

## ÖSSZEKÖTŐ ELEMELK A HEXON POLYPEPTIDEK KÖZÖTT A KÉTDIMENZIÓS KRISTÁLYLEMEZBEN

ÁDÁM ÉVA és NÁSZ ISTVÁN, az MTA levelező tagja

Közlésre érkezett: 1980 II. 5.

Korábbi vizsgálatainkban kimutattuk, hogy az 1-es típusú adenovírussal fertőzött sejtekből kivont, nagyfokban tisztított és koncentrált hexon kapszomerek megfelelő eljárással kristályosíthatók (Nász és Ádám 1977). A kristályosodás során tetraéder alakú háromdimenziós és egyrétegű, de különböző felépítésű — tömör, vagy lyukacsos — kétdimenziós kristálylemezek jönnek létre (Ádám és Nász 1979a, Nász és Ádám 1978). A tömör, kétdimenziós kristálylemezekben a hexonok hexagonalis rendszert alkotnak, hasonlóan a vírusrészecke fehérjeburkát alkotó hexon kapszomerekhez (Horne és mtsai 1959, Caspar és Klug 1962). Arra is rámutattunk, hogy a kétdimenziós kristálylemezben az egyes hexonokat a hat legközelebbi szomszédos hexonnal híd-szerűen finom strukturális elemek kapcsolják össze. Jelen közleményünkben ezekre a több komplett hexon közötti összekötő elemekre vonatkozó vizsgálatainkat ismertetjük és beszámolunk azokról az összekötő elemekről, amelyeket a komplett hexonokat felépítő három polypeptid alegység között mutatunk ki.

### *Anyagok és módszerek*

#### *A hexon fehérjék tisztítása*

1-es típusú adenovírussal fertőzött HEp-2 sejtekből kivont szolubilis fehérje komponenseket ultracentrifugálással választottuk el a virionoktól. A hexon kapszomereket ismételt anioncserés kromatográfiával és gélszűréssel szeparáltuk és tisztítottuk (Lengyel és Nász 1970, Nász és mtsai 1972, Medveczky és mtsai 1976). A fehérje koncentrációt Lowry és mtsai eljárása szerint határoztuk meg (1951).

#### *Kristályosítás*

A nagyfokban tisztított és koncentrált hexon készítményeket 0,5 M-os acetátpufferrel szemben (pH 4,5) dializáltuk +4 °C-on 72 órán át, majd üveg-

csövekben tároltuk  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on. Az anyagokat folyamatosan vizsgáltuk fény-, és elektronmikroszkóppal. A fénymikroszkóppal tetraéder alakú háromdimenziós kristályok képződését figyeltük meg, a koncentrációtól függően néhány óra, vagy néhány nap alatt. Ezzel párhuzamosan megjelentek az elektronmikroszkóppal kimutatható kétdimenziós, egyrétegű hexon kristálylemezek (Ádám és Nász 1979a, b, 1980, Nász és Ádám 1977, 1978).

