

AZ ADENOVÍRUSOK ÉS ÉPÍTŐ ELEMEIK PATHOLÓGIAI ÉS BIOLÓGIAI SZEREPE*

NÁSZ ISTVÁN, az MTA levelező tagja

Közlésre érkezett: 1979 XII. 20.

Az adenovírusokat — mint ismeretes — 1953-ban fedezték fel. Intézetünkben viszonylag korán, már 1956-ban elkezdtünk az adenovírusokkal foglalkozni, több oldalról közelítve meg az egész adenovírus problémakört, általános virológiai és a hazai egészségügy kívánalmi szempontjából is. Munkánk során mindig arra törekedtünk, hogy az elméleti jelentőségű, alap kutatás jellegű vizsgálatok mellett a gyakorlat, az egészségügy közvetlen igényeiből fakadó problémákat is tanulmányozzuk és megoldásukat elősegítsük.

E cél érdekében végzett kutatásaink három fő témakörhöz tartoznak. Ezek a következők:

1. a vírusok kóroktani, pathológiai szerepének vizsgálata, a különböző sejtek és a szervezet szintjén, beleértve a pathomechanizmus tisztázására és a diagnosztika elősegítésére irányuló törekvéseket is,

2. az adenovírusok fehérjeburkát-kapszidját-felépítő különböző struktúr-fehérjék — az ún. penton, a fiber és a hexon — többirányú vizsgálata,

3. az adenovírus DNS szeparálása és vizsgálata, különböző restrikciós enzimekkel való emésztése és a megfelelő restrikciós- ill. géntérképek meghatározása.

A következőkben az e területeken *munkatársaimmal együtt* végzett kutatásainkat szeretném ismertetni a teljességre való törekvés igénye nélkül, néhány eredmény kiragadásával, ill. probléma felvetésével.

Az adenovírusok emberben különböző *légúti és szemészeti* megbetegedéseket okoznak és a *tápcsatorna* bizonyos megbetegedéseire felelősek. Szerepük lehet több, eddig *nem tisztázott etiológiájú* megbetegedésben és feltehetően a *rosszindulatú* daganatok kóroktanában is. Kísérleti állatokra az emberi eredetű adenovírusok nem patogének, kivéve egyes szerológiai típusokat, melyek bizonyos újszülött állatokban daganatot, ill. akut toxikus állapotot hoznak létre (Nász és mtsai 1967a).

A megbetegedéssel járó fertőzések mellett ismeretes, hogy bizonyos adenovírus típusok, elsősorban az 1-es, 2-es, 5-ös és 6-os szerotípusok, látszólag

* 1979. november 15-én elhangzott akadémiai székfoglaló előadás

egészséges egyének, főleg gyermekek szervezetében perzisztálhatnak, jelen lehetnek hosszú ideig *latens* módon, a szervezet különböző helyein anélkül, hogy betegséget okoznának.

Az egyik széleskörűen kutatott problémakörünk, az első fő témakörön belül, a *vírus és a sejt kapcsolata* volt, aminek a fogékony kísérleti állat hiánya kölcsönöz speciális jelentőséget. Ennek során kimutattuk — többek között — hogy az emberi eredetű adenovírus típusok a sejtkárosító ún. cytopathogen hatás jellege szerint, két egymástól jól elkülöníthető csoportba sorolhatók. Meghatároztuk több szerotípus — köztük az igen nehezen tenyésztethető 8-as típus — *szaporodási kinetikáját*, tenyésztési lehetőségét, számos különböző sejtféleségen (Nász 1961, 1963, 1968, Nász és Tóth 1958, 1959a, 1959b).

Tanulmányoztuk a hemagglutináció mechanizmusát, kimutattuk, hogy a vírus hemagglutininek a vírus partikulától elválaszthatók és leírtuk a vírus és a vörösvérsejt interakciója következtében fellépő molekuláris változásokat. Meghatároztuk — világviszonylatban is elsőként — az adenovírusok *hemagglutinációs spektrumát*, mintegy száz különböző emlős, ill. madár fajból származó vörösvérsejtek felhasználásával. Az adenovírusoknak e vizsgálataink eredményeként megismert tulajdonságait számos hazai és külföldi cikk és alapvető kézikönyv az adenovírusokat meghatározó kritériumok közt tartja számon (Nász és mtsai 1961, 1962, 1963, Nász és Pereira 1965, Lengyel és mtsai 1973, 1978).

Az egyes adenovírus antigének pontosabb megismerése mellett a *laboratóriumi diagnosztika* elősegítését célozta többek között pl. az ún. *immuno-zooforézis* technikájának az adenovírusok vizsgálata céljára való kidolgozása is (Nász 1967, Nász és mtsai 1967b, Csepulisz és mtsai 1971).

A következőkben ismertetendő, betegekre vonatkozó kísérleti eredményeket, összesen több mint 5000 betegből származó, mintegy 20 000 különféle anyag, preparátum, különböző irányú feldolgozása során nyertük.

Az adenovírusok *kóroktani* szerepének vizsgálata céljából a vírusizolációs munkák mellett szerológiai vizsgálatsorozatot végeztünk. Ebben a munkában hat éves periódus alatt gyűjtött, több mint 2000 savó, illetve savópár feldolgozása során kimutattuk az *adenovírusok széleskörű hazai* elterjedtségét (Nász és Tóth 1960a, 1960b, Nász és Lengyel 1963). Ugyancsak itt említem meg — *több* adenovírus okozta hazai *járvány* felderítésén kívül — a 60-as évek elején lezajlott nagy *keratoconjunctivitis epidemica* járvány etiológiai tisztázásával kapcsolatos vizsgálatainkat. Most csak azt emelem ki, hogy a betegség szerológiai diagnózisát jelentősen megkönnyítő megállapításunk volt, hogy a kórokozó 8-as típusú adenovírussal való fertőzés hatására *in vivo*, hemagglutináció gátló ellenanyagok képződnek — ami addig nem volt ismeretes — és ezek kimutatásával a szerológiai diagnosztika könnyebben és gyorsabban végezhető és más módszereknél érzékenyebb módon (Nász és Lengyel 1963, Nász és mtsai 1963a, 1963b).

A vírus kóroktani szerepére vonatkozó immunológiai jellegű kutatásaink a humorális immunitás többértű tanulmányozásáról a későbbiekben áttevődtek a celluláris immunitás, az adenovírusok által okozott betegségek *pathomechanizmusának* tanulmányozására, olyan *tisztázatlan etiológiájú*, vagy *feltehetően polietiológiás* betegségekből, melyekben az adenovírus kóroktani szerepére utaló, klasszikusnak nevezhető virológiai jelek, mint a vírus izolálhatósága és a szignifikáns ellenanyagszint emelkedés a vérben, meggyőző módon nem mutatható ki.

Az adenovírusok bizonyos típusai — mint már említettem — hasonlóan a herpes vírusokhoz, jelen lehetnek latens módon a szervezetben, elsősorban a nyirokszervekben, ahonnan csak ritkán, különleges és hosszantartó eljárásokkal izolálhatók. Ugyanakkor a vírusspecifikus fehérje-antigének kimutathatók a helyi laesiók sejtjeiben, vagy a keringő lymphocytákban, ill. ez utóbbiak szenibilizáltak lehetnek a megfelelő vírusantigénnel szemben. Azokban a betegségekből, amelyekben a vírusetiológia ill. a vírus részvétele a kórkép létrehozásában feltételezhető, de az a hagyományos virológiai módszerekkel egyértelműen nem bizonyítható, a kóroktan felderítéséhez való közelebb jutás csak újabb vizsgálati eljárások igénybevételével lehetséges. Ilyen lehet pl. a vírusrészecskék — a virionok —, vagy a specifikus vírusantigének jelenlétének kimutatása a sejtekben immunfluorescens eljárással, vagy elektronmikroszkópos vizsgálattal, továbbá a betegek lymphocytái szenibilizált voltának bizonyítása lymphocytá transformációs teszt segítségével, a kérdéses vírusantigénnel szemben, melyekre blastos transzformációval válaszolnak.

A feltételezett adenovírus fertőzések lehetséges pathomechanizmusát és immunbiológiai hátterét, az immunfunkciók és a latens vírushordozás közti összefüggéseket, számos betegségben, kórképben tanulmányoztuk. E munkánk során alkalmazott főbb eljárásainkat alkalmazott módszereink első csoportja mutatja (I. táblázat).

I. Táblázat

Alkalmazott módszerek I

Szövettenyésztés—Vírustermelés (20 féle primer és permanens emberi és állati, stacioner és forgó kultúra)

Vírusizolálás
 Vírusneutralizáció
 Vírushemagglutináció
 Vírushemagglutináció-gátlás
 Hyperimmunsavók termelése (nyúl, tengerimalac, kecske)
 Agar—gél precipitáció
 Immunelektroforézis
 Immunozmoforézis
 Komplementkötési reakció
 Lymphocytá E—rozetta képzés
 Immunfluorescens eljárás (direkt, indirekt)
 Lymphocytá transzformációs teszt
 Elektronmikroszkópos vizsgálatok (ultravékony metszet, negatív festés)
 Cytológiai eljárások

