

**Új madár picornavírusok (Orivírus A1 és A2) azonosítása és
teljes genom elemzése: rekombinációs események és
változékony genom-régiók egy új picornavírus nemzetség első
tagjaiban**

XXXII. OTDK Biológia Szekció

Készítette: ADONYI ÁDÁM
biológia Bsc szakos hallgató

Témavezető: Dr. Boros Ákos
Baranya Megyei Kormányhivatal
Népegészségügyi Szakigazgatási Szerve
Regionális Virologiai Laboratórium - Pécs



Pécs

2014

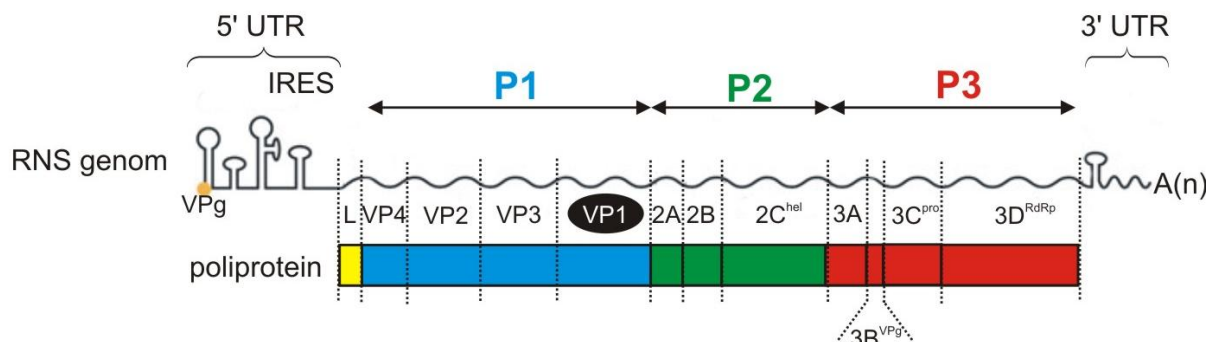
Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	3
1.1. A picornavírusok általános genom-felépítése.....	3
1.2. 2A peptid-típusok.....	4
1.3. 5' nem kódoló régió.....	5
1.4. 3' nem kódoló régió.....	6
1.5. A rekombináció szerepe a picornavírusok evolúciós fejlődésében.....	6
1.6. A picornavírusok nevezéktana - madár picornavírusok.....	7
1.7. Az avihepatovírus klaszter tagjainak genom-jellemzői.....	9
2. Célkitűzések.....	11
3. Anyagok és módszerek.....	12
3.1. Kísérleti minták.....	12
3.2. Virális metagenomika, minta-előkészítés, random RT-PCR, piro szekvenálás.....	12
3.3. RNS extrakció.....	13
3.4. Reverz transzkripció-polimeráz láncreakció (RT-PCR).....	14
3.5. 5' / 3' RACE PCR.....	15
3.6. A felhasznált oligonukleotid primerek felsorolása.....	16
3.7. Gélelektroforézis.....	17
3.8. Direkt nukleotid szekvencia meghatározás.....	17
3.9. "primer-walking" technika.....	17
3.10. "in silico" szekvencia analízis.....	18
4. Eredmények és megbeszélésük.....	19
4.1. Az Orivírus A1 P1 régiójának jellemzése.....	22
4.2. Az Orivírus A1 P2 régiójának jellemzése.....	23
4.3. Az Orivírus A1 P3 régiójának jellemzése.....	24
4.4. Filogenetikai elemzések.....	24
4.5. Az Orivírus A1 nem kódoló régióinak elemzése.....	27
4.6. Az Orivírus A1 kimutatása további házityúk kloákamintáiból.....	29
4.7. Új orivírus genotípus (OrV-A2) meghatározása és szekvencia-vizsgálata.....	30
5. Eredményeink összefoglalása.....	35

1. Bevezetés

1.1. A picornavírusok általános genom-felépítése

A gerinces fajokat fertőző *Picornaviridae* családba tartozó picornavírusok ikozahedrális kapsziddal rendelkező, lipid burok nélküli RNS genomú vírusok. A picornavírusok 7,2-9,7 kilobázis hosszú genomja kevés kivételtől eltekintve egy nagyméretű virális poliproteint kódoló nyílt leolvasási keretből (Open Reading Frame = ORF), az azt határoló 5' és 3' nem kódoló régióból (UnTranslated Region = UTR) és a 3' végen változó hosszúságú poliadenin farokból épül fel (1. ábra). A virális poliprotein úgynevezett strukturális P1 (a virion fehérjeburkát alkotó kapszid-fehérjéket kódoló) és nem-strukturális P2 és P3 (a vírusnak a fertőzött sejten belüli ciklusához köthető peptideket és fehérjéket kódoló) részekre osztható (Palmenberg és mtsai., 2010). A régiókon belül további, különböző méretű és funkciójú fehérjék kódolásért felelős részeket tudunk elkülöníteni. A picornavírusok egy része a P1 genom-régió előtt elhelyezkedő, úgynevezett "leader" (L) fehérjét is kódol, amely a nem-strukturális fehérjékhez tartozik (1. ábra). Az általában a virális poliproteinről lehasadó proteolitikus enzimek (3CD, 3C^{pro}, 2A^{pro}, L^{pro}) segítségével a virális poliprotein különböző méretű és funkciójú fehérjékre hasad (Palmenberg és mtsai., 2010). A hasadási folyamat köztes-, illetve végtermékeit különböző szám-, és betűkombinációkkal jelölik (pl.: 3CD a 3C^{pro} és 3D^{RdRp} virális enzimek prekursora, a 3-as szám pedig a P3 régióra utal) (1. ábra). A P1 kapszid-kódoló régió a picornavírusok egy részében (pl.: parechovírusok, kobuvírusok) VP0 (1AB), VP3 (1C), VP1 (1D) fehérjékre hasad, más picornavírusokban a VP0 fehérje hasításával további két polipeptid (VP4 és VP2) szabadul fel (Palmenberg és mtsai., 2010). A P2 genom régió az emlős picornavírusok döntő többségében három fehérjét (2A, 2B és 2C) kódol, azonban a madarakból eddig azonosított picornavírusok felénél több, vélhetően eltérő funkciójú 2A peptid (multicisztronos 2A genom-régió) is kódolódhat (Palmenberg és mtsai., 2010; Boros és mtsai., 2014b). A virális fehérjék közül a virionok külső felén található, immundomináns VP1 a legváltozékonyabb, míg a 2C helikáz (2C^{hel}), 3C proteáz (3C^{pro}), illetve 3D RNS-függő RNS polimeráz (3D^{RdRp}) enzimek a legkonzervatívabbak (Palmenberg és mtsai., 2010).



1 ábra: A picornavírusok általános genom-felépítése, a fő genom-régiói (P1, P2, P3) és a virális poliproteinről lehasadó érett fehérjék elnevezései (szaggatott vonallal határolva). A genom 5' végéhez egy VPg nevű virális peptid kapcsolódik. IRES: Belső riboszóma kötőhely. Az immundomináns VP1 lokalizációját fekete háttér jelzi. A kódoló részt határoló 5' és 3' nem kódoló szakaszok (UTR) komplex másodlagos RNS strukturáltsággal rendelkeznek (Agol és Gmyl 2010 nyomán, módosítva).

1.2. 2A típusok

Jelenleg összesen 5 különböző 2A típust ismerünk (Palmenberg és mtsai., 2010; Boros és mtsai., 2014b):

- 1: Az enterovírusokra jellemző *proteáz funkciójú 2A*, amelyben a karakterisztikus GXGC (ahol X bármilyen aminosav lehet) aminosav-motívum felismerhető.
- 2: Az *Aphthovírus 2A-szerű peptidek* változatos hosszúságúak (20 - 145 aminosav) és valószínűleg változatos funkcióval is rendelkeznek. Ilyen típusú peptideket találunk egyes emlős picornavírusok, mint például az *Aphthovirus*, *Cardiovirus*, *Erbovirus*, *Teschovirus*, és *Senecavirus* nemzetség tagjai között. Az ebbe a csoportba tartozó 2A peptidek mindegyike ugyanarra a konzervatív, ún. "riboszóma-ugró" aminosav-motívumra (DXEXNPGP, ahol X bármilyen aminosav lehet) végződik. Amikor a transzláció során a riboszómák elérik a DXEXNPGP-motívumot a motívum utolsó két aminosava (G és P) között nem alakul ki peptidkötés. Ennek következtében az NPG-re végződő virális polipeptid darab leválik, miközben folytatódik a genom hátralevő részéről a fehérje szintézise.
- 3: A *Hepatitis A 2A-szerű peptidet* egyelőre csak a hepatitis A vírusokban írtak le. A 2A fehérjének nincs ismert, az előző két fehérjéhez hasonló fehérje hasító funkciója.
- 4: A *Hbox/NC-típusú peptidek* szintén elterjedtek a picornavírusok körében. Ilyen típusú 2A fehérje található például az *Aquamavirus*, a *Kobuvirus*, és a *Parechovirus* nemzetség tagjai

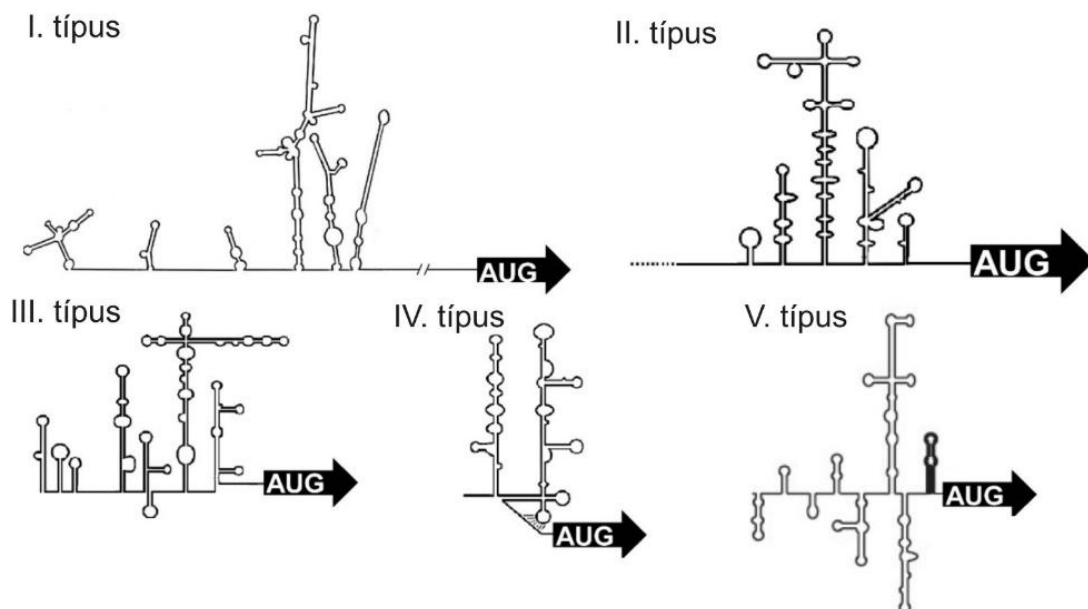
között is. A csoport 2A fehérjéi jelentős rokonságot mutatnak az eukarióta H-rev107 fehérjékkel, melyek fontos sejtciklus-szabályozó szereppel rendelkeznek.

5. *P-hurok NTPáz tartalmú* 2A peptideket jelenleg csak az avihepatovírus filogenetikai klaszter tagjaiban (a klaszterről részletesen lásd később) azonosítottak. Az ebbe a típusba tartozó 2A peptidek mindegyikében felismerhető a GXXGXGKS aminosav-motívum. A peptidek pontos szerepe jelenleg ismeretlen.

Emellett azonban egyre növekvő számban azonosítanak ismeretlen funkciójú 2A peptideket is.

1.3. 5' nem kódoló régió

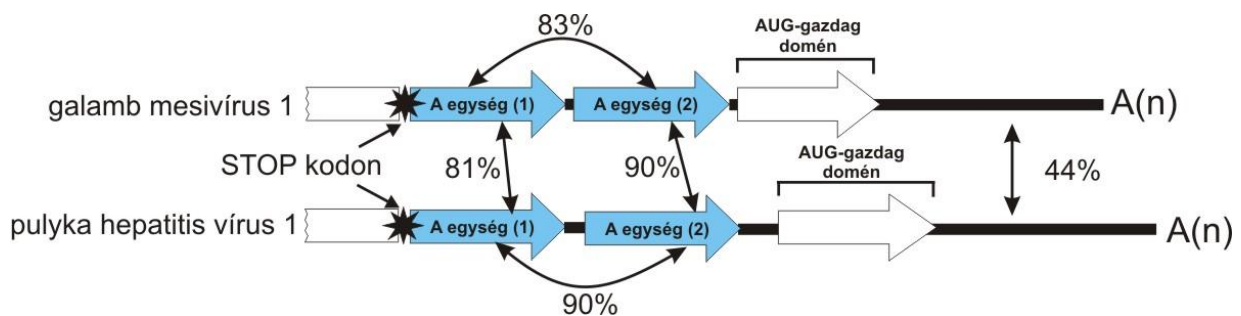
A virális poliproteint kódoló szakaszt 5' és 3' irányba határoló UTR régiókra komplex strukturáltság jellemző. Az 5' UTR start kodon előtti vége tartalmazza a minden picornavírus genomon megtalálható belső riboszóma-kötőhelyet (Internal Ribosomal Entry Site = IRES), amelyet másodlagos RNS struktúrája alapján eddig öt különböző típusba soroltak (Lin és mtsai., 2009; Sweeney és mtsai., 2012) (2. ábra). Az IRES a virális poliprotein átíródásának megindításáért felelős régió, amely a gazdasejt riboszómális komplexének a vírusgenomhoz történő kapcsolódását biztosítja. A picornavírusok mintegy 450 nukleotid hosszúságú IRES régiója komplex másodlagos RNS-struktúrával rendelkezik és számos a gazdasejt által termelt iniciációs faktor és riboszómális komplex kötőhelyeül szolgál (Belsham és Jackson, 2000).



2. ábra: Az eddig azonosított öt különböző IRES típus (I-V) másodlagos RNS struktúrái. AUG: a virális poliprotein start kodonja. (Lin és mtsai., 2009 nyomán, módosítva).

