

AZ ADENOVÍRUSOK PENTON ANTIGÉNJÉNEK VIZSGÁLATA

NÁSZ ISTVÁN az orvostudományok doktora, LENGYEL ANNA, ÁDÁM ÉVA
és MEDVECZKY PÉTER

Közlésre érkezett: 1976. IX. 29.

Az adenovírusok tulajdonságainak vizsgálata során Pereira és mtsai írták le először (Klemperer és Pereira 1959, Pereira és mtsai 1959; Pereira M. S. és mtsai 1959), hogy a vírus tenyésztésében három különböző antigén található, melyeket A, B és C jelöléssel láttak el. A továbbiakban tisztázták ezen antigének bizonyos jellegzetes tulajdonságait, a bennük található antigén-determinánsokat, később pedig morfológiájukat is (Valentine és Pereira 1965). A három komponens elnevezése — a velük foglalkozó víruskutatók javaslatára — 1966 óta hexon, penton és fiber (Ginsberg és mtsai 1966).

A penton elnevezésű antigén komponens az ikozahedralis szimmetriájú virion csúcsain helyezkedik el. Morfológiailag három részből áll. Bázisát a virion csúcsát alkotó — megközelítőleg gömb alakú — vertex kapszomer képviseli, melyhez egy hosszúkás, fonal-, vagy pálcika alakú nyúlvány kapcsolódik, végén egy kisebb gömbbel. Ez utóbbi két rész önmagában az adenovírus fiber komponense, mely a virion csúcsaiból radiálisan nyúlik ki és melynek hossza a különböző alcsoportba tartozó típusoknál más és más. A 252 kapszomerból álló adenovírus kapszid összesen 12 pentont tartalmaz egy-egy virionban, mivel az ikozaédernek 12 csúcsa van. A többi 240 kapszomert, melyek az ikozaéder élén és lapjain helyezkednek el, hexonnak nevezik. Egyes szerotípusok tenyésztésében előfordulnak 12 pentonból álló szabályos képletek, ún. dodekonok is (Norrby 1966a).

A penton a legtöbb adenovírus típusnál hő- és tripszinérzékeny, e behatások ugyanis a csúcsi kapszomer bomlását okozzák és ilyenkor az izolált pentonok vagy dodekonok elvesztik a penton bázist és csak a fibernek megfelelő rész marad épen. Emiatt, valamint a struktúrával magyarázható fragilitás következtében a penton a leglabilisabb komponens az adenovírus kapszid összetevői között. E labilitás, valamint a már említett relatíve kis mennyisége miatt a penton tanulmányozása igen nehéz, s egyes típusok esetében nem is sikerült eddig a többi vírus komponenstől szeparáltan, tisztított formában előállítani.

Az adenovírusok pentonja nemcsak struktúrájában tér el a kapszidot alkotó többi morfológiai egységtől, hanem antigén tulajdonságok tekintetében is, továbbá számos fontos és speciális funkcióval bír. A penton antigénről ismeretes, hogy legalább három antigén-determinással rendelkezik. Ezek közül a γ

típus-specifikus és feltételezik, hogy a penton végén levő kis gömbben található, a δ pedig az egyenes pálcá részben helyezkedik el, s ezek együtt alkotják a fiber antigént. A penton bázisban, tehát a csúcsi kapszomerben található β antigén determinánst pedig csoport-specifikusnak tartják. A δ determináns a különböző alcsoportokba tartozó típusoknál különböző, egyeseknél alcsoport-specifikus, másoknál ettől eltérő reaktivitású (Norrby 1968a).

Az adenovírusok pentonja számos funkcióval rendelkezik. Feltételezik, hogy a vírus a pentonjai révén kapcsolódik a sejthez vírusfertőzéskor, s a vírus hemagglutinációban is ezek tapadnak a fiber gömbjével a megfelelő vörösvértestekre (vvt). Ennek alapján érthető, hogy a virion, vagy a több pentonból álló polimer (pl. dodekon és penton dimer) több tapadási ponttal rendelkezvén teljes, komplett agglutinációt tud létrehozni (Nász 1975). Az egyes pentonok azonban csak egy ponton tudnak a vvt-hez kapcsolódni, így agglutinációt csak akkor tudnak létrehozni, ha másik végüket (azaz a csúcsi kapszomereket) valamilyen heterotípusos, adenovírus elleni immunglobulin molekulával összekapcsoljuk. Ezért a penton monomert inkomplett hemagglutininnak nevezik. Hasonló inkomplett hemagglutinin a fiber is, ennek agglutinációjához azonban nem alkalmas bármely heterotípusos ellenanyag molekula, hanem csak alcsoporton belüli, mert ennek a δ determinánssal kell kapcsolódnia, mely — mint említettük — szűkebb reaktivitású.

A penton rendelkezik toxikus hatással, mely a sejtek ún. „korai cytopathogen (CP) hatásával” mutatható ki. Nagyobb mennyiségű penton hatására a sejtek le is válnak az üvegfalról, ezért korai sejtleválasztó faktornak is nevezik (Nász és mtsai 1967).

A pentont összefüggésbe lehet hozni az adenovírusok interferon-indukáló hatásával is (Pusztai és mtsai 1974). Az utóbbi években nukleáz aktivitást is kimutattak az adenovírral kapcsolatban (Burlingham és mtsai 1971).

Jelen közleményünkben a penton egyes funkcióira, aktivitására és immunológiai tulajdonságaira vonatkozó több mint 10 éve folyó vizsgálataink eredményeit foglaljuk össze.

Anyagok és módszerek

Vírusterzsek, sejtenyészetek. Az 1-, 5-, 9-es prototípus, valamint a Pinckney jelölésű onkogén 7-es és a betegből izolált 8-as (Nász és mtsai 1963) típusú humán adenovírus terzseket monolayer HeLa, HEp-2, AV₃ és primer emberi amnion, továbbá szuszpenziós HEp-2 sejt kultúrákban tenyésztettük a már ismertetett módon (Nász és mtsai 1963, Medveczky és mtsai 1976). A vírussal fertőzött sejtekből többszöri fagyasztás és olvasztás és homogenizálás után nyert kivonatot használtuk fel kísérleteinkben, megfelelő tisztítási eljárások után.