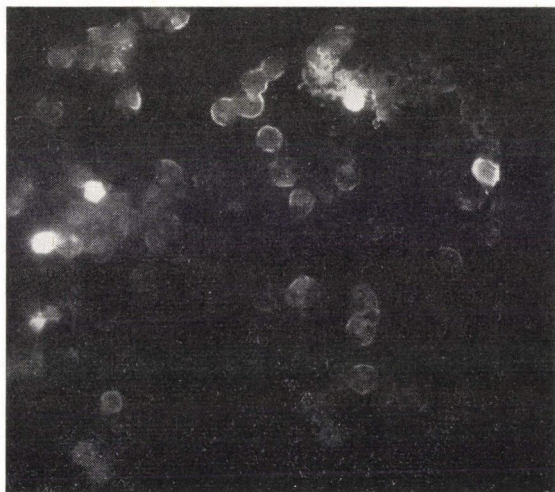
Azt találtuk, hogy azok a betegek, akik bizonyos krónikus recidiváló betegségeiben szenvednek, mint pl. szájnyálkahártya recidiváló fekélye, asthma bronchiale, cervix metaplasia, rendellenes nőgyógyászati vérzések, grippe abdominalis, colitis ulcerosa, stb., *latens vírushordozóknak tekinthetők* és az adenovírusok, elsősorban az említett latens típusok — és gyakran herpes vírusok is — jelen vannak a *helyi laesiók sejtjeiben* és a beteg keringő *lymphocytáiban* is. Ezekből a sejtekből kis százalékban sikerült is infektív vírusokat izolálnunk (Kulcsár és mtsai 1977). Sokkal *jellemzőbb* azonban az a jelenség, hogy bár infektív vírus nem tenyészthető ki a betegekből, de specifikus vírus-antigének nagy százalékban jelen vannak a helyi laesiók sejtjeiben, vagy a keringő lymphocytákban és azokban immunfluorescens eljárásokkal kimutathatók (1. ábra). Ugyancsak jellemző a lymphocyták szenibilizált volta a kérdéses vírusantigénnel szemben (2. ábra) (Nász és mtsai 1971, 1972, 1973, Dán és mtsai 1971, Kulcsár és mtsai 1974, 1977, Horváth és mtsai 1977, Fekete és mtsai 1978). Ezt szemlélteti a II. táblázat, amely néhány vizsgált betegség esetén összegezi — *a könnyebb áttekinthetőség miatt* — százalékosan feltüntetve az említett vizsgálatok eredményét.

II. Táblázat

*Adenovírus antigének és lymphocytá szenibilizáltság
%-os előfordulása betegekből*

Betegség megnevezése	Vírus antigén hordozás %	Pozitív lymphocytá transformáció	Infektív vírus izolálás	Megjegyzés
Aphta recidivans	63/3	43/5	lokális elvált., keringő lymphoc.	elektronmikr.: virionok
Colitis ulcerosa	71/4	80/6		
Grippe abdominalis	65/13	90/2	appendix, nyirokcsomó, garatmosó foly.	
Down-syndroma	45/13	73/35	nyál	
Nőgyógyászati rendellenes vérzések	72/1	n.v.	abrásiós anyag	
Kóros cervix	44/16	n.v.		kontroll: norm. cervix háms.

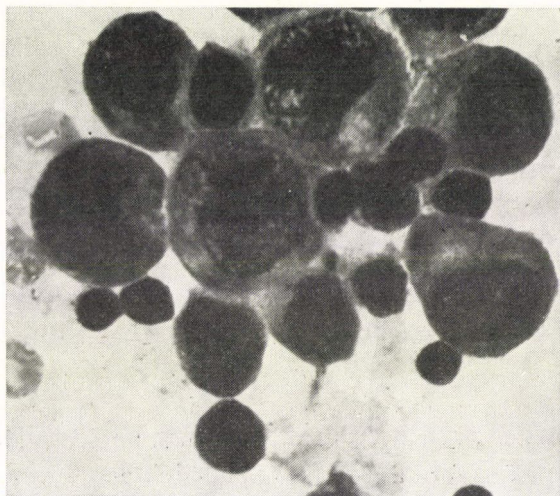
A táblázaton a nevezőben a kontroll vizsgálatok eredménye szerepel. Látható, hogy mind a keresett vírusantigének kimutathatósága, mind a lymphocyták blasztos transzformációja szignifikánsan magasabb a betegeknél, mint a kontrollként vizsgált egészségeseknél. Recidiváló szájnyálkahártya betegségeiben szenvedőknél elektronmikroszkóppal a betegek több mint felénél kimutattuk a víruspartikulák jelenlétét a lokális elváltozásokban, sőt az épnek



1. ábra Specifikus fluorescenciát mutató — adenovírus antigéneket tartalmazó — lymphocyták fluorescein-izotiocianáttal konjugált, 1-es típusú adenovírus ellen termelt immunsavóval kezelve

látszó szájnnyálkahártya sejtekben is. Egyes betegségekből fertőző adenovírust is sikerült izolálnunk, amint a táblázatban megjelöltük.

Feltűnő, hogy a kontroll csoportoknál vírus antigének jelenléte és lymphocytá szenzibilizáltság 10% felett csak gyermekeknél volt található. Kivételt jelent az egészséges felnőttek cervix hámsejtjeiben 16%-ban kimutatott vírus-antigén is. Bizonyos megfigyelések viszont arra utalnak, hogy a későbbiekben az egészségesegeknek látszó vírus-hordozókból kerülhetnek ki a megbetegedettek.



2. ábra Recidiváló aphthás betegek lymphocytáiból 1-es típusú adenovírus hatására létrejött lymphoblastok

Direkt kóroki következtetést ezekből az adatokból levonni csak a betegségek egyrésznél lehetséges, mint pl. grippe abdominalis esetében. Ilyen betegekben ugyanis még szerokonverzió is kimutatható volt. Az egyéb vizsgált betegeknél a nagy %-ban előforduló vírusantigén hordozás, ill. a vírusantigénnel szembeni lymphocytá szenzibilizáltság alapján *feltételezhető*, hogy a vírusantigének elszaporodása lehet oka is egyes kóros állapotoknak, azonban nem zárható ki annak lehetősége sem, hogy a *kóros állapot teremt talajt* a vírusok fokozott mértékű elszaporodása számára.

Tekintettel arra, hogy a különböző, általunk vizsgált megbetegedésekben gyakran észleltük az adenovírus és herpesvírus antigének együttes előfordulását, emberi amnion sejt kultúrát fertőztünk párhuzamosan adeno- és herpesvírussal. Célunk annak meghatározása volt, hogy a két vírus egymás jelenlétében képes-e szaporodni ugyanabban a kultúrában. A tenyészetet olyan időeltolódással fertőztük egymás után a két vírussal, hogy azok eltérő szaporodási ciklusa érvényre juthasson. Immunfluorescens módszerrel vizsgálva a sejteket, azt találtuk, hogy a két vírus képes egyazon sejt kultúrában, sőt *ugyanabban a sejtben* is replikálódni. A különböző vírusok antigénjeit úgy mutattuk ki, hogy az ellenük nyúlban termelt és a vizsgálatokban alkalmazott hyperimmunsavókat eltérő színű fluoreszkáló festékekkel conjugáltuk. Így az adenovírus elleni savó fluorescein-izotiocyanáttal conjugálva zöldessárga, a herpesvírus elleni pedig rhodaminnal történő conjugálás révén narancsvörös színben fluoreszkált a sejtben levő antigénnel kötődve. De igazolható a kétféle vírusantigén jelenléte, azok lokalizációja alapján is: az adenovírus antigének elsősorban a sejt magban, míg a herpesvírusok antigénjei főként a maghártya körül és a cytoplasmában találhatók (Dán és mtsai 1972).

Azt a betegekben észlelt jelenséget, hogy az adeno- és herpesvírusok nagy affinitással bírnak a lymphoid elemekhez és velük tartós vírushordozás alakulhat ki, nem fogékony kísérleti állatok fertőzésével is sikerült megerősítenünk (III. táblázat).

Nyulak intravénás oltása után cytológiai, immunfluorescens és elektronmikroszkópos vizsgálatokkal követtük nyomon a vírusok lokalizációját az állatokban. Azt találtuk, hogy mindkét vírus — a táblázatban csak az adenovírussal kapott eredmények szerepelnek — először a keringő lymphocytákban jelenik meg, majd a thymusban és lépben található, a többi szervekben csak elvéve. Az adenovírusok az állatok nyirokszerveiből még 60 nap után is kimutathatók (Horváth és mtsai 1975, 1979).

Az adenovírus fertőzések *pathomechanizmusához* szolgáltat *további* adatokat az a kísérleti eredményünk, mely szerint egészséges egyének mononukleáris fehérvérsejtjeit *in vitro* inkubálva, abban latens tulajdonságú adenovírus nem képes infektív formában reprodukálódni, de antigénje kimutatható. Ha azonban a sejtet előzőleg phytohemagglutininnel stimuláljuk, úgy azokban az adenovírus fertőző formában képes szaporodni. Ez a mechanizmus az *emberi*

III. Táblázat

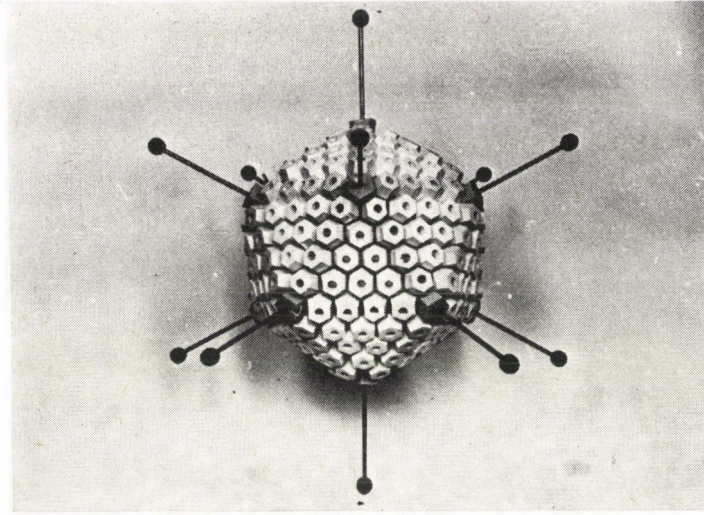
Adenovirus antigének kimutatása nyulak szerveiből immunfluorescens eljárással

Szervek	A vizsgálat ideje a fertőzés után					
	1 óra	2 óra	1 nap	3 nap	7 nap	60 nap
Lymphocyta	+	+	+	+	—	—
Thymus	—	+	+	+	+	—
Lép	—	+	+	+	+	+
Vese	—	—	—	—	—	—
Máj	—	—	—	—	—	—
Tüdő	—	—	—	—	—	—