1.4. A 3' nem kódoló régió

A picornavírusok 3' UTR-jei jelentős méretbeli különbséget (25 nt - Kunsagivirus A1 és 828 nt - Rosavirus A1) és változatos strukturális felépítést mutatnak. A 3' UTR-nek kitüntetett szerepe van a picornavírus genom negatív szálának szintézisében (Rohll és mtsai., 1995). A régiót érintő szekvencia- és strukturális vizsgálatok eredményei az 5' UTR-IRES régiójához hasonlóan az elsődleges szekvencia helyett inkább a másodlagos (illetve térbeli) RNS strukturális konzerváció fontosságára utalnak (Palmenberg és mtsai., 2010). A másodlagos struktúrát alkotó hajtűk és komplex domének mellett egyes picornavírusoknál konzervatív nukleotid motívumok, pl. súlyzó-szerű struktúrák (gallivírusok, Aichivírus A faj vírusai) vagy az s2m (stem-loop 2-szerű motívum, oscivírusok, erbovírusok) nevű hajtű-szerkezetek, illetve konzervatív, ismétlődő szekvenciák, mint például az "A egység" (megrívirusok) is azonosításra kerültek (3. ábra) (Boros és mtsai., 2014a, b; Tengs és mtsai., 2013)



3. ábra: A megrívirus 3' UTR 3' végének vázlatos felépítése és az ismétlődő "A egységek" (kék nyilak) és AUG-gazdag domének (fehér nyilak) helyzete. A %-os értékek az egyes "A egységek" közti nukleotid egyezéseket mutatják (Boros és mtsai., 2014a).

1.5. A rekombináció szerepe a picornavírusok evolúciós fejlődésében

A picornavírusok genom változékonysága a 3D^{RdRP} enzim transzkripció során vétett átírás hibáira (pont mutációk, inzerciók és deléciók) és az átírás ellenőrzésének ("proof-reading") hiányára vezethető vissza. A genom replikációk során keletkező, fokozatosan felhalmozódó változások hozzájárulhatnak a vírusfajon belüli genotípusok szétválásához (Gromeier és mtsai., 1999). Kiterjedtebb, genom-régiókat érintő, hirtelen változások háttérében különböző rekombinációs folyamatok állhatnak, amely folyamatok a picornavírusok evolúciós fejlődésének egyik fő mozgatórugói (Gromeier és mtsai., 1999; Stanway, 1990). A rekombinációban részt vevő "szülői" szekvenciák között genom-régió cserék, duplikációk, illetve "génvesztés" révén új, eltérő genetikai tulajdonságokkal rendelkező genotípusok

jöhetnek létre, amelyek előnyös tulajdonságok hordozása esetén elterjedhetnek. A rekombináns picornavírusok *in silico* azonosítása különböző szekvencia-elemző programok segítségével, jelen tudásunk szerint olyan esetekben lehetséges, ahol a rekombináns vírus "szülői" (vagy közeli rokon) vírusainak szekvenciája is ismert, jó példa erre a már leírásra került rekombináns enterovírusok viszonylag nagy száma, amelyeknek azonosíthatósága többek közt a nagyszámú ismert enterovírus szekvenciákra vezethető vissza (Tapparel és mtsai., 2009). Olyan esetekben, ahol a lehetséges szülői szekvenciák nem ismertek, egy esetleges rekombináns picornavírust a legközelebbi szekvencia-rokon vírusoktól eltérő genom-régiók, például eltérő IRESei (pl. hunnivirusok és a közeli rokon teschovírusok különböző IRESei) jelenléte azonosíthat (Reuter és mtsai., 2012). Az ismert rekombináns picornavírusok döntő többsége fajon belüli (ún. intraspecies), illetve kisebb számban fajok közötti (ún. interspecies) rekombináns, tehát mindkét esetben a "szülői" szekvenciák közeli rokonok, azaz legalább egy nemzetségbe tartozók (Simmonds, 2006). Jelen ismereteink szerint különböző nemzetségekbe tartozó picornavírusok közti esetleges rekombinációra csak közvetett jelek utalnak, pl.: a fent említett rokon vírusoktól eltérő IRES jelenléte (Reuter és mtsai., 2012).

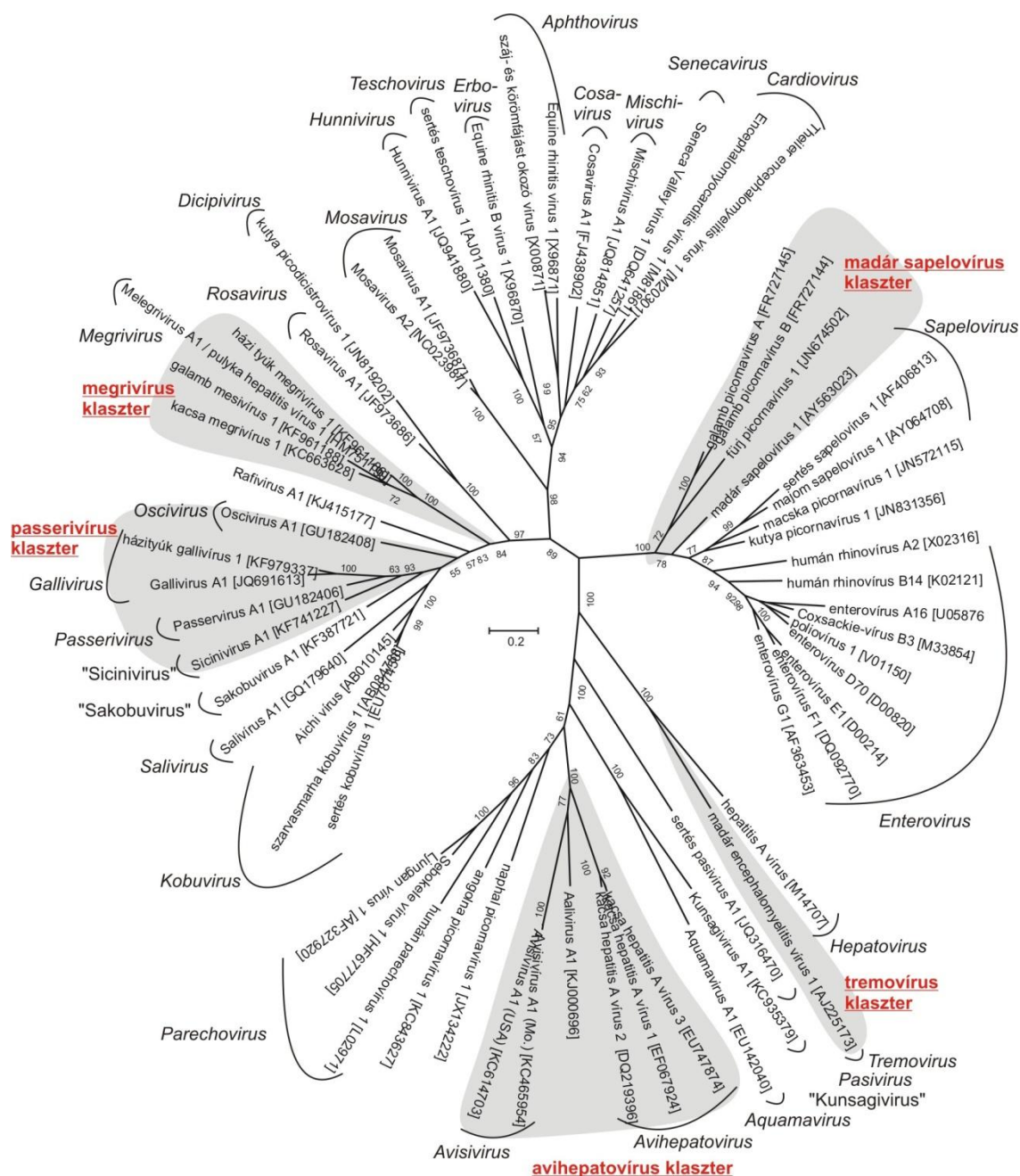
1.6. A picornavírusok nevezéktana - madár picornavírusok

A picornavírusokat genom felépítésük és szekvencia különbségeik alapján nemzetségekbe, fajokba, illetve geno-/szerotípusokba sorolják. Általánosságban elmondható, hogy az egy nemzetségbe tartozó picornavírusok 2A, 2B és 3A peptidjei általában homológok, IRES-eik azonos csoportba tartoznak és P1 P2 és P3 régiójuk: >40%, >40% és >50% szekvencia egyezést mutatnak (http://www.picornastudygroup.com/definitions/genus_definition.htm). Ezek a tulajdonságok irányadóak egy adott picornavírus nemzetségbe sorolásakor is. Ezen szabályok alapján a jelenleg ismert picornavírusok 46 fajba és 26 hivatalosan elfogadott és további három ("Kunsagivirus", "Sakobuvirus" és "Sicinivirus") elfogadásra váró nemzetségbe sorolhatók (4. ábra) (Knowles és mtsai., 2011).

A picornavírusok hazai és nemzetközi nevezéktana folyamatosan változik, összerosódnak benne a történelmi és az új, a gazdafajt elhagyó elnevezések. Sajnos a hivatalos nevezéktan kialakítása messze elmarad az új picornavírusok leírásának sebességétől. A lemaradás még látványosabb a magyar nyelvű nevezéktanra vonatkozóan. Bizonyos régóta ismert picornavírusoknak van magyar tudományos nyelvben elterjedt elnevezése, ilyen például a száj- és körömfájást okozó vírus (*Aphthovirus* nemzetség), vagy a poliovírus (*Enterovirus* nemzetség), de a legtöbb új picornavírusnak tudomásunk szerint nincs. Ezért a dolgozatban

ahol lehetségesnek tartottuk a vírusok magyar elnevezést alkalmaztuk. Azoknál a vírusoknál ahol tudomásunk szerint nincs magyar név, ott a hivatalos angol nyelvű, illetve az újonnan leírt vírusoknál a szerzők által javasolt nevet használtuk. Konkrét példákért lásd a 4. 10. ábrákat és az 5. táblázatot.

A jelenleg ismert 17 madár picornavírus faj tagjai öt, filogenetikailag jól elkülönülő klaszterbe tartoznak (4. ábra). A madár picornavírus klaszterek tagjaira karakterisztikus genom felépítés (P1-P2-P3 genom-régiókat alkotó fehérjék száma, Leader protein [L] jelenléte), illetve genom-tulajdonságok jellemzőek. Például a passerivírus klaszter tagjaira L-3-3-4, a tremovírusokra 4-3-4, míg a megrivírusok egy részére 3-6-4 genom felépítés jellemző (Boros és mtsai., 2014a,b). Karakterisztikus genom-tulajdonság például a pulyka és házityúk megrivírusok 3' UTR-jében azonosított, ismétlődő szekvencia-motívumok, az ún. "A egységek" és az azt követő AUG-gazdag régió jelenléte, amelyet eddig csak a megrivírus klaszter tagjaiban írtak le (3., 4. ábra) (Boros és mtsai., 2014a,b). Az ismert madár picornavírusok közül összesen négyet (házityúk gallivírus 1, Sicinivírus A1, házityúk megrivírus 1, madár encephalomyelitis vírus 1) azonosítottak házityúkokból, amelyek filogenetikai szempontból három madár picornavírus klaszterbe (passerivírus, megrivírus és tremovírus klaszterek) tartoznak (Boros és mtsai., 2014b). Itt jegyezzük meg, hogy a nemrég leírásra került, avihepatovírus klaszterbe tartozó házityúk picornavírus 2 és 3 genomjai vizsgálataink megkezdésekor még nem voltak ismertek (Lau és mtsai., 2014).



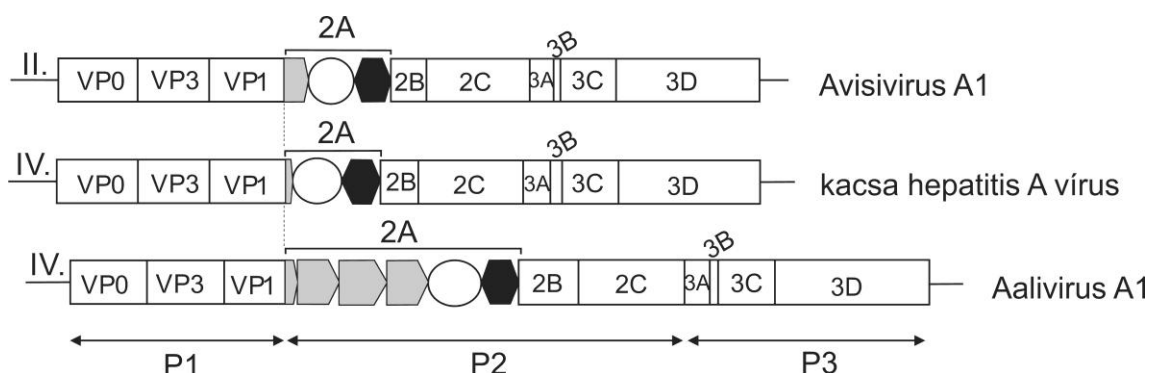
4. ábra: A picornavírusok filogenetikai és nevezéktani rendszere. A P1 strukturális régióból készült aminosav törzsfán az összes picornavírus nemzetség (nemzetségnevek dőlt betűvel szedve) és a három hivatalosan előterjesztett új nemzetség (aposztrofálva) reprezentatív tagjai is feltüntetésre kerültek. A szürke keretes vírusok az öt különböző madár picornavírus klasztert jelölik. A különböző szekvenciák GenBank azonosító számai kapcsos zárójelben találhatóak.

1.7. Az avihepatovírus klaszter tagjainak genom jellemzői

Vizsgálataink során központi szerep jutott a monofiletikus avihepatovírus klaszternek, amelybe kísérleteink kezdetekor a kacsá hepatitis A vírusok (duck hepatitis A virus 1-3,

DHAV, *Avihepatovirus* nemzetség), az Aalivirus A1 (AalV-A1, "Aalivirus" nemzetség) és az Avisivírus A1 (AsV-A1, *Avisivirus* nemzetség) tartoztak (4., 5. ábra). A klaszter tagjait csak pulykákból (AsV-A1), házi kacsákból (DHAV, AalV-A1) hattyúkból (DHAV) és galambokból (DHAV) azonosították (Tseng és mtsai., 2007; Wang és mtsai., 2014; Boros és mtsai., 2014b). Állategészségügyi szempontból kiemelkedő fontossággal bírnak a kacsá hepatitis A vírusok, amelyek az erősen ragályos és magas mortalitással jellemezhető kacsá hepatitis szindróma egyik legfontosabb kórokozói (OIE, 2010). Emellett a klaszter többi tagját tünetmentes és különböző tüneteket mutató szárnyasokból (hepatitis: AalV-A1, enteritis/levertség: AsV-A1) mutatták ki (Wang és mtsai., 2014; Boros és mtsai., 2014b).