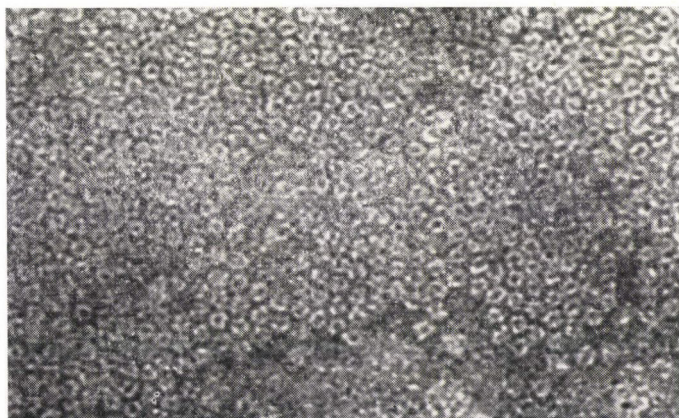
### *Elektronmikroszkópos vizsgálatok*

A vizsgálati anyagokat Formwarral bevont és szenezett mikroostélyra adszorbeáltattuk, majd 1%-os uranylacetáttal negatív kontrasztfestést végeztünk. A vizsgálatok 60 kV feszültség mellett JEM 100 B elektronmikroszkóppal történtek, 100 000-szeres alagnagyítással. A fényképek nagyítása az elektronmikroszkópos negatívról készült, 300 000-szeres és 700 000-szeres végnagyítással. Egyes esetekben ezeket a nagyított képeket lefényképeztük és nagyobb nagyítással vizsgáltuk fénykép vagy diapozitív formájában. Az elektronmikroszkópos negatív filmről éles fókuszálással direkt készített képeken a háttér szemcsézettség gyakran zavarta a finom szerkezet részletes megfigyelését. Ezért a nagyításokat enyhén alulfókuszolt pozícióban készítettük el (Horne és mtsai 1975, Yabe és mtsai 1979). Így a háttér szemcsézettség lényegesen gyengült és a finom struktúrelemek jobban elkülöníthetővé váltak.

### *Eredmények*

#### *Az interhexonalis összekötő elemek mérete*

A tömör kétdimenziós hexagonalis elrendeződésű kristálylemezben az egyes hexonok között rések láthatók. Ezek átlagos mérete — a három nem párhuzamos hexonsor irányában többszáz mérésrel való meghatározás alapján — mintegy  $15\text{--}30\text{ \AA}$  között váltakozott. A különböző preparátumokban az értékek némileg különböztek egymástól (Ádám és Nász 1980, Nász és Ádám 1978). Az 1. ábrán bemutatott kétdimenziós kristályban például a függőleges irányú hexonsorban  $17,3 \pm 2,1\text{ \AA}$  volt a réstávolságok átlaga, ezzel a hexonsorral balról 60 fokos szöget bezáró hexonsorban  $27,5 \pm 4,4\text{ \AA}$ , a jobbról 60 fokos szöget bezáró hexonsorban pedig  $15 \pm 2,7\text{ \AA}$ . A három nem párhuzamos, tehát különböző irányú hexonsorban minden preparátumban enyhe eltérés mutatkozott a hexonok közti rések átlagos nagyságában. Nagyfeloldású elektronmikroszkópos felvételek megfelelő technikával (1. Anyagok és módszerek) készített nagyításain a hexonok közötti réseken keresztül a szomszédos hexonokhoz hídszerűen húzódó finom összekötő elemeket találtunk. Ezeknek az összekötő elemeknek a hossza a réstávolságoknak megfelelő volt, vastagsága pedig átlagosan  $5\text{--}15\text{ \AA}$  között váltakozott. Összekötő elemek a vírus kapszidban is kimutathatók a hexonok között (Nász 1980, Horne és mtsai 1975).



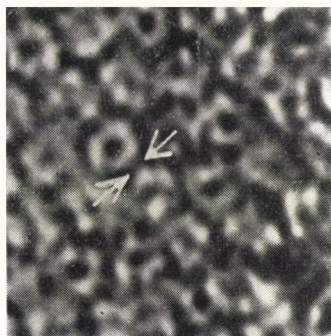
1. ábra Kétdimenziós hexonkristály készítmény elektronmikroszkópos képe. Uranylacetátos festés. A hexonok között finom, radiálisan futó összekötő elemek láthatók, melyek átlagos mérete megközelítőleg  $15-30 \text{ \AA} \times 5-15 \text{ \AA}$ .

#### *Az összekötő elemek alakja*

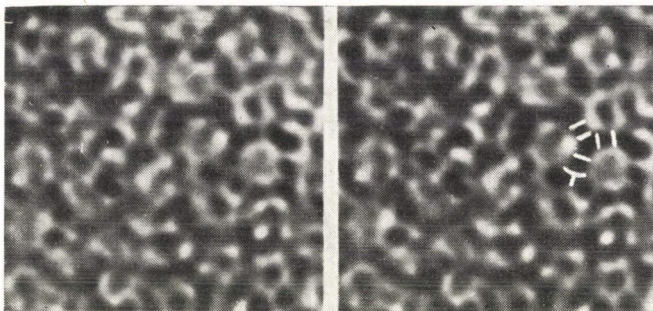
Az összekötő elemek változatos formában fordulnak elő. Általában egyenes hídként kötik össze a szomszédos hexonokat, középső részük, vagy egyik végük azonban gyakran elvékonyodik (1. ábra). Gyakran található a hexonok között az átlag vastagságtól eltérő,  $20-30 \text{ \AA}$  szélességű összeköttetések is (2. ábra), ezek feltehetően két, hossz tengelyük mentén összekapcsolódott összekötő elemnek felelnek meg.