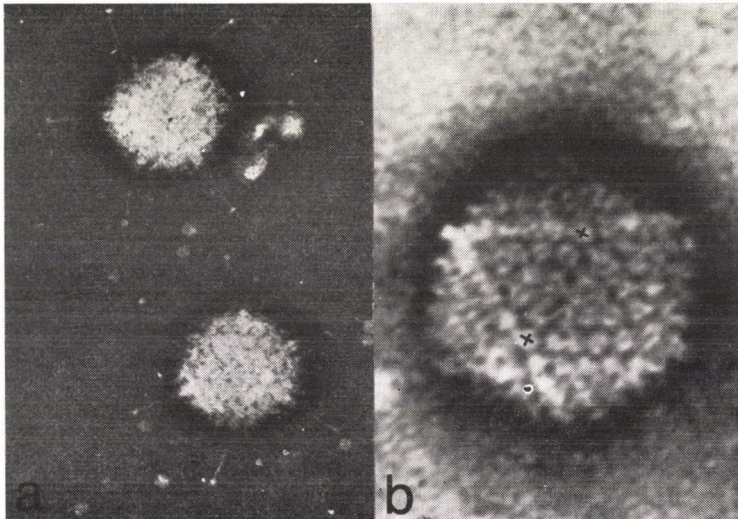
szervezetben is előfordulhat. Ennek megfelelően latens vírushordozóknál a betegség vagy a recidiva akkor jöhet létre, ha valamilyen tényező létrehozza a lymphocyták stimulációját. Ilyen módon a *vírust hordozó lymphocytáknak jelentős szerepe lehet az adenovírus, ill. más vírusok által okozott betegségek pathomechanizmusában*. Tekintettel az adenovírusok onkogén képességére, a szervezetben hosszú ideig jelen levő vírusoknak, vagy *bizonyos komponenseiknek* az onkogenezisben játszott esetleges szerepére is gondolnunk kell (Nász és mtsai 1971, 1972).

Éppen ezért szükséges nemcsak az adenovírus partikula egészét, hanem annak különböző komponenseit, a struktúrfehérjéket és a nukleinsavat is módszeresen tanulmányozni.

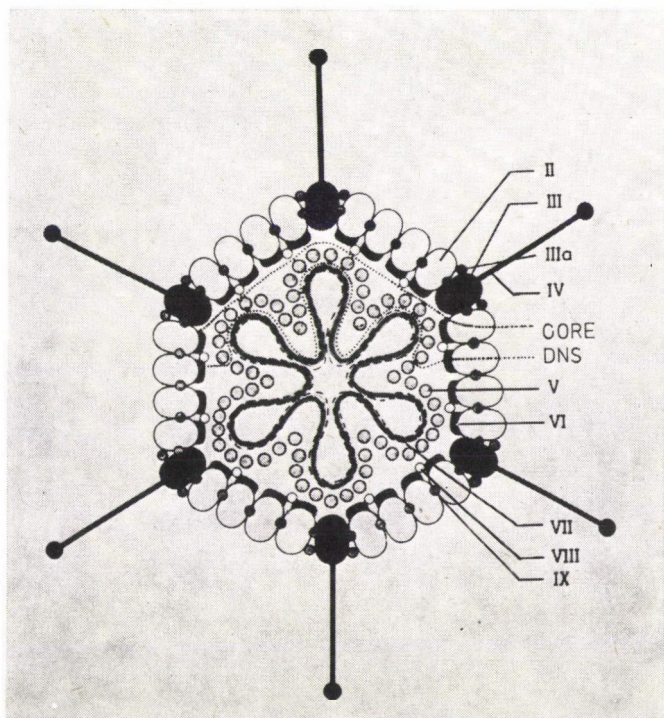
Az adenovírusok köbös felépítésűek, ikozaéder alakúak, külső burokkal, peplonnal nem rendelkeznek, átmérőjük kb. 80 nm és 252 morfológiai egységből, ún. kapszomerből épül fel fehérje köpenyűk, a vírus kapszid (Nász és mtsai 1967a). Ezek közül 12 helyezkedik el az ikozaéder 12 csúcsának megfelelően, 120—120 pedig annak élein és lapjain (3. ábra). A csúcsi kapszomerekből radiálisan kiálló nyúlványok, végükön kis gömbszerű képződménnyel: a penton, illetve a fiber és a lapokon valamint az éleken elhelyezkedő kapszomerek, a hexonok a megfelelő elektronmikroszkópos technikával készített felvételen jól láthatók (4. ábra). Az 5. ábra az adenovírus keresztmetszetét ábrázolja sematikusán (Everitt és mtsai 1975). A *fiber* a hémagglutináció mechanizmusában játszik szerepet, továbbá minden fogékony sejthez való kötődésben, így végsősoron szerepe van az adenovírus betegségek pathomechanizmusában is (Nász és mtsai 1961, 1962, Nász és Lengyel 1963). A *penton* (bázis) az interferon indukcióért felelős és endonukleáz aktivitás kötött hozzá, amelyekkel kapcsolatban szintén végeztünk vizsgálatokat (Nász és mtsai 1976, Medveczky és



3. ábra Adenovírus modell. Az ikozaéder alakú vírusrészecske fehérje köpenyét 252 fehérje alegység — kapszomer — építi fel. A csúcsi kapszomereken radiálisan kiálló nyúlványok helyezkednek el



4. ábra Adenovírus részecskék — virionok — elektronmikroszkópos képe
 a: Jól láthatók a csúcsi kapszomerekből kiálló nyúlványok. Nagyítás: kb. 220 000 ×.
 b: Megkülönböztethetők az egyes kapszomerek és az ikozaéder alak. Két csúcsi kapszomer meg van jelölve. Nagyítás: kb. 550 000 ×



5. ábra Adenovírus partikula keresztmetszete sematikusan. A vírus partikulát felépítő — római számmal jelzett — polipeptidek elhelyezkedését ábrázolja a vírus kapszidban és a virion belsejében

mtsai 1976, 1978). A hexon a legnagyobb mennyiségben előforduló építő elem, egy-egy vírus felépítésében 240 vesz részt. A virionban — az említettekén kívül — még hat-nyolc más, különböző, kisebb polypeptid található — amelyeket római számokkal jelölnek- és részben a fehérje burok különböző pontjain, részben a vírus belsejében, a DNS-hez kötötten helyezkednek el (Nász és mtsai 1972, Nász és Ádám 1975, Everitt és mtsai 1975, Boulanger és mtsai 1979, Wadell 1979).

Intézetünkben hosszú évek óta folyik az adenovírusok fehérje burkát — kapszidját — felépítő különböző struktúrfehérjék — a penton, a fiber és a hexon — többirányú vizsgálata, fizikai és kémiai jellemzőik, biológiai funkciók, antigén tulajdonságaik, izoelektromos pontjuk, aminosav összetételük, stb. meghatározása (Nász és Pereira 1965, Nász 1967, Lengyel és Nász 1970, Nász és mtsai 1972, 1976, Ádám és mtsai 1975, 1977). E vizsgálatok eredményeként jutottunk el nemrégén az 1-es típusú adenovírus hexon, kristályos formában való előállításához és a kristályosodási folyamat tanulmányozásához, így pl. elektronmikroszkóppal és ennek során a kétdimenziós hexonkristály felismeréséhez és szerkezetének elemzéséhez. Most csak ez utóbbi vizsgálatainkat szeret-

IV. Táblázat

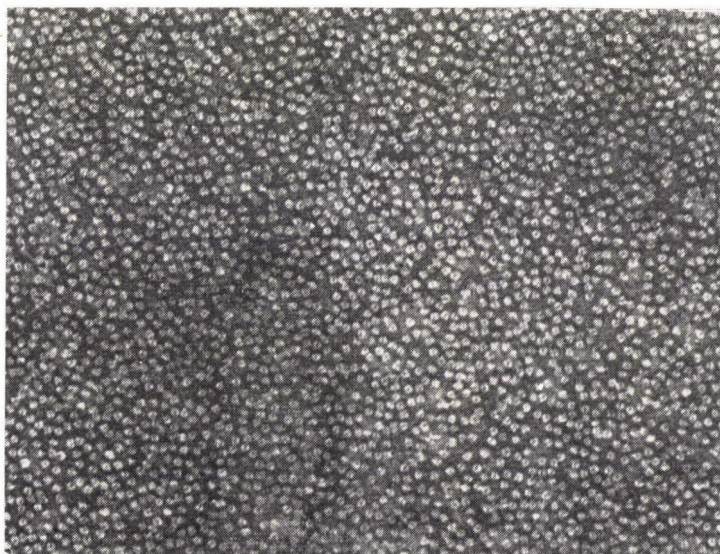
Alkalmazott módszerek II.

Ultracentrifugálási eljárások (MSE Superspeed 50 CsCl grádiens és „párna”)
 Anioncserélő kromatográfia (DEAE Sephadex A-25 és A-50)
 Gélfiltráció (LKB Ultrorac, Sephadex G-200)
 Spektrofotometria (Pye Unicam Sp 800, Spectromom 201)
 Izoelektromos pont meghat. (LKB 8100 Ampholine Electrofocusing Equipment)
 Aminósav analízis (JEOL, JLC-5 AH)
 Ultrahangos dezintegrálás (MSE)
 Mechanikus homogenizálás (MSE)
 Polyacrylamidgél elektroforézis (Quickfit PAGE, Labor MIM)
 Immunprecipitációs módszerek (Labor MIM)
 Elektronmikroszkópos eljárások (JEOL 100 B) negatív festés, freeze fracturing, elektrondiffrakció
 Optikai diffrakció (Fluoval mikroszkóp, XBO 101 xenonlámpa, 546 Å interferencia szűrő)
 (I. Módszerek I.)

ném röviden ismertetni ebből a témakörből. Az alkalmazott legfőbb módszereket a IV. táblázat szemlélteti, amely alkalmazott módszereink második csoportját mutatja be a használt műszerek megjelölésével együtt és nem tartalmazza az első felsorolásban szereplő és itt szintén használt módszereket, csak akkor, ha itt más vonatkozásban is használtuk pl. az elektronmikroszkópnál az elektrondiffrakciós eljárást.

