

XXXII. OTDK Biológiai Szekció

Új picornavírus genetikai jellemzése *Miniopterus schreibersii* denevérfajban

Dallos Bianka Adél, II. éves Biológus MSc hallgató

Pécsi Tudományegyetem,
Természettudományi Kar
Biológiai Intézet
Szentágothai János Kutatóközpont
Virologiai Kutatócsoport

Témavezető:

Dr. Jakab Ferenc

egyetemi docens

2015

Pécs

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	3
1.1 A denevérek és zoonótikus szerepük	3
1.2 A hosszúszárnyú denevér és az általa hordozott vírusok	5
1.3 A picornavírusok	6
2. CÉLKITŰZÉSEK	8
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	9
3.1 Terepi mintavételezés	9
3.2 Laboratóriumi kimutatás és analízisek	10
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	12
4.1 Laboratóriumi eredmények	12
4.2 Genomikai és filogenetikai elemzések eredményei	13
5. ÖSSZEFOGLALÁS	19
6. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS	20
7. IRODALOMJEGYZÉK.....	21

1. Bevezetés

1.1. A denevérek és zoonotikus szerepük

Zoonózisnak hívunk minden olyan betegséget, melyek gerinces állatról terjednek át emberre természetes úton. Ide értjük mind a vírusos, mind pedig az egyéb, például bakteriális vagy gombás eredetű megbetegedéseket is (WHO). A denevérek, mint repülő emlősök, hosszú evolúciós múlttal és kimagaslóan nagy fajdiverzitással komoly jelentőséggel bírnak a különféle vírusok és virális zoonózisok terjesztésében, melynek nem csupán egészségügyi, de komoly evolúciós-filogenetikai jelentősége is van. Luis és munkatársai egy 2013-as tanulmányukban kimutatták, hogy a denevérek szignifikánsan több potenciálisan zoonotikus ágens hordozói lehetnek, mint például a rágcsálók, ezért komoly érdeklődésre tarthatnak számot a témát kutatók körében (Luis et al. 2013.).

A ma élő denevérek rendje (Chiroptera) a legszélesebb körben elterjedt, legnagyobb számú és morfológiailag legdiverzebb, repülni képes emlőscsoport. A Chiroptera rendje körülbelül 1250 fajt foglal magába, ebből Európában 32, hazánkban 28 faj található meg (Bihari et al. 2007.). A denevérek az emlősöknek megközelítőleg 1/5-ét teszik ki, rendje 2 alrendre osztható, a *Yangochiroptera* és a *Yinpterochiroptera* alrendre. A *Yangochiroptera* alrendbe a Repülőkuttyák (*Pteropodidae*) és a Patkós-denevérszerűek (*Rhinolophoidea*), míg a *Yinpterochiroptera* alrendbe a Szabadfarkú (*Emballonuroidea*) denevérek, a Halászdenevérszerűek (*Noctilionoidea*) és a Simaorrú denevérszerűek (*Vespertilionoidea*) tartoznak (Teeling et al. 2005). A denevérek rendje az egyetlen szárazföldi emlőscsoport, amely olyan egyedi tulajdonságokat fejlesztett ki evolúció során, mint például a repülés vagy a tájékozódás visszavert hang segítségével (echolokáció) (Wang et al 2011.). Gyakran élnek nagy (akár több százazres) kolóniákban, a különböző fajok közös élőhelyen osztoznak, ezáltal és repülési képességüket figyelembe véve képesek a különféle vírusok nagy távolságra való eljuttatására (Wynne et al.2013.).

A denevérek éjszakai állatok, így nappali búvóhelyre van szükségük. Ezek lehetnek odvak, barlangok, üregek vagy fák lombjai. A növekvő urbanizáció hatására panelházak réseibe, épületek padlástereibe is befészkelhetik magukat. Az olyan természetire káros antropogén hatások, mint az urbanizáció és a természetes élőhelyek pusztítása, mind növeli a denevérek és emberek vagy háziállataik közti érintkezés lehetőségét, melynek komoly transzmissziós szerepe lehet. Jelen ismereteink szerint a leggyakoribb transzmissziós

útvonalak denevérek és emberek között a direkt kontaktus, például harapás által, a denevérek guanójával való érintkezés, fertőzött szervekkel (elhullott állat) való kontaktus és a fertőzött köztesgazdák (sertés, macska) történő érintkezés (Wong et al 2007.).

Bizonyos, denevérek által hordozott vírus zoonotikus potenciáljára számos példát találunk az elmúlt évtizedek járványai között. Példaként említhetjük a Nipah vírus malajziai és bangladesi megjelenését (Luby et al 2013.), a Hendra vírus ausztráliai megjelenését (Clayton et al 2013.), vagy az Ebolavírus által okozott, jelenleg is tomboló járványt Nyugat-Afrikában (Piot et al. 2014.). A denevérek kapcsolatba hozhatóak továbbá a legújabb, MERS-coronavírus (MERS-Middle Eastern Respiratory Syndrome) által okozott emberi megbetegedésekkel is, mint lehetséges természetes gazdaszervezetek, hiszen sikeresen mutatták ki a MERS-Coronavírus genetikailag közeli rokon vírusait (Yang L et al. 2014.).

Számos egyéb, evolúciós-filogenetikai szempontból kimagaslóan fontos vírust azonosítottak az elmúlt években denevérekben, melyek zoonotikus képessége egyelőre nem tisztázott. Példaként említhető a hepatitis E vírus rokon vírusainak kimutatása (Drexler et al. 2012.), két teljesen új influenza A szubtípus felfedezése (Mehle et al. 2014.) és hepatitis B rokon vírusok kimutatása amelyek meglepő módon képesek voltak humán hepatociták in vitro fertőzésére (Drexler et al. 2013.). Míg számos tanulmányt találhatunk, melyek a különféle trópusi élőhelyeken élő denevérek virológiai szerepét kutatja, Európából jóval kevesebb tanulmány áll rendelkezésre. Az európai denevérfauna virológiai célzatú kutatása főleg az olyan jól ismert víruscsoportokat érintette, mint a Lyssavírusok, Adenovírusok, Astrovírusok, Coronavírusok (Kohl et al. 2014). Módszertanilag kijelenthetjük, hogy a célzott molekuláris kimutatás és a vírusizolálás számított fő módszertannak az eddigi Európát érintő kutatások döntő többségében. Az újgenerációs szekvenálás új távlatokat nyitott az ismeretlen vírusok azonosítása terén is, mivel képes egy-egy mintából óriási adathalmazt szolgáltatni, így a denevérvírusok kutatásához is hatékony eszközként szolgál (Dacheux L et al. 2014).

