VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
VILNIAUS UNIVERSITETAS

Indrė KUČINSKAITĖ-KODZĖ

# NAUJŲ MONOKLONINIŲ ANTIKŪNŲ PRIEŠ VIRUSŲ ANTIGENUS KŪRIMAS, CHARAKTERIZAVIMAS IR TAIKYMAS

DAKTARO DISERTACIJA

TECHNOLOGIJOS MOKSLAI,
CHEMIJOS INŽINERIJA (05T),
BIOTECHNOLOGIJA (T490)

VGTU
LEIDYKLA
Vilnius TECHNIKA 2011

Disertacija rengta 2005–2011 metais Vilniaus universiteto Biotechnologijos institute.

**Mokslinė vadovė**

dr. Aurelija ŽVIRBLIENĖ (Vilniaus universitetas, technologijos mokslai, chemijos inžinerija – 05T).

VGTU leidyklos TECHNIKA XXXX-M mokslo literatūros knyga
*http://leidykla.vgtu.lt*

ISBN 978-9955-28-?

© VGTU leidykla TECHNIKA, 2011
© Indrė, Kučinskaitė-Kodzė, 2011
*indkuc@ibt.lt*

VILNIUS GEDIMINAS TECHNICAL UNIVERSITY
VILNIUS UNIVERSITY

Indrė KUČINSKAITĖ-KODZĖ

# PRODUCTION, CHARACTERIZATION AND APPLICATION OF NEW MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST VIRAL ANTIGENS

DOCTORAL DISSERTATION

TECHNOLOGICAL SCIENCES,
CHEMICAL ENGINEERING (05T),
BIOTECHNOLOGY (T490)

VGTU
LEIDYKLA
Vilnius TECHNIKA 2011

Doctoral dissertation was prepared at the Institute of Biotechnology of Vilnius University in 2005–2011.

**Scientific Supervisor**

Dr Aurelija ŽVIRBLIENĖ (Vilnius University,Technological Sciences, Chemical Engineering – 05T).

# Reziumė

Disertacijoje aprašomi monokloniniai antikūnai, sukurti prieš rekombinantinius mielėse susintetintus antigenus: žmogaus paragripo trečiojo tipo viruso, Menangle viruso, hantavirusų bei pasiutligės viruso nukleokapsidės (N) baltymus. Sukurtieji antikūnai buvo visapusiškai charakterizuoti įvairiais imunocheminės analizės metodais, įvertintas jų specifiškumas, afiniškumas, sugebėjimas atpažinti natyvius virusus infekuotų ląstelių kultūrose. Buvo nustatyta, kad antikūnai, sukurti prieš rekombinantinius mielėse susintetintus virusų baltymus, tinka virusų nustatymui infekuotose ląstelėse. Šie tyrimai patvirtino, kad rekombinantiniai mielėse susintetinti virusų N baltymai turi panašias antigenines savybes, kaip natyvūs virusų N baltymai, formuojantys nukleokapsides. Sukurtieji monokloniniai antikūnai taip pat buvo panaudoti išsamiems minėtų virusų N baltymų antigeninės struktūros tyrimams bei imunodominuojančių sekų nustatymui. Disertaciniame darbe gauti duomenys svarbūs, kuriant naujas imunodiagnostikos sistemas, skirtas virusų infekcijoms nustatyti.

Disertaciją sudaro įvadas, trys skyriai, naudotos literatūros sąrašas ir autorės publikacijų sąrašas.

Įvadiniame skyriuje aptariama tiriamoji problema, darbo aktualumas, formuluojamas darbo tikslas bei uždaviniai, darbo mokslinis naujumas ir praktinė reikšmė, pristatomos paskelbtos publikacijos ir pranešimai konferencijose. Pirmasis disertacijos skyrius skirtas literatūros apžvalgai: jame apibūdinamos paragripo virusų, Menangle viruso, hantavirusų ir pasiutligės virusų šeimos ir gentys, jų genomų ypatybės, struktūriniai baltymai, patogenezė ir epidemiologija. Smulkiau aprašomi minėtų virusų N baltymai. Literatūros apžvalgoje taip pat aprašomi rekombinantinių virusinių baltymų sintezės mielėse privalumai, dažniausiai naudojami virusinių infekcijų diagnostikos metodai bei monokloninių antikūnų taikymas virusinių infekcijų diagnostikai. Antrajame skyriuje aprašomi disertaciniame darbe naudoti metodai: hibridomų technologija, imunofermentinė analizė, imunoblotingas, imunofluorescencinė mikroskopija, molekulinės biologijos metodai. Trečiajame skyriuje pateikiami eksperimentiniai duomenys apie naujų monokloninių antikūnų kūrimą, jų specifiškumo tyrimus, sąveiką su įvairių virusų N baltymais, infekuotų ląstelių ir audinių tyrimus, virusų N baltymų antigeninės struktūros tyrimus.

Disertacijos tema paskelbti 4 straipsniai: visi straipsniai įtraukti į ISI Web of Science sąrašą. Disertacijoje atliktų tyrimų rezultatai paskelbti 6 mokslinėse konferencijose Lietuvoje ir užsienyje.

# Abstract

The dissertation describes development and characterization of monoclonal antibodies against recombinant yeast-expressed antigens: nucleocapsid (N) proteins of human parainfluenza virus type 3, Menangle virus, hantavirus and rabies virus. The newly developed antibodies were investigated by different immunochemical assays for their specificity, affinity and ability to recognize native viruses in infected cells. It was determined that the antibodies raised against recombinant yeast-expressed viral proteins are suitable to identify virus-infected cells. These data confirmed that recombinant yeast-expressed viral N proteins possess antigenic properties similar to that of native viral nucleocapsids. The monoclonal antibodies were also used to study the antigenic structure of viral N proteins and localize their immunodominant regions. The obtained results may have impact on the development of new immunodiagnostic test systems for the detection of viral infections.

The dissertation consists of the introduction, three sections, references, and the list of author's publications.

In the Introductory Chapter, the research topic, the actuality, the aim and tasks, scientific novelty and practical value of the dissertation are discussed. Author's publications and conference reports are also presented. The first Chapter of the dissertation provides literature overview on the genome organization, structural proteins, pathogenesis and epidemiology of parainfluenza viruses, Menangle virus, hantaviruses and rabies viruses. The properties of viral N proteins are described in more detail. The literature overview also demonstrates the benefits of the expression of recombinant viral proteins in yeast, describes commonly used diagnostic assays for viral infections and application of monoclonal antibodies for the immunodiagnostics of viral infections. In the second Chapter, materials and methods are presented: hybridoma technology, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Western blot, immunofluorescence microscopy, molecular biology techniques. The third Chapter provides experimental data on the development of new monoclonal antibodies, testing of their specificity and reactivity with different viral N proteins, infected cells and tissues, the use of monoclonal antibodies for studying the antigenic structure of viral N proteins.

Four articles have been published on the subject of the dissertation. All publications have been included into ISI Web of Science list. The results of the dissertation have been presented in 6 scientific conferences in Lithuania and abroad.

# Santrumpos

ANDV – Andes virusas;

ar. – aminorūgštis;

AT-PGR – atvirkštinės transkripcijos polimerazinė grandininė reakcija;

CFT – komplemento fiksacijos testas;

DMEM – Dulbecco modifikuota Eagle terpė (angl. *Dulbeccos' modified Eagle's medium, DMEM*);

DOBV – Dobrava virusas;

DOBV-Slo – Dobrava viruso Slovenia atmaina;

DTT – ditiotreitolis;

DUVV – Duvenhage virusas;

EBLV-1 – Europos šikšnosparnių 1 tipo lisavirusas (angl. *European bat lyssavirus type 1*);

EBLV-2 – Europos šikšnosparnių 2 tipo lisavirusas(angl. *European bat lyssavirus type 2*);

EDTA – etilendiamintetraacto rūgštis;

ET – endoplazminis tinklas;

F – suliejimo baltymas;

FITC – fluoresceino izotiocianatas;

FVS – fetalinis veršiuko serumas;

GK – Goldžio kompleksas;

GP – glikoproteinas;

GST – gliutation-S transferazė;

HaPyV – žiurkėno poliomos virusas (angl. *hamster polyomavirus*);

HAT – hipoksantinas, aminopterinas, timidinas;
HeV – Hendra virusas;
HKIS – hemoraginė karštinė su inkstų sindromu;
HKPS – hemoraginė karštinė su plaučių sindromu;
HN – hemagliutinuojanti neuraminidazė;
hPIV – žmogaus paragripo virusas (angl. *human parainfluenza virus*);
hRSV – žmogaus sisncitinis kvėpavimo takų virusas (angl. *human respiratory syncytial virus*);
HT – hipoksantinas, timidinas;
HTNV – Hantaan virusas;
HTNV-Foj – Hantaan viruso Fojnica atmaina;
IB – imunoblotingas;
IF – imunofluorescencinė analizė;
IFA – imunofermentinė analizė;
IH – imunohistocheminė analizė;
iRNR – informacinė RNR;
JSA – jaučio serumo albuminas;
$K_d$ – afiniškumo konstanta;
L – didysis baltymas – polimerazė;
LBV – Lagos šikšnosparnių virusas (angl. *Lagos bat virus*);
M – matrikso baltymas;
MenV – Menangle virusas;
MeV – tymų virusas (angl. *measles virus*);
MOKV – Mokola virusas;
N – nukleokapsidė;
NDS – natrio dodecilsulfatas;
NFA – nepilnas Freund'o adjuvantas;
NiV – Nipah virusas;
NPD – į nukleokapsidę panaši dalelė;
OT – optinis tankis;
P – fosfobaltymas;
PBS – fosfatinis buferinis tirpalas (angl. *phosphate buffered saline*);
PBST – fosfatinis buferinis tirpalas su tvinu 20;
PDB – baltymų duomenų bazė (angl. *protein data base*);
PEG/DMSO – polietilenglikolis/dimetilsulfoksidas;
PFA – pilnas Freund'o adjuvantas;

PGR – polimerazinė grandininė reakcija;
PSO – Pasaulio sveikatos organizacija;
PUUV – Puumala virusas;
PUUV-Kaz – Puumala viruso Kazan atmaina;
PUUV-Sot – Puumala viruso Sotkam atmaina;
PUUV-Vra – Puumala viruso, Vranica/Hällnäs atmaina;
PVDF – polivinilidenfluorido membrana;
RABV – klasikinis pasiutligės virusas (angl. *classical rabies virus* );
rN – rekombinantinis nukleokapsidės baltymas;
SEOV – Seulo virusas;
SNV – Sin Nombre virusas;
TAE – Tris acetatinis elektroforezės buferinis tirpalas;
TEMED – *N,N,N`,N`*-tetrametiletilendiaminas;
TIB – taškinis imunoblotingas;
TioV – Tioman virusas;
TMB – *3',5,5'*-tetrametilbenzidinas;
TULV – Tula virusas;
VP1 – poliomos viruso pagrindinis kapsidės baltymas;
VPD – į virusą panaši dalelė.

# Turinys

ĮVADAS ... 1
Tiriamoji problema ... 1
Darbo aktualumas ... 2
Tyrimų objektas ... 3
Darbo tikslas ir uždaviniai ... 3
Tyrimų metodika ... 4
Darbo mokslinis naujumas ir jo reikšmė ... 4
Darbo rezultatų praktinė reikšmė ... 5
Ginamieji teiginiai ... 6
Darbo rezultatų aprobavimas ... 7
Disertacijos struktūra ... 7
Padėka ... 7
1. LITERATŪROS APŽVALGA ... 9
1.1. *Paramyxoviridae* virusų šeima: paragripo ir Menangle virusai ... 9
1.1.1. Paragripo virusų apibūdinimas ... 10
1.1.2. Menangle viruso apibūdinimas ... 14
1.2. *Hantavirus* genties virusai ... 15
1.2.1. Hantavirusų apibūdinimas ... 15
1.3. *Lyssavirus* genties virusai ... 24
1.3.1. Lisavirusų apibūdinimas ... 24
1.4. Virusinių infekcijų diagnostikos metodai ... 32
1.4.1. hPIV ir MenV infekcijų diagnostika ... 35
1.4.2. Hantavirusų infekcijos diagnostika ... 36

1.4.3. Lisavirusų infekcijos diagnostika ... 37
1.5. Rekombinantinių virusinių baltymų sintezė mielėse ... 39
1.6. Monokloniniai antikūnai ir jų taikymas virusinių infekcijų diagnostikai ... 40
1.7. Pirmojo skyriaus apibendrinimas ir disertacijos uždavinių formulavimas ... 43
2. MEDŽIAGOS IR TYRIMO METODAI ... 45
2.1. Medžiagos ... 45
2.1.1. Reagentai ... 45
2.1.2. Antigenai ... 46
2.1.3. Monokloniniai, poliklonimiai antikūnai, serumai ... 47
2.1.4. Rinkiniai ... 47
2.1.5. Plazmidės ir pradmenys PGR amplifikacijos reakcijai ... 48
2.1.6. Fermentai ... 48
2.1.7. Molekulinės masės standartai ... 49
2.1.8. Buferiniai ir kiti tirpalai ... 49
2.1.9. Eksperimentiniai gyvūnai ... 51
2.1.10. Ląstelės, mikroorganizmų kamienai ... 51
2.2. Metodai ... 51
2.2.1. Hibridomų ir monokloninių antikūnų gavimas ... 51
2.2.2. Baltymų tyrimo metodai ... 54
2.2.3. Baltymų struktūros analizė bioinformatikos metodais ... 58
2.2.4. Genų inžinerijos metodai ... 58
2.3. Antrojo skyriaus apibendrinimas ... 60
3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS ... 61
3.1. Trumpas mokslinio darbo apibūdinimas ... 61
3.2. Monokloninių antikūnų prieš žmogaus paragripo 3 tipo viruso rekombinantinį nukleokapsidės baltymą gavimas, charakterizavimas ir taikymas šio baltymo antigeninės struktūros tyrimams ... 62
3.2.1. Hibridomų, gaminančių MAk prieš hPIV3 rN baltymą gavimas ir charakterizavimas ... 63
3.2.2. hPIV3 rN baltymo antigeninės struktūros tyrimas ... 65
3.2.3. Rezultatų, gautų tiriant naujas hibridomas prieš hPIV3 rN baltymą, apibendrinimas ... 69
3.3. Naujų monokloninių antikūnų prieš Menangle viruso rekombinantinį nukleokapsidės baltymą gavimas, charakterizavimas ir taikymas šio baltymo antigeninės struktūros tyrimams ... 70
3.3.1. Hibridomų, gaminančių MAk prieš MenV rN baltymą gavimas ir charakterizavimas ... 71
3.3.2. MenV rN baltymo antigeninės struktūros tyrimas ... 73
3.3.3. Rezultatų, gautų tiriant naujas hibridomas prieš MenV rN baltymą, apibendrinimas ... 75
3.4. Monokloninių antikūnų prieš hantavirusų rekombinantinius nukleokapsidės baltymus gavimas, charakterizavimas ir taikymas antigeninės struktūros tyrimams ... 76
3.4.1. MAk prieš ANDV ir SNV rN baltymus gavimas ir charakterizavimas ... 77
3.4.2. Hantavirusų N baltymų antigeninės struktūros tyrimas ... 84

3.4.3. Rezultatų, gautų tiriant naujas hibridomas prieš hantavirusų rN baltymus, apibendrinimas ... 89
3.5. Monokloninių antikūnų prieš pasiutligės viruso rekombinantinį nukleokapsidės baltymą gavimas, charakterizavimas ir taikymas šio baltymo antigeninės struktūros tyrimams ... 90
3.5.1. Pasiutligės virusų rekombinantinių N baltymų antigeninių savybių tyrimas 91
3.5.2. MAk prieš RABV rN baltymą gavimas ir charakterizavimas ... 96
3.5.3. RABV rN baltymo antigeninės struktūros tyrimas ... 100
3.5.4. Rezultatų, gautų tiriant naujas hibridomas prieš RABV rN baltymą, apibendrinimas ... 106
BENDROSIOS IŠVADOS ... 109
LITERATŪRA IR ŠALTINIAI ... 111
AUTORĖS PUBLIKACIJŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS ... 127

# Contents

INTRODUCTION ..... 1
Topicality of the problem ..... 1
Importance of the dissertation ..... 2
The object of research ..... 3
The aim and tasks of the dissertation ..... 3
Methodology of research ..... 4
Importance of scientific novelity ..... 4
Practical significance of achieved results ..... 5
Defended propositions ..... 6
Approval of the results ..... 7
The scope of the scientific work ..... 7
Acknowledgements ..... 7
1. LITERATURE OVERVIEW ..... 9
1.1. The family *Paramyxoviridae*: parainfluenza and Menangle viruses ..... 9
1.1.1. Characterization of parainfluenza viruses ..... 10
1.1.2. Characterization of Menangle virus ..... 14
1.2. The genus *Hantavirus* ..... 15
1.2.1. Characterization of hantaviruses ..... 15
1.3. The genus *Lyssavirus* ..... 24
1.3.1. Characterization of lysaviruses ..... 24
1.4. Diagnostic methods for viral infections ..... 32
1.4.1. Diagnostics of hPIV and MenV infections ..... 35
1.4.2. Diagnostics of hantavirus infection ..... 36
1.4.3. Diagnostics of lyssavirus infection ..... 37
1.5. Expression of recombinant viral proteins in yeast ..... 39
1.6. Monoclonal antibodies and their application for diagnosis of viral infections ..... 40
1.7. Conclusions to first Chapter and formulation of tasks of the dissertation ..... 43
2. MATERIALS AND METHODS ..... 45

2.1. Materials ..... 45
2.1.1. Reagents ..... 45
2.1.2. Antigens ..... 46
2.1.3. Monoclonal antibodies, policonal antibodies, serums ..... 47
2.1.4. Kits ..... 47
2.1.5. Plasmids and primers for PCR amplification ..... 48
2.1.6. Enzymes ..... 48
2.1.7. Molecular weight standarts ..... 49
2.1.8. Buffers and other solution ..... 49
2.1.9. Experimental animals ..... 51
2.1.10. Cells, microorganisms ..... 51
2.2. Methods ..... 51
2.2.1. Generation of hybridomas and monoclonal antibodies ..... 51
2.2.2. Methods for protein research ..... 54
2.2.3. Bioinformatical methods for protein structure analysis ..... 58
2.2.4. Methods for gene engineering ..... 58
2.3. Summary of the second Chapter ..... 60
3. RESULTS AND DISCUSSION ..... 61
3.1. A brief description of research work ..... 61
3.2.Production and characterization of monoclonal antibodies against human parainfluenza virus type 3 rN protein and their application for the antigenic characterization of the N protein ..... 62
3.2.1. Production and characterisation of monoclonal antibodies-producing hybridomas against hPIV3 rN protein ..... 63
3.2.2. Antigenic structure analysis of hPIV3 rN protein ..... 65
3.2.3. Summary of the results obtained by testing new hybridomas against hPIV3 rN protein ..... 69
3.3. Production and characterization of monoclonal antibodies against Menangle virus rN protein and their application for the antigenic characterization of the N protein ..... 70
3.3.1. Production and characterisation of monoclonal antibodies-producing hybridomas against MenV rN protein ..... 71
3.3.2. Antigenic structure analysis of MenV rN protein ..... 73
3.3.3. Summary of the results obtained by testing new hybridomas against MenV rN protein ..... 75
3.4. Production and characterization of monoclonal antibodies against hantavirus rN proteins and their application for the antigenic characterization of the N protein ..... 76
3.4.1. Production and characterisation of monoclonal antibodies against ANDV and SNV rN proteins ..... 77
3.4.2. Antigenic structure analysis of hantavirus rN proteins ..... 84
3.4.3. Summary of the results obtained by testing new hybridomas against hantavirus rN proteins ..... 89
3.5. Production and characterization of monoclonal antibodies against rabies virus rN protein and their application for the antigenic characterization of the N protein. 90

3.5.1. Antigenic characterisation of rabies virus N proteins..... 91
3.5.2. Production and characterisation of monoclonal antibodies against RABV rN protein ..... 96
3.5.3. Antigenic structure analysis of RABV rN protein..... 100
3.5.4. Summary of the results obtained by testing new hybridomas against RABV rN protein ..... 106
GENERAL CONCLUSIONS ..... 109
REFERENCES ..... 111
THE LIST OF SCIENTIFIC AUTHOR'S PUBLICATIONS ON THE SUBJECT OF THE DISSERTATION ..... 127

# Įvadas

## Tiriamoji problema

Virusai yra plačiai paplitę ir sukelia sunkias infekcines ligas, todėl reikalingi tikslūs ir efektyvūs virusų diagnostikos metodai bei efektyvios vakcinos, padedančios išvengti infekcijos.

Monokloniniai antikūnai yra vertingi diagnostiniai reagentai, padedantys nustatyti virusinę infekciją. Imunocheminiai analizės metodai, pagrįsti antikūno-antigeno sąveika, plačiai naudojami diagnostinėse ir mokslinėse laboratorijose. Šių metodų privalumai yra jų didelis jautrumas ir specifiškumas.

Pirmosios vakcinos buvo kuriamos virusų pagrindu. Šiuolaikinėms efektyvioms priešvirusinėms vakcinoms keliami nauji reikalavimai. Siekiant didesnio saugumo, jos dažnai kuriamos viruso sudedamųjų dalių – rekombinantinių baltymų, gebančių sukelti stiprų ir ilgalaikį bei virusą neutralizuojanį imuninį atsaką, pagrindu. Kuriant tokias vakcinas, svarbu ištirti virusinių baltymų antigeninę struktūrą, identifikuoti imunodominuojančias sekas. Tam gali būti panaudojami monokloniniai antikūnai, atpažįstantys tam tikrą baltymo epitopą sudėtingoje antigeninėje struktūroje.

Šio disertacinio darbo **tikslas** buvo ištirti rekombinantinių virusinių baltymų imunogenines savybes ir sukurti monokloninius antikūnus prieš šiuos baltymus, siekiant juos pritaikyti virusų nustatymui infekuotose ląstelėse, bei virusinių baltymų antigeninei struktūrai tirti. Darbas buvo vykdomas 2005–2011 metais Vilniaus universiteto (VU) Biotechnologijos instituto (BTI) Imunologijos ir ląstelės biologijos skyriuje (ILBS).

# Darbo aktualumas

Monokloniniai antikūnai ir jų pagrindu sukurti imunocheminiai metodai plačiai taikomi šiuolaikinėje biotechnologijoje, medicinoje bei moksliniuose tyrimuose. Svarbi monokloninių antikūnų panaudojimo sritis yra imunodiagnostika – įvairių infekcinių ir sisteminių ligų nustatymas, tiriant biologinius mėginius imunocheminiais metodais. Šie metodai užima dominuojančią padėtį šiuolaikinėje laboratorinėje medicinoje, lyginant su kitais *in vitro* diagnostikos metodais (Biocompare 2009). Monokloniniai antikūnai kaip diagnostiniai reagentai turi didžiulį potencialą. Gerai charakterizuotų, aukšto specifiškumo ir afiniškumo antikūnų poreikis nuolat auga. Antikūnų, skirtų diagnostikai ir moksliniams tyrimams, rinka sudaro didžiulę biotechnologinių produktų rinkos dalį. Tai vienas perspektyviausių ir dinamiškiausių šiuolaikinės biotechnologijos segmentų. 2008 m. pasaulinė antikūnų, skirtų diagnostikai ir moksliniams tyrimams, rinka sudarė apie 5,8 mlrd. eurų, o 2013 m. prognozė yra 8 mlrd. eurų. Prognozuojamas ne mažesnis kaip 7 % jos kasmetinis augimas (Biocompare 2009). Todėl darbai, skirti naujų monokloninių antikūnų ir imunodiagnostinių metodų kūrimui, išlieka aktualūs ir vystomi daugelyje pasaulio laboratorijų.

Monokloniniai antikūnai, sukurti prieš virusų baltymus, yra ne tik vertingi diagnostiniai reagentai, bet ir patogus įrankis virusinių antigenų struktūros bei imuninio atsako į virusinę infekciją tyrimams. Monokloniniai antikūnai atpažįsta trumpas aminorūgščių sekas (epitopus) sudėtingoje antigeno struktūroje, todėl šie tyrimai gali suteikti svarbios informacijos apie rekombinantinių ir natyvių virusinių baltymų antigeninį panašumą, baltymo paviršiuje eksponuojamas sekas, sąveikos vietas su kitais viruso struktūriniais baltymais. Tokio pobūdžio tyrimai svarbūs, kuriant naujos kartos vakcinas ar kitas virusinių infekcijų prevencijos priemones. Pavyzdžiui, atlikus neutralizuojančių antikūnų prieš hepatito C viruso (HCV) E2 baltymą specifiškumo tyrimus buvo identifikuotas E2 baltymo epitopas, bendras skirtingiems HCV genotipams. Buvo parodyta, kad šio epitopo blokavimas yra efektyvus HCV infekcijos kontrolės būdas (Keck *et al.* 2008). Panašūs tyrimai buvo atlikti su žmogaus papilomos viruso, pasiutligės viruso ir kitų virusų antigenais (Fleury *et al.* 2006; Goto *et al.* 2000; Jiang *et al.* 2010). Taigi, remiantis virusinių baltymų antigeninės struktūros tyrimų rezultatais, gali būti kuriami nauji virusinių infekcijų imunoterapijos būdai.

## Tyrimų objektas

Šiame disertaciniame darbe aprašomi nauji monokloniniai antikūnai, sukurti prieš žmogaus paragripo trečiojo tipo viruso (hPIV3) nukleokapsidės (N) baltymą, bei gyvūnų platinamų virusų – hantavirusų, pasiutligės viruso, Menangle viruso – N baltymus. Monokloninių antikūnų kūrimui buvo panaudoti rekombinantiniai mielėse susintetinti virusų antigenai, formuojantys į virusus panašias struktūras. Šie antigenai buvo susintetinti VU Biotechnologijos institute. Jų raiška mielėse *Sacharomyces cerevisiae* buvo gauta pirmą kartą (Ražanskienė *et al.* 2004; Kučinskaitė *et al.* 2007; Juozapaitis *et al.* 2007a; 2008). Anksčiau mūsų atlikti tyrimai patvirtino, kad mielėse susintetinti virusų baltymai, formuojantys į virusus panašias struktūras, gali būti panaudoti serologiniams tyrimams (Samuel *et al.* 2002, 2003; Žvirblienė *et al.* 2007; Petraitytė *et al.* 2007, 2008;). Šiame disertaciniame darbe buvo sukurti monokloniniai antikūnai, kurie tinka tiesioginiam virusų nustatymui infekuotose ląstelėse ar audiniuose. Taigi, rekombinantiniai virusų antigenai ir jiems specifiški antikūnai gali būti panaudoti minėtų virusinių infekcijų diagnostikai įvairiais imunocheminiais metodais.

hPIV3, priklausantis paramiksovirusų šeimai, yra plačiai paplitęs žmogaus kvėpavimo takų virusas, kurio infekcija ypač pavojinga kūdikiams ir mažiems vaikams (Henrickson 2003). Kitas paramiksovirusų atstovas – Menangle virusas – yra sutinkamas Australijoje ir sukelia kiaulių reprodukcinę ligą, tačiau gali būti pavojingas ir žmonėms (Philbey *et al.* 1998). Hantavirusai, kuriuos dažniausiai platina graužikai, yra paplitę visame pasaulyje. Kai kurie hantavirusai yra itin patogeniški žmonėms ir sukelia sunkius sindromus, kurie pasireiškia inkstų bei kraujagyslių patologija (Khaiboullina *et al.* 2005a). Pasiutligė yra mirtinai pavojinga gyvūnų platinama liga, pasireiškianti centrinės nervų sistemos pakenkimais (Gorbach *et al.* 2004).

Šiame disertaciniame darbe sukurtieji monokloniniai antikūnai buvo išsamiai charakterizuoti ir pritaikyti minėtų virusų N baltymų antigeninės struktūros tyrimams. Infekuotų ląstelių ir audinių tyrimai patvirtino naujai sukurtųjų antikūnų diagnostinę vertę.

## Darbo tikslas ir uždaviniai

Šio disertacinio darbo tikslas – ištirti rekombinantinių virusinių baltymų imunogenines savybes ir sukurti monokloninius antikūnus prieš šiuos baltymus, siekiant juos pritaikyti virusų nustatymui infekuotose ląstelėse, bei virusinių baltymų antigeninei struktūrai tirti.

Darbo uždaviniai:

1. Ištirti rekombinantinių virusinių baltymų – hPIV3, Menangle viruso, hantavirusų bei pasiutligės viruso nukleokapsidės baltymų – imunogeniškumą ir sukurti hibridomas, gaminančias monokloninius antikūnus prieš šiuos baltymus;

2. Ištirti sukurtų monokloninių antikūnų specifiškumą, kryžmines reakcijas, sugebėjimą atpažinti natyvius virusus infekuotose ląstelėse ir įvertinti jų diagnostinį potencialą;

3. Naudojant sukurtuosius monokloninius antikūnus ir antiserumus, susidariusius natūralios infekcijos metu, ištirti virusinių baltymų antigenines savybes ir identifikuoti imunodominuojančius epitopus.

## Tyrimų metodika

Darbe buvo naudojama hibridomų technologija, įvairūs imunofermentinės analizės variantai, imunoblotingo ir imunofluorescencinės mikroskopijos metodai, genų inžinerijos, bioinformatikos metodai.

## Darbo mokslinis naujumas ir jo reikšmė

Monokloniniai antikūnai prieš virusų antigenus turi didelę diagnostinę vertę, todėl jie kuriami daugelyje laboratorijų, nemažai tokių antikūnų yra komercializuota. Dauguma anksčiau aprašytų antikūnų buvo sukurti, naudojant nukenksmintus virusus. Mūsų sukurtieji antikūnai skiriasi nuo anksčiau aprašytųjų tuo, kad jie buvo gauti prieš rekombinantinius virusų baltymus, formuojančius į virusų nukleokapsides panašias daleles. Rekombinantinių antigenų paruošimas ir naudojimas imunizacijai yra paprastesnis ir saugesnis, nei virusų kultivavimas ir gryninimas, tačiau rekombinantinių ir natyvių virusinių antigenų struktūra gali skirtis. Todėl buvo svarbu pademonstruoti, kad mūsų sukurtieji antikūnai geba atpažinti natyvius virusus infekuotose ląstelėse.

Naudojant sukurtuosius monokloninius antikūnus, buvo išsamiai apibūdinta dviejų paramiksovirusų šeimos atstovų hPIV3 ir Menangle viruso – N baltymų antigeninė struktūra. Paramiksovirusų N baltymų antigeninės savybės iki šiol buvo mažai tyrinėtos, nebuvo duomenų apie imunodominuojančius T ir B ląstelių epitopus. Vienas iš geriausiai ištirtų šios šeimos atstovų N baltymų yra tymų viruso N baltymas. Yra žinoma, kad tymų viruso N baltymo C galinė dalis dalyvauja sąveikoje su kitais viruso baltymais (Longhi *et al.* 2003). Anksčiau mūsų atlikti tyrimai parodė, kad šioje baltymo dalyje sutelkta dauguma B ląstelių epitopų, kas patvirtina jos lokalizaciją viruso nukleokapsidės paviršiuje

(Žvirblienė *et al.* 2007). Šiame disertaciniame darbe, ištyrus rekombinantinių hPIV3 ir Menangle viruso N baltymų sąveiką su monokloniniais antikūnais bei antiserumais, susidariusiais natūralios infekcijos arba vakcinacijos metu, buvo gauti nauji duomenys apie minėtų virusų N baltymų B ląstelių epitopus, identifikuotos šių baltymų imunodominuojančios sekos. Panašiai buvo ištirta pasiutligės viruso N baltymo antigeninė struktūra. Gauti rezultatai sutapo su anksčiau publikuotais duomenimis apie B ląstelių epitopų lokalizaciją pasiutligės viruso N baltymo N galinėje dalyje (Toriumi ir Kawai 2005; Jiang *et al.* 2010).

Buvo gauti šie nauji rezultatai:

1. Naudojant rekombinantinius mielėse susintetintus virusų antigenus, buvo sukurtos naujos hibridomų linijos, sekretuojančios aukšto afiniškumo antikūnus prieš 4 skirtingų virusų – hPIV3, hantavirusų, pasiutligės viruso ir Menangle viruso – N baltymus;

2. Pirmą kartą buvo sukurti monokloniniai antikūnai prieš Menangle viruso N baltymą ir pademonstruota, kad jie tinka viruso nustatymui infekuotame audinyje;

3. Pirmą kartą buvo ištirta paramiksovirusų šeimos atstovų – hPIV3 ir Menangle virus – N baltymų antigeninė struktūra ir parodyta, kad imunodominuojančios sekos yra lokalizuotos N baltymų C galinėje dalyje. Identifikuotas hPIV3 N baltymo linijinis epitopas, homologiškas tymų viruso N baltymo imunodominuojančiam epitopui.

## Darbo rezultatų praktinė reikšmė

Šio disertacinio darbo rezultatai turi didelę praktinę reikšmę. Mūsų atlikti infekuotų ląstelių ir audinių tyrimai patvirtino, kad antikūnai, sukurti prieš rekombinantinius mielėse susintetintus virusų baltymus, reaguoja su natyviais virusais infekuotose ląstelėse ir audiniuose. Todėl sukurtieji antikūnai gali būti naudojami minėtų virusinių infekcijų imunodiagnostikai. Tiesioginis viruso nustatymas yra svarbus, norint patvirtinti virusinę infekciją ar tiksliai nustatyti infekcijos sukėlėją. Pavyzdžiui, hPIV infekcijos atveju serologiniais metodais neįmanoma nustatyti, kurio tipo virusas (hPIV1 ar hPIV3) sukėlė infekciją, nes šių virusų struktūriniai baltymai yra homologiški ir susidarę antikūnai kryžmiškai reaguoja su abiejų virusų antigenais. Tačiau turint antikūnus, specifiškus konkrečiam virusui (kaip mūsų sukurtieji antikūnai prieš hPIV3), galima tiksliai identifikuoti infekcijos sukėlėją. Vienas iš mūsų sukurtųjų antikūnų prieš hantavirusus (klonas 4H3 ) taip pat turi unikalų specifiškumą – jis

atpažįsta tik itin patogeniškus Sin Nombre ir Andes hantavirusus. paplitusius Amerikos žemyne. Tokie siauro specifiškumo antikūnai turi didelę diagnostinę ir komercinę vertę.

Disertacinio darbo praktinę reikšmę iliustruoja šie pavyzdžiai:

1. Antikūnai prieš Menangle viruso N baltymą perduoti Australijos veterinarijos laboratorijai (*CSIRO Livestock Industries, Australian Animal Health Laboratory*), kur naudojami Menangle viruso infekcijos paplitimo tyrimams.
2. Antikūnai prieš hantavirusų N baltymą perduoti kelioms užsienio mokslo įstaigoms, kuriose atliekami hantavirusų tyrimai: *Friedrich Loeffler Institute* (Vokietija), *Center for Infectious Diseases and Immunity, University of New Mexico School of Medicine* (JAV), *Departamento de Virologia, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas* (Argentina).
3. Antikūnai prieš hPIV3 ir hantavirusų N baltymus komercializuoti ir įtraukti į kompanijų *Abcam Ltd* (D. Britanija) bei *Santa Cruz Biotechnology* (JAV) katalogus. Jie nuolat tiekiami šioms kompanijoms ir platinami visame pasaulyje.

## Ginamieji teiginiai

1. Rekombinantiniai mielėse susintetinti hPIV3, hantavirusų, pasiutligės viruso ir Menangle viruso nukleokapsidės baltymai sukelia stiprų imuninį atsaką ir yra tinkami antigenai monokloniniams antikūnams kurti.
2. Hibridomos, gautos naudojant rekombinantinius hPIV3, hantavirusų, pasiutligės viruso ir Menangle viruso nukleokapsidės baltymus, sekretuoja specifiškus ir afiniškus antikūnus.
3. Monokloniniai antikūnai, sukurti prieš rekombinantinius virusų nukleokapsidės baltymus, atpažįsta epitopus, būdingus natyviems virusams.
4. Monokloniniai antikūnai prieš virusų nukleokapsidės baltymus gali būti naudojami šių baltymų antigeninei struktūrai tirti.
5. Monokloninių antikūnų pagrindu gali būti kuriamos diagnostinės sistemos, skirtos tiesioginiam virusų nustatymui infekuotose ląstelėse.

## Darbo rezultatų aprobavimas

Disertacijos tema yra atspausdinti keturi moksliniai straipsniai, įtraukti į ISI Web of Sciense sąrašą (Kučinskaite-Kodzė *et al.* 2011; Žvirbliene *et al.* 2010; Žvirbliene *et al.* 2009; Kučinskaitė *et al.* 2007).

Disertacijoje atliktų tyrimų rezultatai buvo paskelbti 6 mokslinėse konferencijose Lietuvoje ir užsienyje:

1. Tarptautinėje konferencijoje „*3rd EFIS-EJI Course on Autoimmunity*“ 2007 m. Tartu, Estijoje.
2. Lietuvos Biochemikų draugijos konferencijoje „*Biochemija ir Sistemų Biologija*“ 2008 m. Tolėja.
3. Tarptautinėje konferencijoje „*II Symposium. Standartization in immunology/Standartyzacja w Immunologii*“ 2009 m. Poznanė, Lenkija.
4. Tarptautinėje konferencijoje „*39th Meeting of Scandinavian Society for Immunology jointly with the Baltic Immunological Society*“ 2010 m. Talinas, Estija.
5. Tarptautinėje konferencijoje „*14th International Negative Strand Virus Meeting*“ 2010 m. Briugė, Belgija.
6. Tarptautinėje konferencijoje „*14th International Congress of Immunology*“ 2010 m. Kobė, Japonija.

## Disertacijos struktūra

Disertaciją sudaro: įvadas, literatūros apžvalga, metodinė dalis, rezultatai ir jų aptarimas, naudotos literatūros sąrašas, publikacijų disertacijos tema sąrašas.

Darbo apimtis yra 128 puslapiai, tekste pateikti 35 paveikslai ir 15 lentelių. Rašant disertaciją, buvo panaudota 240 literatūros šaltinių.

## Padėka

Dėkoju savo darbo vadovei dr. Aurelijai Žvirblienei už tyrimų organizavimą ir visokeriopą pagalbą ruošiant disertaciją.

Dėkoju kolegoms Indrei Šėžaitei, Ritai Lasickienei, Vaidai Žilaitytei ir visam Imunologijos ir ląstelės biologijos skyriaus kolektyvui už pagalbą darbe ir diskusijas.

Dėkoju prof. Kęstučiui Sasnauskui, dr. Almai Gedvilaitei, dr. Rasai Petraitytei-Burneikienei, Mindaugui Juozapaičiui už rekombinantinius virusų baltymus ir vertingus patarimus. Dėkoju dr. Rainer’iui Ulrich’ui (*Friedrich-*

*Loeffler-Institut*, Vokietija) už eksperimentų idėjas ir draugišką darbo atmosferą komandiruotės metu.

Dėkoju savo šeimai ir draugams už pagalbą ir moralinį palaikymą.

Šių darbų vykdymui finansinė parama buvo gauta iš LVMSF remiamos Aukštųjų technologijų plėtros programos projektų B-11 „Kvėpavimo takų virusų tyrimai ir diagnostika“ (2003–2005 m.) ir B-16 „Naujų kryptingo specifiškumo monokloninių antikūnų kūrimas, naudojant chimerines į virusus panašias daleles“ (2005–2006 m.).

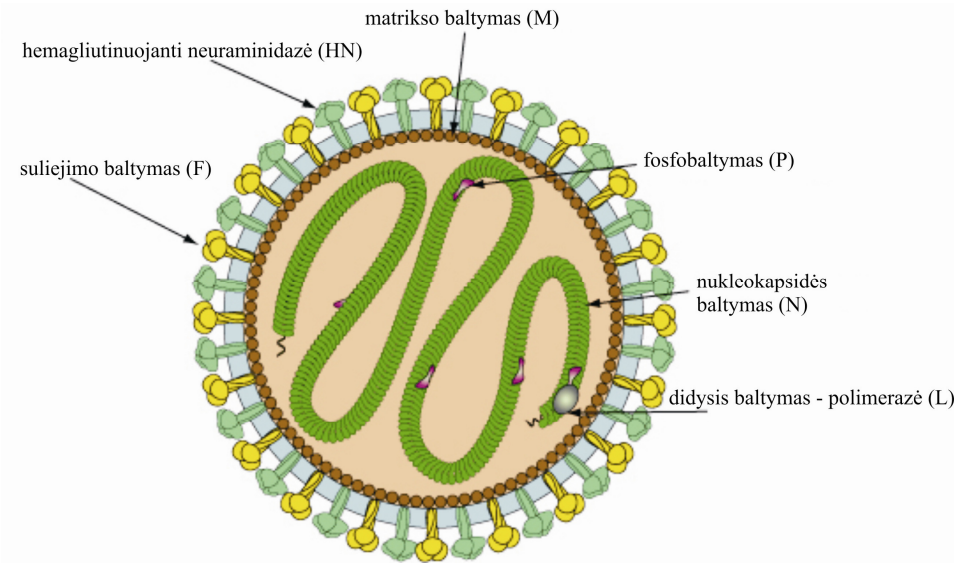
# 1

# Literatūros apžvalga

## 1.1. *Paramyxoviridae* virusų šeima: paragripo ir Menangle virusai

Paragripo (hPIV) ir Menangle virusai priklauso gausiai *Paramyxoviridae* virusų šeimai. Šią šeimą sudaro lengvai infekuojantys ląsteles, tiek žmogaus, tiek gyvūnų organizme sutinkami virusai, tokie kaip tymų (MeV), vėjaraupių, sincitinis kvėpavimo takų (hRSV), metapneumo, Hendra, Nipah virusai.