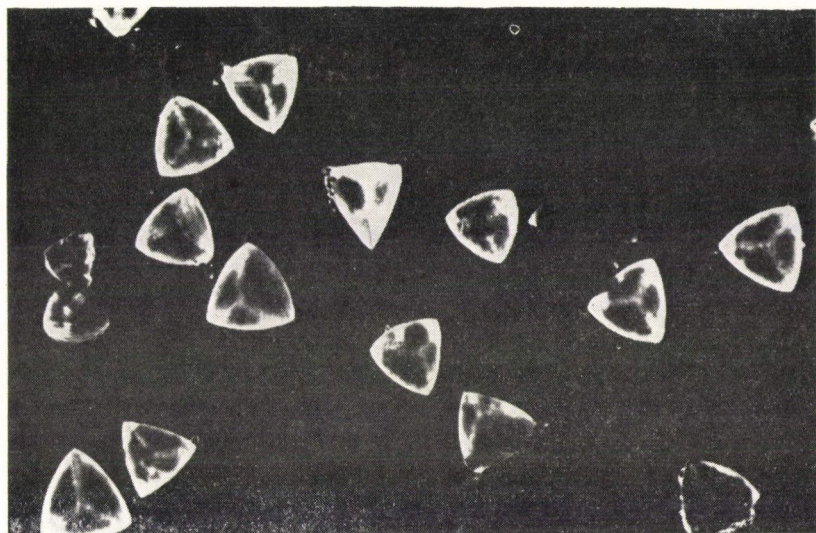
Igen hosszadalmas és munkaigényes szeparálási, tisztítási és koncentrációs eljárással nyert *homogén hexon* készítményt 0,5 M-os acetát puffer elleni dialízissel sikerült kristályosítanunk, amelynek a részleteiről már beszámoltunk (Nász és Ádám 1977). A kristályosításhoz kiindulási anyagként szolgáló homogén hexonkészítmény elektronmikroszkópos képét mutatja a 6. ábra, melyen a hexonok kis gyűrűeskék formájában láthatók, rendezettség nem ismerhető fel az elrendeződésükben (Ádám és Nász 1979a, 1979b, 1980, Nász és Ádám 1978). A dialízis után az anyagot +4 °C-on tárolva, néhány nappal később, abban számtalan tetraéder alakú kristályt találtunk *fénymikroszkópos* vizsgálattal (7. ábra). A kristályok élhossza 0,01—0,1 mm között váltakozott és elektrondiffrakciós vizsgálattal a P₂3 köbös tércsoportú kristályok közé tartozónak bizonyultak, melyek rácsállandója 162 Å volt.

A különböző virális fehérjékből előállítható kristályok gyakorlati jelentősége — többek között — igen nagy lehet, pl. ha azt bizonyos oltóanyagok jelenlegi formájának helyettesítésére használjuk. Amikor ugyanis teljes vírust tartalmazó vakcinákat használunk immunizálásra, a vírus genetikai anyaga, az esetlegesen onkogén nukleinsav és sokféle nem kívánatos fehérje is bejut az oltott egyén szervezetébe. Ez utóbbiak *feleslegesen terhelik* az immunapparatust, ami a későbbiekben káros lehet a szervezetre. Általában jó védőhatást lehet elérni az egyes, jól megválasztott, szeparált, *tisztított* és koncentrált vírusfehér-



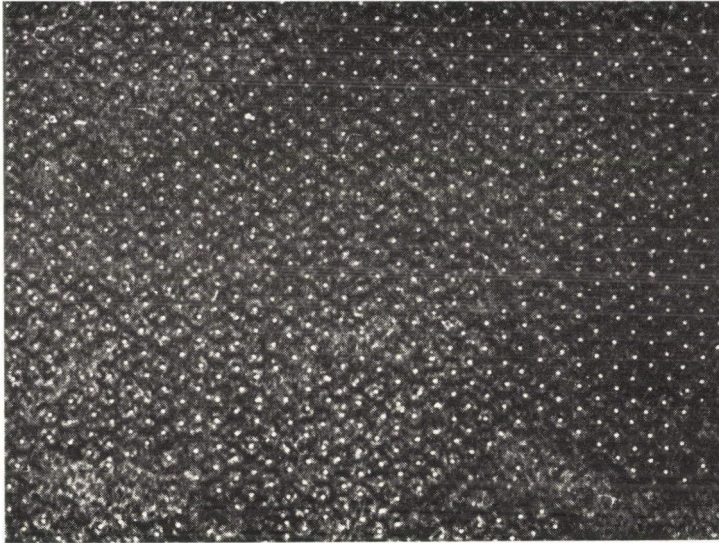
6. ábra Szeparált és tisztított 1-es típusú adenovírus hexon fehérje elektronmikroszkópos képe uranylacetáttal festve. Nagyítás: kb. 120 000 ×

jék felhasználásával is. Mivel a kristályos proteinkészítmény tisztasága nagyfokú, e folyamat segítségével készített, szeparált vírusfehérjék, oltóanyagként való alkalmazásával — az ún. *virusalegység vakcinák* formájában — elkerülhető lenne a szennyező fehérjék bevitele az oltandó szervezetbe.



7. ábra Tetraéder alakú hexonkristályok. Nagyítás: kb. 300 ×

A kristályosítási folyamat során a háromdimenziós kristályok mellett kétdimenziós kristálylemezek is képződnek a hexonokból, melyeket elektronmikroszkópos vizsgálattal sikerült kimutatnunk. Ilyen tömör, hiányosság nélkül összefüggő, hexonokból álló egyrétegű kristálylemezek, amelyeket az 1-es típusnál találtunk, eddig ismeretlenek voltak (Cornick és Sigler 1971,



8. ábra Kétdimenziós hexonkristály részletének elektronmikroszkópos képe. Uranylacetátos festés. Nagyítás: kb. $295\,000\times$ A hexonok közepét fehér pontokkal megjelöltük. Minden hexonnak hat legközelebbi szomszédja van, tehát az elrendeződés hexagonális

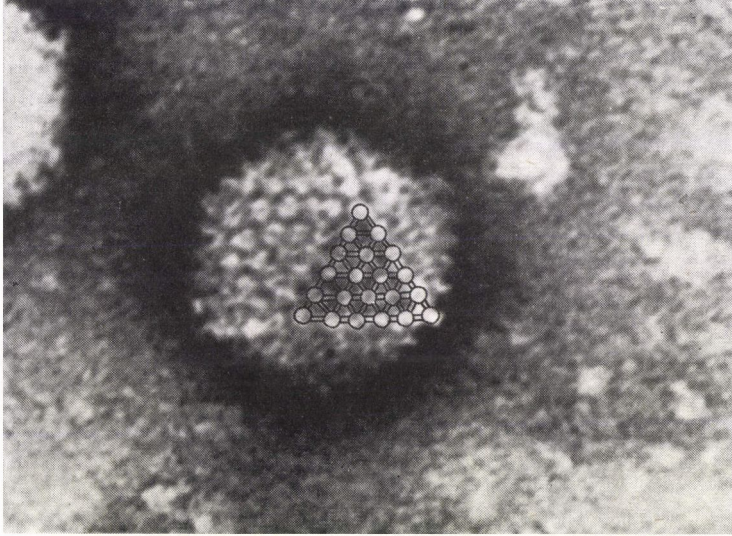
Döhner és Hudemann 1972, Pereira és Wrigley 1974, Nermut 1975, Carstens és Marusyk 1977, Horne és mtsai 1977, Horne 1979). A következőkben ezeknek a szerkezetében felismert szabálytalanságokról, ill. szabályosságokról számolunk be (Ádám és Nász 1979a, 1979b, 1980, Nász és Ádám 1978).

A következő felvétel egy nagyobb kristálylemez egy *részletét* mutatja, melyen a jobb áttekinthetőség céljából megjelöltük minden egyes hexon közép-pontját (8. ábra). A hexonok *hexagonalis* elrendeződése könnyen felismerhető, minden hexonnak 6—6 legközelebbi szomszédja van. Ez az elrendeződés hasonló, vagy *azonos* a hexon kapszomerek elrendeződéséhez az adenovírus kapszidjában, mint az a *virion elektronmikroszkópos felvételéből* jól megítélhető (9. ábra). Itt is látszik a hexagonális elrendeződés, a be nem rajzolt háromszögű lapok egyes részein is. A kristálylemezek szerkezetének, illetve az összetartó erők tanulmányozásának *gyakorlati jelentőségét* éppen ebben a *hasonlóságban* látjuk, mert ilyen módon ismereteket szerezhetünk esetleg a fehérje-burok ultrastruktúrájára, *összeépülési* módjára, a *vírusérés* folyamatára, a *fertőző vírus* kialakulását befolyásoló, — elősegítő vagy gátló — tényezőkre

vonatkozóan, ami a vírusfertőzések elleni küzdelem szempontjából alapvető fontosságú.

A szerkezet pontos elemzése céljából *meghatároztuk*:

1. az egyes hexonok elméletileg szabályos egyensúlyi helyét az adott kristályrácsban, ill. az attól való eltolódását,



9. ábra 1-es típusú adenovírus virion elektronmikroszkópos képe. Egy háromszögű lapon a kapszomerek elrendeződése hexagonális. Foszforszulforsavas festés. Nagyítás: kb. 550 000 ×

2. a párhuzamos hexonsorok egymástól való távolságát,
3. a három nem párhuzamos irányú hexonsor által egymáshoz képest bezárt szögeket,
4. ugyanezen három irányban
 - a) a rácsállandót
 - b) a hexonok átmérőjét
 - c) a hexonok közti réseket.

