

Nász István—Ádám Éva

Az adenovírus-kutatás hármass jelentősége

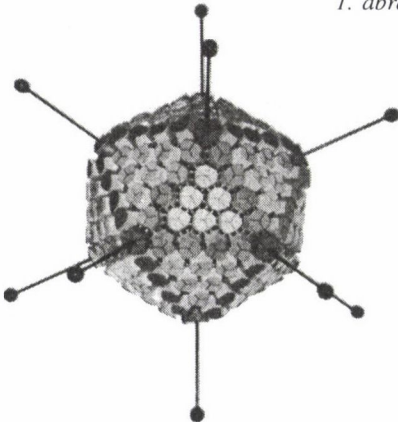
Az adenovírusok jelentősége az orvostudományban értelemszerűen elsősorban kórokozó képességükben nyilvánul meg. Az adenovírus családba jelenleg 128 szerológiai típus tartozik. Ezek közül 51 típus az emberi eredetű, 77-nek pedig különböző emlősállatok, illetve madarak a természetes gazdái. Feltehetően az adenovírusok képesek előidézni emberben a legváltozatosabb körképeket a vírusok között. Általában légúti, szemészeti, gasztrointesztinális és urogenitális fertőzéseket okoznak (1, 2). Sok más betegség előidézésére és sok belső szerv fertőzésére is képesek a népesség szinte minden korosztályában. A latens fertőzések patogenezisében és a rosszindulatú daganatképzésben játszott szerepük felismerése és tanulmányozása során az is kiderült, hogy a fertőzések patomechanizmusa komplikált és máig sem tisztázott teljesen. Az utóbbi mintegy 10—15 év folyamán rendkívüli jelentőségre tett szert az a felismerés, hogy az adenovírusok immunhiányos vagy immunszuppresszált betegekben, illetve AIDS-ben szenvedőkben igen súlyos, nagy letalitással járó fertőzéseket képesek előidézni. Az AIDS és az adenovírus fertőzések között különleges összefüggés, egymásra hatás létezésére utaló adatok is napfényre kerültek, aminek magyarázata jelenleg még nem ismert, de a probléma feltétlenül tisztázásra vár. Az adenovírus valamilyen módon súlyosbítja, gyorsítja a betegség lefolyását. AIDS-esekből viszont számos új, eddig ismeretlen adenovírus szerotípus és intermedier antigéntulajdonságú típus volt izolálható. Többek között ezek a problémák indokolják és teszik szükségessé és időszerűvé az adenovírus fertőzések patomechanizmusának molekuláris szintű vizsgálatát (2, 3).

A kórokozó képességgel látszólagos ellentétben van az adenovírusokban rejlő másik két, nagy reményekkel kecsegtető lehetőség, nevezetesen az adenovírusok felhasználása a különböző betegségek gyógyításában, illetve a fertőző betegségek megelőzésében, azaz az adenovírusok gyógyítást segítő, illetve a prevenciót segítő vírusként való alkalmazása. Mindkét lehetőség világszerte széles körű kísérletes kidolgozás alatt áll és az képezi az alapját, hogy az adenovírusok DNS-ébe idegen gének építhetők be és az így létrehozott rekombináns adenovírusok, mint vektorok képesek behatolni a szervezet sokféle sejtjébe és képesek bevinni azokba a kívánt géneket, amelyek ott kifejezésre jutnak, expresszálnak és kifejtik hatásukat. Az utóbbi években a rekombináns adenovírusok széles körű kísérletes alkalmazásra kerültek gyógyító és preventív célokra egyaránt. A kísérletes génterápiában világszerte alkalmazzák az adenovírus vektorokat az örökletes génhányos és más komplex betegségek gyógyítását, a különböző rákféleségek immunterápiáját és molekuláris

terápiáját célzó kísérletekben. Ígértesnek látszik a rekombináns adenovírus technika és a gyógyszeres kezelés kombinációja is, továbbá a daganatsejtek specifikus elpusztítása módosított, nem rekombináns adenovírusal. Ha pedig a bevitt gén expressziós terméke valamely fertőző betegséget okozó mikroba megfelelő antigénjének felel meg és az expresszáldás után ellene a szervezet ellenanyagot termel, akkor az ilyen „rekombináns védőoltással” a fertőző betegségek jelentős része is megelőzhetővé válhat. A rekombináns adenovírus vakcinák kísérletes alkalmazása is széles körben folyik a különböző fertőző, elsősorban vírusok okozta betegségek megelőzése céljából, nemcsak emberben, hanem nagyon fontos állatgyógyászati vonatkozása is van az eljárásnak. A rekombináns adenovírusok alkalmazásának mezőgazdasági, állattenyésztési területen pedig szinte beláthatatlan horderejű gazdasági jelentősége is lehet (2–5).

