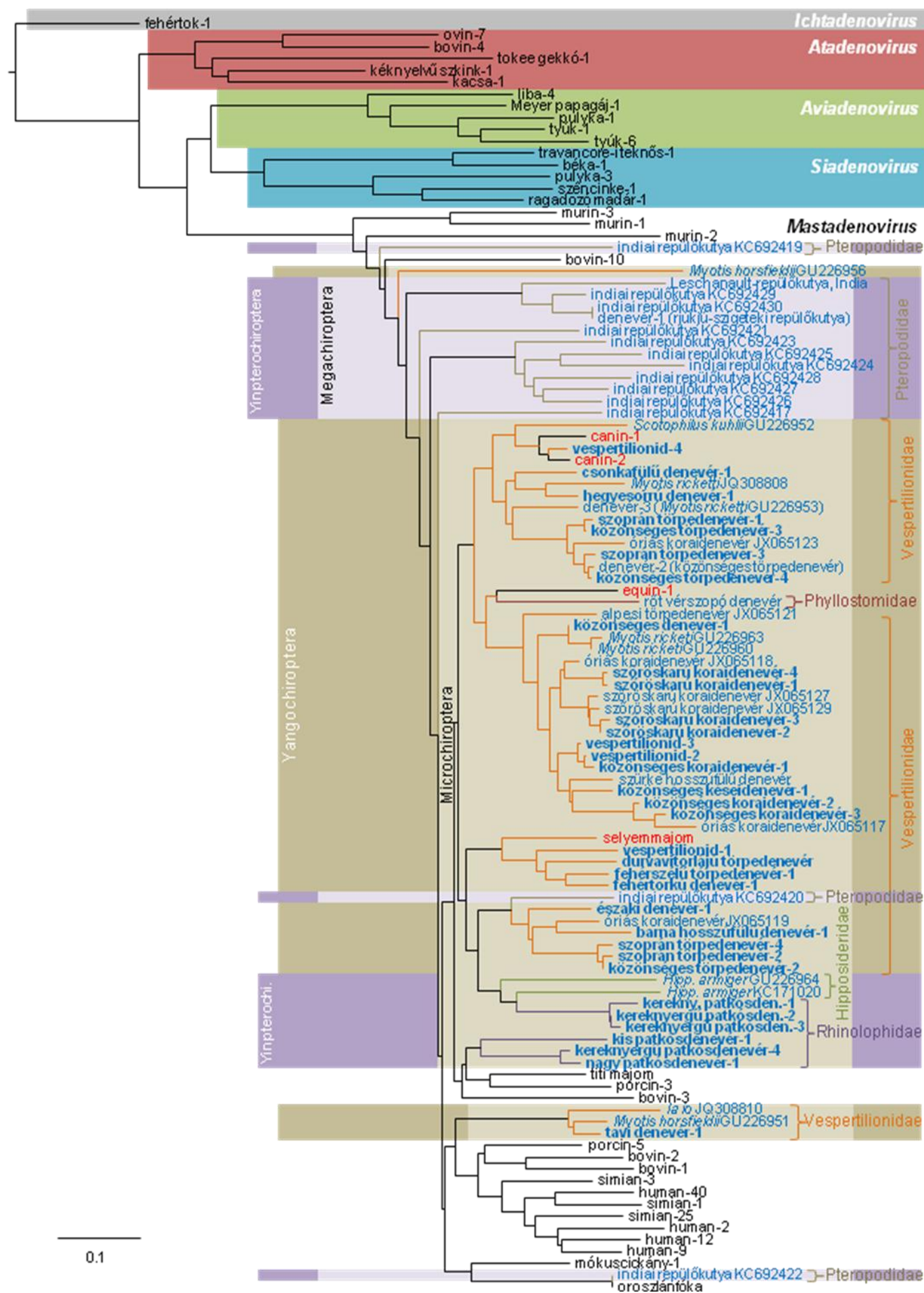
Pteropodidae-vel, amelytől tisztán elkülönülnek. Ez egyértelműen a korábbi Micro- és Megachiroptera alrendi szeparációt igazolja. Valójában oly mértékben különbözőek ezek vírusai, hogy a mastadenovírusok nagyrésze, beleértve a főemlős-AdV-okat is a Micro- és Megachiroptera AdV csoport közé ékelődik a törzsfán. Néhány denevér-AdV elhelyezkedése a törzsfán nem a várakozásainknak megfelelő. Ezekben az esetekben gazdaváltást feltételezünk. Például a kereknyergű patkósdenevérből kimutatott AdV-ok egy csoportja (kereknyergű patkósdenevér AdV-1, -2 és -3), a Hipposideridae család AdV-aival alkotnak egy ágat, távol a többi patkósdenevér-AdV-tól (8. ábra).

A canin AdV-ok (CAdV-1 és -2) mind filogenetikailag, mind pedig genomszerveződésük alapján nagyon hasonlítanak bizonyos denevér-AdV-okra, és feltételezzük, hogy valamilyen denevér-AdV eredettel rendelkeznek (Kohl et al., 2012). Egy közelmúltban megjelent tanulmányban az 1-es típusú ló-AdV (EAdV-1) teljes genom-szekvenciáját és elemzését közzétették (Cavanagh et al., 2012). E munka alapján világossá vált, hogy a CAdV-ok mellett az EAdV-1 is valószínűleg denevér-AdV eredetű. A nagyon egyedi és sokszor vírusfajonként is jellemzően eltérő E3 illetve E4 régióban (Davison et al., 2003; Ursu et al., 2004) is számos homológ ORF-et tartalmaznak a denevér- és canin AdV-ok a ló-AdV-sal. Nevezetesen az E3 régióban van egy közös homológ génjük, amelyet eddig semmilyen más AdV-ban nem mutattak ki. Az EAdV-1 genomjában ez az egyetlen E3 gén, míg a CAdV-1 és -2-ben, a BtAdV-2 és -3-ban található egy 12,5K homológ is, ami szinte minden más mastadenovírusban is létezik. Az E4 régiójukban pedig ugyanaz a 4 génjük van, melyek csak e vírusokban fordulnak elő eddigi ismereteink alapján (6. táblázat).

Ha egy gazdafajban talált AdV nagyon különbözik a gazdafaj többi AdV-ától, az egyértelmű jele, hogy nem a gazdafajjal együtt fejlődött vírusról van szó. Világos az is, hogy az előbb említett CAdV-ok és az újonnan szekvenált EAdV-1 közeli leszármazási viszonyban van bizonyos denevér-AdV-okkal. A rövid pol szakaszra alapozva megtaláltuk a CAdV-okhoz legközelebbi denevér-AdV-t, a vespertilionid AdV-4-et. Ez a vírus annyira közeli, hogy a CAdV-1 és -2 közé esik a filogenetikai fán. A három vírus (CAdV-1, -2 és a vespertilionid AdV-4) tehát egyetlen vírusfaj (*Canine mastadenovirus A*) tagjának tekinthető. Ráadásul a vespertilionid AdV-4 több denevérfaj egyedeiben is megtalálható, ami jelzi a vírus magas virulenciáját. Elképzelhető tehát, hogy nemcsak a denevérfajok közötti gazdaváltás, hanem sokkal nagyobb barrier átlépésére is képes ez a vírus. A ragadozók rendjének, a kutyaalkatúak alrendjének tagjaira, valamint egy független esemény során a lovakra is át tudott kerülni. A CAdV-ok-ról ugyanis tudott, hogy képesek megfertőzni a kutyaalkatúak számos fajtát (Benkő, 2008), így a kutyákon (*Canis familiaris*) kívül aranyakált (*Canis aureus*), farkast (*Canis lupus*), rókákat (*Vulpes sp.*), borzot (*Meles meles*) és különböző medve fajokat (*Ursus sp.*) is (Zarnke és Evans, 1989; Kiss et al., 1996b; Chomel et al., 1998; Dunbar et al., 1998; Qin et al., 2010; Bronson et al., 2014; Di Francesco et al., 2015). Ezeket

az eseteket főként szerológiai vizsgálatokkal derítették fel, és az aranysakálon kívül nem bizonyították molekuláris módszerekkel (Dandár et al., 2010). A molekulárisan jellemzett eddigi egyetlen medve-AdV, nevezetesen egy jegesmedvéből kimutatott AdV (Böszörményi Kinga, személyes közlés) a CAdV-októl nagyon eltérő mastadenovírusnak bizonyult. A ragadozók közül még a kaliforniai oroszlánfókából (*Zalophus californianus*) áll rendelkezésre AdV szekvencia (Cortés-Hinojosa et al., 2015), ami a jegesmedve-AdV-hoz hasonlóan távol esik a CAdV-októl. Így feltételezhetjük, hogy ezek valamelyike a ragadozó (Carnivora) gazdákkal együtt fejlődött AdV-ok.

A vesperilionid AdV-4 eredményeink alapján filogenetikailag közelebb áll a CAdV-2-höz, mint a CAdV-2 a CAdV-1-hez. Ez mutatja, hogy egyre közelebb vagyunk ahhoz, hogy megtaláljuk azt a denevér-AdV-t, ami a CAdV-ok közvetlen őse lehetett. Feltételezzük továbbá, hogy az EAdV-1 őse is egy vesperilionid AdV lehet, de egy másik denevérfajból. Mindkét gazdaváltás valamikor a közelmúltban történhetett, hiszen a CAdV-1 és -2 filogenetikailag nagyon közeliek, az EAdV-1-nek pedig még nem is ismeretes semmilyen változata. A CAdV-ok típusként való besorolását elsősorban a kórokozó-képességükben felismert eltérés indokolta. Bár egyelőre kevés adatunk van a másik ló-AdV-ra, az EAdV-2-re vonatkozóan, a hexon gén részleges szekvenciája alapján filogenetikailag távol áll az EAdV-1-től (Harrach et al., 2011). Tehát az EAdV-2 nem származhat az EAdV-1-től, illetve azzal közös őstől. Feltételezhetjük, hogy az EAdV-2 az evolúció során a lovakkal együtt fejlődött AdV. Ezt támasztja alá a CAdV-1-nek és EAdV-1-nek, az EAdV-2-hez viszonyított magas patogenitása is, ami elméletünk szerint az AdV-oknál gyakran a gazda-váltás jele, amely jelenséget más vírusoknál is leírták.



8. ábra. A DNS-függő DNS-polimeráz részleges szekvenciáján alapuló távolsági mátrix törzsfarekonstrukció. A főemlős-AdV-okból fajonként egy képviselőt, a *Mastadenovirus* nemzetségen kívüli nemzetségekből pedig 5-5 tagot tüntettünk fel. A vírusokat csak a gazda jelöli, az AdV-t kihagytuk a névből. A kínai AdV-okat a gazdafaj latin neve jelöli, mivel ezeknek a denevéreknek nincs magyar neve. A BtAdV-okat késsel, az általunk talált új BtAdV-okat félkövérrel jelöltük. A feltételezhetően denevér eredetű, más gazdában előforduló AdV-okat piros színnel emeltem ki.

A 8. ábrán bemutatott törzsfarekonstrukciókon szerepel számos indiai repülőkutya (*Pteropus giganteus*) kimutatott AdV is, amelyeket nemrégiben publikáltak egy az emlősök vírusainak diverzitását vizsgáló munkában (Anthony et al., 2013). Érdekes megjegyezni, hogy az egyik tyúk-AdV, míg egy másik szekvencia az azóta közölt kaliforniai oroszlánfóka-AdV megfelelő szekvenciájától (GU979536) mindössze 2 nt-ban tér el (aminosav változás nélkül). Megtalálták továbbá a közeli rokonfajból, nevezetesen a rjúkjú-szigeteki repülőkutya-AdV vizsgált szakaszán a szekvencián 1 nt eltérés van, ami aminosav változást nem okoz.

Egy szintén friss, hazai publikációban egy eddig ismeretlen, újvilági majom-AdV izolátumot írtak le (Gál et al., 2013). Filogenetikai fák elfoglalt helye alapján ez az AdV feltételezhetően szintén valamilyen denevér-AdV-től származhat. Érdekes lenne a vírus E3 és E4 régiójának szekvenálása és elemzése.