Az avihepatovírus klaszter tagjainak genomjaira 3-5-4 (DHAV és AsV-A1) illetve 3-8-4 (AalV-A1) genom felépítés, azaz N-terminális Leader protein és a VP4↓VP2 hasítási hely hiánya, illetve több, általában minimum három tagból álló 2A genom-régió jellemző (5. ábra). A klaszter tagjai közül az aali-, és avihepatovírusoknak (DHAV) IV-es, míg az avisivírusoknak II-es típusú IRES-e van. Az Aalivirus A1 2A régiója összesen hat peptidet kódol (Wang és mtsai., 2014). Az avihepatovírus klaszter tagjainak genomjai egy aphthovírus 2A-szerű, egy P-hurok NTPáz típusú és egy Hbox/NC-típusú fehérjékből álló 2A-triászt kódolnak (5. ábra). Ez a 2A triász csak az avihepatovírus klaszter tagjaira jellemző, azok karakterisztikus genom bélyege (Boros és mtsai. 2014b). A nemrég azonosított avihepatovírus klaszterbe tartozó házityúk picornavírus 2 és 3 genomjaiban is megtalálható ez a 2A triász (Lau és mtsai., 2014). A 2A peptidek közül az aphthovírus 2A-szerű, DXEXNPGP-tartalmú 2A peptid több kópiában is jelen lehet (pl. 2 db DXEXNPGP: AsV-A1, illetve 4 db DXEXNPGP: AalV-A1). Az Amerikai Egyesült Államokban azonosított AsV-A1 csak egy DXEXNPGP-tartalmú 2A-szerű egységet kódol (Ng és mtsai., 2013).



5. ábra: Az avihepatovírus klaszter tagjainak méretarányos genom rajza. A római számok az IRES típusokat jelölik. A 2A genom régióban a szürke háttér az aphthovírus 2A-szerű, a fehér kör a P-hurok NTPáz típusú, míg a fekete hatszög a Hbox/NC-típusú 2A peptideket jelöli (Boros és mtsai., 2014b).

2. Célkitűzések

A házi szárnyasok, köztük a házityúk (*Gallus gallus domesticus*) alapvető táplálékforrása az embereknek, emellett a tenyésztésével és feldolgozásával foglalkozó iparágak gazdasági jelentősége sem elhanyagolható. A tenyésztett szárnyas állományokra veszélyt jelentő mikrobiológiai ágenseknek csak egy részét ismerjük; számos olyan kórkép ismeretes, például a maladszorpciós szindróma vagy a "satnyaság és törpenövés tünetegyüttese" (runting-stunting syndrome: RSS), amelynek pontos etiológiai háttere még nem teljesen feltárt (Alina, 2011). A házi szárnyasok egészségi állapotát veszélyeztető patogén vírusok azonosításához elengedhetetlen a különböző madár populációk, köztük a házi szárnyasok között cirkuláló vírusok genetikai szintű azonosítása. Emellett az új (picorna)vírusok genom-vizsgálata hozzájárulhat a vírusok evolúciós fejlődésének mélyebb megismeréséhez. Vizsgálataink megkezdésekor csak négy házityúkokból azonosított madár picornavírus volt ismert, míg az avihepatovírus filogenetikai klaszterbe tartozó egyik madár picornavírust (illetve rokon vírusait) sem azonosították még házityúkokból.

Ezért célul tűztük ki:

- Az avihepatovírus klaszterbe tartozó picornavírusoknak, vagy rokon vírusaiknak azonosítását házityúk kloákamintáiból.
- Az azonosított picornavírus(ok) teljes genom-meghatározását, szekvencia-, és filogenetikai vizsgálatát.
- Esetleges rekombinációra utaló jelek azonosítását.
- Az azonosított picornavírus(ok) előzetes epidemiológiai vizsgálatát.

3. *Anyagok és módszerek*

3.1. *Kísérleti minták*

A kísérleteink során felhasznált házityúk (*Gallus gallus domesticus*) kloákamintái eltérő korú állatokból származtak Délkelet-, és Délnyugat-Magyarország három különböző családi baromfitenyészetéből. A minták jelentős része klinikai tüneteket nem mutató szárnyasokból származott (1. táblázat). A kísérleteink kiindulópontjául szolgáló minta (Pf-CHK-1), amelyet virális metagenomikai vizsgálatra küldtünk, egy hasmenéses tünetet mutató házityúk kloákamintája volt.

Minta jele	Gyűjtési hely	Gyűjtési idő	Tünetek	Kor
PC1	Délkelet Mo.	2013 április	tünetmentes	felnőtt
PC2	Délkelet Mo.	2013 április	tünetmentes	felnőtt
PC3	Délkelet Mo.	2013 április	tünetmentes	felnőtt
PC4	Délkelet Mo.	2013 április	tünetmentes	felnőtt
PC5	Délkelet Mo.	2013 április	tünetmentes	felnőtt
CHK-I	Délnyugat Mo.	2013 április	tünetmentes	24 napos
CHK-II	Délnyugat Mo.	2013 április	tünetmentes	felnőtt
CHK-III	Délnyugat Mo.	2013 április	tünetmentes	6 napos
CHK-IV	Délnyugat Mo.	2013 április	tünetmentes	8 napos
CHK-V	Délnyugat Mo.	2013 április	tünetmentes	16 napos
CHK-VI	Délnyugat Mo.	2013 április	tünetmentes	30 napos
Pf-CHK-1	Délkelet Mo.	2013 április	"hasmenés"	24 napos
Pf-CHK-2	Délkelet Mo.	2013 április	tünetmentes	24 napos

1. táblázat: A kísérleteink során felhasznált házityúk kloáka mintái. A minták három különböző (PC-jelzésű, CHK-jelzésű és Pf-CHK-jelzésű) baromfitenyészetből származtak. Mo.: Magyarország. A virális metagenomikai vizsgálatra küldött mintát fekete háttér jelzi.

3.2. *Virális metagenomika, minta-előkészítés, random RT-PCR, piroszekvenálás*

A Pf-CHK-1 jelzésű kloákamintát Hank-féle pufferelt sóoldattal hígítottuk (Gibco BRL), majd a vírusokat 74 °C-on 50 perces inkubálással inaktiváltuk. Az inaktivált mintát Eric Delwart laboratóriumába (Blood Systems Research Institute, San Francisco, Kalifornia, USA) küldtük virális metagenomikai vizsgálatra, amely a következő alapvető lépésekből épült fel: A mintát 15.000 fordulat/perc (fpp)-en centrifugálták 10 percig. A 200 µl felülúszót egy 0,45 µm-es szűrőn (Millipore) átszűrték, így eltávolítva a baktériumokat és a nagyobb részecskéket. Ezután DNáz (Turbo DNase, Epicentre, és Benzonase, Novagen) és RNáz

(Thermo Scientific) emésztést végeztek így eliminálva a kapszid által védtelessen RNS-t és DNS-t. A virális nukleinsav kivonását "QIAamp spin-column" technikával végezték a gyártó által leírtak szerint (Qiagen). A virális cDNS könyvtár készítéséhez ScriptSeq™ v2 RNA-Seq Library Preparation Kit-et (Epicentre, USA) használták. A kapott mintát Miseq Illumina platformon (Illumina Inc. USA) közvetlen szekvenálásra kerültek a gyártó protokollja szerint (Phan és mtsai., 2013).

A szekvenáláskor keletkező leolvasási szekvenciák ("read"-ek) kontigokká alakításához a Sequencher (Gene Codes) szoftvert használták. A leolvasási szekvenciák akkor alkotottak egy kontigot, ha legalább 35 bázis hosszan legalább 95%-os egyezést mutattak. Így létrehozott kontigok, illetve egyedi leolvasási szekvenciák azonosítását tBLASTx (GenBank-NCBI, USA) programmal végezték el. Azokat a szekvenciákat, amelyeknél tBLASTx keresés 10^{-3} vagy annál kisebb E-értékű találatot adott eukarióta virális, bakteriofág, eukarióta, bakteriális vagy egyéb kategóriákba sorolták a legkisebb E értékű találat alapján. A 10^{-3} -nál nagyobb E-értékű szekvenciákat besorolatlanak osztályozták. További vizsgálataink során csak az eukarióta virális, azon belül is az avihepatovírus klaszter picornavírusaival rokonságot mutató szekvenciákkal foglalkoztunk.

3.3. RNS extrakció

A kloákamintákból 0.1 M-os PBS-sel 10-50%-os szuszpenziót készítettünk, melyből 300-400 µl-t használtunk fel az RNS izoláláshoz. A mintát Genetronnal (1,1,2-trikloro-trifluoretán, Sigma-Aldrich, USA) tisztítottuk és 5 percig centrifugáltuk 10.000 fpp-en. A felülúszóból 150 µl térfogatot 500 µl TRIzol® Reagenssel (Life Technologies, USA) kevertük el. Ezt követően a mintákat 5 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd 100 µl kloroformot adtunk hozzá. Rövid vortexelés után a mintákat 5 percig inkubáltuk, majd 10.000 fpp-en 15 percig centrifugáltuk 4°C-on. A felső vizes fázisból minimum 300 µl mennyiséget mértünk át új 1,5 ml-es Eppendorf csövekbe. Az RNS kicsapását izopropanollal végeztük. A mintákat 10 percig inkubáltuk, majd 10.000 fpp-en 10 percig 4°C-on centrifugáltuk. A kicsapott RNS-ről a vizes-izopropanolos oldatot eltávolítottuk. A csapadékot 75%-os etanollal mostuk, majd 10.000 fpp-en 2 percig 4°C-on centrifugáltuk. A kinyert RNS-t szobahőmérsékleten történő 5-10 perces szárítás után 50 µl nukleáz mentes vízben oldottuk fel. A mintákat a további felhasználásig -80°C-on tároltuk.

3.4. Reverz transzkripció-polimeráz láncreakció (RT-PCR)

A kísérleteink során alkalmazott RT-PCR módszereket a várt PCR termékek mérete: 1000 bázispár (standard PCR), vagy nagyobb (long PCR), illetve a templátvégek jelölésének szükségessége (5'/3' RACE PCR) alapján három részre lehet osztani. A három módszer az alábbiakban külön-külön kerül bemutatásra.

Azok a reagensek, amelyeknél a gyártó nincs külön feltüntetve a Thermo Scientific (USA) termékei.

3.4.1. Standard RT-PCR

Az 1000 bp, vagy annál kisebb várt PCR termékek esetén az alábbi RT-PCR protokollt alkalmaztuk:

3.4.1.1. cDNS szintézis

A reverz transzkripció (RT) reakcióelegy végtérfogata 50 µl volt, amely a következő komponenseket tartalmazta: 5 µl 10X PCR puffer (100mM Tris-HCl, 15mM MgCl₂, 500 mM KCl, 0,01% zselatin (pH: 8,3)), 1 µl 10mM dNTP, 0,2 µl RNasin (40U), 0,5 µl M-MLV-RT (200U), 1 µl reverz primer (20µM), 37 µl nukleáz mentes víz és 3 µl RNS-t. Az összeállított mintákat 60 percen keresztül 42°C-on inkubáltuk, majd az RT enzimet 85°C-on 5 percig inaktívtuk. Negatív kontrollként nukleáz mentes vizet használtunk.

3.4.1.2. Standard PCR

Az 50 µl PCR reakcióelegybe a következő komponenseket mértük be: 5 µl 10X PCR puffer, 1 µl Dupl-A-Taq DNS Polimerázt (Zenon Bio, Szeged) (5U), 1 µl forward primer (20 µM) és 43 µl nukleáz mentes víz. A PCR reakcióelegyet hozzámértük az RT teljes mennyiségéhez, majd a következő hőprogramon inkubáltuk: A kezdeti denaturáció: 94 °C-on 1 percig, majd 40 ciklus: 95°C-on 30 mp, primer átlag T_m-5°C-on 30 mp, és 72°C-on 1 perc, amit egy 5 perces 72°C-on történő inkubációs lépés követett.

3.4.2. Long RT-PCR

Az 1000 bp-nál nagyobb várt PCR termékek esetén az alábbi RT-PCR protokollt alkalmaztuk:

3.4.2.1. cDNS szintézis

A RT reakcióelegy végtérfogata 20 µl volt. Tartalmazott: 4 µl 5X MAXIMA cDNS szintézis puffert (250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl, 15mM MgCl₂, 50 mM DTT), 1µl 10mM dNTP-t, 1 µl reverz primert (20µM), 1 µl MAXIMA RT enzimet (200 U/µl), 3 µl virális RNS-t, és 10 µl

nukleáz mentes vizet. Az elegy keverését és centrifugálását követően 60 percen át 55°C-on inkubáltuk. Az enzim inaktiválása 5 percen át 85°C-on történt. .

3.4.2.2. Long PCR

A PCR reakcióelegy 50 µl végtérfogatú volt, amely a következő komponenseket tartalmazta: 5 µl 10X long PCR reakció puffert (1 mM MgCl₂), 1-1 µl reverz és forward primert (20 µM), 1 µl dNTP-t (10mM), 0,5 µl Long PCR Enzim mixet (5U), 1 µl cDNS-t, 40,5 µl nukleáz mentes vizet. A long PCR minták hőprogramja a standard PCR részben leírttal egyezett kivéve, hogy a ciklusok elongációs lépése 72°C helyett 68°C-on a termék méretétől függően 2-3 percig zajlott.

3.5 5'/3' RACE PCR

A genom 5' és 3' régióinak felszorzozásához "5'/3' rapid amplification of cDNA ends" (RACE) módszert használtunk, amely a következő lépésekből állt:

3.5.1 3' RACE PCR

A virális genom 3' végének felszorzozásához 20 µl végtérfogatú RT reakciót állítottunk össze, amelynek összetétele megegyezett a long PCR részben leírtakkal, annyi különbséggel, hogy 5 µl virális RNS-t és egy ún. Horgonyzott-Adapter-oligodT reverz primert (5' GACCACGCGTATCGATGTCGACT₁₂V 3'; Roche, Svájc) használtunk. Óvatos keverést és centrifugálást követően a mintákat 42°C-on 15 percig, majd 55°C-on 60 percig inkubáltuk. A reverz transzkriptáz enzimet 5 percen át tartó 85°C-os melegítéssel inaktiváltuk. A PCR reakcióelegy összetétele, illetve az alkalmazott hőprogram szintén megegyezett a Long PCR részben leírtakkal. A PCR elegy tartalmazta az Adaptert (5' GACCACGCGTATCGATGTCGAC 3'; Roche, Svájc), mint reverz primert, illetve egy szekvencia-specifikus forward primert.

