

AZ ADENOVÍRUS HEXONFEHÉRJE SZERKEZETE ÉS AGGREGÁLÓDÁSA

ÁDÁM ÉVA, az orvostudományok kandidátusa és NÁSZ ISTVÁN, az MTA levelező tagja

Közlésre érkezett: 1982. III. 28.

Az adenovírusok felfedezéséről beszámoló első közlemény (Rowe és mtsai 1953) megjelenése óta eltelt csaknem 30 esztendő alatt több mint 100 emberi és állati eredetű adenovírus típus (species) vált ismertté (Bodon és mtsai 1979, Wigand és mtsai 1980, Matthews 1979, Wigand és mtsai 1982). Tanulmányozásukat megkönnyítette az, hogy az adenovírusal fertőzött sejtekben a vírus-szaporodás során sejtenként 5 000—20 000 víruspartikula termelődik (Green 1966), sőt a megtermelődött vírusspecifikus fehérjéknek is csak relatíve kis mennyisége használandó fel a komplett virionok kialakításához, kb. 80—95%-a szolubilis formában található meg a fertőzött sejtekben, illetve azok tápfolyadékában (Horwitz és mtsai 1969), ahonnan kivonhatók, tisztíthatók és számos fizikai, kémiai, immunológiai és morfológiai vizsgálat elvégzését teszik lehetővé.

A legtöbb vírus esetében a fehérjeburkot felépítő kapszomereket alkotó polypeptid alegységek közötti összetartó erő túl gyenge ahhoz, hogy a fertőzött sejtekből azokat natív formában izolálni lehetne, az adenovírusok esetében azonban olyan erős — de nem kovalens — kötés tartja össze a kémiai alegységeket, hogy azok intakt formában nyerhetők ki a fertőzött sejtekből és minden tulajdonságukban megegyeznek a virion roncsolásával nyert kapszidfehérjékkel (Ginsberg 1979).

Az adenovírus kapszidjában legnagyobb mennyiségben az ún. hexon kapszomer található. Az ikozahedralis szimmetriájú kapszidot felépítő 252 kapszomer (morfológiai egység) közül 240 a hexon (Horne és mtsai 1959), mely a virion össztömegének mintegy 53%-át alkotja.

A vírusszaporodás során a keletkezett hexonfehérjének csak kb. 10%-a épül be a virionba. A túltermelés ilyen nagy foka és a sejtéből való kivonás és tisztítás lehetőségének megteremtése miatt ma talán az adenovírus hexon az egyik legjobban tanulmányozott és ismert vírusspecifikus fehérje.

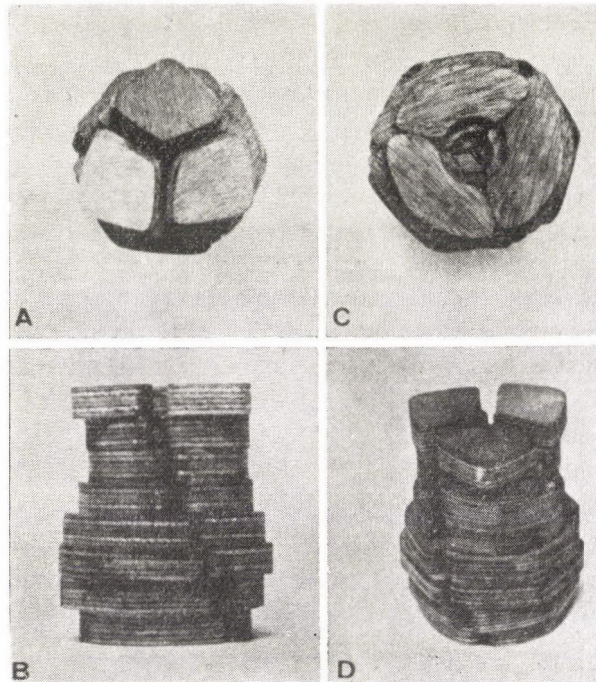
A hexon morfológiája

Az adenovírus hexonnal végzett első elektronmikroszkópos vizsgálatok a kapszomert gömbszerű képződménynek írták le (Horne és mtsai 1959), majd az 5-ös típusú adenovírusból roncsolással nyert hexonok vizsgálatánál kimu-

tatták, hogy a hexon olyan poligonális, rúdszerű képződmény, melynek legnagyobb kiterjedése 8,0 nm és a közepén 2,5 nm átmérőjű lyuk helyezkedik el (Wilcox és Ginsberg 1961). Az elektronmikroszkópok feloldóképességének növekedése, valamint a freeze-etching és freeze-drying technikák bevezetése a vizsgáló módszerek közé (Nermut 1975) a hexon szerkezetének finomabb feltárását eredményezte. Eszerint a hexon felépítése közelebb áll egy olyan háromszögű prizmaéhoz, amelynek lapja $8,5 \times 9,9$ nm, keskenyebbik vége pedig 7,5 nm nagyságú és a hexon csúcsánál egy 2,5—3,5 nm átmérőjű lyuk látszik.

Az adenovírusok kapszidja hőkezelés hatására gyorsan ún. nonamerekké esik szét (Russel és mtsai 1967). Ez a meghatározott alakzatban együttmaradó kilenc hexonból álló képződmény csak további erőteljes behatásra esik szét hexon monomerekre. A kapszid *in vitro* rekonstrukciójánál azt találták (Pereira és Wrigley 1974), hogy a nonamerek kétféle pozícióban, jobbos és balos elrendezésben is adszorbeálódhatnak a gridhez.

Nermut és Perkins (1979) vizsgálatai szerint, a hexonok az elektronmikroszkópos griden alulról, mintegy 2—3 nm vastagságban festődnek, tehát az elektronmikroszkópos vizsgálatkor mindig azt a hexon-vég profilt tanulmányozhatjuk csak, amely a gridhez adszorbeálódott, s a kép lényegében független

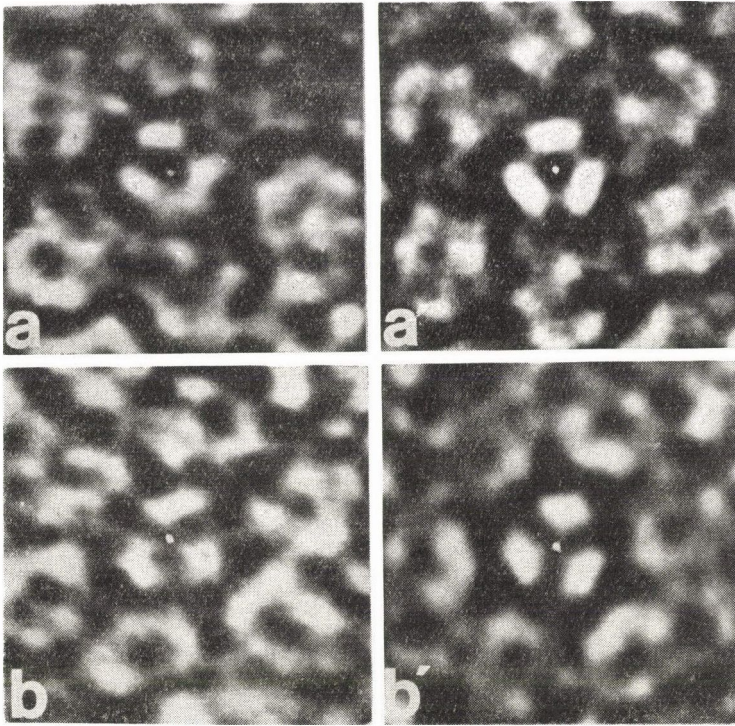


I. ábra. Elektronmikroszkópos vizsgálat és számítógépes modellezés segítségével kialakított hexon-modell. A: a hexonnak a virionban kifelé tekintő végének és C: a hexonnak a virion kapszidjában befelé tekintő végének profilja, B és D: a hexonnak oldal-, illetve felülnézeti képe (Nermut 1980)