A fent taglalt eredmények mind megerősítik a denevér-AdV-ok meglepő sokféleségét. További tanulmányozásuk bizonyára közelebb visz majd további, érdekes gazdaváltások felfedezéséhez.

Teljes AdV gének esetén a korszerűbbnek tartott maximum likelihood számítások is jól alkalmazhatóak voltak. A rövid, 3-500 bp hosszúságú szakaszok vizsgálatakor azonban csak a fehérje távolsági mátrix számítási módszer bizonyult megbízhatónak és informatívnak. Természetesen ilyen rövid szakaszok esetén a számítás eredményeinek megbízhatósága mindig kérdéses. A fehérje távolsági mátrix analíziseken az AdV nemzetségek elkülönülése mindig következetesen megfigyelhető. Az eddigi tapasztalataink szerint legeredményesebben alkalmazható PCR-ek azonban sajnos csak rövid génszakaszok felerősítését teszik lehetővé (Wellehan et al., 2004). Az ezeknél nyert törzsfarekonstrukciók azonban tájékoztatást adnak arra vonatkozóan, hogy melyik vírusokat érdemes tovább vizsgálni. Pillanatnyilag a PCR-es vizsgálatokból kapott adatainkat csak előzetes, tájékoztató eredménynek tekintjük, amelynek alapján további kutatásaink célját és irányát megtervezhetjük.

7.2. Genom analízis

7.2.1. Murin adenovírus 2

Izolálása után bizonyították, hogy a MAdV-2-nek és a HAdV-3-nak közös komplement-kötő antigénje van (Hashimoto et al., 1966). A maga idejében ez elegendő adat volt a két vírus azonos nemzetségbe sorolásához. A MAdV-2 teljes genomszekvenciájának elemzése megerősítette a vírus helyét a *Mastadenovirus* nemzetségben.

A MAdV-2 első, a GenBank-ba benyújtott szekvenciája a hexon gén 253 bp hosszú töredéke volt (Lednicky & Ohr, 2004). A teljes genom szekvenálásakor ezen a szakaszon 100% nt azonosságot találtunk. A következő publikált szekvencia a DNS-függő DNS-polimeráz gén 2.894 bp hosszú szakasza volt, valamint a hexon gén kétharmadát, a teljes proteáz gént és a DNS-kötő fehérje gén (DBP) felét tartalmazó 3.334 bp hosszúságú szakasz (Compton, 2007a, 2007b). Tizenkét nt-on kívül, amelyek a benyújtott szekvenciákban 3 leolvasási keret ugrást (frame shift) okoztak, ezek az adatok is megegyeztek az általunk nyert szekvenciákkal. Az általunk végzett teljes genomanalízis kijavítja az apró hibákat, és az érintett gének (proteáz és DBP) megfelelő hosszúságúságát is meghatározza.

Hamelin és társai restrikciós enzimes hasítási kísérletekkel már 1987-ben bizonyították, hogy a házi egérből izolált két AdV törzs (FL és K87), két jól elkülönülő vírusfajt alkot (Hamelin és Lussier, 1987; 1988; Hamelin et al., 1988). Később, a két MAdV genom méretét is megbecsülték. A restrikciós enzimek által hasított töredékek méreteinek összeadásával a HAdV-2-höz viszonyítva, a MAdV-1 (30,14 Kb-ra becsülték) és MAdV-2 (34,72 Kb-ra becsülték) között jelentős méretkülönbséget ismertek fel (Jacques et al., 1994a; 1994b). Ezek a becslések a teljes genom-szekvenciák ismeretében meglepően pontosnak bizonyultak. A MAdV-1 jelenlegi genom mérete 30.944 bp (eredetileg 30.946 bp-nak közölték, Meissner et al., 1997), míg a MAdV-2 genom méretét munkánk keretében határoztuk meg, és 35.203 bp. A MAdV-3 teljes genomja 30.570 bp (Klempa et al., 2009), a MAdV-1-hez sokkal jobban hasonlít, mint a MAdV-2-höz. Összehasonlító genomelemzésünk bebizonyította, hogy a MAdV-2 genom jelentősen nagyobb méretét elsősorban az egyes gének hossza okozza, míg a gének száma alig több vagy azonos (5. táblázat). A MAdV-2 minden génje, és ebből következtetve minden fehérjéje hosszabb (kivéve a pVII és a 33K), mint a MAdV-1-ben és MAdV-3-ban megtalálható párjuk. Ha azonban a HAdV-2-t is bele vesszük az összehasonlításba, akkor már csak 3 gén marad a MAdV-2-ben, amelyek szokatlan hosszuknál fogva kilógnak a sorból. Ennek megfelelően levonhatjuk a következtetést, hogy egyes esetekben inkább a MAdV-1-nek és a MAdV-3-nak vannak megrövidült génjei, ami azonban nem magyarázza továbbra sem a néhány kivételesen hosszú gén jelenlétét a MAdV-2-ben. A K87-es törzs (MAdV-2) igen hosszú passzázsmúlttal rendelkezik az egér

sejtvonalakon. Feltételezhető, hogy a passzálások során néhány szelekciós tényező elősegítette bizonyos mutációk rögzülését, többek között azokat is, amik a hosszabb gének megjelenését okozták. Ugyanakkor az is lehetséges, hogy a vadon élő házi egér populációban fellelhető MAdV-2 variánsok is hasonló hosszúságúak, amit PCR-es felerősítésekkel tudnánk majd ellenőrizni.

Említésre méltó még, hogy a MAdV-2 G+C tartalma (63,35%) kiemelkedően magas az adenovírusok között. Csupán a porcin AdV-3 (PAdV-3) és a pulyka-AdV-1 (TAdV-1) rendelkezik magasabb G+C aránnyal (63,85% és 67,55%). A MAdV-1 és MAdV-3 G+C tartalma jelentősen alacsonyabb (47,78% és 47,22%). Egy korábbi hipotézis szerint, az alacsony G+C tartalom jele lehet a vírus közelmúltbeli gazdaváltásának (Benkő & Harrach, 2003), ami azt igazolja, hogy a MAdV-2 a házi egér eredeti, vele együtt fejlődő vírusa.

7.2.1.1. A genom sajátosságai

A jelentős méretkülönbség ellenére a három MAdV genom szerveződése nagyon hasonló, mindössze néhány apró eltérés figyelhető meg. A genom középső része 16 gént tartalmaz, mely megőrzött az *Adenoviridae* család minden egyes tagjában. A mastadenovírusokban kettő további gén található ebben a megőrzött régióban. Ezek a nemzetségspecifikus gének a IX-es és az V-ös fehérjéket kódolják. A IX-es gén korai/átmeneti átíródási régióban, míg az V-ös, késői átíródási régióban helyezkedik el. Ezek a gének megtalálhatóak a MAdV-2-ben is, de eddigi ismereteink szerint a mastadenovírusokon kívül egyik más nemzetség képviselőiben sem fordulnak elő (Davison et al., 2003).

Egy további feltételezhető gén első exonja, az úgynevezett U exon szintén megőrzött, de felismerhető homológja csak az egyes nemzetségeken belül található meg. Szinte minden más adenovírusban is van itt egy exon, de a kódolt fehérjék csak az azonos adenovírus-nemzetségek esetén hasonlóak. A *Human mastadenovirus C* fajba tartozó (az 1-es, 2-es, 5-ös és a 6-os) HAdV szerotípusokban az UXP fehérjét kódoló gén U exonon kívüli további két exonját is megtalálták (Tollefson et al., 2007). A HAdV-C-be tartozó vírusok esetében azt is bizonyították, hogy az UXP fehérje jelenléte fokozza a vírushozamot a replikáció során. Ennek a génnek az U exonon kívüli másik két exonját szekvencia összehasonlítással sajnos nem, csak mRNS vizsgálattal lehetne azonosítani. Így a HAdV-C fajba tartozó vírusokon kívül egyelőre nem ismertek. Az U exon hiánya a BAdV-10-ben, MAdV-1-ben és 3-ban kivételesnek számít (Matiz et al., 1998; Ursu et al., 2004; Klempa et al., 2009). Ezekkel szemben a MAdV-2-ben a homológ exont azonosítani tudtuk (2. táblázat).

A vírus-asszociált (VA) RNS gént az AdV genom létfontosságú alkotórészének tartják (Russell, 2009), habár jelenlétét eddig a főemlős-AdV-ok mellett csak a tyúk-AdV-1-ben (FAdV-1) igazolták, ám ott eltérő genom elhelyezkedéssel és nem homológ géneként. Nem sikerült VA RNS gén jelenlétére bukkanni egyik MAdV esetében sem (Meissner et al., 1997;

Klempa et al., 2009). A VA RNS gén valószínűleg a mastadenovírusok főemlős ágában jelent meg, majd az emberszabásúak és emberek AdV-aiban megkettőződött (Benkő & Harrach 2003). Ezt az elméletet erősíti az újabban megjelenő nem főemlős mastadenovírus genomok elemzése, melyekből rendre hiányoznak ezek a gének. A FAdV-1 esetében a VA RNS gén felvétele valamilyen más forrásból történhetett, mégpedig a vírus evolúciójának aránylag késői időpontjában, hiszen egyetlen más (akár avi-) adenovírus típusban sem sikerült ilyen gént kimutatni (Marek et al., 2014a; 2014b; Kaján et al., 2010, 2012; Grgić et al., 2011).

A mastadenovírusokban általánosan gondolták az RGD aminosav motívum jelenlétét a pentonbázis fehérjében, ami a gazdasejt α integrinjeiben előidézi az endocitózist, és ezzel a vírus sejtbe való bejutását (Wickham et al., 1993; Russell, 2009). Az RGD motívum valóban szinte minden főemlős-AdV pentonbázisának szekvenciájában megtalálható (a HAdV-40 és -41-es kivételével). Ugyanakkor mára világos lett, hogy hiányzik minden más mastadenovírus, például a bovin, porcín, canin, mókuscickány-, fóka-AdV pentonbázisából, és nem található egyik MAdV-ban sem.

A másik fehérje, ami fontos szerepet játszik a vírus sejtbe való kapcsolódásában, az antennszerűen kinyúló fiber. Az aviadenovírusok és mastadenovírusok virionjai között szembetűnő strukturális különbség a fibernyúlványok vertexenkénti száma. A fiber gének számától függetlenül a tyúk-adenovírusoknak csúcsonként kettő, míg a mastadenovírusoknak csak egy fiberük van (Szendrői et al., 2003). A tyúk-adenovírusoknál az egy vertexen elhelyezkedő két fiber hossza azonos vagy eltérő lehet, attól függően, hogy az adott AdV genomja egy vagy két különböző fiber gént tartalmaz. A FAdV-1 és FAdV-4 esetében (Griffin és Nagy, 2011), a genomban két fiber gént azonosítottak. A többi FAdV esetében, a FAdV-8-ban és -9-ben (Grgić et al., 2011) a genom csak egy fiber gént tartalmaz, ennek megfelelően a vertexeken elhelyezkedő két fibernyúlvány egyenlő hosszúságú. Két fiber gént mutattak ki továbbá a TAdV-1 és -5 (Kaján et al., 2010), valamint a galamb-adenovírus-1 esetében is. Ezzel szemben a kacsá-adenovírus-2 (DAdV-2) és a TAdV-4 elemzése során csak egy fiber gént találtak (Marek et al., 2014a, 2014b). Előfordul mastadenovírusok esetében is, hogy a genom két különböző fiber gént tartalmaz. Erre példa a HAdV-40, -41, -52, valamint számos óvilági (nem emberszabású) majom-AdV, mint pl. a simian AdV-1 (Kovács et al., 2005; Pantó et al., 2015). Ezekben az esetekben a különböző hosszúságú fiber nyúlványok valószínűleg mindig különböző vertexeken jelennek meg a virionban. A nem-főemlős-mastadenovírusok esetében azonban mindig csak egy fiber gén található a genomban, ennek megfelelően minden MAdV-ban is. Az egy vagy két fiber gén jelenlétét tartják az egyik meghatározó elkülönítő kritériumnak a fajok behatárolásánál is (Benkő et al., 2005) A siadenovírusoknál eddig mindig csak egy fiber gént találtak (Kovács & Benkő, 2011). Az atadenovírusoknak 1 vagy 2 fiber génje lehet. Ez utóbbiak közül a gyík-

AdV-2-nél találták az eddigi legmeglepőbb struktúrát. Elektronmikroszkópos képek alapján a virion két szemközti csúcsán 3 hosszú fiber van, míg az összes többi vertexen 1-1 rövid (Pénzes et al., 2014). Röntgen-krisztallográfia alkalmazásával a fehérje háromdimenziós szerkezete vizsgálható, pl. a fiberek feji részének affinitása meghatározható. Ilyen vizsgálatokhoz mi is készítettünk konstrukciókat (Nguyen et al., 2015).