3.5.2 5' RACE PCR

A virális nukleinsav 5' végének felszorzozásához szekvencia-specifikus primereket használtunk a long PCR rész cDNS szintézisnél bemutatott RT reakció paramétereivel. A kapott cDNS-t QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hollandia) segítségével tisztítottuk. A tisztított cDNS 3' végéhez Adenin homopolimert szintetizáltunk terminális dezoxiribonukleotid transzferáz (TdT) reakció keretében. A TdT reakcióelegy a következő anyagokat tartalmazta: 5 µl 5X TdT reakció puffer (1 M kálium-kakodilát, 0,125 M Tris,

0,05% (v/v) Triton-X-100, 5 mM kobalt-klorid, (pH: 7,2)), 1 µl dATP (5 mM), 0,5 µl TdT enzimet (20U), 5 µl cDNS és 13,5 µl nukleáz mentes víz. A TdT reakcióelegyet 20 percig 37 °C-on inkubáltuk. Az 5' RACE PCR reakciók összetétele megegyezett a long PCR részben leírtakkal. Az első 5' RACE PCR reakcióelegy a 3' RACE PCR reakcióhoz is alkalmazott Horgonyzott-Adapter-oligodT primert, mint forward primert és egy szekvencia-specifikus reverz primert tartalmazott és templátként 5 µl TdT terméket. A második 5' RACE PCR reakcióelegy a 3' RACE PCR reakcióhoz is alkalmazott Adapter primert, mint forward primert, és egy újabb szekvencia-specifikus reverz primert tartalmazott, amelyhez templátként az első 5' RACE PCR termékből 1 µl-t mértünk bele.

3.6. A felhasznált oligonukleotid primerek felsorolása

Reakció szám	Reakció típus	Primer neve	Primer szekvencia (5' - 3')	Termék méret (bp)
R1	standard RT-PCR	OrV-A1-VP0-Ct4-F	TTA ACA TAA CAG GGT CCG AGC AGC	1002
		OrV-A1-VP1-Ct5-R	AAA GAT AGC GTC AAC GTT TGT GTG	
R2	long RT-PCR	OrV-A1-VP3-Ct5-F	GAC ATG CTC AGT CGT GCT CCA A	2199
		OrV-A1-Ct8-2C-R	GTCAACATTCAAACCTACACCACCC	
R3	long RT-PCR	OrV-A1-Ct8-2C-F	GGGTGGTGTAGTTTGAATGTTGAC	1652
		OrV-A1-3D-R	TAA ACA CTG AAC TGC AGC TCT	
R4	3' RACE	OrV-A1-3D-F	CTA GGG AGA AAG TGA GGA AAG G	1288
R5	5' RACE	OrV-A1-5RACE-R1	AAG GCC CTG GGC ATT GAG ATT	1540
		OrV-A1-5RACE-R2	TGG AGG TCA GCG TCA AGC ATT	
		OrV-A1-5RACE-R3	AGT AAG TCT ATG GGC TAT GAC	
szűrő reakció	standard RT-PCR	OrV-A1-3D-F	CTT ATC GMA TGG TSA TGG GTG A	605
		OrV-A1-3D-R	CCY CKG CAC CAC TGG ATC TT	

2. táblázat: Az Orivírus A1 teljes genom meghatározásához felhasznált oligonukleotid primerek listája. R1-5: PCR reakciók sorrendje. Az egyes PCR termékek pozícióját lásd az eredmények rész 6. ábráján.

Reakció szám	Reakció típus	Primer neve	Primer szekvencia (5' - 3')	Termék méret (bp)
R1	long RT-PCR	OrV-A2-VP3-Ct7-F	TTG CCG TGG TGA ATA AAA CAG CTA C	2218
		OrV-A2-3C-Ct9-R	CTT ATC CGT TTT GAT CTC CCA GAC G	
R2	3' RACE	OrV-A2-3B-F	TGA TTA GCA CAA GCC CTT TCA TAG TGC	2941
R3	5' RACE	OrV-A2-5RACE-R1	GTC AGG GCC TGC CCT AAT TTC	1856
		OrV-A2-5RACE-R2	AC GGA GCA GGT GGT GGG GCA T	
		OrV-A2-5RACE-R3	GTA GCT GTT TTA TTC ACC ACG GCA A	

3 táblázat: Az Orivírus A2 genom meghatározásához felhasznált oligonukleotid primerek listája. R1-3: PCR reakciók sorrendje. Az egyes PCR termékek pozícióját lásd az eredmények rész 15. ábráján.

3.7. Gélelektroforézis

A PCR reakciók termékeit 1,5 %-os (standard PCR) illetve 0,5%-os (long PCR) agaróz gélben (NuSieveR 3:1, FMCR BioProducts, USA), 35-45 percen keresztül 110V (standard PCR) illetve 95V (long PCR) feszültséggel Minicell Ec370M (Electroforetic Gel System, E-C Apparatus Co., USA) típusú futtatókádban futtattuk. Minden futtatás tartalmazott 1 kilobázispáros (kbp) illetve 100 bp-os DNS markert (Promega, USA). Az elválasztás során 0,5 X Tris-Borát-EDTA puffert alkalmaztunk. A géleket etidium-bromiddal festettük, majd a vizualizáció 320nm hullámhosszúságú UV megvilágítás alkalmazásával történt.

3.8. Direkt nukleotid szekvencia meghatározás

20µl PCR termékhez 20 µl ammónium-acetát (4,0 M) oldatot mértünk. Majd 120 µl 96%-os etanolt adtunk hozzá és vortexelést követően 13,000 fpp-en 15 percen keresztül 4°C-on centrifugáltuk. A felülúszó eltávolítása után, a csapadékot 200 µl 70%-os etanollal mostuk. A 10 percen át tartó 13.000 fpp-es centrifugálás után a felülúszót pipettával eltávolítottuk, majd a mintákat szobahőmérsékleten szárítottuk. A tisztított PCR termékeket 20-50 µl nukleáz mentes vízben oldottuk fel.

A szekvenálási reakció – 10 µl végtérfogatban – 2,3 µl nukleáz mentes vizet, 0,7 µl reverz/forward primert (20 µM), 2 µl BigDye Terminator mixet és 5 µl tisztított PCR terméket tartalmazott. A reakcióelegyeket a következő hőprogramon inkubáltuk: A kezdeti denaturáció: 96 °C-on 1 percig, majd 25 ciklus: 96°C-on 15 mp, 50°C-on 5 mp, és 60°C-on 4 perc. A kapott termékeket újra tisztítottuk sós-alkoholos kicsapással, amely a következő lépésekből állt: 10 µl terméket 40 µl nukleáz mentes vízzel hígítottunk, majd ezt 5 µl NaAc-t (3M) és 100 µl 4°C-os abszolút etanolt tartalmazó elegyhez adtuk. A 13.000 fpp-en 30 percig 4 °C-on való centrifugálást követően a felülúszót eltávolítottuk, majd 300 µl 70%-os etanollal mostuk és 13.000 fpp-en 10 percig 4°C-on centrifugáltuk. A pelletet 3 percig 50 °C-on hőblokkban szárítottuk. 20 µl HI-Di-ben (Hi-Di™ Formamide, Applied Biosystems, USA) vettük fel. A mintákat kapilláris automata szekvenátorban (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, USA) futtattuk.

3.9. "primer-walking" technika

A "primer-walking" technikát a long PCR- illetve hosszabb 5'/3' RACE termékek szekvenálása során alkalmaztuk. Lényege, hogy a PCR termékek direkt szekvenálása során kapott szekvencia végétől számított 100 bázis távolságra új oligonukleotid primereket tervezünk, és azokat újabb PCR reakció nélkül közvetlenül a szekvenálási reakcióban

használjuk fel. A módszerrel a hosszú PCR termékeken végig lépdélhetünk. A "primer-walking" technika során alkalmazott primerek listája terjedelmi és jelentéktelenségi okok miatt nem szerepel a dolgozatban.

3.10. "in silico" szekvencia analízis

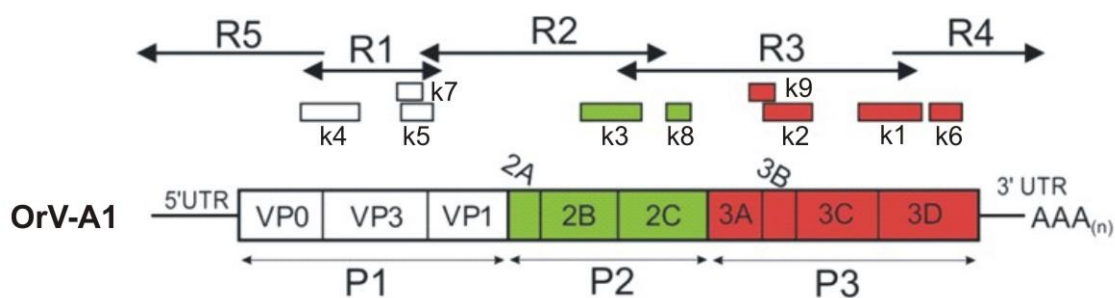
A vizsgálataink során felhasznált szekvenciákat a GenBank (NCBI, National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) adatbázisból gyűjtöttük ki. A szekvenálásból származó szekvenciákat a Chromas LITE (ver. 2.1.1) program segítségével ellenőriztük és javítottuk. A saját és referencia szekvenciák egymáshoz való illesztését a ClustalW (ver.2.1) szoftverrel végeztük, majd az illesztett szekvenciákat GeneDoc (<http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/>, Multiple Sequence Alignment Editor and Shading Utility v.2.7.000, 2006) programmal elemeztük (Thompson és mtsai., 1994; Nicholas és Nicholas, 1997). A hasítási helyek meghatározásánál NetPicoRNA (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPicoRNA/>, 1.0 Server) alkalmazást használtuk (Blom és mtsai., 1996). Az egyes konzervatív fehérje domének azonosításához az NCBI adatbázis CDD-keresés programját alkalmaztuk (Marchler-Bauer és mtsai., 2011). A 2B peptid másodlagos struktúrájának modellezéséhez a PSIPRED szoftvercsomag MEMSATSV transzmembrán helix modellező programot alkalmaztuk (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) (Jones, 1999). A különböző genomrégiók hasonlósági százalékának megállapításához a BioEdit Sequence Aligment Editor programot alkalmaztuk (Hall, 1999). Filogenetikai analízishez a MEGA6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, vers 6.06) szoftvert használtuk (Tamura és mtsai., 2013). A pontos módszer és beállítás minden filogenetikai fánál külön feltüntetésre került. A nem kódoló régiók másodlagos struktúráját az Mfold program segítségével (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form>) elemeztük (Zucker, 2003). Az ábrák szerkesztésénél a VARNA (ver. 3-91) szoftvert alkalmaztuk. Az utómunkálatoknál, amelyek a filogenetikai ágrajzokon a nemzetségek jelölését és egyéb kiemeléseket jelent, Corel DRAW X6 szoftvert alkalmaztunk. A genotípusok összehasonlításából származó szekvencia-távolság diagramot ("Distance-plot") az RDP szoftver 4.16 verziójával (Martin és mtsai., 2010) készítettük el.

4. Eredmények és megbeszélésük

A Pf-CHK-1 mintából, virális metagenomikai módszerrel kapott 57 darab, átlagosan 200 nukleotid hosszúságú leolvasási szekvenciák ("read"-ek) összesen kilenc különböző kontigot alkottak, amelyek legközelebbi rokon szekvenciái a kacsá hepatitis A vírus (Duck hepatitis A virus 1-3= DHAV1-3, *Avihepatovirus* nemzetség) és rokon vírusai (4. táblázat). Mivel a vizsgált vírusunk rokonsági körébe tartozik több, nemrég azonosított házityúk picornavírus (Lau és mtsai, 2014), ezért a mintánkból azonosított picornavírust a könnyebb elkülönítés miatt a továbbiakban, mint Orvírus A1 (OrV-A1) fogjuk hivatkozni. A név utal a minta gyűjtési helyére (Orosháza, Békés megye). Az egyes kontigokat alkotó leolvasások alacsony száma miatt a kapott szekvenciákat csak az oligonukleotid primerek tervezésére használtuk. Az OrV-A1 különböző genom-régiójából származó kontigokra kontig-specifikus átfedő primer-párokat terveztünk annak érdekében, hogy különböző PCR módszerekkel felszorzozzuk a kontigok közti ismeretlen genomszakaszokat, és hogy leellenőrizzük a kontigok bázissorrendjét (6. ábra). Az OrV-A1 genomjának 5' és 3' végét 5' / 3' RACE PCR módszerrel sokszoroztuk fel. A kapott PCR termékek nukleotid sorrendjét Sanger-féle direkt szekvenálási technika és ún. "primer-walking módszer" alkalmazásával határoztuk meg.

	kontig hossza	leolvasások száma	legközelebbi rokon szekvencia	aminosav egyezés (%)	kontig lokalizáció
kontig 1	391 nt	15	kacsá hepatitis A vírus 1 [AEP84766]	37	3C-3D
kontig 2	505 nt	10	kacsá hepatitis A vírus 1 [YP_007969883]	50	3B-3C
kontig 3	486 nt	8	Aalivirus A1 [YP_009026377]	44	2B-2C
kontig 4	469 nt	7	kacsá hepatitis A vírus 1 [ABB76604]	36	VP0-VP3
kontig 5	256 nt	5	kacsá hepatitis A vírus 1 [ABB76604]	33	VP3
kontig 6	258 nt	3	kacsá hepatitis A vírus 1 [ACF71558]	49	3D
kontig 7	204 nt	3	kacsá hepatitis A vírus 3 [ABB96725]	33	VP3
kontig 8	201 nt	3	Avisivirus A1 [AGH06056]	41	2C
kontig 9	201 nt	3	kacsá hepatitis A vírus 3 [AEK70365]	33	2C-3A

4. táblázat: A virális metagenomikai módszerrel kapott, az avihepatovírus filogenetikai klaszter tagjaival szekvencia rokonságot mutató kontigok tulajdonságai, BlastX kereséssel azonosított legközelebbi rokon szekvenciái és genom lokalizációi. A különböző szekvenciák GenBank azonosító számai kapcsos zárójelben találhatóak.



6. ábra: Az Orivírus A1 genom felépítése és fő genom-régiói (P1-3). R1-5: A kontigokra tervezett primerek felhasználásával végzett PCR reakciók. k1-9: A virális metagenomikai módszerrel kapott kontigok elhelyezkedése a genomon.

A Pf-CHK1 mintából azonosított OrV-A1 pozitív, egyszálú RNS genomja 7037 nukleotid hosszúságú (a poliA-farok nélkül). A genom szerkezete nagyfokú hasonlóságot mutatott a picornavírus genom általános felépítésével: 5' UTR-**P1**(VP0-VP3-VP1)-**P2**(2A-2B-2C)-**P3**(3A-3B-3C-3D)-3'UTR (6. ábra). Az OrV-A1 GC-tartalma 49,81%, ami szignifikánsan magasabb, mint a DHAV genotípusok GC-értékei (42.50-43.70) (Tseng és mtsai., 2007). Az OrV-A1 genomja egy 2124 nt (708 aminosav /as/) hosszúságú P1, egy 1596 nt (532 as) hosszúságú P2 és egy 2205 nt (734 as) hosszúságú P3 fő genom-régióra osztható, amelyek a legközelebbi aminosav szekvencia rokonságot a különböző DHAV és aalivírus szekvenciákkal mutatták (5. táblázat).