Saját vizsgálataink, amelyek jelenleg ismertetésre kerülnek, elsősorban az adenovírus hexon fehérje antigénszerkezetére vonatkoznak. Az ikozaéder alakú vírusrészecske (virion) fehérjeburkát alkotó 252 morfológiai egység (kapszomer) közül 240 a hexon, melyek közül 120 helyezkedik el az éleken és 120 a háromszögletű lapokon. Minden komplett hexon három, kémiaillag azonos alegységből áll (1. ábra). A hexonok felszínén számos különböző specificitású antigéndetermináns, epitóp található, melyek pontos ismerete rendkívül fontos szerepet játszik a génterápiás és rekombináns vakcinálási kísérletek hatékonysága szempontjából (6–10).

1. ábra



Adenovírus-modell. Szemlélteti az ikozaéder alakú vírusrészecske élein és lapjain szabályosan elhelyezkedő hexon kapszomereket, az ezeket alkotó három strukturális alegységet és a szomszédos hexonokat összekötő finomszerkezeti elemeket, továbbá a csúcson levő kapszomereknek (pentonok) radiálisan kiálló nyúlványait (fiber), végükön kis gömbszerű képződményekkel.

gorú kritériumok alapján határoztuk meg, az ellenanyagok hexontípusok közötti keresztreakálási képességének, titerének, mértékének és korrelációs koefficiensének segítségével. Ilyen módon összesen 18 különböző IT specifikus epitópot sikerült elkülöníteni. Kimutattuk, hogy egy adott IT epitóp a megfelelő specifikus monoklonális ellenanyaggal azonosítható, de azzal a két hexontípus csoporttal jellemezhető (definiálható), melyek tagjain az adott monoklonális ellenanyaggal kimutatható a jelenléte, illetve amelyeken nem (7–9, 11).

Mielőtt azonban rátérnék az említett témakörben végzett vizsgálataink néhány részletének ismertetésére, szeretnénk köszönetet mondani munkatársainknak áldozatos munkájukért. Kutatócsoportunk és Intézetünk tagjai közül az előadásra kerülő munkák egy-egy részében a felsorolt munkatársak vettek részt: *Dobay Orsolya, Jeney Csaba és Lengyel Anna*. A kísérletek egy-egy része együttműködésben folyt több hazai és külföldi intézet munkatársaival, akiknek szintén szeretnénk köszönetünket kifejezni.

Nagyfokban tisztított és részben kristályosított hexon készítmények segítségével előállított nagyszámú monoklonális ellenanyag és több, mint 20 szerológiai típusba tartozó hexonpreparátum vizsgálata alapján kimutattuk, hogy a különböző hexontípusokon az adenovírus genusra és a szerológiai típusra specifikus epitópokon kívül nagyszámú, ún. intertípus specifikus (IT) epitóp is létezik. Ezek az IT epitópok egymástól is különböznek és az adott szerotípustól függően különböző kombinációkban vannak jelen a hexon felszínén (9, 11). A monoklonális ellenanyagok specificitását, azaz epitóp elkülönítő képességét szigorú