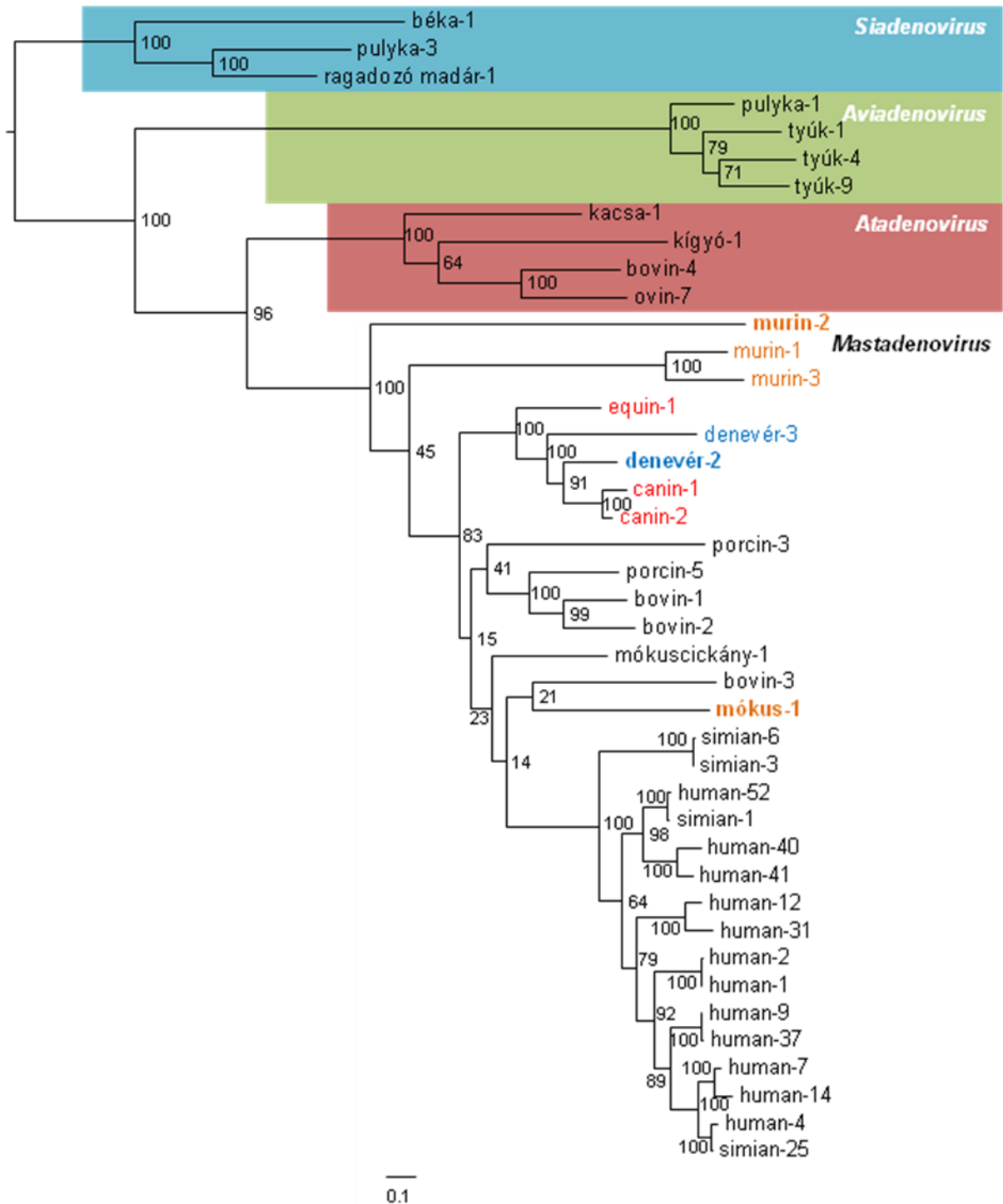
Egyes génekben a splicing megléte vagy hiánya szintén a nemzetség egyik specifikus meghatározója lehet. A pTP és a 33K fehérje génje minden AdV esetében két exonból áll. A mastadenovírusoknál további két fehérje rendelkezik még biztosan splicing helyekkel, a IVa2 és a DNS-függő DNS-polimeráz. A si- és atadenovírusok esetében a DBP fehérje termelődik két exonról (Davison et al., 2003). A MAdV-2 *in silico* analízise alapján megállapítottam, hogy a IVa2, a pTP, a DNS-polimeráz és a 33K gén 1-1 intront tartalmaz, ugyanúgy mint a MAdV-1-ben és a MAdV-3-ban.

A mastadenovírusokban a genom bal oldalán található E1 régió meglehetősen megőrzött. Minden E1 gén megtalálható a MAdV-2-ben is. Az E1B régió 19K homológ génjénél meglepő méretkülönbségeket tapasztaltunk a három MAdV genomjában. A MAdV-2 E1B 19K-ja a genomanalízis alapján 330 aminosav hosszúságú, és N-terminális fele (150 aminosav) homológ a MAdV-1-ben található E1B 19K fehérjével, ami csupán 175 aminosav hosszú. A MAdV-3 Szlovákiában izolált törzsében az E1B 19K fehérje 23 aminosav után meglepően befejeződik egy stop kodonnal. Ha ezt a stop kodont figyelmen kívül hagyjuk, akkor 174 aminosav hosszúságú fehérjét kódoló gén lenne. Mindenesetre a MAdV-2-ben található kifejezetten hosszú E1B 19K gén különlegességnek számít, és átfed az E1B 55K génnel, ami egy másik leolvasási keretben található.

A vizsgált mastadenovírusok közül ez idáig a BAdV-10-nek van a legrövidebb E3 régiója, ami csak 2 gént tartalmaz. A MAdV-1-nek és a MAdV-3-nak a megfelelő genomrégiója valamivel hosszabb, noha csupán egyetlen ORF-ből áll. Ezzel ellentétben a MAdV-2 E3 régiójában 3 ORF található, amelyek közül az egyik, ami hiányzik mind a MAdV-1-ből, mind a MAdV-3-ból a 12,5K-val homológ (Klempa et al., 2009). A 12,5K szerepe egyelőre tisztázatlan, de úgy tűnik, nem létfontosságú. Megtalálható majdnem minden mastadenovírusban kivéve a HAdV-40-et és -41-et, a BAdV-3-at, PAdV-4-et, mókuscickány-AdV-1-et és az EAdV-1-et (Davison et al., 2003; Ursu et al., 2004). A MAdV-2 E3 régiójában a 12,5K gént követően szintén az *r* szálon, átfedve, de különböző leolvasási keretekben két ORF található, melyek egy 181 aminosav és egy 160 aminosav hosszú fehérjét kódolnak. Egyikük sem mutat homológiát bármilyen más fehérjével a GenBank-ban. Említésre méltó, hogy a pVIII és fiber génje között még egy, szintén semmire nem hasonlító ORF van, de ez nem része az E3 régióknak, mivel az *l* szálon helyezkedik el, teljes átfedésben az előbb említett két ORF-fel. Potenciálisan 211 aminosav hosszú fehérjét kódol. További kísérletek lennének szükségesek ahhoz, hogy bizonyítsuk a három ORF közül hány, és melyik

működik génként. A 4. ábrán bemutatott genomterképen csak a 181 aminosav hosszúságú ORF-et tüntettem fel.

A genom jobb oldalán az AdV-ok egyik legvariábilisabb szakasza, az E4 régió található. Tartalma és mérete is nagy különbségeket mutat a *Mastadenovirus* nemzetségbe tartozó AdV fajok között (Ursu et al., 2004). A régió legmegőrzöttebb génje a 34K gén (Davison et al., 2003), aminek a homológja még az atadenovírusokban is megtalálható (Both, 2002). A 34K az E1B 55K fehérjével heterodimert alkotva befolyásolja a gazdasejt anyagcseréjét az ubiquitináció folyamat révén (Harada et al., 2002; Gilson et al., 2014). Néhány mastadenovírusban és látszólag minden atadenovírusban is, a 34K fehérjének két példánya van jelen (Nagy et al., 2001; Ursu et al., 2004, Farkas et al., 2008; Péntes et al., 2014). Ezzel szemben mindhárom MAdV-ban csak egy 34K gén található (Kring et al., 1992; Klempa et al., 2009; Hemmi et al., 2011). A MAdV-1 genomban a 34K géntől jobbra az E4 régióban 5 feltételezhető gént írtak le (ORFA–E), noha ezek funkciója nem ismert (Davison et al., 2003). A MAdV-3-ban az ORFB-n kívül megtalálták ezek homológjait (Klempa et al., 2009). A MAdV-2-ben viszont ezen a helyen csupán két ORF található a balra átíródó szálon, noha egyikük sem mutat semmilyen homológiát a MAdV-1 ORF-ekkel. Ez is bizonyítja, hogy a MAdV-2 genomszerveződés tekintetében is jelentősen eltér az egymásra nagyon hasonló MAdV-1 és -3-tól.



9. ábra. Teljes DNS-polimeráz szekvencián alapuló törzsfa-rekonstrukció. A filogenetikai számításokat „legnagyobb valószínűség” módszerrel számítottuk a modell-szelekció alapján LG+I+G+F modellel. Az elágazásokon láthatók a bootstrap értékek. A főemlős-AdV-okból fajonként egy képviselőt, a *Mastadenovirus* nemzetségen kívüli nemzetségekből pedig 3–4 vírust foglaltam az analízisbe. A BtAdV-okat kék, a rágcsáló-AdV-okat narancssárga szín jelöli. Az általam vizsgált vírusok félkövérrel kiemelve. A vírusok jelölésekor az AdV-t elhagytuk. A feltételezésünk szerint BtAdV-eredetű, ló- és kutya-AdV-ok pirossal kiemelve.

7.2.1.2. A MAdV-2 filogenetikai helyzete

A törzsfa-rekonstrukciókon a MAdV-ok vagy monofiletikus ágat alkotnak, vagy nagyon közel helyezkednek el egymáshoz. A többi ismert mastadenovírushoz képest mindig a legősibbnek tűnnek (Hemmi et al., 2011). Míg a MAdV-1 és MAdV-3 szinte bármilyen gént alapul véve a törzsfa-rekonstrukciókban mindig monofiletikusnak bizonyul, a MAdV-2 következetesen ezektől elkülönülő, monofiletikus vagy szomszédos ágat alkot. Ez a fa-topológia arra utal, hogy a MAdV-2 a legősibb az eddig megismert összes mastadenovírus között (9. ábra). Mindhárom MAdV között a teljes genetikai távolság meghaladja az 5–15%-ot, ami a szükséges előfeltétele az AdV-ok külön fajba sorolásának. Ennek következtében, mindhárom MAdV típus külön vírus fajba sorolható. Leghamarabb a *Murine adenovirus A* fajt fogadta el az ICTV (Benkő et al., 2005), ami a mostanában bevezetett névváltoztatás következtében ma *Murine mastadenovirus A*. A MAdV-3 publikálása után (Klempa et al., 2009) szinte rögtön elfogadták a *Murine mastadenovirus C* fajt is. Indítványunk alapján az ICTV fenntartotta a *Murine mastadenovirus B* fajt a MAdV-2-nek, amit a teljes genomanalízis alapján harmadikként szintén el is fogadtak (Hemmi et al., 2011).