a részecske „magasságától”. A hidrofób formvar-szén bevonathoz a nonamerek 90%-a balos pozícióban kötődik, jobbos felépítésű nonamer csak akkor mutatható ki, ha hidrofil, vagy pozitívan töltött mikrostélyra történik az adszorbeálás.

Az elektronmikroszkópos felvételek birtokában, számítógépes modellezéssel a hexon új, háromdimenziós modelljét dolgozták ki (Nermut és Perkins 1979). A modell szerint (1. ábra) a hexon alsó, azaz a vírus kapszidban eredetileg a virion belseje felé néző végének átmérője 7,5–8,0 nm, a közepén levő megközelítőleg kerek lyuk pedig 2,5–3,0 nm átmérőjű. A virionban kifelé tekintő vég átmérője 8,5–9,0 nm és a három polypeptid alegység között Y alakú rés van. Ezért a hexonok két végének profilja különböző. A hexonon végighúzódik egy csatorna, amely belül igen szűk, de a hexon bázisa felé kissé kiszélesedik. A hexon alsó (befelé tekintő) és a külső vége közötti rész (derék-rész) hexagonális (Burnett és mtsai 1978, 1979, Nermut és Perkins 1979), átmérője 8,5–9,6 nm. A hexon csúcsa kb. 30°-os elfordulást mutat a hexagonális középső, illetve az alsó részhez képest. Burnett és mtsai (1978, 1979) RTG-diffrakciós vizsgálatai és a számítógépes modellezés (Nermut és Perkins 1979) segítségével szerkesztett hexon-modellből kialakítható kapszid szerkezet zártabb, stabilabb, mint a korábbi (Nermut 1975) hexon-modell alapján elképzelhető volt. A korábbi elképzelés szerint ugyanis a kapszid porózusabb volt, a hexonok között nagyobb molekulák számára is átjárható tér maradt és a kapcsolódás is sokkal lazább volt, mint abban a szerkezetben, amelyben a hexon középső részén a két végéhez képest kiszélesedő, hexagonális rész van. Ez a szerkezet valószínűleg csak ionvándorlást tesz lehetővé a virion belseje és a környezet között (Nermut 1980).

Különböző fizikai és kémiai módszerekkel kimutatták, hogy a hexonokat felépítő három polypeptid alegység azonos egymással (Grütter és Franklin 1974) és a hexont alkotó polypeptidek a komplett hexonban háromszoros szimmetriát mutatnak (Boulanger 1975). Az 5-ös típus esetében kétféle hexonprofil létezését írták le a nonamerekben (Nermut és Perkins 1979). Vizsgálatainkban — melyek a kétdimenziós hexon kristálylemez szerkezetének megismerésére irányultak (lásd később) — magunk is kimutattuk a kétféle hexonprofil létezését az 1-es típusú adenovírus hexonnál (Ádám és Nász 1981a, b). Bár a negatív kontrasztfestésnél ritkán látszik világosan a hexont felépítő három kémiai alegység, azaz a három polypeptid (ennek oka a negatív festék eloszlási módja, vagy a polypeptidek flexibilis voltából következően azok egyik végének elmozdulása vagy elhajlása a másik végéhez képest), számos esetben figyeltünk meg olyan hexonokat, ahol a gyűrűk falában, a polypeptideknek megfelelően három elektrondenz terület látszik. Már a kétdimenziós hexon kristálylemez direkt vizsgálatánál is találtunk olyan kapszomereket, amelyekben világosan látszik a három polypeptid. A két egymástól eltérő hexonprofil akkor vált kifejezetté, amikor a komplett hexont felépítő polypeptidek szim-



2. ábra. a) A kétdimenziós hexon kristálylemez részlete és Markham-féle rotációs integrációval készített képe (a'). Jól elkülöníthető a centrális hexont alkotó három, megközelítőleg kerek rést bezáró, kissé lekerekített téglalap alakú polypeptid alegység, melyek között intrahexonális összekötő elemek figyelhetők meg; b) A kétdimenziós kristálylemez részletében a rotációs módszerrel készített képen (b') a centrális hexon három polypeptid alegysége között Y alakú rés látható. Nagytás: kb. 1 200 000 \times . Háromszoros rotáció

metriaviszonyainak vizsgálatára a Markham-féle rotációs integráció módszerét alkalmaztuk (Markham és mtsai 1963). A kétdimenziós hexon kristálylemezben kimutatott egyik hexon-profilban a polypeptidek végeinek alakja enyhén lekerekített sarkú téglalap, melyek egy megközelítőleg kerek rést zárnak körül (2/a. ábra), a másik hexon-profil féleségben a polypeptidek között Y alakú rés látható (2/b. ábra). Ez az első közvetlen, elektronmikroszkóppal látható bizonyítéka a számítógéppel készített hexon-modell helyességének. Az utóbb leírt hexon-profil csak ritkán figyelhető meg a kristálylemezben. A hexonon belüli töltésviszonyoknak megfelelően, a hexonok az alsó — a virionban befelé tekintő — végükkel adszorbeálódnak a gridhez a kétdimenziós kristálylemez esetében is, ez a hexon-vég festődik és látszik az elektronmikroszkópos vizsgálatkor. Egy-egy fordított helyzetben beépült hexon a kristálylemez szerkezetének szabálytalanságát jelenti.

A hexont felépítő polypeptid alegységek háromszoros szimmetriája miatt — a hexonnak bármelyik végét tekintjük is — az adenovírusok a hexagonalisan

szervezett kapszidok olyan egyedi esetét jelentik, melyek háromszoros szimmetriájú makromolekulákból épülnek fel (Nermut és Perkins 1979). A kapszidhoz hasonló hexagonális rendezettség a kétdimenziós hexon kristálylemezben is kimutatható (Ádám és Nász 1979b).