Immunsavók. A fenti sejt kivonatokkal, ill. az azokból tisztítási és szeparációs eljárások után nyert szolubilis komponensekkel nyulakat és tengerimalaco-

kat immunizáltunk a már ismertetett módon (Nász és Pereira 1965, Lengyel és mtsai 1965, Lengyel és Nász 1970a, Medveczky és mtsai 1975).

Penton preparátum előállítása. Anioncserés kromatográfia. DEAE cellulóz, DEAE Sephadex A-25 és A-50 oszlopokról emelkedő koncentrációjú NaCl oldatokkal, folyamatos grádiens vagy lépcsőzetes elució alkalmazásával nyertük a szeparált adenovírus komponenseket, a már ismertetett módon (Nász és Pereira 1965, Lengyel és Nász 1970a, Nász és mtsai 1968, Nász és mtsai 1971).

Gélfiltráció. Az adenovírus komponensek tisztításához Sephadex G-200 oszlopot használtunk a már leírt módon (Nász és mtsai 1971).

Ultracentrifugálás. A virionok tisztításához equilibrium centrifugálást alkalmaztunk, melyet egyes esetekben egy CsCl párnán való 1 órás előzetes tisztítási ultracentrifugálás előzött meg (Nász és Pereira 1965, Lengyel és Nász 1970b, Nász és mtsai 1971, Medveczky és mtsai 1975). A szolubilis komponensek vizsgálatához (Lengyel és Nász 1970b,) valamint a DNS szedimentációs profiljának meghatározásához (Medveczky és mtsai 1975) szaharóz gradiensen való zóna-centrifugálást alkalmaztunk.

Komplementkötési reakciót (KKR), hemagglutinációt (HA) és hemagglutináció gátlást, valamint „hemagglutination enhancement” tesztet az inkomplett hemagglutináció kimutatására Takátsy féle mikrotitrátorban, vagy esetenként csövekben végeztünk (Nász és Pereira 1965, Lengyel és Nász 1970b, Norrby és mtsai 1967).

Géldiffúziós precipitációt, immunelektroforézist, immunozmoforézist és ún. rakéta elektroforézist a már ismertetett módon (Nász és Pereira 1965, Nász 1967, Nász és mtsai 1968, 1971, Renn és Evans 1976, Ádám és mtsai közlés alatt) Difco Noble agar ill. SeaKemTM agaróz felhasználásával végeztünk.

Enzimkezelések. Tripszinkezelést 5x kristályosított tripszin (Serva) felhasználásával 37 C°-on végeztünk, majd equivalens mennyiségű szója inhibitor (Serva) adtunk a reakcióelegyhez. Receptor destruáló enzim (RDE) kezeléshez cholera filtrátumot (Philips-Roxane) használtunk. Lizozim, pronáz és ribonukleáz kezelést a P³² jelzett E.coli DNS izolálására a már leírt módon (Medveczky és mtsai 1975) végeztünk.

Nukleáz aktivitás kimutatására P³² jelzett E.coli DNS-t használtunk s meghatároztuk a reakcióelegy savoldékony nukleotid tartalmát és a DNS szedimentációs profilját vagy elektroforetikus mobilitását a már ismertetett módon (Medveczky és mtsai 1975, Medveczky és mtsai 1976).

A radioaktivitás mérése Packard Tri-carb típusú liquid scintillációs spektrométerben történt (Medveczky és mtsai 1975), a *fehérje meghatározás* Lowry és mtsai módszere szerint (1951), a *DNS mennyiségi meghatározása* 260 nm-en mért abszorpció alapján PYE-Unicam SP 800 ill. Spektrom 204 spektrofotométerben.

A DNS elektroforetikus mobilitását agaróz gél elektroforézissel (Medveczky és mtsai 1976) vizsgáltuk.

Az aminosav összetételt JLC-5 AH (Jeol) automata aminosav analizátor segítségével a már ismertetett módon (Ádám és mtsai közlés alatt) határoztuk meg.

Az izoelektromos pont meghatározás 100 ml-es (LKB 8100 Ampholine Electrofocusing Equipment) készülékben történt (Ádám és mtsai közlés alatt).

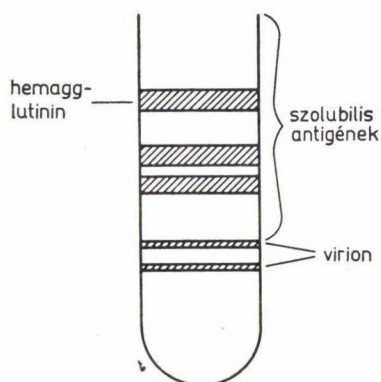
Eredmények

Kísérletek a penton és dodekon szeparálására. Ultracentrifugálás.

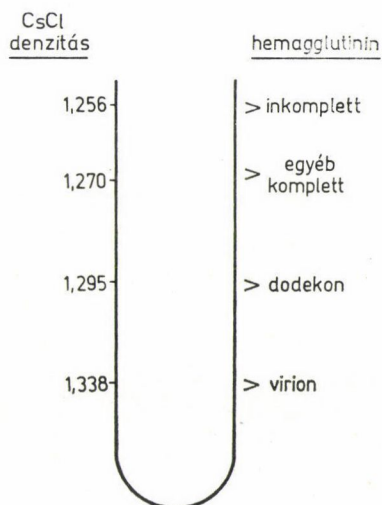
E kísérletek során CsCl equilibrium centrifugálással szeparáltuk a teljes vagy részben előzőleg Arceton 113-mal tisztított vírustartalmú sejtkivonatból a szolubilis komponenseket. Miután ismeretes, hogy az adenovírus hemagglutinációs tulajdonságáért a penton felelős valamilyen formában, így a pentont, vagy annak aggregátumait tartalmazó frakciók megfelelő species vvt-jeivel komplett vagy inkomplett agglutinációt mutatnak (Norrby 1968a). A 7-es (7P) típusú onkogén adenovírus törzs, mely a Rosen szerinti (1960) I. hemagglutinációs csoportba tartozik, s ennek megfelelően majom vvt-eket agglutinál, az equilibrium centrifugálási kísérletben egy jól meghatározott, éles hemagglutinációs csúcsot mutatott a 9—10. frakcióban (1. ábra). Ez a szolubilis komplett hemagglutinin jóval alacsonyabb denzitású, mint az infektív vírus, így attól jól elválasztható ezzel a szeparálási módszerrel, viszont ugyanitt más szolubilis komponensek, hexon és fiber is található, amit az azonos típusú és más adenovírus típus ellen termelt immunsavókkal végzett pozitív KKR reakcióval bizonyítottunk. Miután ez a hemagglutinin komplett hemagglutinációt adott, s titerét heterotípusos adenovírus immunsavó hozzáadása nem befolyásolta, ez a szolubilis komponens minden valószínűség szerint több penton aggregátuma, valószínűleg tehát dodekonnak felel meg.