Mind a 18 IT specifikus epitópot sorrendbe rakva, a különböző adenovírus hexontípusokon való jelenlétük vagy hiányuk alapján kiderült, hogy szinte lineárisan, fokról fokra csökken azoknak a szerotípusoknak a száma, amelyekben jelen van az adott epitóp és ezzel párhuzamosan növekszik azon szerotípusoknak a száma, amelyekben hiányzik. Világosan utal ez a kép az antigénrokonság fokára, mértékére az egyes hexontípusok között és az egymásból való kifejlődés lehetőségére is. Kis túlzással azt lehetne mondani, hogy ez a jelenség az evolúció egy kis mozzanatát engedni sejtteni, de annyi mindenestre biztos, hogy új taxonómiai és diagnosztikai lehetőségeket tár fel. Igazi jelentősége azonban a rekombináns adenovírusok alkalmazása területén van. Ugyanis a rekombináns adenovírusok alkalmazásának egyik nehézsége a recipiens szervezet immunválasza, ellenanyag-termelése a rekombináns vektorvírus saját fehérje antigénjei ellen, amelyek csökkentik, második vagy többszöri kezelés esetén pedig teljesen megakadályozhatják a kezelés hatását, hiszen az összes IT epitóp ellen képződött ellenanyag érezeteti káros hatását, amely az alkalmazott rekombináns adenovírus típus hexonján jelen van. Ez pedig hexontípusonként változó, egyiken több, másikon kevesebb és másféle IT epitóp van jelen (7—9, 12, 13).

Ezek alapján az a javaslatunk, hogy rekombináns adenovírus kezelésre a génterápia során más-más szerotípusból készített vektor kerüljön alkalmazásra második vagy többszöri kezelésre egy adott beteg esetében. Mégpedig olyan adenovírus típusokból, amelyek antigénstruktúrája epitóp összetételben a lehető legtávolabb állnak egymástól. Ennek meghatározására pedig egy rendszert dolgoztunk ki az adenovírusok IT specifikus epitópjainak, antigénrokonsági fokának két-két típusonként történő páros összehasonlítása alapján. Ezt mutatjuk be a táblázaton. A felső vízszintes

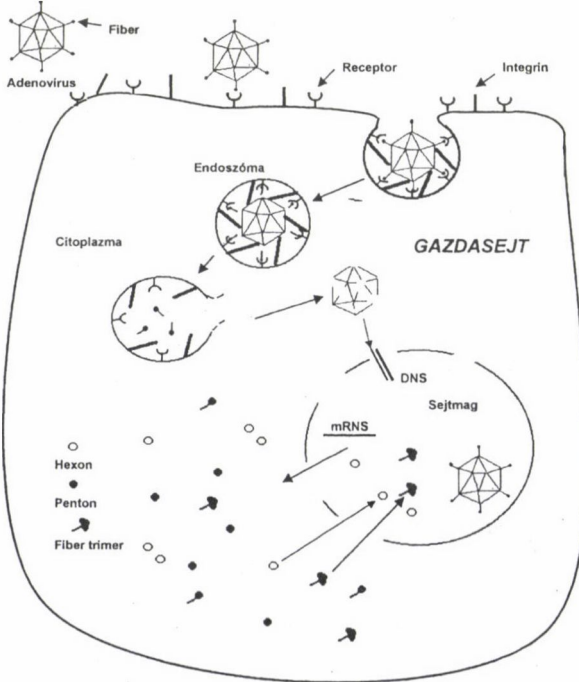
1. táblázat

Epitópok száma			17	16	14	14	12	11	11	11	9	9	8	7	7
Adenovírus típus	szubgenusz		4, 19	8, 9, 9/13, 10	1, 2, 5, 6	7	S16	18	26	13	12	36	41	27	B2
16	8,9,9/13,10	D	16/1												
14	1, 2, 5, 6	C	14/3	13/4											
14	7	B	13/5	13/4	10/8										
12	S16	SAdV	12/5	11/6	9/8	8/10									
11	18	A	11/6	10/7	8/9	7/11	11/1								
11	26	D	11/6	10/7	10/5	8/9	9/5	8/6							
11	13	D	11/6	10/7	9/7	7/11	8/7	8/6	8/6						
9	12	A	9/8	9/7	6/11	9/5	7/7	6/8	6/8	5/10					
9	36	B	8/10	8/9	5/13	8/7	8/5	8/4	6/8	5/10	6/6				
8	41	F	8/9	7/10	8/6	5/12	8/5	7/5	7/5	5/9	4/9	4/9			
7	27	D	7/10	6/11	6/9	3/15	7/5	7/4	6/6	7/4	3/10	4/8	5/5		
7	B2	BAdV	7/10	6/11	5/11	3/15	7/5	7/4	4/10	6/6	3/10	4/8	4/7	5/4	
1	B3	BAdV	1/16	1/15	0/15	1/13	1/11	1/10	0/12	1/10	1/8	1/8	0/9	0/8	1/6