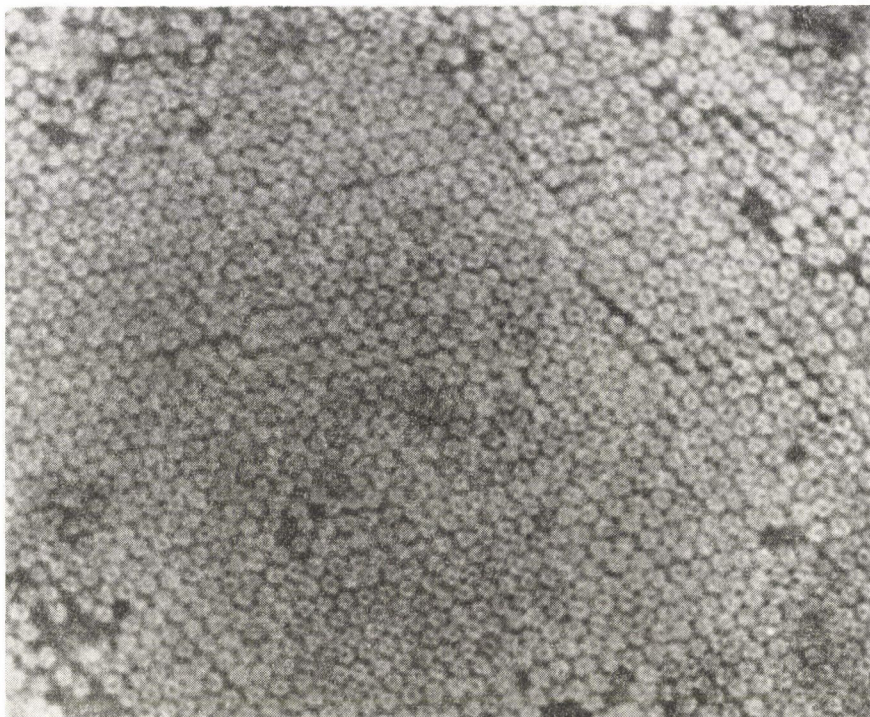
A hexon kristályosítása

Először Pereira és mtsai (1968) számoltak be arról, hogy az 5-ös típusú adenovírus tisztított hexon preparátumából megfelelő eljárást alkalmazva háromdimenziós kristály alakul ki. Ezt követően még néhány munkacsoport kristályosított az 5-ös, illetve a 2-es és 6-os adenovírus típusokból előállított hexonkészítményeket (Cornick és mtsai 1971, Franklin és mtsai 1971, Döhner és Hudemann 1972, Boulanger és Puvion 1973). A kristályok alakja csaknem minden esetben tetraéder volt. Mi magunk az 1-es típusú adenovírussal fertőzött sejtekből kivont és tisztított hexon preparátum 0,5 mol/l acetátpufferrel szembeni dialízisével kidolgoztuk a rutinszerű kristályosítás lehetőségét (Nász és Ádám 1977). Az adenovírus hexon az első vírus alegység fehérje, amelyet sikerült kristályosítani.

RTG diffrakciós vizsgálattal megállapították, hogy mind a 2-es típusú adenovírus hexonkristály (Franklin és mtsai 1971), mind pedig az 5-ös típusú hexonkristály (Cornick és mtsai 1971) a $P2_13$ köbös szerkezetű kristályok közé tartozik, az elemi cella mérete 14,99 nm és minden cella négy hexont tartalmaz. Hasonló eredményeket adott az 1-es típusú adenovírus hexonkristályának elektrondiffrakciós vizsgálata is, bár az elemi cella méretét néhány nm-rel nagyobbak találtuk (Nász 1979—1980). Mivel az egységnyi cellában 12 aszimmetrikus egységet találtak, minden egyes hexonban 3 kristálytanilag aszimmetrikus egységet kell feltételezni és a hexon tengelye párhuzamos a szimmetria tengelyével (Cornick és mtsai 1973).

Az 1-es típusú adenovírus hexon kristályosításakor sorozatos elektronmikroszkópos vizsgálatot végeztünk a kristályosodási folyamat nyomonkövetésére (Ádám és Nász 1979a, b). Kimutattuk, hogy az aggregálódást kiváltó dialízist követően már néhány óra múlva a hexonok kisebb, rendezett csoportokba tömörülése figyelhető meg, a folyamat előrehaladtával pedig több ezer hexonból álló kétdimenziós kristálylemezek alakulnak ki (3. ábra). Ugyancsak elektronmikroszkópos vizsgálattal „háromdimenziós”, többretegűnek tűnő mikrokristályok kialakulását is megfigyeltük (4. ábra), melyek szabályos belső szerkezettel rendelkeznek (Ádám és Nász 1980). Ez a megfigyelésünk világviszonylatban is első.

A kétdimenziós hexon kristálylemez szerkezetének részletes elemzésekor kitűnik, hogy a hexagonális rendezettség mellett szabálytalanságok is kimutathatók a szerkezetben (Ádám és Nász 1979b). A hexonsorok nem párhuzamosak.

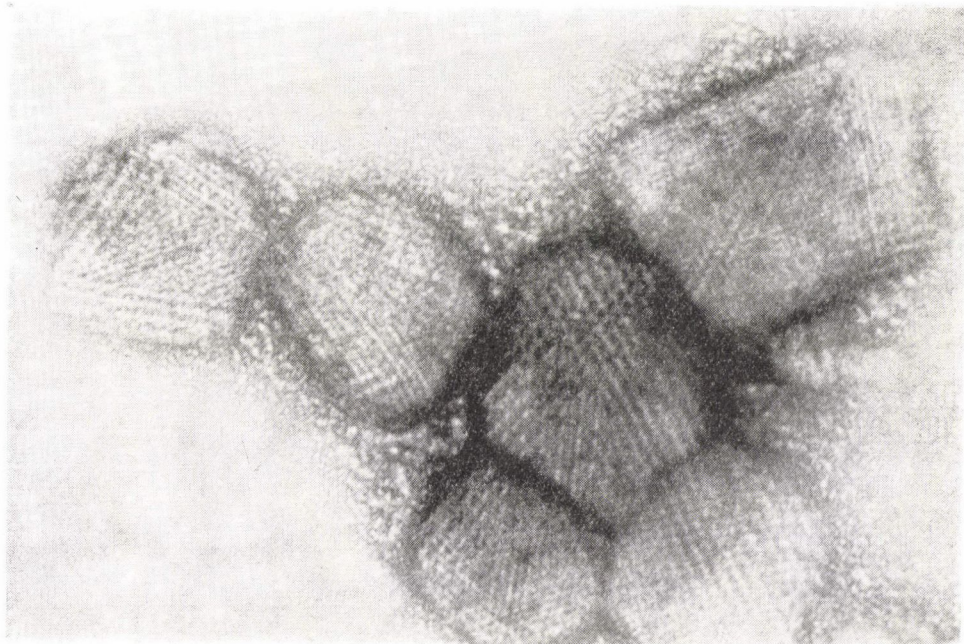


3. ábra. A hexon kristályosítása során kialakult kétdimenziós hexon kristálylemez elektronmikroszkópos képe. Nagyítás: 300 000 ×

