

Az adenovírus (AV) virion fehérjéi sokféle funkcióval rendelkeznek, többek között szerepet játszanak a megfertőzendő sejtbe való bejutás elősegítésével. Az AV-k replikációja során a legkevésbé ismert folyamat a sejtbe való bejutás, és ennek kapcsán az endoszómális rendszer kölcsönhatása a vírussal, illetve annak kapszidjával. Az AV valószínűleg receptor-mediált endocitózissal jut be a megfertőzendő sejtbe, majd az endoszómális rendszerből a citoplazmába, végül belép a sejtmagba és megkezdí replikációját. Mivel ez a folyamat igen hatékony, az AV replikációs tulajdonságainak pontos feltárása és az azt befolyásoló tényezőknek a megismerése felbecsülhetetlen értékű a génterápiás próbálkozásokban.

Régebről már ismert volt a chloroquine gátló hatása a virion internalizációjára, azonban hatásmechanizmusa nem bizonyított (gátolja az endoszómális rendszer acidifikációját, és feltételezhetően a pH változás elmaradása jelenti az effektor mechanizmust).

A kutatási támogatás első periódusában megvizsgáltunk néhány az irodalomból ismert (epszilon-COP, rab5 GTPáz, IP3 kináz), az endoszómális rendszerben fontos funkciókkal rendelkező vivőfehérjét, annak kiderítésére, hogy ezek befolyásolják-e (elősegítik, vagy gátolják) a vírus bejutásának hatékonyságát, és vizsgáltunk néhány, az adenovírus viropexisére ható anyagot (chloroquine, bafilomycin A1, wortmannin) is. Az epszilon-COP fehérje, illetve az endoszómával történő fúzióra ható bafilomycin A1 hatásának vizsgálata, és a kapott eredmények alapján úgy látszik, hogy több, még nem ismert párhuzamos mechanizmus is befolyásolhatja a vírus internalizálódását és ezek egyike involválja az epszilon-COP fehérjét, míg a pH regulációnak valószínűleg nincs jelentős szerepe. Ennek a felismerésnek az alapján kezdtük meg azokat a kísérleteinket, amelyek során eddig nem - vagy nem eléggé - ismert folyamatokban résztvevő fehérjék nyomára bukkantunk. Kidolgoztunk egy egyszerű szűrőrendszert (széles gazdaspektrumú retrovirális vektor HeLa cDNS könyvtár által fertőzött Hela vagy 293 sejtek, amelyeket vad típusú és rekombináns adenovírusokkal felülfertőzve, a produktív infekció eliminálja azokat a retrovirális klónokat, melyek nem tudják megakadályozni a vírus produktív infekcióját, míg az életben maradt

sejtekből a retrovirális klón visszanyerhető és karakterizálható). Ennek a rendszernek a segítségével azonosítottunk olyan sejtfehérjéket, melyek túlexpressziója negatívan befolyásolja a vírus bejutását sejtekbe. A klónokból PCR módszerrel kiemeltük a bevitt cDNS szekvenciákat, és megkezdtük ezek szekvenálását.

Igen érdekes a rab5 proteinek szerepe az internalizációban. Ezek a proteinek ugyancsak a korai endoszoma és az ECV közötti anyagforgalom elengedhetetlen résztvevői és hiányukban ugyancsak blokkolódik az anyagforgalom. Kísérleti eredményeink szerint a rab5 domináns negatív mutánsa nem hogy gátolná, hanem fokozza a virionok internalizációját, ami felveti a lehetőségét, hogy a virion szempontjából az ECV kompartmentnek nincs jelentősége és az eddigi eredményekkel egybevetve egy chloroquine - bafilomycin A1 - epszilon-COP – rab5 hatássort valószínűsít.

Ezeknek a kísérleteknek az eredményei hasznos információkat hozhattak volna a kísérletes génterápiás próbálkozásokhoz, mivel a rekombináns adenovírus vektorok (RAV) igen ígéretes eszközei a génterápiás próbálkozásoknak, azonban alkalmazásukat nagymértékben gátolja a vírus immunogenitása és a sejt való bejutás mechanizmusainak mélyebb ismeretének hiánya. Kutatócsoportunk két irányban igyekezett feltárni e problémák megoldásához vezető utakat.

Ennek egyik irányát, a vírus immunogenitásában rejlő nehézségeket és annak esetleges elkerülését részletesen vizsgáltuk mind a virion fő protein alkotórésze, a hexon ellen termelt monoklonális ellenanyagokkal, mint pedig szintetikus peptidek ellen egérben termelt ellenanyagokkal.

Kísérleteink alapján ajánlásokat tettünk olyan AV típus-párok alkalmazására a génterápiás illetve a vakcinálási eljárás során, amelyek nem tartalmazzak, vagy legalábbis nem számottevő mennyiségben közös intertípus (IT) specifikus epitópot, ezért megfelelőek lehetnek a szervezet immunrendszerének a vektor ellen irányuló hatásának kiküszöbölésére a második, vagy többszöri alkalmazás során.