#### *Az összekötő elemek száma és elhelyezkedése*

Az egy adott, komplett hexontól, annak különböző pontjain eredve, általában a hexon középpontjához viszonyítva radiálisan húzódnak az összekötő elemek a hat legközelebbi szomszédos hexonhoz úgy, hogy egymással bi-

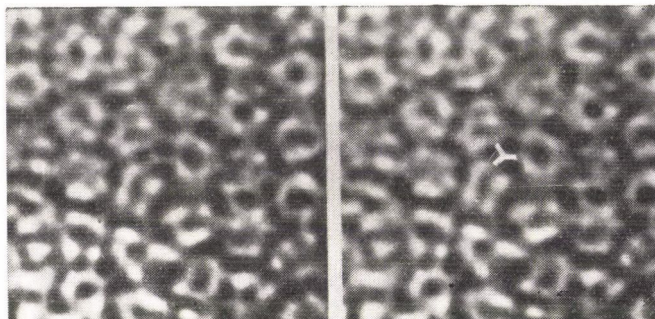


2. ábra A nyíl két hexon közötti, az átlagosnál szélesebb összekötő elemet mutat ( $30 \text{ \AA}$ ). Ezek valószínűleg olyan párhuzamosan futó kettős összekötő elemek, melyek hossz tengelyük mentén összekapcsolódtak.

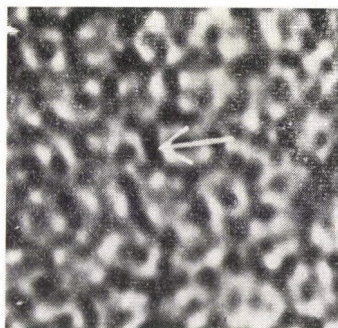


3. ábra Párhuzamosan futó háromszor két összekötő elem (jobb oldali képen megjelölve). A három egymás melletti hexon közötti területet négy részre osztják, melyek közül a középső háromszög alakú. Két-két párhuzamos összekötő elem egymással mintegy 60 fokos szöveget zár be.

zonyos szöveget zárnak be (1. ábra). Számos esetben azonban úgy látszik, hogy a két szomszédos hexont két-két, egymással megközelítőleg párhuzamosan futó összekötő elem kapcsol össze, három legközelebbi hexont pedig hat. Ez a hat összekötő elem a három hexon közötti üres területet négy részre osztja fel. A három szomszédos hexon között a centrálisan elhelyezkedő összekötő elemek megközelítőleg háromszög alakú rést zárnak be, amely mellett mindhárom oldalról egy-egy négyzet, vagy téglalap alakú rész képződik a párhuzamosan futó elemek között. A középen levő háromszög alakú rész úgy jön létre, hogy a három legközelebbi hexon közül bármelyiktől a másik két hexonhoz futó, centrálisan elhelyezkedő összekötő elemek V alakban húzódnak, egymással megközelítőleg 60 fokos szöveget zárva be (3. ábra). Három szomszédos hexon között gyakran található Y alakú összekötő elemek, amelyeknek bármely két szomszédos szára 120 fokos szöveget zár be egymással. Ez az alakzat feltehetően úgy jön létre, hogy a háromszögű rést bezáró összekötő elemek a középrészükig behúzódva összekapcsolódnak egymással. Vastagságuk gyakran nagyobb az

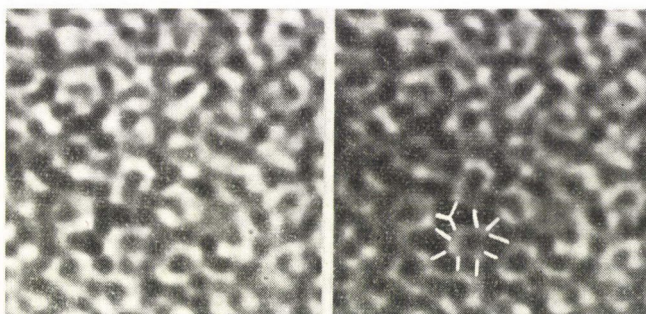


4. ábra Y alakú összekötő elem (jobb oldali képen megjelölve). A három egymás melletti hexon közötti területet három részre osztja. Ez feltehetően úgy jön létre a 3. ábrán bemutatott alakzathoz, hogy a háromszögű rést bezáró három összekötő elem a középrészükig behúzódva összekapcsolódik egymással.