Tai 15 000–19 000 bazių porų ilgio neigiamos orientacijos nesegmentuotą viengrandės RNR genomą turintys virusai. *Paramyxoviridae* šeimai priklausančių virusų 150–350 nm skersmens virionai dažniausiai yra sferinės formos, tačiau sutinkami ir netaisyklingos arba filamentinės formos, įvairaus dydžio virionai. Šios šeimos virusų genomai sudaryti iš tandemiškai sujungtų 6–10 genų, koduojančių struktūrinius ir nestruktūrinius baltymus. Virusą gaubia membrana, sudaryta iš dvigubo lipidų sluoksnio su jame įsiterpusiais dviem glikoproteinais (GP): suliejimo baltymu (F); hemagliutinuojančia neuraminidaze (HN), o viduje yra nukleokapsidė (N), kuri dar vadinama ribonukleobaltymu. Ją sudaro viruso RNR ir ją gaubiantis N baltymas su įsiterpusiais fosfobaltymu (P) ir didžiuoju baltymu – polimeraze (L). (Knipe ir Howley 2007) (1.1 pav.).




**1.1 pav.** *Paramyxoviridae* šeimos viruso viriono schematinis vaizdas (http://expasy.org/viralzone/all_by_species/556.html)
**Fig. 1.1.** Diagram of the family *Paramyxoviridae* virion (http://expasy.org/viralzone/all_by_species/556.html)

### 1.1.1. Paragripo virusų apibūdinimas

hPIV buvo identifikuoti 1956–1960 m. kaip virusai, sukeliantys kūdikiams, vaikams ir senyvo amžiaus žmonėms viršutinių ir apatinių kvėpavimo takų susirgimus, tokius kaip krupas, plaučių uždegimas, bronchitas ir kt. (Chanok *et al.* 1956; Johnson *et al.* 1960). hPIV apima dvi *Paramyxoviridae* šeimos gentis iš penkių. *Respirovirus* genčiai priklauso hPIV1, hPIV3, *Rubulavirus* genčiai priklauso hPIV2, hPIV4a, hPIV4b. Visi penki virusų virionai turi labai panašią struktūrą bei aktyvias HN (Knipe ir Howley 2007). Tos pačios genties hPIV virusų nukleorūgščių ir aminorūgščių (ar.) sekos yra panašios. Tai pačiai hPIV genčiai priklausantys baltymai taip pat turi labai panašias antigenines savybes (Komada *et al.* 1991).

hPIV turi pleomorfiškus, dažniausiai sferinės formos 150–250 nm skersmens virionus (Howe *et al.* 1967). hPIV virioną sudaro N baltymų ir viruso genominės RNR kompleksas, apgaubtas dvigubo lipidinio apvalkalo, kuris susiformuoja iš infekuotos ląstelės plazminės membranos, atsipumpuruojant virusui (Henrickson 2003). Viriono paviršiuje kyšo transmembraniniai GP: HN homotetrametrai ir F trimerai. Virusas per HN baltymą jungiasi prie ląstelės, turinčios sialo rūgšties receptorių. Šio baltymo dėka virusas tvirtinasi prie

ląstelės paviršiaus ir ją agliutinuoja. F baltymas tarpininkauja, suliejant viruso apvalkalą ir šeimininko ląstelės plazminę membraną. Šią funkciją nulemia F baltymo molekulėje esanti hidrofobinių ar. sritis. Tačiau tam, kad minėtas procesas vyktų efektyviai, reikalinga HN ir F baltymų sąveika (Knipe ir Howley 2007). Viriono dvigubą lipidinį sluoksnį iš vidaus dengia matrikso (M) baltymas. Lyginant su kitais viriono baltymais, M baltymo yra gausiausia. Tai – labai konservatyvus, neglikozilintas baltymas, viruso infekcijos metu susijungiantis su šeimininko ląstelės plazminės membranos vidine dalimi. M baltymas koordinuoja viriono susirinkimą, pumpuravimąsi ir atpalaidavimą iš ląstelės. Dėl sąveikos su visais viruso struktūriniais komponentais M baltymas yra pagrindinis tarpininkas, sąlygojantis virusinės dalelės susirinkimą infekuotoje ląstelėje (Knipe ir Howley 2007).

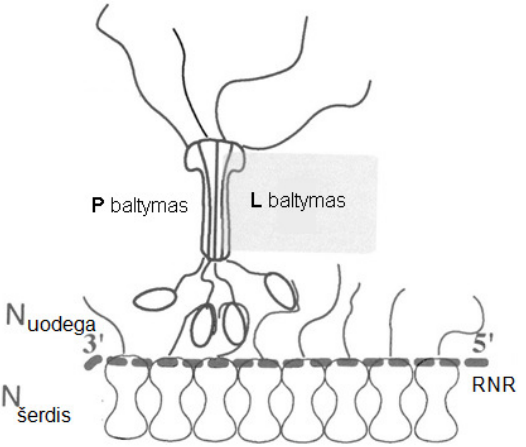
Genominė RNR ir N baltymas sudaro labai stabilią ir tvirtą struktūrą, kuri ir yra visos RNR sintezės matrica. Visų paramiksovirusų N baltymų monomerai sudaro spiralės formos struktūrą, surišdami viruso RNR. hPIV virione yra 2 500–2 700 N baltymo molekulių, tarp kurių yra įsiterpę po 300 P ir 40 L baltymo molekulių. Manoma, kad nukleokapsidė funkcionuoja kaip kompleksas ir natūraliomis sąlygomis neišsiardo. N, P, L baltymų ir RNR kompleksą galima vadinti savarankišku infekuojančiu agentu – N, P, L ir RNR gali susirinkti savarankiškai į nukleokapsidę, vykdyti transkripciją ir RNR replikaciją *in vitro*. P ir L baltymai kartu sudaro viruso polimerazę ir su laisvu N baltymu formuoja kompleksą, kuris dalyvauja naujai sintetinamos genominės ir antigenominės RNR pakavime į nukleokapsidę (Knipe ir Howley 2007).

Šios rūšies virusų replikacija vyksta tik citoplazmoje. Pirmasis žingsnis viruso reprodukcijos kelyje yra viruso ir šeimininko ląstelės lipidinių membranų susiliejimas. Kitas žingsnis – nukleokapsidės atpalaidavimas tiesiogiai į infekuotos ląstelės citoplazmą. Nukleokapsidėje supakuota viruso genominė RNR transkribuojama į teigiamos orientacijos informacinę RNR (iRNR), veikiant viruso RNR polimerazei. Ląstelės ribosomos nuo iRNR transliuoja viruso baltymus. Naujai susintetinti N, P, L viruso baltymai dalyvauja genominės viruso RNR replikacijoje. Padauginta viruso genominė RNR sąveikauja su naujai susintetintais N, P, L baltymais ir taip suformuojamos būsimų virusų nukleokapsidės. M baltymas vidinėje šeimininko ląstelės plazminės membranos pusėje sąveikauja su viruso GP ir tuo pačiu pritraukia nukleokapsidę prie infekuotos ląstelės plazminės membranos, kurios paviršiuje jau yra eksponuoti būsimo viruso GP. Dar citoplazmoje besiformuojant nukleokapsidei, viruso GP transportuojami i endoplazminį tinklą, iš kurio patenka į Goldžio kompleksą (GK). Galiausiai egzocitozės būdu GP patenka į infekuotos ląstelės plazminės membranos paviršių. Išsigaubiant ląstelės plazminei membranai, formuojasi pumpuras, po to atsiskiria virusinė dalelė (Henrickson 2003; Knipe ir Howley 2007).

### 1.1.1.2. Paramiksovirusų nukleokapsidės baltymas

N baltymas – viruso genominę ir antigenominę RNR surišantis baltymas. Jis ir RNR formuoja spiralinės formos struktūras – nukleokapsides. Tik tokią formą įgijusi viruso RNR yra biologiškai aktyvi. Nustatyta, jog vieno iš geriausiai ištirtų paramiksovirusų atstovo – Sendai viruso – N baltymas suriša 6 nukleotidus, o 13 N baltymo vienetų sudaro vieną nukleokapsidės spiralės apsisukimą (Egelman *et al.* 1989). Daugumos paramiksovirusų nukleokapsidėms būdingi tie patys parametrai, tačiau gali skirtis N baltymo vienetų skaičius nukleokapsidės spiralinės struktūros apsisukime. Viriono viduje nukleokapsidė yra susisukusi pati apie save, tačiau pažeidus viriono apvalkalą ir pasklidus jo komponentams į aplinką, nukleokapsidė įgauna lanksčią linijinę konformaciją (Bhella *et al.* 2002).

Paramiksovirusų N baltymo molekulė, atlikus įvairius biocheminius ir struktūrinius tyrimus, buvo suskirstyta į du rajonus: N baltymo šerdį ($N_{šerdis}$) ir N baltymo uodegą ($N_{uodega}$) (1.2 pav.).




**1.2 pav.** Paramiksovirusų atstovo – tymų viruso ribonukleobaltymo schematinis vaizdas (Bourhis *et al.* 2007)

**Fig. 1.2.** Diagram of the ribonucleoprotein of measles virus, member of paramyxoviruses (Bourhis *et al.* 2007)

$N_{šerdis}$ sudaro apie 80 % viso N baltymo ir yra gana konservatyvi tarp *Paramyxoviridae* šeimos virusų. $N_{šerdies}$ centrinė dalis turi konservatyvų ar. motyvą, atsakingą už N baltymo polimerizaciją ir N baltymo ir RNR sąveiką, nors klasikinių RNR surišančių motyvų neturi. $N_{uodega}$ – tai C galinis N baltymo nestruktūrizuotas domenas, tarp *Paramyxoviridae* šeimos virusų nepasižymintis dideliu konservatyvumu. Kadangi $N_{uodega}$ yra iškelta į nukleokapsidės paviršių ir dažniausiai turi neigiamo krūvio fragmentą, ji yra ypač jautri proteazių

poveikiui. Buvo nustatyta, kad N baltymo C galinė dalis nėra reikalinga viruso nukleokapsidės formavimuisi ir genominės RNR pakavimui, tačiau nukleokapsidė, suformuota be N baltymo C galinės dalies, negali būti transkribuojama. Be to, šioje N baltymo dalyje yra sritys, atsakingos už N ir P baltymų sąveiką (Knipe ir Howley 2007).

### 1.1.1.3. Paragripo virusų patogenezė ir epidemiologija

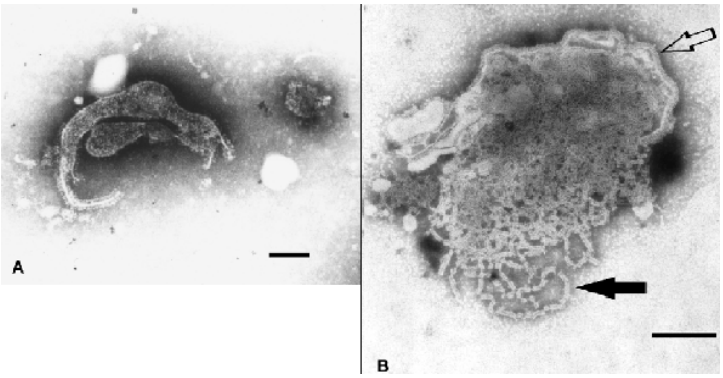
hPIV gali būti perduodamas tiesiogiai per rankas, burną ar akis ne aerozolių, o didesnių lašelių pavidale (Hall 2001). Kvėpavimo takų epitelio ląstelės yra pagrindinė hPIV infekcijos vieta. Ankstyvos infekcijos metu pažeidžiamos nosies ir ryklės gleivinių ląstelės, čia virusai replikuojasi, po to nukeliauja į kvėpavimo takų epitelio ląsteles (Henrickson 2003). Pagrindiniai receptoriai, kuriuos atpažįsta hPIV – sialo rūgštį turinčios ląstelės paviršiaus molekulės (Knipe ir Howley 2007).

hPIV – plačiai ir greit plintantis virusas. Daug veiksnių, tokių kaip bloga mityba arba permaitinimas, vitamino A stoka, maitinančios motinos rūkymas, maitinimo krūtimi trumpas periodas sąlygoja hPIV infekciją kūdikiams (Karmaus *et al.* 2008). Kaip jau buvo minėta, hPIV sukelia apatinių ir viršutinių kvėpavimo takų ligas. Infekcija pavojingiausia kūdikiams, mažamečiams vaikams, senyvo amžiaus žmonėms ir asmenims, turintiems silpną imuninę sistemą, sergantiems įvairiomis lėtinėmis širdies, plaučių ar kitomis ligomis. Suaugusiems žmonėms šie virusai nėra pavojingi, dažniausiai jų infekcija yra besimptomė arba sukelia lengvus viršutinių kvėpavimo takų susirgimus. Todėl dauguma epidemiologinių tyrimų yra atliekama su kūdikiais ir vaikais.

Dauguma hPIV epidemiologinių tyrimų buvo atlikta Pietų ir Šiaurės Amerikoje, Azijoje bei Australijoje. Nustatyta, kad per metus JAV 5 milijonai vaikų iki 5 metų serga apatinių kvėpavimo takų ligomis, iš jų 1/3 vaikų infekuojami hPIV1 ir hPIV3. Pediatrijos ligoninėse nuo 3 iki 18 % hospitalizacijos atvejų sudaro ūmūs kvėpavimo takų susirgimai. Iš jų 9–30 % atvejų buvo nustatyta hPIV infekcija. Kiekvienais metais JAV paguldoma į ligoninę apie 500 000–800 000 vaikų iki 18 metų amžiaus, 12 % visų susirgimų sukelia hPIV1/2/3 virusai (Shay *et al.* 1999). hPIV4 paplitimas nėra gerai ištirtas. 2004–2005 metais Kanadoje buvo atlikti epidemiologiniai tyrimai ir nustatyta, kad iš visų nustatytų hPIV infekcijos atvejų 43 % buvo hPIV4 (Vachon *et al.* 2006). hPIV1 ir hPIV2 dažniausiai sukelia krupą, o hPIV3 yra antras po hRSV virusas, atsakingas už plaučių uždegimą ir bronchitą. hPIV4 infekcija diagnozuojama kur kas rečiau, nes šio viruso infekcijos simptomai būna žymiai lengvesni (Knipe ir Howley 2007).

### 1.1.2. Menangle viruso apibūdinimas

Menangle virusas (MenV) buvo identifikuotas 1997 m. staigaus kiaulių reprodukcinės ligos protrūkio metu Australijoje, vienoje Naujojo Pietų Velso, Menangle kaimo kiaulių fermoje (Philbey *et al.* 1998). Naujasis virusas buvo pavadintas vietovės, kurioje jis buvo aptiktas, pavadinimu ir priskirtas *Paramyxoviridae* šeimai, *Paramyxovirinae* pošeimiui, atsižvelgiant į viruso struktūrą, ištirtą elektroniniu mikroskopu (1.3 pav.) (Philbey *et al.* 1998). Atlikus kiekvieno iš viruso genų nukleorūgščių sekų palyginimus, buvo nustatyta, kad virusas tikrai priklauso paramiksovirusams, o pagal P baltymo geno filogenetinės analizės rezultatus MenV buvo priskirtas *Rubulavirus* genčiai (Bowden *et al.* 2001).




**1.3 pav.** MenV elektroninės mikroskopijos nuotraukos (Philbey AW 1998). (**A**) Pleomorfiškas MenV virionas. (**B**) Suardytas MenV virionas. Balta rodyklė rodo suardyto viriono apvalkalą; juoda rodyklė – pasklidusią į aplinką nukleokapsidę. Juodas brūkšnys atitinka 100 nm

**Fig. 1.3.** Electron micrographs of MenV (Philbey AW 1998). (**A**) The pleomorphic nature of MenV virion. (**B**) A disrupted virion (white arrow) and nucleocapsids (blank arrow); bar = 100 nm

Kiaulių fermoje, kurioje buvo staigus dar nežinomo viruso protrūkis, naujagimių paršelių kiekis sumažėjo nuo 82 % iki 60 %. Viruso infekcija buvo aprašoma, kaip sukelianti paršavedžių kiaulių persileidimus, siejamus su embrionų ir vaisių mirtimis bei paršelių apsigimimais. MenV infekuoti paršeliai sirgo artrogripoze, turėjo išsivysčiusią hipoplaziją, kaukolės ir stuburo smegenų apsigimimus (Philbey *et al.*1998; Love *et al.* 2001). Suaugusios kiaulės neturėjo viruso sukeltos ligos požymių. Dviejų kiaulidėse dirbusių žmonių kraujo serume buvo rasta virusą neutralizuojančių antikūnų. Praėjus kelioms savaitėms po viruso infekcijos protrūkio, abu darbuotojai skundėsi simptomais, panašiais į gripo viruso sukeliamos infekcijos simptomus. Tiriant MenV paplitimą aplink

infekcijos židinį, pavyko nustatyti, kad *Pteropus* šeimos šikšnosparniai yra MenV viruso nešiotojai, kuriems viruso infekcijos metu nepasireiškia jokie ligos simptomai (Philbey *et al.* 1998). Viruso perdavimo būdas kol kas nėra gerai ištirtas. Manoma, kad viruso infekcija kiaulių populiacijoje plinta per virškinamąjį traktą, į jį patekus išmatoms ar šlapimui (Philbey *et al.* 1998). Kaip perduodamas virusas žmogui ir ar infekuoti MenV *Pteropus* šeimos šikšnosparniai gali užkrėsti žmogų, kol kas nėra žinoma.

## 1.2. *Hantavirus* genties virusai

### 1.2.1. Hantavirusų apibūdinimas

Pirmasis hantavirusas buvo identifikuotas 1978 m. kaip Korėjos hemoraginės karštinės sukėlėjas (Lee *et al.* 1978). Virusas buvo pavadintas Hantaan (HTNV) vardu – pagal upės, šalia kurios buvo sugautas šio viruso nešiotojas graužikas *Apodemus agrarius*, pavadinimą. Šiek tiek vėliau buvo identifikuotas panašus virusas, sukeliantis lengvesnius ligos simptomus. Jis buvo išskirtas iš kitos rūšies graužiko (*Clethrionomys glareolus)* Skandinavijoje ir pavadintas Puumala viruso (PUUV) vardu (Brummer-Korvenkontio *et al.* 1980). 1981 m. prancūzų mokslininkai adaptavo HTNV (76–118 atmainą) A549 ląstelių linijoje. Šis virusas buvo ištirtas elektroniniu mikroskopu ir priskirtas *Bunyaviridae* virusų šeimai (White *et al.* 1982). Skirtingai nei kiti šios šeimos virusai, hantavirusai neturi atropodinio vektoriaus, o natūralūs jų nešiotojai yra graužikai ir vabzdžiaėdžiai gyvūnai (1.1 lentelė) (Knipe ir Howley 2007). *Hantavirus* genties virusai *Bunyaviridae* virusų šeimai buvo priskirti 1985 m. kaip virusai sukeliantys hemoraginę karštinę su inkstų sindromu (HKIS) (Schmaljohn *et al.* 1985). Iki 1993 m. buvo manoma, kad visos patogeninės hantavirusų rūšys paplitusios tik senojo žemyno kontinentuose. Amerikoje pneumonijos, sukeliančios širdies darbo sutrikimus, protrūkio metu buvo identifikuotas naujas hantavirusas, kuris pavadintas Sin Nombre (SNV) vardu (Shefer *et al.* 1994). Nuo to laiko šio viruso sukeliama liga vadinama hemoragine karštine su plaučių sindromu (HKPS). Vėliau Šiaurės ir Pietų Amerikoje buvo identifikuota ir daugiau hantavirusų, sukeliančių HKPS (1.1 lentelė). Be patogeninių hantavirusų, dar yra sutinkamos hantavirusų rūšys, nesukeliančios žmogui jokių ligų simptomų – tai Tula (TULV) ir Prospect Hill virusai (Mackow ir Gavrilovskaya 2001).

**1.1 lentelė.** Žmogų infekuojantys hantavirusai, jų nešiotojai, paplitimas, sukeliamos ligos (Khaiboullina *et al.* 2005a; Zhenqiang *et al.* 2008)
**Table 1.1.** Clinical manifestations, geographic distribution and rodent reservoir of pathogenic hantaviruses (Khaiboullina *et al.* 2005a; Zhenqiang *et al.* 2008)

| Hantavirusas | Sukeliama liga | Mirtingumas, % | Geografinis paplitimas | Viruso nešiotojas |
|---|---|---|---|---|
| Amur | HKIS | k. a. | R. Rusija | *Apodemus peninsula* |
| Dobrava (DOBV) | HKIS | 9–12 | Balkanai | *Apodemus flavicollis* |
| Hantaan (HTNV) | HKIS | 10–15 | Azija | *Apodemus agrarius* |
| Khabarovsk | HKIS? | k. a. | Azija | *Microtus arvalis* |
| Puumala (PUUV) | HKIS | 0,1–1 | Europa | *Clethrionomys glareolus* |
| Saaremaa | HKIS | labai mažas | Europa | *Apodemus agrarius* |
| Seoul (SEOV) | HKIS | 3–15 | visame pasaulyje | *Rattus norvegicus* |
| Tula (TULV) | HKIS? | k. a. | Europa | *Microtus arvalis* |
| Andes (ANDV) | HKPS | 43–56 | P. Amerika | *Oligoryzomys longicaudatus* |
| Araraquara | HKPS | k. a. | P. Amerika | *Bolomys lasiurus* |
| Araucaria | HKPS | 39 | P. Amerika | *Bolomys* arba *Akodon* rūšis? |
| Bayou | HKPS | k. a. | Š. Amerika | *Oryzomys palustris* |
| Black Creek Canal | HKPS | k. a. | Š. Amerika | *Sigmodon hispidus* |
| Castelo Dos Sonhos | HKPS | k. a. | P. Amerika | *Oligoryzomys* rūšis? |
| Choclo | HKPS | 25 | P. Amerika | *Oligoryzomys fulvescens* |
| Hu39694 | HKPS | k. a. | P. Amerika | *Oligoryzomys flavescens* ? |
| Juquitiba | HKPS | k. a. | P. Amerika | *Oligoryzomys nigripes* |
| Laguna Negra | HKPS | 9–29 | P. Amerika | *Calomys laucha* |
| Lechiguanas | HKPS | 26 | P. Amerika | *Oligoryzomys flavescens* |
| Monongahela | HKPS | k. a. | Š. Amerika | *Peromyscus maniculatus* |
| Muleshoe | HKPS | k. a. | Š. Amerika | *Sigmodon hispidus* |
| New York | HKPS | k. a. | Š. Amerika | *Peromyscus leucopus* |
| Oran | HKPS | 8–40 | P. Amerika | *Oligoryzomys longicaudatus* |
| Rlo Mamore | HKPS | ? | P. Amerika | *Neacomys spinosus* |

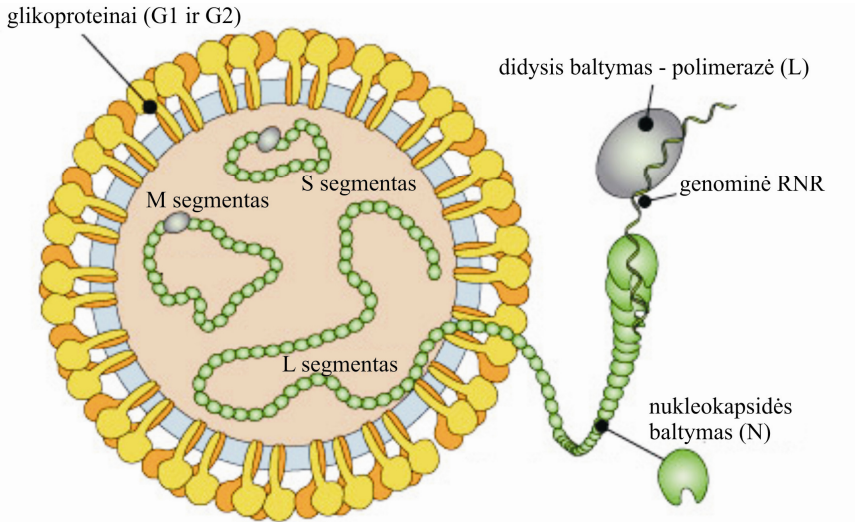
| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Sin Nombre (SNV) | HKPS | 40–60 | Š. Amerika | *Peromyscus maniculatus* |

? – nėra tikslių duomenų; k. a. – keletas atvejų; P. Amerika – Pietų Amerika; Š. Amerika – Šiaurės Amerika; R. Rusija – Rytų Rusija.

Hantavirusų geografinis išsibarstymas ir epidemiologija yra glaudžiai susijusi su natūralių šeimininkų – graužikų geografiniu pasiskirstymu. Dauguma hantavirusų turi vieną, tik jam būdingą graužiką – šeimininką, kuriam viruso infekcija nesukelia jokios ligos simptomų. Hantavirusams infekavus žmogų, išryškėja HKIS arba HKPS simptomai. HKIS sukeliantys virusai paplitę Europos ir Azijos žemynuose (1.1 lentelė). HKPS sukeliantys virusai paplitę Šiaurės ir Pietų Amerikos žemynuose (1.1 lentelė). Europoje dažniausiai sutinkami šie hantavirusai: Dobrava virusas (DOBV), Saaremaa virusas, PUUV ir TULV; Azijoje – HTNV ir Seulo virusas (SEOV); Pietų ir Šiaurės Amerikoje – Andes (ANDV) ir SNV virusai (Knipe ir Howley 2007). Šių virusų infekcija gali būti perduodama tarp graužikų arba nuo graužikų – žmogui. Viruso infekcijos plitimas žmonių populiacijoje mažai tikėtinas. Iki šiol yra aprašytas tik vienas toks atvejis, kai ANDV viruso infekcija buvo perduota iš žmogaus žmogui (Enria *et al.* 1996).

Hantavirusai priklauso *Bunyaviridae* virusų šeimai, kurią sudaro dar keturios virusų gentys: *Orthobunyarirus*, *Phlebovirus*, *Nairovirus* ir *Tospovirus* (Knipe ir Howley 2007). Tai segmentuotą, neigiamos orentacijos, viengrandės RNR genomą turintys virusai. 80–120 nm hantavirusų virionų dalelės dažniausiai būna sferinės arba kiaušinio pavidalo formos. Viruso RNR ir N baltymas sudaro kompaktišką trijų segmentų nukleokapsidę, kurią dengia lipidinis apvalkalas su įsiterpusiais viruso GP: G1 ir G2 (1.4 pav.).

Viruso genomą sudaro didysis (L), vidutinis (M) ir mažasis (S) segmentai, koduojantys viruso baltymus: L segmentas – baltymą L, kuris yra viruso replikazė, transkriptazė (nuo viruso RNR priklausanti RNA polimerazė), endonukleazė; M segmentas – GP G1 ir G2 pirmtaką; S segmentas – N baltymą (Jonsson ir Schmaljohn 2001) (1.4 pav.). Kiekvienas iš segmentų 3’ ir 5’ galuose turi vienodas tarpusavyje komplementarias nukleotidų sekas, kurios formuoja žiedinės formos viruso RNR genomo segmentus (McCormick *et al.* 1982; Schmaljohn 1996). Šios komplementarios nukleotidų sekos tarp tos pačios genties virusų yra labai konservatyvios (Hewlett *et al.* 1977). Taip pat šios nekoduojančios hantavirusų genomo sritys dalyvauja viruso RNR replikacijoje ir transkripcijos reguliacijoje bei virusinės RNR pakavimo iniciacijoje (Jonsson ir Schmaljohn 2001). Kiekvieno segmento RNR sudaro kompleksus su N baltymu ir formuoja spiralės formos grandines (Obijeski *et al.* 1976) (1.4 pav.).




**1.4 pav.** *Hantavirus* genties viruso viriono schematinis vaizdas (http://expasy.org/viralzone/all_by_species/213.html)
**Fig. 1.4.** Diagram of the genus *hantavirus* virion (http://expasy.org/viralzone/all_by_species/213.html)

Hantavirusai daugiausia infekuoja endotelio ląsteles, sudarančias kraujagyslių vidinį sluoksnį, o jų replikacija vyksta citoplazmoje (Rossier *et al.* 1986), dalyvaujant aktino filamentams (Ravkov ir Compans 2001; Kariwa *et al.* 2003; Andersson *et al.* 2004). Patekimui į ląstelę virusas naudoja endotelio ląstelių β1 arba β3 integrinus, o į pačią ląstelę patenka nuo klatrino priklausomos endocitozės būdu (Gavrilovskaya *et al.* 1999). Viruso nukleokapsidėms patekus į ląstelę, prasideda iRNR sintezė (Bouloy ir Hannoun 1976).

N baltymas yra pats gausiausias hantaviruso baltymas tiek pačiame virione, tiek ląstelėje viruso infekcijos metu (Lober *et al.* 2001). Susirenkant virusinei dalelei, N baltymas turi migruoti į tą pačią vietą, kaip G1 ir G2 baltymai. Praėjus 2 val. po viruso infekcijos, N baltymą granulių pavidale galima aptikti citoplazmoje, o po 24 val. N baltymas išsidėsto greta GK (Kariwa *et al.* 2003). Taip pat N baltymas sutinkamas infekuotos ląstelės perinuklearinėje srityje, sąveikaujantis su aktino filamentais (Ravkov ir Compans 2001; Andersson *et al.* 2004). Suardžius aktino filamentų tinklą, sutrinka virionų susirinkimas, todėl manoma, kad aktino filamentai dalyvauja N baltymo pernešime į virionų susirinkimo vietą, gerta GK (Spiropoulou *et al.* 2003). Skirtingai nei dauguma neigiamos orentacijos RNR genomą turinčių virusų, hantavirusai neturi M baltymo, kuris sąveikaudamas su N baltymu ir viruso paviršiaus baltymais padėtų susirinkti virusinei dalelei. Hantavirusų atveju ribonukleobaltymas, susikaupęs GK pūslelių membranų išorėje, sąveikauja su GP citoplazminėmis

uodegomis (Smith ir Pifat 1982). GK membranos su integraliniais viruso baltymais apgaubia ribonukleobaltymą. Susidariusios dalelės susilieja su endoplazminio tinklo (ET) membranomis, taip atpalaiduojamos pavienės virusinės dalelės, ir virionai transportuojami į ląstelės išorę (Kikkert *et al.* 1999).

### 1.2.1.1. Hantavirusų nukleokapsidės baltymas

Hantavirusų N baltymą sudaro 428–433 ar., jo molekulinė masė yra apie 49–51 kDa. Virusui infekavus ląstelę, pradedami sintetinti dideli N baltymo kiekiai. Infekuotoje ląstelėje jo iRNR galima rasti, praėjus 6 valandoms po infekcijos (Spiropoulou 2001). Kaip ir daugumos virusų N baltymai, taip ir hantavirusų N baltymas atlieka panašias funkcijas: apsaugo naujai susintetintą viruso RNR nuo nukleazių degraduojančio poveikio; viruso RNR ir N baltymo formuojamas kompleksas tiesiogiai sąveikauja su viruso paviršiaus GP G1 citoplazminėmis uodegomis virusinės dalelės susirinkimo metu. Kol kas hantavirusų N baltymų erdvinė struktūra nėra išspręsta. Tačiau yra žinoma, kad hantavirusų N baltymas sąveikaudamas su viruso RNR sudaro trimerus, kurie suriša viruso genominę RNR, sudarydami ribonukleobaltymą (Alfadhli *et al.* 2002). Buvo nustatyta, kad HTNV ir PUUV N baltymų C galo 93 ar. fragmentuose yra viruso RNR surišančios sritys (Gott *et al.* 1993). Vėliau RNR surišantis motyvas buvo identifikuotas konservatyvioje N baltymo dalyje tarp 175 ir 217 ar. (Xu *et al.* 2002). N baltymo trimeras atpažįsta segtuko struktūros RNR, kuri susidaro susijungus komplementariems 3’ ir 5’ viruso genominės RNR galams (Mir ir Panganiban 2004). N baltymo trimerai susidaro dalyvaujant N ir C baltymo galams (Alfadhli *et al.* 2002; Kaukinen *et al.* 2004). N baltymo N galinė dalis, atsakinga už trimerų formavimąsi, formuoja dvi antiparalelines α1 ir α2 spirales (Alfadhli *et al.* 2001, 2002). Vieną spiralės apsisukimą sudaro 7 ar. Sąveika tarp konservatyvių 1 ir 4 spiralės apsisukimo hidrofobinių ar. stabilizuoja susisukusių spiralių struktūrą (Lupas *et al.* 1991). Šis spiralių motyvas dalyvauja keliose baltymo – baltymo reakcijose, kurios atlieka keletą svarbių biologinių funkcijų, tokių kaip: signalo perdavimo, transkripcijos reguliavimo ir kt. (Burkhard *et al.* 2001). Pavyzdžiui, SEOV ir HTNV N baltymai sąveikauja su SUMO-1 ir į ubikvitiną panašaus baltymo molekulėmis (Kaukinen *et al.* 2003; Lee *et al.* 2003; Maeda *et al.* 2003); PUUV N baltymas atpažįsta apoptozę pagreitinantį veiksnį – Daxx baltymą (Li X. D., *et al.* 2002); o ANDV N baltymas sąveikauja su interferoną aktyvuojančiu MxA baltymu (Khaiboullina *et al.* 2005b).

Hantavirusų N baltymas sukelia stiprų humoralinį imuninį atsaką infekcijos metu. Dėl šios priežasties jo pagrindu kuriami nauji diagnostiniai reagentai, skirti hantavirusų infekcijai nustatyti (Padula *et al.* 2000; Araki *et al.* 2001; Li Z., *et al.* 2002; Petraitytė 2007, 2008). N baltymas pasižymi didžiausiu

kryžminiu specifiškumu tarp hantavirusų struktūrinių baltymų. Kryžmines serologines reakcijas tarp skirtingų hantavirusų N baltymų paaiškina konservatyvios antigeninės determinantės, didelė N baltymų ar. sekų homologija.

### 1.2.1.2. Hantavirusų patogenezė ir epidemiologija

Kiekvienas hantavirusas turi savo natūralų nešiotoją graužiką (1.1 lentelė). Graužikams – hantavirusų nešiotojams būdinga infekcija, nesukelianti fiziologinių pakitimų, kuri gali tęstis nuo keleto mėnesių iki dviejų metų. Šie virusai gali infekuoti kitos rūšies graužikus įkandus, arba patekus į kvėpavimo sistemą su šlapime, išmatose ir seilėse esančiais virusais (Glass *et al.* 1988; Hinson *et al.* 2004). Eksperimentinės infekcijos metu buvo nustatyta, kad infekuoti graužikai viremijos stadiją pasiekia ir virusas išplinta po visą graužiko organizmą antrąją savaitę po užkrėtimo. Virusų kiekis kraujotakos sistemoje sutampa su antikūnų prieš virusą susidarymu. Antikūnus prieš hantavirusus galima aptikti apie 14 dieną, o didžiausias jų kiekis stebimas 50 dieną po infekcijos. Nors kraujo serume neutralizuojantys antikūnai išlieka labai ilgai, graužiko organizme virusą galima aptikti net keletą mėnesių po infekcijos. Hantavirusai infekuoja endotelio ląsteles, todėl didžiausia jų koncentracija randama plaučių ir inkstų endotelio ląstelėse (Knipe ir Howley 2007).

Skirtingai nei graužikams, hantavirusų infekcija žmogui yra pavojinga. Priklausomai nuo hantaviruso rūšies, infekuotas žmogus gali susirgti HKIS arba HKPS. Hantavirusai infekuoja žmogų, patekus į kvėpavimo sistemą aerozoliams su graužiko šlapime, išmatose ir seilėse esančiais virusais arba per tiesioginį kontaktą su graužikų ekskrementais (Hart ir Bennett 1999; Vapalahti *et al.* 2003). Ankstyvieji hantavirusų infekcijos etapai yra mažai išnagrinėti. Virusas patenka į šeimininko ląstelę per paviršiaus integrinus. Patogeniniai virusai (tokie kaip SNV, New York ir HTNV) į ląstelę patenka per β3 integrinus, nepatogeniniai hantavirusai (Prospect Hill virusas, TULV) – per β1 integrinus (Mackow ir Gavrilovskaya 2001).

Kaip ir infekuotų hantavirusais graužikų atveju, žmogaus organizme hantavirusai taip pat nesukelia citopatinio efekto. Todėl labiausiai pažeidžiamų organų – inkstų ir plaučių – patologija nėra siejama su virusų indukuojama nekroze. Kol kas nėra identifikuoti veiksniai, kurie tiksliai apibūdintų HKIS ir HKPS patogenezę. Manoma, kad endotelio ląstelės yra būtinos hantavirusams sukelti HKIS ir HKPS. Ši hipotezė buvo patvirtinta, aptikus hantavirusų antigenus *post mortem* žmogaus audinių endotelio ląstelėse. Didžiausias virusų antigenų kiekis HKIS atveju randamas inkstų, o HKPS – plaučių endotelio ląstelėse. Buvo nustatyta, kad hantavirusų infekcijos metu padidėja

mikrokraujagyslių endotelio laidumas. Kaip hantavirusai dalyvauja šiame procese, nėra žinoma (Zaki *et al.* 1995).

Tyrimai rodo, kad hantavirusų patogenezė yra multifunkcinis procesas, apimantis ne tik endotelio ląsteles, bet ir citokinus, chemokinus, kitus imuninio atsako efektorius. DNR mikrogardelių metodu buvo nustatyta, kad *in vitro* infekuotose SNV ir Prospect Hill virusais endotelio ląstelėse vyksta molekuliniai virsmai, sukeliantys pavojų ląstelei. Pavyzdžiui, buvo nustatyta, jog 14–18 ląstelės genų, praėjus 3 valandoms po viruso infekcijos, prarado aktyvumą arba buvo neplanuotai aktyvinti. Praėjus 12 valandų po infekcijos, tokių genų skaičius išaugo: SNV atveju identifikuoti 175 paveikti genai, nepatogeninio Prospect Hill viruso atveju – 36 genai. Viruso infekcijos metu aktyvinami įvairūs priešvirusinių, transkripcijos, augimo faktorių, chemokinų, receptorių, struktūrinių baltymų, IFN indukuojančių specifinių kinazių genai (Khaiboullina *et al.* 2004; Geimonen *et al.* 2002).

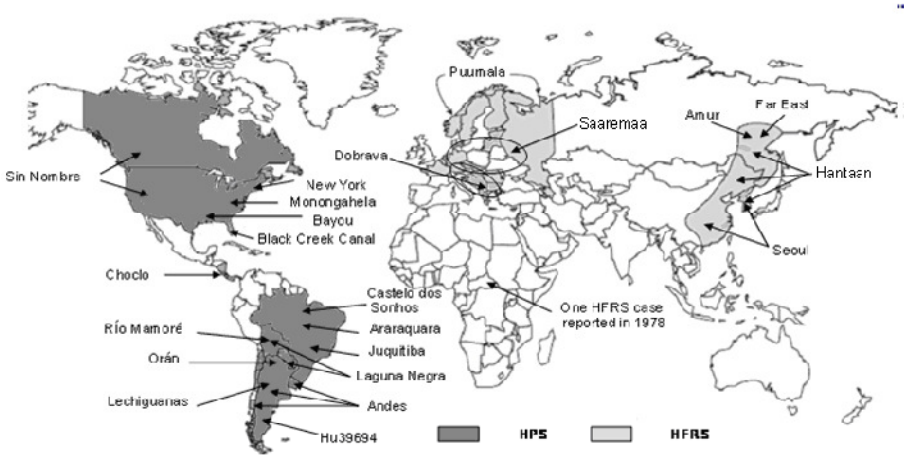
Hantavirusų patogenezėje didelį vaidmenį atlieka cirkuliuojantys imuniniai kompleksai. Jie randami HKIS ligonių kraujo serume, nusėda kraujagyslių sienelėse, inkstuose (Gavrilovskaya *et al.* 1987). Imuninių kompleksų kiekis sumažėja, ligoniui pasveikus.