1.2. A hosszúszárnyú denevér és az általa hordozott vírusok

Hosszúszárnyú denevér (*Miniopterus schreibersii*) közepes termetű, nagyon jellegzetes megjelenésű faj. Több ezres kolóniákat alkot, fontos számára a szálláshely zavartalansága, ezért fokozottan sérülékeny. Európai állománya komoly létszámbeli veszteségeket szenvedett és komoly veszélyeztetettségnek van kitéve a számára alkalmas élőhelyek ritkulása és zavarása miatt. Kizárólag repülő rovarokat fogyasztó, Európában megtalálható leggyorsabb denevérfaj, mely hatalmas távolságok megtételére képes. Elterjedése Európában széleskörű (**1. ábra**), alfajaival együtt Óceániában, Ázsiában és Afrika egyes részein is megtalálható (Gombkötő et al 2007.). A faj szerepe több víruscsoport hordozásában is bizonyítást nyert Európában. Az elmúlt évek során Európában új Lyssavírust (Aréchiga et al. 2013.), új Astrovírust (Kemenesi et al. 2014.) és meglepő módon egy eddig teljesen ismeretlen Filovírust azonosítottak (Negredo et al. 2011.). Valószínűleg az Európában egyedülállóan nagyszámú egyedek tömörítő kolonizációs szokásaik és egyéb fajokkal történő élőhelymegosztásuknak köszönhető, hogy bizonyos esetekben igen magas prevalenciával hordozhatnak vírusokat az egyes kolóniák (Kemenesi et al. 2014.)

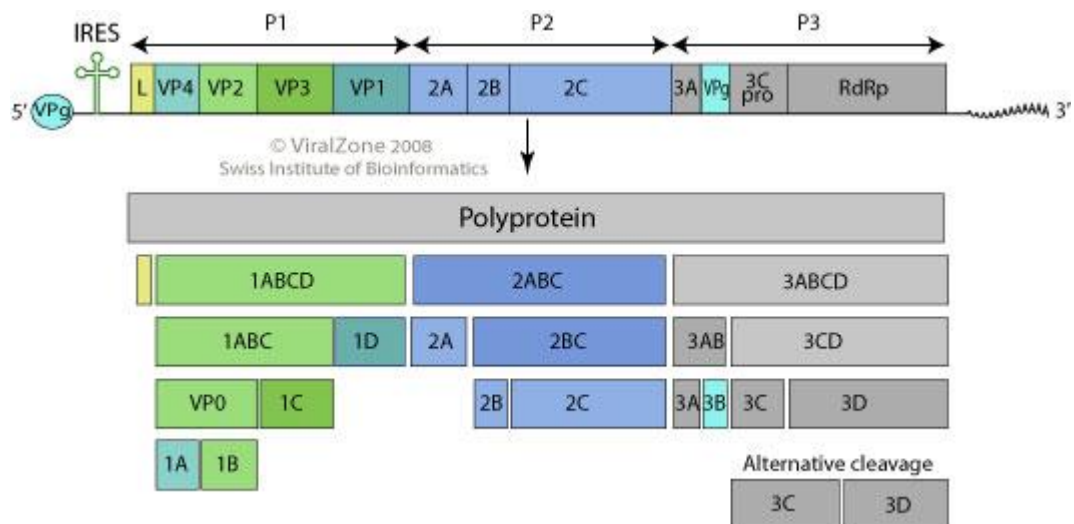


1.ábra: A *M. schreibersii* denevérfaj elterjedése, az eddig ismert alfajok feltüntetése nélkül. (forrás: IUCN)

1.3. A picornavírusok

A picornavírusok (PV) kisméretű, burokkal rendelkező vírusok, pozitív-egyszálú, ~7-9 kilobázis hosszúságú RNS genommal. A Picornaviridae víruscsalád, a Picornavirales rendbe tartozik és jelenleg 26 genust és 46 vírust sorolunk ide (Knowles et al. 2012., ICTV Master Species List 2013.). A PV genom egy kovalensen az 5' véghez kötődő polipeptidet kódol (VPg), melyet az 5' nem transzlálódó régió (Untranslated Region - UTR) követ, ahol a vírusreplikációban kulcsfontosságú internális riboszóma belépő helyek találhatóak (IRES). Az IRES elemek alapvető szerepe a vírusreplikációban az, hogy a gazdasejt mRNS átírásának csendesítése mellett a virális RNS átírása végbe mehessen. Az IRES motívumok olyan másodlagos RNS struktúrák, melyek lehetőséget biztosítanak a riboszóma belépéséhez a genomszekvencián belül, mivel a vírusreplikáció során a 5' cap struktúrával rendelkező, gazda eredetű RNS-esek gátolva vannak (Evstafieva et al 1991.). A nyitott leolvasási keret egyetlen poliproteint kódol, amely a vírus replikációja során proteolitikus hasításokon megy keresztül. Ezt egy rövid 3' UTR szekvencia követi, melynek szintén meghatározható másodlagos RNS struktúrája van, azonban ennek a virális replikációban betöltött szerepe még nem tisztázott. A *Picornaviridae* családra általánosan felírható genomorganizáció a **2. ábrán** látható. Általánosan elmondható, hogy a P1 régió kódolja a strukturális fehérjét, míg a P2 és P3 régió felelős a replikációs-nem strukturális fehérjék kódolásáért.