és a függőleges oszlopokban a vizsgált hexon típusok láthatók. A találkozási pontokban található keretekben az első szám az azonos, a második szám pedig az eltérő epitópok számát mutatja két-két adott adenovírus típus esetében. A vastag keretek által meghatározott típusok nagyfokú rokonságot mutatnak, a vékony keretek által meghatározott típuspárok esetén pedig, mint látható kétszer-háromszor több az eltérő epitópok száma, mint az azonosaké. Tehát ezekből a típusokból érdemes rekombináns adenovírus párokat készíteni a recipiens szervezet immunválasza káros hatásának csökkentése vagy elkerülése céljából (2, 3, 9).

Az IT specifikus epitópok valószínű számának és lokalizációjának a meghatározására *Hudecz Ferenc* (MTA Peptidkémiai Kutatócsoport, ELTE) együttműködésben számítógépes epitóp predikciós eljárásokat végeztünk a 2-es és 41-es típusú humán adenovírus hexonfehérje aminosav szekvenciáján a β -kanyar képző készség és a hidrofilitási profil által meghatározott potenciális epitóp szekvenciák kiválasztásával (14). Mindkét típusban találtunk közösen jelenlévő, azonos vagy hasonló aminosav szekvenciával rendelkező, potenciális IT specifikus epitópokat, de találtunk 17 nem közös, csak egyik típuson prediktálható potenciális epitópot is, amely még nagyobb számú epitóp létezésének lehetőségére hívja fel a figyelmet a hexonfehérjén, mint ami monoklonális ellenanyagok segítségével kimutatható volt. A prediktált epitópok szekvencia sorszáma alapján meghatároztuk az epitópok helyzetét is a komplett hexont alkotó három azonos fehérje alegység háromdimenziós modelljén is.

Az antigenitás és az immunogenitás vizsgálata céljából két prediktált epitópnak megfelelő peptidet szintetizáltunk és carrier-hez konjugáltunk *Hudecz Ferenc*vel, illetve *Mező Imr*ével és munkatársaikkal való együttműködésben (15). Az egyik szintetizált peptid csak a 2-es típusban került prediktálásra, hasonló, vagy rokon szekvenciák nem voltak találhatóak sem a 41-es, sem 15 más, különböző típusú hexonban sem. A másik szintetizált peptid mindkét típusban prediktálásra került és részben teljesen homológ, részben szoros rokonságot mutató szekvenciák voltak találhatóak 15 más típusú hexonban is. A szintetizált peptid-carrier konjugátumokkal a tisztított hexonok ellen termelt egyes monoklonális ellenanyagok reakcióba léptek és a konjugátumok ellen termelt antitestek felismertek különböző típusú, tisztított, natív hexon antigéneket ELISA reakcióban. Tehát a szintetizált biokonjugátumok antigén és immunogén tulajdonságúnak bizonyultak. További hasonló és más jellegű vizsgálatok újabb 4 szintetizált peptiddel is folyamatban vannak az epitópok szerkezetének és tulajdonságainak tanulmányozása céljából (11).