A másik kutatási irány, a vírus sejtbejutásához kötődő virális és celluláris folyamatok feltérképezése lett volna. A kezdeti kísérleti eredmények után azonban ez a kutatási terület sajnálatos módon megszakadt, ugyanis a *kutatási pályázat OTKA támogatásának elnyerését*

követően alig 1 évvel a megkezdett kísérletes munka után, a kutatásban résztvevők számában jelentős - negatív értelmű - változás állt be. A kutatásban résztvevőként bejelentett két fiatal kolléga közül az egyik külföldön vállalt munkát (jelenleg is Amerikában tartózkodik, és másirányú kutatási elképzelései vannak), a másik időközben kutatási témát változtatott és a harmadik kolléga is más kutatási területen kezdett dolgozni. A nehézségeket az is tetézte, hogy segédszemélyzet sem állt az ily módon kiürült "kutatócsoport" rendelkezésére. Így tehát a kutatócsoport a témavezetőn kívül gyakorlatilag csak prof. Dr. Nász István akadémikus, emeritus professzorból állt. Ezért történt az, hogy Nász professzor úrral figyelmünket az adenovírus kapszid, mint szabályos ikozahedrális test szimmetriaviszonyainak felderítése felé, az egyes polipeptidek helyzetének tanulmányozására fordítottuk. A pontos szimmetriaviszonyok meghatározása új információkhoz vezethet a kapszid összeépülésének, a szerkezet és funkció közötti összefüggés megértése területén is.

Az AV virionjában illetve a kapszidot felépítő kapszomerekben fellelhető szimmetriaviszonyokat, illetve a molekuláris struktúra (molekuláris anatómia) tanulmányozására direkt elektronmikroszkópos vizsgálatokat, a Markham-féle rotációs integrációs eljárást és modellezést alkalmaztunk. Kimutatható volt, hogy a hexon kapszomereknek a virion felszíne felé mutató vége három polipeptid alegységből áll, és helyzetükből megállapítható volt egymáshoz és a pentonokhoz való kölcsönös orientációjuk is. Víruskapszid és ikozaéder modelleken vizsgáltuk az alapvető szimmetriatípusok jelenlétét vagy hiányát és azt, hogy a kapszid szimmetriájában hogyan érvényesül az ikozahedrális szimmetria, mennyiben befolyásolja vagy zavarja a hasonlóságot a kapszidot felépítő nagyszámú, különböző méretű és összetételű és különböző funkcióval rendelkező polipeptid molekulák jelenléte. Vizsgáltuk, hogy milyen szimmetriarendszerek találhatók a kapszid egészében és hogy hogyan illeszkednek a kapszid építő elemei az 5-szörös, 3-szoros és 2-szeres ikozahedrális szimmetriarendszerbe.

Ezen vizsgálataink során kimutattuk, hogy az AV kapszidot felépítő hét különböző típusba tartozó több, mint 1500 polipeptid molekula mindegyike (feltehetően még az aminosavaiké is) szimmetrikus elhelyezkedésű. Minden polipeptid féleség külön-külön is szimmetrikus hálózatot képez a kapszidban, funkcióik szerint történő eloszlásban, a lapok és az élek külső és belső oldalán, valamint a belsejében, de mindig az ikozahedrális szimmetriának megfelelően. Az egyes, különböző polipeptid elemek ezért általános szimmetria motívumot is jelentenek a kapszidban a saját szimmetria hálózatukban. Bizonyos szempontból kivételt jelentenek a kapszidban a hexonok. A kapszid háromszögű lapjain környezeti helyzetük és egymáshoz való orientációjuk alapján négyféle hexontípus található, melyek laponként, egymás mellett, mint három, négy hexonból álló csoport (NCs) helyezkednek el, a háromszoros forgási szimmetria szerint. Minden NCs-ben levő egy peripentonális hexonnak két polipeptidje orientálódik a penton felé. Az NCs-k összeállításának kétféle lehetősége van, úgy hogy a hexonok egy IX jelű polipeptidet, vagy úgy, hogy egy IIIa jelű polipeptidet fognak közre. Az NCs-k 20 lapon, 2 x 60-szor szimmetrikusan ismétlődve, mint általános hexon szimmetria motívum alkotják a kapszidot, a többi polipeptidekkel együtt.

Az ikozahedrális AV kapszidnak három különböző típusú forgási szimmetriatengelye van. Hat ötfogású, tíz háromfogású és tizenöt kétfogású tengelyének két-két felszíni pontja van, amely összesen 62 forgási pólust jelent. A tengelyek meghatározzák az egybevágó forgási lapcsoportok számát és helyzetét a kapszidban és azt, hogy egy forgási szakaszban, illetve egy vagy az összes tengelyen történő teljes körfordulat alatt a forgási lapcsoportok a kapszid mely más lapjaival, milyen multiplicitással kerülnek szimmetrikus fedésbe. Az 5-, 3- és 2-fogású forgási tengelyekhez tartozó forgási lapcsoportok száma: 4, 6.66, illetve 10 lap. Minden tengelyhez kétféle összeállítású lapcsoport tartozik. A szomszédos egybevágó lapcsoportra való egyenkénti „ráhelyezéssel” az 5-fogású tengelyen való átforgatás során 12-szer kerülnek fedésbe a forgási elemek lapjai, mind a 20 kapszid lappal, a 3-fogású tengelyek esetében 20-szor, a 2-fogású tengelyek esetében 30-szor, úgy, hogy minden lapra különböző lapkombináció (laptalálat) esik, és szimmetriájuk nem szenved zavart.