Specifinio būdo, kaip gydyti HKIS ir HKPS ligonius, nėra sukurta. Gydymo efektyvumas dažniausiai priklauso nuo gydytojo sukauptos patirties, gydant šiuos sindromus. Dažniausiai ligoniai turi vartoti daug skysčių ir palaikyti elektrolitų balansą organizme. Nespecifiniai priešvirusiniai vaistai, tokie kaip IFN-α, steroidai, ciklofosamidas, gali būti naudojami šiai infekcijai gydyti. Buvo įrodyta, kad gydant HKIS ligonius ribavirinu sumažinamas mirtingumas, jei vaistas pradedamas vartoti atsiradus pirmiesiems ligos simptomams (Huggins *et al.* 1991). HKPS atveju ribavirinas buvo neefektyvus (Mertz *et al.* 2004).

Hantavirusų infekcijos prevencija siejama su graužikų, nešiojančių šiuos virusus, populiacijos mažinimu apgyvendintose teritorijose. Taip pat rekomenduojama žmonėms nekontaktuoti su laukiniais graužikais, saugoti maistą nuo kontakto su jais. Vakcinacija būtų paprasčiausias hantavirusų infekcijos prevencijos būdas. Pirmoji vakcina prieš hantavirusus buvo sukurta, išskyrus ir nukenksminus HTNV B-1 virusą iš infekuoto graužiko smegenų ląstelių. Ši vakcina sumažino viruso kiekį, užkrėtus eksperimentinius gyvūnus HTNV B-1, KHF-83-6 virusų atmainomis (Yamanishi *et al.* 1988). Pirmoji komercinė vakcina – „Hantavax“ taip pat buvo pagaminta nukenksminto viruso pagrindu. Praėjus metams po vakcinacijos, 50 % žmonių, vakcinuotų šia vakcina, kraujo serume turėjo hantavirusus neutralizuojančių antikūnų. Nors „Hantavax“ vakcina buvo gerai toleruojama, ji nesukūrė ilgalaikio imuniteto, todėl buvo sutelktas dėmesys į naujų vakcinų prieš hantavirusus kūrimą. Buvo sukurta dvivalentė vakcina prieš HNTV ir SEOV (Ruan *et al.* 1999). Praėjus dviem savaitėms po vakcinacijos šia vakcina, net 100 % savanorių, dalyvavusių

vakcinacijoje, kraujo serume buvo rasta neutralizuojančių antikūnų. Tačiau 2–4 % savanorių ši vakcina sukėlė šalutinį poveikį. Kasmet Kinijoje pagaminama 4 milijonai dozių 5 skirtingų vakcinų prieš hantavirusus, visos jos gaminamos nukenksminant virusą (Hooper ir Li 2001). Yra sukurta nemažai strategijų, skirtų rekombinantinėms vakcinoms prieš hantavirusus kurti. Rekombinantiniai baltymai, kurie tiktų vakcinoms, sintetinami įvairiose raiškos sistemose. Kuriami chimeriniai baltymai, DNR vakcinos (Schmaljohn 2009). Visos šios vakcinos eksperimentinių gyvūnų modeliuose veikia efektyviai, sukelia stiprų imuninį atsaką prieš virusus. Tačiau iki šiol nėra nė vienos komerciškai prieinamos rekombinantinės vakcinos prieš hantavirusus.

Hantavirusų sukeliamos ligos yra plačiai paplitusios pasaulyje (1.5 pav.). Kiekvienais metais pasaulyje hospitalizuojama nuo 150 000 iki 200 000 ligonių su HKIS (Lee 1996).




**1.5 pav.** Hantavirusų sukeliamų HKIS ir HKPS pasiskirstymas pasaulyje (Zhenqiang B 2008)

**Fig. 1.5.** Geographical distribution of hantavirus pulmonary sindrome and hemorragic fever with renal sindrome (Zhenqiang B 2008)

Azijos žemyne HTNV, SEOV sukeliamas HKIS dažniausiai diagnozuojamas Kinijoje, Korėjos Respublikoje ir Tolimųjų Rytų Rusijoje. Nuo 1950 iki 2001 m. Kinijoje buvo aprašyta daugiau nei 1 400 000 HKIS atvejų, iš jų – 45 000 mirčių. Kasmet Kinijoje aprašoma nuo 40 000 iki 60 000 HKIS atvejų, o tai sudaro 70–90 % visų HKIS atvejų pasaulyje. Korėjos Respublikoje kasmet susiduriama su 300–400 HKIS atvejų, o Rusijoje – su 100–200 atvejų. Kitose Azijos žemyno šalyse su hantavirusų sukeliamu HKIS susiduriama retai. Japonijoje nuo 1985 metų nebuvo aprašyta nei vieno HKIS atvejo (Zhenqiang *et al.* 2008).

Europos žemyne per metus HKIS atvejų diagnozuojama: Rusijoje (3 000 atvejų), Suomijoje (1 000 atvejų), Švedijoje (300 atvejų) ir kitose Europos šalyse susiduriama su mažiau nei 100 atvejų per metus (Zhenqiang *et al.* 2008).

Šiaurės ir Pietų Amerikoje daugiausia paplitę SNV, ANDV, Monongahela, New York, Black Creek Canal, Bayou, Oran, Lechiguanas ir Hu39694 hantavirusai. Graužikai, priklausantys *Sigmondontinae* pošeimiui, yra šių virusų nešiotojai. Skirtingai nei kiti hantavirusai, jie sukelia HKPS žmogui, o mirtingumas siekia 40–50 % (Khaiboullina *et al.* 2005a).

Hantavirusų paplitimas Lietuvoje pirmą kartą buvo aprašytas 1990 m. (Motiejūnas *et al.* 1990). Buvo tirtos skirtingos žmonių grupės ir trys geografiniai regionai. Nustatytas bendras hantavirusams specifinių antikūnų serume paplitimas buvo 0,6 %. Daugiau teigiamų serumo mėginių buvo nustatyta tarp miško darbininkų ir gamtosaugininkų. Buvo ištirti 4578 graužikų serumai ir daugiausiai hantavirusams specifinių antikūnų rasta pelėnuose *Clethrionomys glareolus* (4,2 %). Visi antigenai šių graužikų serume buvo priskirti PUUV serotipui. Dauguma infekuotų pelėnų buvo sugauta Šiaurės ir Vidurio Lietuvoje (židiniai Šiaulių ir Panevėžio apskrityse ir Širvintų rajone). 2005 metais buvo paskelbti duomenys apie naują hantavirusų paplitimo Lietuvoje tyrimą (Sandmann *et al.* 2005). Tirtos dvi serumų grupės: onkologinių ligonių (n = 438) ir kraujo donorų (n = 299) serumai. Nustatyta, kad praėjus tik kiek daugiau nei dešimtmečiui po ankstesnio tyrimo, situacija Lietuvoje žymiai pasikeitė. Buvo nustatyta, kad Lietuvoje sutinkami du hantavirusų serotipai (PUUV ir DOBV), dominuojant DOBV serotipui. Taip pat nustatytas didesnis antikūnų paplitimas, nei ankstesniame tyrime (0,7 % donorų grupėje, kur vidutinis amžius 22,5 metai ir 8,2 % onkologinių pacientų grupėje, vidutinis amžius 65,7 metai). Tyrimai parodė, kad hantavirusai yra paplitę visoje Lietuvoje. Visose septyniose apskrityse surinktuose kraujo serumuose buvo aptikta hantavirusams specifinių antikūnų turinčių serumų (Sandmann *et al.* 2005). Šie duomenys sutampa su kaimyninėse šalyse atliktais hantavirusų epidemiologiniais tyrimais. Latvijoje ir Rusijoje taip pat paplitę PUUV ir DOBV hantavirusai (Niklasson *et al.* 1991; Lundkvist *et al.* 2002). 2007 metais buvo aprašyti hantavirusų paplitimo tyrimai tarp hemodializę atliekančių pacientų (Dargevičius *et al.* 2007). Buvo ištirti 218 kraujo serumo pavyzdžiai. Mėginiai buvo tirti naudojant IgG antikūnus „išgaudantį“ imunofermentinės analizės metodą, IgG antikūnai susidarę prieš hantavirusus buvo tiriami naudojant mielėse sintetintus N baltymus. Gauti teigiami rezultatai buvo patvirtinti imunoblotingo metodu. Antikūnų prieš hantavirusus (DOBV, HTNV ir PUUV) paplitimas šioje grupėje buvo 7,4 %, dominavo DOBV serotipas (81 %). Visi atlikti tyrimai rodo, kad Lietuvoje hantavirusai taip pat plinta, todėl reikalingi tolimesni šios infekcijos epidemiologiniai tyrimai.

# 1.3. *Lyssavirus* genties virusai

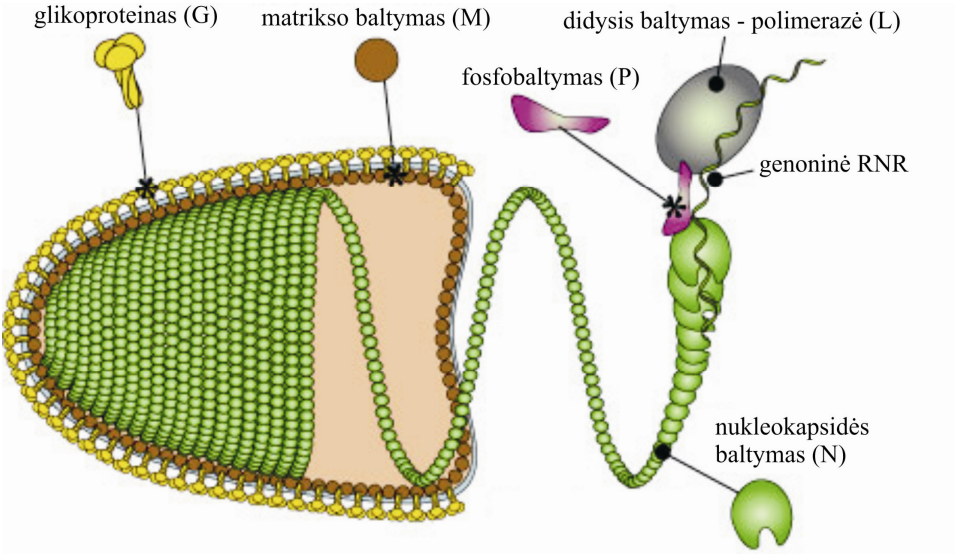
## 1.3.1. Lisavirusų apibūdinimas

Lisavirusų pavadinimas kilęs iš lotyniško žodžio „*lyssa*“, kuris reiškia pasiutligę. Pasiutligė – viena seniausiai aprašytų infekcinių ligų. Senovės Mezopotamijos rašytiniuose šaltiniuose (23 a. pr. Kr.) minima, jog pasiutusio šuns įkandimai yra pavojingi žmogui, o Homero Iliadoje Hektoras vadinamas pasiutusiu šunimi. 4 a. pr. Kr. Aristotelis tiksliai įvertino pasiutusio šuns keliamą mirtiną pavojų žmogui (Knipe ir Howley 2007). Senovės graikai manė, kad pasiutligę sukelia po liežuviu esančios kirmėlaitės. Pirmajame mūsų eros amžiuje romėnas Celsus'as pasiutligę pavadino hidrofobija. Van Sviton'as 1770 m. pirmasis aprašė žmogaus pasiutligės paralyžiaus formą. Nors jau buvo žinoma, kad pasiutligę perneša pasiutę gyvūnai, 1804 m. G. G. Zinke nustatė, kad infekcinis pasiutligės agentas slypi pasiutusio gyvūno seilėse. V. Galtier'is sukūrė eksperimentinį pasiutligės infekcijos modelį: kaip virusą perduoti triušiui ir iš triušio kitam triušiui. Pasiutligės viruso tyrimus molekuliniame lygyje paspartino naujų technologijų atsiradimas. Kad pasiutligės virusas infekuoja neuronus, mikroskopu įrodė A. Negri 1903 m., identifikavęs pasiutusio gyvūno neuronų citoplazmoje intarpinius kūnelius, kurie pasirodė esą nukleokapsidės agregatai ir dabar vadinami Negri kūneliais (Kristensson *et al.* 1996). Dideli nuopelnai tiriant pasiutligę ir rengiant jos prevencijos priemones priklauso L. Pasteur'ui. Jis įrodė, kad pasiutligės sukėlėjas yra virusas, randamas pasiutusio gyvulio seilėse, liaukose ir audiniuose, bet dažniausiai – galvos ir stuburo smegenyse. L. Pasteur'as eksperimentiškai nustatė, kad pakartotinai skiepijant „gatvės“ virusą, galima gauti susilpnintą virusą, kurį jis pavadino fiksuotu. Užkrėtęs juo triušį, iš jo smegenų pagamino skiepus. Pirmasis nuo pasiutligės paskiepytas žmogus – berniukas J. Meister'is, 1885 metų liepos 6 d. įkąstas pasiutusio šuns ir išgyvenęs. Po to L. Pasteur'o gydymas pradėtas plačiai taikyti visame pasaulyje (Knipe ir Howley 2007).

Pagal N baltymo filogenetinę analizę *Lyssavirus* genties šeimą sudaro septyni virusų genotipai. Klasikinis pasiutligės virusas (RABV) buvo priskirtas 1 genotipui, Lagos šikšnosparnių virusas (LBV) – 2 genotipui, Mokola virusas (MOKV) – 3 genotipui, Duvenhage virusas (DUVV) – 4 genotipui, Europos šikšnosparnių 1 tipo lisavirusas (EBLV-1) – 5 genotipui, Europos šikšnosparnių 2 tipo lisavirusas (EBLV-2) – 6 genotipui ir Australijos šikšnosparnių lisavirusas – 7 genotipui (Knipe ir Howley 2007). Eurazijoje šikšnosparniuose buvo identifikuoti keturi nauji lisavirusai: Aravan virusas, Khujand virusas, Irkut virusas, Vakarų Kaukazo šikšnosparnių virusas (Arai *et al.* 2003; Kuzmin *et al.* 2003, 2005). Pagal virusus neutralizuojančius antikūnus, kurie susidaro prieš

pasiutligės virusų glikoproteinus, išskiriami keturi lisavirusų serotipai: RABV – 1 serotipas; LBV – 2 serotipas; MOKV – 3 serotipas; DUVV – 4 serotipas (Schneider *et al.* 1973; Dietzschold *et al.* 1988).

*Lyssavirus* genties virusai priklauso *Rhabdoviridae* virusų šeimai, kurią sudaro dar dvi virusų gentys: *Vesiculovirus* ir *Ephemerovirus* (Knipe ir Howley 2007). Tai nesegmentuotą, neigiamos orientacijos, viengrandės RNR genomą turintys virusai. Jų viriono pavidalas primena kulką (1.6 pav.). Viriono dalelė yra 80 nm diametro ir 180 nm ilgio.




**1.6 pav.** *Rhabdoviridae* šeimos viruso viriono schematinis vaizdas (http://expasy.org/viralzone/all_by_species/22.html)
**Fig. 1.6**. Diagram of the family *Rhabdoviridae* virion (http://expasy.org/viralzone/all_by_species/22.html)

Pagrindinio *Lyssavirus* genties atstovo – RABV 12 kb RNR genomą gaubia 1 200 N baltymo molekulės. Kiekviena N baltymo molekulė dengia 9 nukleotidų bazes (Iseni *et al.* 1998), taip supakuodama viruso genomą į nukleokapsidę. Į viruso nukleokapsidės sudėtį taip pat įeina 466 kopijos P baltymo ir 50 kopijų L baltymo. P baltymas atsakingas už L baltymo sąveiką su nukleokapside, o L baltymas dalyvauja visose RNR sintezės fermentinėse reakcijose.

Virione N baltymas asocijuotas su 1 800 M baltymo molekulėmis, kuris kondensuoja nukleokapsidę į tvirtai susuktą M baltymo ir nukleokapsidės struktūrą (1.6 pav.) (Thomas *et al.* 1985). Tokia struktūra kartais vadinama viriono skeletu, nes dėl M baltymo ir nukleokapsidės sąveikos susidaro kulkos pavidalo viriono struktūra. M baltymas atlieka tarpininko vaidmenį tarp nukleokapsidės lipidinio apvalkalo (Lenard *et al.* 1990). M baltymo molekulės

epitopai virione dėl formuojamo komplekso su nukleokapside ir lipidiniu apvalkalu yra visiškai paslėpti ir nepasiekiami (Mebatsion *et al.* 1999). Viruso apvalkale eksponuota nuo 300 iki 400 GP (G baltymo) smailių, kiekviena smailė sudaryta iš trijų G baltymo molekulių. G baltymas atlieka viruso prisitvirtinimo prie šeimininko ląstelės ir prasiskverbimo į ją funkcijas (Rose *et al.* 1980; Gaudin *et al.* 1992). Viruso lipidinis apvalkalas formuojamas iš infekuotos ląstelės (Albertini *et al.* 2006) plazminės membranos, virusui susirenkant į dalelę ir atsipumpuruojant. Viruso apvalkalo cheminė sudėtis dėl to gali kisti, priklausomai nuo infekuotos ląstelės rūšies (McKenna *et al.* 2003).

*Rhabdoviridae* šeimos virusų genomą sudaro viengrandė, nesegmentuota, neigiamos orientacijos RNR. Apytiksliai 50 nukleotidų ilgio lisavirusų genomų 3’ ir 5’ galinės sekos yra dalinai komplementarios ir turi sekas, kurios tarnauja kaip transkripcijos ir replikacijos promotoriai ir kaip signalai, skirti susidaryti kapsidėms genomų ir antigenomų replikacijos metu. Nors šios galinės sekos nekoduoja baltymų, tačiau nuo jų yra transkribuojamos nežinomas funkcijas atliekančios iRNR molekulės. Pasiutligės virusų genomą sudaro 5 genai, koduojantys viruso baltymus (3’-N-P-M-G-L-5’). Genų sujungimo vietos turi konservatyvias sekas, kurios nurodo geno transkripcijos pradžią ir pabaigą. Šios sekos reguliuoja viruso RNR polimerazės aktyvumą. Paprastai netransliuojami iRNR 5’ ir 3’ regionai yra trumpi (10–50 nukleotidų) ir neturi sekų, kurios kontroliuotų iRNR transliaciją (Knipe ir Howley 2007). Tarp G ir L baltymų genų yra papildomas transkripcinis vienetas, kuris nekoduoja baltymo ir yra vadinamas pseudogenu. Pseudogeno delecija RABV prototipo kamiene neturėjo jokio efekto viruso replikacijai ląstelėse ir patogenezei pelėje (Ceccaldi *et al.* 1998). Tačiau didelį neuroinvazinį laipsnį turinčio pasiutligės viruso „gatvės viruso“ kamieno pseudogeno pakaitalas paveikė viruso neuroinvazinį efektą, o tai reiškia, kad pseudogenas vaidina svarbų vaidmenį kai kurių pasiutligės virusų kamienų patogenezėje (Feber *et al.* 2004).

*Rhabdoviridae* virusų šeimos replikacijos ciklas yra panašus į kitų neigiamos orientacijos, viengrandę RNR turinčių virusų. Replikacija prasideda nuo viruso prisitvirtinimo prie ląstelės, susiliejimo su ja ir nukleokapsidės atpalaidavimo į citoplazmą. Lisavirusai atpažįsta infekuojamas ląsteles per įvairius receptorius. Daugiausia ištyrinėti receptoriai, per kuriuos RABV infekuoja neuroną. RABV G baltymas efektyviausiai atpažįsta neuronų kilmės ląsteles (Tuffereau *et al.* 1998), todėl RABV būdingas neurotropizmo reiškinys. Keletas skirtingų neurono paviršiaus molekulių buvo identifikuoti kaip potencialūs RABV receptoriai: nikotino acetilcholino receptorius, neuronų adhezijos molekulė CD56, žemo afiniškumo neuronų augimo faktorius p75. Be šių receptorių, RABV atpažįsta ir kitų ląstelių paviršiaus molekules (neigiamą krūvį turinčius lipidus – gangliozidus), tačiau pastarosios pasižymi mažesniu afiniškumu. Įdomu tai, kad RABV prisitvirtinti prie ląstelės reikalingas žemesnis

nei įprastas pH (pH 6,5–6,6), svarbus G baltymo konformacijai susidaryti, reikalingai atpažinti infekuojamos ląstelės paviršiaus receptorių. Lisavirusai patenka į ląstelę nuo klatrino priklausomos endocitozės būdu (Matlin *et al.* 1982). Virusui prisijungus prie receptoriaus, ląstelės membranoje susiformuoja klatrinu padengta įdauba, taip susiformuoja endocitozinė dalelė. Pasišalinus klatrinui iš pūslelės, susiformuoja ankstyvoji endosoma. Ankstyvosios endosomos turinys transportuojamas į vėlyvąsias endosomas ir lizosomas degradacijai. Endosominių pūslelių susidarymo metu dažnai susiformuoja vadinamieji multivezikuliniai kūneliai (Gruenberg ir Stenmark 2004). Endocitozinis kelias sudaro itin žemo pH aplinką. Esant pH 6,5 ir žemesniam, G baltymas tarpininkauja, susiliejant viruso apvalkalo ir endosomos membranoms. Žemas pH keičia susiliejimo baltymų konfirmaciją, o lisavirusų atveju G baltymai įgauna atsparumą tripsino proteolizei (Fredericksen ir Whitt 1996). Viruso G baltymai per suliejimo peptidą skatina susilieti viruso ir ląstelės membranas, jam įsiterpiant į taikinio membraną. Buvo nustatyta G baltymo susiliejimo peptido seka (59–221 ar.), kuria RABV įsiskverbia į infekuojamą ląstelę (Durrer *et al.* 1995).

Viruso infekcijos metu į ląstelės citoplazmą įterpiama nukleokapsidė Ji atpalaiduojama per multivezikulinius kūnelius. Kad nukleokapsidė patektų į citoplazmą ir nebūtų degraduojama lizosomų proteazių ar kitų fermentų, reikia papildomos sąveikos tarp multivezikulinių kūnelių ir endosomų membranų (Le Blanc *et al.* 2005).

Eksperimentai parodė, jog pirmieji viruso replikacijos procesai (prisitvirtininas, įsiskverbimas, nukleokapsidės atpalaidavimas į citoplazmą ir pirminė transkripcija) įvyksta per kelias valandas po infekcijos. Tuo tarpu genomo replikacija, antrinė transkripcija ir viruso susirinkimas gali vykti iki keleto dienų nuo infekcijos pradžios (Knipe ir Howley 2007).

Kaip ir daugumos virusų, *Rhabdoviridae* šeimos virusų atskiri komponentai susirenka skirtinguose ląstelės kompartmentuose ir tik replikacijos pabaigoje susirenka į viruso dalelę. G baltymas sintetinas ribosomose, išsidėsčiusiose grūdėtojo ET paviršiuje (Rose ir Gallione 1981) o, G baltymo brendimas ir cheminė modifikacija – ET membranose (Katz ir Lodish 1979; Hammond ir Helenius 1994). Susijungus GK ir atsiskyrusių ET pūslelių membranoms, G baltymo monomerai susijungia į trimerus ir transportuojami į GK (Doms *et al.* 1988). GK membranoms susiliejus su plazmine membrana, G baltymas iškeliamas į ląstelės paviršių (McCreedy *et al.* 1990; Brown ir Lyles 2003). Skirtingai nei G baltymas, M baltymas sintetinamas kaip tirpus baltymas ir asocijuoja su neigiamą krūvį turinčiais periferinės membranos fosfolipidais (Lenard ir Vanderoef 1990; Ye *et al.* 1994). Viruso pumpuravimosi metu, laisvos M baltymo molekulės citozolyje ir komplekse su ląstelės plazmine membrana dalyvauja sudarant N–M baltymo kompleksus (Flood ir Lyles1999).

Susitelkus viruso komponentams, viruso dalelė iškeliama į ląstelės paviršių, taip susidaro naujam infekcijos ciklui pasiruošęs virionas.

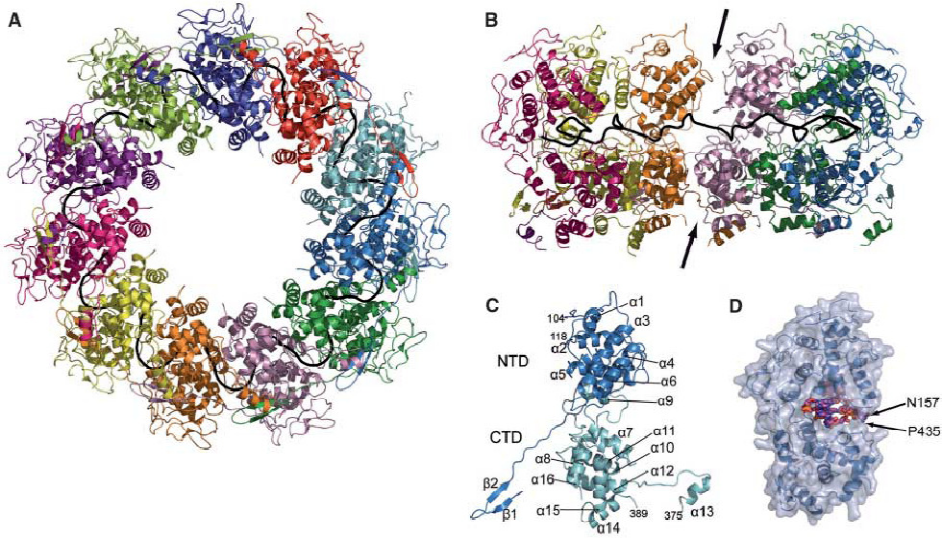
### 1.3.1.1. Lisavirusų nukleokapsidės baltymas

Kaip ir daugumos virusų N baltymai, taip ir lisavirusų N baltymas atlieka panašias funkcijas: apsaugo naujai susintetintą viruso RNR. Tvirtai ir kompaktiškai supakuotas lisavirusų genomas padeda virusui praeiti įgimto imuniteto barjerus, endosominio kelio metu nukleokapsidėms patenkant į citoplazmą. Piešvirusinio imuninio atsako metu interferonas aktyvina infekuotos ląstelės egzonukleazes, tačiau jos nepajėgios pasiekti viruso RNR tvirtai supakuotoje nukleokapsidėje (Espert *et al.* 2003; Le Blanc *et al.* 2005; Akira *et al.* 2006;). Kaip RNR jungiasi su N baltymu *in vivo,* kol kas nėra gerai ištirta. Manoma, kad šiam procesui nereikalingi kiti viruso baltymai (Kouznetzoff *et al.* 1998).

Siekiant tiksliau ištirti lisavirusų nukleokapsidės susirinkimo procesą ir išsiaiškinti, kokį vaidmenį atlieka RNR – N baltymo kompleksas lisavirusų gyvavimo cikle, buvo ištirta RABV RNR – N baltymo komplekso erdvinė struktūra. Sintetinant RABV N baltymą vabzdžių raiškos sistemoje, susidaro RNR – N baltymo žiedai iš 9, 10, 11, 12 ir 13 N baltymo kopijų (Schoehn *et al.* 2001). Iš 11 N baltymo molekulių sudaryti žiedai geriausiai formavo kristalus, todėl didelės skiriamosios gebos elektroniniu mikroskopu (Schoehn *et al.* 2001) ir rentgenostruktūrinės analizės metodu (Albertini *et al.* 2006) buvo išspręsta RNR – N baltymo komplekso erdvinė struktūra. Nustatyta RNR – N baltymo komplekso erdvinė struktūra pavaizduota 1.7 paveiksle.

RNR – N baltymo erdvinės struktūros modelyje N baltymo protomeras sudarytas iš dviejų šerdinių domenų: N galinio (NTD) ir C galinio (CTD) (1.7 B, C, D pav.). NTD (nuo 32 iki 233 ar. N baltymo molekulėje) domeną sudaro 6 α spiralės, sujungtos didelėmis kilpomis. CTD (nuo 236 iki 356 ar. ir nuo 396 iki 450 ar. N baltymo molekulėje) domeną sudaro 11 α spiralių, sujungtų tvirtomis kilpomis (1.7 C pav.). Taigi, RABV N baltymo molekulė susideda iš dviejų skilčių, todėl manoma, kad yra ir dvi sritys, per kurias prijungiama RNR grandinė. NTD apatinė ir CTD viršutinė dalys „uždaro“ RNR grandinę, sudarydamos siaurą plyšį tarp NTD N157 ir CTD P435 (1.7 D pav.) (Albertini *et al.* 2006). Susidarant RNR – N baltymo žiedui, skirtingų protomerų NTD nesąveikauja (1.7 B pav.). Priešingai nei NTD, CTD sąveikauja tarpusavyje dideliu paviršiaus plotu dėka hidrofobinių ir Van der Valso ryšių (1.7 B pav.). N baltymo erdvinės struktūros modelyje matyti du mažiau struktūrizuoti subdomenai, kyšantys iš NTD ir CTD, ir siekiantys gretimus protomerus (1.7 C pav.). NTD subdomeno β klosčių sujungimo sritis (linkis) (nuo 23 iki 29 ar.) ir

CTD subdomeno formuojama trumpa 13-ta α spiralė yra iškeltos į RNR – N baltymo komplekso paviršių.




**1.7 pav.** RABV – N baltymo komplekso erdvinė struktūra (Albertini *et al.* 2006)
**Fig. 1.7.** Three-dimensional structure of the RABV RNR – N protein complex (Albertini *et al.* 2006)

Priešingai nei NTD, CTD sąveikauja tarpusavyje dideliu paviršiaus plotu dėka hidrofobinių ir Van der Valso ryšių (1.7 B pav.). N baltymo erdvinės struktūros modelyje matyti du mažiau struktūrizuoti subdomenai, kyšantys iš NTD ir CTD, ir siekiantys gretimus protomerus (1.7 C pav.). NTD subdomeno β klosčių sujungimo sritis (linkis) (nuo 23 iki 29 ar.) ir CTD subdomeno formuojama trumpa 13-ta α spiralė yra iškeltos į RNR – N baltymo komplekso paviršių.

RABV N baltymo C galinė dalis yra atsakinga už sąveiką su P baltymu (Schoehn *et al.* 2001). P baltymas aktyvina L baltymą ir jungiasi prie N baltymo per fosforilintą CTD S389 (Dietzschold *et al.* 1987). Sąveikos su P baltymu metu ši N baltymo sritis yra ypač lanksti (Toriumi ir Kawai 2005). P baltymas sąveikaudamas su S389 veikia subdomenus. Taip perduodamas signalas NTD atsiverti, o RNR tampa lengvai prieinama viruso polimerazei (Albertini *et al.* 2006).

RABV N baltymo antigeninės struktūros tyrimai patvirtina RNR – N baltymo erdvinės struktūros tyrimo metu gautus duomenis. Literatūroje aprašomos kelios antigeninės RABV N baltymo determinantės (epitopai). Buvo sukurti 6 MAk, specifiški RABV N baltymo C galiniam fragmentui nuo 360 iki

383 ar. (Goto *et al.* 2000). Yra duomenų ir apie nustatytus epitopus RABV N baltymo N galinėje dalyje nuo 1 iki 42 ar. Žinoma, kad pasiutligės viruso N baltymo N galinė dalis nedalyvauja nukleokapsidės formavime ir sąveikoje su kitais viruso baltymais, pvz., P baltymu (Toriumi ir Kawai 2005). Nustatyta, kad MAk prieš 1–42 ar. segmentą sąveikauja su N baltymu net ir tais atvejais, kai N baltymas yra nukleokapsidės struktūroje arba prisijungęs P baltymą. Tuo tarpu MAk prieš N baltymo C galinį segmentą (nuo 388 iki 407 ar.) nesąveikauja su N baltymu, kai jis formuoja minėtas struktūras (Toriumi ir Kawai 2005).

### 1.3.1.2. Lisavirusų patogenezė ir epidemiologija

Lisavirusai – pagrindiniai pasiutligės sukelto encefalito etiologiniai agentai. Virusų nešiotojai – šikšnosparniai, šunys, beždžionės, meškėnai, lapės, skunkai, galvijai, vilkai, kojotai, mangustai, pelės, katės ir kt. – gali pernešti pasiutligę sukeliančius virusus kitiems žinduoliams, naminiams gyvūnams arba žmogui. Viruso perdavimas žmogaus žmogui retai sutinkamas. Literatūroje aprašyti keli atvejai, kai pasiutligės virusas buvo perduotas žmogui organų transplantacijos metu (Srinivasan *et al.* 2005). Lisavirusai perduodami dažniausiai per odą, įkandus infekuotam gyvūnui arba per gleivines – patekus infekciniam agentui. Jų epidemiologija yra susijusi su virusą platinančio šeimininko rūšies paplitimu ir ryšiais su žmogumi.

Benamiai, valkataujantys šunys yra pagrindiniai RABV nešiotojai visame žemyne. Nors yra ir išimčių – Australijoje, Antarktidoje ir keliose izoliuotose salose klasikinis pasiutligės virusas nėra paplitęs (Badrane *et al.* 2001). Trys pasiutligės virusų rūšys aptinkamos tik Afrikos žemyne. Tai LBV, MOKV ir DUVV. Daugiausia jie sutinkami vabzdžiaėdžiuose šikšnosparniuose arba mažuose žinduoliuose (King *et al.* 1994). EBLV-1 ir EBLV-2 paplitę Europoje, nuo Rusijos iki Ispanijos, daugiausia vandenyno pakrantėse (Schneider ir Cox 1994). Australijos šikšnosparnių virusas aptinkamas Australijos rytinėje pakrantėje, dažniausiai vabzdžiaėdžiuose šikšnosparniuose (Hooper *et al.* 1997). Lisavirusus platinantys šikšnosparniai paplitę Afrikoje, Australijoje ir Europoje. Europoje aprašomos trys skirtingos lisavirusų rūšys: RABV, EBLV-1, EBLV-2 (Kuzmin *et al.* 2005).

Taigi, pasiutligės profilaktikos klausimai labai aktualūs visame pasaulyje. Įvairios tarnybos glaudžiai bendradarbiauja, kad ši pavojinga liga neplistų. Pasaulio sveikatos organizacijos (PSO) duomenimis, kasmet pasaulyje nuo pasiutligės miršta apie 55 tūks. žmonių (http://www.who.int/mediacentre /factsheets/fs099/en/). Tokį didelį sergamumą ir mirtingumą šiose šalyse sąlygoja gyvenimo būdas, tradicijos. Todėl labai svarbu nuolat analizuoti

pasiutligės epidemiologinę situaciją, nustatyti viruso paplitimą įvairių gyvūnų populiacijose, aiškinti žmonėms apie plitimo tendencijas ir pavojų užsikrėsti. To galima pasiekti, taikant tikslius pasiutligės diagnostikos metodus ir naudojant efektyvias imunoprofilaktikos priemones – vakcinas.

Lietuvoje pasiutligė žinoma nuo senų laikų. 1897 m. gydytojas V. Orlovskis Vilniuje įkūrė Pastero stotį (Svičiulis *et al.* 1989). Jos paskirtis buvo gaminti vakcinas, skiepyti nuo pasiutligės, atlikti mokslinius tyrimus. Nuo 1923 iki 2000 m. buvo užfiksuota nuo 87 iki 221 pasiutligės atvejų (Lukauskas ir Dranseika 2001). Visi atvejai buvo patvirtinti netiesioginės imunofluorescencijos ir laboratorinių gyvūnų užkrėtimo metodais. Dažniausiai pasiutlige serga laukiniai ir naminiai gyvūnai, tačiau pasitaiko ir žmonių susirgimų. Lietuvoje kasmet (1994–2003 m. duomenimis) į medikus kreipiasi nuo 8 000 iki 12 000 nukentėjusių nuo įvairių laukinių ar naminių gyvūnų žmonių. Dažniausiai žmonės nukenčia pavasario, vasaros ir rudens laikotarpiu. Nepaisant įvairių priemonių, kurių imasi medicinos ir veterinarijos specialistai, kas treji, ketveri metai Lietuvoje žmonės miršta nuo pasiutligės. Mirtingumas nėra didelis. 1960–2003 metais užregistruota 10 mirties atvejų. Dažniausias infekcijų šaltinis – šunys ir lapės (Milius *et al.* 2004).

Įkandus pasiutusiam gyvūnui, ligos vystymasis priklauso nuo įkandimo gylio, vietos, viruso atmainos. Didžiausias mirtingumas stebimas, pažeidus galvos zoną (40–80 %), mažiau pavojingi įkandimai į rankų (15–40 %), kojų ar liemens zonas (5–15 %) arba per rūbus (< 5 %). Dažniausiai pasiutligės inkubacinis periodas būna nuo 1 iki 2 mėnesių, nors gali trukti tik savaitę arba keletą metų. Pasiutligės klinika skirstoma į tris periodus: inkubacinį, neurologinį ir komos. Pirmojo periodo metu, kuris trunka nuo 2 iki 10 dienų, dažniausiai simptomai būna menkai pastebimi arba nespecifiški: jaučiama vėsuma, troškulys, galvos skausmas, fotofobija, hidrofobija, pykinimas, vėmimas, viduriavimas, gerklės ir raumenų skausmas, kosulys, pakyla kūno temperatūra. Ankstyvoje pasiutligės stadijoje, jei virusas buvo perduotas įkandus gyvūnui, žaizdos vietoje jaučiamas nemalonus pojūtis: deginimas, perštėjimas. Tai vieninteliai specifiški simptomai, būdingi pasiutligei. Neurologinės fazės metu pasireiškia nervų sistemos sutrikimai: nerimas, susijaudinimas, disfazija, stiprus seilių išsiskyrimas, paralyžius, kartais kliedesys. Ši fazė pasibaigia po 2–7 dienų ir žmogų ištinka koma, po to – staigi mirtis sutrikus kvėpavimo sistemos arba širdies darbui (http://www.who.int/rabies/human/WHO_strategy_prepost_expos ure /en/index1.html).

Pasiutligė priskiriama prie didžiausią pavojų keliančių infekcinių ligų. Kol kas nėra aprašyta spontaniškų pasveikimo nuo šios ligos atvejų (Dutta *et al.* 1994). Todėl terminas „gydymas“ yra klaidinantis šios ligos atveju. Daugiau nei 12 milijonų žmonių per metus, įtarus galimą pasiutligės viruso infekciją, profilaktiškai skiepijasi. Pasiutligės virusus linkusių platinti gyvūnų

vakcinavimas yra pagrindinė pasiutligės prevencijos priemonė. Šalyse, kuriose vykdomos laukinių šunų vakcinacija, žmogaus mirtis nuo pasiutligės viruso yra retas reiškinys. Pirmoji pasiutligės vakcina, panaudota žmogui 1885 m. Vakcina, sukurta nervinio audinio pagrindu, iki šiol yra naudojama kai kuriose šalyse. Atsižvelgiant į tai, kad vakcinos, sukurtos natūralių audinių pagrindu yra rizikingos, buvo pradėtos kurti vakcinos infekuotų ląstelių kultūrų pagrindu. Žmogaus diploidinių ląstelių pasiutligės vakcina buvo pradėta naudoti 1967 m. Net 1,5 milijonų žmonių buvo vakcinuoti vakcina, kurioje diploidines ląsteles buvo infekuotos susilpnintu Pitman-Moore L503 pasiutligės viruso kamienu (Knipe ir Howley 2007).

## 1.4. Virusinių infekcijų diagnostikos metodai

Virusų infekcijų diagnostikos metodai skirstomi pagal tai, koks komponentas nustatomas. Tai gali būti paties infekciją sukėlusio viruso išskyrimas, viruso genetinės medžiagos, antigenų arba antikūnų nustatymas audiniuose arba kraujo serume.

Patekę į ląstelę, virusai panaudoja jos replikacijos sistemą, kad galėtų pasidauginti. Todėl ląstelių kultūros, paukščių embrionai ir laboratoriniai gyvūnai gali būti naudojami viruso infekcijai nustatyti. Viruso išskyrimas – vienas iš seniausių metodų, naudojamų viruso infekcijai diagnozuoti. Nors viruso kultivavimui gali būti naudojami gyvūnai ir paukščių embrionai, dažniausiai laboratorijose naudojamos ląstelių kultūros (pirminės arba antrinės). Siekiant nustatyti konkretų virusą, užkrečiamos tam tikros ląstelių linijos. Ląstelių linijos pasirinkimas priklauso nuo viruso gebėjimo infekuoti tam tikros rūšies ląsteles (patogenezės). Viruso infekcija, kai lizuojama ląstelė, yra dažniausias viruso plitimo būdas. Todėl viruso infekcijos metu dažniausiai mikroskopu stebimi ląstelės morfologiniai pakitimai – citopatinis efektas. Kai kurie, virusai (pavyzdžiui, gripo ir paragripo virusai) nesukelia citopatinio efekto, tačiau jų paviršiuje lokalizuoti hemagliutininai agliutinuoja eritrocitus. Šis fenomenas vadinamas hemadsorbcija. Tokiam reiškiniui stebėti į užkrėstą virusu ląstelių kultūrą pridedama eritrocitų. Taigi, naudojant virusų išskyrimo ir kultivavimo metodą, gana sunku tiksliai nustatyti virusus. Todėl šis metodas dabar retai taikomas, jį siūloma keisti kitais metodais (Callihan ir Menegus 1984; Knipe ir Howley 2007).