5. ábra A nyíl két hexon közé mutat, melyek között nem látható összekötő elem.

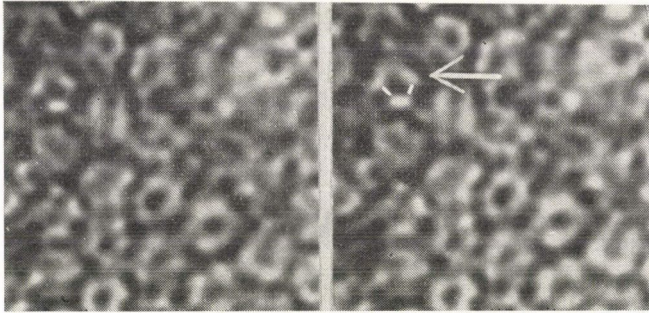
átlagosnál. Az ilyen összekötő alakzat a három szomszédos hexon közötti üres területet három ovális jellegű részre osztja fel (4. ábra). Előfordul, hogy egy-egy szomszédos hexon között nem mutatható ki összeköttetés (5. ábra). Általában azonban bármely hexon és hat legközelebbi szomszédja között 6–10 összekötő elem mindig kimutatható volt (6. ábra).



6. ábra Centrálisan elhelyezkedő hexon, melyet a hat legközelebbi szomszédjával 10 összekötő elem kapcsol össze (jobb oldali képen megjelölve). Köztük egy Y alakú összekötő elem, amely a centrális hexont két másik hexonnal kapcsolja össze (ezért kettőnek számítható).

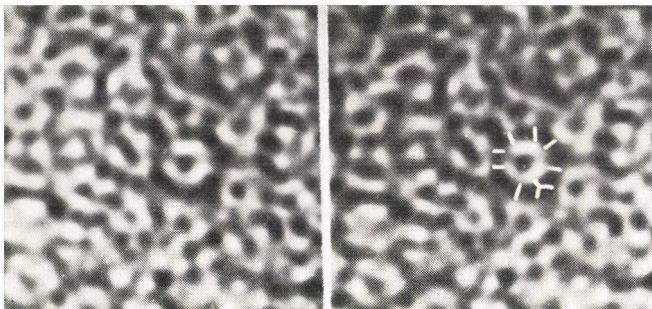
#### *Intrahexonalis összekötő elemek*

A komplett hexon kapszomereket három polypeptid alegység építi fel a háromszoros szimmetriának megfelelően (Pereira és Wrigley 1974, Nermut 1975, Nász és mtsai 1972, Franklin és mtsai 1971, Cornick és mtsai 1971). Az uranylacetáttal, vagy más negatív festékekkel kezelt készítményben ritkán látszik tisztán, hogy az egyes hexonok három fő építő elemből állnak, amit a polypeptidek egyik végének elmozdulása, vagy elhajlása a másik végéhez viszonyítva, illetve a festődési viszonyok magyaráznak. Ennek következtében akár hat polypeptidből állónak is tűnhetnek a hexonok (Nermut 1975). Ennek ellenére az uranylacetáttal festett kétdimenziós kristálylemezben található

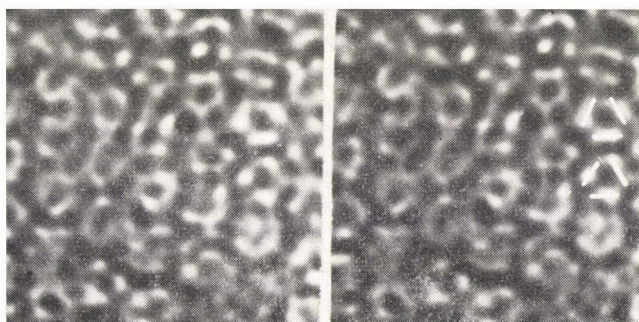


7. ábra Olyan hexon, melyben jól megkülönböztethető, hogy három fő polypeptidből épül fel. Jól láthatók az egyik polypeptidtől a másik kettő felé húzódó intrahexonalis összekötő elemek (jobb oldali képen megjelölve).