A Rosen szerinti (1960) II. hemagglutinációs alcsoportba tartozó típusok közül, melyek a patkány vvt-ekkel adnak teljes agglutinációt, a 8-as és 9-es típust vizsgáltuk centrifugálási módszerekkel. A két típus equilibrium centrifugálással kapott eredményei igen hasonlóak, így a 2. ábrán a 8-as típussal kapott hemagglutinációs eredményeket mutatjuk be. A három komplett hemagglutinációt mutató csúcs közül az első az 1,34 g/ml denzitású adenovirionnak felel meg. A második, 1,295 g/ml denzitás körüli a dodekonnak, míg az alacsonyabb denzitású frakciókban komplett és inkomplett hemagglutininek egyaránt található. Utóbbiak kimutatására a hemagglutinációt heterotípusos adenovírus immunsavó jelenlétében kell elvégezni. Az itt található komplett hemagglutininek penton dimereknek felelhetnek meg, míg az inkomplett hemagglutininek monomer pentonnak és fibernek.

E típusok különböző komponenseit előzetes kromatográfiás szeparálás után (l. később) szaharóz grádiensen való zóna-centrifugálással is vizsgáltuk.

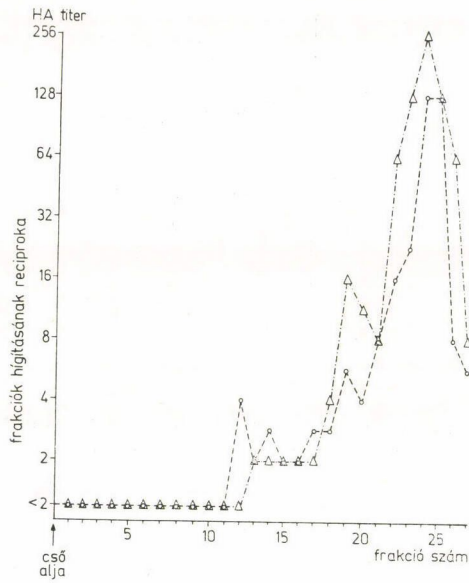


1. ábra: 7-es típusú adenovírus CsCl equilibrium centrifugálása során nyert sűrűsödési csíkok. A víruskomponensek elhelyezkedése

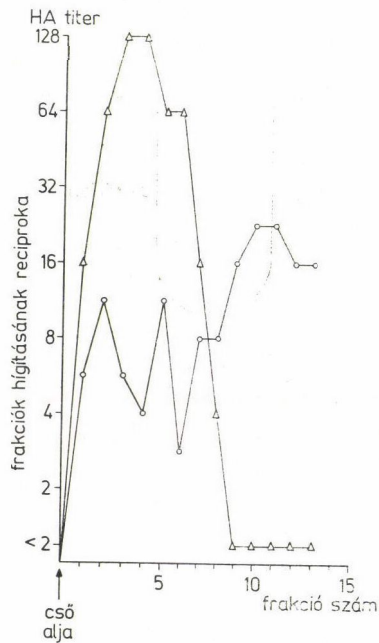


2. ábra: 8-as típusú adenovírus hemagglutininjeinek elhelyezkedése CsCl equilibrium centrifugálás után

A penton a centrifugacső felső harmadában helyezkedett el (3. ábra), legnagyobb mennyiségben a felszínhez közel, a 22—26. frakcióban. A két típus dodekonjának vizsgálatakor az eredmények már nem voltak ennyire egybehangzóak. A 9-es típus dodekonjának zóna-centrifugálásakor egy határozott csúccsal rendelkező, nagyobb ülepedési sebességű komplett hemagglutinin-t találtunk a cső alsó felében (4. ábra) és egy kisebb ülepedési sebességű inkomplett hemagglutinin-t a cső felső harmadában (5. ábra). A 8-as típus dodekonja sokkal labilisabbnak bizonyult és a cső alján és közepén is találtunk a komplett hemagglutinin mellett (4. ábra), azt meghaladó mennyiségű inkomplett hemagglutinineket (5.

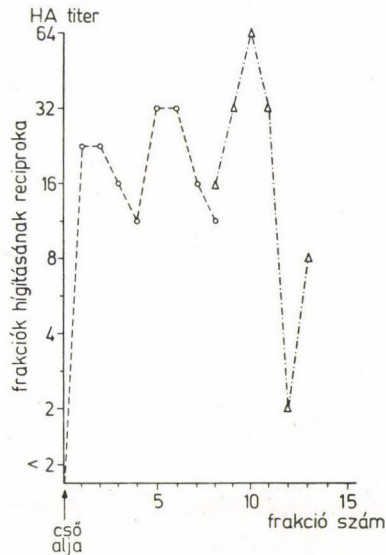


3. ábra: 8-as és 9-es típusú adenovírus pentonjának zóna-centrifugálása szaharóz grádiensen. A frakciók HA titeré heterotípusos adenovírus elleni immunsavó jelenlétében.
 Jelek: ○ — — — ○ 8-as típus △ — · — · △ 9-es típus



4. ábra: 8-as és 9-es típusú adenovírus komplett szolubilis hemagglutininjének zóna-centrifugálása szaharóz grádiensen.
 Jelek: ○ — — — ○ 8-as típus △ — — — △ 9-es típus

ábra), jelezve, hogy a centrifugálási folyamat végére már a dodekon elbomlott kisebb számú pentonból álló poli- vagy dimerekre, illetve monomerekre. Előbbiek még komplett hemagglutininékként mutathatók ki, utóbbiak már csak heterológ adenovírus immunsavó jelenlétében agglutinálnak, tehát inkomplett hemagglutininékként.