Kerestük

1. A szabálytalan — diszlokált — hexonsorokat, és
2. a hexonokat összetartó erők morfológiai alapjait.

A kapott eredmények közül csak a szerkezet jellemzése szempontjából legfontosabb adatokat fogom ismertetni. Módszerünk az elektronmikroszkópos képek *direkt analízise* mellett, azok *optikai diffrakciós* elemzése volt. E célra a kristálylemez elektronmikroszkópos képének és a hexonok középpont-térképének negatív, vagy pozitív filmjét használtuk. Ez utóbbit úgy készítettük, hogy a megjelölt középpontokat fényképen reprodukáltuk a hexonok nélkül. Ezt

ábrázolja a 10. ábra, amely ugyanannak a kristálylemeznek a középpont-térképe, melyet már bemutattam. A kristálylemez és hexon középpont térképének optikai diffrakciós képe hexagonálisan elrendezett reflexiós pontokból áll (11. ábra). Az elsőrendű spektrum, — első order — reflexiós pontjainak a 0.-rendű maximumtól (középponttól) mért távolsága alapján megfelelő képpellett számítva a *rácsállandó* 100, 107 illetve 111 Å volt a három lehetséges, nem párhuzamos irányban (Ádám és Nász 1980). A *direkt mérések* hasonló

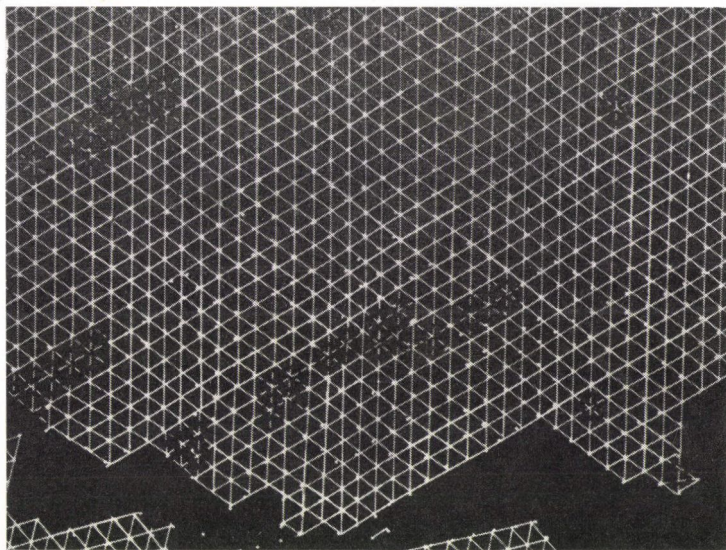


10. ábra A 8. ábrán bemutatott kristálylemez középpont térképe



11. ábra A 10. ábrán bemutatott középpont térkép optikai diffrakciós képe hexagonálisan elrendezett reflexiós pontokból áll

eredményeket adtak, de a rácsállandó értékek megközelítőleg 10%-kal nagyobbak adódtak az elektronmikroszkópos képen, a három nem párhuzamos hexonsor irányában mérve. A negatívan festett kristálylemez diffrakciós képe a második orderig, a középpont térképé pedig a harmadik orderig terjed ki, ami viszonylag kevés, és relatíve jelentős rövidtávú rendezetlenségre utal. Az optikai diffrakciós kép reflexiós pontjainak élességében látható különbségek pedig számottevő hosszútávú rendezetlenségre mutatnak. További méré-



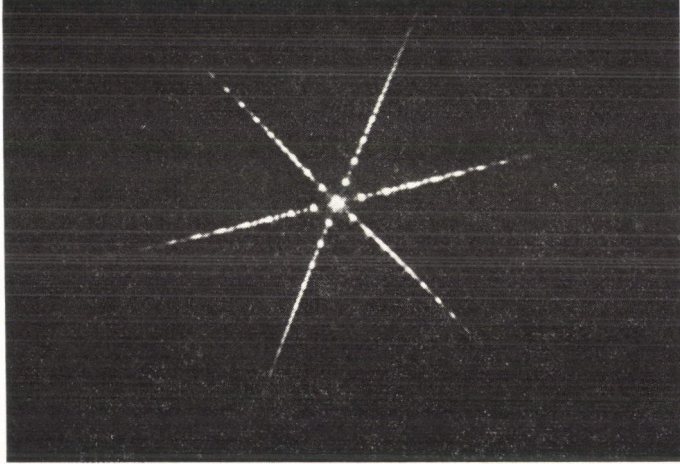
12. ábra A hexonok középpontját jelző pontok hálózatszerűen összekötve a 10. ábrán bemutatott középpont térkép alapján (l. szöveg)

sek céljára a középpont-térkép pontjait hálózatszerűen összekötöttük a hexagonális elrendezésnek megfelelő három nem párhuzamos irányban húzott vonallal, mint az a 12. ábrán is látható. A három vonal metszéspontja mutatja az egyes hexonok *elméletileg helyes egyensúlyi pozícióját* a rácson belül (Caspar és mtsai 1977). Az ezektől távolabb való elhelyezkedés pedig a kristályrács *rövidtávú rendezetlenségét*, az ún. „short range disorder” jelzi. Mint látható számos hexon eltolódva helyezkedik el a metszéspontokhoz viszonyítva. Az eltolódás az adott sortávolság 15—20%-át is elérheti esetenként, ami szintén azt jelenti, hogy a rövidtávú szabálytalanság számottevő.

A párhuzamos vonalak távolsága a hexonsorok egymástól való távolságát jelzi a hálózatban. Ez mérések alapján szintén eltérő, ami a *hosszútávú rendezetlenséget*, a „long range disorder” jelzi. Ez mintegy 10%-os eltérésnek felel meg.

A hálózat nem párhuzamos sorai által egymással bezárt *szögek* — bármelyik két irányt is véve alapul-, néhány fokal *eltérést* mutatnak a szabályos

hexagonális hálózat 60 fokos szögeitől. E hálózat *optikai diffrakciós* képén a három nem párhuzamos iránynak megfelelő éles diffrakciós pontsorok láthatók (13. ábra), melyeknek — szabályos hexagonális rendszer esetén — pontosan 60 fokos szögeket kellene bezárniuk. Szabad szemmel is megítélhető, hogy jelen esetben ettől eltérések vannak.

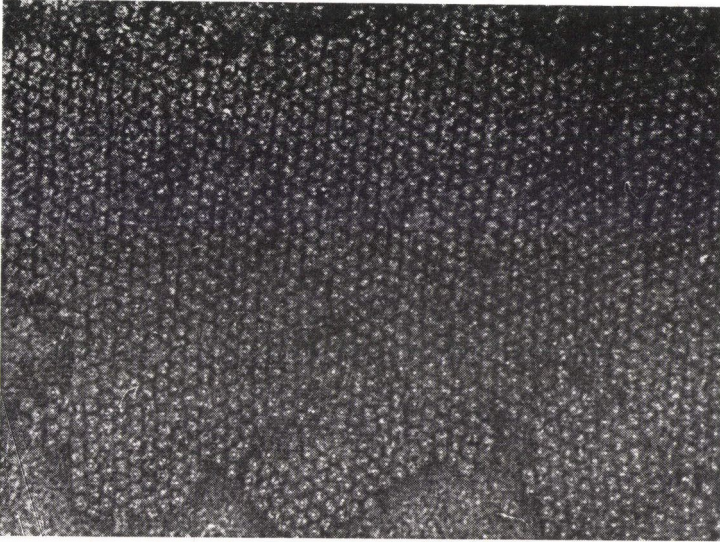


13. ábra A 12. ábrán bemutatott hálózat optikai diffrakciós képe

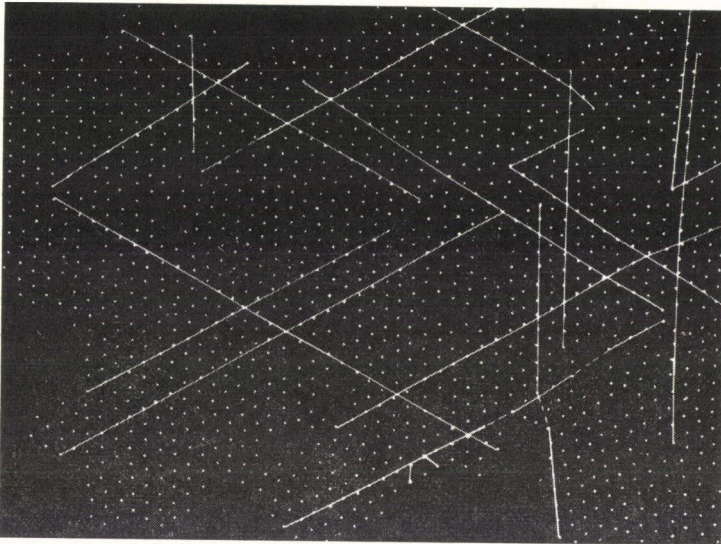
A kétdimenziós hexon kristálylemez szabályosságát a már ismertetett szabálytalanságok mellett *többletként* beépült, ún. *diszlokált* hexonsorok is zavarják. Ezek a kristálylemez szabad szemmel való megtekintésre is kissé lazábbnak, szabálytalanabbnak látszanak (14. ábra), a beépülés helyén az eredeti hexagonális rendszer fellazul, majd ismét kialakul az eredeti rendezettség, ahogyan ez az előbbi kristálylemez középpont-térképén látható, melyen a diszlokált hexonsorokat vonalak mutatják (15. ábra).

A hexon kristálylemezben a hexonok között finom összekötő elemeket figyeltünk meg, nagy feloldású elektron mikroszkópos vizsgálattal (16. ábra), amelyek minden bizonnyal a hexonokat összetartó erők morfológiai alapjait reprezentálják. Ezek az összekötő elemek sok esetben *párosával*, egymással párhuzamosan húzódnak a szomszédos hexonok között. Valószínűnek látszik, hogy ez a törvényszerű, és ahol nincs, vagy csak egy összekötő elem, az vagy festődési hiba következménye, vagy arra utal, hogy az összekötő elemek leszakadtak a hexonokról a preparátum készítése közben.