A pályamunka szempontjából fontos továbbá említést tennünk a picornavírusok zoonotikus jelentőségéről. A picornavírusok az állatok széles skálájában megtalálhatóak, kórképüket tekintve főként légzőszervi, szívet érintő, különféle májbetegségeket, neurológiai és bizonyos esetekben szisztémás fertőzésekben van szerepük változó súlyossággal (Tracy et al. 2006.). Számos tanulmány foglalkozik továbbá a picornavírusok fajok közti terjedési képességével, mely nem példanélküli. Lim és munkatársai bizonyították egy rágcső eredetű PV humán megbetegedésben betöltött szerepét, továbbá Yu és munkatársai szeroepidemiológiai kapcsolatot találtak egy sertés eredetű PV és humán megbetegedések között (Lim et al. 2014., Yu et al. 2013.)



2.ábra: A Picornaviridae víruscsalád általános genomorganizációja (forrás: ViralZone)

2. Célkitűzések

Kutatásunk fő célkitűzése a *M. schreibersii* denevérfaj mélyreható virológiai vizsgálata volt a molekuláris biológia új eszköztárának, az újgenerációs szekvenálásnak a felhasználásával. Mivel egy különlegesen diverz és széles elterjedésű denevérfajról van szó, megismerése az általános ökológiai igényeinek felmérésén túl mikrobiális szinten is igen fontos. Alapvető célunk volt olyan vírusok azonosítása, melyek akár állat – vagy humán egészségügyi, akár evolúciós-filogenetikai jelentőséggel bírhatnak.

További célkitűzésünk volt az ily módon azonosított vírusok mélyreható filogenetikai és genomikai elemzése, mely a modern számítástechnika korában alapvető fontosságú és a vírusok szaporítása nélkül és az in vitro kísérleteket megelőzően, következtetni enged a vírusok bizonyos molekuláris mechanizmusaira, tulajdonságaira.

3. Anyagok és Módszerek

3.1. Terepi mintavételezés

A terepi mintavételezést 2013-ban végeztük, a denevérek nászidőszakában, az éves nászhálózás alkalmával a Villány melletti Szársomlyó hegységen. A mintavételezés évében a barlangban található *M. schreibersii* kolónia becsült mérete 1000-1500 példány volt. A denevérek befogása a barlang nyílásától ~10 méterre elhelyezett húr csapdával történt. A denevérek faj szintű meghatározását tapasztalt denevérkutatók végezték. A nászhálózás során szokásos mérések (testtömeg, alkarhossz, korbecslés) elvégzését követően az állatokat eldobható, steril papírzsákokba helyeztük maximum 10 perc időtartamra (3. ábra). A papírzsákok ventillációja 5 mm nagyságú lyukakkal történt meg. A papírzsákokba helyezett denevérek a várakozási idő alatt a zsákba ürítenek, a guanó így kereszt-kontamináció nélkül gyűjthető. Az elengedett állatokat körömlakkal jelöltük, így a többszöri mintavételezést elkerültük. A begyűjtött mintákat a terepen 500 µl RNAlater (Qiagen Germany) oldatba helyeztük és szárazjégen szállítottuk a laboratóriumba. A denevérek szigorúan védett állatfajok, ezért mintavételezésük csak nem invazív eljárással történhet és szigorúan engedélyhez kötött. Mintavételezésünk engedélyét az illetékes hatóság (Dél-dunántúli Környezetvédelmi, Természetvédelmi és Vízügyi Felügyelőség) adta ki 14/2138-7/2011-es engedélyszámon.



3.ábra: A papírzsákokba helyezett denevérek a terepi mintavételezés alatt

3.2. Laboratóriumi kimutatás és analízisek

A minták homogenizálását, automata homogenizátorral végeztük, 5 percig 30 Hz-es frekvencián (Qiagen TissueLyser II), majd szobahőmérsékleten 17 000 g sebességgel 10 percig centrifugáltuk. A további RNS extrakcióhoz 200 µl-nyi felülúszót használtunk. Az RNS extrakciót a Diagon Viral NA Extraction Kit felhasználásával készítettük, a gyártó által előírt protokollt követve. A tisztított nukleinsavból mintánként 5 µl-t vittünk tovább random priming PCR amplifikációra, melynek során 2 lépésben valósítottunk meg a random amplifikációt. Első lépésben hagyományosan AMV reverz transzkriptáz (Promega), és egy az 5' végén 21 nukleotidból álló szekvenciát tartalmazó random hexamer primer felhasználásával hajtottunk végre átírást, a gyártó által előírt protokollt követve. A felhasznált program: 25 °C – 10 perc; 42 °C – 1 óra; 72 °C – 15 perc volt. A reverz-transzkripciót (RT) követően az amplifikáció 40 cikluson keresztül Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (ThermoScientific) és a RT-hoz használt primer 21 nukleotidjára komplementer szekvenciájú primer használatával és 3 µl cDNS templáttal történt meg a gyártó által előírt követelmények betartásával. A felhasznált program a következő volt: 98 °C – 3 perc; [98 °C - 15 másodperc; 48 °C – 30 másodperc; 72 °C – 2 perc] x 40; 72 °C – 8 perc. A metagenomikai könyvtár készítését NEBNext® Fast DNA Fragmentation & Library Prep Set for Ion Torrent felhasználásával, a gyártó által előírt protokollt követve végeztük el. A méretszelekciós lépéshez E-Gel® SizeSelect™ (Life Technologies) rendszert használtunk. A további lépések (emulziós PCR, szekvenálás) lépései során, előzetesen publikált és optimalizált módszereket alkalmaztunk (Fehér et al. 2014.). A Bioinformatikai analízishez a 40 bp-nál hosszabb szekvencia olvasatok kerültek felhasználásra és összevetésre 1,7 millió virális szekvenciával (GenBank). A de novo szekvenciaillesztéseket és a referenciaterképezést a CLC Genomics Workbench elemzőcsomaggal végeztük el.