voltak olyan hexonok, amelyekben jól megállapítható volt, hogy három fő alkotórészük van. Sok esetben az is látható volt, hogy ezek között a fő strukturális polypeptidek között is léteznek finom összekötő elemek. A 7. ábrán bemutatott hexonon belüli — intrahexonalis — összekötő hidak mintegy  $7,5 \text{ \AA}$  vastagok és  $10,5 \text{ \AA}$  hosszúak. Az intrahexonalis összekötő elemek úgy kötik össze a három strukturális polypeptidet, hogy kialakul a komplett hexon és közepén egy üreg vagy csatorna. Ezért negatív festéssel készített preparátumban a hexonok általában gyűrű alakú képződménynek látszanak. A hexont felépítő polypeptideket úgy látszik, hogy egy-egy intrahexonalis híd köti a szomszédos polypeptidekhez a hexonon belül, azonban nem lehet kizárni, hogy ezek is kettősek. Sok esetben az is megítélhető, hogy az inter-, és intrahexonalis összekötő elemek a polypeptidek végeitől húzódnak a szomszédos hexon polypeptidjeinek illetve az egy hexonon belüli polypeptidek végeihez (8. ábra). A hexonokban az egyes fő polypeptidek téglalap vagy kissé görbült téglalap alakúnak látszanak és az összekapcsolódás következtében kivehető, hogy a hexon alakja megközelítőleg háromszögű és a háromszög csúcsai két-két polypeptid találkozási pontjánál lehetnek, a háromszög oldalait pedig a polypepti-



8. ábra Az interhexonalis összekötő elemek a hexont alkotó három fő polypeptid végeitől futnak a szomszédos hexonokhoz (a jobb oldali képen megjelölve).

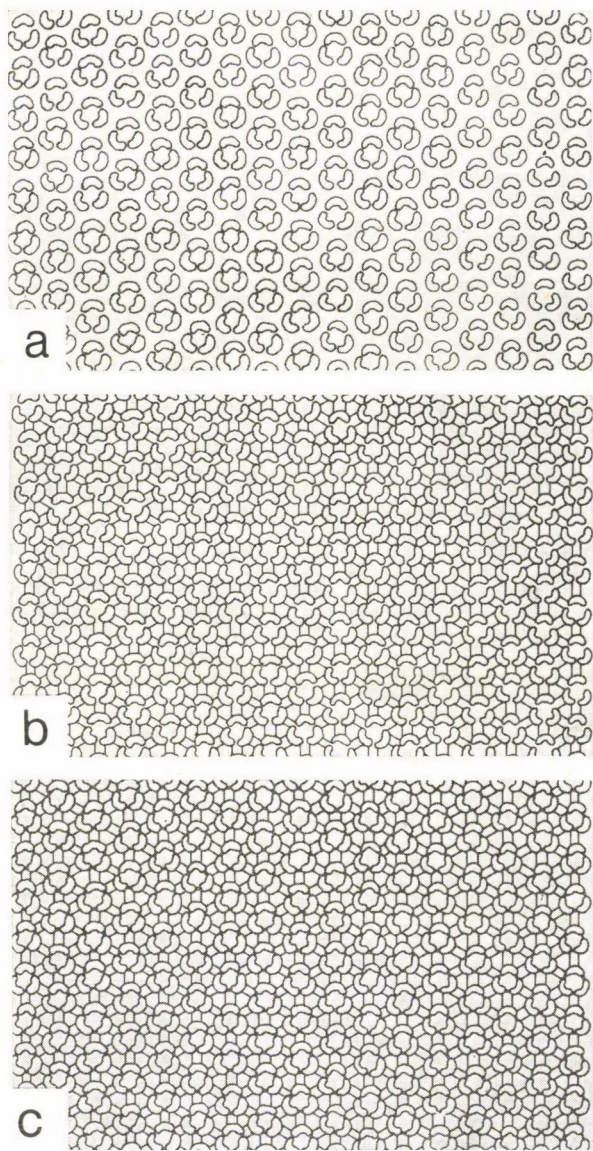


9. ábra A két szomszédos hexon „csúcs és oldal” (corner to edge) orientációban találkozik egymással (jobb oldali képen megjelölve). A polypeptidek hosszanti oldalai jelentik a háromszög alakú hexonok oldalát és a két polypeptid találkozási pontjai a hexonok csúcsát

dek hosszanti oldalai jelentik. A két szomszédos hexonban a polypeptidek orientációja olyan, hogy mindig egy csúcs és egy oldal találkozik egymással (9. ábra).