Wigand és munkatársai (1977) közölték, hogy a MAdV-1 és a MAdV-2 között nincs keresztreakció. Ezt az állítást teljes mértékben igazolta a két vírus között általunk talált filogenetikai és genetikai különbség. Az eltérő antigén hatás az AdV-oknál elsősorban a hexon 1-es és 2-es hurok, valamint a fiber fej különbségein múlik. A MAdV-1-et és MAdV-2-őt korábban más kutatók rokon, de különböző vírusként azonosították (Sugiyama et al., 1967; Smith et al., 1986; Lussier et al., 1987).

A 10. ábrán bemutatott összehasonlítás a vírusok hexonja között jól mutatja mind a különbségeket, mind a tapasztalt hasonlóságokat.

A tény, hogy a MAdV-2 sokkal kevésbé hasonlít a MAdV-1-re vagy a MAdV-3-ra mint azok egymásra, kissé különös, hiszen a MAdV-1-et és a MAdV-2-t házi egérből izolálták, ellentétben a MAdV-3-mal, amit pirókegérből. Erre a paradoxonra még nem sikerült biztos magyarázatot találnunk, de feltételezhető, hogy a MAdV-2 lehet a házi egér „eredeti”, vele együtt fejlődött vírusa, a MAdV-3 pedig a pirókegéré, hiszen ezek nem okoznak kóros elváltozást a gazdáikban. A MAdV-1 viszont, ami bizonyos egér törzsekben encephalomyelitist idéz elő, esetleg egy gazdaváltást átélő vírus, a MAdV-3 rokona, amely később kerülhetett át a házi egérre. Ezek alapján a MAdV-1 eredeti gazdáját valószínűleg nem ismerjük még.

működő immunrendszerrel rendelkeznek, ezzel növelve a sikeres anti-tumor terápiák várható értékét (Robinson et al., 2009).

7.2.2. Mókus-adenovírus 1

Három, fogságban tartott, hét hónapos vörös mókus (két nőstény és egy hím) pusztult el váratlanul, Németországban. Az állatokat magánkézben tartották, fogságban szaporították és a tulajdonos elmondása szerint, soha nem hagyták el a ketrecüket, és a ketrecbe sem érkezett semmilyen más állat. A tetemeiket a német állatorvosok kórbonctanilag vizsgálták. A mókusok jó állapotban voltak és megfelelő testsúllyal rendelkeztek (180 g, 220 g, 240 g). A fő kórtani elváltozás: a kitágult vékonybelek vizenyős, krémes, barna tartalma volt. A vastag- illetve végbélben nem mutattak ki komolyabb kórbonctani elváltozást. Mindhárom mókus veséjét enyhén vagy mérsékelten megnagyobbodottnak találták. Két mókuson elvégzett kórszövet-tani vizsgálattal a vékonybélben heves, súlyos, elhalásos gyulladást találtak. A bélbolyhok súlyosan károsodottak voltak. A nyálkahártya neutrophil granulocytás, histocytás, lymphocytás és plazmasejtes beszűrődését lehetett látni. A bélhámsejt magjában néhány AdV-ok jelenlétére utaló bazofil zárványt figyeltek meg. A bél lumenében és mélyen a nyálkahártyában bélféreg keresztmetszete látszott. Hemolizáló *E. coli*-t sikerült izolálni mindhárom mókus beléből, továbbá egyikük májából és veséjéből is. Más, bakteriális kórokozót nem találtak. Flotációs módszerrel mindhárom mókus bélsarából nagyszámú bélféreg petét mutattak ki. A leírtak alapján, nem vonható le egyértelműen az a következtetés, hogy az állatok elhullását a kimutatott AdV okozta volna, azonban mások, több esetben is kimutatták az AdV jelenlétét súlyos hasmenéses tüneteket mutató vörös mókusokból (Everest et al., 2008; 2010a; 2010b; 2012; 2013).

Mivel minden esetben klinikai tüneteket mutató, vagy elhullott vörös mókusokból mutatták ki az AdV jelenlétét, egy esetben viszont teljesen egészséges keleti szürkemókusokból (Everest et al., 2009), feltételezhetjük, hogy a vörös mókust elterjedési területéről egyre jobban kiszorító, behurcolt, invazív keleti szürkemókus lehet a forrása az AdV-nak. Bár a 2009-es cikk azt írja, hogy PCR-rel mutatták ki a keleti szürkemókus AdV-át, annak szekvenciája nem elérhető, így ez a feltételezés egyelőre nem bizonyított. Hazánkban azonban, ahol nem jelent még meg a szürkemókus, nem találtuk vörös mókusban a SqAdV-t. Egy 2013-ban megjelent publikáció szerint olyan vörös mókusokban is találtak AdV-t Nagy-Britanniában, amelyek élőhelyén nincsenek keleti szürkemókusok (Everest et al., 2013). Ez ellentmondani látszik a behurcolt, és az Európában élő mókusokra patogénebb vírusra vonatkozó elméletnek, vagy a vírus már gyorsabban terjed, mint az eredeti gazdája.

A SqAdV-1-nek a megőrzött géneket tartalmazó középső régióját, a IVa2 géntől a fiber génig, PCR segítségével felerősítettük és nukleotid-sorrendjét meghatároztuk. A SqAdV-1 vizsgált szakaszának genetikai szerveződését a mastadenovírusokra általában

jellemzőnek találtuk (Rusvai et al., 2000; Nagy, 2002; Kovács et al., 2005). A régió a minden AdV-ra jellemző szokásos 16, és a csupán a mastadenovírusokra jellemző V-ös géneket tartalmazza. A IVa2, polimeráz, pTP és 33K gén rendelkezik splicing helyekkel, vagyis e gének minden esetben két exonból állnak össze. Egyik kivétel a IVa2 gén első exonjának splicing szekvenciájában megtalálható potenciális splice donor és akceptor hely, mert nem tökéletesen felelnek meg a konszenzusnak. A pVII polipeptid, mint általában minden AdV-ban, nagyon eltérő ebben a vírusban is. A mérete 110 aminosav és csak a fele mutat bármilyen homológiát más AdV-ok pVII génjével. A pVII gén jellegzetes proteáz vágási szignálokkal rendelkezik, mint minden prekursor fehérje, melyet az adenovírusoknál megegyezés szerint a p kezdőbetű jelöl. Ezek a proteáz vágási szignálok adenovírus nemzetségenként eltérőek, és konszenzus szekvenciájuk alapján 1-es ((M/L/I)XGG'X) és 2-es típusba ((M/L/I/N/Q)XGX'G) sorolhatóak. Jelenlegi tudásunk szerint minden AdV pVII génje két hasítási hellyel rendelkezik (Davison et al., 2003). Az N-terminális régió felőli szignál mindig 2-es típusú, mely a mi általunk vizsgált vírusoknál is ilyennek bizonyult (11. ábra). A második vágási hely szignálja nemzetségenként egyedi, így a mast- és siadenovírus nemzetségeknél 1-es típusú, míg az avi- és atadenovírusoknál 2-es típusú. Bár a vágási helyek alaptípusa megőrzött nemzetségenként, a motívum a nemzetségeken belül is változatos szekvenciával rendelkezhet (Ruzindana-Umunyana et al., 2002). Itt érdemes megemlíteni, hogy a SqAdV-1 és a MAdV-2 második, 1-es típusú vágási helyének motívuma megegyezik a többi rágcsáló azonos motívumával (MYGG'A). Ugyanígy a BtAdV-2-é a BtAdV-3-éval, a canin AdV-okéval, illetve a ló-AdV-1-ével (LFGG'A). Ezek az azonosságok is alátámasztják mind a SqAdV-1 rágcsáló AdV-okhoz, illetve a ló- és a canin-AdV-ok denevér-AdV-okhoz való közeli rokonságát (11. ábra).

Sajnálatos módon, a legérdekesebb régiók, az E3 és E4 régiók szekvenciája egyelőre nem ismert a SqAdV-1-ből. Ennek oka, hogy eddig nem sikerült izolálni, így csak a fertőzött szervekből kivont DNS áll rendelkezésünkre. Úgy tűnik, hogy a genomszekvenálási projektet PCR segítségével tudjuk csak tovább folytatni.

A mókusfélék vírusainak tanulmányozása humán egészségügyi szempontból is fontos lehet, mivel nemrégiben leírták, hogy amerikai változékonymókus (*Sciurus variegatoides*) tenyésztők az állatoktól kapott birnavírus fertőzésbe haltak bele (Hoffmann et al., 2015).

Mastadenovirus				
	1	2-es típus	1-es típus	50
mókus-AdV-1	MAVLI	SPSNNSG	WG-----LG--MKS	MYGGA
murin AdV-1	MSILI	SPSDNTG	WG-----LG--TGK	MYGGA
murin AdV-2	MSILI	SPSNNTG	WG-----LG--VSK	MYGGA
murin AdV-3	MSIMI	SPSDSTG	WG-----LG--TGR	MYGGA
canin AdV-1	MAILI	SPSNNTG	WG-----LG--THK	LFGGA
canin AdV-2	MAILI	SPTNNTG	WG-----LG--THK	LFGGA
ló-AdV-1	MAILI	SPTNNTG	WG-----LGL	GNNKLF
denevér-AdV-2	MAILI	SPTNNTG	WG-----LG--THR	LFGGA
denevér-AdV-3	MAILI	SPSNNTG	WG-----LG--SHR	LFGGA
humán AdV-5	MSILI	SPSNNTG	WG-----LRF	-PSKMF
Aviadenovirus				
	1	2-es típus	2-es típus	50
tyúk-AdV-1	MSILI	SPSDNRG	WGA-----NM	-RYRRRAS
galamb-AdV-1	MSILI	SPSDNRG	WGM-----RRR	PRSSMRG
liba-AdV-4	MSILI	SPSDNRG	WGTMM	RRSRSRST
kacsa-AdV-2	MSILI	SPSDNRG	WGA	MMRRRSRSR
Atadenovirus				
	1	2-es típus	2-es típus	50
gyík-AdV-2	MSILI	SPSDNTG	WG-----LG--NCR	IRGTGAR
kígyó-AdV-1	MPILI	SPSDNTG	WG-----LG--KLR	IRATGLT
papagáj-AdV-3	MSILI	SPSDNTG	WG-----VG--TTL	MRATGTR
bovin AdV-4	MSILM	SPSDNTG	WG-----SIG--TAL	MRATGVK
Siadenovirus				
	1	2-es típus	1-es típus	50
béka-AdV-1	MTAVL	LSPADNR	GWGA-----RAM	RSGSVYLV
rag.mad.-AdV-1	MSSIVY	SPADSRG	WGI-----GNT	AMRAY-LI
szkua-AdV-1	MASIVY	SPGDSRG	WGI-----GNS	SAMRDYYLV
pulyka-AdV-3	MHSVVY	SPGDSRG	WGI-----GNS	SMRDYYLI

11. ábra. Pozicionális illesztés a vizsgált AdV-ok pVII fehérjéjének proteáz vágási helyeket tartalmazó szakaszaiból. Kék háttér jelöli a minden AdV-ra jellemző, 2-es típusú vágási szignált. Zöld háttér jelöli a mastadenovírusokban és siadenovírusokban a második vágási helyet, ami mindig 1-es típusú és genus specifikus. Ezek az avi- és atadenovírusoknál 2-es típusúak (szürke háttér). Az általunk elemzett vírusok neve kékkel kiemelve. Rövidítés: rag.mad., ragadozó madár.

7.2.3. Denevér-adenovírus 2

A BtAdV-2 izolátum sikeres *in vitro* replikációja lehetőséget adott egy új denevér-vírus molekuláris és genomiális jellemzésére újgenerációs szekvenálással.

A kórszövettani vizsgálatok során a főbb elváltozások a tüdőben és a lépben voltak, de (molekuláris vizsgálat során) a bél, vese és máj mutatta a vírus jelenlétét. A vizsgált 12 denevér közül négyben megfigyelhető volt a lép lymphoreticuláris szöveteinek fokozott aktivitása, ami a vírusos fertőzöttség egyik jele lehet. A vizsgált szövetekben azonban nem mutatkoztak zárványok. Így végülis nem sikerült bizonyítani az összefüggést a molekuláris vizsgálatok eredménye és a denevérek kórszövettani elváltozásai között. A vizsgált denevérek enyhébb vagy súlyosabb traumás sérüléseket szenvedtek, és ezek vezettek

elhullásukhoz. Feltételezhető, hogy a BtAdV-2 fertőzés csupán enyhébb tüneteket okoz, vagy tünetmentes.