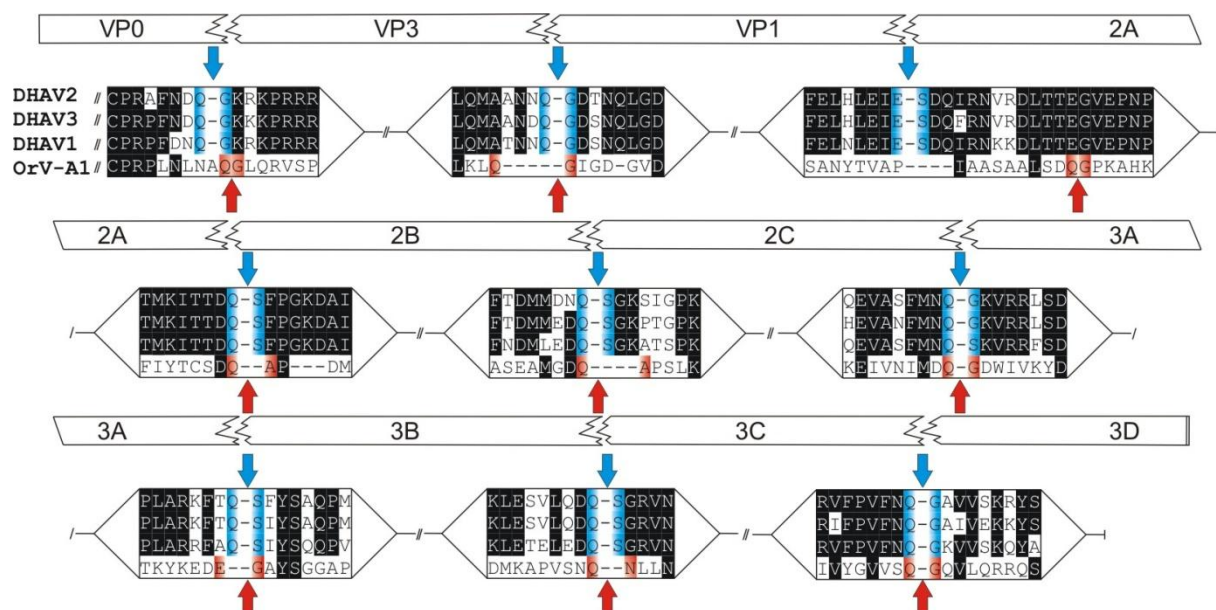
A jelenleg érvényben lévő besorolási szabályok értelmében az azonos nemzetségbe tartozó picornavírusok P1, P2 és P3 régiójának >40%, >40% és >50% aminosav egyezést kell mutatniuk. Az OrV-A1 a legközelebbi rokon szekvenciákkal csak 28,71%, 25,46% és 34,41% as egyezést mutat a P1, P2 és P3 régióban (5. táblázat). Mindezek alapján valószínű, hogy az Orivírus A1 egy új picornavírus nemzetség ("Orivirus") típusfajának ("Orivirus A") alapító tagja, melyet a mintavétel helye alapján (Orósháza) neveztünk el.

Nemzetség	Referencia típus neve	GenBank azonosító	P1	P2	P3
Nem besorolt	háziyúk picornavírus 2	KF979333	27,3	18,4	30,7
Nem besorolt	háziyúk picornavírus 3	KF979334	26,5	21,4	30,4
"Aalivirus"	Aalivirus A1	KJ000696	28,7	13,3	32,8
Aphthovirus	száj- és körömfájást okozó vírus	NC_004004	12,2	20,1	18,8
Aquamavirus	Aquamavirus A1	EU142040	22,5	21,7	20,9
Avihepatovirus	kacsa hepatitis A vírus 1	NC_008250	26,3	23,5	32,3
	kacsa hepatitis A vírus 2	EF067923	27,3	25,5	34,4
	kacsa hepatitis A vírus 3	DQ812093	28,2	24,0	31,5
Avisivirus	Avisivirus A1	KC465954	26,6	22,2	29,3
Cardiovirus	Encephalomyocarditis vírus 1	NC_001479	11,5	16,2	19,6
Cosavirus	Cosavirus A1	FJ438902	14,0	19,2	20,9
Dicipivirus	Cadicivirus A1	JN819202	15,7	17,4	18,0
Enterovirus	poliovírus 1	NC_002058	13,5	17,2	21,7
Erbovirus	Equine rhinitis B vírus 1	NC_003983	11,9	16,4	19,5
Gallivirus	Gallivirus A1	JQ691613	13,4	14,5	20,1
Hepatovirus	hepatitis A vírus 1	NC_001489	12,9	14,7	19,3
Hunnivirus	Hunnivirus A1	JQ941880	13,6	12,5	19,7
Kobuvirus	Aichi vírus 1	AB010145	13,4	17,8	18,7
Megrivirus	Melegrivirus A1	HM751199	13,2	15,7	17,2
Mischivirus	Mischivirus A1	JQ814851	12,7	18,4	17,5
Mosavirus	Mosavirus A 1	JF973687	14,6	19,0	19,2
Oscivirus	Oscivirus A 1	GU182408	12,4	17,1	19,9
Parechovirus	humán parechovírus 1	NC_001897	23,8	25,2	26,0
Pasivirus	Pasivirus A1	JQ316470	18,5	23,5	26,1
Passerivirus	Passerivirus A1	GU182406	11,3	17,7	18,2
Rosavirus	Rosavirus A1	JF973686	12,6	14,7	19,8
Salivirus	Salivirus A1	GQ179640	12,8	17,5	20,3
Sapelovirus	sertés sapelovírus 1	NC_003987	13,2	17,4	21,2
Senecavirus	Seneca Valley vírus 1	NC_011349	13,8	19,3	20,4
Teschovirus	sertés teschovírus 1	NC_003985	13,8	18,3	21,2
Tremovirus	madár encephalomyelitis vírus 1	NC_003990	12,6	18,5	17,4

5. táblázat: Az OrV-A1 valamint a picornavírus nemzetségek reprezentatív tagjainak a P1, P2, P3 fő genom-régiók páronként vizsgált %-os aminosav egyezési értékei. A legmagasabb aminosav egyezési értékeket fekete alapon fehér számok jelölik. Az avihepatovírus klaszter tagjai vastagon vannak szedve. A hivatalosan elfogadott picornavírus nemzetségek dőlt betűvel van szedve.

A három fő genom régió további funkcionális egységekre osztható, amelyeket jellegzetes aminosav motívumok, ún. proteolitikus hasítási helyek választanak el egymástól. Az OrV-A1 potenciális hasítási helyeinek meghatározásához a NetPicoRNA program eredményei mellett

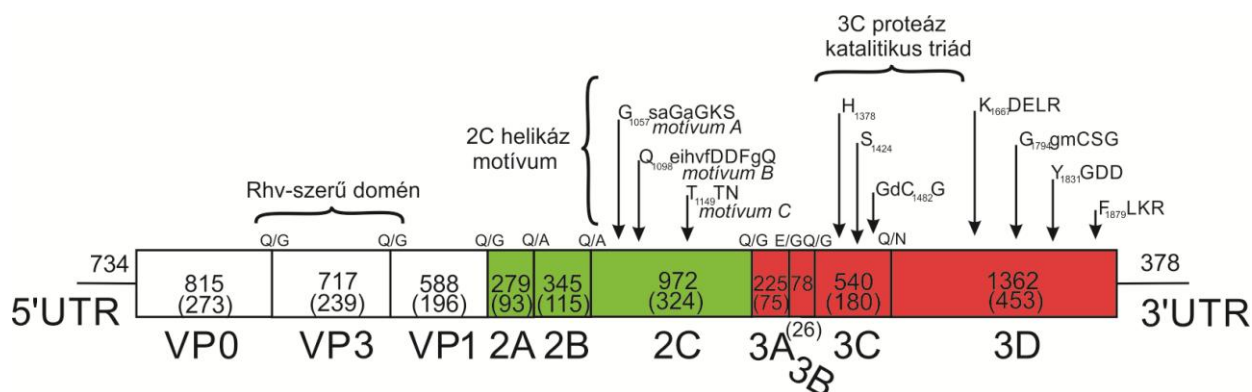
az ismert hasítási helyekkel rendelkező legközelebbi rokon DHAV szekvenciákat használtuk (7. ábra)



7. ábra: Az Orivírus A1 virális poliproteinjének illesztése a kacsza hepatitis A vírusokhoz (DHAV 1-3). Az ábrán csak a potenciális hasítási helyek körüli régiók láthatóak. A sötét háttérű betűk $\geq 75\%$ -os aminosav egyezést mutatnak a négy szekvenciára vonatkozóan. Használt szekvenciák GenBank azonosító számai a következők voltak: DHAV1: DQ249299; DHAV2: EF067924 és DHAV3: DQ256132, ahol a hasítási helyeket kék háttér és kék nyilak jelzik. Az Orivírus A1 potenciális hasítási helyeit piros háttér, és piros nyilak jelzik.

4.1. Az Orivírus A1 P1 régiójának jellemzése

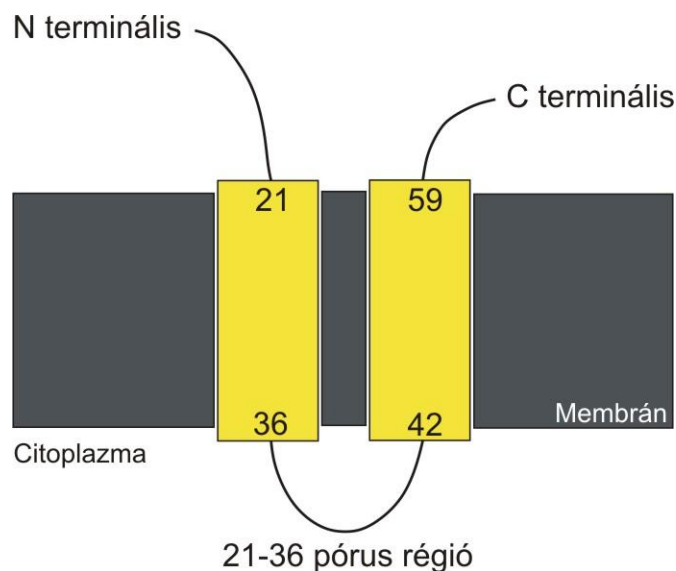
A hasítási helyek vizsgálata alapján az OrV-A1 P1 régió N-terminális része nem tartalmaz "Leader" fehérjét, nem rendelkezik VP4↓VP2 hasítási hellyel, illetve mirisztoilációs hely (GXXXS/T, ahol X bármilyen aminosav lehet) sem azonosítható. Mindezekből feltételezhetjük, hogy az OrV-A1 kapszidja három fehérje-monomerből (VP0, VP3 és VP1) épül fel (7., 8. ábra). Hasonló kapszid felépítés jellemzi a DHAV-okat és a rokon avisi-, és aalivírusokat (Tseng és mtsai, 2007; Boros és mtsai., 2014b).



8. ábra: Az Orivírus A1 genom térképe a potenciális proteolitikus hasítási helyekkel, az egyes régiók nukleotid (felső szám) és aminosav méreteivel (alsó szám, zárójelben), elnevezéseivel, az azonosítható konzervatív enzimatikus motívumokkal, doménekkkel. P1 régió: fehér háttér, P2 régió: zöld háttér, P3 régió: piros háttér. Rhv-szerű domén: konzervatív domén-kereső szoftver (CDD) által azonosított picornavírus kapszid-domének (Marchler-Bauer és mtsai., 2011).

4.2. Az Orivírus A1 P2 régiójának jellemzése

A vizsgált vírus P2 régiója csak három fehérjét (2A-2B-2C) kódol. A 93 as hosszú, jelenleg ismeretlen funkciójú 2A fehérjében nem volt azonosítható sem "riboszóma-ugró" motívum (DXEXNPGP), sem NTP-áz funkcióra utaló rész (GXXGXGKS), sem pedig Hbox/NC típusú 2A mintázat. Megjegyzendő, hogy a fent említett három 2A típus jelenléte az OrV-A1 legközelebbi rokon vírusainak (avihepato-, avisi-, és aalivírusok) karakterisztikus elkülönítő bélyege (Boros és mtsai., 2014b). Az OrV-A1 2A genom-régiójának mérete is jóval kisebb, mint a rokon vírusok azonos régiója (az aalivírusok 2A régiója 725 as hosszúságú, az Avisivírus A1-é 339 as) (Wang és mtsai., 2014; Boros és mtsai., 2013). Emellett az enterovírusoknál leírt proteáz-motívum (GXCG) sem azonosítható az OrV-A1 2A fehérjében (Palmenberg és mtsai., 2010). A 115 aminosav hosszúságú 2B fehérje másodlagos struktúrájának vizsgálata két transzmembrán hélix szerkezet jelenlétét mutatta ki az N-terminális részen (9. ábra), ami a 2B fehérjének - más picornavirális 2B fehérjékhez hasonlóan - membránpórus kialakításban betöltött szerepére utal (Palmenberg és mtsai., 2010). A régió által kódolt utolsó fehérje (2C), a rokon szekvenciákhoz hasonlóan, illetve a beazonosítható konzervatív aminosav-motívumok (8. ábra) alapján valószínűleg III-as típusú helikáz funkcióval rendelkezik (Hales és mtsai., 2007).