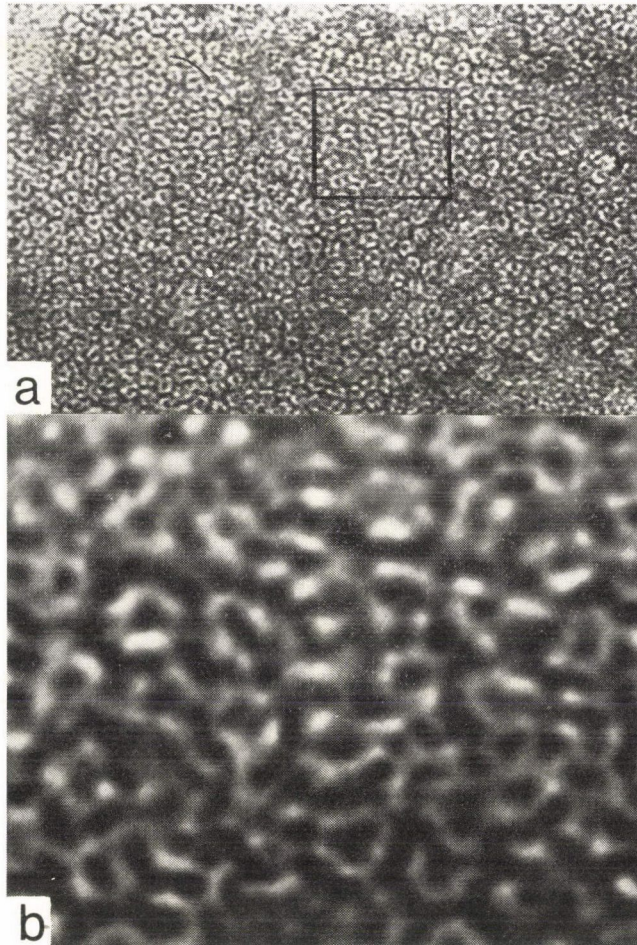
Vizsgálataink alapján a kétdimenziós kristály szerkezete tehát hexagonális rendszer, melyben a hexonokat *kettős összekötő elemek* kapcsolják egymáshoz. Ha a diszlokáció és más tényezők által előidézett kristályhibákat figyelmen kívül hagyjuk is, a szerkezetet *enyhén ferde és szabálytalan hexagonális elrende-*



14. ábra Kétdimenziós hexonkristály elektronmikroszkópos képe. A hexon középpontokat megjelöltük. Nagyítás: kb. 215 000 \times . A kristálylemezben diszlokált hexonsorok találhatóak. (l. 15. ábra)



15. ábra A 14. ábrán látható kristály középpont térképe. A diszlokált hexonsorokat vonalak jelzik



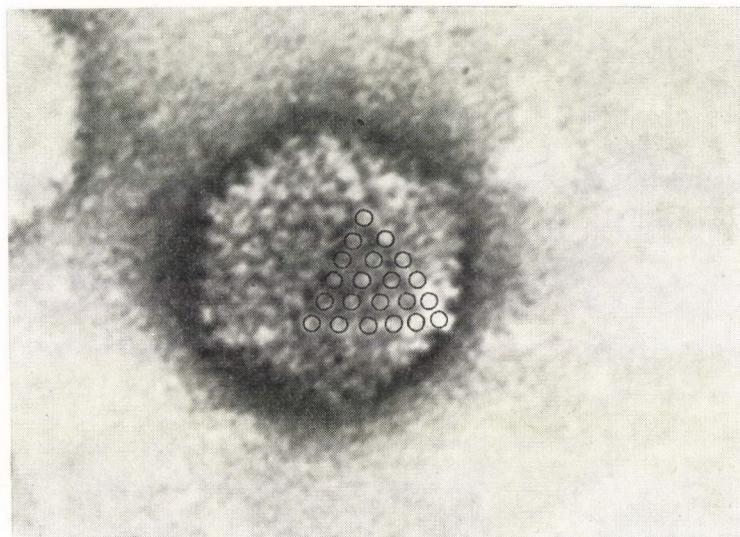
16. ábra Kétdimenziós hexon kristálylemez elektronmikroszkópos képe. Uranylacetátos festés.
 a: nagyítás: kb. 300 000 ×
 b: nagyítás: kb. 1 400 000 ×. Azonos a 16. ábra bejelölt területével. Jól láthatók az egyes hexonokat a hat legközelebbi szomszédal összekötő finom nyúlványok, melyek helyenként párosak

ződés jellemzi. Mégis minden egység egy bizonyos meghatározott távolságon belül marad, a hálózatban elméletileg megjelölhető egyensúlyi pozíciójához viszonyítva. Ez a szabályosság is jellemzi a szerkezetet és specifikus egymásrahatás létezésére mutat a hexonok között, ami fenntartja a hatszoros koordinációt. A hexonok közti összekötő elemeknek bizonyos fokig hajlékonyaknak, rugalmasaknak kell lenniük és az egyes hexonok csak annyira távolodhatnak el a hálózatban az egyensúlyi helyzetüktől, amennyire azt saját összekötő elemik rugalmassága és a szomszédos hexonok pozíciója — amit részben szintén azok összekötő elemei határoznak meg — lehetővé teszi (Ádám és Nász 1979a,

1979b, 1980, Nász és Ádám 1978). Ez a mechanizmus rendkívül fontos az infektív vírus funkcióképessége szempontjából, mert ez biztosítja — esetleg más tényezőkkel együtt — a vírus fehérjeburkának a fertőzőképességhez szükséges, *megfelelő zártságát*. A vírus fehérjeburkának szerkezetét, az összekötő elemekre vonatkozó megfigyeléseink alapján ugyanis úgy képzeljük el, hogy minden hexont két-két összekötő elem, két-két „polipeptidhid” rögzít mind a hat szomszédos hexonhoz, mint ahogy az a 17. ábrán látható. Erre utal az is, hogy az összekötő elemek a vírus fehérjeburkában is kimutathatók voltak elektronmikroszkóppal, nemcsak a kétdimenziós hexon aggregátumban.

Mint az eddigiekből is kitűnik, az adenovírusokban — és természetesen más vírusokban és a fertőzött sejtekben is — számos olyan fehérje, ill. polypeptid, valamint az ezeket kódoló nukleinsav van, amelyeknek *nagy mennyiségben* való előállítása szükséges vagy a prevenció céljából, pl. a legység vakcinák termelése miatt, vagy tudományos érdekből pl. a vírusos onkogenezis, vagy más fontos biológiai problémák tanulmányozása céljából. Amint nagy mennyiségű tiszta fehérjére van szükség a vírusfehérjék tulajdonságainak vizsgálatához és gyakorlati felhasználásához, ugyanúgy nagy mennyiségű nukleinsav szükséges a vírusgénnek kiterjedt vizsgálatához, szekvencia analíziséhez stb.

Ezeknek, a kutató és az orvos számára valamilyen szempontból fontos és hasznos vírusfehérjéknek, polypeptideknek, vírusgéneknek az előállítása igen hosszadalmas, munkaigényes és rendkívül költséges folyamat a jelenleg rendelkezésünkre álló módszerekkel. Ezért elegendő mennyiségben való előállításuk



17. ábra Adenovírus virion elektronmikroszkópos képe. Nagyítás: kb. 550 000 \times . A fehérje burok lehetséges szerkezetét a virion egyik háromszögű lapján berajzoltuk. A kapszomereket körök, az összekötő elemeket vonalak jelzik

perspektivikusan csak *DNS rekombinációs*, vagyis *génsebészeti* eljárások segítségével, baktériumokban való megtermeltetéssel végezhető el. Ennek következtében szinte társadalmi érdeké vált és világszerte óriási méretekben megnőtt az utóbbi években a vírusnukleinsavak — köztük az adenovírus DNS — tanulmányozása, ill. felhasználási lehetőségeinek vizsgálata iránti érdeklődés.

Valamennyi adenovírus típus DNS-e lineáris, 12—13 mikrométer hosszú kettősszálú molekula. Az emberi eredetű adenovírusok 35 szerológiai típusba tartoznak és DNS-szekvencia homológia alapján 7 DNS alcsoportba sorolhatók. A virion belsejében a DNS hurkokat képez, olyan módon, hogy minden kapszomer belső oldalához egy-egy hurok kapcsolódik (Nász és Berencsi 1975, 1976, Berencsi és Nász 1976).

Az adenovírus DNS vizsgálata témakörben számos emberi és állati eredetű adenovírus típusnál elvégeztük a DNS izolálásán és tanulmányozásán kívül a DNS különböző restrikciós enzimekkel való emésztését és a megfelelő restrikciós térkép összeállítását. Meghatároztuk a különböző adenovírus típusok közti genetikai különbségeket. E kísérleteink során alkalmazott legfőbb eljárásokat, módszereket — a szokásos virológiai eljárásokon kívül — alkalmazott módszereink harmadik csoportja szemlélteti (V. táblázat).

V. Táblázat

Alkalmazott módszerek III.

DNS—szeparálás (pronáz—SDS—fenol módszer)

DNS—tisztítás: ultracentrifuga: CsCl, Cs₂SO₄ equilibrium

DNS—protein komplex tisztítás: gélszűrés (Sephrose, Sephadex) immunprecipitáció

DNS—frakcionálás: hydroxyapatit kromatográfia agaróz-ethidiumbromid elektroforézis

DNS—denaturálási hőmérséklet meghatározás (T_m; formamid—SDS)

Restrikciós enzim preparálás (Hind III, Sal I, BamH I.)

Plazmid izolálás baktériumokból

Baktérium transzformáció (plazmid DNS-sel)

Ligáz enzim preparálás (T—4 fággal fertőzött baktériumokból)

(Gradiens lap-gél elektroforézis, mikro-agarózgél precipitáció, DNS-cellulóz, -foszocellulóz, —DEAE—cellulóz oszlopkromatográfia, izotópos eljárások, stb.)