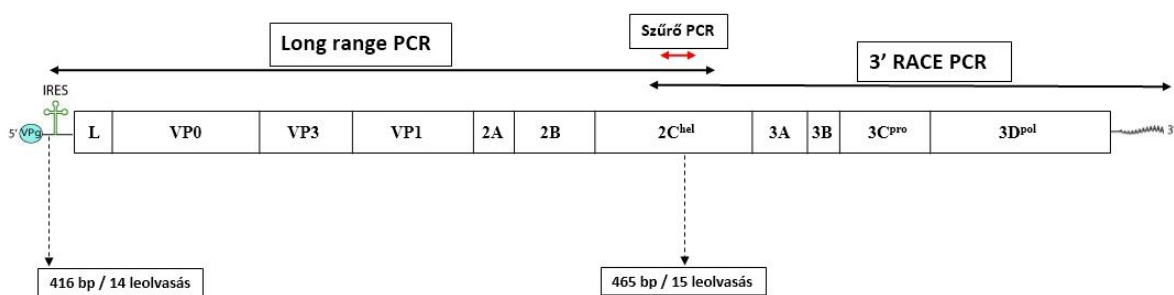
Az 5' és 3' UTR régiók amplifikációjához a 2nd Generation 5'/3' RACE kit (Roche) segítségével történt meg a gyártó által előírt protokollt követve. A kutatás során elvégzett RT-PCR reakciókhoz a SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen)-t használtuk, a gyártó által javasolt protokollt követve. A további szekvenálási reakciókat ABI PRISM 310 Genetic Analyzer automata szekvenálón végeztük el. A szekvenciák szerkesztéséhez és illesztéséhez GeneDoc 3.2 és ClustalX 2.0 szoftvereket alkalmaztunk. A filogenetikai elemzéseket MEGA v5.0 szoftverrel hajtottuk végre Maximum-Likelihood paraméter beállítással. A bootstrap szimulációk értéke 1000 volt. Az 5'

és 3' UTR régiók másodlagos RNS struktúrájának meghatározása az Mfold program segítségével történt meg (Zuker 2003.).

4. Eredmények és értékelésük

4.1 Laboratóriumi eredmények

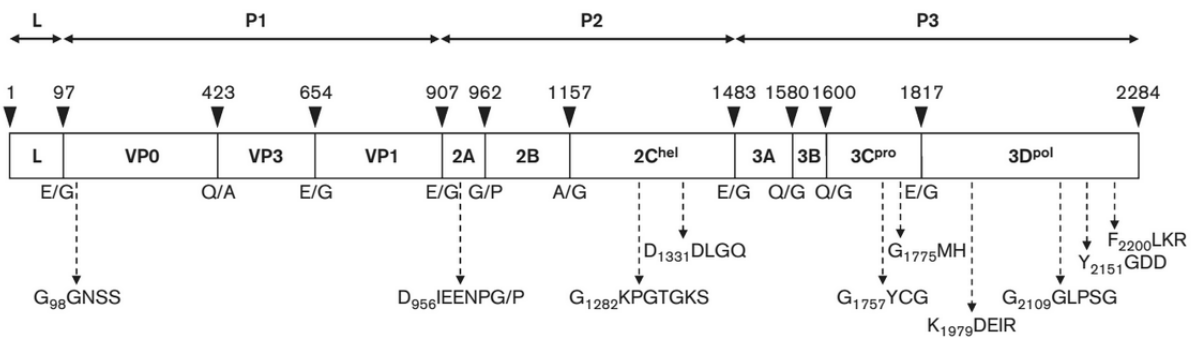
A terepi mintavételezés során 13 *M. schreibersii* denevér guano mintáját gyűjtöttük be és dolgoztuk fel metagenomikai módszerekkel. Az analízisek során két minta esetében kaptunk picornavírus eredetű szekvencia töredékeket. Az egyiknél 14 olvasatban egy 416 bp hosszúságú szakaszt, a másik mintánál pedig 15 olvasatban egy 465 bp hosszúságú szekvenciát. Az ismeretlen szekvenciárészleteket 3' RACE-PCR és Long Range PCR reakciók során amplifikáltuk a metagenomikai analízisek során nyert szekvenciatöredékekre tervezett primerekkel (4. ábra). Az így nyert 465 bp hosszúságú szakaszra, amely lokalizációját tekintve a P3 genomi régióba esett (konzervatív, nem strukturális kódoló régió) szűrő primerpárt terveztünk, hogy megtudjuk a vírusra pozitív minták számát a mintaállományunkból. A 13 mintából 6 esetben igazoltuk a vírus jelenlétét. A 6 pozitív minta esetében sikeresen meghatároztuk a teljes kódoló régió szekvenciáját, továbbá a teljes 3'UTR és részlegesen az 5' UTR régiókat is. Az általunk meghatározott szekvencia hossza 7947 bp, a legnagyobb homológiát mutató referenciaszekvenciához (GenBank szám: JQ814851) képest az 5' vég ~ 500bp hosszúságú szakasza hiányozik.



4.ábra: A metagenomikai analízis során nyert szekvenciatöredékek és a genomszekvencia feltárásához használt PCR reakciók sematikus ábrázolása

4.2 Genomikai elemzések eredményei

Genomikai elemzésünkhöz a támpontot a legnagyobb homológiát mutató referenciaszekvencia nyújtotta (GenBank szám: JQ814851). A Kódoló régió teljes hossza 2284 aminosav (as). A genomorganizáció jellegzetes sémát mutatott: 5'UTR[L-P1(VP0, VP3, VP1)-P2(2A,2B,2C^{hel})-P3(3A,3B^{VPg},3C^{pro},3D^{pol})]3'UTR-poly(A). A genomorganizáció sematikus ábrája és a továbbiakban feltüntetett aminosav motívumok ábrázolását az **5. ábra** tartalmazza. A lehetséges hasítóhelyek meghatározásához a referenciaszekvenciát és a NetPicoRNA predikciós szervert használtuk fel. A referencia szekvencia, a Mischivirus A, melyet *M. schreibersii* denevérekből mutattak ki Kínában (Wu et al. 2012.).