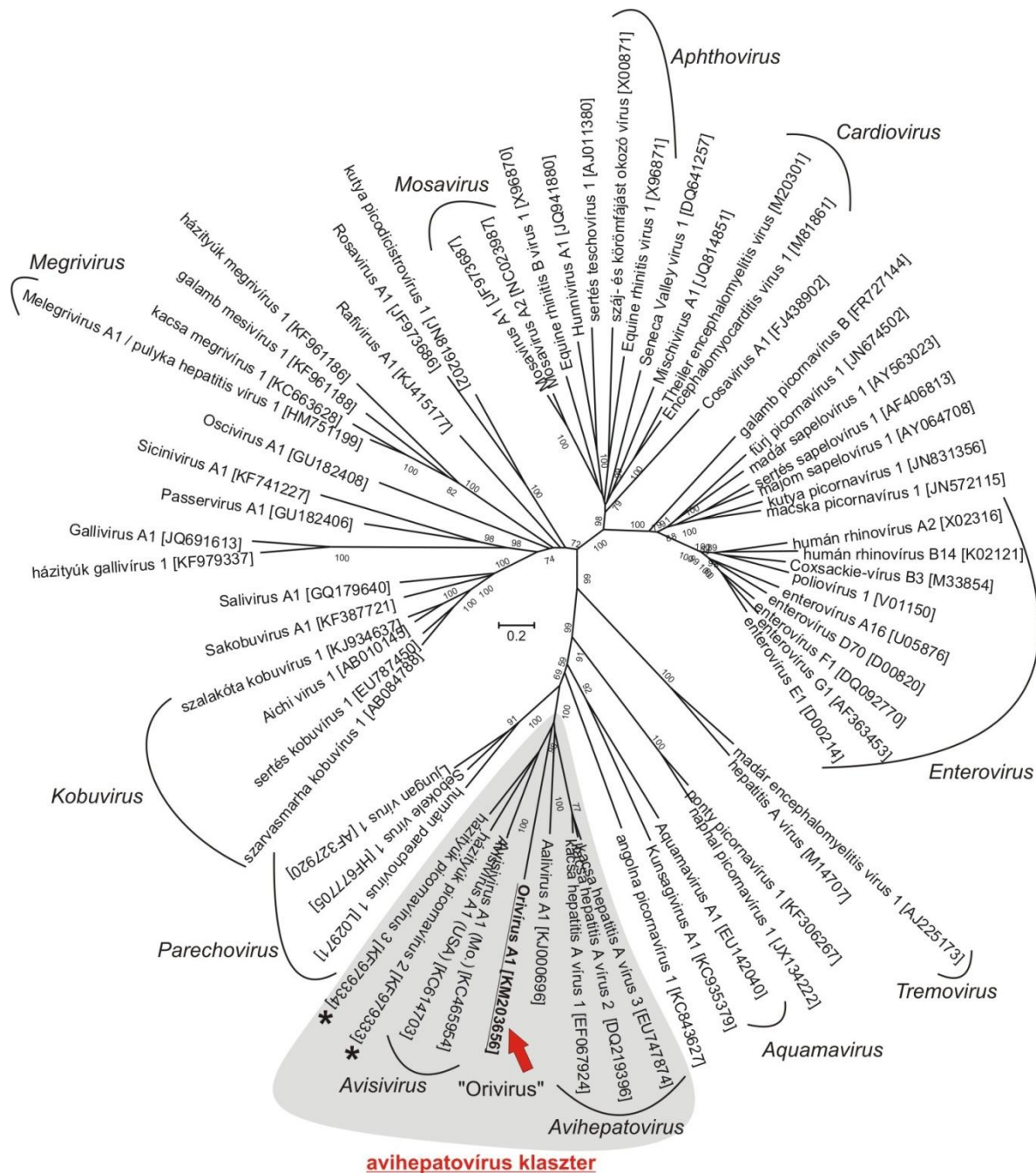
9. ábra: Az Orivírus A1 2B fehérje transzmembrán héliceit tartalmazó N-terminális részének modellje. Sárga oszlopok: potenciális transzmembrán régiók. Számok: aminosav pozíciók az N-terminális oldalról számozva.

4.3. Az Orivírus A1 P3 régiójának jellemzése

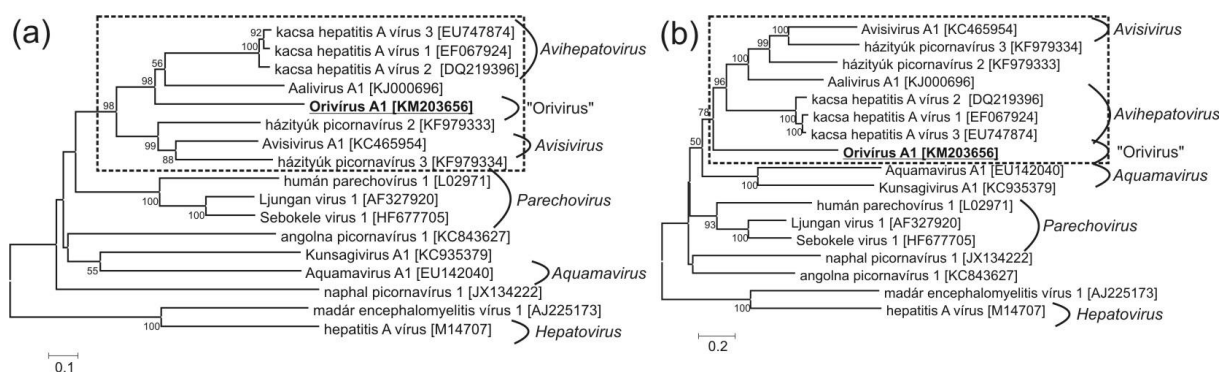
A harmadik genom régió négy virális fehérje kódolásáért felelős (3A-3B-3C-3D) közöttük egy 3B^{VPg} peptidért, amelyben a harmadik pozícióban lévő konzervatív tirozin is beazonosítható. Ezt követi a 3C fehérje, mely a proteáz katalitikus triád aminosav-motívumai (8. ábra) alapján picornavírusokra jellemző proteáz funkcióval rendelkezik. A genom utolsó fehérjéje a 3D peptid, amely az RNS függő RNS polimeráz enzimekre jellemző konzervatív aminosav-motívumok jelenléte alapján RNS polimeráz funkciót láthat el (Hales és mtsai., 2007).

4.4. Filogenetikai elemzések

Az OrV-A1 a vizsgált három genom régióból (P1, 2C és 3D) készült filogenetikai fán az avihepato- (DHAV-ok), avisi- (Avisivírus A1 és házityúk picornavírus 2, 3), és az aalivírusokkal mutatott legközelebbi rokonságot (10., 11. ábra). A filogenetikai és genom összehasonlító vizsgálatok eredményeként kijelenthető, hogy az OrV-A1 az avihepatovírus monofiletikus filogenetikai klaszter új tagja.



10. ábra: Az Orivirus A1 (piros nyíl) és a Picornaviridae család reprezentatív tagjainak filogenetikai helyzete a P1 kapszid fehérjék illesztéséből készült filogenetikai fán. A fa 1000-szeres ismétlési értékkel (bootstrap) Neighbor-joining módszerrel és Jones-Taylor-Thornton szubsztitúciós modellel készült. Az elágazási pontokon lévő számok a bootstrap (BS) értékeket jelölik. Csak a BS>50 értékek kerültek feltüntetésre. A különböző szekvenciák GenBank azonosító számai kapcsos zárójelben találhatóak. A szürke kiemelés az avihepatovírus filogenetikai klaszter tagjait jelöli. A dőlt betűvel szedett nemzetségneveket a tájékozódást segítő tüntettük fel. *: A nemrég azonosított avisivírus-rokon házityúk picornavírusok (Lau és mtsai., 2014).



11. ábra: Az Orivirus A1 (aláhúzza és vastagon szedve) és a filogenetikai szempontból legközelebbi rokon picornavírusok filogenetikai helyzete a 2C (a) és 3D (b) fehérjék illesztéséből készült filogenetikai fák. Az avihepatovírus filogenetikai klaszter tagjait szaggatott vonal határolja. Az ágrajzok a P1 törzsfával (10. ábra) megegyező beállításokkal készültek.

A filogenetikai vizsgálatok segítségével megállapított legközelebbi rokon vírusok genom régióit is összehasonlítottuk az OrV-A1 megfelelő részeivel (6. táblázat). Az egyes genom-szakaszok az avihepatovírus klaszter különböző tagjaival mutattak közelebbi szekvencia rokonságot. Az adatok az OrV-A1 és a klaszter többi tagjának viszonylag távoli rokonságára utalnak.

Vírus neve	Nemzetség	GenBank azonosító	aminosav egyezés (%)									
			VP0	VP3	VP1	2A	2B	2C	3A	3B	3C	3D
kacsa hepatitis A vírus 1	Avihepatovirus	DQ249299	32,7	27,9	19,8		22,7	39,2	12,6	14,7	31,3	39,3
kacsa hepatitis A vírus 2	Avihepatovirus	EF067924	29,8	30,8	22,8		22,7	39,5	13,8	14,7	31,9	40,8
kacsa hepatitis A vírus 3	Avihepatovirus	DQ256132	31,3	30,8	24,0		23,5	40,1	12,8	14,7	29,7	39,7
Avisivirus A1	Avisivirus	KC465954	27,8	28,2	24,4		19,0	38,2	25,6	19,2	27,6	31,3
Aalivirus A1	"Aalivirus"	KJ000696	31,3	29,2	29,2		12,7	39,2	24,4	19,2	29,1	37,3
háziyúk picornavírus 2	Nem besorolt	KF979333	30,5	25,5	28,9		17,2	36,7	19,7	26,9	24,0	37,0
háziyúk picornavírus 3	Nem besorolt	KF979334	30,7	27,8	23,9		20,0	35,2	20,5	23,1	23,2	35,6

6. táblázat: A genom régiók aminosav egyezési értékeit a táblázatban százalékosan tüntettük fel. A legmagasabb aminosav egyezési értékeket fekete alapon fehér számok jelölik. Az OrV-A1 2A fehérjéje nem vett részt az összehasonlító vizsgálatokban, mivel az összehasonlítandó vírusok mindegyike több, az OrV-A1 2A fehérje funkciójától eltérő fehérjét kódol.

A szekvencia hasonlósági és filogenetikai vizsgálatok az OrV-A1 és az avihepatovírus klaszter tagjainak monofiletikus eredetére utal. Azonban az OrV-A1 2A fehérjének méretbeli és funkcióbeli eltérése az avihepatovírus klaszter többi tagjától az OrV-A1 evolúciós fejlődése során bekövetkező, a 2A genom-régiót érintő komplex rekombinációs eseményre utal. Hipotézisünk szerint az avihepatovírus klaszter őseinek evolúciós fejlődése

során egy 2A genom-régiót érintő "gén" vesztésből és nyerésből álló komplex rekombinációs folyamat játszódhatott le, amely során szétválhattak a több 2A fehérjét kódoló multicisztronos (avisi-, avihepato-, aalivírusok), illetve az egy 2A tartalmú, monocisztronos (orivírus) leszármazási vonalak. A 2A régiót érintő rekombináció a picornavírusok körében nem egyedülálló, hasonló folyamatokra utaló jeleket azonosítottak a madár megrivírusok, illetve a humán parechovírusok evolúciós fejlődése során is (Johansson és mtsai., 2002; Boros és mtsai., 2014a; Lau és mtsai., 2014). A tényleges rekombinációt az szülői szekvenciák hiánya miatt a rendelkezésünkre álló kísérletes, illetve szekvencia-elemző módszerekkel nem lehet egyértelműen bizonyítani.

4.5. Az Orivírus A1 nem kódoló régióinak elemzése

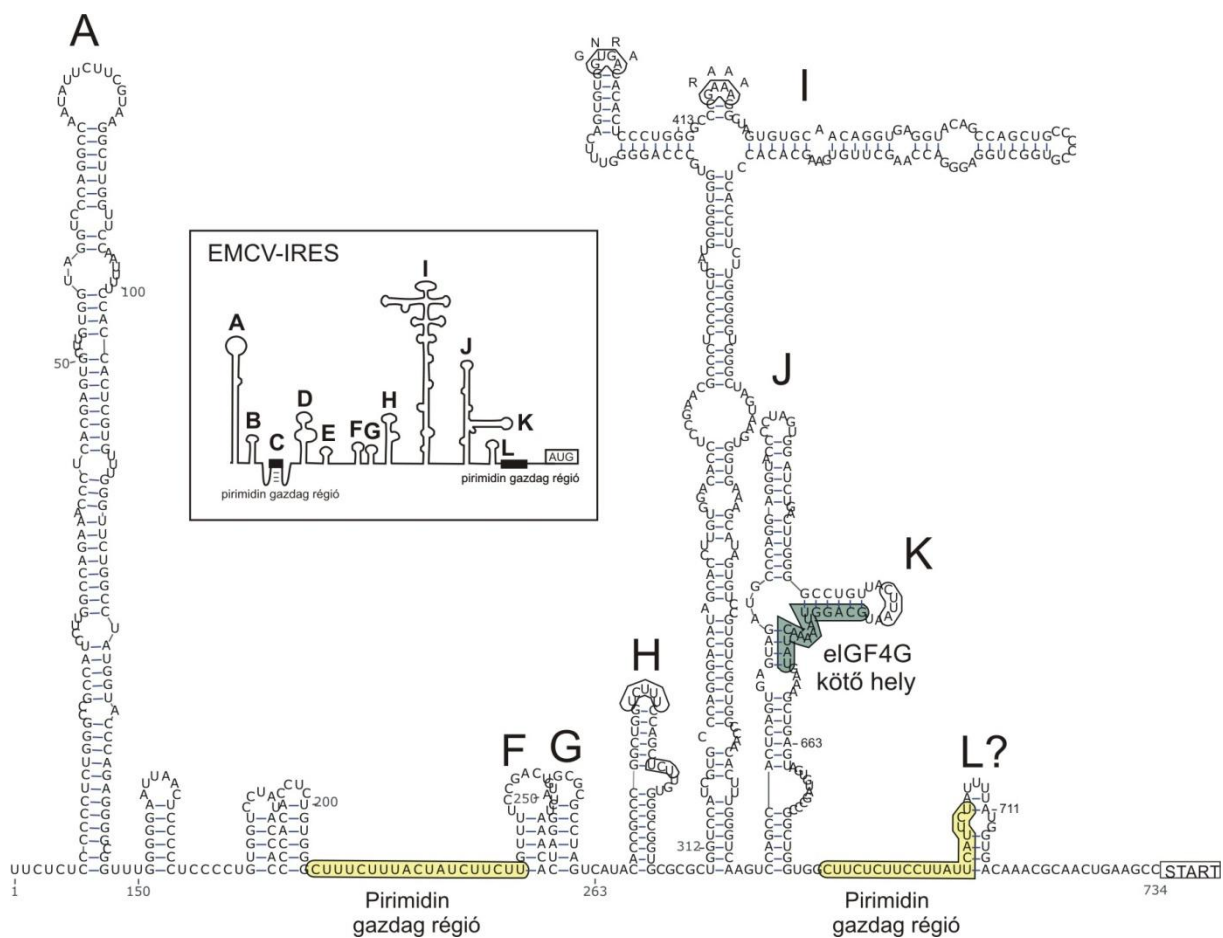
4.5.1. 5' UTR jellemzése

Az OrV-A1 5' nem kódoló régiója (UTR) 734 nukleotid hosszúságú és egy Kozak-kontextusban lévő (GXXGCCA₇₃₅UGG, nagy betűk: konzervatív nukleotidok, start kodon aláhúzva) AUG start kodonnal végződik. BlastN program segítségével 86%-os egyezést találtunk az OrV-A1 (377-től 434-ig) és a Avisivírus A1 [KC614703] (276-től 333-ig) 5' UTR régiói között. A szekvencia-hasonlóságot mutató régió az avisivírus II-es IRES konzervatív doménjének (I-es domén / J domén) felel meg (Boros és mtsai., 2013). Az MFold program szabadenergia-minimumon alapuló másodlagos RNS struktúra számításai alapján készült OrV-A1 5' UTR modellt a 12. ábra mutatja be. A modellen beazonosítható volt az avisivírus IRES konzervatív I-es doménje (J domén), a II-es típusú IRES karakterisztikus struktúrái (H-L domének), illetve transzkripció faktor kötőhelyei (Belsham és Jackson, 2000). Mindezekből feltételezhetjük, hogy az OrV-A1 az avisivírusokhoz hasonlóan II-es típusú IRES-el rendelkezik (12. ábra).