Elektroninės mikroskopijos metodu diagnozuojama viruso infekcija, nustatant viruso morfologiją. Šis metodas yra brangus ir reikalauja aukštos kvalifikacijos, todėl virusinių infekcijų diagnostikai retai naudojamas (Knipe ir Howley 2007).

Virusinių infekcijų diagnostikai plačiai naudojami imunologiniai metodai, pagrįsti antigeno – antikūno sąveika. Juos galima suskirstyti dvi grupes: (i) kai žinomas antigenas naudojamas nustatyti imuninį atsaką (humoralinį arba ląstelinį), tiriant ligonio kraujo serumą ir (ii) kai žinomo specifiškumo antikūnai naudojami nustatyti infekciniam agentui. Taigi, virusų infekcijos diagnostikai naudojami šie imunologiniai metodai:

1. Viruso neutralizacijos testas, t.y., viruso sugebėjimo infekuoti ląstelę blokavimas antikūnais. Atliekant šį testą, analizuojamojo kraujo serumo mėginio ir viruso, kuris yra tapatus konkrečiam ligos sukėlėjui, mišiniu užkrečiamos ląstelių kultūros, kiaušiniai arba eksperimentiniai gyvūnai. Neutralizuoto viruso aktyvumas vertinamas ląstelę lizuojančio efekto pasireiškimu, hemadsorbcijos/hemagliutinacijos reakcijomis. Jei viruso neutralizacijos testui atlikti buvo naudojami eksperimentiniai gyvūnai, tai viruso neutralizacijos atveju stebimas ligos pasireiškimas. Tiriamojo serumo neutralizuojančių antikūnų titru laikomas didžiausias serumo praskiedimas, kuriam esant virusai neutralizuojami. Tai – gana jautrus ir specifiškas metodas, dažnai naudojamas kaip auksinis standartas nustatant virusus neutralizuojančius antikūnus. Tačiau šis metodas reikalauja gana daug laiko ir specialių saugumo priemonių darbui su virusais (Jamehdar *et al.* 2007).

2. Hemagliutinacijos inhibicijos testas (HAI). Gana daug skirtingų virusų (gripo, paragripo, raudoniukės virusai, adenovirusasi, alfavirusai, buniavirusai, flavivirusai ir kai kurios pikornavirusų atmainos) geba agliutinuoti eritrocitus. Antikūnai, susidarę prieš viruso hemagliutinuojantį baltymą, blokuoja šį procesą. HAI atliekamas taip: stebima sąveika tarp paciento kraujo serumo ir tam tikros dozės hemagliutinino, į reakcijos mišinį pridėjus eritrocitų. Jeigu kraujo serume yra antikūnų prieš viruso hemagliutininą, eritrocitų agliutinacijos procesas blokuojamas. HAI nesudėtinga atlikti, be to, jo kaštai nėra dideli. Tačiau šis testas nėra specifiškas, todėl šiuolaikinės diagnostikos laboratorijos jį keičia imunofermentinės analizės ir radioimunologiniais testais (Killian 2008).

3. Komplemento fiksacijos testas (CFT). Antikūnai prieš virusą, susijungę su viruso antigenais, fiksuoja komplementą. Avies eritrocitai naudojami kaip indikatorius komplemento fiksacijai nustatyti. CFT teigiamos reakcijos atveju antikūno – antigeno kompleksas susiriša su komplementu, tokiu atveju komplementas nesukelia avies eritrocitų lizės ir jie nusėda ant eksperimente naudojamo indo dugno. Jeigu CFT rezultatas neigiamas, nesusidaro antikūno-antigeno kompleksas ir likęs laisvas komplementas, sąveikaudamas su eritrocitais, sukelia jų lizę. Komplemento fiksacijos reakcija tinka daugelio virusinių ligų diagnostikai, bet dažniausiai taikoma antigeno, bendro įvairių serologinių variantų virusams, antikūnams aptikti. Tačiau šis metodas taip kaip ir HAI, nėra pakankamai jautrus ir specifiškas, todėl keičiamas kitais metodais (Evans *et al.* 1997).

4. Imunofermentinė analizė (IFA). Šis metodas sukurtas 1970 m. Tai – vienas jautriausių imunocheminių metodų, naudojamų virusinių infekcijų diagnostikai. IFA metodo esmė yra ta, kad susidaro antigeno-antikūno kompleksas, kuris ryškinamas antriniais antikūnais. Pastarieji žymimi fermentu, kuris skaldo substratą ir sukelia spalvinę reakciją. Naudojant šį analizės metodą laboratoriniams tyrimams, galima įvertinti, ar tiriamas mėginys yra teigiamas: ar susidarė antikūnai pirminės infekcijos, vakcinacijos arba po vakcinacijos įvykusios reinfekcijos metu. Šiam tikslui naudojamos įvairios IFA modifikacijos: (i) netiesioginė IFA; (ii) konkurencinė IFA; (iii) antikūnus „išgaudanti“ IFA; (iv) sluoksniuotas (dviepitopės) IFA metodas ir (v) imunoblotingas (IB) (Harlow ir Lane 1988; Knipe ir Howley 2007).

5. Imunofluorescencinė analizė (IF) ir imunohistocheminė analizė (IH). IF itin plačiai naudojama virusinių infekcijų diagnostikai, nustatant virusinius antigenus arba virusui specifiškus IgG, IgM ir IgA klasių antikūnus. Virusų antigenams arba prieš juos susidariusiems antikūnams nustatyti naudojami fluorescuojančiomis žymėmis ženklinti poliklonininiai arba monoklonininiai antikūnai. Veikiant UV šviesai, fluorochromais „nudažytos“ ląstelės švyti. Tiesioginės ir netiesioginės IF atmainos skirtos nustatyti virusų antigenams. Praktikoje IF metodas dažnai naudojamas kvėpavimo takų virusų (hRSV, A ir B gripo virusų, hPIV, adenovirusų) antigenams nustatyti kvėpavimo takų nuoplovose. Netiesioginė IF, skirta nustatyti antikūnams prieš virusą, taikoma naujai atrastų virusų infekcijoms diagnozuoti. Panaši į IF yra IH, tik vietoje fluorescuojančios žymės naudojami fermentai, keičiantys atitinkamo substrato spalvą. IH metodu dažnai nustatomi virusiniai antigenai audiniuose (Knipe ir Howley 2007).

6. Radioimunologinė analizė. Šis metodas skirtas nustatyti viruso antigenam tiriamajame mėginyje. Atliekant tyrimą, sumaišomi žinomi kiekiai radioaktyvia žyme ženklinto antigeno, antikūnų ir tiriamo mėginio. Jei tiriamajame mėginyje yra antigeno, specifiško reakcijos mišinyje esantiems antikūnams, stebimas radioaktyvia žyme ženklinto antigeno koncentracijos sumažėjimas. Šis metodas dabar retai naudojamas rutininei virusų infekcijos diagnostikai, nes reikalauja specializuotos įrangos (http://virology-online.com/general/Tests.htm).

7. Imunojutikliai. Viruso antigenai nustatomi antikūnais, specifiškais nustatomam virusui, imobilizuotais ant elektrodo (Au, Pt). Antikūno – antigeno sąveika stebima, fiksuojant elektrocheminį signalą (amperometrinį atsaką). Tai naujas, gana greitas ir jautrus metodas, bet kol kas retai naudojamas virusinių baltymų nustatymui klinikiniuose mėginiuose (Gan *et al.* 2009, 2010).

Diagnostinė virusologija padarė didelę pažangą, pradėjus taikyti molekulinės biologijos metodus, skirtus viruso DNR ar RNR nustatyti. Šiuos metodus galima suskirstyti į dvi kategorijas:

1. Metodai, kurių metu naudojami nukleorūgščių zondai, komplementariai sąveikaujantys su tiriamojo viruso nukleorūgščių seka. Zondai – nuo 20 iki 1 000 bazių ilgio oligonukleotidai, paženklinti fermentais, antigeniniais substratais, chemiliuminescenciniais dariniais ar radioizotopais, leidžiančiais nustatyti hibridų (tiriamosios DNR, RNR ir zondo) kiekį. Hibridizacijos reakcijos tarp zondų ir tiriamųjų virusų nukleorūgščių sekos gali būti vykdomos skystoje fazėje. Taip atliekamos hibridizacijos reakcijos turi daugiau privalumų, nei vykdomos kietos fazės paviršiuje („Southern“ blotingas ar taškinė hibridizacija). *In situ* hibidizacija, kurios metu tiriama virusų infekcija audiniuose ar pavienėse ląstelėse yra ypač svarbi, diagnozuojant viruso infekciją. Nors hibridizacijos metodai jau seniai naudojami laboratorijose, virusinių infekcijų diagnostikai jie nėra plačiai taikomi (Kuypers *et al.* 1993; Chen *et al.* 2010).

2. Metodai, kurių metu padauginama viruso genetinė medžiaga. Polimerazinės grandininės reakcijos (PGR) metu *in vitro* amplifikuojami tiriamojo viruso DNR fragmentai. Klasikinės PGR atveju gautas produktas analizuojamas DNR elektroforezės gelyje arba pasirenkant vieną iš hibridizacijos technologijų. PGR metodas yra pritaikytas ir RNR turinčių virusų nustatymui – galima amplifikuoti tiriamojo viruso RNR, prieš pirmąjį amplifikacijos ciklą įterpiant atvirkštinės transkripcijos ciklą (AT-PGR). Šiuolaikinėje laboratorinėje diagnostikoje amplifikacijos produktams nustatyti dažnai naudojama kiekybinė PGR (kPGR), kurios metu galima aptikti labai mažus tikslinės DNR kiekius analizuojamame mėginyje, pvz., vieną viruso DNR kopiją reakcijos mišinyje. Šiai PGR atlikti naudojami prietaisai, kurių dėka galima tiesiogiai stebėti PGR produktų fluorescencijos intensyvumo kitimą laike. Tai žymiai pažangesnis metodas, lyginat su standartine nukleorūgščių analize agarozės gelyje (Kang *et al.* 2010, Loeffelholz *et al.* 2010).

### 1.4.1. hPIV ir MenV infekcijų diagnostika

Viršutinių ir apatinių kvėpavimo takų ligas, būdingas kūdikiams ir mažamečiams vaikams, gali sukelti ne tik hPIV, bet ir kiti patogenai. Bronchitą ir plaučių uždegimą gali sukelti hRSV, žmogaus metapneumovirusas, taip pat šių ligų priežastis gali būti bakterinė infekcija. Dėl to svarbu ištirti tikslų ligų sukėlėją ir parinkti tinkamą gydymą (Knipe ir Howley 2007). hPIV infekcijos diagnostika remiasi įprastais metodais, kuriais galima nustatyti virusą, jo baltymus arba genominę RNR kvėpavimo takų išskyrose. Gali būti naudojami ir serologiniai diagnostikos metodai, nustatant antikūnus, susidariusius prieš virusą kraujo serume arba kvėpavimo takų išskyrose ir jų nuoplovose (Loeffelholz *et al.* 2010). hPIV infekcijai diagnozuoti naudojami šie metodai:

▪ Elektroninės mikroskopijos metodas. Elektroniniu mikroskopu stebimi klinikiniai, dažniausiai kvėpavimo takų išskyrų ir nuoplovų mėginiai. Šiuo metodu per 5–15 min. galima identifikuoti virusą, remiantis morfologiniais parametrais: hPIV virionas turi būti sferinės formos, 140 nm skersmens. Nors šis metodas gana greitas, tačiau jis yra nepakankamai specifiškas ir reikalauja papildomos analizės hPIV genotipų nustatymui.

▪ IF metodas. Šis metodas hPIV infekcijai nustatyti naudojamas beveik tris dešimtmečius (Henrickson 2003). Šios analizės metodu galima nustatyti virusą fiksuotuose kvėpavimo takų išskyrų ir nuoplovų pavyzdžiuose, naudojant specifiškus antikūnus prieš skirtingų genotipų hPIV baltymus. IF analizės metodu taip pat galima nustatyti antikūnus, susidariusius prieš hPIV kraujo serume ar kvėpavimo takų išskyrose. Tam yra naudojami sertifikuoti komerciniai fiksuotų ląstelių kultūrų, užkrėstų skirtingais hPIV arba įvairių kvėpavimo takų virusais, rinkiniai.

▪ PGR metodas ir jo modifikacijos. Šie metodai dažnai naudojamai hPIV1, hPIV2, hPIV3 ir hPIV4 virusų infekcijai diagnozuoti. Metodų jautrumas siekia nuo 95 % iki 100 %, o specifiškumas nuo 97 % iki 100 %, lyginant su įprastais ląstelių kultūrų metodais (Henrickson 2003). hPIV infekcija diagnozuojama naudojant multipleksinės (dauginės) PGR rinkinius, kuriais nustatoma visa grupė kvėpavimo takų virusų (Lam *et al.* 2007; Malekshahi *et al.* 2010; Sumino *et al.* 2010). Kiekybinės PGR sistemos taip pat naudojamos kvėpavimo takų virusų infekcijoms diagnozuoti (Terlizzi *et al.* 2009).

▪ Serologiniai metodai tokie, kaip IFA, IH, CFT ar viruso neutralizacija, leidžia nustatyti hPIV infekciją, tačiau šie metodai yra mažai specifiški ir šiuo metu retai naudojami (Zuckerman *et al.* 2009).

MenV infekcija nustatoma, išskiriant virusą iš audinių ar išmatų bei užkrečiant įvairias ląstelių kultūras, MenV kultivavimui dažniausia naudojama BHK1 ląstelių linija. Po 3–5 persėjimų viruso infekcijos atveju stebimas ląstelę lizuojantis efektas, arba virusas identifikuojamas elektroniniu mikroskopu bei atliekant viruso neutralizacijos testą (Bowden *et al.* 2001). MenV infekcijai patvirtinti atliekama PGR analizė (Kirkland *et al.* 2001a). Imunocheminiai metodai iki šiol nebuvo taikomi MenV infekcijos nustatymui, nes nebuvo sukurta viruso antigenams specifiškų antikūnų. Tikslių, greitų ir tiesiogiai MenV nustatančių metodų kūrimas yra svarbus, siekiant kontroliuoti MenV infekciją.

### 1.4.2. Hantavirusų infekcijos diagnostika

Hantavirusų sukeliamus HKIS ir HKPS sunku diagnozuoti, atsižvelgiant tik į klinikinius simptomus. Todėl hantavirusų diagnostika turi būti pagrįsta epidemiologine informacija ir laboratorinės diagnostikos metodais. Hantavirusų

infekcija dažniausia diagnozuojama serologiniais metodais. Hantavirusams specifiški antikūnai gali būti nustatomi, kai pasireiškia pirmieji HKIS ir HKPS ligų simptomai, bei tolimesnėse ligų stadijose (Ennis *et al.* 1997). Tuo tarpu viruso RNR gali būti aptinkama infekuoto žmogaus kraujyje tik ankstyvose ligos stadijose (Kramski *et al.* 2007).

Yra sukurta nemažai serologinių metodų, skirtų diagnozuoti HKIS ir HKPS. Netiesioginė IF, infekuotų ląstelių natyviu hantavirusu pagrindu, buvo pirmasis metodas taikomas HKIS ir HKPS diagnostikai. Šiuo metu netiesioginę IF po truputi išstumia kiti serologiniai metodai – įvairios IFA atmainos. Netiesioginės IFA metodu nustatomi hantavirusams specifiški IgG ir IgM klasės antikūnai. Jiems nustatyti naudojami įvairūs komponentai: natyvaus viruso baltymai (Hedman *et al.* 1991) arba rekombinantiniai bakterijose, mielėse arba vabzdžių ląstelėse susintetinti, dažniausia N baltymai (Takakura *et al.* 2003; Maes *et al.* 2004; Meisel *et al.* 2006; Schmidt *et al.* 2006; Petraitytė *et al.* 2007, 2008). Hantavirusų N baltymas – dominuojantis antigenas, sukeliantis stiprų ir ilgalaikį imuninį atsaką žmogaus organizme (Elgh *et al.* 1998), todėl šio baltymo pagrindu kuriami įvairūs serologiniai metodai. Ankstyvai hantavirusų infekcijai nustatyti gali būti naudojama IgM antikūnus „išgaudanti“ IFA, pasižyminti didesniu jautrumu diagnozuojant hantavirusų infekciją (Kallio-Kokko *et al.* 1998; Wang *et al.* 2007; Petraitytė *et al.* 2009). IB ir imunochromatografijos metodai rečiau naudojami IgM klasės antikūnams nustatyti (Hujakka *et al.* 2003). Tačiau serologiniai metodai turi ir trūkumų. Vienas iš jų – jie netinka viruso serotipui nustatyti, todėl hantavirusų atveju serotipavimui naudojama viena iš viruso neutralizacijos testo atmainų – PRNT (angl. *plaque reduction neutralization test*) (Maes *et al.* 2009).

Yra nemažai komercinių IF ir IFA rinkinių (Progen Biotechnik GmbH (Vokietija), Focus Diagnostics (JAV)), skirtų hantavirusų infekcijai nustatyti. Komercinių IFA rinkinių sudėtyje yra rekombinantiniai virusų antigenai, sukurti bakuloviruso, *E.coli* raiškos sistemose.

### 1.4.3. Lisavirusų infekcijos diagnostika

Pasiutligės požymiai būdingi ne tik šiai ligai, todėl vienintelis kelias patvirtinti pasiutligės diagnozę – nustatyti virusą arba jam specifiškus komponentus. Rutininė pasiutligės laboratorinė diagnostika atliekama, taikant standartinius laboratorinės analizės metodus, kurie skirti nustatyti virusą, jo antigenus, nukleorūgštis ar specifiškus virusui antikūnus. Diagnostika *post mortem* atliekama, nustatant viruso antigenus preparuotuose centrinės nervų sistemos audiniuose IF ir IH metodais. Pasiutligės viruso nustatymui audiniuose

dažniausia naudojami žymėti antikūnai prieš N baltymą (http://www.cdc.gov/rabies/diagnosis/direct_fluorescent_antibody.html).

Histopatologinis metodas – seniausias metodas pasiutligės virusui nustatyti. Paruošti tiriamo gyvūno smegenų audiniai dažomi histologiniais dažais, tokiais kaip hematoksilinas ar eozinas (Hamir *et al.* 1996). Audinių pokyčiai, sukelti pasiutligės viruso, stebimi mikroskopu. Histologiniai pakitimai stebimi viruso infekcijos metu gali būti tokie: mononuklearinės infiltracijos, polimorfonuklearinės ląstelės, limfocitų židiniai, Negri kūneliai. Skiriamasis pasiutligės bruožas yra pasiutligės virusui būdingi 2–10 μm skersmens N baltymo agregatai, susidarantys infekuotame neurone (Negri kūneliai) (http://www.cdc.gov/rabies/diagnosis/histologic.html). PSO rekomenduoja, kad pasiutligės virusų infekcijos diagnostika turi būti atliekama antikūnų prieš ribonukleobaltymus pagrindu, o tiesioginė IF laikoma auksiniu standartu, nustatant pasiutligės virusus infekuotų gyvūnų centrinės nervų sistemos audiniuose (http://www.who-rabies-bulletin.org/about_rabies/Diagnosis.aspx; http://www.cdc.gov/rabies/diagnosis/accuracy.html).

Gana plačiai naudojami biologiniai pasiutligės viruso nustatymo metodai (Koprowski 1973; Albas *et al.* 2005). Eksperimentinės pelės užkrečiamos galimai infekcine medžiaga ir pelės stebimos 30 dienų. Po 30 dienų gyvūno smegenų audiniai tiriami mikroskopu, IF arba IH metodais. Kitas biologinis būdas nustatyti pasiutligės virusą – audinių kultūrų infekavimo testas (Webster 1987). Audinių kultūrų ląstelėse koncentruojamas didesnis viruso kiekis, skirtingai nei infekuojant eksperimentinius gyvūnus. Taikant šį metodą, naudojamos neuroblastomos linijų ląstelės. Pasiutligės viruso buvimas ląstelėse nustatomas, naudojant fluorescencinėmis žymėmis žymėtus antikūnus. Galutiniai testo rezultatai gaunami po 72 val. Pagal jautrumą ir laiko sąnaudas šis testas pranašesnis, nei gyvūnų užkrėtimo metodas (Rudd ir Trimarchi 1989).

Prieš keletą dešimtmečių buvo aprašytas fluorescuojančių antikūnų metodas, skirtas nustatyti pasiutligės viruso antigenams infekuotų arba eksperimentinių gyvūnų smegenų audiniuose (Goldwasser ir Kissling 1958). Jau tada buvo pastebėta, jog tai pranašesnis diagnostikos būdas, nei biologiniai testai. Išanalizavus 825 mėginius, buvo patvirtinta, jog fluoresencinės analizės metodas yra jautresnis nei biologiniai testai ar infekuotų audinių mikroskopavimas (McQueen *et al.* 1960). Šiuo metu IF metodas dažnai naudojamas pasiutligės laboratorinei diagnostikai (Knipe ir Howley 2007). IH metodas leidžia nustatyti pasiutligės virusą formalinu fikusuotuose audiniuose. Tam naudojami monokloniniai antikūnai, kurie specifiškai atpažįsta viruso baltymus (Lembo *et al.* 2006; Stein *et al.* 2010). IH ir IF metodais tiesiogiai nustatant viruso infekciją audiniuose, naudojami antikūnai atpažįstantys lysavirusų N baltymus (http://www.cdc.gov/rabies/diagnosis/direct_fluorescent_

antibody.html). Tokie antikūnai dažniausia gaunami naudojant natyvų virusą (Toriumi ir Kawai 2005; Jiang *et al.* 2010; Fooks *et al.* 2009).

Pasiutligei nustatyti naudojami ir IFA metodai. Atliekant šiuos testus, analizuojami žmogaus arba gyvūno kraujo serumai. Viruso baltymams nustatyti kraujo serume naudojami specifiški virusui antikūnai, kurie imobilizuojami plokštelėse. Taip išgaudomi viruso baltymai, o reakcija ryškinama fermentinėmis žymėmis žymėtais antikūnais (dviepitopės IFA modelis) (Xu *et al.* 2007). Antikūnai, susidarę viruso infekcijos metu, nustatomi kraujo serumo mėginyje netiesioginės IFA metodu. Šiems tyrimams atlikti pakanka keleto valandų, o rezultatai būna tikslūs. Tačiau šie metodai kol kas nėra pritaikyti visiems lisavirusų šeimos virusams nustatyti. Dažniausiai šie metodai naudojami klasikinio pasiutligės viruso (1 genotipo) infekcijos diagnostikai.

Pasiutligės virusui nustatyti gali būti naudojami AT-PGR ir kiekybinės PGR metodai. Jie yra specifiški ir pasižymi dideliu jautrumu (Rojas *et al.* 2006; Wacharapluesadee *et al.* 2008).

## 1.5. Rekombinantinių virusinių baltymų sintezė mielėse

Žmogaus ligas sukeliantys virusai natūraliai dauginasi tik žinduolių ląstelėse. Heterologinėse raiškos sistemose, pvz. bakterijose, gauti rekombinantiniai viruso baltymai gali skirtis nuo natūralių viruso baltymų savo struktūra ir antigeninėmis savybėmis dėl juos sintetinančių ląstelių įtakos baltymo brendimui ar kitiems biosintezės etapams. Taikant virusų baltymus diagnostikai, svarbu, kad rekombinantinio baltymo struktūra kuo tiksliau atitiktų natūralų viruso baltymą. Rekombinantiniai virusų baltymai, susintetinti žinduolių ląstelių kultūrose, dažniausiai atitinka šį reikalavimą. Tačiau tokios raiškos sistemos yra gana sudėtingos, brangios, todėl sunku gauti didelę baltymo išeigą. Ieškoma būdų gauti didesniems virusinių rekombinantinių baltymų kiekiams, nes plačiai paplitusių infekcinių ligų diagnostikai ir prevencijai reikalingi dideli antigenų kiekiai (Antoniukas *et al.* 2006). Svarbu, kad rekombinantinis viruso baltymas išsaugotų savo antigeninę struktūrą.

Mikroorganizmai dauginasi greitai, todėl nesunku užauginti didelę ląstelių biomasę. Lengviausia kultivuoti prokariotinius mikroorganizmus – bakterijas, todėl juose yra išbandyta beveik visų virusų grupių baltymų biosintezė. Nustatyta, kad bakterijų susintetinti virusų baltymai neturi kai kurių būdingų savybių, todėl jų panaudojimas gali būti ribotas. Pvz. rekombinantinis tymų viruso N baltymas, išskirtas iš *E.coli*, buvo blogas diagnostinis reagentas, lyginant su rekombinantiniais N baltymais, išskirtais iš vabzdžių ir žinduolių ląstelių (Warnes *et al.* 1994). Kadangi bakterijos, kaip virusinių baltymų

producentas, dažnai yra netinkamas, dėmesys nukrypo į paprasčiausius eukariotinius mikroorganizmus, tokius, kaip mielės.

Mielės *Saccharomyces cerevisiae* – saugūs, nepatogeniški mikroorganizmai. Tai – geriausiai genetikos, molekulinės biologijos ir fiziologijos požiūriu ištirti eukariotai, plačiai naudojami heterologinių genų raiškai. Mielės gerai auga ant nebrangių terpių, mielių baltymų sekrecijos keliai ir potransliacinės modifikacijos (proteolitinis brendimas, disulfidinių jungčių formavimasis, glikozilinimas) panašios į aukštesniųjų eukariotų, jos neturi endotoksinų, yra nepavojingos žmogui. Iki šiol mielėse yra susintetinta daug įvairių virusų baltymų, padedančių *in vitro* ir *in vivo* tirti įvairias baltymų sąveikas bei pasižyminčių natyviam virusui būdingomis antigeninėmis savybėmis, kas yra labai svarbu vakcinų bei diagnostinių sistemų kūrimui. Nustatyta, kad mielių raiškos sistemoje kai kurie virusų baltymai geba formuoti struktūras, panašias į natūralaus viruso, todėl šie baltymai tinka imunodiagnostikai (Ražanskienė *et al.* 2004; Slibinskas *et al.* 2004; Juozapaitis *et al.* 2005, 2007a ir b, 2008; Petraitytė *et al.* 2009).

Naudojant mielėse susintetintus baltymus kuriamos įvairios diagnostinės sistemos. D. Samuel'iui ir kolegoms pavyko sukurti metodus, skirtus ankstyvai tymų ir kiaulytės virusų infekcijų diagnostikai, naudojant mielėse sintetintus N baltymus. Hantavirusų infekcijos diagnostikai buvo sukuri netiesioginės ir antikūnus „išgaudančios“ IFA metodai, taip pat panaudojant mielėse sintetintus N baltymus (Schmidt *et al.* 2005, 2006; Petraitytė *et al.* 2007, 2008). Paukščių gripo infekcijai nustatyti viščiukų kraujo serumuose naudojamas netiesioginės IFA metodas, kurio pagrindą sudaro mielėse sintetinti paukščių gripo viruso N ir HN baltymai (Upadhyay *et al.* 2009).

Reikia pažymėti, kad pirmoji rekombinantinė vakcina, skirta kovai prieš žmogaus hepatitą B ir gauta mielių *S.cerevisiae* raiškos sistemoje (Makela 2000), šiuo metu užkariavo pasaulio rinką – šios vakcinos jau panaudota milijonai dozių (Venters *et al.* 2004).

## 1.6. Monokloniniai antikūnai ir jų taikymas virusinių infekcijų diagnostikai

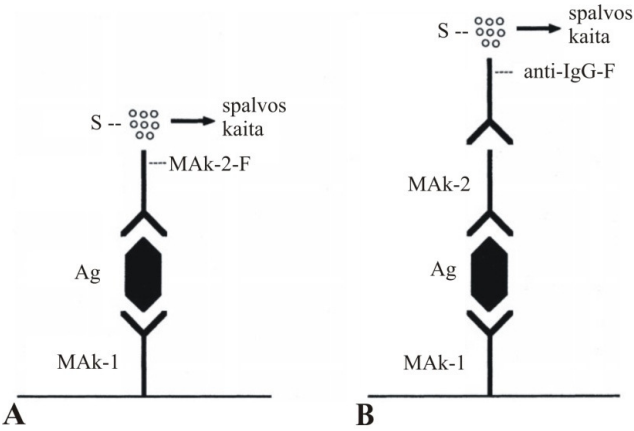
Monokloniniai antikūnai (MAk) plačiai naudojami kaip tikslūs imunocheminiai reagentai virusinių infekcijų diagnostikai, nustatant virusinius antigenus arba virusui specifiškus antikūnus. Tiesioginis virusų arba atskirų jų antigenų nustatymas kraujo, kūno išskyrų, audinių mėginiuose yra tikslus ir patikimas metodas, diagnozuojant virusinius susirgimus. IF ir IH metodai plačiai naudojami diagnostinėse laboratorijose, tiesiogiai nustatant virusus infekuotame audinyje ar citologiniame mėginyje. Naudojant antikūnus, audiniuose tiesiogiai

nustatomas pasiutligės virusas (http://www.cdc.gov/rabies/diagnosis/direct_fluorescent_antibody.html). Atliekant plaučių, širdies ar kitų organų transplantaciją, kvėpavimo takų išskyrose IF metodu nustatomas herpes paprastasis virusas (angl. *herpes simplex virus*) (Engelmann *et al.* 2010). Vaikams pavojingo kvėpavimo takų viruso hRSV infekcija diagnozuojama tiesioginės IF metodu kvėpavimo takų išskyrose ir nuoplovose (Borek *et al.* 2006).

Dviepitopės IFA metodas taikomas tiesiogiai nustatant virusų antigenus kraujyje ir kūno skysčiuose. Juo nustatomi virusų antigenai ląstelės paviršiuje arba citologinio mėginio skystojoje fazėje. Dviepitopės IFA pagrindinis komponentas – skirtingas virusinio baltymo determinantes (epitopus) atpažįstantys MAk (1.8 pav.). Specifiški viruso baltymui MAk imobilizuojami imunofermentinės analizės (IFA) plokštelėje. Tiriamajame mėginyje esantys viruso antigenai selektyviai sąveikauja su imobilizuotais MAk ir gali būti nustatomi, naudojant antrinius antikūnus. Tiesioginėje dviepitopėje IFA antriniais antikūnais naudojami MAk, žymėti fermentine žyme ir atpažįstantys skirtingą tiriamo viruso baltymo epitopą nei imobilizuotieji antikūnai (1.8 A pav.). Netiesioginės dviepitopės IFA atveju būtina antrinių antikūnų ir fermentine žyme žymėtų tretinių antikūnų sąveika (1.8 B pav.). Šiuo metu klinikinių tyrimų laboratorinėje praktikoje dviepitopės IFA metodas taikomas nustatant hRSV, gripo virusų, rotaviruso, adenovirusų, hepatito B viruso bei žmogaus imunodeficito viruso antigenus (Knipe ie Howley 2007). Pavyzdžiui, buvo sukurtas žmogaus imunodeficito pirmo tipo viruso kapsidės p24 baltymo kiekybinis nustatymo metodas (Liu *et al.* 2007).

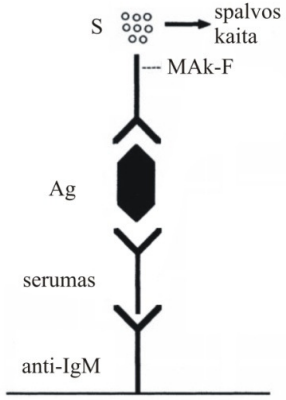
Daugelio virusų infekcijos diagnostika siejama su IgM ir IgG antikūnų nustatymu kraujo arba seilių mėginiuose. Žinoma nemažai metodų antikūnams prieš virusus nustatyti, tačiau tokie metodai, kuriuose naudojami monokloniniai antikūnai, sutinkami rečiau. Ankstyvajai viruso infekcijai nustatyti gali būti naudojama IgM „išgaudanti“ IFA (1.9 pav.). Jos metu serume esančius IgM klasės antikūnus išgaudo antikūnai prieš žmogaus IgM (anti-IgM). Pridėjus viruso antigenų, pastarieji specifiškai jungiasi prie IgM, susidariusių prieš viruso antigenus. Reakcija išryškinama fermentu žymėtais antikūnais prieš viruso antigenus.

IgM „išgaudanti“ IFA buvo sėkmingai pritaikyta IgM klasės antikūnų prieš tymų, kiaulytės virusus, hantavirusus nustatymui (Samuel *et al.* 2002, 2003; Schmidt *et al.* 2005; Petraitytė *et al.* 2007). Lyginant su netiesiogine IFA, kai tiriama serume esančių IgM sąveika su viruso antigenu, imobilizuotu plokštelėje, ši serologinio metodo modifikacija pasižymi didesniu specifiškumu, žymiai mažesniu reakcijos fonu.




**1.8 pav.** Dviepitopės IFA modeliai (Knipe ir Howley 2007). (**A**) Tiesioginė dviepitopė IFA. (**B**) Netiesioginė dviepitopė IFA

**Fig. 1.8.** The models of double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (Knipe and Howley 2007). (**A**) Direct. (**B**) Indirect




**1.9 pav.** IgM antikūnus „išgaudančios“ IFA modelis (Knipe ir Howley 2007)

**Fig. 1.9.** The model of IgM-capture enzime-linked immunosorbent assay (Knipe and Howley 2007)

Virusinės infekcijos neatsiejamos nuo kasdieninio gyvenimo. Virusų, keliančių pavojų žmogaus gyvybei sąrašą papildo vis nauji virusai, todėl MAk kūrimas ir jų taikymas kuriant naujas diagnostines sistemas labai svarbus. Be to, antikūnų rinkos ekspertų duomenimis, MAk buvo vienas dažniausiai naudojamų molekulinių įrankių 2008 m., o diagnostiniai MAk sudarė net 20 % visų parduodamų antikūnų (Biocompare 2009). Taigi, MAk yra vertingi diagnostiniai įrankiai, padedantys nustatyti virusinę infekciją.

## 1.7. Pirmojo skyriaus apibendrinimas ir disertacijos uždavinių formulavimas

Paramiksovirusai, hantavirusai ir lisavirusai yra plačiai paplitę ir sukelia sunkias infekcines ligas, todėl reikalingi tikslūs ir efektyvūs diagnostikos metodai bei efektyvios vakcinos, padedančios išvengti infekcijos.

MAk yra vertingi diagnostiniai reagentai, padedantys nustatyti virusinę infekciją. Dauguma aprašytų antikūnų, specifiškų virusų baltymams, buvo sukurti naudojant nukenksmintus virusus. Rekombinantinių virusinių baltymų – antigenų paruošimas ir naudojimas MAk gavimui yra paprastesnis ir saugesnis nei virusų kultivavimas ir gryninimas.

Paramiksovirusams, hantavirusams ir lisavirusams infekavus ląstelę, N baltymo susidaro gausiai. Taip pat šių virusų N baltymai sukelia stiprų humoralinį imuninį atsaką infekcijos metu. Dėl šių priežasčių rekombinantiniai, mielėse susintetinti virusų N baltymai yra geri diagnostiniai reagentai ir puiki priemonė MAk kurti.

Todėl, šio disertacinio darbo tikslas buvo ištirti rekombinantinių hPIV3, Menangle viruso, hantavirusų ir pasiutligės viruso imunogenines savybes ir sukurti monokloninius antikūnus prieš šiuos baltymus, siekiant juos pritaikyti virusų nustatymui infekuotose ląstelėse, bei virusinių baltymų antigeninei struktūrai tirti.

Darbo tikslui pasiekti buvo suformuluoti šie uždaviniai:

1. Ištirti rekombinantinių virusinių baltymų – hPIV3, Menangle viruso, hantavirusų bei pasiutligės viruso nukleokapsidės baltymų – imunogeniškumą ir sukurti hibridomas, gaminančias monokloninius antikūnus prieš šiuos baltymus;

2. Ištirti sukurtų monokloninių antikūnų specifiškumą, kryžmines reakcijas, sugebėjimą atpažinti natyvius virusus infekuotose ląstelėse ir įvertinti jų diagnostinį potencialą;

3. Naudojant sukurtuosius monokloninius antikūnus ir antiserumus, susidariusius natūralios infekcijos metu, ištirti virusinių baltymų antigenines savybes ir identifikuoti imunodominuojančius epitopus.

# 2

# Medžiagos ir tyrimo metodai

## 2.1. Medžiagos

### 2.1.1. Reagentai

Akrilamidas; *N,N'*-metilenbisakrilamidas; hipoksantinas, aminopterinas, timidinas (HAT); hipoksantinas, timidinas (HT); L-glutaminas; natrio perjodatas; pilnas Freund'o adjuvantas (PFA); nepilnas Freund'o adjuvantas (NFA); polietilenglikolis/dimetilsulfoksidas (PEG/DMSO); pristanas ; *3',5,5'*-tetrametilbenzidinas (TMB) – peroksidazės substratas imunoblotingui; Tris bazė; Kumasi dažas R-250; 4-chlornaftolis; ampicilinas; etidiumbromidas; natrio borhidridas (Sigma, JAV).

Acto rūgštis; dinatrio hidrofosfatas; druskos rūgštis; gentamicino sulfatas; glicinas; kalio chloridas; kalio dihidrofosfatas; natrio chloridas; natrio hidrokarbonatas; natrio šarmas; natrio dodecilsulfatas (NDS); kalio chloridas; sieros rūgštis; tvinas 20; želatina; *N,N,N`,N`*-tetrametiletilendiaminas (TEMED); glicinas; peroksidas; polivinilidenfluorido (PVDF) membrana; peptonas; mielių ekstraktas; etilendiamintetraacto rūgštis (EDTA); Tris acetatas; chloroformas/fenolis (1:5) (Roth, Vokietija).

Dulbecco modifikuota Eagle terpė (angl. *Dulbeccos' modified Eagle's medium – DMEM*)), fetalinis veršiuko serumas (FVS) (Biochrom, Vokietija).

Amonio peroksosulfatas; avidinas (Fluka, Šveicarija).

Etanolis (Vilniaus degtinė, Lietuva).

Jaučio serumo albuminas (JSA) (LabClinics, Ispanija).

Metanolis (Scharlau, ES).

TMB peroksidazės substratas imunofermentinei analizei (Clinical Science products Inc., JAV).

Agarozė; ditiotreitolis (DTT) (UAB Fermentas, Lietuva).

Agaras (MERCK, Vokietija).

### 2.1.2. Antigenai

Darbui buvo naudojami rekombinantiniai baltymai, gauti iš Biotechnologijos instituto (BTI) Eukariotų genų inžinerijos skyriaus (EGIS):

- paragripo pirmo tipo viruso rekombinantinis N baltymas (hPIV1 rN);
- paragripo trečio tipo viruso rekombinantinis N baltymas (hPIV3 rN);
- žmogaus sincitinio kvėpavimo takų viruso rekombinantinis N baltymas (hRSV rN);
- tymų viruso rekombinantinis N baltymas (MeV rN);
- Menangle viruso rekombinantinis N baltymas (MenV rN);
- Tioman viruso rekombinantinis N baltymas (TioV rN);
- Hendra viruso rekombinantinis N baltymas (HeV rN);
- Nipah viruso rekombinantinis N baltymas (NiV rN);
- Andes hantaviruso rekombinantinis N baltymas (ANDV rN);
- Sin Nombre hantaviruso rekombinantinis N baltymas (SNV rN);
- Puumala hantaviruso (PUUV), Vranica/Hällnäs atmainos rekombinantinis N baltymas (PUUV-Vra rN);
- PUUV, Kazan atmainos rekombinantinis N baltymas (PUUV-Kaz rN);
- PUUV, Sotkam atmainos rekombinantinis N baltymas (PUUV-Sot rN);
- Hantaan hantaviruso (HTNV), Fojnica atmainos rekombinantinis N baltymas (HTNV-Foj rN);
- Dobrava hantaviruso (DOBV), Slovenia atmainos rekombinantinis N baltymas (DOBV-Slo rN);
- Seulo hantaviruso rekombinantinis N baltymas (SEOV rN);
- klasikinio pasiutligės viruso rekombinantinis N baltymas (RABV rN);

▪ Europos šikšnosparnių pirmo tipo lisaviruso rekombinantinis N baltymas (EBLV-1 rN);

▪ Europos šikšnosparnių antro tipo lisaviruso rekombinantinis N baltymas (EBLV-2 rN);

▪ chimerinis baltymas, žiurkėno poliomos viruso (HaPyV) pagrindinio kapsidės baltymo VP1 pagrindu, su įterptu PUUV-Vra N baltymo 1–120 ar. fragmentu (HaPyVP1/1–120);

▪ chimerinis baltymas, HaPyV pagrindinio kapsidės baltymo VP1 pagrindu, su įterptu PUUV-Vra N baltymo 1–80 ar. fragmentu;

▪ chimerinis baltymas, HaPyV pagrindinio kapsidės baltymo VP1 pagrindu, su įterptu PUUV-Vra N baltymo 1–45 ar. fragmentu;

▪ netransformuotų mielių ląstelių grubus lizatas.