Minden eddig talált denevér-AdV, így a BtAdV-2 is a *Mastadenovirus* nemzetségbe tartozik, tehát továbbra is úgy tűnik, hogy az emlősök közül az atadenovírusok csak a kérődzőkre ugrottak át, és telepedtek meg azokban, és csak azt követően, amikor már elkülönültek a többi emlős vonaltól. A mastadenovírusokban az ITR általában hosszabb (93–371 bp), mint más nemzetségek AdV-aiban (siadenovírusokban 30–39 bp, aviadenovírusokban 39–118 bp, atadenovírusokban 42–118 bp) (Dán et al., 2001; Harrach, 2014). A BtAdV-2 ITR-je 146 bp hosszú. Összehasonlítva a közeli rokon CAdV-1 ITR-rel (199 bp) és CAdV-2 ITR-rel (198 bp), egy kicsit rövidebb azoknál (6. táblázat). A BtAdV-2-n kívül egyedüli denevér-AdV, aminek ismerjük szinte a teljes genomját, a BtAdV-3, ám ennél éppen a végszekvenciákat nem határozták meg, így sajnos az ITR teljes hosszáról nincs információnk (Li et al., 2010b). Ebből adódik az is, hogy a BtAdV-2 az első denevér-AdV, melynek a teljes genomja ismert. A BtAdV-2 ITR első 40 bp-ja teljesen azonos a CAdV-1 és CAdV-2 ITR-jének ezen szakaszával, ami újabb bizonyíték a denevér-AdV-ok és CAdV-ok közeli genetikai rokonságára.

A mastadenovírusban ismert minden E1 gén megtalálható a BtAdV-2-ben is (E1A, E1B 19K, E1B 55K, IX), és méretük is a nemzetségre jellemző átlag körüli (4. táblázat).

A BtAdV-2 genom középső részében 16 gén található, melyek az AdV-ok megőrzött génjeinek számítanak, valamint a csak mastadenovírusokban előforduló V-ös fehérjét kódoló gén is jelen van tizenhetedikként a régió közepén. Hasonlóképpen a MAdV-2-höz, a BtAdV-2 pentonbázisában sincs RGD motívum. Nem tudtuk kimutatni a VA RNS gén (vagy gének) jelenlétét sem.

A mastadenovírus nemzetségre jellemző splicing mintázatot a denevér-adenovírusok (BtAdV-2, BtAdV-3) is igazolják. Nevezetesen a IVa2, pTP, DNS-polimeráz és a 33K gén 1-1 intront tartalmaz.

E3 régióval csak a mastadenovírus genomok rendelkeznek. Az atadenovírusokban található E3 elnevezésű fehérje nem homológ semmilyen mastadenovírus fehérjével. Az E3 régió vizsgálata fontos, hiszen az egyik legvariábilisabb régióról van szó. Ráadásul az eddig vizsgált itt található fehérjék hatásáról mindig valamilyen sejtmanipulálásért felelős aktivitás igazolódott be. E régióban található gének általában nem homológok, vagy ha igen, azok is csak az egymással nagyon közeli mastadenovírusokban találhatók meg, nincs olyan gén, mely minden mastadenovírusban megtalálható lenne. A 12,5K gén az, mely a legtöbb mastadenovírusban ugyan megtalálható, de néhány mastadenovírusból még ez is hiányzik. A BtAdV-2-ben jelen van. Érdekesség, hogy azonosítottuk a 12,5K-t a BtAdV-3-ban is, noha az eredeti genomanalízis nem írta le (Li et al., 2010b). A BtAdV-2 genomját elemezve ugyanis a BtAdV-3 genomját is górcső alá vettük. A BtAdV-2 E3 régiójában a 12,5K-n kívül

még egy ORF található, amely homológ a BtAdV-3, valamint a CAdV-1, CAdV-2, és EAdV-1-ben megtalálható E3 ORF-el. Másik, korábban közölt mastadenovírus E3 génnel nem homológ ez az ORF.

Megtalálható továbbá a BtAdV-2 genomjában a hipotetikus fehérje génjének (UXP) első exonja, ami a mastadenovírusok közül eddig csak a MAdV-1, MAdV-3 és BAdV-10 genomjában nem lehetett kimutatni. A további exonok kimutatásához további mRNS vizsgálatokra lenne szükség.

Ahogy az várható volt, mind a BtAdV-2 mind a BtAdV-3 csupán egy fiber génnel rendelkezik, tehát valószínű, hogy a virion minden vertexén egy, azonos hosszúságú fiber nyúlvány található.

A szintén nagyon variábilis E4 régió első génje a BtAdV-2-ben az ORF6/7, amely nincs jelen minden mastadenovírusban, például a már tárgyalt MAdV-okban sem. Ez a gén szintén két exonból áll, mint a IVa2, pTP, DNS-polimeráz és a 33K. A BtAdV-2 rendelkezik 34K-val is, ami nem csak a mastadenovírusban található meg, hanem az atadenovírusokban is előfordul. Néhány mastadenovírusban és az atadenovírusokban több 34K is előfordulhat, a BtAdV-2, -3, a CAdV-ok és az EAdV-1-ben azonban csupán egy homológja található. A 34K-tól jobbra négy további ORF található a BtAdV-2-ben, az ORFA–D. Ezeknek az ORF-eknek a homológjai a CAdV-okban, BtAdV-3-ban és EAdV-1-ben is megtalálható, noha az általuk kódolt hipotetikus fehérjék szerepe még nem ismert.

A törzsfa-rekonstrukciókon a CAdV-ok és az EAdV-1 mindig denevér-AdV-okkal esnek közel egymáshoz, illetve monofiletikusak. Az E3 és E4 régióban tapasztalt hasonlóságuk alapján közeli genetikai rokonságuk megkérdőjelezhetetlen (3. ábra, 8. ábra, 9. ábra).

vagy a BtAdV-3 ezen a kb. 150 aminosav hosszú pol szakaszon valóban egy ilyen, nem letális mutációval rendelkezik. A teljes polimeráz génen alapuló törzsfa-rekonstrukció elkészítésénél így az eredetileg a GenBank-ban található, feltételezhetően hibás, szekvenciát használtuk, de még így sem láttunk jelentős eltérést, vagyis a BtAdV-3 a többi denevér-AdV között jelent meg (9. ábra).

A BtAdV-2-nek a genetikai távolsága a BtAdV-3-tól illetve a CAdV-októl meghaladja az 5–15%-ot, ráadásul más gazdafajoktól származnak, így egyértelműen indokolt külön-külön AdV fajba sorolásuk. A CAdV-1 és CAdV együtt alkotja a *Canine adenovirus A* fajt (Benkő et al., 2005). A BtAdV-3-nak mint az első ismert genomszekvenciájú denevér-AdV, a *Bat mastadenovirus A* fajba, míg az általunk vizsgált BtAdV-2 a *Bat mastadenovirus B* fajba sorolását az ICTV hivatalosan jóváhagyta.

8. Új tudományos eredmények

1. Adenovírusok jelenlétére PCR-rel vizsgáltam a Magyarországon előforduló összes denevérfajból és a Németországban eddig megfigyelt denevérfajok zöméből gyűjtött mintákat. Kimutattam 31 új adenovírust és megállapítottam, hogy ugyanaz az egyed többféle adenovírossal is fertőzött lehet.
2. Elemeztem az izolált denevér-AdV-2 teljes genomját, és igazoltam egyes állatorvosi szempontból jelentős mastadenovírusok denevér-adenovírusokkal közös eredetét.
3. Új AdV-ok jelenlétét mutattam ki rágcsálókban, pirókegérben, mezei pocokban és vízidisznóban. Elsőként publikáltuk a mókus-AdV előfordulását Nagy-Britannia területén kívül.
4. Részt vettem a murin AdV-2 genomjának szekvenálásában, elemeztem és filogenetikailag vizsgáltam eredetét.
5. Meghatároztam és elemeztem a mókus-AdV genom mintegy kétharmadának a DNS-szekvenciáját.
6. A hazai pirókegér populációban a murin AdV-3 jelenlétét többször kimutattam. Megállapítottam az eredeti MAdV-3 izolátumban leírt csonka E1B 19K gén teljes hosszúságú változatát, és hogy az jelen van a vadon élő pirókegerek vírusában.

9. Irodalomjegyzék

- Anthony, S.J., Epstein, J.H., Murray, K.A., Navarrete-Macias, I., Zambrana-Torrelío, C.M., Solovyov, A., Ojeda-Flores, R., Arrigo, N.C., Islam, A., Ali Khan, S., Hosseini, P., Bogich, T.L., Olival, K.J., Sanchez-Leon, M.D., Karesh, W.B., Goldstein, T., Luby, S.P., Morse, S.S., Mazet, J.A., Daszak, P., Lipkin, W.I.: **A strategy to estimate unknown viral diversity in mammals**, *MBio.*, 4. e00598-13, 2013.
- Bartha, A.: **Proposal for subgrouping of bovine adenoviruses**, *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.*, 19. 319-321, 1969.
- Bartha, A.: **Dropped egg production in ducks associated with adenovirus infection**, *Avian Pathol.*, 13. 119-126, 1984.
- Bartha, A., Mészáros, J., Tanyi, J.: **Antibodies against EDS-76 avian adenovirus in bird species before 1975**, *Avian Pathol.*, 11. 511-513, 1982.
- Benkő, M.: **Adenoviridae. Pathogenesis**. In: *Encyclopedia of Virology*. Szerk.: Mahy, B., van Regenmortel, M. Oxford: Elsevier, Third Edition, vol 1, 2008. p. 24-29.
- Benkő, M., Doszpoly, A.: **Ichtadenovirus. Adenoviridae**. In: *The Springer Index of Viruses*. Szerk.: Tidona, C.A., Darai, G. New York: Springer-Verlag, 2011. p. 29-32.
- Benkő, M., Élő, P., Ursu, K., Ahne, W., LaPatra, S.E., Thomson, D., Harrach, B.: **First molecular evidence for the existence of distinct fish and snake adenoviruses**, *J. Virol.*, 76.10056-10059, 2002.
- Benkő, M., Harrach, B.: **Molecular evolution of adenoviruses**, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 272. 3-35, 2003.
- Benkő, M., Harrach, B., Both, G.W., Russell, W.C., Adair, B.M., Ádám, É., de Jong, J.C., Hess, M., Johnson, M., Kajon, A., Kidd, A.H., Lehmkuhl, H.D., Li, Q.G., Mautner, V., Pring-Akerblom, P., Wadell, G.: **Family Adenoviridae**. In: *Virus Taxonomy*. VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Szerk.: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A. London: Elsevier, Academic Press, 2005. p. 213-228.
- Berget, S.M., Moore, C., Sharp, P.A.: **Spliced segments at 5' terminus of adenovirus 2 late messenger-RNA**, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 74. 3171-3175, 1977.
- Blailock, Z.R., Rabin, E.R., Melnick, J.L.: **Adenovirus myocarditis in mice. An electron microscopic study**, *Exp. Mol. Pathol.*, 9. 84-96, 1968.
- Boldogh, S.: **The bat fauna of the Aggtelek National Park and its surroundings (Hungary)**, *Vespertilio* 9-10. 33-56, 2006.
- Both, G.W.: **Identification of a unique family of F-box proteins in atadenoviruses**, *Virology*, 304. 425-433, 2002.