4.5.2. 3' UTR jellemzése

Az orivírus 3' UTR 378 nukleotid hosszúságú. A szekvencia vizsgálatok három, 53-55 nt hosszúságú, egymást követő ismétlődő motívum jelenlétét mutatták ki. Az ismétlődő motívumok nagyfokú hasonlóságot mutattak a filogenetikailag távoli házityúk és pulyka megrivírusok 3' UTR régiójában talált, szintén ismétlődő "A egységeivel" (Boros és mtsai., 2014a) (3., 13., 14. ábra). Az "A egységek" jelenlétét az avihepatovírus klaszter egyik tagjában sem írták még le eddig. Az OrV-A1 "A egységei" után, a megrivírus 3' UTR-hez hasonlóan egy közel 100 nt hosszú AUG-gazdag régió következik (citozin tartalma ≈7%). Az

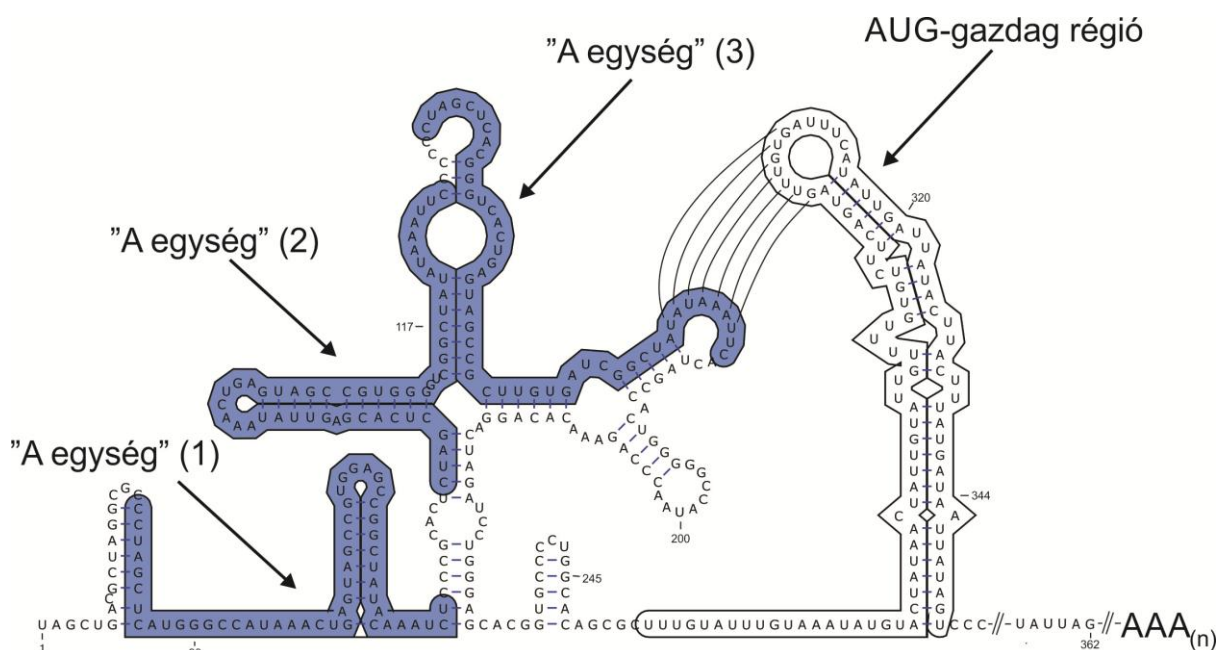
”A egységek” és az AUG- gazdag régió egy komplex másodlagos RNS struktúra részei, amelyben az AUG-gazdag régió egy hurkot alkot és amelynek apikális része álcsonót képez a harmadik ”A egységgel” (14. ábra). Az így kialakult komplex struktúrának valószínűleg szerkezet stabilizáló funkciója lehet. Az OrV-A1 és a megrivírusok 3’ UTR régióinak hasonlósága, az ”A egységek” jelenléte a filogenetikailag távoli picornavírusok közti szekvencia-kicserélődés, illetve rekombináció lehetőségére utal. Továbbá az ”A egységeknek” az s2m (stem-loop 2-szerű motívum) szekvenciához hasonló mobilis genetikai elem funkciója sem zárható ki (Tengs és mtsai., 2013).



12. ábra: Az Orivírus A1 teljes 5’ UTR másodlagos RNS modellje. A modell MFold program szabadenergia-minimumon alapuló számításai alapján, VARNA és Corel Draw vizualizációs programokkal készült. Keretes rész: az encephalomyocarditis vírus teljes 5’ UTR-jének és II-es IRES doménjeinek (H-L) másodlagos RNS struktúra-vonalrajza (Stewart és Semler, 1997). Fekete vonallal határolt szekvencia-motívumok: polipirimidin régió-kötő protein (PTB) (Belsham és Jackson, 2000). A, F-L: az EMCV 5’ UTR azonos módon elnevezett doménjeinek megfeleltethető részek.

megrivírusok	ChMV-1	"A egység" (1)	CTAGCTCAGGAG--TGTA	AACTGAGTAGCCG-TT	GGA-ATCGGCTATATAAAATTA
		THV-1	"A egység" (1)	CTAGCTCAGGAG--TTG	AACTGAGTAGCCG-TC
	"A egység" (2)		CTAGCTCAGGAGGATTTAA	ACTGAGTAGCCG-TT	GGA-ATCGGCTATATAAAATTA
	MeV-1	"A egység" (1)	CTAGCTCAGG--GTTTAA	AACTGAGTAGCCG-T	GTTATCGGCTATATAAAATTA
		"A egység" (2)	CTAGCTCAGGACGTCATA	AACTGAGTAGCCG-TT	GGA-ATCGGCTATATAAAATTA
	orivírus A1	"A egység" (1)	CTAGCTCATG-GGCCATA	AACTGAGTAGCCG--	TGGA-GCCGGCTATACAAATCT
"A egység" (2)		CTAGCTCACGA-GTTATA	AACTGAGTAGCCG-T	GGG--GTCGGCTATATAAAATTC	
"A egység" (3)		CTAGCTCAGG-GGTC---	ACTGAGTAGCCGCTTG	-TGATCGGCTATATAAAATTC	
			***** *	***** *** *	*** *****

13. ábra: A megrivírusok és az OrV-A1 "A egységek" nukleotid szekvenciáinak illesztése. *: azonos nukleotidok. Sötét háttérű fehér betűk: konzervatív (>87% egyezés) nukleotidok. Zárójeles számok: ismétlődések száma. ChMV-1: házityúk megrivírus 1; THV-1: Melegrivírus A1 / pulyka hepatitis vírus 1; MeV-1: galamb mesivírus 1.



14. ábra: Az Orivírus A1 3'UTR másodlagos RNS struktúrája. A modell MFold program szabadenergia-minimumon alapuló számításai alapján, VARNA és Corel Draw vizualizációs programokkal készült. A harmadik "A egység" (3) és az AUG-gazdag régió között álsomókapcsolat (fekete ívelt vonalak) lehetséges.

4.6. Az Orivírus A1 kimutatása további házityúk kloákamintáiból

Az Orivírus A1 legkonzervatívabb genom régiójára tervezett 3D^{RdRp} szűrő primerpár és standard RT-PCR alkalmazásával a rendelkezésünkre álló további 12 házityúk minta közül 6-ból kimutatható volt a vírus. A vírus jelen volt mindhárom vizsgált baromfityényszerben. A pozitív minták nagy része 24 naposnál fiatalabb szárnyasokból származott, és egyik pozitív állat sem mutatott látható tüneteket a mintavételkor (7. táblázat). Az Orivírus A1 jelenléte

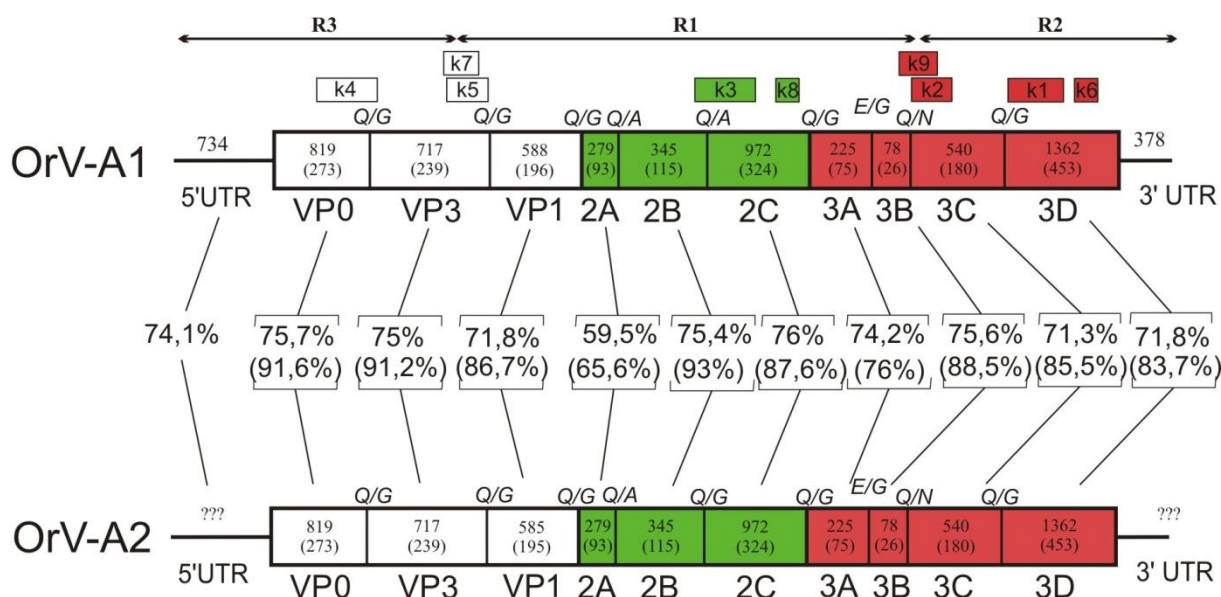
tünetmentes állatokban azonban nem zárja ki a vírus kórokozó képességét. Több olyan picornavírus is ismert, például a járványos gyermekbénulásért felelős humán poliovírus, vagy a pulykák akut hepatitis szindrómájáért felelősnek tartott pulyka hepatitis vírus 1, amelyek képesek nagyszámú tünetmentes fertőzés mellett súlyos tüneteket okozó infekciókra is (Melnick, 1996; Honkavuori és mtsai., 2011; Boros és mtsai., 2014b). Az Orivírus A1 kórokozó szerepét illetően további, kiterjedtebb vizsgálatokra van szükség.

Minta jele	Gyűjtési hely	Gyűjtési idő	Tünetek	Kor	OrV-A1
PC1	Délkelet Mo.	2013 április	tünetmentes	felnőtt	Neg.
PC2	Délkelet Mo.	2013 április	tünetmentes	felnőtt	Neg.
PC3	Délkelet Mo.	2013 április	tünetmentes	felnőtt	Neg.
PC4	Délkelet Mo.	2013 április	tünetmentes	felnőtt	Neg.
PC5	Délkelet Mo.	2013 április	tünetmentes	felnőtt	Poz.
CHK-I	Délnyugat Mo.	2013 április	tünetmentes	24 napos	Poz.
CHK-II	Délnyugat Mo.	2013 április	tünetmentes	felnőtt	Neg.
CHK-III	Délnyugat Mo.	2013 április	tünetmentes	6 napos	Poz.
CHK-IV	Délnyugat Mo.	2013 április	tünetmentes	8 napos	Poz.
CHK-V	Délnyugat Mo.	2013 április	tünetmentes	16 napos	Poz.
CHK-VI	Délnyugat Mo.	2013 április	tünetmentes	30 napos	Poz.
Pf-CHK-1	Délkelet Mo.	2013 április	"hasmenés"	24 napos	Poz.
Pf-CHK-2	Délkelet Mo.	2013 április	tünetmentes	24 napos	Neg.

7. táblázat: Az Orivírus A1 RT-PCR szűrésében felhasznált házityúk (*Gallus gallus domesticus*) kloáka mintái. A minták három különböző (PC-jelzésű, CHK-jelzésű és Pf-CHK-jelzésű) baromfityényszetből származtak. Az OrV-A1 RT-PCR pozitív mintákat fekete háttér jelzi.

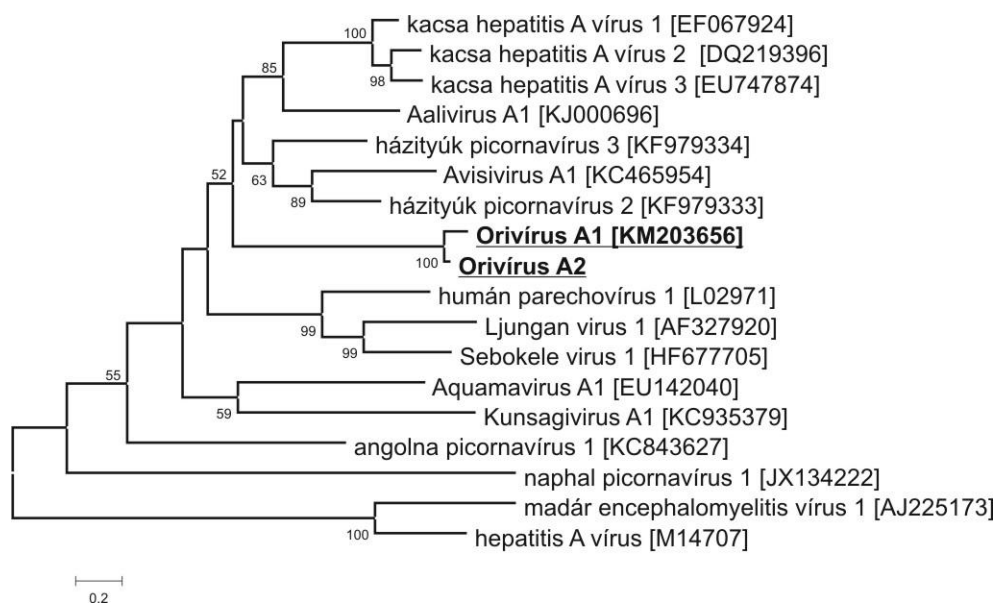
4.7. Új orivírus genotípus (OrV-A2) meghatározása és szekvencia-vizsgálata

A virális metagenomikai módszerrel kapott szekvenciák illesztése két olyan kontig (kontig 7 és 9) jelenlétét mutatta ki, amelyek jelentős nukleotid szekvencia eltérést (25% illetve 22%) mutattak az OrV-A1-től. A kontigokra tervezett primerek, és különböző PCR technikák (3'/5' RACE, long PCR) alkalmazásával a Pf-CHK-1-es mintából sikerült egy további orivírus IRES és teljes kódoló régióját meghatározni (15. ábra).