### 2.1.3. Monokloniniai, polikloniniai antikūnai, serumai

hPIV infekuotų vaikų kraujo serumų mėginiai buvo gauti iš dviejų institucijų: Vilniaus universiteto vaikų ligoninės Pediatrijos skyriaus bei *de Salud Carlos III Institute* (Ispanija).

Vakcinuotų eksperimentinių ir laukinių gyvūnų serumų rinkiniai bei MAk prieš natyvių pasiutligės virusų N baltymus rinkinys, buvo gauti iš *Friedrich Loeffler Institute* (Vokietija).

HAM – MAk prieš klasikinio pasiutligės viruso N baltymą buvo gauti iš Šveicarijos Pasiutligės Centro.

MAk prieš raguočių parazito *Neospora caninum* nežinomą paviršiaus baltymą buvo gauti iš *Friedrich Loeffler Institute* (Vokietija).

Darbe buvo naudojami ožkos polikloniniai antikūnai prieš gliutation-S transferazę (GST) (GE Healthcare, Vokietija), peroksidaze žymėti antikūnai prieš pelės IgG (BioRad, JAV), fluoresceino izotiocianatu (FITC) žymėti antikūnai prieš palės IgG (BD Biosciences Pharmingen, JAV).

### 2.1.4. Rinkiniai

Netiesioginės IF rinkiniai:

▪ *Progen indirect immunofluorescence kit*, IF rinkinys, kurį sudaro: PUUV (atmaina Hällnäs B1 83-223L), HTNV (atmaina 76-118), SEOV (atmaina R22) infekuotos, stiklelių paviršiuje fiksuotos *Vero 6* linijos ląstelės (Progen Biotechnik, Vokietija);

▪ *Euroimmun FB 0866-0110 kit*, IF rinkinys, kurį sudaro: PUUV (atmaina Sotkamo), DOBV (atmaina Slovenia), Saaremaa virusu, SEOV, HTNV, SNV infekuotos, mikrogardelių reakcijų laukelių paviršiuje fiksuotos *Vero 6* linijos ląstelės (Euroimmun, Vokietija);

▪ *Hantavirus Mosaic 1*, IF rinkinys, kurį sudaro: PUUV (atmaina Kazan p21), DOBV (atmaina Slovenia), Saaremaa virusu, SEOV (atmaina p33 2227), HTNV(atmaina 76-118), SNV (atmaina p6) infekuotos, mikrogardelių reakcijų laukelių paviršiuje fiksuotos, *Vero 6* linijos ląstelės (Euroimmun, Vokietija);

▪ *Mosaic: Paraifluenza virus Types 1–4*, IF rinkinys, kurį sudaro: hPIV1, hPIV2, hPIV3, hPIV4a ir hPIV4b infekuotos, mikrogardelių reakcijų laukelių paviršiuje fiksuotos, *Vero 6* linijos ląstelės (Euroimmun, Vokietija).

*Monoclonal Antibody isotyping Kit (HRP/ATBS)*, rinkinys pelės monokloninių antikūnų klasėms nustatyti (Pierce, JAV).

*Parainfluenza 1/2/3 IgG ELISA*, netiesioginės IFA rinkinys IgG klasės antikūnams prieš hPIV1, hPIV2 ir hPIV3 virusus nustatyti (IBL, JAV);

*CloneJET™ PCR Cloning Kit*, rinkinys DNR fragmentų ligavimui į klonavimo vektorių (UAB Fermentas, Lietuva).

*DNA Extraction Kit*, rinkinys DNR išskyrimui iš agarozės (UAB Fermentas, Lietuva).

*GeneJET pasmid Miniprep Kit*, rinkinys plazmidžių išskyrimui (UAB Fermentas, Lietuva).

### 2.1.5. Plazmidės ir pradmenys PGR amplifikacijos reakcijai

hPIV3 ir RABV N baltymų genų fragmentų raiškai *E.coli* buvo naudojama pGEX-KT plazmidė (Amersham, Suomija).

Pradmenys PGR amplifikacijos reakcijoms buvo gauti iš Metabion (Vokietija) ir Eurofins (Belgija).

### 2.1.6. Fermentai

*Taq* DNR polimerazė; *Pfu* ir *Taq* DNR polimerazių mišinys santykiu 1:10; T4 DNR ligazė; RNazė A; restrikcijos endonukleazės: EcoRI, BamHI, Mva 1269I, Bsp 119I, MunI, XmaJI buvo gauti iš UAB Fermentas (Lietuva).

Antikūnų žymėjimui buvo naudojama krienų peroksidazė (Merck, JAV).

### 2.1.7. Molekulinės masės standartai

DNR fragmentų agarozės gelyje standartai (UAB Fermentas, Lietuva):

- *MassRuler™ Mix*;
- *GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder*.

Baltymų molekulinio svorio standartas: *PageRuler™ Prestained Protein Ladder Mix* (UAB Fermentas, Lietuva).

### 2.1.8. Buferiniai ir kiti tirpalai

IFA buvo naudojami šie tirpalai:

Imobilizacijos buferinis tirpalas: 0,05 M Natrio hidrokarbonato (pH 9,5).

Fosfatinis buferinis tirpalas (PBS): 0,1 M fosfatinis buferinis tirpalas su 0,15 M NaCl, (pH 7,2).

JSA/PBS: 1,0 % (w/v) JSA, ištirpintas PBS.

PBST: PBS su 0,1 % (v/v) tvino 20.

Baltymų elekroforezei poliakrilamido gelyje denatūruojančiomis sąlygomis buvo naudojami šie tirpalai:

Akrilamido/bisakrilamido tirpalas: 30 % (w/v) akrilamido, 0,8 % N,N'-metilenbisakrilamido.

4 kartus koncentruotas Tris-HCl/NDS (pH 8,8): 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), 0,4 % (w/v) NDS.

4 kartus koncentruotas Tris-HCl/NDS (pH 6,8): 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,4 % (w/v) NDS.

Amonio peroksosulfato tirpalas: 10 % (w/v) amonio peroksosulfato.

Koncentruojančio gelio tirpalas (4 % akrilamido): 13 % (v/v) akrilamido/bisakrilamido tirpalo, 25 % 4 kartus koncentruoto Tris-HCl/NDS (pH 6,8), 0,5 % amonio peroksosulfato tirpalo, 0,1 % TEMED.

Skirstomojo gelio tirpalas (12 % akrilamido): 40 % (v/v) akrilamido/bisakrilamido tirpalo, 25 % 4 kartus koncentruoto Tris-HCl/NDS (pH 8,8), 0,33 % amonio peroksosulfato tirpalo, 0,066 % TEMED.

Baltymų mėginio užnešimo buferinis tirpalas (UAB Fermentas, Lietuva).

Baltymų elektroforezės buferinis tirpalas (UAB Fermentas, Lietuva).

Baltymų elektroforezės gelio dažas: 40 % (v/v) etanolio, 10 % acto rūgšties, 0,1 % Coomasie blue R-250 dažo.

Gelių plovimo tirpalas: 5 % (v/v) acto rūgštis.

Imunoblotingo ir taškinio imunoblotingo tirpalai:

Baltymų pernašos buferinis tirpalas: 0,025 M Tris, 0,15 M glicino, 10 % (v/v) metanolio.

Membranos blokavimo tirpalas: PBS su 1 % (w/v) želatinos.

Membranos plovimo tirpalas – PBST.

Membranos ryškinimo tirpalas: 0,05 % (v/v) 4-chlornaftolio, 16 % metanolio, 0,02 % šalto peroksido, PBS tirpale.

Mitybinių terpių sudėtys:

Hibridomų ir Sp2/0 ląstelių augimo terpė: DMEM terpė su 2 mM L-glutamino, 200 µg/ml gentamicino, 10–15 % (v/v) FVS.

Neseruminė terpė: DMEM terpė su 2 mM L-glutamino, 200 µg/ml gentamicino.

HAT terpė: augimo terpė su $1\cdot10^{-4}$ M hipoksantino, $4\cdot10^{-7}$ M aminopterino, $1{,}6\cdot10^{-5}$ M timidino.

HT terpė: augimo terpė su $1\cdot10^{-4}$ M hipoksantino, $1{,}6\cdot10^{-5}$ M timidino.

*E. coli* augimo terpė (LB): 1 % (w/v) peptono, 0,5 % mielių ekstrakto, 1 % NaCl. Jei su antibiotiku, tai ampicilino koncentracija 5–100 µl/ml.

Agarizuota LB terpė – 2 % (w/v) agaro, 1% peptono, 0,5 % mielių ekstrakto, 1 % NaCl.

*E.coli* kompetentinių ląstelių ruošimui buvo naudojami šie tirpalai:

NaCl tirpalas: 5 mM Tris-HCl (pH 7,4–8,0), 5 mM $MgCl_2$, 100 mM NaCl.

$CaCl_2$ tirpalas: 5 mM Tris-HCl (pH 7,4–8,0), 5 mM $MgCl_2$, 100 mM $CaCl_2$.

Transformacijai ruošiami sterilūs tirpalai.

DNR elektroforezės tirpalai

Tris acetatinis elektroforezės buferinis tirpalas (TAE) (pH 8,3): 0,04 M Tris acetato, 1 mM EDTA (pH 8,0).

Agarozės tirpalai: 0,8 % (w/v), 1 %, 1,5 % agarozės TAE buferyje.

Etidiumbromido tirpalas: 10 mg/ml etidiumbromido.

### 2.1.9. Eksperimentiniai gyvūnai

Eksperimentams buvo naudojamos BALB/c linijos pelės, gautos iš Imunologijos instituto (dabartinio Inovatyvios medicinos centro) (Vilnius). Pelės buvo sveikos, neužkrėstos virusinėmis ar bakterinėmis infekcijomis.

### 2.1.10. Ląstelės, mikroorganizmų kamienai

Hibridomų kūrimui naudota Sp2/0 ląstelių linija. Ši ląstelių linija negamina imunoglobulinų. Dėl timidinkinazės (TK) ir hipoksantinguaninfosforibozil-transferazės (HGFET) genų mutacijų šios ląstelės neauga selektyvioje HAT terpėje (Shulman *et al.* 1978).

*E. coli* kamienai naudoti plazmidžių konstravimui:

- DH5α ($F^-$gyrA96($Nal^r$) recA1 relA1endA1 thi-1 hsdR17 ($r_k^-m_k^+$) glnV44 deoR Δ(lacZYA-argF) U169 (φ80dΔ(lacZ)M15)).
- DH10B ($F^-$ end A1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL ΔlacX74 Φ80lacZΔM15 araD139 Δ(ara,leu)7697 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) $\lambda^-$ ).

## 2.2. Metodai

### 2.2.1. Hibridomų ir monokloninių antikūnų gavimas

Pagrindiniai MAk kūrimo etapai yra šie: BALB/c pelių imunizacija; mielomos ląstelių kultivavimas; ląstelių hibridizacija, selekcija, klonavimas; MAk specifiškumo įvertinimas, antikūnų klasių nustatymas; MAk gryninimas; hibridomų šaldymas.

#### 2.2.1.1. Imunizacija

Imunizacijai naudojamos 6–8 savaičių BALB/c linijos pelės, auginamos Imunologijos institute (dabartiniame Inovatyvios medicinos centre) (Vilnius) linijinių pelių kolonijoje. Kiekvienu rekombinantiniu baltymu imunizuojama po 3 peles. Pelės imunizuojamos 3 kartus kas 28 dienas, atliekant poodinę injekciją. Pirmajai imunizacijai pelėms suleidžiama po 50 μg kiekvieno antigeno, ištirpinto PBS (n = 3) ir suspenduoto lygiame tūryje pilno Freundo adjuvanto (PFA), (n = 3). Po pirmosios imunizacijos praėjus 28 dienoms, tos pačios grupės pelės toliau imunizuojamos tokiomis pat antigenų dozėmis (50 μg pelei),

atitinkamai ištirpintų PBS ir emulguotų su nepilnu Freundo adjuvantu (NFA). Po 56 dienų pelės imunizuojamos be adjuvantų, naudojant tą pačią antigeno dozę. Kraujo pavyzdžiai surenkami po kiekvienos imunizacijos, užšaldomi ir saugomi -20 $^{o}$C iki antikūnų titro nustatymo. Antikūnų prieš antigeną titras nustatomas netiesioginės IFA metodu. Pelė, kurios kraujyje specifiškų antikūnų titras didžiausias, tris dienas prieš hibridizaciją dar sykį imunizuojama 50 µg antigeno, ištirpinto PBS.

### 2.2.1.2. Ląstelių suliejimas

Hibridomoms gauti naudojama Sp2/0 mielomos ląstelių linija. Iki hibridizacijos ląstelės persėjamos 3 kartus, DMEM ląstelių augimo terpėje su 10 % FVS. Suliejimui naudojamos gyvos, vienodo dydžio ląstelės, esančios logaritminėje augimo fazėje.
Prieš hibridizaciją mielomos ląstelės suspenduojamos augimo terpėje ir centrifuguojamos 5 min. 1000 aps./min. greičiu. Terpė nupilama, o ląstelės suspenduojamos 25 ml DMEM augimo terpėje. Antigenu imunizuotos pelės blužnis išimama sterilioje aplinkoje ir suspenduojama 5 ml DMEM terpėje be serumo. Blužnies ląstelių suspensiją centrifuguojama 1000 aps./min. greičiu, 7 min. Terpė nupilama ir blužnies ląstelės suspenduojamos 10 ml augimo terpėje. Blužnies ląstelės suspenduojamos kartu su mielomos ląstelėmis santykiu nuo 1:3 iki 1:10. Tada ląstelės vėl centrifuguojamos 1 min. 1000 aps./min. greičiu, nucentrifugavus supernatantas nupilamas, o ląstelės atsargiai purtant suspenduojamos 1 ml PEG–4000 ir 10 % DMSO tirpale terpėje be serumo. Po 3 min. inkubacijos ląstelių suspensija po truputį skiedžiama, lėtai sulašinant beseruminę terpę. Terpės pripilama iki 50 ml ir vėl centrifuguojama. Nuosėdos suspenduojamos jau paruoštoje HAT terpėje ir išsėjamos į sterilias audinių kultūroms skirtas 96 šulinėlių plokšteles, po 200 µl ($150\cdot10^5$ ląstelių) į šulinėlį.

Makrofagai yra labai svarbus komponentas suliejimo technologijoje. Šios ląstelės sudaro palankias sąlygas sulietų ląstelių auginimui, taip pat yra aktyvūs fagocitai. Nesusiliejusios mielomos ląstelės dėl aminopterino veikimo pradeda žūti, praėjus kelioms dienoms po hibridizacijos. Makrofagai pradeda fagocituoti jų nuolaužas ir atsirandantys klonai tampa daug geriau pastebimi. Hibridizacijos metu makrofagai surenkami iš pilvo ertmės, pradūrus peritoniumą ir į pelės pilvo ertmę suleidus 4–5 ml beseruminės terpės, suspenduojant ir ją išsiurbiant. Taip pilvo ertmė praplaunama du kartus. Paimti makrofagai nucentrifuguojami ir suskaičiuojami. Į 96 šulinėlių plokštelės vieną šulinėlį turi patekti apie $1\cdot10^3$ ląstelių. Makrofagai sumaišomi su sulietomis blužnies ir mielomos ląstelėmis, toks ląstelių mišinys išpilstomas į plokšteles po $2\cdot10^5$ ląstelių į šulinėlį.

### 2.2.1.3. Hibridinių ląstelių selekcija ir klonavimas

Praėjus 10 dienų nuo ląstelių suliejimo, mikroskopu peržiūrimi visi plokštelių šulinėliai ir pažymimi tie, kuriuose auga klonai. Klonai testuojami netiesioginės IFA metodu – kaip neigiama kontrolė naudojama terpė iš šulinėlio, kuriame nebuvo pastebėtas ląstelių augimas. Teigiamai kontrolei naudojamas imunizuotos pelės kraujo serumas, paimtas hibridizacijos dieną. Teigiamais klonais laikomi tie, kurių terpės mėginio optinis tankis (OT) yra didesnis už neigiamos kontrolės.

Siekiant gauti vieno klono ląsteles, hibridomos klonuojamos. Ląstelių suspensija atskiedžiama taip, kad pasėję į 96 šulinėlių plokšteles, vienoje duobutėje gautume vieną hibridomų kloną. Teigiami klonai klonuojami plokštelėse, užsėtose makrofagais. Po 6–5 dienų peržiūrimos plokštelės ir atrenkami klonai, augantys po vieną.

Netiesioginės IFA metodu atrinkti teigiami klonai, padauginami 24 šulinėlių plokštelėse. Tolesniam ląstelių, sekretuojančių MAk, dauginimui ir pačių monokloninių antikūnų gavimui ląstelės perkeliamos į 50 ml indus (*in vitro*) arba suleidžiamos į pelės pilvo ertmę (*in vivo*).

### 2.2.1.4. Ląstelių šaldymas ir atšildymas

Ląstelių suspensija centrifuguojama 5 min. 1000 aps./min. greičiu. Supernatantas nupilamas, ląstelių masė suspenduojama šaltoje +4 °C šaldymo terpėje. Tokia ląstelių suspensija išpilstoma į plastikines šaldymo ampules, kurios iš karto dedamos į specialias dėžutes ir į -70 °C šaldiklį. Kai ampulių turinys sušąla, jos perkeliamos į skystą azotą ilgalaikiam saugojimui.

Atšildant ląsteles, būtina jas atplauti nuo šaldymo terpės neseruminėje terpėje.

### 2.2.1.5. Hibridomų kultivavimas *in vivo*

BALB/c linijos pelės sensibilizuojamos, įleidžiant į pilvo ertmę 0,5 ml pristano. Po 4–10 dienų į pilvo ertmę suleidžiama 2–5 ml, $1 \cdot 10^4$–$1 \cdot 10^5$ ląst./ml koncentracijos hibridinių ląstelių suspensijos neseruminėje terpėje. Ascitas susiformuoja per 8–20 dienų. Ascitinis skystis iš pelės pilvo ertmės išsiurbiamas, naudojant automatini dozatorių, prieš tai prakirpus pelės kailiuką ir pradūrus peritoniumą.

### 2.2.1.6. Antikūnų gryninimas iš ascitinio skysčio

Ascitiniame skystyje MAk koncentracija yra pakankamai didelė (2–10 mg/ml) ir pašalinių baltymų kiekis santykinai yra labai mažas, todėl kelis kartus baltymus išsodinant amonio sulfatu pasiekiamas 80–90 % specifinių antikūnų švarumas. MAk precipitacijai reikalingas 45 % amonio sulfato tirpalo įsisotinimas. Ascitinis skystis sumaišomas su prisotintu amonio sulfato tirpalu santykiu 1:1. Inkubuojama apie valandą +4 °C. Susidariusios nuosėdos atskiriamos centrifuguojant 9000 aps./min. greičiu. Nuosėdos ištirpinamos PBS ir vėl pridėdama toks pats tūris 45 % sotaus amonio sulfato tirpalo. Taip kelis kartus išsodinti MAk išlieka stabilūs ilgą laiką (1–2 metus). Antikūnų suspensija saugoma +4 °C.

## 2.2.2. Baltymų tyrimo metodai

### 2.2.2.1. Elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje denatūruojančiomis sąlygomis

Baltymų elektroforezė vykdoma poliakrilamidiniamie gelyje, sudarytame iš baltymus koncentruojančios (4 % poliakrilamido) ir skiriamosios dalių (12 % poliakrilamido), baltymų elektroforezės buferiniame tirpale, esant 60 mA nuolatinės srovės stiprumui ir 200 V įtampai. Į paruošto poliakrilamidinio gelio takelį įnešama nuo 1 iki 5 µg baltymo. Prieš elekroforezę baltymai 5 kartus skiedžiami mėginio užnešimo buferiniu tirpalu ir 20 kartų redukuojančiu agentu. Taip paruošti baltymų mėginiai inkubuojami verdančio vandens vonioje 3–4 min. Elektroforezei pasibaigus, gelis fiksuojamas ir dažomas gelio dažymo tirpale (*Coomasie blue* R-250 dažu) per naktį. Gelis atplaunamas 10 % acto rūgšties tirpale.

### 2.2.2.2. Imunoblotingas (IB)

Po elektroforezės baltymų pernaša iš gelio ant polivinilidendifluorido (PVDF) membranos vykdoma pusiau sausos pernašos aparatu. Pernaša trunka 40 min., leidžiant 1–2,5 mA srovę, 1 $cm^2$ membranos ploto vienetui. Įvykus baltymų pernašai nuo gelio ant membranos, membrana blokuojama blokavimo buferiniu tirpalu 30 min. kambario temperatūroje. Visos IB reakcijos vykdomos kambario temperatūroje. Po to membrana inkubuojama su neskiesta hibridomų augimo terpe arba kraujo serumu (skiestu nuo 1:200 iki 1:1000 PBST) 2 val. Po

inkubacijos membrana plaunama 4 kartus PBST ir inkubuojama su peroksidaze žymėtais antikūnais prieš pelės IgG, 1 val. Po inkubacijos membrana 7–8 kartus plaunama PBST ir ryškinama TMB substratu, skirtu IB.

### 2.2.2.3. Taškinis imunoblotingas (TIB)

PVDF membrana sukarpoma 1,5 $cm^2$ kvadratais. Prieš antigeno adsorbciją membrana plaunama 5 min. PBS ir išdžiovinama. Kvadrato centre užlašinama 2 µl (0,1 mg/ml) antigeno, skiesto PBS. Taip paruošta membrana džiovinama 1 val. +37 ºC temperatūroje. Likusios stadijos (membranos laisvo paviršiaus blokavimo, inkubacijos su pirminiais ir antriniais antikūnais, membranos ryškinimas) vykdomos kaip ir IB (žiūrėti 2.2.2.2 skyrelį).

### 2.2.2.4. Netiesioginė imunofermentinė analizė (IFA)

Pirmiausia 96 šulinėlių plokštelėje sorbuojamas antigenas: į šulinėlius pilama po 100 µl antigeno tirpalo imobilizacijos buferiniame tirpale ir inkubuojama per naktį +4 $^{o}$C. Kitą dieną sorbcijos tirpalas iš šulinėlių iškratomas. Neišnaudotas šulinėlių paviršius blokuojamas, į šulinėlį pripilant 150 µl blokavimo tirpalo. Plokštelė inkubuojama 1 val. kambario temperatūroje. Blokavimo tirpalas iškratomas, į šulinėlius pilama 100 µl antikūnų mėginio. Priklausomai nuo mėginio formos, antikūnai skiedžiami PBST: kraujo serumai 1:200, ascitiniai skysčiai nuo 1:1 000 iki 1:100 000, hibridomų augimo terpės analizuojamos neskiestos. Nustatant antikūnų titrą, tiriamieji mėginiai skiedžiami daug kartų (nuo 1:100 iki 1:1 000 000), kol paskutinio skiedimo metu lieka minimalus kiekis antikūnų. Plokštelė su tiriamuoju mėginiu inkubuojama 1 val. kambario temperatūroje. Po inkubacijos plokštelė plaunama keturis kartus PBST. IgG atsakui nustatyti peroksidaze žymėti antriniai pelės IgG antikūnai skiedžiami remiantis gamintojo rekomendacijomis. Šio tirpalo įpilama po 100 µl į šulinėlį ir inkubuojama 1 val. Po inkubacijos plokštelė plaunama šešis kartus PBST. Fermentinė reakcija ryškinama apie 15 min. TMB substratu, pilant po 100 µl į šulinėlį. Reakcija sustabdoma, pridedant 50 µl 4 % $H_2SO_4$ tirpalo. Spektrofotometru (Tecan, Austrija) matuojamas OT, esant 450 nm bangos ilgiui. Rezultatai skaičiuojami, naudojant „Magelan“ (Austrija) kompiuterinę programą.

Monokloninių antikūnų tariamoji afiniškumo konstanta ($K_d$) nustatoma netiesioginės IFA metodu, pasitelkiant OT (450 nm) priklausomybės nuo antikūnų koncentracijos (M) titravimo kreives. Tariamoji $K_d$ atitinka tokią antikūnų koncentraciją (M), kuriai esant OT (450 nm) sumažėja perpus.

Antikūnų klasėms ir poklasėms nustatyti naudojamas pelės imunoglobulinų izotipavimo rinkinys. Jį sudaro antikūnai, specifiški kiekvienai pelės antikūnų klasei ir poklasei bei antikūnai prieš imunoglobulino molekulės κ ir λ lengvąsias grandines. Izotipai nustatomi netiesioginės IFA metodu pagal gamintojo rekomendacijas.

### 2.2.2.5. Epitopų nustatymas

MAk prieš hPIV3, Menangle viruso, hantavirusų ir pasiutligės viruso N baltymus epitopų lokalizacija tiriama IB arba netiesioginės IFA metodu, naudojant rekombinantinius N baltymų fragmentus arba chimerinius baltymus, turinčius N baltymų intarpus (Gedvilaitė *et al.* 2004). MAk prieš hPIV3 epitopo vieta buvo patikslinta IFA metodu, naudojant sintetinį peptidą, atkartojantį hPIV3 N baltymo ar. seką nuo 437 ar. iki 446 ar.

Pirmiausia 96 šulinėlių plokštelėje sorbuojamas avidinas: į šulinėlį įpilama po 100 µl tirpalo (2 µg/ml dejonizuotame $H_2O$) ir inkubuojama per naktį +37 $^oC$. Iškračius turinį, plokštelė blokuojama 1 val. blokavimo tirpalu, kurio įnešama 150 µl į šulinėlį. Plokštelė iškratoma ir plaunama 4 kartus PBST. Po plovimo į plokštelės šulinėlius pilama 100 µl sintetinio peptido (10 µg/ml) ir inkubuojama 1 val. +37 $^oC$. Po plovimo įnešama 100 µl tiriamojo antikūnų tirpalo ir inkubuojama 1 val. kambario temperatūroje. Analizei naudojama neskiesta hibridomų augimo terpė arba antiserumai, kurie skiedžiami PBST 1:200. Po inkubacijos su antikūnais plokštelė vėl plaunama. Likusios stadijos (inkubacija su antriniais antikūnais žymėtais peroksidze, imunofermentinės reakcijos ryškinimas) toliau vykdomos kaip netiesioginėje IFA (žiūrėti 2.2.2.4 skyrelį).

### 2.2.2.6. Konkurencinė IFA

Šis metodas naudojamas, siekiant nustatyti MAk atpažįstamų epitopų išsidėstymą baltymo molekulėje. Konkurencinės IFA procedūra šiek tiek skiriasi, priklausomai nuo to, ar konkurencijos metodu tiriami skirtingi MAk, ar skirtingų rūšių antikūnai (pelės ir žmogaus). Dauguma IFA stadijų (imobilizacija, blokavimas, ryškinimas) panašios į aprašytas 2.2.2.4 skyrelyje, išskyrus pavyzdžių skiedimų parinkimą bei jų įnešimo tvarką. Tiriant skirtingų MAk konkurenciją, po blokavimo ir plovimo pirmiausia į šulinėlį įnešama 50 µl nežymėtų antikūnų ir inkubuojama 1 val., po to, neiškračius tirpalo, įnešama 50 µl peroksidaze pažymėtų antikūnų, ir dar inkubuojama 1 val. Po to plokštelė plaunama ir ryškinama, kaip aprašyta 2.2.2.4 skyrelyje. Tiriant pelės ir žmogaus antikūnų konkurenciją, pirmiausia į šulinėlį įnešama 50 µl žmogaus antikūnų ir

inkubuojama 1 val., po to, neiškračius tirpalo, įnešama 50 µl pelės antikūnų, inkubuojama 1 val., atplaunama, pridedama peroksidze žymėtų antikūnų prieš pelės IgG ir inkubuojama dar 1 val. Po to plokštelė plaunama ir ryškinama, kaip aprašyta aukščiau. Abiem atvejais konkuruojančių antikūnų galutinis skiedimas parenkamas taip, kad OT reikšmė būtų lygi maždaug pusei maksimaliosios (pagal titravimo kreivę). Konkurencija stebima tuomet, kai šulinėlyje, kur buvo vykdoma konkurencija, OT yra sumažėjęs, lyginant su kontroliniu šulinėliu, kuriame vietoje konkuruojančių antikūnų buvo įpilta 50 µl PBST.

### 2.2.2.7. Netiesioginė imunofluorescencinė analizė (IF)

Darbe naudojamos iš anksto paruoštos mikrogardelės, kurių reakcijų laukeliai padengti atitinkamais virusais infekuotomis *Vero 6* linijos ląstelėmis (Euroimmun, Vokietija). Tiriamųjų antikūnų pavyzdžiai skiedžiami PBS. Jeigu naudojama hibridomų terpė, ji skiedžiama 1:1–1:50. Jei naudojama antikūnų amonio sulfato suspensija arba kraujo serumas, naudojami įvairūs skiedimai (nuo 1:100 iki1:5 000). Ant mikrogardelės reakcijos laukelio užnešame 25 µl tiriamojo pavyzdžio arba kontrolių. Inkubacija vykdoma 30 min. kambario temperatūroje. Po inkubacijos mikrogardelė staigiu judesiu nupurtoma ir plaunama rezervuare, pripildytame PBST, inkubuojant 5 min. Po plovimo, į atitinkamą reakcijos laukelį užlašinama po 20 µl paruošto (25 µg/ml) FITC žymėtų antikūnų prieš pelės IgG tirpalo. Inkubacija vykdoma 30 min. tamsoje, kambario temperatūroje. Po inkubacijos mikrogardelė staigiu judesiu nupurtoma ir plaunama 2 kartus PBST inkubuojant po 5 min. ant purtyklės. Ant nusausintos mikrogardelės kiekvieno reakcijos laukelio užlašinama 10 µl glicerolio, uždedamas dengiamasis stiklelis. Rezultatai vertinami fluorescensiniu mikroskopu (Olimpus IX70, Japonija), naudojant 200, 400 kartų padidinimą. FITC fluorescensija stebima, esant 492 nm bangos ilgiui.

### 2.2.2.8. Antikūnų žymėjimas krienų peroksidaze

Peroksidazės prijungimas prie antikūno atliekamas perjodatiniu metodu (Wilson ir Nakane 1978). Antikūnai (5 mg/ml) dializuojami prieš natrio karbonatinį buferį (pH 9,5). Į 5 mg/ml vandeninį peroksidazės tirpalą pridedama 250 µl 0,2 M natrio perjodato tirpalo ir 20 minučių maišoma kambario temperatūroje. Tirpalas dializuojamas prieš 0,01 M natrio acetatinį buferį (pH 4,2). Tirpalas kalibruojamas iki pH 9,5, pridedant 1 M natrio karbonato tirpalo. Po dializės peroksidazės tirpalas sumaišomas su antikūnų tirpalu. Inkubuojama 2 val. kambario temperatūroje. Po to pridedama 4 mg/ml natrio borhidrido ir 2 val.

inkubuojama +4 $^{o}$C temperatūroje. Konjugatas dializuojamas prieš PBS, po to į konjuguotų antikūnų tirpalą pridedama iki 2 % (w/v) JSA ir iki 50 % (v/v) glicerolio. Konjugatas saugomas -20 $^{o}$C temperatūroje.

### 2.2.3. Baltymų struktūros analizė bioinformatikos metodais

Baltymų struktūros analizė atliekama pasitelkiant EMBL-EBI duomenų bazes ir bioinformatikos įrankius. Baltymų pirminių sekų paieška atliekama UniProt BLAST paieškos įrankiais, o sekų palyginimas – UniProt ClustalW2 programa.

Erdvinių struktūrų paieška atliekama PDB duomenų bazėje, o šios struktūros peržiūrimos PyMol (http://www.pymol.org/) programos pagalba. Baltymų 3D modeliai konstruojami panaudojant žinomas struktūras kaip šablonus, pasitelkiant į pagalba baltymo sekos ir struktūros analizės tinklo serverį – *Bioinformatics Tolkit, Max – Planck Institute for Development Biology* (http://toolkit.tuebingen.mpg.de/).

### 2.2.4. Genų inžinerijos metodai

#### 2.2.4.1. DNR elektroforezė agarozės gelyje. DNR fragmentų išskyrimas

DNR elektroforezė atliekama 0,8–1,5 % agarozės, ištirpintos TAE buferiniame tirpale, geliuose su 0,1 μg/ml etidžio bromidu, naudojant horizontų rezervuarą ir veikiant 10 V/cm stiprumo įtampa. Elektroforezės aparato talpa taip pat užpildoma TAE buferiu. Pasibaigus elektroforetiniam frakcionavimui, geliai analizuojami UV šviesoje transiliuminatoriumi.

Ruošiant DNR fragmentų išskyrimui agarozės gelį, naudojamos plačius takelius formuojančios šukos. Į vieną ar kelis takelius įnešamas DNR mėginys, o į gretimus takelius įnešamas DNR fragmentų ilgio standartas. Po elektroforezės UV šviesoje gelyje pažymima vieta, kurioje išsidėstęs reikiamo dydžio fragmentas. Išpjauta agarozės juostelė su DNR fragmentu susmulkinama ir patalpinama į mikro-centrifugos mėgintuvėlį. DNR fragmentai iš agarozės gelio išskiriami naudojant „*DNA Extraction Kit*“ rinkinį (UAB Fermentas, Lietuva). Procesas atliekamas pagal gamintojo rekomendacijas.

### 2.2.4.2. *E.coli* kompetentinių ląstelių paruošimas

*E.coli* kolonija inkubuojama per naktį 5 ml LB terpės +37 $^{o}$C, purtant 200 aps./min. greičiu. Iš ryto 40–50 µl terpės su bakterijomis perkeliama į naują 5 ml LB terpės mėgintuvėlį ir auginama apie 2,5 val. (kol ląstelių kultūros tankis pasiekia 0,6 optinio vieneto prie 660 nm bangos ilgio) tomis pačiomis sąlygomis. Auginimą nutraukus visos tolesnės procedūros atliekamos ledo vonioje. Ląstelės surenkamos centrifuguojant 10 min. 2500 asp./min. greičiu +4 $^{o}$C. Supernatantas nupilamas, ląstelės suspenduojamos 2,5 ml atšaldyto NaCl tirpalo. Centrifuguojama 10 min. 2500 asp./min. greičiu +4 $^{o}$C. Supernatantas nupilamas, ląstelės suspenduojamos 2,5 ml atšaldyto $CaCl_2$ tirpalo ir ši suspensija laikoma 0,5–1 val. lede. Suspencija centrifuguojama 10–15 min. 2500 asp./min. greičiu šaltoje centrifugoje. Nupylus supernatantą lieka apie 100 µl ląstelių ir $CaCl_2$ suspencijos. Suspendavus kompetentinę bakterijų kultūros suspenciją galima laikyti 0 $^{o}$C temperatūroje iki 2 parų.

### 2.2.4.3. *E. coli* kompetentinių ląstelių transformacija ir indukcija IPTG

Vykdant transformaciją, vienam mėginiui imama 50 µl kompetentinės kultūros ir 2,5–3 µg DNR ligato. Mišinys 30 min. laikomas ledo vonioje, po to 2 min. pernešamas į +42 $^{o}$C vonią, vėliau 2 min. laikomas ledo vonioje. DNR ir ląstelių mišinys užpilamas 1 ml LB terpės ir inkubuojamas +37 $^{o}$C. Ląstelės nusodinamos centrifuguojant 2 min. 5000 aps./min. greičiu, supernatantas nupilamas. Ląstelės suspenduojamos likusiame terpės laše ir išsėjamos ant agarizuotos LB terpės su ampicilinu (ampicilino koncentracija 100 µg/ml). Lėkštelės inkubuojamos +37 $^{o}$C per naktį.

Vykdant *E. coli* kompetentinių ląstelių indukciją IPTG, *E.coli* kolonija inkubuojama per naktį 5 ml LB terpės su ampicilinu +37 $^{o}$C, purtant 200 aps./min. greičiu. Ši kultūra skiedžiama 50–100 kartų ta pačia terpe ir auginama apie 2,5 val. (kol ląstelių kultūros tankis pasiekia 0,6 optinio vieneto prie 660 nm bangos ilgio) tomis pačiomis sąlygomis. Auginimą nutraukus, į augimo terpę pridedama IPTG iki galutinės koncentracijos 1 mM. Ląstelės inkubuojamos 2 val. +37 $^{o}$C, purtant 200 aps./min. greičiu. Po inkubacijos ląstelės nusodinamos centrifuguojant 5 min. 5000 aps./min. greičiu ir tirpinamos dejonizuotame vandenyje, iškart ruošiami pavyzdžiai baltymų elektroforezei, kaip įprasta (2.2.2.1 skyrelis).

### 2.2.4.4. DNR ligavimas ir DNR hidrolizė restrikcijos endonukleazėmis

DNR ligavimo reakcija vykdoma ligavimo buferyje 2 val. +25 °C arba per naktį +4 °C, pridėjus 1–5 tarptautinių vnt. T4 DNR ligazės. Vektoriaus ir DNR fragmentų santykis ligavimo mišinyje – 1:3. Įvykus reakcijai, ligavimo mišiniu transformuojamos kompetentinės *E.coli* ląstelės.

DNR hidrolizė vykdoma optimaliomis kiekvienai restrikcijos endonukleazei sąlygomis. Buferiniai tirpalai, inkubacijos laikas bei temperatūra parenkami pagal gamintojo rekomendacijas. 1 µl DNR suskaldyti imama 1–2 restrikcijos endonukleazės aktyvumo vienetai ir reakcijos mišinys inkubuojamas 1–2 val. Po inkubacijos, į 10 µl reakcijos mišinį pridedama DNR dažo ir vykdomas elektroforezinis frakcionavimas. Jei restrikcijos endonukleaze paveikta DNR bus naudojama kitose fermentinėse reakcijose, reakcijos mišinys ekstrahuojamas fenolio-chloroformo mišiniu ir išsodinamas etanilio.

## 2.3. Antrojo skyriaus apibendrinimas

MAk gauti, pasirinkta standartinė ląstelių hibridizacijos technologija. Paramiksovirusų, hantavirusų ir lisavirusų rekombinantiniai N baltymai, skirti MAk gavimui, buvo gauti iš BTI Eukariotų genų inžinerijos skyriaus. MAk specifiškumui tirti, pasirinkti IFA, IB metodai. MAk tinkamumo tiesiogiai atpažinti virusą infekuotose ląstelėse patvirtinimui pasirinktas netiesioginės IF metodas.

Netiesioginės IF ir IH eksperimentai su infekuotais žmogaus bei gyvūnų audinias buvo atlikti Lietuvos ir užsienio virusologijos laboratorijose: Australijoje (angl. *CSIRO Livestock Industries, Australian Animal Health Laboratory*), JAV (angl. *Department of Pathology, Center for Infectious Diseases and Immunology, University of New Mexico School of Medicine*) ir Lietuvoje, Nacionaliniame maisto ir veterinarijos rizikos vertinimo institute, Virusologinių tyrimų skyriuje.

hPIV3 ir RABV N baltymų genų persiklojančių fragmentų raiškai pasirinkta pGEX-KT plazmidė.

# 3

# Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

## 3.1. Trumpas mokslinio darbo apibūdinimas

Šio disertacinio darbo tikslas buvo ištirti rekombinantinių virusinių baltymų imunogenines savybes ir sukurti monokloninius antikūnus (MAk) prieš šiuos baltymus, siekiant juos pritaikyti virusų diagnostikai ir antigeninei baltymų struktūrai tirti. Darbas buvo vykdomas VU Biotechnologijos instituto (BTI) Imunologijos ir ląstelės biologijos skyriuje (ILBS).

MAk kūrimui buvo naudojami rekombinantiniai mielėse sintetinti virusų antigenai, formuojantys į virusų nukleokapsides panašias daleles (NPD). Šie antigenai buvo gauti iš VU BTI EGIS. Atlikus imunizacijas šiais antigenais, buvo sukurti MAk prieš žmogaus kvėpavimo takų viruso (hPIV3) N baltymą bei gyvūnų platinamų virusų antigenus (hantavirusų, pasiutligės viruso, Menangle viruso N baltymus). Imunizacijų metu buvo tiriamas minėtų rekombinantinių baltymų imunogeniškumas. MAk buvo kuriami, naudojant hibridomų technologiją: suliejant imunizuotų pelių blužnies ląsteles su mielomos ląstelėmis. Teigiamos hibridomos buvo padaugintos *in vitro* ir *in vivo* bei užšaldytos ilgalaikiam saugojimui. Gauti MAk buvo išgryninti ir visapusiškai charakterizuoti IFA, IB, IF, IH metodais – nustatomas jų specifiškumas, imunoglobulinų klasės, afiniškumas ($K_d$). Taip pat buvo ištirtas antikūnų sugebėjimas atpažinti natyvius virusus infekuotų ląstelių kultūrose. Kai kurių

MAk potenciali diagnostinė vertė buvo ištirta, naudojant klinikinius histologinius mėginius.