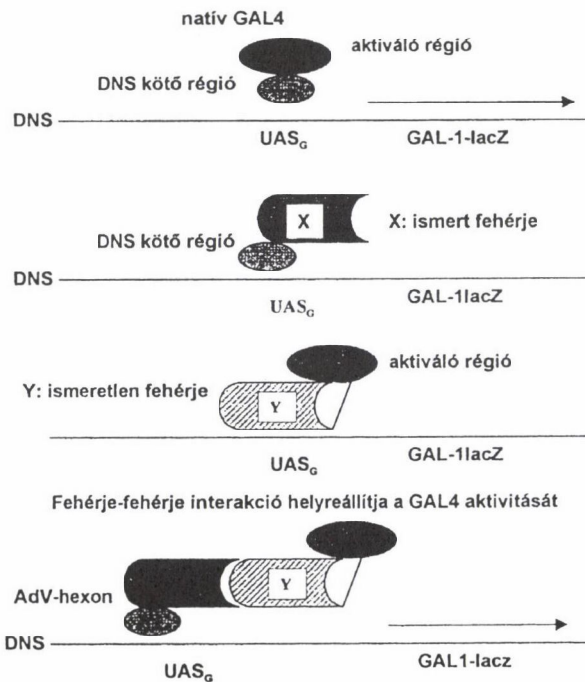


2. ábra

Az adenovírusok bejutása a gazdasejtbe. A nyúlványok végén levő gömbszerű képződmény kapcsolódik a sejtmembrán felszínén levő receptorhoz. Ezután az integrinek segítségével a sejtmembrán betüremkedése következtében bejut a citoplazmába egy endoszómába zártan, majd az endoszóma fala és a vírus fehérjeburka szét-töredezik, kiszabadul a vírus DNS és bejut a sejt magjába. Innen specifikus mRNS-molekulák vándorolnak a citoplazmába a különböző vírusfehérje „alkatrészek” termelésének kódolására, amelyek visszajutva a sejt magba kialakítják a komplett fertőzőképes új vírusokat.

Az adenovírus-fertőzések patomechanizmusának területén arra vonatkozóan vannak folyamatban vizsgálatok, hogy a fertőzési folyamat melyik szakaszában, melyik vírusfehérje, melyik sejtféherjével lép kapcsolatba az új vírusrészecskék termelődése folyamán. Először a vírus partikula részben a receptorok és részben az integrinek segítségével bejut a sejtbe, ezután a vírus DNS a fehérjeburokból kiszabadulva bejut a sejtmagba, ahol mRNS képződik róla, majd az mRNS visszakerül a citoplazmába, ott irányítja a különféle vírusfehérjék termelését, amelyek az érett vírusrészecskék kialakításához visszajutnak a sejtmagba (2. ábra). Ez alatt a folyamat alatt számos különböző vírusfehérje léphet interakcióba számos különböző sejtféherjével. Ezt a kérdést először a hexonfehérje vonatkozásában tettük vizsgálat tárgyává az ún. két-hibrid rendszer (THS, Two Hybrid System) segítségével. Ez a módszer azon alapszik, hogy a *Saccharomyces cerevisiae* Gal4-es transzkripció faktorja két régióból áll: DNS-kötő és aktiváló régióból. A natív Gal4 aktiválja egy riporter gén (pl. β -galactosidase) expresszáldását (16). A két régió génjei egymástól szeparálhatók, elválaszthatók, plazmidba építhetők és ismert vagy ismeretlen fehérjék köthetők hozzájuk gén szinten. A DNS-kötő részhez kötjük a hexon gént (első hibrid), az aktiváló részek egy-egy példányához pedig külön-külön sok-sok ismeretlen sejtféherje gént tartalmazó cDNS könyvtárból más-más sejtféherje génje kötődik (második hibrid). Élesztősejtben való expresszáldás után ebből a sejtféherje halmazból a DNS-kötő rész fehérjeje maga választja ki azt az aktiváló rész és sejtféherje hibridet, amelynek fehérje része képes interakcióba lépni a DNS-kötő részhez kötődött ismert vírusfehérjével (hexon) és ezáltal helyreáll a Gal4-es transzkripció faktor aktivitása (3. ábra). A riporter gén működése alapján kiválasztható az a sejt, amelyben az aktív Gal4 transzkripció faktor van és az ismeretlen sejtféherje génje szeparálható, szekvenálható és ezáltal az ismeretlen fehérje meghatározható.

Röviden összefoglalva eredményeinket: monoklonális ellenanyagok segítségével kimutattuk, hogy az adenovírus hexonfehérjén legalább 18 különböző intertípus



3. ábra

Két-hibrid rendszer működésének elve két különböző — vírus- és sejteredetű — fehérje interakciójának kimutatása céljából. Bővebb magyarázat a szövegben.

specificitású, korábban nem ismert epitóp létezik. A hexon polipeptid alegységének aminosav szekvenciáján végzett számítógépes predikciós eljárásokkal meghatároztuk a potenciális intertípus specifikus epitópok aminosav szekvenciáit. Ezek egy részét szintetizáltuk és carriermolekulákhoz kötött biokonjugátumok formájában tanulmányozva bizonyítottuk antigén és immunogén képességüket.