#### Megbeszélés

Az ismertetett eredményekből és abból a tényből kiindulva, hogy a hexonok háromszoros szimmetriatengellyel rendelkeznek (Crowther és Franklin 1972, Pereira és Wrigley 1974, Nermut 1975), tentatív diagrammot készítettünk a tömör kétdimenziós hexon kristálylemez molekuláris elrendeződéséről, mely a 10. ábrán látható. A diagram „a” része a hexonokat felépítő három polypeptid kölcsönös elhelyezkedését ábrázolja az egyes hexonokon belül és a hexonok kölcsönös orientációját a kétdimenziós kristálylemezben. Ebben a szerkezetben minden egyes hexon orientációja azonos és equivalens környezetben van a hexagonális elrendeződésnek és a háromszoros szimmetriatengelynek megfelelően. A hexon polypeptidek oldalához — ez egyben a háromszög alakú hexon oldalát is jelképezi — mindig a szomszédos hexon két polypeptidjének vége kerül közelebb. Ez megfelel a „corner to edge” közelítésnek, ahogyan azt a vírus kapszidban a nonamerek közt kimutatták (Nermut 1975, Boulanger és mtsai 1979, Crowther és Franklin 1972, Harasawa és mtsai 1978). A kétdimenziós kristálylemezben úgy látszik, hogy ez a rendszer általános. Természetesen előfordulhatnak szabálytalanságok az egyes hexonok orientációjában azáltal, hogy néhány fokkal elfordulnak a többihez viszonyítva. Ez a rotáció azonban a háromszoros szimmetria miatt maximálisan csak 60 fok lehet. Ekkor azonban a hexonok közötti kötések jellege is szükségszerűen megváltozik. A diagram „b” részén az interhexonális összekötő elemek elhelyezkedését is feltüntettük. Eszerint, tetszés szerint kiválasztott centrális hexon bármely polypeptidjéhez húzódik párhuzamosan egy-egy híd a szomszédos hexon két közelebbi polypeptidjének egyik végéről a háromszoros szimmetria szerint. Ilyen



10. ábra A hexont alkotó polypeptidek kölcsönös orientációját továbbá az inter —, és intra-hexonalis összekötő elemek molekuláris elrendeződését mutató tentatív diagram (lásd szöveg).

módon minden hexont két-két, megközelítőleg párhuzamos — szabályos esetben összesen 12 — összekötő elem kapcsol a hat legközelebbi szomszédjához. Minden kettős párhuzamos összekötő elem a szomszédos két párhuzamos összekötő elemmel azonban mintegy 60 fokos szöveget zár be. Így jön létre az olyan alakzat, amikor a három legközelebbi hexon közötti területet az interhexonalis



kötések négy részre osztják, melyek közül a centrálisan elhelyezkedő rés megközelítőleg háromszög alakú (3. ábra). Elméletileg az tételezhető fel a háromszoros szimmetria alapján, hogy egy centrális hexonnak háromszor két összekötő elem a „sajátja”. Ezek haladnak *tőle* a hat legközelebbi szomszédja közül háromhoz, a másik háromtól viszont a centrális hexon felé haladnak a szomszédos hexonok saját összekötő elemei. Minden egyes hexon polypeptidhez négy interhexonalis összekötő elem csatlakozik, amelyek közül kettő lehet csak a sajátja, vagy a két szélső, amelyek egymással megközelítőleg 120 fokos szöget zárnak be, vagy a két belső, amelyek párhuzamosan futnak egymással. Fel lehet tételteni azt is, hogy minden hexon polypeptidnek négy saját kötődési helye vagy nyúlványa van, amelyek egymással kötődve hozzák létre az interhexonalis összekötő elemeket, vagy azok úgy jönnek létre, hogy két szomszédos hexon egy-egy megfelelő kötődési helye közé egy kis molekulásúlyú külön polypeptid épül be. A diagramm „c” részén az intrahexonalis összekötő elemeket is feltüntettük a hexon polypeptidek közé rajzolt dupla vonalkák formájában, ami a valóságban egyaránt jelenthet egyszálú vagy kétszálú összeköttetést is. Az elektronmikroszkópos képek analízisekor általában egyszálú intrahexonalis összeköttetéseket láttunk, azonban kétségtelen, hogy az intrahexonalis kötések erősebbek, mint az interhexonalisak. Ezért feltételezhető itt is a duplaszálú kötés, mivel nem zárható ki, hogy ezek nem az elektronmikroszkópos képek illetve a rajz síkjában, hanem mélységében helyezkednek el egymás mellett a polypeptidek között. Tekintettel arra, hogy az összekötő elemek együtt maradtak a hexonokkal a fertőzött sejtekből való kivonás és a hosszadalmas tisztítási és koncentrálási eljárások folyamán, feltételezhető, hogy vagy integráns részei a hexon polypeptideknek, vagy azokkal párhuzamosan folyik a sejtekben a szintézisük és velük erős kötéssel kapcsolódnak.