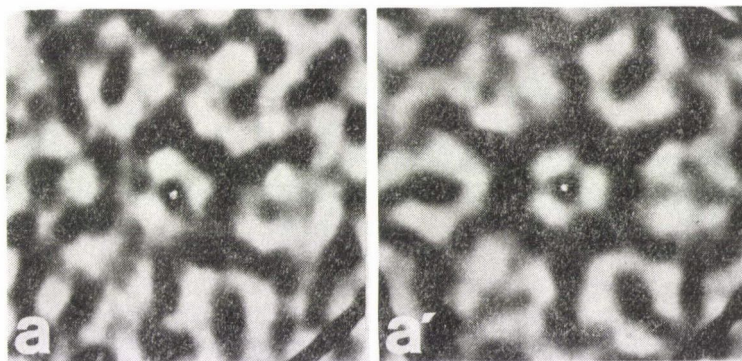
zamos irányokban mért rácscsillapítási értékek átlagában szignifikáns eltérés van, a kétdimenziós hexon kristálylemezben a hexonok kissé ferde és szabálytalan hexagonális rendszert alkotnak.

A kétdimenziós hexon kristálylemez — szerkezeténél fogva — alkalmas optikai diffrakcióval történő tanulmányozásra is. A fénymikroszkópra adaptált eljárással kimutattuk, hogy a szerkezetre jellemző diffrakciós maximumok intenzitása eltérő és relatíve kevés számú orderben jelennek meg, ami a kristályrács rövid- és hosszútávú szabálytalanságára utal (Ádám és Nász 1980, Ádám 1981). A reflexiós maximumok távolságából számított rácscsillapítási értékek a direkt analízis eredményeivel egybehangzóan igazolták, hogy a kétdimenziós hexonkristály szerkezete kissé ferde hexagonális felépítésű.

A kétdimenziós kristálylemez különösen alkalmas a hexonok és a hexonokat felépítő polypeptid alegységek kölcsönös orientációjának és kapcsolódási módjának vizsgálatára, mivel abban a periodikusan ismétlődő információk relatíve nagy területen találhatók. Az elektronmikroszkópos felvételek direkt vizsgálata és a különböző képjavítási eljárások bevezetése (Markham-féle rotációs integráció és számítógépes képelemzés) lehetővé tette a kétdimenziós kristálylemez szerkezetének megismerését a hexonok és a komplett hexo-



4. ábra. Lineáris belső szerkezettel rendelkező hexon mikrokristályok elektronmikroszkópos képe. Nagyítás: 200 000 ×



5. ábra. a) A kétdimenziós kristálylemez részletének elektronmikroszkópos képe. A Markham-féle rotációs integráció módszerével (a') készített képen jól látszanak a centrális hexont felépítő polypeptid alegységek és megítélhető, hogy a polypeptid alegységek mindegyikéhez a szomszédos hexonok két-két polypeptid alegysége esik a legközelebb. Háromszoros rotáció. Nagyítás: kb. 1 000 000 ×

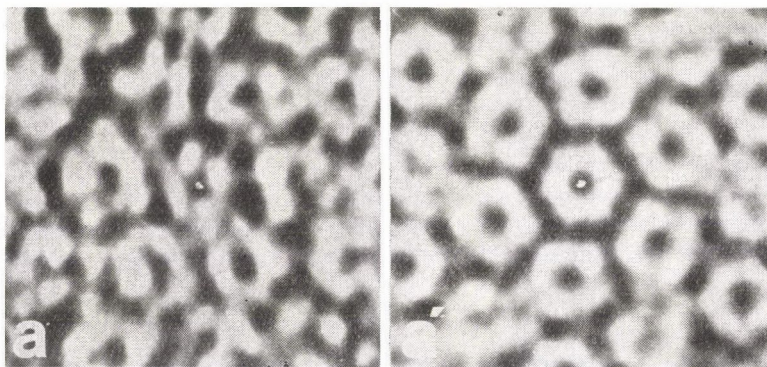
nokat felépítő polypeptidek szintjén (Ádám és mtsai 1979—1980, Ádám és Nász 1981a, b). A kristálylemez kisebb körülírt területein, a szomszédos hexonok polypeptidjei között leírt „egy a kettőhöz” való orientálódási, közeledési rendszer azt jelenti, hogy a hexont felépítő egyes polypeptidek oldalához mindig a szomszédos hexon két polypeptidjének vége kerül a legközelebb (5. ábra).

Így a kétdimenziós kristálylemezben a komplett hexonok és az azokat felépítő polypeptid alegységek equivalens környezetben vannak a hexagonalis elrendződés és a háromszoros szimmetria szerint. Ez az orientáció általános lehet nemcsak a kétdimenziós kristálylemezben, hanem az adenovírus kapszidjában is (Nász 1979—1980).

Az 1-es típusú adenovírus hexonból létrejött kétdimenziós kristálylemez szerkezetének vizsgálatakor *interhexonalis összekötő* elemek létezését is kimutattuk (Ádám és Nász 1981b). Ezek hozzák létre az „egy a kettőhöz” való *kapcsolódási* rendszert, mert minden egyes hexon minden egyes polypeptid alegysége és a szomszédos hexon két polypeptid alegysége között helyezkednek el. Ez azt jelenti, hogy szabályos esetben egy adott centrális hexontól az őt körülvevő hat szomszédos hexonhoz hatszor két párhuzamos összekötő elem halad (6. és 7. ábra). A hexonok közötti összekötő elemek létezését elektronmikroszkópos felvételek bizonyítják az 1-es típusú adenovírus kapszidjában is (Nász 1979—1980). Nemcsak a hexonok között mutatható ki finom összekötő híd, hanem a hexont alkotó három polypeptid alegység között is egy adott komplett hexonban (2/a. ábra) (Ádám és Nász 1981b). Az összekötő elemek háttér granulációtól való elkülönítését nagyban elősegítette az ún. alulfókuszolási technika bevezetése (Yabe és mtsai 1979), a szimmetriaviszonyok megismerését pedig a Markham technika (Markham és mtsai 1963) alkalmazása.