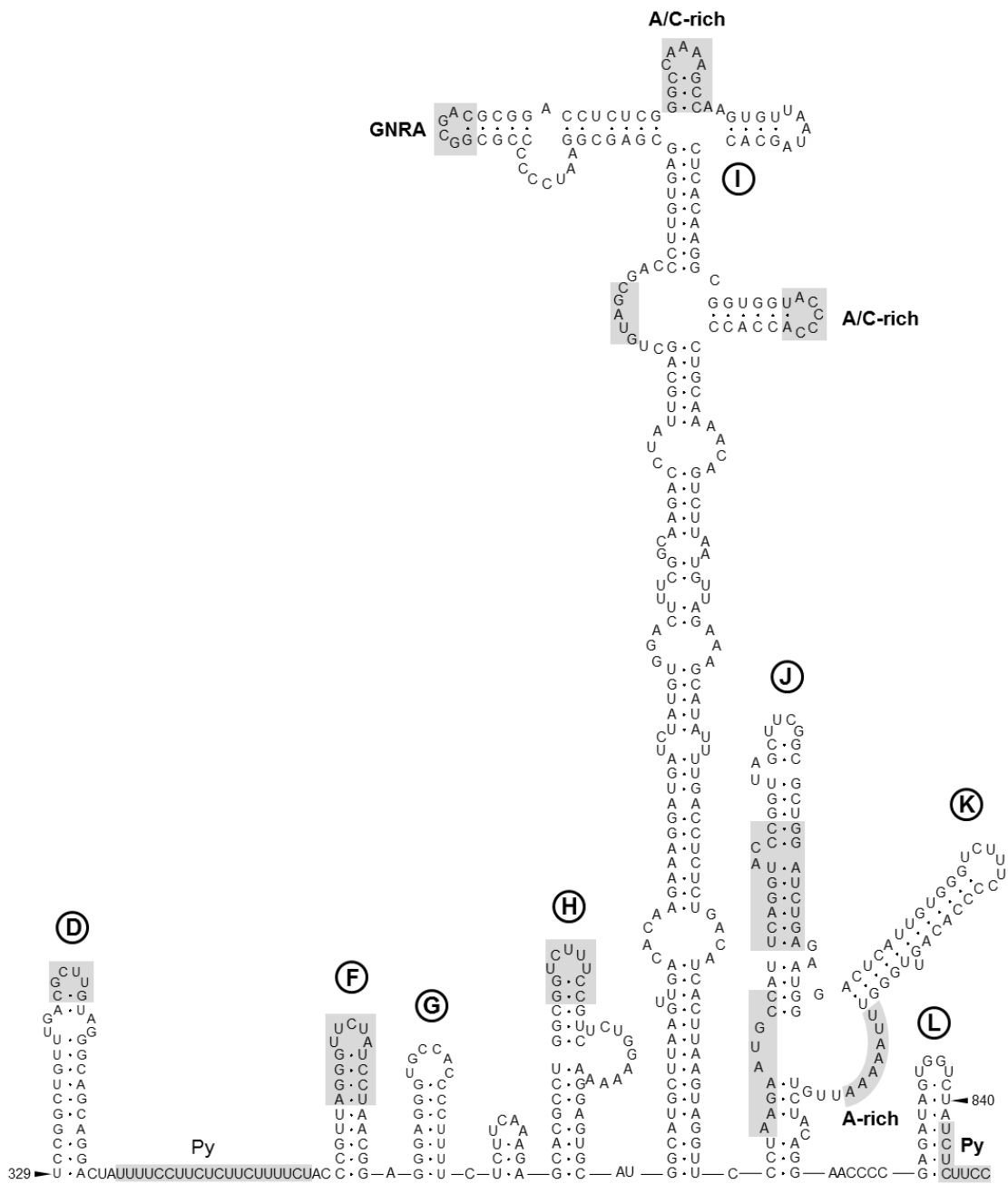
5.ábra: A teljes kódoló régió organizációja, a kódolt fehérjék mérete aminosavban, a régiók határát jelentő aminosav párok és a konzervált aminosav motívumok szaggatott nyilakkal jelölve a pozíciójukban.

Az L protein nem tartalmazta a papin-szerű tiol proteázok katalitikus diádját (Cys és His) (Gorbalenya et al. 1991.), sem pedig a CHCC cink-kötő motívumot (Chen et al. 1995.). A szekvenciaillesztések alapján nem következtethetünk a VP0 proteolitikus hasítására VP4 és VP2 fehérjékké. A VP0/VP3 és VP3/VP1 hasítási helyeket kivéve a referenciaszekvenciával (Wu et al 2012.) azonos hasítási mintázatot találtunk: L/P1 (E₉₇/G), P1/P2 (E₉₀₅/G), P2/P3 (E₁₄₈₀/G). A CDD (Conserved Domain Database) (Marchler-Bauer et al. 2011.) keresés használatával Rhv-szerű kapszid doméneket (cd00205), 2C RNS helikáz (pfam00910), 3C cisztein-proteáz (pfam00548) és 3D RdRp (cd01699) karakterisztikus picornavírus motívumokat írtunk le. A VP0 potenciális mirisztillációs motívumot tartalmazott (GxxxS – G₉₈GNSS). A 2A protein a DxExNPG/P (D₉₅₆IEENPGP) konzervált hasítóhellyel rendelkezett. Hasonlóan más picornavírusokhoz a 2C proteinban megtalálható a konzervált NTP-kötő GxxGxGKS (G₁₂₈₂KPGTGKS) és helikáz DDLxQ (D₁₃₃₁DLGQ) motívumok. A