### Összefoglalás

A tömör kétdimenziós, hexagonalis elrendeződésű adenovírus hexon kristálylemezben nagyfeloldású elektronmikroszkópos vizsgálattal finom interhexonalis összekötő elemeket mutattunk ki. A hexonokat felépítő három polypeptid között pedig intrahexonalis összekötő elemeket találtunk. Az interhexonalis összekötő elemek hossza 27,3 Å, szélessége 12 Å volt. Az intrahexonalis összeköttetések hossza 10,5 Å, szélessége pedig 7,5 Å volt. Kimutattuk, hogy a hexonok kölesönös orientációja a kétdimenziós kristálylemezben megfelel a „corner to edge” kapcsolódásnak és az egy hexont alkotó három polypeptid mindegyike megfelel a háromszög alakú hexon egy-egy oldalának, két-két polypeptid találkozási pontja pedig a hexon egy-egy csúcsának. Elektronmikroszkópos felvételek elemzése alapján a hexon polypeptidek és az interhexonalis összekötő elemek molekuláris elrendeződéséről tentatív diagrammot készítettünk. Eszerint egy hexon mindhárom polypeptidjének

mindkét végéhez húzódik párhuzamosan egy-egy összekötő elem a szomszédos hexon két legközelebbi polypeptidjének egyik-egyik végéről a háromszoros szimmetria szerint. Így minden hexont hatszor két párhuzamos összekötő elem kapcsol a hat szomszédjához. Két-két párhuzamos összekötő elem pedig megközelítőleg 60 fokos szöveget zár be egymással.

## IRODALOM

- 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).  
 Caspar, D. L. D. és Klug, A.: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 27, 1 (1962).  
 Cornick, G., Sigler, P. B. és Ginsberg, H. S.: *J. Mol. Biol.*, 57, 397 (1971).  
 Crowther, R. A. és Franklin, R. M.: *J. Mol. Biol.*, 68, 181 (1972).  
 Franklin, R. M., Petterson, U., Akervall, K., Strandberg, B. és Philipson, L.: *J. Mol. Biol.*, 57, 383 (1971).  
 Harasawa, R., Konishi, S. és Ogata, M.: *Jap. J. Vet. Sci.*, 40, 733 (1978).  
 Horne, R. W., Brenner, S., Waterson, A. P. és Wildy, P.: *J. Mol. Biol.*, 1, 84 (1959).  
 Horne, R. W., Pasquali-Ronchetti, Y. és Hobart, J. M.: *J. Ultrastruct. Res.*, 51, 233 (1975).  
 Lengyel, A. és Nász, I.: *J. Virol.*, 6, 406 (1970).  
 Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J.: *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951).  
 Medveczky, P., Csuzi, S., Nász, I., Ádám, É., Berencsi, Gy. és Antoni F.: *Arch. Virol.*, 52, 315 (1976).  
 Nász, I.: *Orvostudomány*, 30—31, 107, (1979—80).  
 Nász, I. és Ádám, É.: *Orvostudomány*, 28, 383, (1977).  
 Nász, I. és Ádám, É.: *Orvostudomány*, 29, 155 (1978).  
 Nász, I., Lengyel, A. és Cserba, I.: *Arch. ges. Virusforsch.*, 36, 80 (1972).  
 Nermut, M. V.: *Virology*, 65, 480 (1975).  
 Pereira, H. G. és Wrigley, N. G.: *J. Mol. Biol.*, 85, 617 (1974).  
 Yabe, Y., Sadakana, H., Isono, H.: *Virology*, 96, 547 (1979).  
 Wadell, G.: *Intervirology*, 11, 47 (1979).