5. ábra: 8-as és 9-es típusú adenovírus szolubilis komplett hemagglutininjének zóna-centrifugálása során kimutatható inkomplett hemagglutininékként. Jelek: 1. 3. ábra.

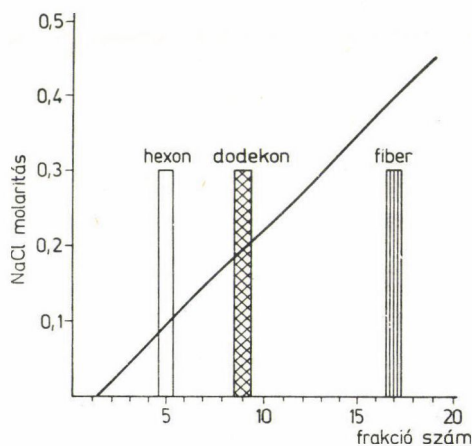
Anioncserés kromatográfia

A 7-es típusú adenovírus DEAE cellulózon való kromatográfiája során (6. ábra) a szolubilis komplett hemagglutinin (dodekon) 0,2M koncentrációjú NaCl oldattal eluálódott az oszlopról, a többi szolubilis komponens közül a hexon ennél előbb, 0,1M koncentrációnál, a fiber pedig jóval hátrább, 0,4M NaCl-dal. DEAE Sephadex A-50 oszlop használata esetén a dodekon eluciója zömmel 0,25—0,35M NaCl oldatnál következett be.

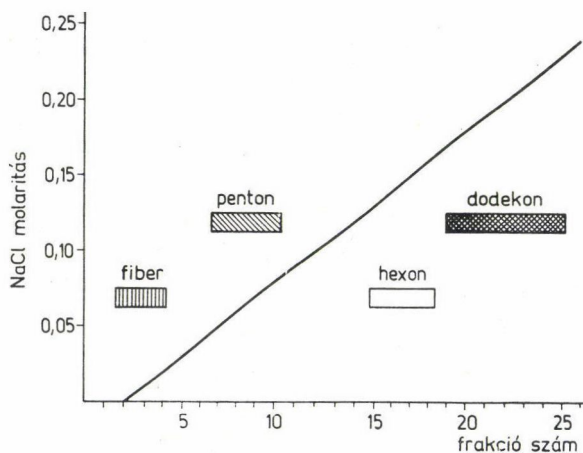
A II. hemagglutinációs alcsoportba tartozó típusok anioncserés kromatográfiájakor a DEAE Sephadex A-25 oszlop biztosította a legjobb szeparálást (Lengyel és Nász 1970b, Nász és mtsai 1971), bár a komponensek eluciójának sorrendje mindkét DEAE Sephadex készítménynél azonos volt: fiber, penton, hexon, dodekon. Ezt illusztrálja a 7. ábra, melyen a 8-as típusú adenovírus szolubilis komponenseinek elució sorrendjét mutatjuk be. Az azonos alcsoportba tartozó 9-es, 10-es és 13-as típus anioncserés kromatográfiája hasonló sorrendet mutatott, sőt a III. alcsoportba tartozó 1-es és 5-ös típusé is. Utóbbiak azonban

dodekonnal nem rendelkeznek, így ezeknél sorrendben csak fibert, pentont és hexont mutattunk ki (8. ábra).

A kísérletek során a penton és dodekon tartalmú frakciók sejttenyészeteken kifejezett toxikus hatást mutattak. E „korai CP hatás”, valamint a tripszinérzékenységi vizsgálatok bizonyították, hogy a hemagglutináció alapján identifikált komponens valóban pentont tartalmaz.

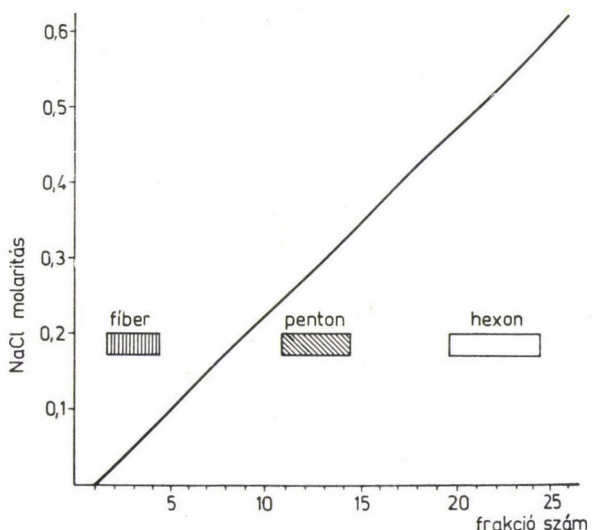


6. ábra: 7-es típusú adenovírus szolubilis komponenseinek elúciós sorrendje DEAE cellulóz oszlopon végzett anioncserés kromatográfiában



7. ábra: 8-as típusú adenovírus szolubilis komponenseinek elúciós sorrendje DEAE Sephadex A-25 oszlopon végzett anioncserés kromatográfiában

A penton ill. dodekon tartalmú frakciók mindhárom alcsoportba tartozó típusok esetében hő- és tripszinérzékenynek bizonyultak. A 7-es típus hemagglutininjének titere 10 perces 56 C°-on való hőkezelés vagy 1 órás 0,1%-os trip-



8. ábra: 1-es típusú adenovírus szolubilis komponenseinek elúciós sorrendje DEAE Sephadex A-50 oszlopon végzett anioncserés kromatográfiában

szinkezelés hatására tizedére csökkent. Az I. táblázatban bemutatjuk a 8-as típus pentonjának és komplett hemagglutininjének tripszinkezelés hatására bekövetkezett változását. A penton, mely saját és más alcsoportba tartozó heterotípusos adenovírus immunsavó jelenlétében egyaránt agglutinálja a patkány és bizonyos típusok esetében a humán vvt-eket, tripszinkezelés hatására már csak saját alcsoporton belüli immunsavó jelenlétében agglutinált, vagyis fiberré alakult. A dodekon hemagglutinációs titere is kb. huszadrészeére csökkent, s tripszinkezelés után nagy mennyiségű fiber keletkezett. Mindkét anyag korai CP hatása is megszűnt a tripszinkezelés után.