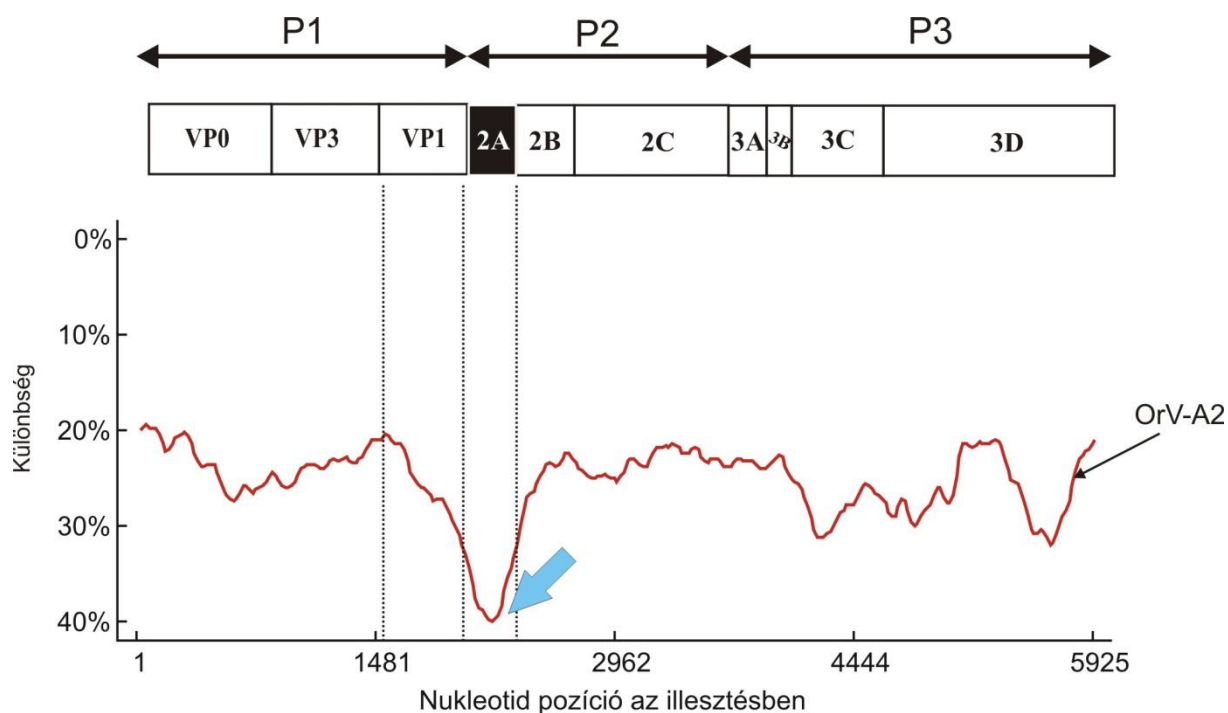
15. ábra: Az Orivírus A1 és A2 genom összehasonlító ábrája a potenciális proteolitikus hasítási helyekkel és az egyes genom-régiók nukleotid (felső szám) és aminosav (alsó szám, zárójelben) %-os hasonlósági értékei. P1 régió: fehér háttér, P2 régió: zöld háttér, P3 régió: piros háttér. R1-3: A kontigokra tervezett primerek felhasználásával végzett PCR reakciók. k1-9: A virális metagenomikai módszerrel kapott kontigok elhelyezkedése a genomon. A k7 és k9 kontig az OrV-A2 genotípushoz tartozik.

A rendelkezésünkre álló 6533 nukleotidos részleges orivírus szekvencia 73%-os nukleotid és 86%-os aminosav egyezést mutatott az OrV-A1-hez, ami arra enged következtetni, hogy a második orivírus szekvencia az "orivírus A" faj új genotípusa (OrV-A2). A két szekvencia közeli rokonsága a VP1 immundomináns régió aminosav illesztéséből készült törzsfán is jól látható (16. ábra).



16. ábra: Az orivirus genotípusok (A1 és A2, vastagon szedve, aláhúzva) és a közeli rokon picornavírus szekvenciák immundomináns VP1 genom régiójának aminosav szekvencia illesztéséből készült törzsfá. A fa 1000-szeres ismétlési értékkel (bootstrap) Neighbor-Joining módszerrel és Jones-Taylor-Thornton szubsztitúciós modellel készült. Az elágazási pontokon lévő számok a bootstrap (BS) értékeket jelölik. Csak a BS>50 értékek kerültek feltüntetésre. A különböző szekvenciák GenBank azonosító számai kapcsos zárójelben találhatóak.

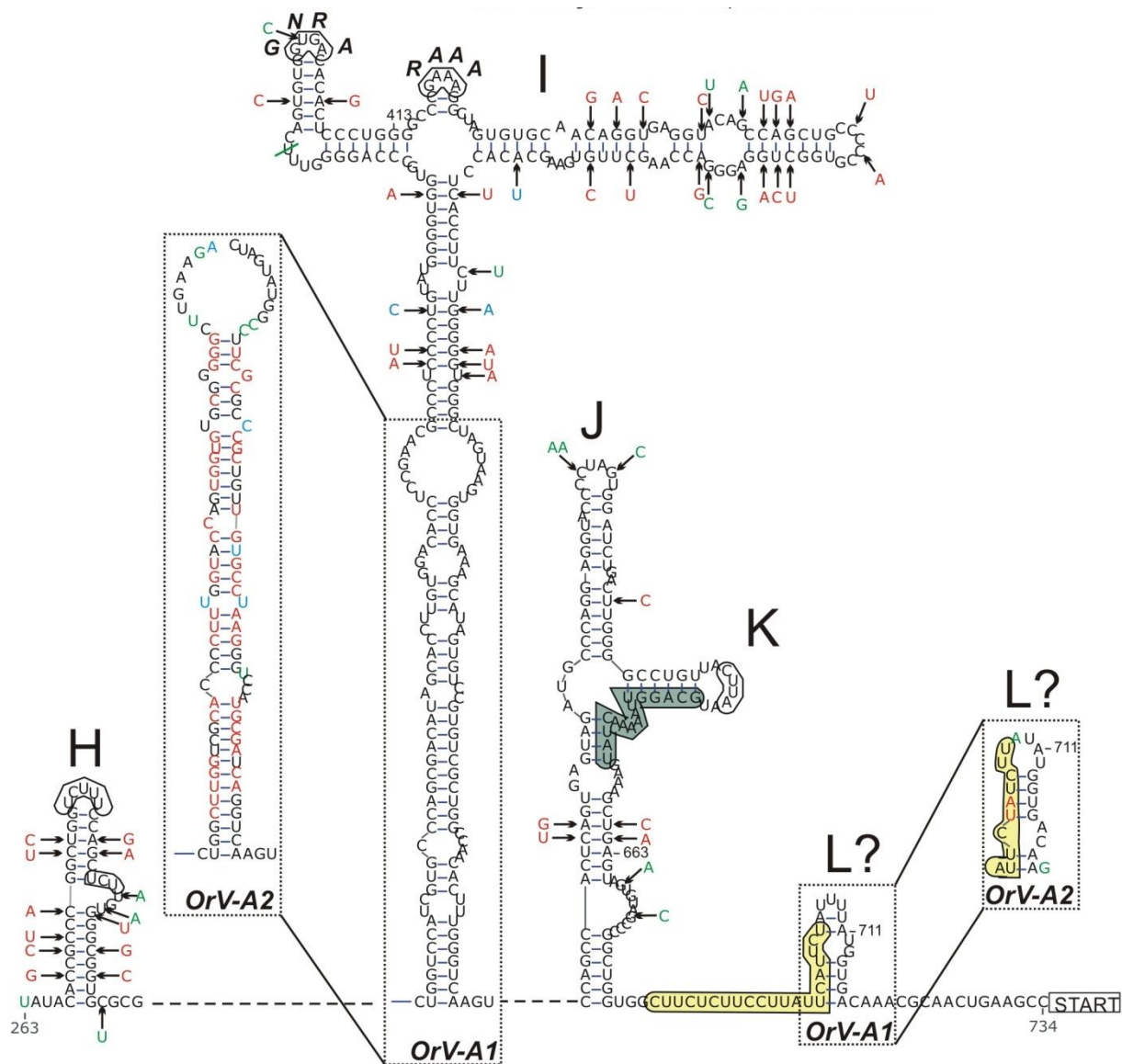
A virális poliproteinek illesztése az OrV-A1-el azonos genom-felépítést (3-3-4) és azonos lehetséges hasítási helyeket mutatott, a 2B↓2C hasítási helyet kivéve, ahol az OrV-A2 esetében Q↓A helyett Q↓G található (15. ábra). A két genotípus kódoló szekvencia-szakaszának összehasonlítása azt mutatta, hogy az orivirus genom legváltozékonyabb régiója nem az immundomináns VP1 (28,2% nt és 13% as különbség) kapszid fehérjerész, hanem a 2A fehérje (40,5% nt és 34,4% as különbség) (15., 17. ábra). Mindez a nem-strukturális fehérjét kódoló 2A genom régióhoz mért gyorsabb evolúciós változékonyságára enged következtetni. A 2A genom-régió genotípusok közti ilyen mértékű különbségére ismereteink szerint eddig még nem volt példa. A 2A régió változékonyságának oka jelenleg még ismeretlen.



17. ábra: Az Orivírus A1 és A2 genotípusok kódoló régiójának távolság-diagramja ("Distance-plot"). Az analízis a teljes kódoló régiók nukleotid illesztéséből készült RDP szoftver 4.16 verziójával. Ablak méret: 300 nt, lépés méret: 20 nt. A szaggatott vonalak a VP1 és a 2A genom-régiók határát jelzik. A két genotípus közötti legnagyobb szekvencia-különbség a 2A genom régióban látható (kék nyíl).

Az Orivírus A2 rendelkezésünkre álló 564 nt hosszúságú 5' UTR szakasza 74,1%-os nt egyezést mutatott az OrV-A1 azonos genom-szakaszával (166-734 nt közötti régiója). Az OrV-A2 5' UTR régiójának másodlagos RNS-struktúra vizsgálata az OrV-A1 II-es típusú IRES-éhez nagyon hasonló struktúrát mutatott (12., 18. ábra). A két genotípus 5' UTR-jei közti különbségek jelentős többsége ($\approx 97\%$ -a) a másodlagos RNS struktúra szempontjából lényegtelen, főleg kovariáns nukleotid különbségek voltak (18. ábra). Mindez az OrV-A1 II-es típusú IRES modelljének helytállóságára utal. Az IRES régióban azonosítható nagyszámú kovariáns nukleotid cserék jelenléte újabb bizonyíték az elsődleges szekvencia felett álló strukturális-szintű konzervációra (Belsham és Jackson, 2000).

Az Orivírus A1 kimutatására használt 3D szűrő primerpár a szekvencia-vizsgálatok alapján nem alkalmas az OrV-A2 kimutatására, így az A2 genotípusról epidemiológiai adatok jelenleg még nem állnak rendelkezésünkre.



18. ábra: Az Orivirus A1 és A2 IRES legkonzervatívabb régió (H-L) szekvenciájának és másodlagos RNS struktúrájának összehasonlítása. Az ábrán a fekete betűk a mindkét genotípus szekvenciájában megtalálható konzervatív nukleotidokat jelölik. Piros betűk: Az IRES struktúrát fenntartó, főleg kovariáns nukleotid változások, zöld betűk: A másodlagos struktúra szempontjából lényegtelen nukleotidok ("csendes" mutációk), kék betűk: a másodlagos struktúrát befolyásoló nukleotid változások. A pontozott keretes struktúrák az adott szakaszok összehasonlítását segítő kerütek külön-külön ábrázolásra. A domének elnevezése (H-L), a fehér, zöld, illetve sárga háttérű keretezések megegyeznek az OrV-A1 IRES ábrájával (12. ábra).

5. Eredményeink összefoglalása

Virális metagenomikai és RT-PCR módszerek felhasználásával egy hasmenéses házityúk kloákamintájából meghatároztuk egy új madár picornavírus teljes genomját, amelyet a mintavétel helyéről (Orosháza) Orivírus A1-nek nevezünk el. A szekvencia-hasonlósági és filogenetikai vizsgálatok alapján az OrV-A1 egy új picornavírus nemzetség ("Orivírus") alapító tagja lehet. Az orivírus 5' UTR-je II-es típusú IRES-t, és a 3' UTR régióban többszörösen ismétlődő, megrivírus-szerű szekvencia-motívumokat ("A egységeket") tartalmaz. A virális poliprotein P1, P2 és P3 régiója 3, 3, és 4 peptidből áll, azaz csak 3 kapszid fehérjét és egy darab, ismeretlen funkciójú 2A peptidet kódol. Az OrV-A1 a filogenetikai vizsgálatok alapján az avihepatovírus monofiletikus klaszter tagja, azonban a klaszter többi tagjától eltérő 2A és a 3' UTR felépítés az orivírus evolúciós fejlődése során bekövetkező genom-régió cserékre, többszörös rekombinációs eseményekre utal, és egyben újabb bizonyítékot szolgáltat a picornavírus genom mozaik-szerű felépítésére. Az OrV-A1 kimutatható volt tünetmentes állatok kloákamintáiból is, ezért esetleges patogén szerepe még tisztázásra vár.

Az Orivírus A1-hez nem illeszkedő kontigokra tervezett oligonukleotid primerek és különböző PCR-technikák alkalmazásával sikerült egy vélhetően új genotípusba tartozó orivírus (Orivírus A2) szinte teljes genomját is meghatároznunk. Mindkét genotípusnak azonos típusú IRES-e, és genom felépítése volt. Az egyes genom régiók szekvencia-szintű összehasonlítása érdekes módon a legkülönbözőbbnek a 2A régiót mutatta. Mindez a nem-strukturális fehérjét kódoló 2A genom régióhoz mért gyorsabb evolúciós változékonyságára enged következtetni, amire eddigi ismereteink szerint hasonló példát még nem találtak. A 2A fehérje "hipervariabilitása" a 2A genom régió evolúciós forrópont szerepére utal.

Az orivírus genotípusok szekvencia vizsgálatából származó eredmények hozzájárulhatnak a picornavírusokra valójában jellemző változékonysági potenciál (genom régió cserék, mutációs változásokra permisszív genom régiók) feltárásához.