(I. Módszerek I, II.)

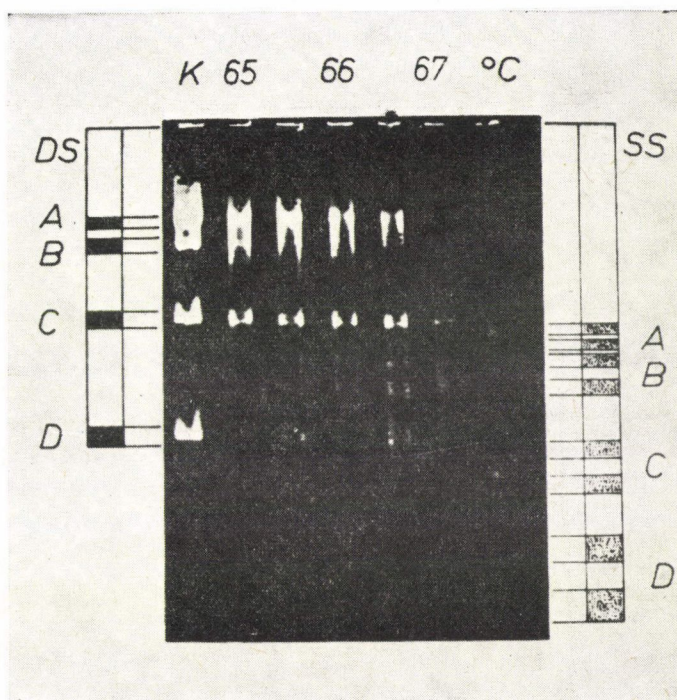
A vírus DNS jobb és bal oldalát a guanylsav: cytidilsav mennyisége alapján lehet azonosítani a konvenció szerint.

Ennek a meghatározására új módszert dolgoztunk ki, annak az elvnek az alapján, hogy a magasabb G : C tartalmú DNS, *magasabb hőmérsékleten* denaturálható mint az alacsonyabb G : C tartalmú DNS (Berencsi és mtsai 1978).

A következő ábrán a *Bacillus amyloliquefaciens*-H baktérium restrikciós enzimjével a BamH I-gyel létrehozott DNS fragmentumok elhelyezkedési sorrendjének meghatározását fogom bemutatni. Ez az enzim az 1-es típusú

adenovírus DNS-ét a GGATCC hexanukleotid szekvenciának megfelelően 3 helyen vágja el. Az agaróz lap-gél elektroforézis során nagyság szerint válnak szét a fragmentumok, és sorban az ABC nagy betűvel vannak megjelölve. A leglassabban vándorló fragmentum 10 megadalton, a következő 6,7 Md, a harmadik a 4 Md és a legkisebb 2,2 Md molekulásúlyú (18. ábra).

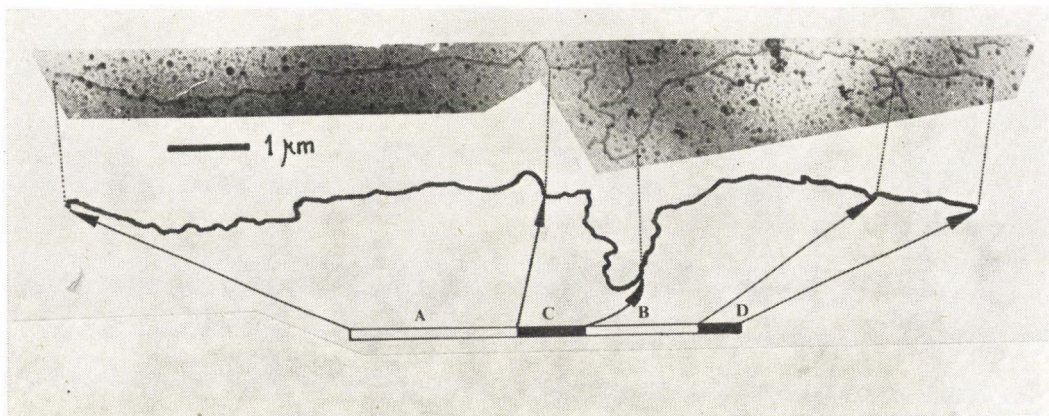
Ezeknek a fragmentumoknak a *keverékét* megfelelő puffer keverékében (formamid-Tris) különböző hőfokon inkubáltuk, majd hígítás és gyors lehűtés után elektroforetizáltuk. Azt találtuk, hogy a „B” és „D” fragmentum alacsonyabb hőfokon tűnt el — azaz vált szét a kettős DNS lánc-, mint a A és a C fragmentumok. A második legnagyobb fragmentumból keletkező két egyszálú 3,35—3,35 Md nagyságú DNS jól azonosítható az ábrán 65,5 °C-tól kezdve. Ez a kísérlet azt bizonyítja, hogy a második legnagyobb és legkisebb fragmentum kevesebb guanylsavat és cytidilsavat tartalmaz, tehát a konvenció szerint a lineáris DNS jobb oldalán helyezkedik el. A vázolt módon meghatároztuk a vírus DNS-en az enzimek specifikus metszéspontjainak elhelyezkedéseit és egymáshoz való viszonyát, a fragmentumok sorrendjét. Ez a következőnek



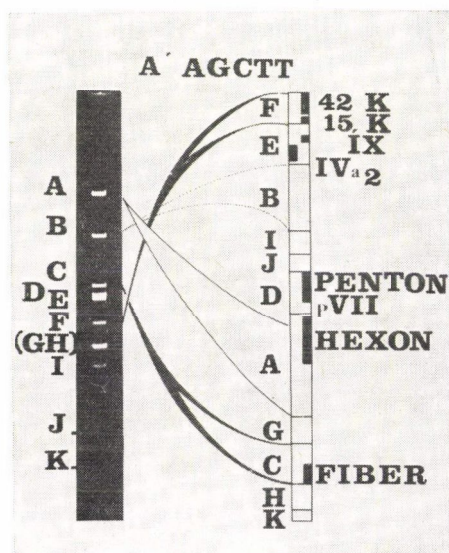
18. ábra Az 1-es típusú adenovírus DNS Bam H I. restrikciós enzimmel létrehozott fragmentumainak agaróz gél elektroforézise illetve a fragmentumok sorrendjének meghatározása (l. szöveg)

bizonyult: ACBD ahogy az a 19. ábrán az egységnyi hosszú adenovírus DNS elektronmikroszkópos képére vetítve látható.

A 20. ábra szemlélteti az adenovírus DNS darabok kivágásának és tisztításának *gyakorlati célját és lehetőségeit*. Bal oldalon függőlegesen a Hind III enzimmel való emésztés után készített agaróz-gél elektroforézis eredményét tüntettük fel. Az elektroforézis fölülről lefelé történt, a DNS darabok elnevezése itt is nagyság szerint történik az ABC betűivel. Minél kisebb a kivágott



19. ábra Az 1-es típusú adenovírus DNS elektronmikroszkópos illetve sematikus képe, melyen a BAM H. I. restriktív enzim által létrehozott fragmentumok fizikai sorrendjét bejelöltük

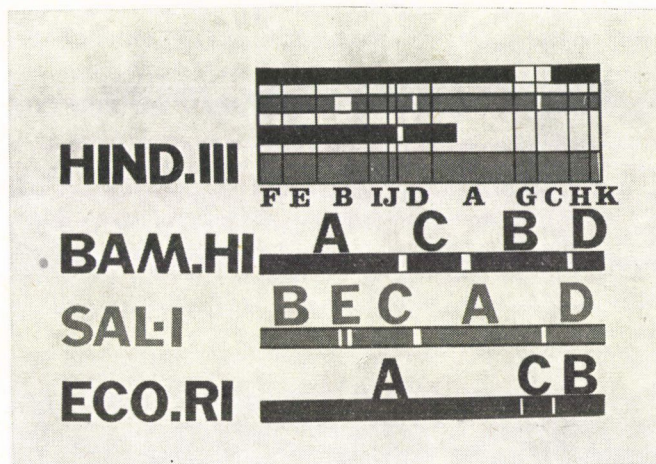


20. ábra Az 1-es típusú adenovírus DNS Hind III. restriktív enzimmel létrehozott fragmentumainak elektroforézise és a fragmentumok sorrendje az egységnyi hosszú DNS-re vetítve sematikusán, megjelölve néhány gén helyét (l. szöveg)

fragmentum, annál gyorsabban képes a pozitív sarok felé vándorolni. A vándorlás távolságából kiszámítható a molekulasúly. Fototechnikai okokból a két legkisebb fragmentum (J és K) nem látható. A Hind III enzim az AAGCTT nukleotid sorrendet ismeri fel és a két adenilsav között vágja el a DNS-t, tehát minden fragmentum adenilsavval kezdődik és végződik. Összesen 11 fragmentum keletkezik, ami azt mutatja, hogy ez a bizonyos nukleotid sorrend 10 helyen fordul elő a DNS-ben.

A jobb oldali kettős vonal az adenovírus DNS molekuláját jelképezi. Kis téglalapok mutatják azoknak a géneknek az elhelyezkedését, amelyeket a restriktációs enzim nem vág el. Legfölül — a DNS baloldalán — a tumorkeltő gén, az onkogén helyezkedik el. Ez a DNS darab két korai fehérje génjét hordozza, amelyeket molekulasúlyuk alapján 42K és 15K proteineknek neveznek. A jobbról balra mutató nyilak jelzik, hogy a szélső DNS-darab az F-fragmentum, tehát ha az onkogén DNS-részt tisztítani akarjuk, azért, hogy például sejtekbe bejuttassuk, vagy génebézészeti módszerrel baktériumokban megtermeltessük, akkor az elektroforézissel történő elválasztást követően a 6. DNS darabot kell kivágni és kitisztítani a gélből. A legfelső „A” fragmentumban a hexon protein génje helyezkedik el. A fiber protein génje a C fragmentumban van, a penton bázis és az egyik DNS-kötő proteinek, a VII proteinek a prekursorát a „D” fragmentum hordozza. Érdekes az E fragmentum szerkezete, mert a IX-es protein génje az egyik, a IVa2-nek nevezett protein génje pedig a másik láncon van.