A komplett hexon molekulásúlya

A hexon molekulásúlyának meghatározására irányuló vizsgálatok még azonos típusok esetén sem eredményeztek azonos értékeket. Analitikai ultracentrifugálással (Pettersen és mtsai 1967), a kristályosított hexon sűrűségi

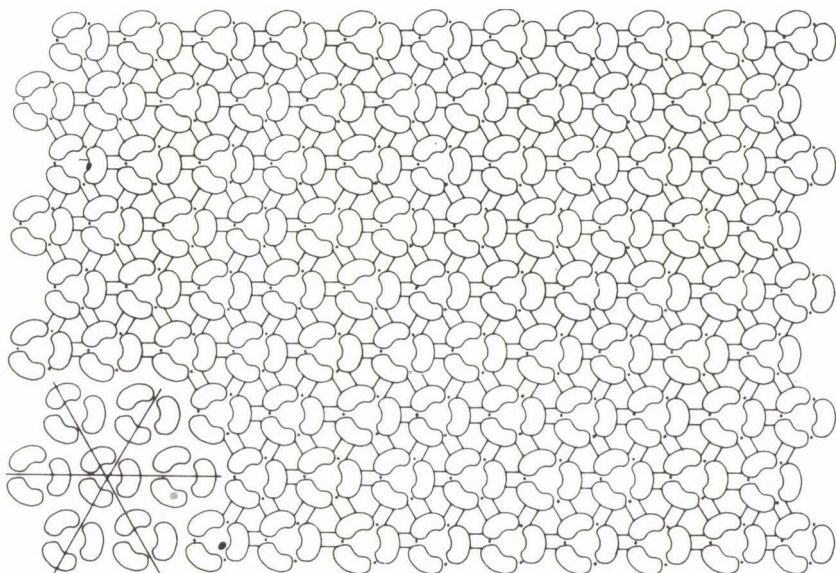


6. ábra. A kétdimenziós kristálylemez részletének elektronmikroszkópos (a) és Markham-féle rotációs integráció módszerével készített képe (a'). Szabályos esetben a centrális hexontól az őt körülvevő hat szomszédos hexonhoz hatszor két párhuzamos összekötő elem halad. Hatszoros rotáció, ezért a háromszoros szimmetriával rendelkező centrális hexon három polypeptidjének profiljai elmosódnak. Nagyítás: kb. 1 200 000 ×

grádiensben való ultracentrifugálásával, a denzitás alapján meghatározva a molekulásúly értékét (Franklin és mtsai 1971, Cornick és mtsai 1971) vagy gélfiltrációt és akrilamid-gél elektroforézist alkalmazva (Nász és mtsai 1972) a különböző típusú adenovírusok hexonjainak molekulásúlya 282 000 és 413 000 között mozgott. Nemesak a különböző humán eredetű adenovírusok hexonjának molekulásúlya, hanem a humán és a bovin eredetű adenovírusok hexonjának molekulásúlya között is eltérés mutatható ki (Belák 1978).

A komplett hexonok molekulásúlyában kimutatható különbség természetesen már az őket felépítő polypeptidek molekulásúly különbségében is megmutatkozik. Így például az 5-ös típusú adenovírus hexonból előállított hexonkristály denzitása alapján kalkulált érték a komplett hexonra 282 000—315 000 (Franklin és mtsai 1971), azonos módszerrel a 2-es típus esetében 362 000—413 000 (Franklin és mtsai 1971). Ugyanezen típusok hexonjának polypeptid aleggységeit vizsgálva kimutatták, hogy az 5-ös típus felépítő polypeptid molekulásúlya mintegy 15 000-rel kisebb, mint a 2-es típus azonos polypeptidjére meghatározott érték (Jörnvall és mtsai 1975, Ginsberg 1979).

A molekulásúlybeli eltérés megmutatkozott a szedimentációs koefficiens értékében is (Grütter és Franklin 1974).



7. ábra. A kétdimenziós hexon kristálylemez szerkezetének tentatív diagramja, mely a hexon polypeptidek és az összekötő elemek lehetséges kölcsönös orientációját mutatja. Szemlélteti a hexon polypeptidek „egy a kettőhöz” való kötődését a hexonok között és a hexonokon belül. Az orientáció megfelel a háromszoros szimmetriának és a hexagonalis elrendezésnek. Az interhexonalis összekötő elemeket a hexonok között vonalak, az intrahexonalis összekötő elemeket a hexon polypeptidek között pontok jelölik. A hexonsoroknak megfelelő tengely (bal alsó sarokban berajzolva) egy adott hexon két polypeptidje között és a harmadikat felezve halad

A hexon izoelektromos pontja

Az adenovírusok kapszidján belül — annak szerkezetéből adódóan — nem mindegyik hexon van azonos környezetben. A csúcsi kapszomer körül elhelyezkedő hexonok, az ún. peripentonalis hexonok (Prage és mtsai 1970) ugyanis egyfelől a pentonhoz, másfelől pedig hexonhoz kapcsolódnak. Az ikozahéder egyetlen háromszögű lapját tekintve is három különböző hexonféleséget különböztettek meg (Shortridge és Biddle 1970), melyek közül az egyik az előbb említett peripentonalis hexon, a másik az éleken elhelyezkedő, de nem peripentonalis hexon, a harmadik hexonféleség pedig a lapok közepén található. A roncsolási vizsgálatok szerint ez utóbbiak kötődnek egymáshoz a legerősebben és izoelektromos pontjuk pI 4,7. A penton körüli hexonokra meghatározott érték pI 3,1 és az élek közepén található két hexon izoelektromos pontja pI 3,7 az 5-ös típusú adenovírus esetében (Shortridge és Biddle 1970). Az 1-es típusú adenovírusal fertőzött sejtekből kivont és tisztított hexon izoelektromos pontja pI 4,55 (Ádám és mtsai 1977), ez megközelíti az 5-ös típus esetében a lapok közepén található hexonokra meghatározott pI értéket és arra utal, hogy a szolubilis hexonpopulációban ez a hexonféleség dominál. A 2-es típusú adenovírus szaporodása során egy olyan hexonpopulációt mutattak ki, amely csak a fertőzött sejtekben vagy azok felülírójában található, a virion kapszidjában nem, és amelynek izoelektromos pontja eltér az előbb leírtaktól, értéke magasabb azoknál (pI 4,9) (Boulangier és mtsai 1978).

A hexon antigénszerkezete

A virion kapszidjában legnagyobb mennyiségben található hexonfehérje csoportspecifikus antigéndeterminánsokat hordoz. A közös komplementkötő antigén ellen termelt ellenanyag keresztreakciót ad a Mastadenovírus genusba tartozó adenovírusokkal (Valentine és Pereira 1965, Norrby 1966, Matthews 1979), ilyen keresztreakció azonban nem figyelhető meg az Aviadenovírus genus tagjaival (Matthews 1979). A Mastadenovírus genus tagjai között tapasztalható szerológiai keresztreakció összehasonlíthatatlanul nagyobb az egyes alcsoportok (subgenus) tagjai között, mint a különböző alcsoportok tagjai között (Stinski és Ginsberg 1975). Ezt a reaktivitás fokában mutatkozó különbséget ugyanazon alcsoporton belül és az alcsoportok között, intra- és intersubgroup specificitásnak nevezték el (Philipson és Petterson 1973). A csoportspecifikus rész mellett a hexonban típuspecifikus antigénkomponens is található. A virion kapszidjában csak a típuspecifikus antigéndetermináns hozzáférhető az ellenanyagok számára, így feltehetően a hexonnak eltérő régiói hordozzák a megfelelő antigénkomponenseket. Kimutatták, hogy a csoportspecifikus antigén a virion belseje felé tekintő hexonvégen, míg a típuspe-

cifikus rész a hexon kifelé tekintő végén található (Ginsberg 1979). Így a szerológiai reakció topológiai felismerésre is lehetőséget nyújt. A szolubilis hexonban természetesen a típuspecifikus rész mellett a csoportspecifikus antigén is hozzáférhető az ellenanyagok számára (Pereira és Laver 1970), a virion kapszidjában azonban csak a típuspecifikus antigén reagál az ellenanyagokkal (Norrby és mtsai 1969). Ily módon a hexon típuspecifikus komponense ellen termelt ellenanyag a vírus fertőzőképességét semlegesíteni képes (Pereira és Laver 1970). A különböző adenovírus típusok hexonjai eltérő mértékben képesek kiváltani neutralizáló ellenanyag képződését (Pettersson és mtsai 1967).