Sukurtieji MAk buvo naudojami minėtų virusų N baltymų antigeninės struktūros tyrimams bei imunodominuojančių B ląstelių epitopų nustatymui. Tyrimams buvo naudojami ne tik MAk, sukurti prieš rekombinantinius baltymus, bet ir infekuotų žmonių kraujo serumo mėginiai. Epitopų lokalizacija buvo nustatoma, naudojant rekombinantinius N baltymų fragmentus, chimerinius baltymus, sintetinius peptidus bei konkurencinės IFA metodą.

Atliktų tyrimų rezultatai buvo publikuoti 4 straipsniuose ir paskelbti 6 mokslinėse konferencijose Lietuvoje ir užsienyje.

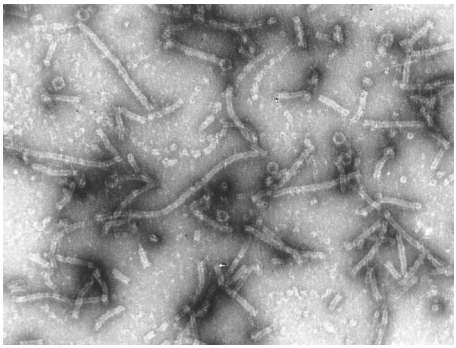
## 3.2. Monokloninių antikūnų prieš žmogaus paragripo 3 tipo viruso rekombinantinį nukleokapsidės baltymą gavimas, charakterizavimas ir taikymas šio baltymo antigeninės struktūros tyrimams

Žmogaus paragripo virusas (hPIV) priklauso gausiai *Paramyxoviridae* virusų šeimai, kurios nariai sukelia ligas pavojingas tiek žmonėms, tiek gyvūnams. Atsižvelgiant į virusų genų sekas ir antigenines savybes, išskiriami keturi hPIV tipai: hPIV1, hPIV2, hPIV3 ir hPIV4 (Knipe ir Howley 2007). hPIV virusai infekuoja kvėpavimo takų epitelio ląsteles, o jų infekcijų padariniai dažniausiai būna įvairūs kvėpavimo takų susirgimai. Nustatyta, kad hPIV1 ir hPIV3 virusai pavojingiausi kūdikiams, mažamečiams vaikams, senyvo amžiaus ir silpną imuninę sistemą turintiems žmonėms (Monto 1973; Vainionpaa ir Hyypia 1994). Apie 30–40 % ūmių kvėpavimo takų ligų, tokių kaip bronchitas ar plaučių uždegimas, sukelia hPIV (Reed *et al.* 1997). hPIV1 dažniausiai nurodomas kaip plaučių uždegimo sukėlėjas, o hPIV3 yra antrasis pagal dažnį bronchito ir plaučių uždegimo sukėlėjas kūdikiams ir mažamečiams vaikams (po žmogaus sincitinio kvėpavimo takų viruso (hRSV)). hPIV diagnostika dažniausiai remiasi molekulinės diagnostikos metodais – viruso RNR nustatymu. *Paramyxoviridae* šeimos virusai turi daug struktūros panašumų. Pavyzdžiui, hPIV1 ir hPIV3 virusai yra labai panašūs, o tai apsunkina šių virusų diferencinę diagnostiką. Šių virusų diagnostikai ar epidemiologiniams tyrimams būtų naudingi imunocheminiai metodai, sukurti virusų baltymų ar jiems specifiškų antikūnų pagrindu.

Siekiant sukurti imunocheminius metodus hPIV3 infekcijos nustatymui, šiame darbe buvo sukurti MAk prieš hPIV3 rekombinantinį nukleokapsidės (rN) baltymą (hPIV3 rN). N baltymas yra gausiausias paramiksovirusų baltymas, kuris formuoja stabilią ir tvirtą spiralės formos struktūrą su viruso RNR – viruso

nukleokapsidę. N baltymas ne tik apsaugo viruso RNR nuo nukleazių poveikio, bet ir kompaktiškai supakuoja genominę ir antigenominę viruso RNR (Henrickson 2003).

MAk kūrimui buvo panaudotas mielėse *Sacharomyces cerevisiae* susintetintas hPIV3 rN baltymas (Juozapaitis *et al.* 2008), formuojantis NPD (3.1 pav.).



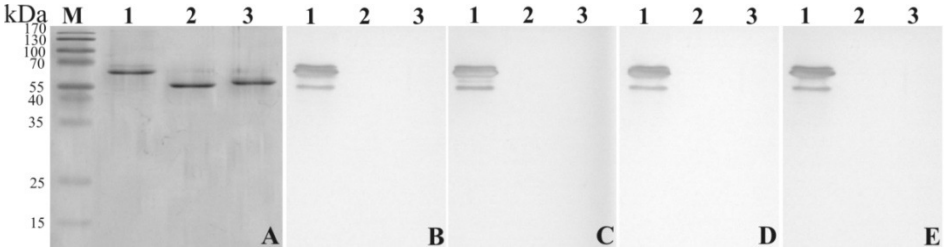
**3.1 pav.** Elektroninės mikroskopijos nuotrauka: hPIV3 rN baltymo formuojamos NPD. Padidinimas – 100 000 kartų (Juozapaitis *et al.* 2008)
**Fig. 3.1.** Electron micrograph of hPIV3 rN protein-generated nucleocapsid-like particles. Magnification – 100 000 times (Juozapaitis *et al.* 2008)

### 3.2.1. Hibridomų, gaminančių MAk prieš hPIV3 rN baltymą gavimas ir charakterizavimas

Siekiant sukurti MAk, BALB/c linijos pelės buvo 3 kartus imunizuojamos hPIV3 rN baltymu. Imunizuotų pelių kraujo pavyzdžiai buvo renkami po kiekvienos imunizacijos ir netiesioginės IFA metodu buvo tiriamas specifiškų antikūnų titras, t.y., kraujo serumo skiedimas, kuriam esant IFA metodu gautas OT yra apie 1,0. Hibridomų kūrimui buvo atrinkta pelė, kurios specifiškų hPIV3 rN baltymui antikūnų titras buvo didžiausias (1:6 500). Suliejus imunizuotos pelės blužnies ląsteles su mielominėmis Sp2/0 linijos ląstelėmis, buvo gauti trys hibridomų klonai (2H1, 5F12, 11H7) sekretuojantys IgG1 klasės antikūnus ir vienas – sekretuojantis IgG3 klasės antikūnus (klonas 5C9). Antikūnų specifiškumas hPIV3 rN baltymui buvo patvirtintas IFA ir IB (3.2 pav.) metodais.

Siekiant tiksliau charakterizuoti MAk ir hPIV3 rN baltymo sąveiką, buvo nustatytos MAk $K_d$ reikšmės, apibūdinančios MAk afiniškumą antigenui. $K_d$ reikšmės nustatytos netiesioginės IFA metodu, pasitelkiant OT priklausomybės nuo MAk koncentracijos kreives. Kiekviena $K_d$ reikšmė atitinka MAk

koncentraciją, kuriai esant maksimalus OT sumažėja pusiau. Gautos MAk prieš hPIV3 rN baltymą $K_d$ reikšmės (nuo $6{,}2\cdot 10^{-10}$ mol/l iki $7{,}3\cdot 10^{-9}$ mol/l) parodo didelį MAk afiniškumą antigenui. Nustatytos $K_d$ reikšmės pateiktos 3.1 lentelėje.

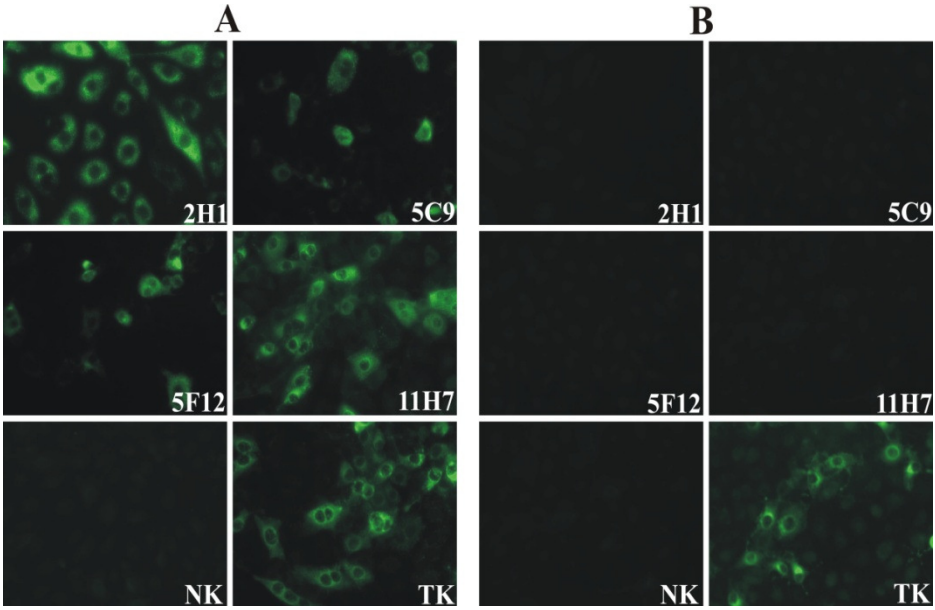



**3.2 pav.** MAk prieš hPIV3 rN baltymą 2H1 (**B**), 5C9 (**C**), 5F12 (**D**) ir 11H7 (**E**) specifiškumo tyrimas IB metodu, naudojant įvairius rekombinantinius, mielėse sintetintus N baltymus. (**A**) Baltymų elektroforezės nuotrauka (M – baltymų molekulinio svorio standartas (UAB Fermentas, Lietuva); 1 takelis – hPIV3 rN baltymas; 2 takelis – RABV rN baltymas; 3 takelis – hPIV1 rN baltymas)

**Fig. 3.2.** Western blot analysis of the monoclonal antibodies 2H1 (**B**), 5C9 (**C**), 5F12 (**D**) and 11H7 (**E**) cross-reactivities with N proteins of hPIV3 (lane 1), RABV (lane 2), hPIV1 (lane 3). Lane M, prestained protein ladder (UAB Fermentas, Lithuania). (**A**) As a control, the same recombinant proteins were run in a SDS polyacrylamide gel and stained with Coomassie blue

Siekiant antikūnus taikyti virusinių infekcijų imunodiagnostikai arba kaip biotechnologinius įrankius, svarbu ištirti jų kryžmines reakcijas su kitais antigenais. Kuriant MAk, kurie serologiniuose tyrimuose atpažintų tik hPIV3 N baltymą, svarbu nustatyti, ar jie nereaguoja su paragripo pirmo tipo viruso rekombinantiniu N baltymu (hPIV1 rN) ir kitų virusų N baltymais. Tuo tikslu buvo patikrinta kiekvieno klono kryžminė reakcija netiesioginės IFA ir IB (3.2 pav.) metodais su rekombinantiniais hPIV1, tymų viruso (MeV), hRSV, klasikinio pasiutligės viruso (RABV) N baltymais, susintetintais mielėse.

Tyrimas parodė, kad visi naujai sukurtieji MAk specifiškai atpažįsta tik hPIV3 rN baltymą: kryžminės reakcijos su kitų virusų N baltymais nevyko. Siekiant įsitikinti, jog šie MAk atpažįsta ne tik hPIV3 rN baltymą, bet ir natyvias viruso nukleokapsides infekuotose hPIV3 ląstelėse, buvo atlikta infekuotų ląstelių IF analizė. Ji parodė, kad visi MAk reaguoja su hPIV3 nukleokapsidėmis laukinio tipo hPIV3 virusu infekuotose žinduolių ląstelėse (3.3 A pav.). Kaip ir tikėtasi, nebuvo stebima MAk sąveika su hPIV1 viruso nukleokapsidėmis infekuotose *Vero 6* linijos ląstelėse (3.3 B pav.). Teigiami IF analizės tyrimo rezultatai parodė, jog rekombinantinio ir natyvaus viruso N baltymų antigeninė struktūra yra panaši ir naujai sukurtų MAk epitopai yra eksponuoti hPIV3 nukleokapsidės paviršiuje.




**3.3 pav.** MAk prieš hPIV3 rN baltymą specifiškumo tyrimas IF analizės metodu, naudojant hPIV1 ir hPIV3 virusais infekuotas *Vero 6* linijos ląsteles (Euroimmun, Vokietija). (**A**) hPIV3 virusu infekuotos ląstelės. (**B**) hPIV1 virusu infekuotos ląstelės. NK – neigiama kontrolė, hPIV1/hPIV3 virusams neigiamas žmogaus kraujo serumas, TK – teigiama kontrolė, hPIV1/hPIV3 virusams teigiamas žmogaus kraujo serumas

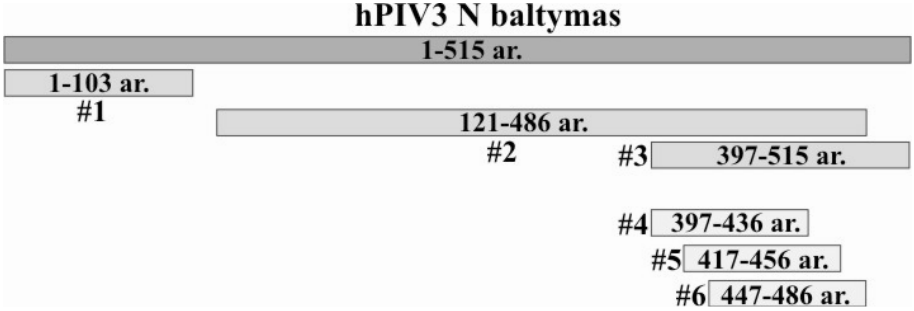
**Fig. 3.3.** Indirect immunofluorescence staining of hPIV-infected cells with monoclonal antibodies raised against hPIV3 N protein. (**A**) hPIV3-infected *Vero 6* cells; (**B**) hPIV1-infected *Vero 6* cells. NK, negative control (slides incubated with human negative serum for hPIV1/3); TK, positive control (slides incubated with human serum containing IgG against hPIV1/3)

## 3.2.2. hPIV3 rN baltymo antigeninės struktūros tyrimas

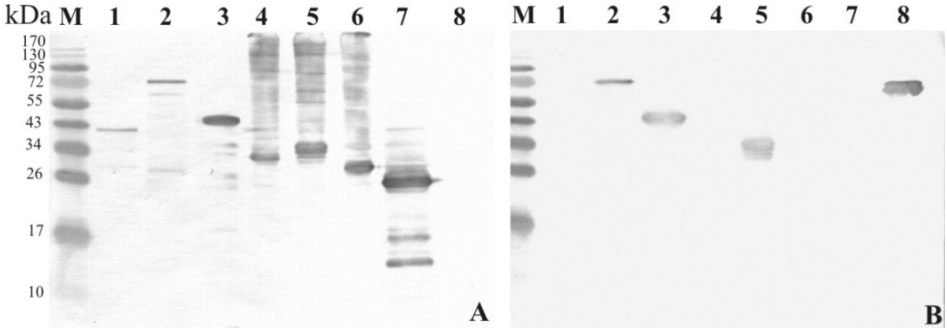
### 3.2.2.1. MAk epitopų lokalizavimas, naudojant hPIV3 N baltymo fragmentus

Siekiant nustatyti hPIV3 rN baltymo ir MAk prieš hPIV3 rN baltymą sąveikos vietas (epitopus), buvo sukonstruoti trys hPIV3 N baltymo fragmentai, sulieti su GST. Persiklojantys hPIV3 N baltymo fragmentai atkartojo hPIV3 N baltymo seką: pirmasis fragmentas 1–103 ar. (#1); antrasis fragmentas 121–486 ar. (#2) ir trečiasis fragmentas 397–515 ar. (#3) (3.4 pav.). Epitopų vietoms N baltymo molekulėje nustatyti buvo atliktas IB su *E. coli*, transformuotų fragmentus

koduojančiomis plazmidėmis, lizatais. Visi MAk reagavo su #2 ir #3 fragmentais (3.5 pav.). #2 ir #3 fragmentai persidengia 87 ar., todėl MAk atpažinimo vieta hPIV3 N baltymo molekulėje yra nuo 397 iki 486 ar.




**3.4 pav.** Persiklojančių hPIV3 N baltymo fragmentų schema
**Fig. 3.4.** Schematic representation of overlapping hPIV3 N protein fragments




**3.5 pav.** MAk 2H1 (**B**) prieš hPIV3 rN baltymą ir polikloninių antikūnų prieš GST (**A**) sąveikos su GST sujungtais, *E. coli* sintetintais, hPIV3 N baltymo fragmentais tyrimas IB metodu. (M – baltymų molekulinio svorio standartas (UAB Fermentas, Lietuva); 1 takelis – #1 fragmentas (1–103 ar.); 2 takelis – #2 fragmentas (121–486 ar.); 3 takelis – #3 fragmentas (397–515 ar.); 4 takelis – #4 fragmentas (397–436 ar.); 5 takelis – #5 fragmentas (417–456 ar.); 6 takelis – #6 fragmentas (447–486 ar.); 7 takelis – GST; 8 takelis – pilno ilgio hPIV3 rN baltymas)
**Fig. 3.5.** Reactivity of monoclonal antibody 2H1with GST-fused hPIV3 N protein fragments expressed in *E. coli*. (**A**) Western blot with anti-GST polyclonal antibodies. (**B**) Western blot with monoclonal antibody 2H1 against hPIV3 rN protein. (Lyne M, prestained protein molecular mass marker; lane 1, fragment #1(1–103 aa); lane 2, fragment #2 (121–486 aa); lane 3, fragment #3 (397–515 aa); lane 4, fragment #4 (397–436 aa); lane 5, fragment #5(417–456 aa); lane 6, fragment #6 (447–486 aa); lane 7, GST; lane 8, hPIV3rN protein)

Tikslesniam epitopų nustatymui buvo susintetinti dar trys persidengiantys fragmentai, atkartojantys hPIV3 N baltymo fragmentą nuo 397 iki 486 ar.: 397–436 ar. (#4); 417–456 ar. (#5); 447–486 ar. (#6) (3.4 pav.). IB tyrimai su šiais fragmentais parodė, kad visi MAk reaguoja tik su #5 fragmentu (417–456 ar.). (3.5 pav.). Fragmentas #5 persikloja su #4 ir #6, todėl MAk prieš hPIV3 rN baltymą epitopas lokalizuotas trumpoje 10 ar. ilgio N baltymo atkarpoje tarp 437–446 ar.

Siekiant įsitikinti, ar MAk sąveikauja būtent su šiuo trumpu hPIV3 N baltymo fragmentu, buvo tiriama MAk sąveika netiesioginėje IFA su sintetiniu peptidu GEPQSSIIQI, atitinkančiu ar. seką nuo 437 iki 446 ar. hPIV3 N baltymo molekulėje. MAk 5C9 ir 11H7 reagavo su šiuo sintetiniu peptidu, o MAk 2H1 ir 5F12 neatpažino peptido. Buvo padaryta prielaida, kad MAk 2H1 bei 5F12 ir peptido sąveikai būtinos šalia 437–446 ar. fragmento esančios ar. liekanos.

### 3.2.2.2. MAk ir antikūnų, susidariusių hPIV3 infekcijos metu, specifiškumo palyginimas

Siekiant nustatyti, ar MAk prieš hPIV3 rN baltymą atpažįsta tuos pačius epitopus, kaip antikūnai, susidarę natūralios hPIV3 infekcijos metu, netiesioginės IFA metodu buvo ištirti 42 hPIV infekuotų žmonių serumai (rezultatai nepateikiami). Siekiant nustatyti hPIV3 IgG specifiškus antikūnus, infekuotų žmonių serumai buvo tiriami dviem būdais: (i) naudojant komercinį rinkinį (IBL, JAV); (ii) netiesioginės IFA metodą, naudojant hPIV3 rN baltymą (Juozapaitis *et al.* 2008). Komercinis rinkinys yra sukurtas natyvaus viruso komponentų pagrindu ir skirtas nustatyti hPIV1/2/3 virusams specifiškus IgG antikūnus. Rezultatai, gauti komerciniu rinkiniu ir netiesioginės IFA (hPIV3 rN baltymo pagrindu) nesutapo. Patikrinus serumus netiesiogines IFA metodu, buvo nustatyta, kad 35 iš 42 serumuose yra specifiškų IgG prieš hPIV3 N baltymą. 10 serumų iš 35 teigiamų, identifikuotų netiesioginės IFA metodu, komerciniu rinkiniu buvo įvertinti kaip neigiami. Rezultatų neatitikimą gali sąlygoti hPIV3 N baltymo kiekis, naudotas abiem metodais. Komerciniame rinkinyje plokštelėse imobilizuojami visi viruso baltymai, todėl N baltymo kiekis gali būti labai mažas, lyginant su mūsų sukurta netiesiogine IFA. Kadangi visi mėginiai buvo surinkti iš hPIV infekuotų pacientų, galima manyti, kad mūsų naudojama sistema yra jautresnė ir leidžia nustatyti mažesnes specifiškų IgG koncentracijas. Lygiagrečiai kraujo mėginiuose buvo nustatomi antikūnai prieš hPIV1. Iš 35 hPIV3 N baltymui teigiamų serumų 11 kryžmiškai reagavo su hPIV1 N baltymu. Šios serumų antikūnų kryžminės reakcijos gali būti siejamos su didele hPIV1 ir hPIV3 N baltymų ar. sekų homologija. Taip pat negalima atmesti galimos dvigubos hPIV1 ir hPIV3 virusų infekcijos.

Naudojant sintetinį peptidą, atkartojantį hPIV3 N baltymo 437–446 ar. seką, buvo ištirta, ar viruso infekcijos metu susidaro antikūnai prieš tą patį imunodominuojantį rajoną, kurį atpažįsta antikūnai, gauti prieš rekombinantinį antgeną. Ištyrus 35 kraujo serumo mėginius, kuriuose buvo nustatyti IgG antikūnai prieš hPIV3 N baltymą, 16 reagavo su sintetiniu peptidu. Taigi, 46 % hPIV3 N baltymui IgG teigiamų serumų yra randami antikūnai prieš hPIV3 N baltymo 437–446 ar. linijinį epitopą. Tai patvirtina šio epitopo imunodominuojantį vaidmenį, vykstant natūraliai hPIV3 infekcijai.

### 3.2.2.3. hPIV3 ir MeV N baltymų imunodominuojančių epitopų palyginimas

Anksčiau mūsų atliktuose MeV N baltymo antigeninės struktūros tyrimuose buvo identifikuotas linijinis imunodominuojantis epitopas, atitinkantis MeV N baltymo 440–448 ar. fragmentą (Žvirblienė *et al.* 2007). MeV ir hPIV3 virusai priklauso *Paramyxoviridae* virusų šeimai, o jų N baltymai tarpusavyje turi tam tikrą struktūros panašumą, todėl buvo atliktas hPIV3 ir MeV N baltymų C galo sekų (nuo 397 ar.) palyginimas (3.6 A pav.).

A

```
hPIV3      397  IRNINSSETSFHKPTGGSAIEMAIGEEPEQ-------FEHRADQEQDGEPQSSIIQYAWAEGNR 453
MeV        397  AMHTTEDKISRAVGPRQAQVSFLHGDQSENELPRLGGKEDRRVKQSRGEAREYSRETGPSRASD 461
                  : ...: *    .  : :. : *::.*:        *.*  ::. **.:.*  : . :...

hPIV3      454  SDDRTEQATESDNIKTEQQNIRDRLNKRLNDRKKQGSQPSTNPTNRTNQDEIDDLFNAFGSN-- 515
MeV        462  ARAAHLPTGTPLDIDTATESSQDPQDSRRSADALLRLQAMAGISEEQGSDTDTPIVYNDRNLLD 525
                :      :  . :*.*  :. :*  :.* .       *. :. ::. ..*    :.    .
```

B

```
hPIV3      397  IRNINSSETSFHKPTGGSAIEMAIGEEPEQFEHRADQEQDGEPQSSIIQYAWAEGNRSDDRTEQ 460
hPIV1      398  LTNLSGGDGAYHKPTGGGAIEVAIDHTDITFGAEDTADRDNKNWTNNSNERWMN-HSINNHTIT 460
                : *:...: ::******.*** :**..   *  .   ::*.:  :.  :  * : :  :::*

hPIV3      461  ATESDNIKTEQQN-----IRDRLNKRLNDRKKQGSQPSTNPTNRTNQD--EIDDLFNAFGSN-- 515
hPIV1      461  ISGAEELEEETNDEDITDIENKIARRLADRKQRLSQANNKQDANSDADYENDDDATAAAGIGGI 524
                    : ::::: * ::  *.::: :** ***:: **...:   .:: *  : **   * *
```

**3.6 pav.** Paramiksovirusų N baltymų C galo ar. palyginys. Baltymų pirminės struktūros tyrimas buvo atliktas ClustalW2 programa. (**A**) hPIV3 ir MeV N baltymų C galo ar. palyginys; (**B**) hPIV3 ir hPIV1 N baltymų C galo ar. palyginys. („*“ – homologinės ar.; „:“ – panašią funkcinę grupę turinčios ar.; „.“ – funkciškai panašios ar.; „ “ – nustatytas epitopas)

**Fig. 3.6.** Alignment of paramyxovirus N protein C-terminal aa sequences. Alignment of selected proteins primary structure was performed using ClustalW2. (**A**) Alignment of hPIV3 and MeV N protein C-terminal aa sequences; (**B**) Alignment of hPIV3 and hPIV1 N protein C-terminal aa sequences („*“ – homologous aa sequences; „:“ – aa with a similar functional group; „.“ – functionally similar aa; „ “ – identified epitope)

Nors palyginamos baltymų sritys nebuvo homologiškos (jose yra tik 11 % identiškų ar.), buvo nustatyta, kad imunodominuojančių linijinių epitopų sekose (MeV N – seka 440–448 ar., hPIV3 N – seka 437–446 ar.) sutampa kelios ar. Iš dešimties hPIV3 N baltymo linijinio epitopo ar. dvi yra identiškos ir trys panašios, lyginant su MeV N baltymo epitopo seka. Nors epitopai tarpusavyje yra panašūs, MAk prieš hPIV3 N baltymo linijinį epitopą (437–446 ar.) nesąveikavo su MeV rN baltymu. Papildomai buvo atliktas hPIV3 ir hPIV1 N baltymų C galo ar. sekų palyginimas nuo 397 ar. iki 446 ar. (3.6 B pav.). Šios sekos, taip pat kaip ir MeV N baltymo atveju, turi mažai homologijos (jose yra tik 24 %. identiškų ar.) Todėl MAk, gauti prieš hPIV3 rN baltymą, kryžmiškai nereaguoja su hPIV1 N baltymu.

### 3.2.3. Rezultatų, gautų tiriant naujas hibridomas prieš hPIV3 rN baltymą, apibendrinimas

Buvo sukurtos keturios naujos hibridomų linijos (2H1, 5C9, 5F12, 11H7), sekretuojančios aukšto afiniškumo IgG klasės MAk prieš mielėse sintetintą, NPD formuojantį hPIV3 rN baltymą (3.1 lentelė).

**3.1 lentelė.** Apibendrinantys duomenys apie naujai sukurtus MAk prieš hPIV3 rN baltymą

**Table 3.1.** Summarising data on recently produced monoclonal antibodies against hPIV3 rN protein

| MAk klono pav. | MAk klasė ir poklasė | $K_d$, M | MAk ir hPIV3 N baltymo sąveika: | | | hPIV3 N baltymo epitopų lokalizacija |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | IFA[a] | IB[b] | IF[c] | |
| **2H1** | IgG1 | $7{,}7\cdot 10^{-10}$ | +++ | + | + | 417–456 ar. (#5 fragmentas) |
| **5C9** | IgG3 | $6{,}3\cdot 10^{-10}$ | +++ | + | + | 437–446 ar. (GEPQSSIIQI) |
| **5F12** | IgG1 | $6{,}2\cdot 10^{-10}$ | +++ | + | + | 417–456 ar. (#5 fragmentas) |
| **11H7** | IgG1 | $7{,}3\cdot 10^{-9}$ | +++ | + | + | 437–446 ar. (GEPQSSIIQI) |

[a]IFA rezultatai buvo išreikšti: „+++“ – OT>1,5.
[b]IB rezultatai buvo išreikšti: „+“ – teigiama reakcija.
[c] IF rezultatai buvo išreikšti: „+“ – teigiama reakcija.

IFA, IB ir IF metodais buvo ištirtas MAk specifiškumas. Nustatyta, kad MAk reaguoja su hPIV3 rN baltymu ir nereaguoja su mielėse sintetintais kitų virusų N baltymais. Visi MAk sąveikauja su hPIV3 nukleokapsidėmis laukinio tipo hPIV3 virusu infekuotose žinduolių ląstelėse. Todėl nauji MAk prieš hPIV3 N baltymą gali būti taikomi tiesioginiam virusų nustatymui IF metodu biologiniuose mėginiuose. Naudojant persiklojančius hPIV3 N baltymo fragmentus ir sintetinį peptidą, pavyko lokalizuoti MAk atpažįstamus hPIV3 N

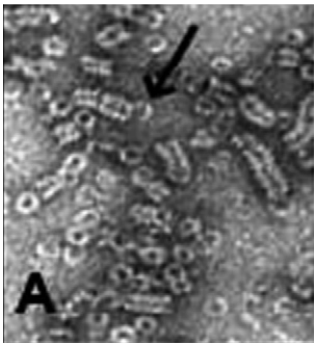
baltymo epitopus. Buvo nustatyta, kad hPIV3 N baltymo, kaip ir kitų paramiksovirusų N baltymų epitopai lokalizuoti C galinėje baltymo dalyje (Žvirblienė *et al.* 2007).

## 3.3. Naujų monokloninių antikūnų prieš Menangle viruso rekombinantinį nukleokapsidės baltymą gavimas, charakterizavimas ir taikymas šio baltymo antigeninės struktūros tyrimams

Menangle virusas (MenV) buvo identifikuotas 1997 m. Australijoje, vienoje iš Naujojo Pietų Velso Menangle kaimo kiaulių fermų (Philbey *et al.* 1998). Pagal struktūrą, naujasis virusas buvo priskirtas *Paramyxoviridae* šeimai, *Paramyxovirinae* pošeimiui (Philbey *et al.* 1998). Viruso infekcija sukėlė paršavedžių kiaulių persileidimus, siejamus su embrionų ir vaisių žuvimu bei paršelių apsigimimais. Virusą neutralizuojančių antikūnų buvo rasta dviejų kiaulidėse dirbusių žmonių kraujo serumuose. Praėjus kelioms savaitėms po viruso infekcijos protrūkio, abu darbuotojai skundėsi simptomais, panašiais į gripo viruso sukeliamos infekcijos simptomus. Ištyrus MenV paplitimą aplink infekcijos židinį, pavyko nustatyti, kad MenV viruso nešiotojai yra *Pteropus* šeimos šikšnosparniai, kuriems viruso infekcijos metu nepasireiškia jokie ligos simptomai (Philbey *et al.* 1998). Viruso perdavimo būdas kol kas nėra gerai ištirtas, bet manoma, kad viruso infekcija kiaulių populiacijoje plinta per virškinamąjį traktą, patekus išmatų ar šlapimo (Philbey *et al.* 1998). Kol kas nėra ištirta, kaip virusas perduodamas žmogui ir ar infekuoti MenV *Pteropus* šeimos šikšnosparniai gali būti pavojingi žmogui.

MenV infekciją galima nustatyti, išskiriant virusą iš audinių ar išmatų bei užkrečiant įvairias ląstelių kultūras. Virusas identifikuojamas elektroniniu mikroskopu arba atliekamas viruso neutralizacijos testas (Bowden *et al.* 2001; Kirkland *et al.* 2001b). Šie metodai ilgai trunka, reikalauja ypatingų saugumo priemonių. Todėl greiti, tikslūs ir tiesioginiai MenV nustatymo metodai padėtų kontroliuoti MenV infekciją. MenV antigenų nustatymas imunocheminės analizės metodais, panaudojant MAk prieš šiuos virusus, leistų išvystyti tikslesnius MenV infekcijos laboratorinės diagnostikos metodus. MenV N baltymo, kaip ir kitų paramiksovirusų, kiekis virione yra didžiausias, todėl buvo tikimasi, kad MAk prieš šį baltymą būtų naudingi, kuriant MenV diagnostikos sistemas. Todėl buvo iškeltas uždavinys sukurti MAk prieš MenV rekombinantinį N baltymą (MenV rN) ir panaudoti juos MenV N baltymo antigeninės struktūros tyrimams bei tiesioginėms MenV diagnostikos sistemoms kurti.

MAk kūrimui buvo panaudotas mielėse *Sacharomyces cerevisiae* susintetintas MenV rN baltymas, formuojantis NPD (3.7 pav.) (Juozapaitis *et al.* 2007).




**3.7 pav.** Elektroninės mikroskopijos nuotrauka: MenV rN baltymo formuojamos NPD. Padidinimas – 100 000 kartų (Juozapaitis *et al.* 2007)
**Fig. 3.7.** Electron micrograph of MenV rN protein-generated nucleocapsid-like particles. Magnification – 100 000 times (Juozapaitis *et al.* 2007)

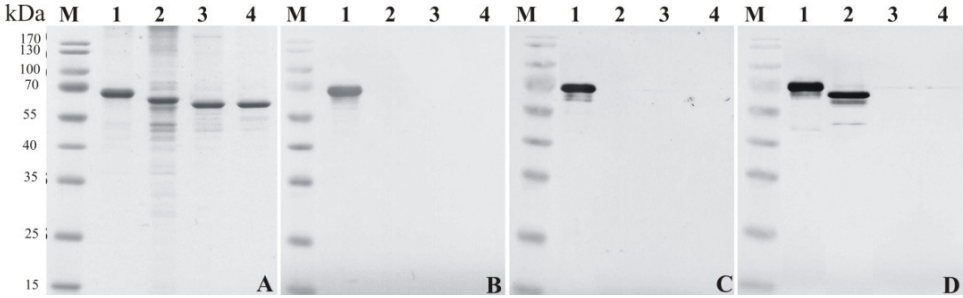
### 3.3.1. Hibridomų, gaminančių MAk prieš MenV rN baltymą gavimas ir charakterizavimas

Imunizacija MenV rN baltymu sukėlė stiprų humoralinį atsaką imunizuotų BALB/c linijos pelių organizme: specifiškų MenV rN baltymui antikūnų titras siekė apie 1:17 000. Suliejus imunizuotos pelės blužnies B limfocitus ir mielomos Sp2/0 ląsteles, pavyko gauti tris hibridomų linijas (2D1, 4G11 ir 10G8), sekretuojančias antikūnus prieš MenV rN baltymą. Visi trys klonai sekretavo IgG1 klasės antikūnus (3.2 lentelė). MAk specifiškumas MenV rN baltymui buvo patvirtintas IFA ir IB metodais (3.2 lentelė, 3.8 pav.).

MAk 2D1, 4G11 nerodė kryžminio specifiškumo reakcijų su kitų paramiksovirusų: Tioman viruso (TioV), Nipah viruso (NiV), Hendra viruso (HeV), hPIV1, hPIV3 mielėse sintetintais N baltymais (3.8 pav.). Klono 10G8 sekretuojami MAk kryžmiškai reagavo su TioV rN baltymu (3.8 D pav.). Neseniai identifikuotas TioV, kaip ir MenV priklauso *Paramyxoviridae* šeimos, *Rubulavirus* genties virusams, o jų N baltymai turi 78,2 % identiškų ar. (Chua *et al.* 2002). Todėl tikėtina, kad 10G8 atpažįsta bendrą MenV ir TioV N baltymams, kryžmiškai reaguojantį epitopą.

Siekiant tiksliau charakterizuoti MAk ir MenV rN baltymo sąveiką, buvo nustatytos $K_d$ reikšmės. Gautos $K_d$ reikšmės ($K_d$(2D1) = $7{,}7 \cdot 10^{-10}$ M; $K_d$(4G11) =

$8{,}9\cdot 10^{-10}$ M; $K_d$(10G8) = $8{,}1\cdot 10^{-10}$ M) parodė, jog MAk prieš MenV rN baltymą pasižymi dideliu afiniškumu antigenui.




**3.8 pav.** Monokloninių antikūnų prieš MenV rN baltymą 2D1 (**B**), 4G11 (**C**) ir 10G8 (**D**) specifiškumo tyrimas IB metodu, naudojant įvairius rekombinantinius, mielėse sintetintus N baltymus. (**A**) Baltymų elektroforezės nuotrauka. (M – baltymų molekulinio svorio standartas (UAB Fermentas, Lietuva); 1 takelis – MenV rN baltymas; 2 takelis – TioV rN baltymas; 3 takelis – NiV rN baltymas; 4 takelis – HeV rN baltymas)

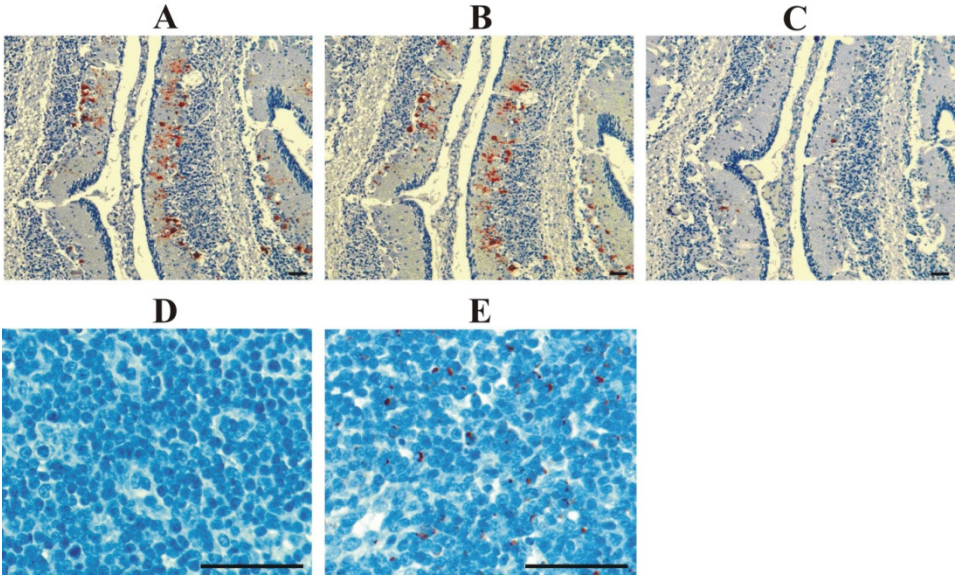
**Fig. 3.8.** Western blot analysis of monoclonal antibodies 2D1 (**B**), 4G11 (**C**), and 10G8 (**D**) cross-reactivities with recombinant, yeast expressed N proteins of MenV (lane 1), TioV (lane 2), NiV (lane 3), HeV (lane 4). Lane M, prestained protein ladder (UAB Fermentas, Lithuania). (**A**) As a control, the same recombinant proteins were run in a SDS polyacrylamide gel and stained with Coomassie blue

### 3.3.1.1. MAk prieš MenV rN baltymą specifiškumo tyrimas *in situ*

IH metodu buvo tiriama sąveika tarp MAk prieš MenV rN baltymą ir MenV infekuotų negimusių paršelių smegenų audinių. Tyrimai buvo atlikti Australijoje (angl. *CSIRO Livestock Industries, Australian Animal Health Laboratory*). Teigiama imunohistocheminė reakcija buvo stebima smegenėlių audinio neuronuose (3.9 pav.).

MAk 2D1 ir 4G11 stipriai sąveikavo su MenV infekuotais audiniais (3.9 A, B pav.), tuo tarpu MAk 10G8 žymiai silpniau sąveikavo su MenV (3.9 C pav.). Ruošiant infekuotus audinius IH tyrimui naudojami reagentai, tokie kaip formalinas ir parafinas, kurie gali pakeisti N baltymo erdvinę struktūrą, todėl 10G8 klono sekretuojami antikūnai silpniau reaguoja su tokiu pakitusiu epitopu. MAk kryžminis specifiškumas buvo tirtas ir su TioV infekuoto paršelio limfmazgių ir tonzilių audiniais. Infekuotuose audiniuose, naudojant 2D1 ir 4G11 klonų antikūnus, TioV N baltymas imunohistochemiškai nenusidažė. Kaip jau buvo minėta, tiriant IFA ir IB metodais (3.8 pav., 3.2 lentelė) šie MAk taip pat nerodė kryžminių reakcijų su TioV rN baltymu. Nors 10G8 klono antikūnai

reagavo su TioV rN baltymu, tiriant IFA ir IB metodais (3.8 pav., 3.2 lentelė), tačiau tiriant IH metodu sąveikos tarp viruso N baltymo ir 10G8 antikūnų nebuvo (3.9 D pav.). Tai patvirtina ankstesnį pastebėjimą, kad 10G8 klono antikūnai yra mažiau afiniški imunohistocheminių reagentų modifikuotam virusų N baltymui, šiuo atveju – TioV N baltymui. Imunohistocheminė MAk analizė patvirtino rekombinantinio baltymo, prieš kurį buvo gauti MAk, antigeninės struktūros panašumą su natyviu MenV N baltymu, todėl buvo įdomu ištirti MenV N baltymo ir MAk sąveikos sritis.