I. táblázat

8-as típusú adenovírus penton és dodekon tripszinerzékenységének vizsgálata

Vizsgált hemagglutinin	tripszin kezelés	komplett HA titer	inkomplett HA titer		korai CP hatás
			azonos	más	
			alcsoportba tartozó immunsavó jelenlétében		
penton	0	- ¹	32 ²	32	+
	+	-	48	4	-
dodekon	0	512	512	512	+
	+	24	768	96	-

¹ < 1 : 4

² reciprok érték

Vörösvértestre való adszorpció és elúció

A 7-es típus szolubilis hemagglutininjé teljes mértékben adszorbeálódott a rhesus vvt-hez, 1 órán át 37 C°-on. Más komponensek számottevő adszorpciót nem mutattak. Éjszakán át 4 C°-on a hemagglutinín legnagyobb része eluálódott a vvt-ekről, ily módon a hemagglutinín visszanyerhető és más szolubilis komponensektől elválasztható.

II. táblázat

8-as típusú adenovírus dodekonnal és pentonnal végzett vvt adszorpciós és RDE elúciós kísérletek

Vizsgált hemagglutinín	kezelés	komplett HA titer	inkomplett HA titer	
			azonos	más
			alcsoportha tartozó immunsavó jelenlétében	
dodekon	0	32 ¹	32	32
	humán vvt	— ²	16	12
	RDE a vvt-hez	256	256	256
penton	0	—	32	32
	humán vvt	—	32	32
	Ad-13 savó ³	24	32	32
	humán vvt	8	12	8
	humán vvt RDE a vvt-ekhez	— 192	— 192	— 192
penton	0	—	24	24
	Ad-11 savó ⁴	12	24	24
	humán vvt	4	12	8
	humán vvt RDE a vvt-ekhez	— 24	4 48	— 48

¹ reciprok érték

² < 1 : 4

³ azonos alcsoportha tartozó heterotípusos immunsavó

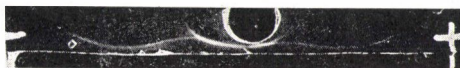
⁴ más alcsoportha tartozó heterotípusos immunsavó

A II. hemagglutinációs alcsoportha tartozó típusok komplett hemagglutininjé szintén adszorbeálódik a patkány és (bizonyos típusok esetében) humán vvt-ekhez, elúciójuk azonban semmilyen hőfokon sem következik be. Ha a 8-as vagy 9-es típus szolubilis komplett hemagglutininjét humán vvt-ekhez adszorbeáltuk, úgy RDE kezeléssel azok eluálhatóak voltak a vvt-ekről s ily módon tisztított formában kvantitativ visszanyertük azokat. Monomer pentonok esetében azonban, melyek inkomplett hemagglutinációt mutatnak csak, ez az adszorpció csak alig, vagy egyáltalán nem következett be. Ha azonban az inkomplett hemagglutinínhez először heterotípusos adenovírus immunsavót adtunk, s így komplett hemagglutininné alakítottuk át, úgy az adszorpció létrejött, s ha humán vvt-eket használtunk és két egymás utáni vvt kezelést végeztünk, úgy a penton legnagyobb részét tisztított és koncentrált formában RDE kezeléssel

vissza tudtuk nyerni. A II. táblázat mutatja e kísérletek eredményeit. Láthatjuk, hogy a penton előkezelésére mind saját, mind más alcsoportba tartozó heterológ adenovírus immunsavó alkalmas volt. Eluciót csak humán vvt-ek és csak RDE kezelés hatására értünk el, patkány vvt-ekkel adszorpció elérhető ugyan, de elució RDE-vel nem lehetséges.

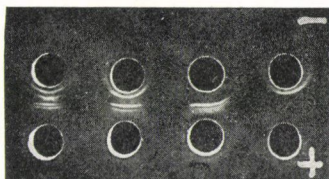
Immunológiai vizsgálatok

Az 5-ös adenovírus típus géldiffúziós vizsgálatakor három precipitációs csíkot kaptunk, melyek közül kettő részleges azonosságot mutatott, ez a penton és fiber antigénnek megfelelő csíkokra volt jellemző. Elektromos térbe helyezve a vírusanyagot a három antigén, a hexon, a penton és a fiber más-más elektroforetikus mobilitást mutatott. Az 5-ös típusal végzett immunoelektroforézis eredményét mutatja a 9. ábra. A három precipitációs ív közül a középső, amelyik



9. ábra: 5-ös típusú adenovírus immunoelektroforézise homológ immunsavóval

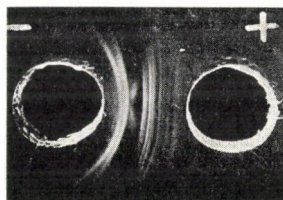
tehát a legkisebb mobilitást mutatja, a penton. Immunozmozforézissel az antigén kimutatása már három óra alatt is teljes mértékben sikerül, a penton ennél a módszernél is középső pozíciót foglal el (10. ábra). A vírusanyagot tripszinnel



10. ábra: 5-ös típusú adenovírus immunozmozforézise. A felső rezervoárokban balról jobbra: teljes vírus, tripszinnel kezelt teljes vírus, hexon és fiber. Az alsó rezervoár sorban 5-ös típus ellen termelt immunsavó

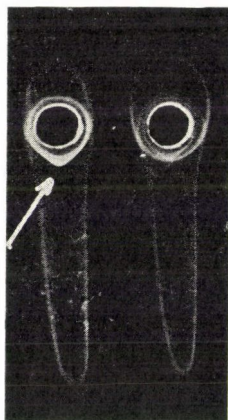
kezelve a csík eltűnik és a fibernek megfelelő csík növekszik, jelezve, hogy a penton elbomlott, s belőle fiber szabadult fel. Ezzel a módszerrel a penton precipitációs csíkja már az első órában megjelenik, s három órás futtatás után pedig egyes komponensek több csíkot is adhatnak, melyek között középen a penton β determinánsának megfelelő vattaszerű precipitációs köteg, mely néha ívelt, és a negatív pólus felé hajlanak a végei, jól kivehető (11. ábra).