A 2-es és 5-ös típusú adenovírusokkal végzett kísérletekben kimutatták (Pettersson 1971), hogy a fertőzött sejtekben legalább két hexonpopuláció van, amelyek közül csak az egyik képes típuspecifikus ellenanyagtermelés indukálására. A két hexonpopuláció vándorlási sebessége elektromos térben eltérő volt, amit egy olyan speciális polypeptid komponensnek tulajdonítottak, amely csak a lassabban vándorló hexonban van meg. Ennek a „lassú” hexonnak mintegy ötvenszer nagyobb a neutralizáló aktivitása. A „lassú” hexon polypeptid aegysége 50—60 aminosavval rövidebb a másik, 115 000 molekulásúlyú polypeptidnél, mely a virion kapszidjában és a felülúszóban is található „normál” hexon alkotórésze. A virion kapszidjában „lassú” hexon nem található. Boulanger és mtsai (1978) kimutatták, hogy a „lassú” hexonban kétszer annyi típuspecifikus antigéndetermináns van, mint a kapszidba is beépülő hexonban. Izoelektromos pontjuk is eltér egymástól.

Különböző enzimekkel végzett emésztési kísérletek szerint, a kezelésre a csoportspecifikus rész károsodik, míg a típuspecifikus rész érintetlen marad (Pettersson 1971). Tripszin kezelésre azonban a hexonnak sem immunológiai aktivitása, sem morfológiája nem változik, annak ellenére, hogy az enzim a polypeptidbe több helyen is belevág (Pereira és Skehel 1971, Jörnvall és Philipson 1980).

Döhner és Dieckmann (1978) kimutatták, hogy a hexonon legalább 20 determináns csoport van, melyek fele típuspecifikus, másik fele csoportspecifikus antigéndetermináns. Hibridoma sejtekkel termeltetett monoklonális ellenanyagok újabb bizonyítékokat szolgáltattak arra, hogy a hexon csoport- és típuspecifikus antigéncsoportokat hordoz (Russel és mtsai 1981).

Az adenovírusok szolubilis antigénjeit emberi immunizálásra is alkalmazták (Kasel és mtsai 1966). A neutralizáló ellenanyagok kialakulása — a hexon reaktivitása — liposzomák vagy Freund-adjuváns jelenlétében nagyobb, mint vizes oldatban (Kramp és mtsai 1979). Couch és mtsai (1973) kristályosított adenovírus hexonnal önkénteseket immunizálva a neutralizáló ellenanyag szignifikáns növekedéséről számoltak be.

Polypeptidek

Az adenovírusok kettős fonalú lineáris DNS-e $20\text{--}25 \times 10^6$ molekulasúlyú (Tooze 1980), és a benne foglalt genetikai információ $20\text{--}40$ közepes méretű fehérje kódolására nyújt elegendő információt (Ginsberg 1979). Most csak a hexonnal kapcsolatban levőkről teszünk említést.

Az adenovírusokban kimutatható polypeptideket római számmal jelölik. Ezek közül a II jelű polypeptid a hexont építi fel oly módon, hogy három II jelű polypeptid található egy komplett hexonban (Grütter és Franklin 1974). A kapszomereket alkotó polypeptidek mellett a virion kapszidjának sok más alkotórésze is van (Everitt és mtsai 1973). Ezek közül kettőt a hexonnal kapcsolatban mutattak ki (Everitt és Philipson 1974, Everitt és mtsai 1975), melyek a VI-os és VIII-as jelű polypeptidek. Sem a VI-os, sem pedig a VIII-as polypeptid ellen termelt ellenanyag nem reagál az intakt virionnal, ami arra enged következtetni, hogy ezek a polypeptidek a hexon bázisánál — a virionban a hexon befelé tekintő végénél — teremtenek kapcsolatot a hexonok között. A VI-os polypeptid nemcsak a lapokon és éleken elhelyezkedő hexonok között mutatható ki, hanem a peripentonalis hexon és a penton között is (Everitt és mtsai 1975), a VIII-as ezzel szemben csak az éleken és lapokon található a hexonok között (Everitt és mtsai 1973). A IX-es jelű polypeptidet a nonamerok között mutatták ki (Boulanger és mtsai 1979, Lemay és Boulanger 1980) és nonamerenkénti számát 15-nek adták meg. Feltehetően a vírus kapszid stabilizálásában is szerepet játszhat. A IX-es polypeptid ellen termelt ellenanyag kismértékben képes az intakt virion precipitálására, ami arra utal, hogy a virion felszínéhez közelebb helyezkedik el a hexonok között (Everitt és mtsai 1975).

A IIIa jelű polypeptid csak a peripentonalis hexonokkal van kapcsolatban oly módon, hogy a penton és a peripentonalis hexon között helyezkedik el (Everitt és mtsai 1975). Az ún. 100K protein „állványozó” szerepet tölt be a hexon morfogenezisében, a komplett hexon kialakulása során (Everitt és mtsai 1975) tehát nem struktúrfehérje.

Polypeptid szintézis, a hexon kialakulása

A DNS replikációját követően már 4—5 óra múlva kimutathatók a kapszid komponenseket alkotó polypeptidek a fertőzött sejtben (Flint 1977), kivételesen csak a IX jelű polypeptid képez (Persson és mtsai 1978), melynek szintézise mechanizmusában eltér a késői polypeptidek szintézisétől (Chow és mtsai 1977, Evans és mtsai 1977, Petterson és Matthews 1977). Ez a polypeptid ugyanis a kapszidfehérjék megjelenése előtt már kimutatható a fertőzött sejtben és akkor is termelődik, ha a DNS replikációját AraC-vel blokkolják (Harter és Lewis 1977).