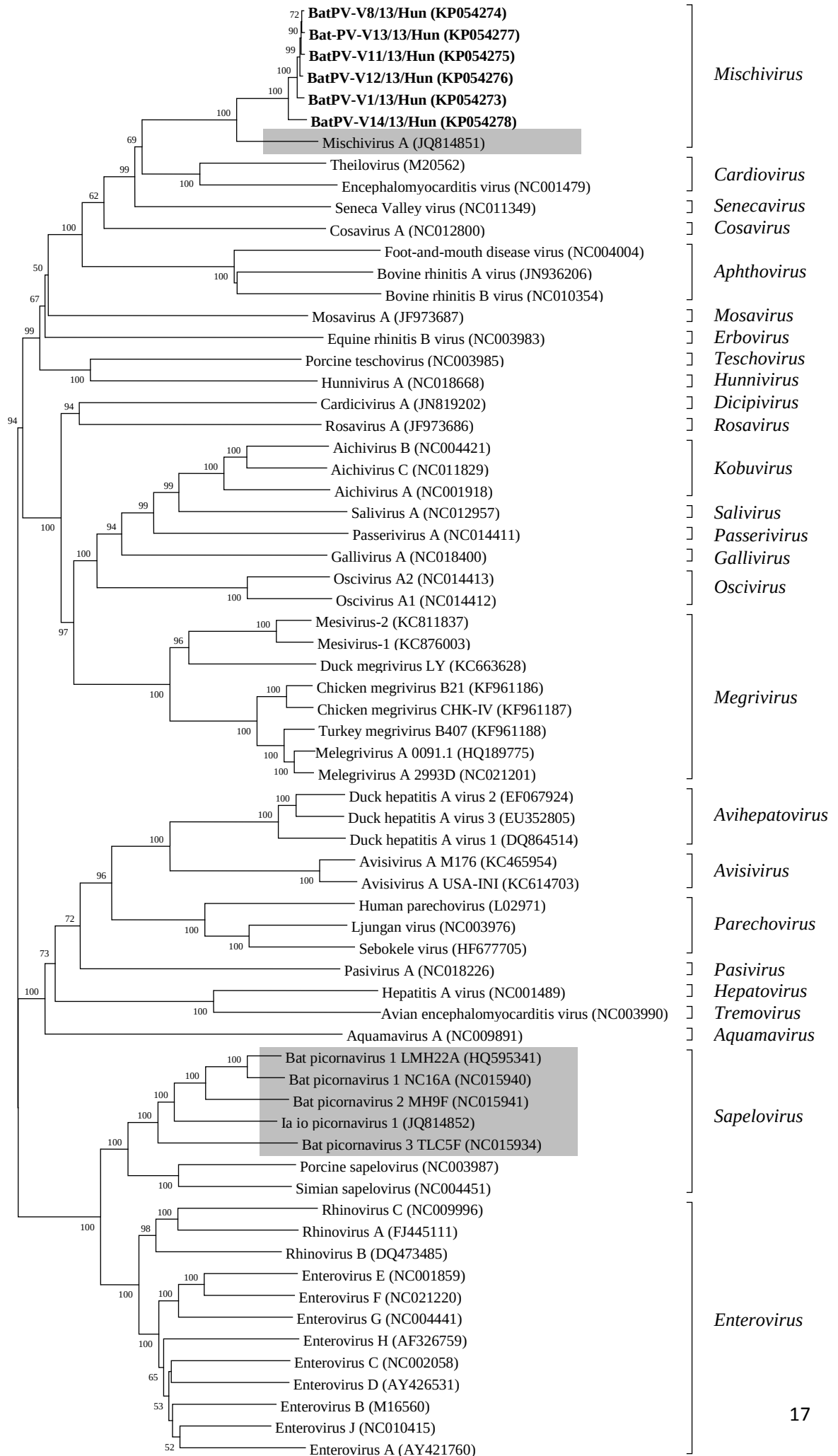
3C^{pro} katalitikus triádja H-D-C szintén megtalálható volt az általunk feltárt szekvenciákban (H-E/D-C). Tartalmazták továbbá a konzervált aktív protáz motívumot GxCG (G₁₇₅₇YCG), egy GxH motívummal (G₁₇₇₅MH). A 3D protein K₁₉₇₉DEIR, G₂₁₀₉GLPSG, Y₂₁₅₁GDD és F₂₂₀₀LKR konzervált motívumokat tartalmazott (5. *ábra*).

A szekvenciaadatok és a feltételezett másodlagos struktúra alapján az általunk leírt picornavírusok 5'UTR régiója II-es típusú IRES-t tartalmazott (6. *ábra*), hasonlóan a cosavírusokhoz, az encephalomyocarditis vírushoz és a száj-és körömfájás vírushoz. Az általunk feltárt részleges 5'UTR szekvenciában sikeresen azonosítottuk a fő konzervált doméneket (H, I, J, K, L domének), melyeknek alapvető szerep jut az IRES tipizálásban. Az általunk prediktált másodlagos struktúrában, II-es típusú IRES konzervált motívumokat azonosítottunk: kettő A/C gazdag hurok régió az I domén apikális részén; A-gazdag hurok a J és K domének csatlakozásánál. Az F domén, a cosavírusokhoz hasonlóan tartalmazott egy 13 nukleotid nagyságú szekvenciát (AGGGUUCUAUCCU), illetve a H domén egy, az encephalomyocarditis víruséval azonos szekvenciát tartalmazott (GGUCUUUCC). Továbbá magas nukleotid szintű homológiát fedeztünk fel a J és D domének esetében, a fent már említett 3 vírussal. Az általunk leírt denevér picornavírus tartalmazott továbbá egy 8 nukleotid hosszúságú oligopyrimidin traktust az L loopot követően (6. *ábra*) (Kapoor et al. 2008.). Meglepő módon a 329 és 440-es szakasz mind szekvencia szinten, mind pedig strukturálisan is sok hasonlóságot mutat a cosavírusok ugyanezen szakaszával (D, F, G loopok és a 364-383 közötti pirimidin traktus).

A 3' UTR régió elemzése során, az általunk leírt szekvencia 76% nukleotidszekvencia szintű azonosságot mutatott a fentebb már említett referenciaszekvenciával (Mischivírus A), hosszúságát tekintve pedig 211 nukleotid alkotja. Érdekesség, hogy a 71 és 110 közötti szakasz 88%-os homológiát mutatott a Theiler's murine encephalomyelitis vírussal (Buckwalter et al. 2011.). Az Mfold (Zuker 2003.) program használatával meghatároztuk a régió feltételezhető másodlagos struktúráját, mely 6 domént foglalt magába (7. *ábra*). A C domén egy AAGCCA₈₈₋₉₃ motívumot tartalmazott, mely az encephalomyocarditis vírusok I doménjében található, továbbá a D domén egy CCUUCU₁₁₅₋₁₂₀ szekvenciát tartalmazott, ami nagyon hasonló az encephalomyocarditis vírusok UCUUCU szekvencia motívumára (Duque & Palmberg 2001.). Általánosan elmondható, hogy a picornavírusok 3' UTR régiója másodlagos RNS struktúrákat tartalmaz, melyek szerepe feltételezhetően különféle virális és gazda eredetű fehérjék kötőhelye lehet (Rohll et al. 1995.).



6.ábra: Az általunk leírt picornavírus részleges 5'UTR régiójának másodlagos struktúrája, II-es típusú IRES. A fő domének betűkkel jelölve és a konzervált régiók szürkén kiemelve.