Az 1-es típusú adenovírus antigénjeit rakéta elektroforézis módszerével vizsgálva a hexonnak megfelelő precipitációs terület kúp alakú, az ugyancsak



11. ábra: 5-ös típusú adenovírus immunozenoforézise. + pólus felőli rezervoárban 5-ös típus elleni immunsavó. – pólus felőli rezervoárban 5-ös típusú adenovírus

pozitív irányba vándorló penton precipitátuma homogén opálosodás formájában jelenik meg, a hexon precipitációs területén belül. Tripszinkezelés után ez a precipitátum eltűnik és a fiber csíkja, mely körívszerűen veszi körül az antigén rezervoárt, megnövekszik (12. ábra).

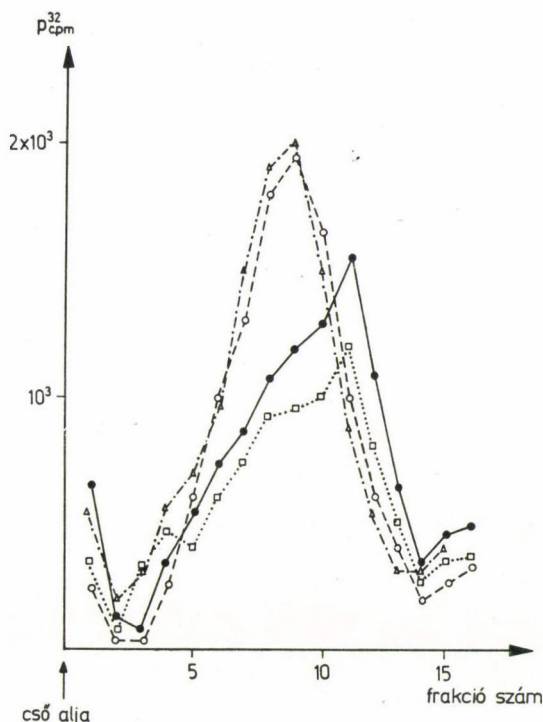


12. ábra: 1-es típusú adenovírus „rakéta” elektroforézise homológ immunsavót tartalmazó agaróz gélben. A nyíl a pentonnak megfelelő precipitációs területet jelöli

A 7P típusú adenovírus törzs tisztított hemagglutininje KKR-ban elsősorban a homológ vírustörzs ellen termelt immunsavóval reagált, kis mértékben azonban a heterológ 2-es típus elleni immunsavóval is. A teljes vírust tartalmazó anyag homológ immunsavóval géldiffúziós precipitációban, az 5-ös típushoz hasonlóan szintén három csíkot adott, melyek közül a középső feltehetőleg a pentonnak felelt meg (Nász és Pereira 1965).

A penton nukleáz aktivitásának vizsgálata

Egyes adenovírus típusokról megállapították, hogy tartalmazznak olyan endonukleázt, mely bontja az adenovírus DNS-t (Burlingham és mtsai 1971, Burlingham és Doerfler 1972), s az enzim a virionon belül a pentonnal hozható összefüggésbe. Kísérleteinkben az 1-es típusú adenovírussal fertőzött sejtek kivonatával sikerült olyan endonukleáz aktivitást kimutatnunk, mely az izotóp-



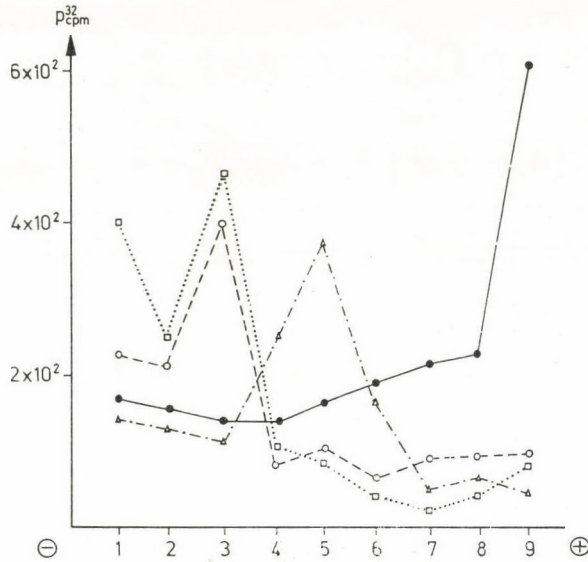
13. ábra: Tisztított 1-es típusú adenovirionok endonukleáz aktivitása anti-HEp IgG és tripszinnel előkezelés után.

Jelek: \triangle - - - \triangle P^{32} DNS + puffer \bullet - - - \bullet P^{32} DNS + virion
 \square \square P^{32} DNS + anti-HEp IgG-vel kezelt virion \circ - - - \circ P^{32} DNS + tripszinnel kezelt virion

pal jelzett DNS-t savoldékony oligonukleotidokig lebontotta. A kontroll sejtkivonat, mely nem fertőzött sejtekből készült, nem mutatott ilyen aktivitást. Sejtekből kivont, tisztított virionokkal viszont vírushoz asszociált endonukleázt mutattunk ki, melynek hatására kisebb molekulásúlyú DNS fragmentumok keletkeztek, mint a kontroll sejtek kivonatának hatására. Az esetleges virionra kötődött, sejteredetű enzimek lehetőségének kizárására anti-HEp IgG-vel kezelt virionokkal is elvégeztük a kísérletet, ez azonban nem tért el a kezeletlen

virionnal kapott szedimentációs profiltól. Tripszinnel kezelt virionokkal azonban a virion nukleáz aktivitása megszűnt (13. ábra), ami a penton szerepére utal a nukleáz aktivitásban.