Különböző mutánsokkal (ts mutánsok) végzett kísérletekben kimutatták, hogy a hőmérsékletnek szerepe van a kémiai alegységek (polypeptidek) morfológiai egységgé (kapszomerré) történő összeépülésében (Leibowitz és Horwitz 1974, Waroquier és Boulanger 1973). A 42 °C hőmérsékleten keletkező hexon polypeptidek nem képesek trimerré — komplett hexonná — összekapcsolódni (Russel és mtsai 1974). Más ts mutánsokkal végzett kísérletek szerint olyan hexonok is kialakulhatnak, melyek immunológiai szempontból reakcióképesek, de nem képesek bejutni a sejtmagba (Kaufmann és Ginsberg 1976), ahol a virion összeépülése történik. A másik lehetőség pedig az, hogy a non-permissiv hőmérsékleten szintetizálódott polypeptidekből összeépült hexon ugyan bejut a sejtmagba, de mégsem képes beépülni a virion kapszidjába (Ensinger és Ginsberg 1972, Ginsberg 1979). Azokban a mutánsokban, amelyeknél csak a 100K (nem struktúr) protein szintézisében van zavar, a hexon polypeptidek szintén nem képesek trimerré összekapcsolódni. Ez a 100K protein „állványozó”, az összeépülést segítő szerepét igazolja, vagy olyan módosító szerepre utal, ami segíti a hexon kialakulását.

A hexon struktúrgénje

Garon és mtsai (1973) kimutatták, hogy az azonos subgenusba tartozó adenovírusok hexonját kódoló DNS szakasz genetikai szerkezete nagyon hasonló. Így a 2-es és 5-ös típusú adenovírusok DNS-e között, a hexont kódoló régióban csak a 0,50 és 0,60 genom egység között van nukleotida sorrend eltérés. A különböző restriktációs enzimekkel végzett kísérletek szerint az eddig vizsgált humán adenovírusok hexon génje a 0,50—0,60 genom egység közé esik (Akusjärvi és Petterson 1978a, b, Berget és mtsai 1977, Chow és mtsai 1977, Flint 1977, Grodzicher és mtsai 1977, Weber és Hassel 1979).

A hexon aminosav összetétele és a hexon polypeptid aminosav-sequenciája

A különböző szerológiai típusú adenovírusok hexonjának aminosav összetétele a különböző laboratóriumokban végzett vizsgálatok szerint hasonló egymáshoz (Boulanger és mtsai 1969, Petterson 1971, Philipson és mtsai 1975, Ádám és mtsai 1977). A hexon relatíve nagyszámú, hidrofób kötést eredményező aminosavval rendelkezik, melyek valószínűleg a multimer szerkezet stabilizálásában játszanak szerepet. Szabad szulfhidril csoportok jelenlétét finomabb analitikai módszerekkel mutatták ki (Ginsberg 1979, Jörnvall és mtsai 1975, Neurath és mtsai 1970). Először Jörnvall és mtsai (1974) mutatták ki azt, hogy az N-terminalis aminosav acetilált és meghatározták a terminalis peptid sequenciáját. Legújabb vizsgálataikban (Jörnvall és mtsai 1981a) meg-

határozták az adenovírus hexonfehérje elsődleges szerkezetét és a hexon génhez való kapcsolatát. Az adenovírus hexon CNBr fragmentumainak szétválasztásával, a hexonban elfoglalt helyük analízisével és a carboxymethylált CNBr fragmentumok kémiai analízisének eredményeképpen (Jörnvall és von Bahr-Lindström 1981, Jörnvall és mtsai 1981b, c) ma már nemcsak az adenovírusok hexonjának aminosav összetételét ismerjük, hanem a 2-es típusú adenovírus hexon proteinjének aminosav sequenciáját is, amely 966 aminosav pontos sorrendjét jelenti a hexon polypeptidben.

IRODALOM

- Akusjärvi, G. és Petterson, U.*: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **75**, 5822 (1978a).
Akusjärvi, G. és Petterson, U.: Virology, **91**, 477 (1978b).
Anderson, C. W., Baum, S. G. és Gesteland, R. F.: Virology, **12**, 241 (1973).
Ádám, É.: Kandidátusi értekezés, 1981.
Ádám, É. és Nász, I.: Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. **26**, 15 (1979a).
Ádám, É. és Nász, I.: Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung., **26**, 139 (1979b).
Ádám, É. és Nász, I.: Intervirology, **13**, 1 (1980).
Ádám, É. és Nász, I.: Intervirology, **15**, 37 (1981a).
Ádám, É. és Nász, I.: Virology, **114**, 265, (1981b).
Ádám, É., Nász, I. és Fedina, L.: Orvostudomány, 30–31, 327 (1979–1980).
Ádám, É., Nász, I. és Medveczky, P.: Kísérl. Orvostud., **29**, 311 (1977).
Belák, S.: Kandidátusi értekezés, (1978).
Berget, S. M., Moore, C. és Sharp, P. A.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **74**, 3171 (1977).
Bodon, L., Prohászka, L., Ádám, É. és Nász, I.: Acta Vet. Acad. Sci. Hung., **27**, 73 (1979).
Boulanger, P. A.: J. Virol., **16**, 1678 (1975).
Boulanger, P. A., Devaux, C. és Lemay, P.: Virology, **84**, 456 (1978).
Boulanger, P. A., Flamencourt, P. és Biserte, G.: Eur. J. Biochem., **10**, 116 (1969).
Boulanger, P. A., Lemay, P., Blair, G. E. és Russel W. C.: J. gen. Virol., **44**, 783 (1979).
Boulanger, P. A. és Puvion, F.: Eur. J. Biochem., **39**, 37 (1973).
Burnett, R. M., Grütter, M. G., Markovic, Z. és White, J. L.: EMBO Meeting Örenäs, **17**, (1978).
Burnett, R. M., Grütter, M. G., Markovic, Z. és White, J. L.: J. Supramol. Struct., Suppl. **3**, 92 (1979).
Chow, L. T., Roberts, J. M., Lewis, J. B. és Broker, T. R.: Cell, **11**, 819 (1977).
Cornick, G., Sigler, P. B. és Ginsberg, H. S.: J. mol. Biol., **57**, 397 (1971).
Cornick, G., Sigler, P. B. és Ginsberg, H. S.: J. mol. Biol., **73**, 533 (1973).
Couch, R. B., Kasel, J. A., Pereira, H. G., Haase, A. T. és Knight, V.: Proc. Soc. Exp. Biol., (N. Y.) **143**, 905 (1973).
Döhner, L. és Dieckmann, U.: Acta Biol. Med. Germ., **37**, 1735 (1978).
Döhner, L. és Hudemann, H.: Arch. ges. Virusforsch., **38**, 279 (1972).
Ensinger, M. J. és Ginsberg, H. S.: J. Virol., **10**, 328 (1972).
Evans, R. M., Fraser, N., Ziff, E., Weber, J., Wilson, M. és Darnell, J. E.: Cell, **12**, 733 (1977).
Everitt, E., Lutter, L. és Philipson, L.: Virology, **67**, 197 (1975).
Everitt, E. és Philipson, L.: Virology, **62**, 253 (1974).
Everitt, E., Sundquist, B., Petterson, U. és Philipson, L.: Virology, **52**, 130 (1973).
Flint, J.: Cell, **10**, 153 (1977).
Franklin, R. M., Petterson, U., Akervall, K., Strandberg, B. és Philipson, L.: J. mol. Biol., **57**, 383 (1971).
Garon, C. F., Berry, K. W., Hierholzer, J. C. és Rose, J. A.: Virology, **54**, 414 (1973).
Ginsberg, H. S.: Compr. Virol., **13**, 409 (1979).
Green, M.: Ann. Rev. Microbiol., **20**, 189 (1966).
Grodzicher, I., Anderson, C. W., Sambrook, J. és Mathews, M. B.: Virology, **80**, 111 (1977).
Grütter, M. és Franklin, R. M.: J. mol. Biol., **89**, 163 (1974).
Harter, M. L. és Lewis, J. B.: In: Early proteins of oncogenic DNA viruses. (Eds.: May, P., Horne, R. W., Brenner, S., Watson, A. P. és Wildy, P.: J. mol. Biol., **1**, 84 (1959).
Horwitz, M. S., Scharff, M. D. és Maizel, J. V.: Virology, **39**, 682 (1969).
Jörnvall, H., Akusjärvi, G., Aleström, P., von Bahr-Lindström, H., Petterson, U., Appella, E., Fowler, A. V. és Philipson, L.: J. Biol. Chem. **256**, 6181 (1981a).