- Bronson, E., Spiker, H., Driscoll, C.P.: **Serosurvey for selected pathogens in free ranging American black bears (*Ursus americanus*) in Maryland, USA**, J. Wildl. Dis., 50. 829-836, 2014.
- Casas, I., Vazquez-Moron, S., Juste, J., Falcon, A., Aznar, C., Ibanez, C., Pozo, F., Ruiz, G., Berciano, J.M., Garin, I., Aihartza, J.M., Echevarria, J.E.: **Adenovirus groups in western Palaearctic bats in Spain**, GenBank Accession No. JX065117 to JX065129. 2010.
- Cavanagh, H.M., Mahony, T.J., Vanniasinkam, T.: **Genetic characterization of equine adenovirus type 1**, Vet. Microbiol., 155. 33-37, 2012.
- Chen, L.H., Wu, Z.Q., Hu, Y.F., Yang, F., Yang, J., Jin, Q.: **Genetic diversity of adenoviruses in bats of China**, [in Chinese] Bing. Du. Xue. Bao. 28. 403-408, 2012.
- Chomel, B.B., Kasten, R.W., Champouis, G., Soulier, M., Kikuchi, Y.: **Serological survey of selected canine viral pathogens and zoonoses in grizzly bears (*Ursus arctos horribilis*) and black bears (*Ursus americanus*) from Alaska**, Rev. Sci. Tech., 17. 756-766, 1998.
- Chow, L.T., Broker, T.R., Lewis, J.B.: **Complex splicing patterns of RNAs from the early regions of adenovirus-2**, J. Mol. Biol., 134. 265-303, 1979.
- Compton, S.R.: **Mouse adenovirus 2 strain K87 DNA polymerase gene, partial cds.**, GenBank, Accession No.: EF436584, 2007a.
- Compton, S.R.: **Mouse adenovirus 2 strain K87 hexon gene, partial cds.**, GenBank, Accession No.: EF436585, 2007b.
- Cortés-Hinojosa, G., Gulland, F.M., Goldstein, T., Venn-Watson, S., Rivera, R., Waltzek, T.B., Salemi, M., Wellehan, J.F. Jr.: **Phylogenomic characterization of California sea lion adenovirus-1**, Infect. Genet. Evol., 31. 270-276, 2015.
- Dandár, E., Szabó, L., Heltai, M., Doszpoly, A.: **Adenovírusok és herpeszvírusok előfordulásának felmérése emlős ragadozók (Carnivora) mintáinak PCR-vizsgálatával: borz-herpeszvírus első kimutatása Magyarországon**. Magy. Allatorvosok, 132. 302- 308, 2010.
- Davison, A.J., Benkő, M., Harrach, B.: **Genetic content and evolution of adenoviruses**, J. Gen. Virol., 84. 2895-2908, 2003.
- Davison, A.J., Wright, K.M., Harrach, B.: **DNA sequence of frog adenovirus**, J. Gen. Virol., 81. 2431-2439, 2000.
- Dán, Á., Élő, P., Harrach, B., Zádori, Z., Benkő, M.: **Four new inverted terminal repeat sequences from bovine adenoviruses reveal striking differences in the length and content of the ITRs**, Virus Genes, 22. 175-179, 2001.

- Dán, Á., Ruzsics, Zs., Russell, W.C., Benkő, M., Harrach, B.: **Analysis of the hexon gene sequence of bovine adenovirus type 4 provides further support for a new adenovirus genus (*Atadenovirus*)**, J. Gen. Virol., 79. 1453-1460, 1998.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D.: **ProtTest 3: fast selection of best-fit models of protein evolution**, Bioinformatics, 27. 1164-1165, 2011.
- Di Francesco, C.E., Gentile, L., Di Pirro, V., Ladiana, L., Tagliabue, S., Marsilio, F.: **Serologic evidence for selected infectious diseases in Marsican brown bears (*Ursus arctos marsicanus*) in Italy (2004-09)**, J. Wildl. Dis., 51. 209-213, 2015.
- Drexler, J.F., Corman, V.M., Wegner, T., Tateno, A.F., Zerbinati, R.M., Gloza-Rausch, F., Seebens, A., Müller, M.A., Drosten, C.: **Amplification of emerging viruses in a bat colony**, Emerg. Infect. Dis., 17. 449-456, 2011.
- Doszpoly, A., Wellehan, J.F. Jr., Childress, A.L., Tarján, Z.L., Kovács, E.R., Harrach, B., Benkő, M.: **Partial characterization of a new adenovirus lineage discovered in testudinoid turtles**, Infect. Genet. Evol., 17. 106-112, 2013.
- Duff, J.P., Higgins, R., Farrelly, S.: **Enteric adenovirus infection in a red squirrel (*Sciurus vulgaris*)**, Vet. Rec., 160. 384, 2007.
- Dunbar, M.R., Cunningham, M.W., Roof, J.C.: **Seroprevalence of selected disease agents from free ranging black bears in Florida**, J. Wildl. Dis., 34. 612-619, 1998.
- Everest, D.J., Butler, H., Blackett, T., Simpson, V.R., Shuttleworth, C.M.: **Adenovirus infection in red squirrels in areas free from grey squirrels**, Vet. Rec., 173. 199-200, 2013.
- Everest, D.J., Grierson, S.S., Meredith, A.L., Milne, E.M.: **Adenovirus in a red squirrel (*Sciurus vulgaris*) from Scotland**, Vet. Rec., 167. 184, 2010a.
- Everest, D.J., Grierson, S.S., Stidworthy, M.F., Shuttleworth, C.: **PCR detection of adenovirus in grey squirrels on Anglesey**, Vet. Rec. 165. 482, 2009.
- Everest, D.J., Griffin, J., Warnock, N.D., Collins, L., Dick, J., Reid, N., Scantlebury, M., Marks, N., Montgomery, I.: **Adenovirus particles from a wild red squirrel (*Sciurus vulgaris*) from Northern Ireland**, Vet. Rec., 170.188, 2012.
- Everest, D.J., Stidworthy, M.F., Milne, E.M., Meredith, A.L., Chantrey, J., Shuttleworth, C., Blackett, T., Butler, H., Wilkinson, M., Sainsbury, A.W.: **Retrospective detection by negative contrast electron microscopy of faecal viral particles in free-living wild red squirrels (*Sciurus vulgaris*) with suspected enteropathy in Great Britain**, Vet. Rec., 167. 1007-1010, 2010b.
- Everest, D.J., Stidworthy, M.F., Shuttleworth, C.: **Adenovirus-associated deaths in red squirrels on Anglesey**, Vet. Rec., 163. 430, 2008.
- Farkas, S.L., Gál, J.: **Adenovirus and mycoplasma infection in an ornate box turtle (*Terrapene ornata ornata*) in Hungary**, Vet. Microbiol., 138. 169-173, 2009.

- Farkas, S.L., Harrach, B., Benkő, M.: **Completion of the genome analysis of snake adenovirus type 1, a representative of the reptilian lineage within the novel genus *Atadenovirus***, *Virus Res.*, 132. 132-139, 2008.
- Felsenstein, J.: **PHYLIP-Phylogeny inference package**, *Cladistics*, 5. 164-166, 1989.
- Gál, J., Hornyák, Á., Mándoki, M., Bakonyi, T., Balka, G., Szeredi, L., Marosán, M., Ludányi, T., Forgách, P., Sós, E., Demeter, Z., Farkas, S.L.: **Novel mastadenovirus infection and clinical disease in a pygmy marmoset (*Callithrix [Cebuella] pygmaea*)**, *Vet. Microbiol.*, 167. 695-699, 2013.
- Gilson, T., Harrach, B., Branton, P.E., Blanchette, P.: **Evolution of a Cullin-based E3 ubiquitin ligase in adenoviruses** In: 11th International Adenovirus Meeting. Szerk: Nemerow, G. San Diego: University of California, 2014. p. 71.
- Grgić, H., Yang, D.H., Nagy, É.: **Pathogenicity and complete genome sequence of a fowl adenovirus serotype 8 isolate**, *Virus Res.*, 156. 91-97, 2011.
- Griffin, B.D., Nagy, É.: **Coding potential and transcript analysis of fowl adenovirus 4: insight into upstream ORFs as common sequence features in adenoviral transcripts**, *J. Gen. Virol.*, 92. 1260-1272, 2011.
- Guida, J.D., Fejer, G., Pirofski, L.-A., Brosnan, C.F., Horwitz, M.S.: **Mouse adenovirus type 1 causes a fatal hemorrhagic encephalomyelitis in adult C57BL/6 but not BALB/c mice**, *J. Virol.*, 69. 7674-7681, 1995.
- Guindon, S.F., Dufayard, J.F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., Gascuel, O.: **New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0.**, *System. Biol.*, 59. 307-321, 2010.
- Hall, T.A.: **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT**, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 41. 95-98, 1999.
- Hamelin, C., Jacques, C., Lussier, G.: **Genome typing of mouse adenoviruses**. *J. Clin. Microb.*, 26. 31-33, 1988.
- Hamelin, C., Lussier, G.: **Differentiation of mouse adenovirus strains FL and K87 by restriction endonuclease analysis**. *Laboratory Animal Science*, 37. 537-537, 1987.
- Hamelin, C., Lussier, G.: **Genotypic differences between the mouse adenovirus strains FL and K87**, *Experientia*, 44. 65-66, 1988.
- Han, J., Sabbatini, P., White, E.: **Induction of apoptosis by human Nbk/Bik, a BH3-containing protein that interacts with E1b 19K**, *Mol. Cell Biol.*, 16. 5857-5864, 1996.
- Harada, J.N., Shevchenko, A., Shevchenko, A., Pallas, D.C., Berk, A.J.: **Analysis of the adenovirus E1B-55K-anchored proteome reveals its link to ubiquitination machinery**, *J. Virol.*, 76. 9194-9206, 2002.
- Harrach, B.: **Reptile adenoviruses in cattle?** *Acta Vet. Hung.*, 48. 485-490, 2000.

- Harrach, B.: **Adenoviruses: General features**. In: Reference Module in Biomedical Sciences. Szerk.: Caplan, M., Mitchell, R., Bradshaw, R., McManus, L. Amsterdam: Elsevier, 2014. p. 10.
- Harrach, B., Benkő, M., Both, G.W., Brown, M., Davison, A.J., Echavarría, M., Hess, M., Jones, M.S., Kajon, A., Lehmkuhl, H.D., Mautner, V., Mittal, S.K., Wadell, G.: **Family Adenoviridae**. In: *Virus Taxonomy*. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Szerk.: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J. Oxford: Elsevier, Academic Press, 2011. p. 125-141.
- Harrach, B., Kaján, G.L.: **Aviadenovirus. Adenoviridae**. In: The Springer Index of Viruses Szerk.: Tidona, C.A., Darai, G. New York: Springer, 2011. p. 13-28.
- Harrach B., Meehan, B.M., Benkő, M., Adair, B.M., Todd, D.: **Close phylogenetic relationship between egg drop syndrome virus, bovine adenovirus serotype 7, and ovine adenovirus strain 287**, *Virology*, 229. 302-306, 1997.
- Hartley, J.W., Rowe, W.P.: **A new mouse virus apparently related to the adenovirus group**, *Virology*, 11. 645-647, 1960.
- Hashimoto, K., Sugiyama, T., Sasaki, S.: **An adenovirus isolated from feces of mice. I. Isolation and identification**, *Jpn. J. Microbiol.*, 10. 115-125, 1966.
- Hemmi, S., Vidovszky, M.Z., Ruminska, J., Ramelli, S., Decurtins, W., Greber, U., Harrach, B.: **Genomic and phylogenetic analyses of murine adenovirus 2**, *Virus Res.*, 160. 128-135, 2011.
- Hoffmann, B., Tappe, D., Höper, D., Herden, C., Boldt, A., Mawrin, C., Niederstraßer, O., Müller, T., Jenckel, M., van der Grinten, E., Lutter, C., Abendroth, B., Teifke, J.P., Cadar, D., Schmidt-Chanasit, J., Ulrich, R.G., Beer, M.: **A variegated squirrel bornavirus associated with fatal human encephalitis**, *N. Engl. J. Med.*, 373. 154-62, 2015.
- Hutterer, R., Ivanova, T., Meyer-Cords, C., Rodrigues, L.: **Bat migrations in Europe – A review of banding data and literature**, Bonn: Bundesamt für Naturschutz, 2005. p. 180.
- Ivanics, É., Palya, V., Glávits, R., Dán, A., Pálfi, V., Révész, T., Benkő, M.: **The role of egg drop syndrome virus in acute respiratory disease of goslings**. *Avian Pathol.*, 30. 201-208, 2001.
- Jacques, C., Cousineau, L., D'Amours, B., Lussier, G., Hamelin, C.: **Molecular cloning, physical mapping and cross-hybridization of the murine adenovirus type 1 and type 2 genomes**, *J. Gen. Virol.*, 75. 1311-1317, 1994a.
- Jacques, C., D'Amours, B., Hamelin, C.: **Genetic-relationship between mouse adenovirus-2 (strain K87) and human adenovirus-2**, *FEMS Microbiol. Lett.*, 115. 7-11, 1994b.