Az 1-es típusú adenovírusból ezért megfelelő tisztítási lépéseken keresztül tisztított pentont állítottunk elő, és megvizsgáltuk annak endonukleáz aktivitását mind *E. coli*, mind pedig 1-es típusú adenovírus DNS-ével. A 14. ábra a



14. ábra: 1-es típusú adenovírus tisztított pentonja endonukleáz aktivitásának vizsgálata P^{32} jelzett *E. coli* DNS szubsztráttal. A DNS elektroforetikus mobilitása 0 (□), 5 (○), 20 (△), és 60 (●) perc inkubáció után

különböző ideig pentonnal inkubált *E. coli* DNS elektroforetikus mobilitását mutatja. Míg a 0 és 5 perces inkubáció után nem látszik még lényeges bomlás, 20 perc után már erősen nő az elektroforetikus mobilitás, 60 perc után pedig a DNS nagyrészt lebomlott gyorsan vándorló fragmentumokra. Szubsztrátként 1-es típusú adenovírusból kivont, tisztított DNS-t használva, hasonlóképpen kimutattuk a nukleáz aktivitást (15. ábra). Tisztított hexon és fiber készítmények nem okozták a DNS szubsztrát hasonló bomlását.

A penton aminosav összetételének meghatározása

Az 1-es típusú adenovírus szolubilis pentonjának aminosav összetételét összehasonlítottuk a virion és a nem fertőzött kontroll sejtpreparátumok aminosav összetételével (III. táblázat). A virionban a bázikus aminosavak relatív



15. ábra: 1-es típusú adenovírus szeparált DNS-e elektroforetikus mobilitásának változása tisztított 1-es típusú penton jelenlétében, agaróz gélelektroforézisben.

Jelzések: 1 = kezelés előtt, 2 = pentonnal való 5 perces inkubáció után, 3 = pentonnal való 60 perces inkubáció után

aránya magasabb, mint a pentonban (lys, arg), utóbbiban viszont magasabb aszparaginsav, treonin és szerin tartalmat találtunk, mint akár a virionban, akár a kontroll sejtekben.

A penton izoelektromos pontjának meghatározása

Az 1-es típusú adenovírus szolubilis komponenseinek izoelektromos pontját vizsgálva az egyes vírusfehérjék a 72 órás vizsgálati idő alatt a nekik megfelelő pH tartományban opaleszkáló korong formájában gyűltek össze. A pentonnak megfelelő frakciók fehérje meghatározás és géldiffúziós precipitáció mód-

III. táblázat

1-es típusú adenovírus tisztított pentonjának és virionjának aminosav összetétele

Aminosav ¹	Penton	Virion	HEp-2	AV ₃
Lys	5,04	6,34	14,86	17,61
His	2,03	2,11	nyom ²	nyom
Arg	3,80	7,99	2,35	1,50
Asp	13,19	11,14	10,68	8,39
Thr	8,23	6,90	5,58	4,67
Ser	9,47	6,86	6,95	5,60
Glu	10,11	9,86	14,70	20,00
Pro	7,01	7,30	5,62	5,30
Gly	7,69	7,45	7,05	6,50
Ala	7,69	8,40	8,30	7,10
Val	5,72	5,69	5,20	4,30
Met	nyom	nyom	nyom	2,50
Ile	2,91	3,17	3,00	2,98
Leu	8,28	7,30	8,10	6,81
Tyr	2,67	3,12	2,71	2,25
Phe	3,78	3,68	3,52	2,71
Trp	NH ³	NH	NH	NH
1/2 Cys	NK ⁴	NK	nyom	nyom

¹ aminosav összetétel mol/100 mol aminosavban megadva² nyomokban³ nem történt meghatározás⁴ nem kimutatható

szerével vizsgálva pI 4,69 izoelektromos pontnak feleltek meg. A másik két szolubilis komponens ettől eltérő izoelektromos pontot mutatott (Ádám és mtsai közlés alatt).

Megbeszélés

A penton antigén szeparálására végzett kísérleteink során tisztáztuk az eddig ilyen szempontból még nem vizsgált 7-es és 8-as típusú humán adenovírusok hemagglutininjének természetét. Az I. hemagglutinációs alcsoport tagjai közül (Rosen 1960) ugyanis elsősorban a 3-as típust vizsgálták behatóan (Norrby 1966a, 1966b), majd pedig a 11-est (Norrby 1968b).

A 7P törzs szeparálása során nyert szolubilis komplett hemagglutinin tulajdonságai nagyrészt azonosak a 3-as típus dodekonjáról ismertekkel (Norrby 1966a). Érdekes jelenség viszont, hogy anioncserés kromatográfiában az igen nagyszámú vizsgált adenovírus típus közül eddig csak ennél és a legkifejezettebb onkogenitású 12-es típusnál fordult elő, hogy a típuspecifikus fiber (mely egyúttal a penton alkotórésze) a többi szolubilis komponens után, a magas NaCl koncentrációjú eluensekkel oldódott le az oszlopról (Huebner és mtsai 1964, Norrby és Ankerst 1969, Lengyel, Nász, Béládi nem közölt adatok).

A 8-as típus esetében elsőként sikerült szolubilis pentont és szolubilis komplett hemagglutinint izolálnunk ebből a nehezen tenyészthető és fokozott

labilitást mutató törzsből. A kidolgozott vvt adszorpció — RDE elució módszerével új és gyors szeparálási eljárást kaptunk e típus kutatásához. A módszer minden valószínűség szerint az azonos alcsoportba tartozó, hasonló hemagglutinációs tulajdonságú típusok antigénjeinek szeparálására is alkalmas lehet (Norrby és mtsai 1967).

A 8-as típusból ilyen módon izolált pentonnal sikerült nyulakban anti-penton immunsavót előállítanunk, mellyel gátolni tudtuk a 8-as típusú adenovírus interferon indukcióját (Pusztai és mtsai 1974). Ezzel indirekt módon a pentonnak az interferon indukcióban játszott szerepére kaptunk újabb bizonyítékot.