A 21. ábra összefoglalja az 1-es típusú adenovírus DNS-én különböző restriktációs enzimekkel végzett kísérleteink eredményeit, egy-egy vízszintes vonal az ábrán a 22,54 Md molekulasúlyú DNS genomot jelképezi. Egy-egy



21. ábra Az 1-es típusú adenovírus DNS-ből különböző restriktációs enzimekkel nyert fragmentumok (1. szöveg)

enzim metszéspontjainak elhelyezkedését vertikális vonalak mutatják. A BamH I enzim 3, a streptomyces albus restriktációs enzime 4, az E.coli R I-es enzime két helyen vágja el, az 1-es típusú adenovírus DNS-t. Legtöbb metszést a Haemophilus influenzae D törzsének III. enzime csinálja, összesen 10 darabot, mint az előbb bemutattam. Utóbbiak elhelyezkedését itt kettős vonalak közé húzott függőleges szakaszok mutatják. A Hind III enzim által kivágott valamennyi fragmentumot és az ábra felső felében berajzolt fragmentumokat, szeparáltan sikerült előállítanunk. A Hind III térképe fölött látható fragmentumokat úgy nyertük, hogy az egyik enzim által kivágott részt szeparáltuk és a másik enzimmel emésztettük. Pl. ha Sal I. „C” fragmentumát Hind III-mal emésztjük másodlagosan, akkor a Hind III „I” és „J” fragmentumán kívül, azok „két oldalán” még egy-egy új fragmentum is képződik. Ezeket a DNS fragmentumokat — összesen 23-at — már preparatív mennyiségben előállítottuk és reméljük, hogy tervezett DNS manipulációs kísérleteinknél eredményesen alkalmazásra kerülhetnek.

Ennyiben kívántam áttekintést adni az adenovírus kutatás területén nyert eddigi főbb eredményeinkről. Az adenovírus problémakör három *különbözőnek tűnő* kutatási területéről számoltam be, amelyek azonban a valóságban *szorosan összefüggnek* és a jövőben várható, hogy méginkább összefonódó, közös témakört fognak jelenteni. Az alapkutatás jellegű DNS-manipulációs és vírusfehérje kutatások alapján ugyanis elvileg megnyílt a lehetőség olyan jó antigén tulajdonságú, tiszta fehérje komponensek mesterséges előállítására, amelyek az adenovírusok által okozott patológiás állapotok prevencióját, ill. terápiáját segíthetik a gyakorlatban.

IRODALOM

- Ádám, É., Lengyel, A. és Nász, I.: Kísérl. Orvostud., 27, 612 (1975).
 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., Nász, I. és Medveczky, P.: Acta microbiol. Acad. Sci. hung., 24, 181 (1977).
 Berencsi, Gy., Medveczky, P., Naroditszky, B. S., Chaplygina, N. M., Zavizion, B. A., Tikhonenko, T. I. és Nász, I.: Acta microbiol. Acad. Sci. hung., 25, 97 (1978).
 Berencsi, Gy. és Nász, I.: Mikrobiol. Zsurn., 38, 515 (1976).
 Boulanger, P. A., Lemay, P., Blair, G. E. és Russel, W. C.: J. Gen. Virol., 54, 783 (1979).
 Carstens, E. B. és Marusyk, R. G.: J. Gen. Virol., 34, 541 (1977).
 Caspar, D. L. D., Goodenough, D. A., Makowsky, L. és Philips, W. C.: J. Cell Biol., 74, 605 (1977).
 Cornik, G. és Sigler, P. B.: J. Mol. Biol., 57, 397 (1971).
 Csepulisz, G. S., Zsdanov, V. H., Nász, I., Cserba, I. és Rózsa, K.: Vapr. Viruszol., 16, 62 (1971).
 Dán, P., Geck, P., Kulcsár, G. és Nász, I.: Acta microbiol. Acad. Sci. hung., 19, 51 (1972).
 Dán, P., Kulcsár, G., Sallay, K. és Nász, I.: Blut, 22, 211 (1971).
 Döhner, L. és Hudemann, H.: Arch. ges. Virusforsch., 38, 279 (1972).
 Everitt, E. B., Lutter, L. és Philipson, L.: Virology, 67, 197 (1975).

- Fekete, Gy., Kulcsár, G., Dán, P., Nász, I., Schuler, D. és Dobos, M.: Orv. Hetilap, 119, 1147 (1978).
- Horne, R. W.: Advances in Virus Research, 24, 173 (1979).
- Horne, R. W., Harnden, J. és Hull, R.: Virology, 82, 150 (1977).
- Horváth, J., Dán, P., Kulcsár, G., Nász, I. és Schranz, V.: Acta microbiol. Acad. Sci. hung., 22, 331 (1975).
- Horváth, J., Kulcsár, G., Dán, P. és Nász, I.: Kísér. Orvostud., 31, 244 (1979).
- Horváth, J., Kulcsár, G., Dán, P. és Nász, I.: Pneumonol. Hung., 30, 343 (1977).
- Kulcsár, G., Okonkwo, Ch., Horváth, J., Dán, P., Nász, I., Geck, P. és Tasnádi, G.: Gyermekgyógy. 25, 405 (1974).
- Kulcsár, G., Sallay, K., Dán, P., Nász, I. és Horváth, J.: Fogorvosi Szle, 70, 345 (1977).
- Lengyel, A., Klembala, M. és Nász, I.: Arch. ges. Virusforsch., 43, 63 (1973).
- Lengyel, A., Klembala, M. és Nász, I.: Orvostud., 29, 299 (1978).
- Lengyel, A. és Nász, I.: J. Virol., 6, 406 (1970).
- Medveczky, P., Csuzi, S., Nász, I., Adám, É., Berencsi, Gy. és Antoni, F.: Arch. Virol., 52, 315 (1976).
- Medveczky, P., Csuzi, S., Nász, I., Adám, É. és Bánfalvy, G.: Kísér. Orvostud., 30, 79 (1978).
- Nász, I.: Acta microbiol. Acad. Sci. hung., 8, 397 (1961).
- Nász, I.: Acta microbiol. Acad. Sci. hung., 10, 355 (1963).
- Nász, I.: Lancet, i, 394 (1967).
- Nász, I.: Ens. Cienif. T. Romay, Acad. Cienc. Cuba, 621 (1968).
- Nász, I. és Adám, É.: Biológia, 23, 121 (1975).
- Nász, I. és Adám, É.: Orvostud., 28, 383 (1977).
- Nász, I. és Adám, É.: Orvostud., 29, 155 (1978).
- Nász, I., Béládi, I. és Lengyel, A.: Az adenovírusok és kórokozó szerepük. Akadémiai Kiadó, Budapest, (1967a).
- Nász, I. és Berencsi, Gy.: Orv. Hetilap, 116, 1503 (1975).
- Nász, I. és Berencsi, Gy.: Vap. Viruszol., 21, 643 (1976).
- Nász, I., Cserba, I. és Rózsa, K.: Zsch. Immun.-Forsch., 131, 225 (1967b).
- Nász, I., Kulcsár, G., Dán, P., Lengyel, A. és Cserba, I.: Acta microbiol. Acad. Sci. hung., 10, 53 (1963a).
- Nász, I., Kulcsár, G., Dán, P., Lengyel, A. és Cserba, I.: Orv. Hetilap, 104, 442 (1963b).
- Nász, I., Kulcsár, G., Dán, P. és Sallay, K.: J. Infect. Dis., 124, 214 (1971).
- Nász, I., Kulcsár, G., Dán, P., Sallay, K., Vértes, L., Geck, P., Keskeny, S. és Horváth, J.: Orvostud., 23, 357 (1972).
- Nász, I., Kulcsár, G., Dán, P., Sallay, K., Vértes, L., Geck, P., Keskeny, S. és Horváth, J.: Acta microbiol. Acad. Sci. hung., 20, 191 (1973).
- Nász, I. és Lengyel, A.: Lancet, ii, 1067 (1963).
- Nász, I., Lengyel, A., Adám, É. és Medveczky, P.: Orvostud., 27, 219 (1976).
- Nász, I., Lengyel, A. és Cserba, I.: Arch. ges. Virusforsch., 36, 80 (1972).
- Nász, I., Lengyel, A., Dán, P. és Kulcsár, G.: Lancet, ii, 717 (1961).
- Nász, I., Lengyel, A., Dán, P. és Kulcsár, G.: Acta microbiol. Acad. Sci. hung., 9, 69 (1962).
- Nász, I. és Pereira, H. G.: MTA Orv. Biol. Tud. Oszt. Közl., 15, 327 (1965).
- Nász, I. és Tóth, M.: Acta microbiol. Acad. Sci. hung., 5, 377 (1958).
- Nász, I. és Tóth, M.: Acta microbiol. Acad. Sci. hung., 6, 85 (1959a).
- Nász, I. és Tóth, M.: Lancet, ii, 128 (1959b).
- Nász, I. és Tóth, M.: Lancet, i, 285 (1960a).
- Nász, I. és Tóth, M.: Zbl. Bact. I. Orig., 178, 141 (1960b).
- Nermut, M. V.: Virology, 65, 480 (1975).
- Pereira, H. G. és Wrigley, N. G.: J. Mol. Biol., 85, 617 (1974).
- Schranz, V., Kulcsár, G., Dán, P., Horváth, J., Nász, I., Barinszki, I. F. és Ugrjumov, E. P.: Acta microbiol. Acad. Sci. hung., 26, 1 (1979).
- Wadell, G.: Intervirology, 11, 47 (1979).