8.ábra: A teljes kódoló régió (6852 bp) filogenetikai analízise. A filogenetikai fa elkészítése MEGA v5.0 szoftverrel történt neighbour-joining algoritmus használatával, Maximum Composite Likelihood paraméterbeállítással. Az eddig ismert denevér eredetű picornavírusok szürkén kiemelve. Az általunk leírt vírustörzseket vastag betűvel jelöltük.

5. Összefoglalás

A pályamunka összegzéseként elmondhatjuk, hogy Európai denevérek közül elsőként, sikeresen kimutattunk és karakterizáltunk egy új picornavírust. Az általunk leírt vírus legközelebbi rokonát Kínában azonosították, ezzel a *M. schreibersii* komoly virológiai szerepét tovább növeltük, hiszen az általunk leírt vírus és gazdaállatának hosszú földrajzi és koevolúciós múltjáról alkothattunk képet. A filogenetikai analízisekből és a többi denevér eredetű picornavírus (*Sapelovirusok*) rokonsági fokából a víruscsalád eddig fel nem ismert diverzitására gyanakszunk a denevérek körében Európában is, melynek feltárásához további kutatások szükségesek.

Az általunk kimutatott vírus legközelebbi rokonának a *Mischivirus* genus egyetlen eddig leírt tagja, a *Mischivirus A* bizonyult, de a genuson belül határozott monofiletikus ágon elkülönül a két vírus, így feltételezhetően a genus egy újabb tagját azonosítottuk Európában.

6. Köszönetnyilvánítás

Mindenek előtt köszönettel tartozom témavezetőmnek, **Dr. Jakab Ferencnek** a munkámban nyújtott szakmai támogatásáért és a laboratóriumi háttért biztosításáért, mert nélküle ez a dolgozat nem készülhetett volna el. Továbbá köszönettel tartozom a Szentágotthai János Kutatóközpont Virologiai Kutatócsoportjában dolgozó összes munkatársamnak, Kemenesi Gábornak, Földes Fanninak, Oldal Miklósnak, Dr. Kutas Annának és Garai Kittinek mind emberi, mind szakmai támogatásukért.

Külön köszönet illeti **Dabing Zhang Professzort**, a Kína Mezőgazdasági Egyetem (Peking), Állatepidemiológiai és Zoonózis Laboratóriumának munkatársát, aki a másodlagos RNS struktúrák meghatározásában nyújtott pótolhatatlan segítséget.

7. Irodalomjegyzék

Aréchiga Ceballos N, Vázquez Morón S, Berciano JM, Nicolás O, Aznar López C, Juste J, Rodríguez Nevado C, Aguilar Setién A, Echevarría JE. Novel lyssavirus in bat, Spain. *Emerg Infect Dis*. 2013 May;19(5):793-5. doi: 10.3201/eid1905.121071.

Bihari, Z., Csorba, G. & Heltai, M. (eds): Magyarország emlőseinek atlasza. Kossuth Kiadó, Budapest, 2007

Buckwalter, M. R., Nga, P. T., Gouilh, M. A., Fiette, L., Bureau, J. F., Laird, M. E., Buchrieser, J., Ozden, S., Cheval, J. & other authors (2011). Identification of a novel neuropathogenic Theiler's murine encephalomyelitis virus. *J Virol* 85, 6893–6905.

Chen, HH., Kong, WP., Roos, RP. (1995). The leader peptide of Theiler's murine encephalomyelitis virus is a zinc-binding protein. *J Virol* 69, 8076-8078.

Clayton B.A., Wang L.F., Marsh G.A. Henipaviruses: An Updated Review Focusing on the Pteropid Reservoir and Features of Transmission. *Zoonoses Public Health*. 2013;60:69–83. doi: 10.1111/j.1863-2378.2012.01501.x. [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]

Dacheux L, Cervantes-Gonzalez M, Guigon G, Thiberge JM, Vandenbogaert M, Maufrais C, Caro V, Bourhy H. A preliminary study of viral metagenomics of French bat species in contact with humans: identification of new mammalian viruses. *PLoS One*. 2014 Jan 29;9(1):e87194. doi: 10.1371/journal.pone.0087194. eCollection 2014.

Drexler JF, Seelen A, Corman VM, Fumie Tateno A, Cottontail V, Melim Zerbinati R, Gloza-Rausch F, Klose SM, Adu-Sarkodie Y, Oppong SK, Kalko EK, Osterman A, Rasche A, Adam A, Müller MA, Ulrich RG, Leroy EM, Lukashev AN, Drosten C. Bats worldwide carry

hepatitis E virus-related viruses that form a putative novel genus within the family Hepeviridae. *J Virol.* 2012 Sep;86(17):9134-47. doi: 10.1128/JVI.00800-12. Epub 2012 Jun 13.

Drexler JF, Geipel A, König A, Corman VM, van Riel D, Leijten LM, Bremer CM, Rasche A, Cottontail VM, Maganga GD, Schlegel M, Müller MA, Adam A, Klose SM, Carneiro AJ, Stöcker A, Franke CR, Gloza-Rausch F, Geyer J, Annan A, Adu-Sarkodie Y, Oppong S, Binger T, Vallo P, Tschapka M, Ulrich RG, Gerlich WH, Leroy E, Kuiken T, Glebe D, Drosten C. Bats carry pathogenic hepadnaviruses antigenically related to hepatitis B virus and capable of infecting human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Oct 1;110(40):16151-6. doi: 10.1073/pnas.1308049110. Epub 2013 Sep 16.

Duque, H. & Palmenberg, A. C. (2001). Phenotypic characterization of three phylogenetically conserved stem-loop motifs in the mengovirus 3' untranslated region. *J Virol* 75, 3111–3120.

Evstafieva AG, Ugarova TY, Chernov BK, Shatsky IN. A complex RNA sequence determines the internal initiation of encephalomyocarditis virus RNA translation. *Nucleic Acids Res.* 1991 Feb 11;19(3):665-71.

Fehér E, Pazár P, Kovács E, Farkas SL, Lengyel G, Jakab F, Martella V, Bányai K. Molecular detection and characterization of human gyroviruses identified in the ferret fecal virome. *Arch Virol.* 2014 Dec;159(12):3401-6. doi: 10.1007/s00705-014-2203-3. Epub 2014 Aug 14.