- Jörnvall, H., Aleström, P., Akusjärvi, G., von Bahr-Lindström, H., Philipson, L. és Petterson, U.: J. Biol. Chem. **256**, 6204 (1981b).
- Jörnvall, H., Appella, E., Fowler, A. és von Bahr-Lindström, H.: J. Biol. Chem. **256**, 6199 (1981c).
- Jörnvall, H. és von Bahr-Lindström, H.: J. Biol. Chem., **256**, 6187 (1981).
- Jörnvall, H., Ohlsson, H. és Philipson, L.: Biochem. Biophys. Res. Commun., **56**, 304 (1974).
- Jörnvall, H. és Philipson, L.: Eur. J. Biochem., **104**, 237 (1980).
- Jörnvall, H., Petterson, U. és Philipson, L.: Eur. J. Biochem., **48**, 179 (1975).
- Kasel, J. A., Alford, R. H., Lehrich, J. R., Banks, P. A., Huber, M. és Knight, V.: Amer. Rev. Resp. Dis., **94**, 168 (1966).
- Kaufmann, R. S. és Ginsberg, H. S.: J. Virol., **19**, 643 (1976).
- Kramp, W. J., Howard, R., Drake, S. és Kasel, J. A.: Infection and immunity Ang., **771**, (1979).
- Leibowitz, J. és Horwitz, M. S.: Virology, **61**, 129 (1974).
- Leibowitz, J. és Horwitz, M. S.: Virology, **66**, 10 (1975).
- Lemay, P. és Boulanger, P. A.: Ann. Virol., **131**, 259 (1980).
- Markham, R., Frey, S. és Hills, G. J.: Virology, **20**, 88 (1963).
- Mathews, R. E. F.: Intervirology, **12**, 132 (1979).
- Nász, I.: Orvostudomány, **30—31**, 107 (1979—1980).
- Nász, I. és Ádám, É.: Orvostudomány, **28**, 383 (1977).
- Nász, I., Lengyel, A. és Cserba, I.: Arch. ges. Virusforsch., **36**, 80 (1972).
- Nermut, M. V.: Virology, **65**, 480 (1975).
- Nermut, M. V.: Arch. Virol., **64**, 175 (1980).
- Nermut, M. V. és Perkins, W. J.: Micron, **10**, 247 (1979).
- Neurath, A. R., Rubin, B. A., Wiener, F. P. és Hartzell, R. W.: FEBS Letters, **7**, 114 (1970).
- Norrby, E.: Virology, **28**, 236 (1966).
- Norrby, E., Marusyk, H. és Hammar skjöld, M. L.: Virology, **38**, 477 (1969).
- Pereira, H. G. és Laver, N. G.: J. gen. Virol., **9**, 167 (1970).
- Pereira, H. G. és Skehel, J. J.: J. gen. Virol., **12**, 13 (1971).
- Pereira, H. G., Valentine, R. C. és Russel, W. C.: Nature (London), **219**, 946 (1968).
- Pereira, H. G. és Wrigley, N. G.: J. mol. Biol., **85**, 617 (1974).
- Persson, H., Mathisen, B., Philipson, L. és Petterson, U.: Virology, **93**, 198 (1979).
- Persson, H., Petterson, U. és Mathews, M. B.: Virology, **90**, 67 (1978).
- Petterson, U.: Virology, **43**, 123 (1971).
- Petterson, U. és Mathews, M. B.: Cell, **12**, 741 (1977).
- Petterson, U., Philipson, L. és Höglund, S.: Virology, **33**, 575 (1967).
- Philipson, L. és Petterson, U.: Progress in experimental tumor Res., **18**, 1 (1973).
- Philipson, L., Petterson, U. és Lindberg, U.: Molecular biology of adenoviruses. Virology monographs. 14. Springer Verlag. (1975).
- Prage, L., Petterson, U., Höglund, S., Lonberg-Holm, K. és Philipson, L.: Virology, **42**, 341 (1970).
- Rowe, N. P., Huebner, R. J., Gilmore, L. K., Parrott, R. H. és Ward, T. G.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **84**, 570 (1953).
- Russel, W. C., Patel, G., Precious, B., Sharp, I. és Gardner, P. S.: J. gen. Virol., **56**, 393 (1981).
- Russel, W. C., Skehel, J. J. és Williams, J. F.: J. gen. Virol., **24**, 247 (1974).
- Russel, W. C., Valentine, R. C. és Pereira, H. G.: J. gen. Virol., **1**, 509 (1967).
- Shortridge, K. F. és Biddle, F.: Arch. ges. Virusforsch., **29**, 1 (1970).
- Stinski, M. F. és Ginsberg, H. S.: J. Virol., **15**, 898 (1975).
- Tooze, J.: DNA tumor viruses. In: Molec. Biol. of Tumor Viruses. Part 2. (1980).
- Valentine, R. C. és Pereira, H. G.: J. mol. Biol., **13**, 13 (1965).
- Yabe, Y., Sadakana, H. és Isono, H.: Virology, **96**, 547 (1979).
- Waroquier, R. és Boulanger, P. A.: Arch. ges. Virusforsch., **41**, 371 (1973).
- Weber, J. és Hassel, J. A.: J. gen. Virol., **44**, 639 (1979).
- Wigand, R., Bartha, A., Dreizin, R. S., Esche, H., Ginsberg, H. S., Green, M., Hierholzer, J. C., Kalter, S. S., McFerran, P., Petterson, U., Russel, W. C., és Wadell, G.: Intervirology **18** 169 (1982).
- Wigand R., Gelderblom H. és Wadell, G.: Arch. Virol., **64**, 225 (1980).
- Wilcox, W. C. és Ginsberg, H. S.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **47**, 512 (1961).