Eredményeink szerint az intertípus specifikus epitópok fontos szerepet játszanak a kísérletes génterápiában és a rekombináns adenovírus védőoltásban, a rekombináns vektorok saját fehérje antigénjei ellen a recipiens szervezetben kialakuló káros hatású immunválaszban. Ennek elkerülésére a második, vagy többszöri rekombináns kezelésre ugyanannál a betegnél más-más adenovírus szerotípusból készített rekombináns javaslunk alkalmazni, amelyek antigénszerkezete, epitóp összetétele eltérő egymástól. Az epitóp összetétel meghatározására és a megfelelő típuspárok kiválasztására összehasonlító rendszert is kidolgoztunk.

IRODALOM:

- 1 Nász I. (1986) Az adenovírusok patológiai jelentősége és molekuláris szerkezete. Akadémiai Kiadó, Budapest, 1—58.
- 2 Nász I, Ádám É. (1997) Újabb fejlemények és irányzatok az adenovírus-kutatásban. *Orv. Hetil.* 138/43, 2711—2724.
- 3 Ádám É, Nász I. (1995) A rekombináns adenovírusok jelentősége a kísérletes génterápiában. *Orv. Hetil.* 136/15, 755—761.
- 4 *Randrianarison-Jewtoui* Koff V, *Perricaudet* M. (1995) Recombinant adenoviruses as vaccine. *Biologicals*, 23, 145—157.
- 5 *Siegfried* W. (1993) Perspectives in gene therapy with recombinant adenoviruses. *Exp. Clin. Endocrinol.* 101, 7—11.
- 6 Nász I, Ádám É. (1991) Characterization of the antigenic structure of adenovirus hexons by means of monoclonal antibodies. *UNESCO-ROSTE Techn. Rep.* 6, 66—79.
- 7 Ádám É, Nász I, *Lengyel* A. (1995) Antigenic homogeneity among the adenovirus hexon types of subgenus C. *Arch Virol.* 140, 1297—1301.
- 8 Ádám É, Nász I, *Lengyel* A. (1995) Diversity in the antigenic structure of different hexon types among the members of adenovirus subgenus D. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 42, 85—92.
- 9 Ádám É, Nász I, *Lengyel* A. (1996) Characterization of adenovirus hexons by their epitope composition. *Arch. Virol.* 141, 1891—1907.
- 10 *Russel* WC, *Adrian* T, *Bartha* A, *Fujinaga* K, *Ginsberg* HS, *Hierholzer* JC, *de Jong* JC, *Li* QG, *Mautner* V, *Nász* I, *Wadell* G. (1995) Adenoviridae. In: *Murphy* FA, *Faquet* CM, *Bishop* DHL, *Ghabrial* SA, *Jarvis* AW, *Martelli* GP, *Mayo* MA, *Summers* MD (eds) *Virus Taxonomy. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Springer, Wien—New York, 128—133. (*Arch Virol* [Suppl] 10)
- 11 Ádám É, Nász I, *Hudec* F, *Lengyel* A, *Mező* G, *Dobay* O. (1998) Characterization of intertype specific epitopes on adenovirus hexons. *Arch. Virol.* 143, 1669—1682.
- 12 *Douglas* J.T., *Curiel* D.T. (1997) Adenoviruses as vectors for gene therapy. *Sci. Med.* 4, 44—53.
- 13 *Kagami* H, *Atkinson* J.C, *Michalek* S.M, *Handelman* B, *Yu* S, *Bawn* B.J., *O'Connell* B. (1998) Repetitive adenovirus administration to the parotid gland: Role of immunological barriers and induction of oral tolerance. *Hum. Gene Ther.* 9, 305—313.
- 14 *Hudec* K. (1994) Prediction of B- and T-cell epitopes. In: *Rajnavölgyi* É. (ed) *Synthetic peptides in the search for B- and T-cell epitopes*. RG Landes Company, Austin, 19—30.
- 15 *Hudec* F. (1995) Design of synthetic branched-chain polypeptides as carriers for bioactive molecules. *Anti-Cancer Drugs*, 6, 171—193.
- 16 *Fields* S, *Sternglanz* R. (1994) The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends In Genetics*, 10, 286—292.