Gorbalenya, AE., Koonin, EV., Lai, MM. (1991). Putative papain-related thiol proteases of positive-strand RNA viruses. Identification of rubi- and aphthovirus proteases and delineation of a novel conserved domain associated with proteases of rubi-, alpha- and coronaviruses. *FEBS Lett* 288, 201-205.

ICTV (International Committee on the Taxonomy of Viruses) Master Species List 2013:
http://talk.ictvonline.org/files/ictv_documents/m/msl/4911.aspx

IUCN (The IUCN Red List of Threatened Species):
<http://www.iucnredlist.org/details/13561/0>

Kapoor, A., Victoria, J., Simmonds, P., Slikas, E., Chieochansin, T., Naeem, A., Shaukat, S., Sharif, S., Alam, M. M. & other authors (2008). A highly prevalent and genetically diversified Picornaviridae genus in South Asian children. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 20482–20487.

Kemenesi G, Dallos B, Görföl T, Boldogh S, Estók P, Kurucz K, Kutas A, Földes F, Oldal M, Németh V, Martella V, Bányaí K, Jakab F. Molecular survey of RNA viruses in hungarian bats: discovering novel astroviruses, coronaviruses, and caliciviruses. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2014 Dec;14(12):846-55. doi: 10.1089/vbz.2014.1637.

Knowles, NJ., Hovi, T., Hyypiä, T., King, AMQ., Lindberg, M., Pallansch, MA., Palmenberg, AC., Simmonds, P., Skern, T., Stanway, G. & other authors. (2012). Picornaviridae. In: *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* pp 855-880. Ed: King, AMQ., Adams, MJ., Carstens, EB., Lefkowitz, EJ. San Diego: Elsevier.

Marchler-Bauer, A., Lu, S., Anderson, JB., Chitsaz, F., Derbyshire, MK., DeWeese-Scott, C., Fong, JH., Geer, LY., Geer, RC., Gonzales, NR. & other authors (2011). CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Res* **39**, D225-229.

Negredo A, Palacios G, Vázquez-Morón S, González F, Dopazo H, Molero F, Juste J, Quetglas J, Savji N, de la Cruz Martínez M, Herrera JE, Pizarro M, Hutchison SK, Echevarría

JE, Lipkin WI, Tenorio A. Discovery of an ebolavirus-like filovirus in europe. PLoS Pathog. 2011 Oct;7(10):e1002304. doi: 10.1371/journal.ppat.1002304. Epub 2011 Oct 20.

Gombkötő P, Boldogh S (2007) Hosszúszárnyú denevér – *Miniopterus schreibersii* (Kuhl, 1817) – Pp. 127-128. In: Bihari, Z., Csorba, G. & Heltai, M. (eds): Magyarország emlőseinek atlasza. Kossuth Kiadó, Budapest, 2007

Kohl C* and Andreas Kurth Viruses. Aug 2014; 6(8): 3110–3128. Published online Aug 13, 2014. doi: 10.3390/v6083110 PMID: PMC4147689 European Bats as Carriers of Viruses with Zoonotic Potential

Lim, ES., Cao, S., Holtz, LR., Antonio, M., Stine, OC., Wang, D. (2014). Discovery of rosavirus, a novel variant of a rodent-associated picornavirus, in children from The Gambia. Virology 454-455, 25-33.

Luby S.P. The pandemic potential of Nipah virus. Antivir. Res. 2013; 100:38–43. doi:10.1016/j.antiviral.2013.07.011. [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]

Luis AD, Hayman DT, O’Shea TJ, Cryan PM, et al. A comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic viruses: Are bats special? Proc Biol Sci 2013; 280:20122753.

Mehle A. Unusual influenza A viruses in bats. Viruses. 2014 Sep 17;6(9):3438-49. doi: 10.3390/v6093438.

Rohll, J. B., Moon, D. H., Evans, D. J. & Almond, J. W. (1995). The 39 untranslated region of picornavirus RNA: features required for efficient genome replication. J Virol 69, 7835–7844.

Teeling EC, Springer MS, Madsen O, Bates P, et al. A molecular phylogeny for bats illuminates biogeography and the fossil record. *Science* 2005; 307:580–584

Tracy, S., Chapman, NM., Drescher, KM., Kono, K., Tapprich, W. (2006). Evolution of 299 virulence in picornaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 299, 193-209.

Piot P, Muyembe JJ, Edmunds WJ. *Lancet Infect Dis.* 2014 Nov;14(11):1034-5. doi: 10.1016/S1473-3099(14)70956-9. Epub 2014 Oct 1. Ebola in west Africa: from disease outbreak to humanitarian crisis.

ViralZone - Picornaviridae: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/33.html

Wang LF, Walker PJ, Poon LL. Mass extinctions, biodiversity and mitochondrial function: Are bats ‘special’ as reservoirs for emerging viruses? *Curr Opin Virol* 2011; 6:649–657.

Wong S, Lau S, Woo P, Yuen KY. Bats as a continuing source of emerging infections in humans. *Rev Med Virol* 2007; 17:67–91.

Wu, Z., Ren, X., Yang, L., Hu, Y., Yang, J., He, G., Zhang, J., Dong, J., Sun, L., Du, J. & other authors (2012). Virome analysis for identification of novel mammalian viruses in bat species from Chinese provinces. *J Virol* **86**, 10999-11012.

Wynne JW, Wang LF. Bats and viruses: Friend of foe? *PLoS Pathogens* 2013; 10:e1003651.

Yang L, Wu Z, Ren X, Yang F, Zhang J, He G, Dong J, Sun L, Zhu Y, Zhang S, Jin Q. MERS-related betacoronavirus in *Vespertilio superans* bats, China. *Emerg Infect Dis*. 2014 Jul;20(7):1260-2. doi: 10.3201/eid2007.140318.

Yu, JM., Li, XY., Ao, YY., Li, LL., Liu, N., Li, JS., Duan, ZJ. (2013). Identification of a novel picornavirus in healthy piglets and seroepidemiological evidence of its presence in humans. *PLoS One* 8, e70137.

Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 31, 3406–3415.