**3.9 pav.** MAk prieš MenV rN baltymą specifiškumo tyrimas IH metodu, naudojant MenV infekuotų negimusių paršelių smegenų audinius (**A–C**), TioV infekuotų paršelių limfmazgių audinius (**D** ir **E**). Tyrimams naudoti antikūnai: 2D1 (**A**), 4G11 (**B**), 10G8 (**C** ir **D**), triušio poliklonininiai antikūnai prieš TioV N baltymą (**E**). IH tyrimas atliktas Australijoje (angl. *CSIRO Livestock Industries, Australian Animal Health Laboratory*)
**Fig.3.9.** Immunohistochemistry of MeV infected tissues. (**A-C**), brain tissue of MeV-infected stillborn piglet. (**D, E**), lymph node tissue of TioV-infected pig. Tissue samples were probed with primary antibodies: **A**, monoclonal antibodies of clone 2D1; **B**, monoclonal antibodies of clone 4G11; **C-D**, monoclonal antibodies of clone10G8; **E**, rabbit antiserum specific to TioV N protein. Immunohistochemistry investigations were done at CSIRO Livestock Industries, Australian Animal Health Laboratory

### 3.3.2. MenV rN baltymo antigeninės struktūros tyrimas

MenV rN baltymo antigeninei struktūrai tirti buvo naudojami 4 MenV N baltymo fragmentai (1–400 ar., 1–430 ar., 1–460 ar. ir 1–490 ar.), susintetinti mielėse, EGIS (Juozapaitis *et al.* 2007). Tyrimas buvo atliktas IB metodu. Nė vienas iš MAK nereagavo su 1–400 ir 1–430 ar. fragmentais, o 1–490 ar. fragmentą atpažino visi trys MAk. Klonų 2D1 ir 4G11 sekretuojami antikūnai sąveikavo su 1–460 ar. fragmentu. Tai rodo, kad 2D1 ir 4G11 MAk epitopai lokalizuoti tarp 431 ir 460 ar., o 10G8 epitopas – nuo 461 ar. iki 490 ar. MAk specifiškumo tyrimo rezultatai, panaudojant MenV N baltymo fragmentus, pateikti 3.2 lentelėje.

**3.2 lentelė.** MAk gautų prieš MenV rN baltymą sąveika su pilno ilgio MenV ir TioV rN baltymais ir su sutrumpintais MenV N baltymo fragmentais. Sąveika tirta IB metodu
**Table 3.2.** Interaction between monoclonal antibodies against MenV and TioV rN proteins and MenV N protein fragments. Interaction was explored using Western blot method

| MAk klono pav. | MAk ir rN baltymų sąveika | | MAk sąveika su MenV N baltymo fragmentais | | | | MenV N baltymo imunodominuojančios sritys |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | MenV | TioV | 1–400 ar. | 1–430 ar. | 1–460 ar. | 1–490 ar. | |
| **2D1** | + | - | - | - | + | + | 431–460 ar. |
| **4G11** | + | - | - | - | + | + | 431–460 ar. |
| **10G8** | + | + | - | - | - | + | 461–490 ar. |

„+“ – teigiama reakcija.
„-“ – neigiama reakcija.

Kadangi 10G8 antikūnai kryžmiškai reaguoja su TioV N baltymu, pabandėme nustatyti tikslesnį 10G8 epitopą, sugretinus MenV ir TioV N baltymų ar. sekas. Sekoms palyginti buvo pasinaudota ClustalW2 pirminių baltymų sekų palyginimo programa. Buvo sugretintos abiejų baltymų sekos nuo 461 iki 490 ar., atitinkančios fragmentą, su kuriuo reagavo klono 10G8 antikūnai. Gautame MenV ir TioV N baltymų ar. sekų palyginyje gerai matyti galima bendro MenV ir TioV N baltymų epitopo sritis: nuo 467 iki 485 ar. (3.10 pav.). Naujų MAk gautų prieš MenV N baltymą, sąveikos su MenV N baltymo fragmentais atkartojančiais baltymo C galinę sritį, tyrimai pateikė naujų žinių apie MenV N baltymo antigeninę struktūrą – B ląstelėms lengvai pasiekiamas MenV N baltymo vietas (epitopus). Gauti rezultatai parodė, jog MenV N baltymo, kaip ir kitų *Paramyxoviridae* šeimos virusų: MeV (Žvirblienė *et al.* 2007) ir hPIV3 (Žvirblienė *et al.* 2009) N baltymų imunodominuojančios sritys lokalizuotos baltymo molekulės C galinėje dalyje.

```
MenV        461 PIPQMPQNIDWEVRLAEIERRNQQMAARD 490
TioV        461 PVPAPIREIDWEARIAEIEEQGQRMRDQG 490
                *:*   ::****.*:****.:.*:*  :.
```

**3.10 pav.** MenV ir TioV N baltymų 461–490 ar. sekų palyginys. Baltymų pirminės struktūros tyrimas buvo atliktas ClustalW2 programa. („*“ – homologinės ar.; „:“ – panašią funkcinę grupę turinčios ar.; „.“ – funkciškai panašios ar.; „ “ – spėjamas epitopas)

**Fig. 3.10.** Alignment of MenV and TioV N protein 461-490 aa sequences. Alignment of selected proteins primary structure was performed using ClustalW2 („*“ – homologous aa sequences; „:“ – aa with a similar functional group; „.“ – functionally similar aa; „ “ – identified epitope)

## 3.3.3. Rezultatų, gautų tiriant naujas hibridomas prieš MenV rN baltymą, apibendrinimas

Iki šiol dar nebuvo sukurta MAk prieš MenV, todėl nebuvo galimybės nustatyti šį virusą infekuotame audinyje imunologiniais metodais. Mums pavyko sukurti 3 MAk prieš rekombinantinį N baltymą, kuris formuoja NPD ir savo antigenine struktūra panašus į natyvų virusą. MAk buvo charakterizuoti IFA, IB ir IH metodais, buvo nustatytos $K_d$ (3.3 lentelė).

**3.3 lentelė.** Apibendrinantys duomenys apie naujai sukurtus MAk prieš MenV rN baltymą

**Table 3.3.** Summarising data on recently produced monoclonal antibodies against MenV rN protein

| MAk klono pav. | MAk klasė ir poklasė | $K_d$, M | MAk sąveika su MenV/TioV N baltymais: | | | MenV N baltymo epitopų lokalizacija |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | IFA[a] | IB[b] | IH[c] | |
| **2D1** | IgG1 | $7{,}7\cdot 10^{-10}$ | +++/- | +/- | ++/- | 431–460 ar. |
| **4G11** | IgG1 | $8{,}9\cdot 10^{-10}$ | +++/- | +/- | ++/- | 431–460 ar. |
| **10G8** | IgG1 | $8{,}1\cdot 10^{-10}$ | +++/+ | +/+ | +/- | 467–485 ar. |

[a]IFA rezultatai buvo išreikšti: „-“ – OT <0,3; „+“ – OT = 0,3–0,5; „+++“ – OT>1,0.
[b]IB rezultatai buvo išreikšti: „+“ – teigiama reakcija; „-“ – neigiama reakcija.
[c] IH rezultatai buvo išreikšti: „++“ – stipri teigiama reakcija; „+“ – silpna teigiama reakcija ; „-“ – neigiama reakcija.

Nustatyta, kad MAk 2D1 ir 4G11 reaguoja tik su MenV rN baltymu, o klono 10G8 sekretuojami antikūnai rodo kryžminę reakciją su giminišku TioV rN baltymu (3.3 lentelė). Naudojant naujai sukurtus MAk buvo nustatyta, kad MenV N baltymo antigeninė struktūra yra panaši į kitų *Paramixoviridae* šeimos

virusų N baltymų antigeninę struktūrą: MenV N baltymo imunodominuojančios sritys lokalizuotos N baltymo molekulės C galinėje dalyje (3.3 lentelė). MAk imunohistocheminė analizė su infekuotų gyvūnų audiniais patvirtino natyvaus viruso ir rekombinantinio baltymo antigeninės struktūros panašumą. Apibendrinant atliktus tyrimus, galima teigti, kad MAk prieš MenV rN baltymą gali būti panaudoti, kuriant naujas laboratorinės diagnostikos sistemas MenV infekcijai nustatyti.

## 3.4. Monokloninių antikūnų prieš hantavirusų rekombinantinius nukleokapsidės baltymus gavimas, charakterizavimas ir taikymas antigeninės struktūros tyrimams

Hantavirusai – plačiai paplitę pasaulyje virusai. Jų šeimininkai ir nešiotojai yra graužikai ir vabzdžiaėdžiai gyvūnai, kuriems virusai sukelia lėtinę, žymių fiziologinių pakitimų nesukeliančią infekciją. Žmogus šiuo virusu užsikrečia oro lašeliniu būdu per infekuotų gyvūnų ekskrementus. Hantavirusų infekcija žmogui sukelia pavojingas gyvybei hemoragines karštines su inkstų arba plaučių nepakankamumo sindromais (HKIS, HKPS). Kiekvieno hantaviruso rūšis yra susijusi su tam tikra graužikų rūšimi. Pagal šį kriterijų iki šiol yra identifikuota daugiau nei 20 patogeniškų hantavirusų (Knipe ir Howley 2007).

Diagnozuojant hantavirusus, dažnai naudojami serologiniai metodai, tokie kaip netiesioginė IF, hemagliutinacijos inhibicijos testas, bei įvairūs IFA metodo variantai, sukurti virusinių baltymų pagrindu. Natūralios hantavirusų infekcijos, kaip ir eksperimentinių infekcijų ar imunizacijų su rekombinantiniais baltymais imunologiniai tyrimai rodo, kad hantavirusų N baltymas sukelia stiprų, ilgalaikį imuninį atsaką. Todėl vis dažniau kuriami greiti IFA, IB, imunochromatografijos metodai hantavirusų infekcijai nustatyti, naudojant rekombinantinius N baltymus bei MAk prieš šiuos baltymus (Mertens *et al.* 2009; Petraitytė *et al.* 2007). Taip pat kuriami IF metodai, leidžiantys tiesiogiai nustatyti virusinius baltymus infekuotose ląstelių kultūrose bei graužikų audiniuose (Meisel *et al.* 2006).

Yra sukurta nemažai MAk prieš įvairius hantavirusus. Pirmieji MAk prieš hantavirusus buvo gauti, suleidžiant BALB/c linijos pelėms gyvas, šiuo virusu infekuotų *A. Agrarius coreae* plaučių audinių ląsteles bei aktyvius Hantaan (HTNV) ir Seulo (SEOV) hantavirusus (Franko *et al.* 1983; Yamanishi *et al.* 1984; Sugiyama *et al.* 1987). Vėlesni bandymai gauti MAk buvo panaudojant nukenksmintus HTNV, SEOV ir Puumala (PUUV) hantavirusus (Ruo *et al.* 1991). PUUV N baltymui ir glikoproteinams specifiški MAk buvo gauti infekavus natūralų PUUV nešiotoją rudąjį pelėną (Lundkvist ir Niklasson 1992).

Anksčiau VU BTI ILBS buvo sukurtos 4 hibridomų linijos sekretuojančios MAk prieš vieno iš hantavirusų – PUUV, atmainos Vranica/Hällnäs (PUUV-Vra) N baltymo 1–120 ar. imunodominuojantį rajoną (Žvirblienė *et al.* 2006). Šie MAk buvo gauti, panaudojant imunizacijai chimerinį baltymą, sukurtą genų inžinerijos metodais – hantaviruso N baltymo seka buvo įterpta į baltymą-nešiklį – žiurkėno poliomos viruso kapsidės baltymą VP1 (HaPyVP1/1–120).

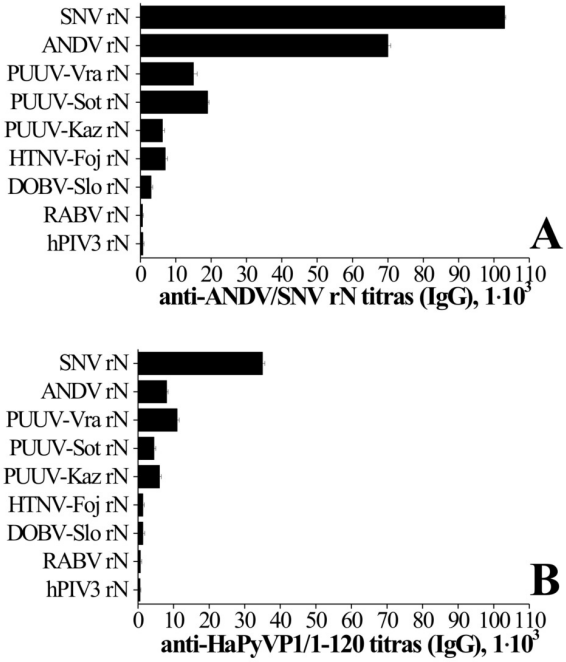
Šiame darbe buvo iškeltas uždavinys sukurti MAk prieš ypač patogeniškų Andes ir Sin Nombre (ANDV ir SNV) hantavirusų N baltymus, siekiant juos pritaikyti minėtų virusų diagnostikai. Mes ištyrėme ANDV ir SNV rekombinantinių N baltymų (ANDV rN ir SNV rN) imunogeniškumą, sukūrėme MAk prieš šiuos baltymus, ištyrėme jų specifiškumą įvairiais metodais ir palyginome šiuos MAk su anksčiau sukurtaisiais MAk prieš PUUV-Vra N baltymo 1–120 ar. seką.

### 3.4.1. MAk prieš ANDV ir SNV rN baltymus gavimas ir charakterizavimas

Imunizacijai buvo panaudoti ANDV ir SNV rN baltymai, susintetinti mielėse *S.cerevisiae* (Ražanskienė *et al.* 2004). Siekiant sukurti kryžmiškai reaguojančius MAk prieš ANDV ir SNV rN baltymus, BALB/c linijos pelės buvo imunizuotos keturis kartus. Pirmoji ir trečioji imunizacijos buvo atliktos su ANDV rN baltymu, antroji – SNV rN baltymu, ketvirtoji (imuninį atsaką prieš hibridizaciją sustiprinanti imunizacija) – taip pat buvo atlikta SNV rN baltymu. Imunizuotų pelių kraujo serumai buvo renkami po kiekvienos imunizacijos ir netiesioginės IFA metodu buvo tiriamas specifiškų antikūnų titras. Imunizacijos ANDV ir SNV rN baltymais sukėlė stiprų humoralinį atsaką pelių organizme. Po paskutinės imunizacijos specifiškų IgG klasės antikūnų titras prieš ANDV ir SNV rN baltymus imunizuotų pelių kraujo serume siekė nuo 1:70 000 iki 1:100 000 (3.11 A pav.).

Antiserumų kryžminės reakcijos buvo tikrintos su kitais rekombinantiniais hantavirusų N baltymais: PUUV-Kaz (Puumala viruso, Kazan atmaina), PUUV-Sot (Puumala viruso, Sotkamo atmaina), PUUV-Vra, HTNV-Foj, DOBV-Slo (Dobrava-Belgrade viruso, Slovenia atmaina). Prieš šiuos baltymus taip pat buvo stebimas stiprus humoralinis atsakas. Specifiškų antikūnų titras siekė 1:6 000–1:19 000. Palyginus kryžmines reakcijas tarp antiserumų, gautų imunizavus peles pilno ilgio SNV ir ANDV rN baltymais ir HaPyVP1/1–120 chimeriniu baltymu, buvo gauti taip pat dideli kryžmiškai reaguojančių antikūnų titrai prieš įvairius hantavirusų rekombinantinius N baltymus (3.11 B pav.). Imunogeniškumo tyrimai parodė, kad atlikus imunizacijas ANDV ir SNV rN

baltymais, didelė tikimybė gauti MAk, kryžmiškai reaguojančius su įvairių hantavirusų N baltymais.




**3.11 pav.** (**A**) Pelių imunizuotų SNV ir ANDV rN baltymais ir (**B**) chimeriniu HaPyVP1/1–120 baltymu antiserumų sąveika su kitų hantavirusų rekombinantiniais, mielėse sintetintais N baltymais. Specifiškų antikūnų titrai nustatyti netiesioginės IFA metodu, atskirai kiekvienai pelių grupei (n = 3)

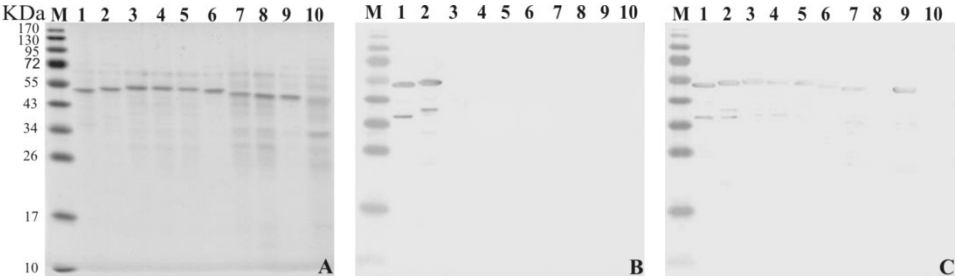
**Fig. 3.11.** Immunoreactivity of antisera collected from mice immunized with SNV and ANDV rN proteins (**A**) and chimeric HaPyVP1/1–120 protein (**B**) compared to other recombinant N proteins of hantaviruses. Antibody titers were determined by ELISA for each group of mice (n = 3)

Suliejus ANDV ir SNV rN baltymais imunizuotos pelės blužnies ląsteles su mielomos Sp2/0 ląstelėmis, buvo gauti 4H3 ir 7G2 hibridomų klonai, sekretuojantys IgG1 klasės antikūnus. Antikūnų specifiškumas SNV ir AND rN baltymams buvo patvirtintas IFA ir IB metodais (3.5 ir 3.6 lentelės; 3.12 pav.).

Siekiant apibūdinti MAk afiniškumą, buvo nustatytos $K_d$ reikšmės, naudojant SNV rN baltymą. Gautos $K_d$ reikšmės ($K_d$(4H3) = $7{,}5\cdot 10^{-10}$ M; $K_d$(7G2) = $2{,}8\cdot 10^{-9}$ M) parodė, jog gautieji MAk pasižymi dideliu afiniškumu SNV rN baltymui.

### 3.4.1.1. MAk prieš hantavirusų N baltymus sąveikos tyrimas su įvairiais hantavirusų rN baltymais

Hibridomų 4H3 ir 7G2 sekretuojamų antikūnų savybė sąveikauti su įvairių hantavirusų rekombinantiniais N baltymais: SNV, ANDV, PUUV-Kaz, PUUV-Sot, PUUV-Vra, TULV, HTNV-Foj, DOBV-Slo, SEOV buvo tirta IFA ir IB metodais (3.5 ir 3.6 lentelės; 3.12 pav.). IFA ir IB rezultatai sutapo. Klono 4H3 MAk reagavo tik su SNV ir ANDV rN baltymais, prieš kuriuos jis buvo gautas (3.5 ir 3.6 lentelės; 3.12 B pav.). Klono 7G2 sekretuojami MAk pasižymėjo dideliu kryžminiu specifiškumu ir reagavo su kitų hantavirusų: PUUV, TULV, HTNV, SEOV rN baltymais (3.5 ir 3.6 lentelės; 3.12 C pav.). Šio klono sekretuojami antikūnai nereagavo su DOBV-Slo rN baltymu (3.5 ir 3.6 lentelės; 3.12 C pav. 8 takelis).




**3.12 pav.** MAk 4H3 (**B**) ir 7G2 (**C**) specifiškumo tyrimas IB metodu, naudojant įvairius hantavirusų rekombinantinius, mielėse susintetintus N baltymus. (**A**) Baltymų elektroforezės nuotrauka. (M – baltymų molekulinio svorio standartas (UAB Fermentas, Lietuva); 1 takelis – SNV rN baltymas; 2 takelis – ANDV rN baltymas; 3 takelis – PUUV-Kaz rN baltymas; 4 takelis – PUUV-Sot rN baltymas; 5 takelis – PUUV-Vra rN baltymas; 6 takelis – TULV rN baltymas; 7 takelis – HTNV-Foj rN baltymas; 8 takelis – DOBV-Slo rN baltymas; 9 takelis – SEOV rN baltymas; 10 takelis – netransformuotų mielių ląstelių grubus lizatas)

**Fig. 3.12.** Western blot analysis of monoclonal antibodies 4H3 (**B**) and 7G2 (**C**) cross-reactivities with recombinant, yeast expressed N proteins of SNV (lane 1), ANDV (lane 2), PUUV-Kaz (lane 3), PUUV-Sot (lane 4), PUUV-Vra (lane 5), TULV (lane 6), HTNV-Foj (lane 7), DOBV-Slo (lane 8), SEOV (lane 9), crude lysate of non-transformed yeast cells (lane 10). Lane M, prestained protein ladder (UAB Fermentas, Lithuania). (**A**) As a control, the same recombinant proteins were run in a SDS polyacrylamide gel and stained with Coomassie blue

Kaip jau minėta, anksčiau buvo sukurti MAk prieš PUUV-Vra viruso N baltymo 1–120 ar. fragmentą (Žvirblienė *et al.* 2006). Žinant, kad hantavirusų N baltymai konservatyvūs ir pasižymi didele pirminės ar. sekos homologija, buvo įdomu ištirti dviejų MAk grupių, gautų skirtingais metodais, specifiškumą (3.4 lentelė).

**3.4 lentelė.** Tyrimui naudoti MAk prieš hantavirusų N baltymus
**Table 3.4.** Monoclonal antibodies against hantavirus N proteins used for the analysis

| Imunogenas | MAk klono pav. |
|---|---|
| Pilno ilgio ANDV ir SNV rN baltymai | 4H3 |
| | 7G2 |
| Chimerinis, VPD formuojantis baltymas, su PUUV-Vra 1–120 ar. segmentu (HaPyVP1/1–120) | 2C6* |
| | 5C5* |
| | 5E11* |
| | 7A5* |

„*“ – anksčiau publikuoti MAk (Žvirbliene *et al.* 2006).

Siekiant palyginti naujai sukurtų ir prieš tai aprašytų MAk kryžmines reakcijas su įvairių hantavirusų N baltymais, IFA ir IB metodais buvo ištirtas jų specifiškumas. Klono 2C6 sekretuojami MAk reagavo tik su PUUV-Vra rN baltymu (3.5 ir 3.6 lentelės). Klono 5E11 sekretuojami MAk reagavo beveik su visais šiame eksperimente naudotais rekombinantiniais hantavirusų N baltymais, išskyrus HTNV-Foj rN baltymą. Klonų 5C5 ir 7A5 MAk sąveika su hantavirusų N baltymais buvo panaši. Šie MAk reagavo su SNV, ANDV, PUUV-Kaz, PUUV-Sot, PUUV-Vra virusų rN baltymais. Nors 5C5 ir 7A5 MAk specifiškumas rekombinantiniams hantavirusų N baltymams buvo panašus, tačiau sąveikos stiprumas skyrėsi. 5C5 MAk sąveika su N baltymais IFA buvo silpnesnė, nei 7A5 MAk sąveika (3.5 ir 3.6 lentelės).

**3.5 lentelė.** MAk sąveika su hantavirusų rekombinantiniais N baltymais (tirta netiesioginės IFA metodu)
**Table 3.5.** Interaction between monoclonal antibodies and recombinant hantavirus N proteins (indirect ELISA test)

| MAk klono pav. / Rombinantiniai N baltymai | Imunogenai | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | pilno ilgio ANDV ir SNV rN baltymai | | chimerinis HaPyVP1/1–120, baltymas su PUUV-Vra 1-120 ar. segmentu | | | |
| | 4H3 | 7G2 | 2C6 | 5C5 | 5E11 | 7A5 |
| SNV | +++ | +++ | - | ++ | ++ | +++ |
| ANDV | +++ | +++ | - | + | ++ | +++ |
| PUUV-Kaz | - | + | - | + | +++ | +++ |
| PUUV-Sot | - | ++ | - | + | +++ | +++ |
| PUUV-Vra | - | ++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| TULV | - | ++ | - | + | +++ | ++ |
| HTNV-Foj | - | + | - | - | - | - |
| DOBV-Slo | - | - | - | - | ++ | - |
| SEOV | - | +++ | - | - | +++ | - |

„+++ „ – labai stipri reakcija, OT>1,0; „++“ – stipri reakcija, OT 0,5–1,0; „+“ – silpna reakcija, OT 0,49–0,2; „-“ – nereaguoja, OT< 0,2.

**3.6 lentelė.** MAk sąveika su hantavirusų rekombinantiniais N baltymais (tirta IB metodu)
**Table 3.6.** Interaction between monoclonal antibodies and recombinant hantavirus N proteins (Western blot test)

| MAk klono pav. / Rekombinantiniai N baltymai | Imunogenai | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | pilno ilgio ANDV ir SNV rN baltymai | | chimerinis HaPyVP1/1–120, baltymas su PUUV-Vra 1–120 ar. segmentu | | | |
| | 4H3 | 7G2 | 2C6 | 5C5 | 5E11 | 7A5 |
| SNV | + | + | - | + | + | + |
| ANDV | + | + | - | + | + | + |
| PUUV-Kaz | - | + | - | + | + | + |
| PUUV-Sot | - | + | - | + | + | + |
| PUUV-Vra | - | + | + | + | + | + |
| TULV | - | + | - | + | + | + |
| HTNV-Foj | - | + | - | - | - | - |
| DOBV-Slo | - | - | - | - | + | - |
| SEOV | - | + | - | - | + | - |

„+“ – teigiama reakcija; „-“ – neigiama reakcija.

Iš gautų rezultatų matyti, kad MAk, gauti naudojant skirtingus antigenus pagal sąveiką su įvairių hantavirusų N baltymais yra gana panašūs. Antikūnai, susidarę po imunizacijos pilno ilgio hantavirusų N baltymais ar chimeriniu baltymu su įterptu hantaviruso N baltymo fragmentu gali atpažinti N baltymus, prieš kuriuos jie gauti (MAk: 4H3 ir 2C6) arba kryžmiškai reaguoti su įvairių hantavirusų N baltymais (MAk: 7G2, 5C5, 5E11, 7A5).

Hantavirusai pagal antigenų kryžminį reaktyvumą skirstomi į tris grupes, priklausomai nuo viruso nešiotojo – graužiko rūšies (Zhenqiang *et al.* 2008):

- *Murinae* šeimos graužikai – HTNV, DOBV ir SEOV nešiotojai;
- *Arvicolinae* šeimos graužikai – PUUV nešiotojai;
- *Sigmodontinae/Neotominae* šeimos graužikai – SNV, ANDV nešiotojai.

MAk, gauti prieš rekombinantinius N baltymus, pagal reaktyvumą su įvairiais hantavirusų N baltymais buvo suskirstyti į grupes pagal prieš tai minėtus kriterijus. MAk 7G2 ir 5E11 sąveikauja su visų trijų grupių hantavirusų N baltymais, o tai patvirtina faktą, kad N baltymas yra ypač konservatyvus tarp hantavirusų (Antic *et al.* 1992). MAk 4H3 atpažįsta tik *Sigmodontinae/Neotominae* graužikų šeimos hantavirusų N baltymus, o 5C5 ir 7A5 klonų sekretuojami MAk reaguoja su *Arvicolinae* ir *Sigmodontinae/Neotominae* graužikų šeimos hantavirusų N baltymais. MAk kryžminis specifiškumas dar kartą patvirtino, kad tarp hantavirusų egzistuoja glaudus filogenetinis ryšys (Chu *et al.* 1994).

### 3.4.1.2. MAk prieš hantavirusų rN baltymus tyrimas *in situ*

IF metodu buvo patikrinta visų 6 MAk sąveika su hantavirusais infekuotomis ląstelėmis. Visi MAk atpažino virusus infekuotose ląstelėse (3.7 lentelė).

IF metodu gauti duomenys apie MAk specifiškumą sutapo su IFA ir IB rezultatais. MAk 4H3 reagavo tik su ANDV ir SNV infekuotomis ląstelėmis. MAk 7G2, 5C5, 5E11 ir 7A5 sąveikavo su įvairiais hantavirusais. Klono 2C6 sekretuojami MAk, skirtingai nei IFA ir IB metodais, reagavo su PUUV-Sot ir PUUV-Kaz virusų atmainomis, o neatpažino PUUV-Vra/Hällnäs (3.7 lentelė). Tarp skirtingų PUUV virusų N baltymų stebima ar. sekų 95 % homologija, o 1–120 ar. fragmentas, prieš kurį yra gautas MAk 2C6, yra ypač homologiškas, todėl skirtingą 2C6 sąveiką naudojant skirtingus analizės metodus gali paaiškinti epitopo struktūros skirtumai, susidarę susivyniojant baltymui natūraliomis sąlygomis ir *in vitro*.

**3.7 lentelė.** MAk sąveika su hantavirusais infekuotomis ląstelėmis (tirta IF metodu)
**Table 3.7.** Interaction between monoclonal antibodies and hantavirus-infected cells (indirect immunofluorescence assay)

| MAk klono pav. / Hantavirusai | Imunogenai | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | pilno ilgio ANDV ir SNV rN baltymai | | chimerinis HaPyVP1/1–120, baltymas su PUUV-Vra 1-120 ar. segmentu | | | |
| | 4H3 | 7G2 | 2C6 | 5C5 | 5E11 | 7A5 |
| SNV P6 [c] | +++ | nt. | - | ++ | +++ | ++ |
| ANDV [d] | +++ | - | - | + | ++ | - |
| PUUV-Kazan p21 [c] | - | nt. | +++ | +++ | +++ | +++ |
| PUUV-Sotkamo [b] | - | + | +++ | +++ | +++ | +++ |
| PUUV-Hällnäs B1 83-223L [a] | - | + | - | +++ | +++ | +++ |
| HTNV 76-118 [a, c] | - | + | - | - | - | - |
| DOBV Slovenia [b, c] | - | - | - | - | + | - |
| Saaremaa virus [b, c] | - | - | - | - | + | - |
| SEOV R22 [a] | - | + | - | + | +++ | - |
| SEOV p-332227 [c] | - | nt. | - | - | +++ | - |

„+++“ – labai stipri sąveika; „++“ – stipri sąveika; „+“ – silpna sąveika; „-“ – sąveikos nėra; „nt.“ – netikrinta.

Buvo ištirta, ar MAk atpažįsta viruso N baltymą natūraliai hantavirusais infekuotų plaučių ir širdies audiniuose. Tam tikslui buvo panaudota 12 natūraliai infekuotų graužikų (*A. Longipilis, A. Olivaceus, O. Longicaudatus* ir *O. nigripes*) plaučių ir širdies audinių iš Argentinos Chubut, Rio Negro bei Misiones vietovių. IF Tyrimai buvo atlikti JAV (angl. *Department of Pathology, Center for Infectious Diseases and Immunology, University of New Mexico School of Medicine*). Ištyrus 12 graužikų audinių mėginių, 11 buvo nustatyta

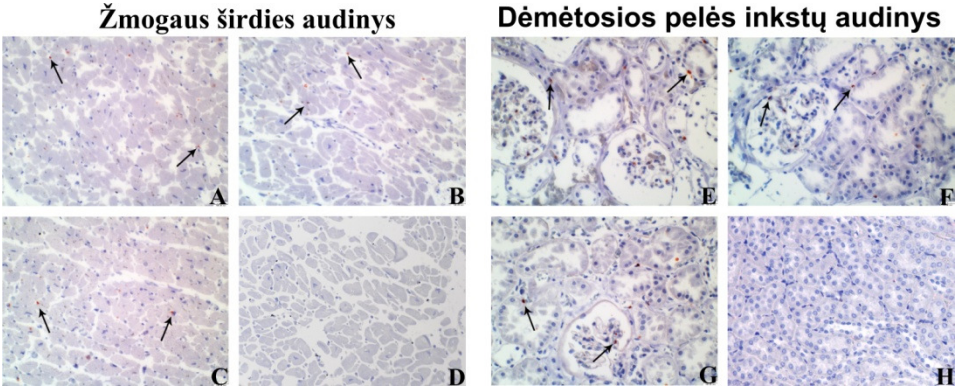
ANDV infekcija. Viruso infekcija buvo patvirtinta AT-PGR metodu. Vienas iš 12 audinių pavyzdžių buvo infekuotas Juquitiba hantavirusu. Visuose graužikų audiniuose virusą atpažino 4H3 klono sekretuojami MAk (3.8 lentelė). Klono 5E11 MAk nereagavo su vienu iš dvylikos audinių, o šio antikūno sąveika su virusais buvo silpnesnė nei su 4H3 MAk (3.8 lentelė).

MAk sąveikos su hantavirusų infekuotais audiniais IH tyrimams taip pat buvo parinkti 4H3 ir 5E11 MAk, kurie pasižymėjo stipria sąveika su rekombinantiniais N baltymais, tiriant IFA ir IB metodais. IH tyrimui buvo panaudoti žmogaus mirusio nuo hemoraginės karštinės su HKIS, kurio sukėlėjas buvo SNV, širdies audinys ir dėmėtosios pelės, infekuotos SNV, inkstų audinys, paimtas 14 dieną po eksperimentinės infekcijos. Tyrimai taip pat buvo atlikti JAV (angl. *Department of Pathology, Center for Infectious Diseases and Immunology, University of New Mexico School of Medicine*). IH tyrimų rezultatai parodė, kad 4H3 ir 5E11 MAk stipriai reaguoja su SNV teigiamais audiniais (3.13 pav.).

**3.8 lentelė.** MAk ir hantavirusų nukleokapsidžių sąveika IF metodu infekuotuose graužikų audiniuose. Tyrimai buvo atlikti JAV (angl. *Department of Pathology, Center for Infectious Diseases and Immunology, University of New Mexico School of Medicine*)
**Table 3.8.** Reactivity of monoclonal antibodies with infected rodant tissues were analyzed using an indirect immunofluorescence assay. Immunofluorescence investigations were done at Department of Pathology, Center for Infectious Diseases and Immunology, University of New Mexico School of Medicine

| **Graužikų rūšis** | **Vietovė** | **Hantavirusai** | **IF teigiamų pavyzdžių skaičius/ IF tikrintas pavyzdžių skaičius*** | |
|---|---|---|---|---|
| | | | **Mak 5E11** | **MAk 4H3** |
| *A. longipilis* | Chubut | ANDV Pietų | 1/1 | 1/1 |
| *A. olivaceus* | Chubut | ANDV Pietų | 3/4 | 1/1 |
| *A. olivaceus* | Chubut | ANDV Pietų | 2/3 | 2/2 |
| *O. longicaudatus* | Chubut | ANDV Pietų | 1/1 | 1/1 |
| *O. longicaudatus* | Chubut | ANDV Pietų | 1/1 | 1/1 |
| *O. longicaudatus* | Chubut | ANDV Pietų | 1/2 | 1/1 |
| *O. longicaudatus* | Chubut | ANDV Pietų | 1/2 | 2/2 |
| *O. longicaudatus* | Chubut | ANDV Pietų | 0/1 | 1/1 |
| *O. longicaudatus* | Rio Negro | ANDV Pietų | 1/2 | 1/1 |
| *O. longicaudatus* | Rio Negro | ANDV Pietų | 1/2 | 2/2 |
| *O. longicaudatus* | Rio Negro | ANDV Pietų | 2/2 | 1/1 |
| *O. nigripes* | Misiones | Juquitiba | 1/2 | 2/2 |

„*“ – Plaučių ir širdies audinių pavyzdžiai.