- Jánoska, M., Vidovszky, M., Molnár, V., Liptovszky, M., Harrach, B., Benkő, M.: **Novel adenoviruses and herpesviruses detected in bats in Hungary**, *Vet. J.*, 189. 118-121, 2011.
- Jones, D.T., Taylor, W.R., Thornton, J.M.: **The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences**, *Comput. Appl. Biosci.*, 8. 275-282, 1992.
- Juste, J., Benda, P., Garcia-Mudarra, J.J., Ibáñez, C.: **Phylogeny and systematics of Old World serotine bats (genus *Eptesicus*, Vespertilionidae, Chiroptera): an integrative approach**, *Zool. Scr.*, 42. 441-457, 2013.
- Kaján, G.L., Davison, A.J., Palya, V., Harrach, B., Benkő, M.: **Genome sequence of a waterfowl aviadenovirus, goose adenovirus 4**, *J. Gen. Virol.*, 93. 2457-2465, 2012.
- Kaján, G.L., Sameti, S., Benkő, M.: **Partial sequence of the DNA-dependent DNA polymerase gene of fowl adenoviruses: a reference panel for a general diagnostic PCR in poultry**, *Acta Vet. Hung.*, 59. 279-285, 2011.
- Kaján, G.L., Stefančík, R., Ursu, K., Palya, V., Benkő, M.: **The first complete genome sequence of a non-chicken aviadenovirus, proposed to be turkey adenovirus 1**, *Virus Res.*, 153. 226-233, 2010.
- Kiss, I., Matiz, K., Allard, A., Wadell, G., Benkő, M.: **Detection of homologous DNA sequences in animal adenoviruses by polymerase chain reaction**, *Acta Vet. Hung.*, 44. 243-251, 1996a.
- Kiss, I., Matiz, K., Bajmóci, E., Rusvai, M., Harrach, B.: **Infectious canine hepatitis: detection of canine adenovirus type 1 by polymerase chain reaction**, *Acta Vet. Hung.*, 44. 253-258, 1996b.
- Klempa, B., Krüger, D.H., Auste, B., Stanko, M., Krawczyk, A., Nickel, K.F., Überla, K., Stang, A.: **A novel cardiotropic murine adenovirus representing a distinct species of mastadenoviruses**, *J. Virol.*, 83. 5749-5759, 2009.
- Kohl, C., Vidovszky, M.Z., Mühldorfer, K., Dabrowski, P.W., Radonić, A., Nitsche, A., Wibbelt, G., Kurth, A., Harrach, B.: **Genome analysis of bat adenovirus 2: indications of interspecies transmission**, *J. Virol.*, 86. 1888-1892, 2012.
- Kovács, E., Benkő, M.: **Complete sequence of raptor adenovirus 1 confirms the characteristic genome organization of siadenoviruses**, *Infect. Genet. Evol.*, 11. 1058-1065, 2011.
- Kovács, G.M., Harrach, B., Zakhartchouk, A.N., Davison, A.J.: **Complete genome sequence of simian adenovirus 1: an Old World monkey adenovirus with two fiber genes**, *J. Gen. Virol.*, 86. 1681-1686, 2005.
- Kovács, G.M., LaPatra, S.E., D'Halluin, J.C., Benkő, M.: **Phylogenetic analysis of the hexon and protease genes of a fish adenovirus isolated from white sturgeon**

- (*Acipenser transmontanus*) supports the proposal for a new adenovirus genus**, Virus Res., 98. 27-34, 2003.
- Kring, S.C., Ball, A.O., Spindler, K.R.: **Transcription mapping of mouse adenovirus type-1 early region-4**, Virology, 190. 248-255, 1992.
- Kuzmin, I.V., Bozick, B., Guagliardo, S.A., Kunkel, R., Shak, J.R., Tong, S., Rupprecht, C.E.: **Bats emerging infectious diseases, and the rabbiess paradigm revisited**, Emerg. Health Threats, 4. 7159, 2011.
- Le, S.Q., Gascuel, O.: **An improved general amino acid replacement matrix**, Mol. Biol. Evol., 25.1307-1320, 2008.
- Lednický, J.A., Ohr, J.S.: **Subgenomic mouse adenovirus 2 hexon sequence**, GenBank, Accession No. AY618467. 2004.
- Li, L., Victoria, J.G., Wang, C., Jones, M., Fellers, G.M., Kunz, T.H., Delwart, E.: **Bat guano virome: predominance of dietary viruses from insects and plants plus novel mammalian viruses**, J. Virol., 84. 6955-6965, 2010a.
- Li, Y., Ge, X., Zhang, H., Zhou, P., Zhu, Y., Zhang, Y., Yuan, J., Wang, L.F., Shi, Z.: **Host range, prevalence and genetic diversity of adenoviruses in bats**, J. Virol., 84. 3889-3897, 2010b.
- Lima, F.E, Cibulski, S.P., Elesbao, F., Carnieli Junior, P., Batista, H.B., Roehe, P.M., Franco, A.C.: **First detection of adenovirus in the vampire bat (*Desmodus rotundus*) in Brazil**, Virus Genes, 47. 378-381, 2013.
- Lussier, G., Smith, A.L., Guénette, D., Descoteaux, J.P.: **Serological relationship between mouse adenovirus strains FL and K87**, Lab. Anim. Sci., 37. 55-57, 1987.
- Maeda, K., Hondo, E., Terakawa, J., Kiso, Y., Nakaichi, N., Endoh, D., Sakai, K., Morikawa, S., Mizutani, T.: **Isolation of novel adenovirus from fruit bat (*Pteropus dasymallus yayeyamae*)**, Emerg. Infect. Dis., 14. 347-349, 2008.
- Marek, A., Ballmann, M.Z., Kosiol, C., Harrach, B., Schlotterer, C., Hess, M.: **Whole-genome sequences of two turkey adenovirus types reveal the existence of two unknown lineage that merit the establishment of novel species within the genus *Aviadenovirus***, J. Gen. Virol., 95. 156-170, 2014a.
- Marek, A., Kaján, G.L., Kosiol, C., Harrach, B., Schlotterer, C., Hess, M.: **Complete genome sequences of pigeon adenovirus 1 and duck adenovirus 2 extend the number of species within the genus *Aviadenovirus***, Virology, 462-463. 107-114, 2014b.
- Martínez-Jiménez, D., Graham, D., Couper, D., Benkő, M., Schöniger, S., Gurnell, J., Sainsbury, A.W.: **Epizootiology and pathologic findings associated with a newly described adenovirus in the red squirrel, *Sciurus vulgaris***, J. Wildl. Dis., 47. 442-454, 2011.

- Matiz, K., Ursu, K., Harrach, B., Zádori, Z., Benkő, M.: **Sequencing and phylogenetic analysis of the protease gene, and genetic mapping of bovine adenovirus type 10 define its relatedness to other bovine adenoviruses**, *Virus Res.*, 55. 29-35, 1998.
- Mei, Y.F., Harrach, B., Wadell, G.: **Mastadenovirus. Adenoviridae**. In: The Springer Index of Viruses. Szerk.: Tidona, C.A., Darai, G., New York: Springer, 2011. p. 33-48.
- Meissner, J.D., Hirsch, G.N., LaRue, E.A., Fulcher, R.A., Spindler, K.R.: **Completion of the DNA sequence of mouse adenovirus type 1: sequence of E2B, L1, and L2 (18-51 map units)**, *Virus Res.*, 51. 53-64, 1997.
- Nagy, M., Nagy, E., Tuboly, T.: **The complete nucleotide sequence of porcine adenovirus serotype 5**, *J. Gen. Virol.*, 82. 525-529, 2001.
- Nguyen, T.H., Vidovszky, M.Z., Ballmann, M.Z., Sanz-Gaitero, M., Singh, A.K., Harrach, B., Benkő, M., van Raaij, M.J.: **Crystal structure of the fibre head domain of bovine adenovirus 4, a ruminant atadenovirus**, *Viol. J.*, 12. 81, 2015.
- Pantó, L., Podgorski, I.I., Jánoska, M., Márkó, O., Harrach, B.: **Taxonomy proposal for Old World monkey adenoviruses – characterisation of several non-human, non-ape primate adenovirus lineages**, *Arch. Virol.*, 160. 3165-3177, 2015.
- Papp, T., Fledelius, B., Schmidt, V., Kaján, Gy.L., Marschang, R.E.: **PCR-sequence characterization of new adenoviruses found in reptiles and the first successful isolation of a lizard adenovirus**, *Vet. Microbiol.*, 134. 233-240, 2009.
- Perry, W.L.: **JavaScript DNA Translator: DNA-aligned protein translations**, *Biotechniques*, 33. 1318-1320, 2002.
- Peters, M., Vidovszky, M.Z., Harrach, B., Fischer, S., Wohlsein, P., Kilwinski, J.: **Squirrel adenovirus type 1 in red squirrels (*Sciurus vulgaris*) in Germany**, *Vet. Rec.*, 169. 182, 2011.
- Pénzes, J.J., Menéndez-Conejero, R., Condenzo, G.N., Ball, I., Papp, T., Doszpoly, A., Paradela, A., Pérez-Berná, A.J., López-Sanz, M., Nguyen, T.H., van Raaij, M.J., Marschang, R.E., Harrach, B., Benkő, M., San Martin, C.: **Molecular characterization of a lizard adenovirus reveals the first atadenovirus with two fiber genes and the first adenovirus with either one short or three long fibers per penton**, *J. Virol.*, 88. 11304-11314, 2014.
- Phan, T.G., Kapusinszky, B., Wang, C., Rose, R.K., Lipton, H.L., Delwart, E.L.: **The fecal viral flora of wild rodents**, *PLoS Pathog.*, 7. e1002218, 2011.
- Pring-Akerblom, P., Blazek, K., Schramlová, J., Kunstýr, I.: **Polymerase chain reaction for detection of guinea pig adenovirus**, *J. Vet. Diagn. Invest.*, 9. 232-236, 1997.
- Qin, Q., Li, D., Zhang, H., Hou, R., Zhang, C., Zhang J., Wei, F.: **Serosurvey of selected viruses in captive giant pandas (*Ailuropoda melanoleuca*) in China**, *Vet. Microbiol.*, 142. 199-204, 2010.

- Raut, C.G., Yadav, P.D., Towner, J.S., Amman, B.R., Erickson, B.R., Cannon, D.L., Sivaram, A., Basu, A., Nichol, S.T., Mishra, A.C., Mourya, D.T.: **Isolation of a novel adenovirus from *Rousettus leschenaultii* bats from India**, Intervirology, 55. 488-490, 2012.
- Reagan, R.L., Smith, E.J., Brueckner, A.L.: **Studies of Newcastle disease virus (NDV) propagated in the cave bat (*Myotis lucifugus*)**, Proc. Soc. Exp. Med., 75. 691-692, 1950.
- Reeves, W.C., Scrivani, R.P., Pugh, W.E., Rowe, W.P.: **Recovery of an adenovirus from a feral rodent *Peromyscus maniculatus***, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 124. 1173-1175, 1967.
- Robinson, M., Li, B., Ge, Y., Ko, D., Yendluri, S., Harding, T., VanRoey, M., Spindler, K.R., Jooss, K.: **Novel immunocompetent murine tumor model for evaluation of conditionally replication-competent (oncolytic) murine adenoviral vectors**, J. Virol., 83. 3450-3462, 2009.
- Romeo, C., Ferrari, N., Rossi, C., Everest, D.J., Grierson, S.S., Lanfranchi, P., Martinoli, A., Saino, N., Wauters, L.A., Hauffe, H.C.: **Ljungan virus and an adenovirus in Italian squirrel populations**, J. Wildl. Dis., 50. 409-411, 2014.
- Rowe, W.P., Huebner, R.J., Gilmore, L.K., Parrott, R.H., Ward, T.G.: **Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture**, Proc. Soc. Exp. Biol., 84. 570-573, 1953.
- Russell, W.C.: **Adenoviruses: Update on structure and function**, J. Gen. Virol., 90. 1-20, 2009.
- Russell, W.C., Benkő, M.: **Adenoviridae. Animal viruses**. In: Encyclopedia of Virology, Szerk.: Granoff, A., Webster, R.G. New York: 2. kiadás, Academic Press, 1999. p. 14-21.
- Rusvai, M., Harrach, B., Bánrévi, A., Evans, P.S., Benkő, M.: **Identification and sequence analysis of the core protein genes of bovine adenovirus 2**, Virus Res., 70. 25-30, 2000.
- Ruzindana-Umunyana, A., Imbeault, L., Weber, J.M.: **Substrate specificity of adenovirus protease**, Virus Res., 89. 41-52, 2002.
- Sainsbury, A.W., Adair, B., Graham, D., Gurnell, J., Cunningham, A.A., Benkő, M., Papp, T.: **Isolation of a novel adenovirus associated with splenitis, diarrhoea, and mortality in translocated red squirrels, *Sciurus vulgaris***, Erkrankungen der Zootiere, 40. 265-270, 2001.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.: **Molecular Cloning, A Laboratory Manual**. 2. kiadás, New York: Cold Spring Harbor, 1989.
- San Martin, C.: **Latest insights on adenovirus structure and assembly**, Viruses, 4. 847-877, 2012.