Végeredményben ez 240, 400 illetve 600 laptalálatot, multiplicitást jelent az 5-, 3- illetve a 2-fogású szimmetriatengelyek esetében, és ezek a számok megegyeznek az elméletileg lehetséges variációk számával. Ugyanez az eredmény adódik az ikozahedrális kapszidban levő valódi forgási műveletek számát, a 60-at megszorozva az 5-szörös, 3-szoros és a 2-szeres forgási szakaszokban résztvevő lapok számával. A multiplicitás másik meghatározási módja az összes forgási lapcsoport egyszerre történő továbbfordulását veszi alapul minden egyes forgási szakaszban, ami meg többszörözi a multiplicitási mutató számértékét az 5-, 3- és a 2-fogású forgási típusnak megfelelően és 1200-as multiplicitási értéket eredményez mindhárom típus esetén.

Az 5-fogású szimmetriatengelyekre merőlegesen futó, 10-10 lapból álló hat geodétikus szalagpalást mentén középén, horizontálisan ejtett metszészvonallal szabályos dekagonális keresztmetszet jön létre és két egyenlő részre vágható a kapszid, amelyeken a lapok és a polipeptidek egymástól 72° -os elfordulást mutatnak, de megfelelő forgatással egybevágó helyzetbe kerülnek a polipeptidek, ami 300 illetve 600 különleges lapkombinációt jelent. Az ikozaéderhez hasonlóan, a kapszidnak is létezik 15 képzeletbeli tükörsíkja, amelyek két azonos módon rendezett félre vágják azt, a felszínen létrehozva laponként 6, összesen 120 kisebb, derékszögű ún. Möbius-féle háromszöget. Ezek a háromszögek a lapok háromszoros szimmetriatengelyén két külön hármass csoportban 120° -kal szimmetrikusan elfordíthatók a polipeptid alegység orientációjának megfelelően, úgy hogy az azonos szimmetriaelemek, a hexon és más polipeptidek is megközelítően fedik egymást.

A hexon trimerek felszíne ideális esetben háromszoros forgási és hármass tüköröződési szimmetriát mutat. Az egyes hexonok a lapokon a $p3$ hálózat szerint helyezkednek el és megtalálható az elrendeződésben az eltolási, a forgási, a horizontális és a vertikális tüköröződési szimmetria és ezek kombinációi, továbbá a csúsztatva tüköröződés és az antiszimmetria is. Minden lapnak és minden öt lapból álló csúcsnak van antiszimmetrikus párja. Minden háromszögű lap három csúcs létrehozásában vesz részt és minden lapnak három legközelebbi szomszédja van. A lapokon az NCs hexonok polipeptid alegységei azonos, az úramutató járásával ellentétes

irányultságúak, de a szomszédos lapok orientációja egymáshoz viszonyítva mindig ellentétes irányú. Az ötszörös szimmetriatengelyen egy adott lap a szomszédos lapra "átfordítható", vagy az összes többire "átforgatható" és felveszi annak a lapnak az orientációját, amelyre került. Így minden lap a hozzá tartozó polipeptidekkel együtt húszszoros szimmetriát mutat. A kapszidon a hat ötfogású tengelyre merőlegesen halad 10-10 háromszögű lapból álló és $10 \times 36^\circ$ -ban hajlott geodétikus (egyenlítői) szalagpalást. Egy háromszögű lap három szalagpalást felépítésében vesz részt, melyek 60° -os szögben metszik egymást. A 12 csúcs, a 20 lap és a 30 él együttesen megfelel 62 "billenési" pontnak és ha a test átbillen vagy egy képzeletbeli belső középponton folyamatosan átfordul más pontokra, 62 helyzetvariációt hozhat létre.

Tehát az ikozahedrális kapszidot felépítő hét különböző típusba tartozó, több mint 1500 polipeptid molekula mindegyike részét képezi több szimmetriatípusnak és –rendszernek. A polipeptid molekulák helyzete az 5-, 3- és 2-fogású szimmetriarendszereken belül szimmetrikus és a különböző szimmetriatípusok és –rendszerek egymást átfedve egyszerre vannak jelen a kapszidban. A kapszid bármely szimmetriatengelyen való forgásánál szimmetriarendszereik nagy multiplicitással egyidejűleg, párhuzamosan érvényesek és „működőképesek”. Az adenovírus kapszid szimmetriatípusai és –rendszerei megfelelnek az ikozahedrális szimmetria szabályainak, de a különböző építőelemek több mélységi szintben való jelenléte és elhelyezkedési- és eloszlási rendje nagymértékben gazdagítja, és bonyolultabbá teszi azt.