Ugyancsak hasznos kutatási módszernek bizonyult az immunelektroforézis és — főleg gyorsasága és az adenovírus kutatásban való újszerűsége miatt — az immunozmoforézis. Ez utóbbi, valamint a rakéta elektroforézis segítségével néhány órán belül meghatározható egy vírustörzs vagy ellenanyag típusa.

A pentonhoz asszociált endonukleázt eleinte csak a 2-es és 12-es adenovírus típusnál tudták kimutatni (Burlingham és mtsai 1971, Burlingham és Doerfler 1972), újabban más típusokkal is sikeres kísérletekről számolnak be (Marusyk és mtsai 1975). Az 1-es típusról eddig nem volt adat az endonukleáz jelenlétére és első esetben sikerült izolált, tisztított pentonnal is endonukleáz aktivitást kimutatnunk (Medveczky és mtsai 1976). A tripszinkezeléssel és a többi tisztított szolubilis vírus komponenssel kapott eredményeink arra utalnak, hogy az enzimaktivításban a tripszinérzékeny penton bázis játszik szerepet.

Először sikerült meghatározni az 1-es típusú adenovírus pentonjának aminosav összetételét és e szolubilis komponens izoelektromos pontját (Ádám és mtsai közlés alatt).

Összefoglalás

A humán adenovírusok három különböző alcsoportjába tartozó 1-, 5-, 7-, 8- és 9-es típusú vírustörzsek szolubilis penton antigénje fizikai, kémiai, immunológiai és biológiai tulajdonságait vizsgáltuk. A kísérletek során komplett és inkomplett hemagglutináció módszerével tanulmányoztuk a penton mono-, di- és polimereket s eljárást dolgoztunk ki a II. hemagglutinációs alcsoportba tartozó típusok pentonjának szeparálására. A penton antigén gyors kimutatására immunológiai módszereket dolgoztunk ki. Meghatároztuk a különböző típusok pentonjának elució tulajdonságait anioncserés kromatográfiában és meghatároztuk az 1-es típusú adenovírus tisztított pentonjának izoelektromos pontját és aminosav összetételét. Kimutattuk e vírustípus virionhoz kötött endonukleáz aktivitását s tisztított, szeparált pentonnal végzett kísérletekkel igazoltuk, hogy az enzim-aktivitás a pentonnal kapcsolatos.

IRODALOM

- Ádám, É., Nász, I. és Medveczky, P.: Kísérletes Orvostud., közlés alatt.
 Burlingham, B. T. és Doerfler, W.: *Virology*, **48**, 1, (1972).
 Burlingham, B. T., Doerfler, W., Petterson, U. és Philipson, L.: *J. Mol. Biol.* **60**, 45, (1971).
 Ginsberg, H. S., Pereira, H. G., Valentine, R. C. és Wilcox, W. C.: *Virology* **28**, 783, (1966).
 Huebner, R. J., Pereira, H. G., Allison, A. C., Hollinshead, A. C. és Turner, H. C.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **51**, 432, (1964).
 Klemperer, H. G. és Pereira, H. G.: *Virology* **9**, 536, (1959).
 Lengyel, A., Dán, P., Cserba, I. és Nász, I.: *MTA V. Orv. Oszt. Közl.* **16**, 213, (1965).
 Lengyel, A. és Nász, I.: *J. Virol.* **6**, 406, (1970a).
 Lengyel, A. és Nász, I.: *Orvostudomány* **21**, 213, (1970b).
 Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. és Randall, R. J.: *J. Biol. Chem.* **193**, 265, (1951).
 Marusyk, R. C., Morgan, A. R. és Wadell, G.: *J. Virol.* **16**, 456, (1975).
 Medveczky, P., Csuzi, S., Nász, I. és Antoni, F.: *Orvostudomány* **26**, 213, (1975).
 Medveczky, P., Csuzi, S., Nász, I., Ádám, É., Berencsi, Gy. és Antoni, F.: *Arch. Virol.* **52**, 315, (1976).
 Nász, I.: *Lancet* **i**, 394, (1967).
 Nász, I.: Újabb eredmények a szemészetben **1**, 6, (1975).
 Nász, I., Béládi, I. és Lengyel, A.: *Az adenovírusok és kórokozó szerepük. Akadémiai Kiadó, Budapest* (1967).
 Nász, I., Cserba, I. és Rózsa, K.: *Orvostudomány* **19**, 55, (1968).
 Nász, I., Kulcsár, G., Dán, P., Lengyel, A. és Cserba, I.: *Orv. Hetil.* **104**, 442, (1963).
 Nász, I., Lengyel, A. és Cserba, I.: *Orvostudomány* **22**, 101, (1971).
 Nász, I. és Pereira, H. G.: *MTA V. Orv. Oszt. Közl.* **15**, 327, (1965).
 Norrby, E.: *Virology* **28**, 236, (1966a).
 Norrby, E.: *Virology* **30**, 608, (1966b).
 Norrby, E.: *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **43**, 1, (1968a).
 Norrby, E.: *J. Gen. Virol.* **2**, 123, (1968b).
 Norrby, E. és Ankerst, J.: *J. Gen. Virol.* **5**, 183, (1969).
 Norrby, E., Nyberg, B., Skaaret, P. és Lengyel, A.: *J. Virol.* **1**, 1101, (1967).
 Pereira, H. G., Allison, A. C. és Farthing, C. P.: *Nature* **183**, 895, (1959).
 Pereira, M. S., Pereira, H. G. és Allison, A. C.: *Lancet* **i**, 551, (1959).
 Pusztai, R., Béládi, I., Lengyel, A., Nász, I. és Taródi, B.: *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.* **21**, 269, (1974).
 Renn, D. W. és Evans, E.: *Anal. Biochem.* **71**, 588, (1976).
 Rosen, L.: *Amer. J. Hyg.* **71**, 120, (1960).
 Valentine, R. C. és Pereira, H. G.: *J. Mol. Biol.* **13**, 13, (1965).