- Smith, A.L., Winograd, D.F., Burrage, T.G.: **Comparative biological characterization of mouse adenovirus strains FL and K87 and seroprevalence in laboratory rodents**, Arch. Virol., 91. 233-246, 1986.
- Sonntag, M., Mühldorfer, K., Speck, S., Wibbelt, G., Kurth, A.: **New adenovirus in bats, Germany**, Emerg. Infect. Dis., 15. 2052-2055, 2009.
- Staden, R.: **The Staden sequence analysis package**, Mol. Biotechnol., 5. 233-241, 1996.
- Sugiyama, T., Hashimoto, K., Sasaki, S.: **An adenovirus isolated from the feces of mice. II. Experimental infection**, Jpn. J. Microbiol., 11. 33-42, 1967.
- Szendrői, A., Schamberger, A., Bakonyi, T., Hornyák, A., Rusvai, M.: **Molecular comparison of the fibre proteins of bovine adenovirus subtype A and subtype B**, Virus. Res., 94. 59-63, 2003.
- Teeling, E.C., Springer, M.S., Madsen, O., Bates, P., O'Brien S.J., Murphy W.J.: **A molecular phylogeny for bats illuminates biogeography and the fossil record**, Science, 307. 580-584, 2005.
- Thomson, D., Meers, J., Harrach, B.: **Molecular confirmation of an adenovirus in brushtail possums (*Trichosurus vulpecula*)**, Virus Res., 83. 189-195, 2002.
- Tollefson, A.E., Ying, B., Doronin, K., Sidor, P.D., Wold, W.S.: **Identification of a new human adenovirus protein encoded by a novel late I-strand transcription unit**, J. Virol., 81. 12918-12926, 2007.
- Ursu, K., Harrach, B., Matiz, K., Benkő, M.: **DNA sequencing and analysis of the right-hand part of the genome of the unique bovine adenovirus type 10**, J. Gen. Virol., 85. 593-601, 2004.
- Vidovszky, M.Z., Boldogh, S.: **Adenovírusok kimutatása az észak-magyarországi denevérfaunában**, Magy. Allatorvosok, 133. 747-753, 2011.
- Vidovszky, M.Z., Kohl, C., Boldogh, S., Görföl, T., Wibbelt, G., Kurth, A., Harrach, B.: **PCR screening of the German and Hungarian bat fauna reveals the existence of numerous hitherto unknown adenoviruses**, XVIth International Congress of Virology, Montreal, Canada, 2014.
- Vidovszky, M.Z., Kohl, C., Boldogh, S., Görföl, T., Wibbelt, G., Kurth, A., Harrach, B.: **Random sampling of the European bat fauna reveals the existence of numerous hitherto unknown adenovirus**, Acta Vet. Hung., 63. 508-525, 2015.
- Vidovszky, M., Ruminska, J., Ramelli, S., Decurtins, W., Doszpoly, A., Skoda, G., Hemmi, S., Harrach, B., Greber, U.: **Characterisation of the murine adenovirus 2 genome and partial sequences from similar rodent adenoviruses**, Acta Microbiol. Immunol. Hung., 58. s112-113. 2011.
- Wellehan, J.F.X., Johnson, A.J., Harrach, B., Benkő, M., Pessier, A.P., Johnson, C.M., Garner, M.M., Childress, A., Jacobson, E.R.: **Detection and analysis of six lizard**

- adenoviruses by consensus primer PCR provides further evidence of a reptilian origin for the atadenoviruses**, J. Virol., 78. 13366-13369, 2004.
- Wickham, T.J., Mathias, P., Cheresch, D.A., Nemerow, G.R.: **Integrins $\alpha\beta 3$ and $\alpha\beta 5$ promote adenovirus internalization but not virus attachment**, Cell, 73. 309-319, 1993.
- Wigand, R., Gelderblom, H., Özel, M.: **Biological and biophysical characteristics of mouse adenovirus, strain FL**, Arch. Virol., 54. 131-142, 1977.
- Yang, F., Wang, Y., Zheng, W., He, B., Jiang, T., Li, Y., Xia, L., Feng, Y., Fan, Q., Tu, C.: **Metagenomic analysis of bat virome in several Chinese regions**, Sheng. Wu. Gong. Cheng. Xue. Bao., 29. 586-600, 2013.
- Zarnke, L.R., Evans, M.B.: **Serologic survey for infectious canine hepatitis virus in grizzly bears (*Ursus arctos*) from Alaska, 1973 to 1987**, J. Wildl. Dis., 25. 568-573, 1998.

10. Tudományos publikációk

10.1. Lektorált, impakt faktorral rendelkező tudományos közlemények

- Hemmi, S., Vidovszky, M.Z., Ruminska, J., Ramelli, S., Decurtins, W., Greber, U.F., Harrach, B.: **Genomic and phylogenetic analyses of murine adenovirus 2**, *Virus Res.*, 169. 128-135, 2011. *IF: 2,941*
- Jánoska, M., Vidovszky, M., Molnár, V., Liptovszky, M., Harrach, B., Benkő, M.: **Novel adenoviruses and herpesviruses detected in bats**, *Vet. J.*, 189. 118-21, 2011. *IF: 2,239*
- Peters, M., Vidovszky, M.Z., Harrach, B., Fischer, S., Wohlsein, P., Kilwinski, J.: **Squirrel adenovirus type 1 in red squirrels (*Sciurus vulgaris*) in Germany**, *Vet. Rec.*, 169. 182, 2011. *IF: 1,248*
- Vidovszky, M.Z., Boldogh, S.: **Adenovírusok kimutatása az észak-magyarországi denevérfaunában**, *Magy. Allatorvosok*, 133. 747-753, 2011. *IF: 0,201*
- Kohl, C., Vidovszky, M.Z., Mühldorfer, K., Dabrowski, P.W., Radonić, A., Nitsche, A., Wibbelt, G., Kurth, A., Harrach, B.: **Genome analysis of bat adenovirus 2: indications of interspecies transmission**, *J. Virol.*, 86. 1888-1892, 2012. *IF: 5,076*
- Vidovszky, M.Z., Kohl, C., Boldogh, S., Görföl, T., Wibbelt, G., Kurth, A., Harrach, B.: **Random sampling of the European bat fauna reveals the existence of numerous hitherto unknown adenovirus**, *Acta Vet. Hung.*, 63. 508-525, 2015. *IF: 0,646*

10.2. Konferencia összefoglalók

- Vidovszky, M.Z., Harrach, B.: **Novel adenoviruses detected in bats in Hungary**, XV. International Congress of Virology, Sapporo, Japan, 2011.
- Vidovszky, M., Ruminska, J., Ramelli, S., Decurtins, W., Doszpoly, A., Skoda, G., Hemmi, S., Harrach, B., Greber, U.: **Characterisation of the murine adenovirus 2 genome and partial sequences from similar rodent adenoviruses**, *Acta Microbiol. Immunol. Hung.*, 58. s112-113. 2011.
- Vidovszky, M.Z., Kohl, C., Boldogh, S., Görföl, T., Wibbelt, G., Kurth, A., Harrach, B.: **Novel adenoviruses detected in bats in Hungary and Germany**, 10th International Adenovirus Meeting, Umeå, Sweden, 2012.
- Vidovszky, M.Z., Kohl, C., Boldogh, S., Görföl, T., Wibbelt, G., Kurth, A., Harrach, B.: **PCR screening of the German and Hungarian bat fauna reveals the existence of numerous hitherto unknown adenoviruses**, XVIth International Congress of Virology, Montreal, Canada, 2014.

10.3. A disszertációval szorosan nem összefüggő, adenovírus témájú közlemények

- Ballmann, M.S., Vidovszky, M.Z.: **Széles gazdaspektrumú psittacin adenovírus (PsAdV-2) kimutatása különböző papagájfajok hazai egyedeiben**, Magy. Allatorvosok, 135. 78-84, 2013. *IF: 0,185*
- Nguyen, T.H., Vidovszky, M.Z., Ballmann, M.Z., Sanz-Gaitero, M., Singh, A.K., Harrach, B., Benkő, M., van Raaij, M.J.: **Crystal structure of the fibre head domain of bovine adenovirus 4, a ruminant atadenovirus**, Virol. J., 12. 81, 2015. *IF: 2,181*

11. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kinyilvánítani elsősorban témavezetőmnek Dr. Harrach Balázsnek és Dr. Benkő Máriának a hihetetlen családi légkörért, amit laboratóriumunkban megteremtenek minden egyes diákjuknak, akit csak egy kicsit is érdekel a tudomány. Köszönöm továbbá a sok türelmet, lelkesítést, szakmai tanácsot és támogatást, amellyel a mai napig „tudományos szülőkként” terelgetik utamat.

Köszönöm a sok segítséget az összes együttműködőknek, akikkel hónapokon keresztül rágtuk át újra és újra egy-egy tudományos cikk kéziratát; dr. Molnár Viktornak a sok egzotikus állat mintát a Budapesti állatkertből, dr. Egyed Lászlónak, Görföl Tamásnak, dr. Estók Péternek és főként dr. Boldogh Sándornak, akik fáradtságot nem kímélve gyűjtötték számunkra a mintákat; köszönöm továbbá dr. Susan Comptonnak az elszaporított MAdV-2 biztosítását. Külön köszönet dr. Thomas Wiltonnak az angol nyelvű részek korrektúrájáért.

Köszönöm minden szakdolgozómnak, Ballmann Mónikának, Görföl Tamásnak és Földes Katalinnak, akik a közös munka során, bizonyos területeken engem is túlnőve, segítettek munkámat. Köszönöm a sok segítséget a laboratóriumban dolgozó minden munkatársamnak, az előttem járóknak, akik bevezettek az egyes munkák és módszerek rejtelmeibe. A teljesség igénye nélkül dr. Kaján Győzőnek, dr. Papp Tibornak, dr. Doszpoly Andornak, dr. Péntes Juditnak, és baráti szeretettel Jánoska Máténak[†], akivel együtt kezdtük el a denevér-AdV-ok csodálatos világának felderítését, és aki sajnos ma már nem lehet köztünk.

Köszönöm a családomnak, Édesapámnak, Édesanyámnak és a testvéreimnek, akik mindig hittek és hisznek bennem, támogattak általános iskola első osztályától kezdve, és példájukkal mindig megerősítettek abban, hogy nincs lehetetlenség, csak tehetetlenség. Köszönöm végül, de nem utolsósorban elragadó feleségemnek Vidovszky Sárának és gyermekeimnek, Hangának és Marcinak, hogy megteremtik nekem azt a családi háttérrel, ami kétségkívül óriási erőt és biztonságot nyújt egy sokszor a tudomány nagy felfedezései és bukásai közt húzódozó pengeélen egyensúlyozó kutató számára. Hálás vagyok a disszertáció elkészítésének időszakában tanúsított türelmükért is.

Munkám anyagi feltételeit az OTKA NN107632 számú pályázata biztosította.