**3.13 pav.** MAk 4H3 (**A**, **E**) ir 5E11 (**B**, **F**) specifiškumo tyrimas IH metodu. Tyrimams naudoti SNV infekuoti žmogaus širdies (**A–D**) ir dėmėtosios pelės inkstų audinių (**E–H**) mėginiai. Teigiama kontrolė – triušio imunizuoto SNV N baltymu antiserumas (**C**, **G**); Neigiama kontrolė – antikūnai prieš žmogaus gripo viruso hemagliutininą (**D**, **H**). Tyrimai buvo atlikti JAV (angl. *Department of Pathology, Center for Infectious Diseases and Immunology, University of New Mexico School of Medicine*)

**Fig. 3.13.** Immunohistochemistry of SNV-infected human and rodent tissues. (**A-D**), SNV-infected human heart tissues. (**E-H**), SNV-infected deer mouse kidney tissues. Tissue samples were probed with primary antibodies: (**A**, **E**) monoclonal antibodies of clone 4H3; (**B**, **F**) monoclonal antibodies of clone 5E11. (**C, G)**, positive control, rabbit antiserum specific to SNV N protein. (**D**, **H**) negative control, an irrelevant monoclonal antibodies against human influenza virus hemagliutinin. Immunohistochemistry investigations were done at Department of Pathology, Center for Infectious Diseases and Immunology, University of New Mexico School of Medicine

## 3.4.2. Hantavirusų N baltymų antigeninės struktūros tyrimas

Natūralios hantavirusų infekcijos, kaip ir eksperimentinių infekcijų ar imunizacijų su rekombinantiniais baltymais imunologiniai tyrimai rodo, kad hantavirusų N baltymas sukelia stiprų, ilgalaikį imuninį atsaką, o N galinė N baltymo dalis yra ypač imunogeniška ir kryžmiškai reaguojanti (Elgh *et al.* 1998; Geldmacher *et al.* 2005). Atlikus pirminės struktūros N baltymų (SNV, ANDV, PUUV-Kaz, PUUV-Sot, PUUV-Vra, TULV, HTNV-Foj, SEOV ir DOBV-Slo) sekų palyginimą (3.14 pav.), buvo pastebėti dideli sekų panašumai. Paminėtų hantavirusų N baltymų sekos tarpusavyje turi apie 49 % homologiškų ar., todėl MAk prieš šiuos baltymus gali kryžmiškai reaguoti.

```
SNV N          MSTLKEVQDNITLHEQQLVTARQKLKDAERAVELDPDDVNKSTLQSRRAAVSALETKLGE 60
ANDV N         MSTLQELQENITAHEQQLVTARQKLKDAEKAVEVDPDDVNKSTLQSRRAAVSTLETKLGE 60
PUUV-Kaz N     MSDLTDIQEEITRHEQQLVVARQKLKDAERAVEVDPDDVNKNTLQARQQTVSALEDKLAD 60
PUUV-Sot N     MSDLTDIQEDITRHEQQLIVARQKLKDAERAVEVDPDDVNKNTLQARQQTVSALEDKLAD 60
PUUV-Vra N     MSDLTDIQEDITRHEQQLVVARQKLKDAEKAVEMYPDDVNKNTLQARQQTVSALEDKLAD 60
```

```
TULV N          MSQLKEIQEEITRHEQQIVIARQKLKDVEKTVEADPDDVNKSTLQSRRAAVSALEDKLAD 60
HTNV-Foj N      MATMEELQREINAHEGQLVIARQKVRDAEKQYEKDPDELNKRTLTDREGVAVSIQAKIDE 60
SEOV N          MATMEEIQREISAHEGQLVIARQKVKDAEKQYEKDPDDLNKRALHDRESVAASIQSKIDE 60
DOBV-Slo N      MATLEELQKEINNHEGQLVIARQKVKDAEKQYEKDPDDLNKRALSDRESIAQSIQGKIDE 60
                *: : ::* :*. ** *:: ****::*.*:  *  **::** :*  *.  . ::: *: :

SNV N           LKRELADLIAAQKLASKPVDPTGIEPDDHLKEKSSLRYGNVLDVNSIDLEEPSGQTADWK 119
ANDV N          LKRQLADLVAAQKLATKPVDPTGLEPDDHLKEKSSLRYGNVLDVNSIDLEEPSGQTADWK 120
PUUV-Kaz N      YKRRMADAVSRKKMDTKPTDPTGIEPDDHLKERSSLRYGNVLDVNAIDIEEPSGQTADWY 120
PUUV-Sot N      YKRRMADAVSRKKMDTKPTDPTGIEPDDHLKERSSLRYGNVLDVNAIDIEEPSGQTADWY 120
PUUV-Vra N      FKRRMADAVSRKKMDTKPTDPTGIEPDDHLKERSSLRYGNVLDVNAIDIEEPSGQTADWY 120
TULV N          FKRQLADLVSSQKMGEKPVDPTGLEPDDHLKERSSLRYGNVLDVNAIDIDEPSGQTADWF 120
HTNV-Foj N      LKRQLADRIATGKNLGKEQDPTGVEPGDHLKERSMLSYGNVLDLNHLDIDEPTGQTADWL 120
SEOV N          LKRQLADRIAAGKNIGQDRDPTGVEPGDHLKERSALSYGNTLDLNSLDIDEPTGQTADWL 120
DOBV-Slo N      LRRQLADRVAAGKNIGKERDPTGLDPGDHLKEKSMLSYGNVIDLNHLDIDEPTGQTADWL 120
                 :*.:** ::  *   :  ****::*.*****:* * ***.:*:* :*::**:******

SNV N           SIGLYILSFALPIILKALYMLSTRGRQTIKENKGTRIRFKDDSSYEEVNGIRKPRHLYVS 179
ANDV N          AIGAYILGFAIPIILKALYMLSTRGRQTVKDNKGTRIRFKDDSSFEEVNGIRKPKHLYVS 180
PUUV-Kaz N      TIGVYVIGFTIPIILKALYMLSTRGRQTVKENKGTRIRFKDDTSFEDINGIRRPKHLYVS 180
PUUV-Sot N      TIGVYVIGFTLPIILKALYMLSTRGRQTVKENKGTRIRFKDDTSFEDINGIRRPKHLYVS 180
PUUV-Vra N      TIGVYVIGFTLPIILKALYMLSTRGRQTVKENKGTRYRFKDDTSFEDINGIRRPKHLYVS 180
TULV N          SIGQYITGFALAIILKALYMLSTRGRQTIKENKGTRIRFKDDSSYEEINGIRRPKHLYVS 180
HTNV-Foj N      SIIVYLTSFVVPILLKALYMLTTRGRQTTKDNKGTRIRFKDDSSFEDVNGIRKPKHLYVS 180
SEOV N          TIIVYLTSFVVPIILKALYMLTTRGRQTSKDNKGMRIRFKDDSSYEDVNGIRKPKHLYVS 180
DOBV-Slo N      SIVIYLTSFVVPILLKALYMLTTRGRQTTKDNKGMRIRFKDDSSFEDVNGIRKPKHLFLS 180
                :*  *: .*.:.*:*******:****** *:*** * *****:*:*::****:*:**::*

SNV N           MPTAQSTMKADEITPGRFRTIACGLFPAQVKARNIISPVMGVIGFSFFVKDWMERIDDFL 239
ANDV N          MPTAQSTMKAEEITPGRFRTIACGLFPAQVKARNIISPVMGVIGFGFFVKDWMDRIEEFL 240
PUUV-Kaz N      MPTAQSTMKAEELTPGRFRTIVCGLFPTQIQVRNIMSPVMGVIGFSFFVKDWPERIRDFM 240
PUUV-Sot N      MPTAQSTMKAEELTPGRFRTIVCGLFPTQIQVRNIMSPVMGVIGFSFFVKDWSERIREFM 240
PUUV-Vra N      MPTAQSTMKAEELTPGRFRTIVCGLFPTQIQVRNIMSPVMGVIGFSFFVKDWADRIREFM 240
TULV N          MPTAQSTMKADELTPGRFRTIVCGLFPAQIMHRNIISPVMGVIGFSFFVKDWPEKIEEFL 240
HTNV-Foj N      LPNAQSSMKAEEITPGRYRTAVCGLYPAQIKARQMISPVMSVIGFLALAKDWSDRIEQWL 240
SEOV N          MPNAQSSMKAEEITPGRFRTAVCGLYPAQIKARNMVSPVMSVVGFLALAKDWTSRIEEWL 240
DOBV-Slo N      MPNAQSSMKADEITPGRFRTAICGLYPAQVKARNLISPVMSVIGFVALAKNWTERVEEWL 240
                :*.***:***:*:****:**  ***:*:*:  *:::****.*:**  :.*:* .:: :::

SNV N           AARCPFLP-----EQKDPRDAALATNRAYFITRQLQVDESKVSDIEDLIADARAESATIF 294
ANDV N          AAECPFLP-----KPKVASEAFMSTNKMYFLNRQRQVNESKVQDIIDLIDHAETESATLF 295
PUUV-Kaz N      EKECPFIKPEVKPGTPAQEIEFLKRNRVYFMTRQDVLDKNHVADIDKLIDYAASGDPTSP 300
PUUV-Sot N      EKECPFIKPEVKPGTPAQEIEMLKRNKIYFMQRQDVLDKNHVADIDKLIDYAASGDPTSP 300
PUUV-Vra N      EKECPFIKPEVKPGTPTQEIEFLKKNKVYFMDRQNVLDKNHVADIDKLIDYAASGDPTSP 300
TULV N          IKPCPFLK---KSG-PSKEEDFLVSNDAYLLGREKALRESHLAEIDDLIDLAASGDPTPP 296
HTNV-Foj N      IEPCKLLP----DTAAVSLLGGPATNRDYLRQRQVALGNMETKESKAIRQHAEAAGCSMI 296
SEOV N          GAPCKFMA----ESPIAGSLSGNPVNRDYIRQRQGALAGMEPKEFQALRQHSKDAGCTLV 296
DOBV-Slo N      DLPCKLLS----EPSPTSLTKGPSTNRDYLNQRQGALAKMETKEAQAVRKHAIDAGCNLI 296
                   * ::                  *  *:  *:  :   .  :   :   :   . .

SNV N           ADIATPHSVWVFACAPDRCPPTALYVAGMPELGAFFAILQDMRNTIMASKSVGTSEEKLK 354
ANDV N          TEIATPHSVWVFACAPDRCPPTALYVAGVPELGAFFSILQDMRNTIMASKSVGTAEEKLK 355
PUUV-Kaz N      DDIESPNAPWVFACAPDRCPPTCIYVAGMAELGAFFSILQDMRNTIMASKTVGTAEEKLK 360
PUUV-Sot N      DNIDSPNAPWVFACAPDRCPPTCIYVAGMAELGAFFSILQDMRNTIMASKTVGTAEEKLK 360
PUUV-Vra N      DNIESPNAPWVFACAPDRCPPTCIYVAGMAELGAFFSILQDMRNTIMASKTVGTAEEKLK 360
TULV N          DSIKSPQAPWVFACAPDRCPPTCIYIAGMAELGAFFSILQDMRNTIMASKTVGTAEEKLK 356
HTNV-Foj N      EDIESPSSIWVFAGAPDRCPPTCLFIAGIAELGAFFSILQDMRNTIMASKTVGTSEEKLR 356
SEOV N          EHIESPSSIWVFAGAPDRCPPTCLFVGGMAELGAFFSILQDMRNTIMASKTVGTADEKLR 356
DOBV-Slo N      DHIDSPSSIWVFAGAPDRCPPTCLFIAGMAELGAFFAVLQDMRNTIMASKTIGTSEEKLK 356
                  * :* : **** ********.::::.*:.******::************::**::***:

SNV N           KKSAFYQSYLRRTQSMGIQLDQKIIILYMSHWGREAVNHFHLGDDMDPELRELAQTLVDI 414
ANDV N          KKSAFYQSYLRRTQSMGIQLDQKIIILYMLSWGKEAVNHFHLGDDMDPELRQLAQSLIDT 415
PUUV-Kaz N      KKSSFYQSYLRRTQSMGIQLDQRIILLYMLEWGKEMVDHFHLGDDMDPELRGLAQSLIDQ 420
PUUV-Sot N      KKSSFYQSYLRRTQSMGIQLDQRIILLFMLEWGKEMVDHFHLGDDMDPELRGLAQALIDQ 420
PUUV-Vra N      KKSSFYQSYLRRTQSMGIQLDQRIILLYMLEWGKEMVDHFHLGDDMDPELRGLAQALIDQ 420
```

```
TULV N          KKSSFYQSYLRRTQSMGIQLDQRIILLFMTEWGSDIVNHFHLGDDMDPELRTLAQSLIDQ 416
HTNV-Foj N      KKSSFYQSYLRRTQSMGIQLDQRIIVLFMVAWGKEAVDNFHLGDDMDPELRTLAQSLIDV 416
SEOV N          KKSSFYQSYLRRTQSMGIQLDQRIIVMFMVAWGKEAVDNFHLGDDMDPELRSLAQILIDQ 416
DOBV-Slo N      KKSSFYQSYLRRTQSMGIQLDQRIIVLFMVDWGKEAVDSFHLGDDMDPELRGLAQALIDQ 416
                ***:******************:**:::*  ** : *: ************ *** *:*

SNV N           KVREIN-QEPLKL 426
ANDV N          KVKEISNQEPLKL 428
PUUV-Kaz N      KVKEISNQEPLKI 433
PUUV-Sot N      KVKEISNQEPLKI 433
PUUV-Vra N      KVKEISNQDPLKI 433
TULV N          KVKEISNQEPLKI 429
HTNV-Foj N      KVKEISNQEPLKL 429
SEOV N          KVKEISNQEPMKL 429
DOBV-Slo N      KVKEISNQEPLKL 429
                **:**. *:*:*:
```

**3.14 pav.** Hantavirusų N baltymų pirminių struktūrų palyginys. Baltymų pirminės struktūros tyrimas buvo atliktas ClustalW2 programa. („*“ – homologinės ar.; „:“ – panašią funkcinę grupę turinčios ar.; „.“ – funkciškai panašios ar.; „ “ – spėjama MAk 7G2 epitopo sritis; „ “ – spėjama MAk 2C6 epitopo sritis; „ “ – spėjama MAk 5C5 epitopo sritis; „ “ – spėjama MAk 5E11 epitopo sritis; „ “ – spėjama MAk 7A5 epitopo sritis)

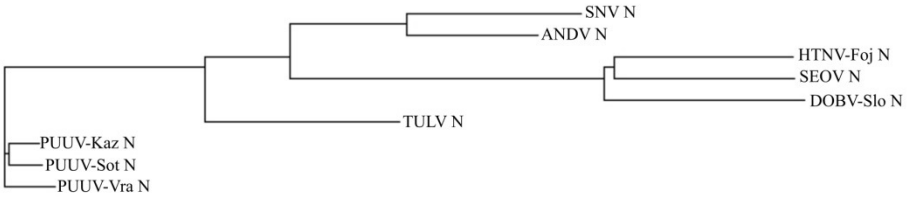
**Fig. 3.14.** Alignment of hantavirus N proteins aa sequences. Alignment of selected proteins primary structure was performed using ClustalW2 („*“ – homologous aa sequences; „:“ – aa with a similar functional group; „.“ – functionally similar aa; „ “ – predicted epitope of 7G2 monoclonal antibodies; „ “ – predicted epitope of 2C6 monoclonal antibodies; „ “ – predicted epitope of 5C5 monoclonal antibodies; „ “ – predicted epitope of 5E11 monoclonal antibodies; „ “ – predicted epitope of 7A5 monoclonal antibodies)

Naudojant CLUSTAL programą, buvo sudarytas filogenetinis hantavirusų N baltymų giminingumo medis (3.15 pav.). Pagal ar. sekos homologiją išsiskiria keturios hantavirusų N baltymų grupės:

1. SNV, ANDV N baltymai;
2. HTNV-Foj, DOBV-Slo ir SEOV N baltymai;
3. TULV N baltymas;
4. PUUV-Kaz, PUUV-Sot, PUUV-Vra N baltymai.

Kadangi hantavirusų N baltymų sekas sieja tam tikra homologija, galima tikėtis, kad šie baltymai gali turėti ir bendrus B ląstelių epitopus.

Hantavirusų N baltymų imunodominuojančių rajonų identifikavimui buvo panaudoti chimeriniai baltymai su įterptais PUUV-Vra hantaviruso N baltymo fragmentais (1–45 ar., 1–180 ar. ir 1–120 ar.), gauti iš EGIS (Gedvilaitė *et al.* 2004). Pirmiausia buvo tiriami MAk, sukurtų prieš PUUV-Vra 1–120 ar. segmentą, epitopai. Netiesioginės IFA rezultatai parodė, kad trijų MAk (2C6, 5C5 ir 5E11) epitopai yra 1–45 ar. fragmente (3.9 lentelė).




**3.15 pav.** Hantavirusų N baltymų filogenetinis giminingumo medis. Atstumas nuo filogenetinio medžio pradžios iki pabaigos parodo baltymų panašumą. Pradinis taškas yra 0 %

**Fig. 3.15.** A phylogenetic tree of hantavirus N proteins. Distance between the beginning and the end of the phylogenetic tree demonstrates protein similarity. A starting point is 0 %

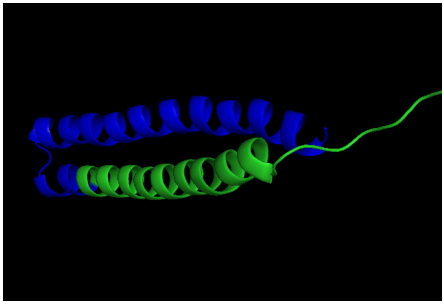
**3.9 lentelė.** MAk prieš hantavirusų N baltymus epitopų nustatymas, naudojant PUUV-Vra N baltymo fragmentus

**Table 3.9.** Identification of monoclonal antibodies epitopes against hantavirus N proteins using PUUV-Vra N protein fragments

| MAk klono pav. | Imunogenai | PUUV-Vra N baltymo epitopų lokalizacija |
|---|---|---|
| **4H3** | pilno ilgio ANDV ir SNV rN baltymai | nenustatyta |
| **7G2** | | 121–433 ar. |
| **2C6** | chimerinis, VPD formuojantis baltymas, su PUUV-Vra 1–120 ar. segmentu (HaPyVP1/1–120) | 1–45 ar. |
| **5C5** | | 1–45 ar. |
| **5E11** | | 1–45 ar. |
| **7A5** | | 81–120 ar. |

Tai patvirtina ankstesnius tyrimus, kad N baltymo 1–45 ar. sritis ypač imunogeniška o susidarę antikūnai prieš šią sritį atlieka viruso infekciją stabdantį poveikį (Koletzki *et al.* 2000). PUUV N baltymo epitopų paieška parodė, jog šioje srityje yra eksponuoti imunodominuojantys epitopai (Lundkvist *et al.* 2002). MAk 7A5 nereagavo su 1–45 ar. ir 1–80 ar. sekomis, todėl jo epitopas buvo lokalizuotas tarp 81 ir 120 ar. Kadangi MAk 7G2, gauti prieš pilno ilgio ANDV ir SNV rN baltymus, kryžmiškai reaguoja su PUUV-Vra N baltymu, tie patys fragmentai buvo panaudoti 7G2 MAk epitopų kartiravimui. MAk 7G2 neatpažino nei vieno chimerinio baltymo, todėl jo epitopas buvo lokalizuotas centrinėje arba C galinėje N baltymo dalyje nuo 121 iki 433 ar. Literatūroje yra duomenų, kad ypač varibilioje hantavirusų N baltymo srityje nuo 241 ar. iki 300 ar. yra lokalizuotas MAk prieš TULV N baltymą epitopas (tarp 226–293 ar.) (Lundkvist *et al.* 1996). ANDV ir SNV N baltymų epitopai, specifiški serotipams, lokalizuoti 244–286 ar. srityje (Tischler *et al.* 2008). 4H3 sekretuojami MAk atpažįsta tik ANDV ir SNV rN baltymus, todėl jo epitopo lokalizacijos vieta nebuvo nustatyta.

Kol kas hantavirusų N baltymų tretinė struktūra nėra išspręsta. Tačiau, yra žinoma, kad hantavirusų N baltymas, sąveikaudamas su viruso RNR sudaro trimerus, kurie suriša viruso genominę RNR sudarydami ribonukleobaltymą (Alfadhli *et al.* 2002). RNR surišantis motyvas buvo identifikuotas konservatyvioje N baltymo dalyje tarp 175 ir 217 ar. (Xu *et al.* 2002). N baltymo trimeras atpažįsta segtuko struktūros RNR, kuri susidaro susijungus komplementariems 3' ir 5' viruso genominės RNR galams (Mir ir Panganiban 2004). N baltymo trimerai susidaro dalyvaujant N ir C baltymo galams (Alfadhli *et al.* 2002; Kaukinen *et al.* 2004). N baltymo N galas, atsakingas už trimerų formavimąsi, formuoja dvi antiparalelines α1 ir α2 spirales (Alfadhli *et al.* 2002). Šis spiralių motyvas dalyvauja keliose baltymo – baltymo reakcijose, kurios atlieka keletą svarbių biologinių funkcijų, tokių kaip signalo perdavimo, transkripcijos reguliavimo ir kt. (Mason ir Arndt 2004). Baltymų duomenų bazėje (PDB) yra pateiktos ANDV ir SNV N baltymų motyvų, formuojančių susisukusias spirales, tretinės struktūros (Boudko *et al.* 2007; Wang *et al.* 2008). Atsižvelgiant į tai, kad N galinė baltymo dalis atsakinga ne tik už N baltymų trimerų formavimąsi, bet ir yra ypač imunogeniška, buvo įdomu, kaip tretinės struktūros modelyje gali atrodyti mūsų identifikuotos hantavirusų N baltymų epitopų vietos. Buvo pasirinkta ANDV N baltymo 1–74 ar. fragmento struktūra, nustatyta branduolio magnetinio rezonanso tyrimu (Wang *et al.* 2008). Analizuojant šį modelį struktūrų peržiūros programa PyMol ir pažymėjus mėlyna spalva imunogenišką 1–45 ar. fragmentą matyti, kad α1 spiralė ir α2 spiralės mažoji dalis, formuojanti N baltymo trimerus ir sąveikaujanti su viruso RNR, gali būti lokalizuota molekulės paviršiuje ir lengvai prieinama B ląstelėms (3.16 pav.).



**3.16 pav.** Imunogeniškas 1–45 ar. fragmentas (pažymėtas mėlyna spalva) ANDV N baltymo 1–74 ar. fragmento tretinės struktūros modelyje

**Fig 3.16.** Immunogenic aa 1–45 fragment (marked in blue) in the model of the tertiary structure of ANDV N protein fragment aa 1–74

Siekiant tiksliau identifikuoti hantavirusų N baltymų epitopus, buvo pasinaudota N baltymų palyginiu (3.14 pav.). Tiriant MAk kryžminį

specifiškumą, buvo nustatyta, jog 7G2 MAk atpažįsta visą rinkinį hantavirusų N baltymų: SNV, ANDV, PUUV-Kaz, PUUV-Sot, PUUV-Vra, TULV, HTNV-Foj, SEOV, išskyrus DOBV-Slo N baltymą. Todėl sekų palyginyje nuo 121 iki 433 ar. buvo ieškoma vietų, kur SNV, ANDV, PUUV-Kaz, PUUV-Sot, PUUV-Vra, TULV, HTNV-Foj, SEOV N baltymų ar. nesutaptų su DOBV-Slo N baltymo. Pavyko identifikuoti 5 tokias vietas (3.14 paveiksle jos pažymėtos melsva spalva). MAk 2C6, 5C5 ir 5E11 atpažįsta epitopus PUUV-Vra N baltymo 1–45 ar. fragmente, todėl pabandėme atlikti epitopų paiešką šio fragmento pirminių sekų palyginiuose. Klono 2C6 MAk reaguoja tik su PUUV-Vra N baltymu, todėl jo epitopas galėtų būti greta 34M ir 35Y amino rūgščių (3.14 pav. šios ar. pažymėtos raudona spalva). MAk 5C5 nereaguoja su HTNV-Foj, DOBV-Slo ir SEOV N baltymais, todėl jo epitopas turėtų būti bendras arba labai panašus tarp SNV, ANDV, PUUV-Kaz, PUUV-Sot, PUUV-Vra ir TULV N baltymų. Palyginyje matyti, kad 2S ir 45Q ar. galėtų įeiti į 5C5 epitopo sudėtį (3.14 pav. šios ar. pažymėtos žalsva spalva). MAk 5E11 neatpažįsta HTNV-Foj N baltymo. 1–45 ar. fragmente matoma 37E HTNV-Foj N baltymo ar., kuri išsiskiria iš kitų, palyginyje naudotų hantavirusų N baltymų, todėl 37E ar. neįeina į MAk 5E11 epitopo sudėtį (3.14 pav. ar., patenkančios į MAk 5E11 spėjamo epitopo sudėtį pažymėtos pilka spalva). MAk 7A5 reaguoja su PUUV-Vra 81–120 ar. fragmentu, todėl jo epitopo buvo ieškoma šio fragmento palyginyje. 7A5 MAk atpažįsta *Arvicolinae* ir *Sigmodontinae/Neotominae* graužikų šeimos hantavirusų N baltymais, todėl ieškota nesutapimų tarp SNV, ANDV, PUUV-Kaz, PUUV-Sot, PUUV-Vra ir HTNV-Foj, DOBV-Slo, SEOV N baltymų ar. sekų. Pavyko identifikuoti net 6 ar. pozicijas, kurios galėtų įeiti į MAk 7A5 epitopo sudėtį (3.14 pav. šios ar. pažymėtos geltona spalva).

### 3.4.3. Rezultatų, gautų tiriant naujas hibridomas prieš hantavirusų rN baltymus, apibendrinimas

Naudojant hantavirusų rekombinantinius N baltymus, buvo sukurti ir detaliai charakterizuoti MAk, pasižymintys įvairiomis kryžminėmis reakcijomis su skirtingų hantavirusų N baltymais. Klonų 7G2 ir 5E11 sekretuojami MAk pasižymėjo didžiausiu kryžminiu specifiškumu. Šie MAk sąveikavo su dauguma hantavirusų rekombinantinių N baltymų. MAk 4H3 ir 2C6 reagavo tik su baltymais, prieš kuriuos jie buvo gauti, t.y., SNV, ANDV ir PUUV-Vra rN baltymus. Klonų 5C5 ir 7A5 MAk reagavo su *Arvicolinae* ir *Sigmodontinae/Neotominae* graužikų šeimos hantavirusų N baltymais. MAk kryžminis specifiškumas dar kartą patvirtino, kad tarp hantavirusų vyrauja glaudus filogenetinis ryšys.

Sukurtieji MAk sąveikavo ne tik su rekombinantiniais N baltymais, bet ir atpažino natyvių virusų nukleokapsides infekuotose ląstelėse. IF ir IH analizė patvirtino, jog rekombinantiniai ir natūralių virusų N baltymai turi panašią antigeninę struktūrą. Dauguma MAk atpažino N galinę N baltymo sritį, kaip ir natūralios hantavirusų infekcijos metu susidarantys antikūnai. Tikslių hantavirusų N baltymų epitopų nepavyko nustatyti, tačiau naudojant PUUV-Vra N baltymo fragmentus pavyko identifikuoti 5 iš 6 MAk apytiksles epitopų vietas. Trijų iš penkių MAk (2C6, 5C5 ir 5E11) epitopai buvo lokalizuoti tarp 1 ir 45 ar. MAk 7A5 epitopas buvo lokalizuotas rPUUV-Vra N baltymo sekoje tarp 81 ir 120 ar. Klono 7G2 MAk, gauto prieš SNV ir AND rN baltymus, epitopas buvo lokalizuotas N baltymo dalyje nuo 121 iki 433 ar. MAk 4H3 nereagavo su PUUV-Vra N baltymu, todėl jo epitopo lokalizacijos nepavyko nustatyti.

IH tyrimas, naudojant infekuotų žmonių ir graužikų audinių mėginius, patvirtino naujai sukurtų MAk diagnostinę vertę. Gauti duomenys apie MAk specifškumą svarbūs, kuriant serologinius ir imunohistocheminius hantavirusų diagnostikos metodus.

## 3.5. Monokloninių antikūnų prieš pasiutligės viruso rekombinantinį nukleokapsidės baltymą gavimas, charakterizavimas ir taikymas šio baltymo antigeninės struktūros tyrimams

Pasiutligė yra viena iš seniausiai aprašytų infekcinių ligų, kurią sukelia *Rhabdoviridae* šeimai, *Lyssavirus* genčiai priklausantys virusai. Šie virusai negrįžtamai paveikia centrinę nervų sistemą, infekuodami neuronus ir sukeldami progresuojantį encefalitą, todėl virusu infekuotą organizmą neišvengiamai ištinka mirtis (Knipe ir Howley 2007).

Lisavirusų N baltymas yra pagrindinis viruso nukleokapsidės komponentas, kuris kartu su viruso genomine RNR, nuo RNR priklausančia RNR polimeraze (L) ir fosfobaltymu (P) sudaro ribonukleobaltymą. Nukleokapsidę dengia dvisluoksnis lipidinis apvalkalas su įsiterpusiais glikoproteino (G) trimerais. (Knipe ir Howley 2007). Nors lisavirusų infekcijos metu neutralizuojantys antikūnai susidaro prieš glikoproteiną, N baltymui specifiškų antikūnų nustatymas svarbus diagnostikos tikslais (Esterhuysen *et al.* 1995). Kuriant serologinius diagnostikos metodus, svarbu turėti saugius gerai charakterizuotus viruso komponentus, kurie būtų skirti antikūnams prieš virusus nustatyti, arba MAk prieš viruso baltymus, kuriais būtų galima tiesiogiai nustatyti virusą. Todėl buvo iškeltas uždavinys ištirti rekombinantinio, mielėse *S. cerevisiae*

susintetinto klasikinio pasiutligės viruso (RABV) N baltymo imunogenines ir antigenines savybes, sukurti MAk prieš šį baltymą ir pritaikyti juos RABV N baltymo antigeninės struktūros tyrimams bei diagnostinėms sistemoms kurti.

### 3.5.1. Pasiutligės virusų rekombinantinių N baltymų antigeninių savybių tyrimas

Rekombinantinio baltymo gebėjimas aktyvinti organizmo imuninę sistemą taip, kaip tai daro natyvaus viruso baltymas, yra svarbi baltymo, prieš kurį norima gauti imunodiagnostikai tinkančius MAk, savybė. Todėl pirmiausia buvo atliktas mielėse susintetintų pasiutligės virusų N baltymų antigeninių savybių tyrimas. Buvo ištirti rekombinantiniai N baltymai, sukurti VU BTI EGIS:

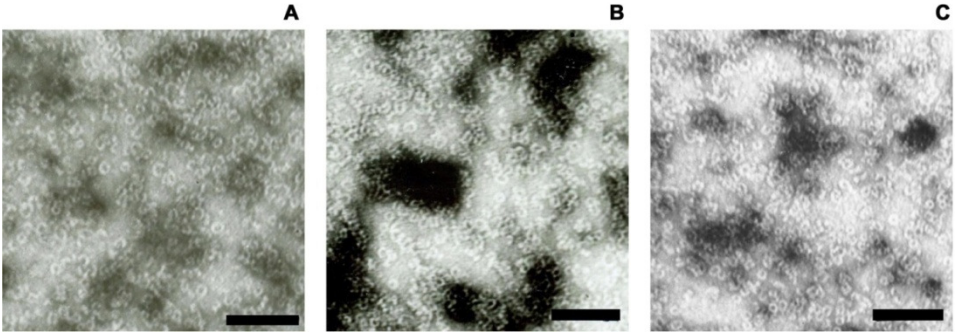
- klasikinio pasiutligės viruso rekombinantinis N baltymas – RABV rN;
- Europos šikšnosparnių lisaviruso pirmojo tipo rekombinantinis N baltymas – EBLV-1 rN;
- Europos šikšnosparnių lisaviruso antrojo tipo rekombinantinis N baltymas – EBLV-2 rN.

Tyrimui buvo panaudoti *Friedrich Loeffler Institute* (Vokietija) sukaupti eksperimentinių vakcinuotų ir laukinių gyvūnų serumų rinkiniai bei anksčiau sukurtų MAk rinkinys, skirtas lisavirusų infekcijos diferencinei diagnostikai (3.10 lentelė).

Pasiutligę sukeliantys virusai pasižymi didele atmainų gausybe, N baltymo sintezei mielėse ir MAk gavimui buvo pasirinktas plačiai paplitęs ir vienas iš labiausiai ištirtų RABV CVS-11 kamienas (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=11294&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock). Šis kamienas dar vadinamas standartiniu, todėl jis dažnai naudojamas kaip pasiutligės viruso modelis įvairiuose tyrimuose bei kuriant vakcinas. EGIS taip pat buvo susintetinti dar du *Lyssavirus* genčiai priklausančių virusų (EBLV-1 ir EBLV-2) rN baltymai. EBLV-1 rN baltymo sintezei buvo parinkta RV1423 atmaina išskirta iš natūraliai infekuoto *Eptesicus serotinus* šikšnosparnio 1997 metais Vokietijoje, o EBLV-2 rN baltymo – RV1333 atmaina, aptikta žmoguje 2002 metais Škotijoje. Visos trys pasiutligės virusų atmainos natūralios infekcijos metu sutinkamos Europoje. Rekombinantiniai mielėse sintetinti trijų genotipų lisavirusų N baltymai (RABV rN, EBLV-1 rN ir EBLV-2 rN) formuoja tipiškas žiedines nukleokapsidės struktūras, matomas elektroniniu mikroskopu (3.17 pav.).

Pirmiausia N baltymų specifiškumas buvo tirtas IB metodu, panaudojant ankščiau sukurtus MAk (klonas HAM), atpažįstančius skirtingų genotipų *lyssavirus* genties virusų N baltymus. Šie MAk buvo gauti iš Šveicarijos Pasiutligės centro. Kaip ir buvo tikėtasi, MAk HAM atpažino visus tris mielėse

susintetintus pasiutligės virusų N baltymus.

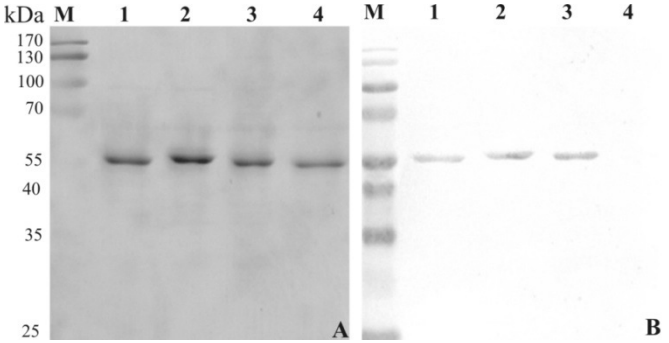



**3.17 pav.** Elektroninės mikroskopijos nuotraukos: (**A**) RABV rN baltymo formuojamos NPD; (**B**) EBLV-1 rN baltymo formuojamos NPD; (**C**) EBLV-2 rN baltymo formuojamos NPD. Padidinimas – 100 000 kartų. Brūkšniai dešiniajame nuotraukų kampe atitinka 100 nm. Nuotraukos gautos iš BTI EGIS

**Fig. 3.17.** Electron micrographs of RABV rN (**A**), EBLV-1 rN (**B**) and EBLV-2 rN (**C**). All rN proteins form nucleocapsid-like structures. Magnification – 100 000 times. Micrographs were provided by the Department of Eukaryote Gene Engineering of the Institute of Biotechnology

Rekombinantinių lisavirusų N baltymų antigeninės savybės taip pat buvo ištirtos, naudojant vakcinuotų gyvūnų antiserumus. Antiserumai buvo gauti po vakcinacijos komercine pasiutligės vakcina HDCV, į kurios sudėtį įeina nukenksminta klasikinio pasiutligės RABV viruso CVS-11 atmaina. Natyvaus viruso N baltymo ir rekombinantinių virusų N baltymų antigeninis panašumas buvo įvertintas IB (3.18 pav.). Nustatyta, kad denatūruoti pasiutligės virusų rN baltymai reaguoja su antikūnais, susidariusiais vakcinuoto triušio kraujyje prieš viruso N baltymą. IB rezultatai patvirtina, jog mielių raiškos sistemoje sintetintų baltymų antigeninė struktūra, lyginant su natyvių virusų, yra panaši.

Siekiant patvirtinti rekombinantinių RABV, EBLV-1 ir EBLV-2 N baltymų antigeninį panašumą su natūralaus viruso N baltymu, buvo panaudota grupė MAk prieš N baltymą, gautų naudojant skirtingus *lyssavirus* genties virusus (3.10 lentelė). Šie antikūnai pasižymi skirtingu reaktyvumu tarp lisavirsų ir iki šiol yra naudojami naujai aptiktų lisavirusų izoliatų diferencijavimui (3.10 lentelė). RABV, EBLV-1, EBLV-2 rN baltymų antigeninės savybės buvo tirtos netiesioginės IFA, IB, taškinio imunoblotingo (TIB) ir IF metodais (3.11 lentelė). Nei vienas iš dešimties MAk neatpažino RABV rN, EBLV-1 rN ir EBLV-2 rN baltymų, tiriant IB metodu. Todėl galima daryti prielaidą, kad antikūnai lisavirusų infekcijos atveju susidaro prieš komformacinius N baltymų epitopus. Patikrinus MAk sąveiką IFA metodu, MAk pasižymėjo skirtingu specifiškumu (3.19 pav.).




**3.18 pav.** Mielėse sintetintų RABV, EBLV-1, EBLV-2 rN baltymų sąveika su vakcinuoto triušio antiserumu. Antiserumas gautas vakcinuojant triušį komercine pasiutligės vakcina (HDVC). (**A**) Baltymų elektroforezės nuotrauka. (**B**) IB su vakcinuoto triušio antiserumu nuotrauka. (M. baltymų molekulinio svorio standartas (UAB Fermentas, Lietuva); 1 takelis – RABV rN baltymas; 2 takelis – EBLV-1 rN baltymas; 3 takelis – EBLV-2 rN baltymas; 4 takelis – PUUV-Vra rN baltymas (neigiama kontrolė))

**Fig. 3.18.** Reactivity of yeast-expressed N proteins of RABV (lane 1), EBLV-1 (lane 2) and EBLV-2 (lane 3) in Western blot with rabbit serum raised against a comercial RABV vaccine (HDVS) (**B**). As controls a corresponding Coomassie blue-stained gel (**A**). Lane M, prestained protein ladder (UAB Fermentas, Lithuania). Lane 4, negative control, PUUV-Vra rN protein

Du iš dešimties MAk (W239.17 ir LBV736) atpažino visus tris rekombinantinius baltymus. MAk W187.5, W187.11.12 ir Z144.88 reagavo tik su RABV rN, o MAk MAS6.3, DUV6.15.13 ir S62.1.2 su EBLV-1 rN. MAk MW187.6.1 atpažino tiek RABV rN, tiek EBLV-2 rN baltymus. Atlikus tyrimus TIB ir IF analizės metodais, dauguma rezultatų sutapo, tačiau išsiskyrė MAk LBV763. TIB ir IF analizėje šis MAk neatpažino nei vieno rekombinantinio baltymo, o iš IFA metodu gautų rezultatų matyti, kad jie sąveikauja su visais trimis N baltymais (3.19 pav.). MAk LBV763 buvo gauti prieš Lagoso šikšnosparnių viruso N baltymą ir buvo tikėtasi, kad jie bus tinkami šio viruso identifikavimui (Mebatsion *et al.* 1992). Tačiau mūsų tyrimas parodė, kad šie MAk kryžmiškai reaguoja su kitų genotipų lisavirusais, šiuo atveju su RABV.

Tyrimas parodė, jog MAk, gauti prieš natyvius virusus reaguoja su rekombinantiniais mielėse sintetintais N baltymais ir natyvių RABV, EBLV-1 ir EBLV-2 virusų nukleokapsidėmis infekuotose ląstelėse. Todėl galima teigti, kad mielėse susintetintų N baltymų ir laukinio tipo virusų N baltymų erdvinė struktūra yra analogiška.

**3.10 lentelė.** MAk rinkinys, skirtas lisavirusams diferencijuoti (Schneider *et al.* 1980, 1981, 1985; Umoh *et al.* 1990; Cox *et al.* 1992). MAk buvo gauti prieš natyvių lisavirusų N baltymus

**Table 3.10.** Monoclonal antibodies collection for differentiation of lyssavirus genotypes. Monoclonal antibodies were generated against native lyssavirus N proteins (Schneider *et al.* 1980, 1981, 1985; Umoh *et al.* 1990; Cox *et al.* 1992)

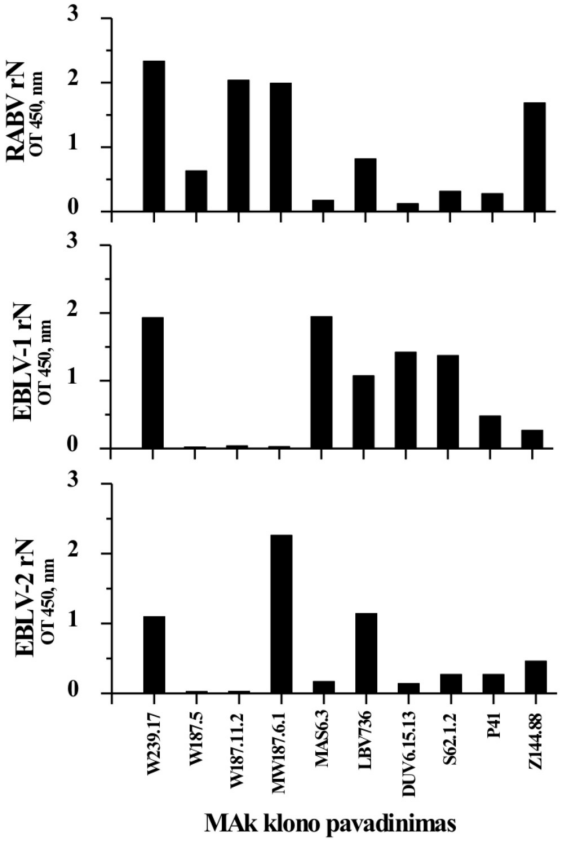
| MAk klono pav. | lisavirusų izoliatai, panaudoti MAk gauti | MAk reaguoja su: | MAk nereaguoja su: |
|---|---|---|---|
| W239.17 | europietiškos lapės viruso RABV izoliatas | RABV, MOKV, DUUV, EBLV, LBV; įvairiomis vakcinų atmainomis: CVS, CVS-11, LEP, ERA, HEP, PM, SAD-Berne, SAD-19, TÜ 33, CTN-1 | nenustatyta |
| W187.5 | europietiškos lapės viruso izoliatas | RABV, šunų ir kačių izoliatais iš Nigerijos; vakcinos atmaina LEP | SAD-Berne, SAD-B19, ERA, TÜ 33, EBLV, MOKV, LBV, DUVV |
| W187.11.2 | europietiškos lapės viruso izoliatas | RABV, šunų ir kačių izoliatais iš Nigerijos; vakcinų atmainomis: LEP, SAD | EBLV, MOKV, DUVV, LBV |
| MW187.6.1 | poliarinės lapės MOKV ir RABV izoliatai | RABV, MOKV, LBV, DUVV, EBLV; šunų ir kačių izoliatais iš Nigerijos | SAD |
| MAS6.3 | poliarinės lapės MOKV izoliatas | MOKV, EBLV-F1, LBV(L2, L3), šunų ir kačių izoliatais iš Nigerijos ir Etiopijos | LEP, LBV, DUVV |
| LBV736 | poliarinės lapės LBV izoliatas | DUVV, EBLV-F1; šunų izoliatais iš Nigerijos | LEP, Etiopijos RABV atmainos, MOKV, LBV |
| DUV6.15.13 | poliarinės lapės DUV viruso izoliatas | EBLV, DUVV; šunų izoliatais iš Nigerijos | LEP, Etiopijos RABV atmainos, MOKV, LBV |
| S62.1.2 | Poliarinės lapės EBLV-1 viruso izoliatas | EBLV, DUVV | SAD B19, Europo RABV izoliatai |

| | | | |
|---|---|---|---|
| P41 | poliarinės lapės RABV izoliatas | poliarinių lapių pasiutligės izoliatais ir šunų izoliatais iš Nigerijos | LBV; MOKV; DUVV; RABV vakcinų kamienai; šikšnosparnių virusai iš Vokietijos ir Afrikos |
| Z144.88 | šuns iš Nigerijos viruso izoliatas | dauguma RABV izoliatais ir vakcinų atmainomis | MOKV; DUVV; LBV; EBLV-F1 |

**3.11 lentelė.** RABV, EBLV-1 ir EBLV-2 rekombinantinių N baltymų antigeninių savybių tyrimas IFA, TIB ir IF metodais, naudojant anksčiau sukurtų MAk rinkinį
**Table 3.11.** Characterization of RABV, EBLV-1 and EBLV-2 recombinant N proteins antigenic properties by ELISA, dot blot and immunofluorescence methods using the previously developed collection of monoclonal antibodies

| **MAk klono pav.** | **Antigenas** | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **RABV** | **RABV rN** | | **EBLV-1** | **EBLV-1 rN** | | **EBLV-2** | **EBLV-2 rN** | |
| | **IF [a]** | **IFA [b]** | **TIB [c]** | **IF [a]** | **IFA [b]** | **TIB [c]** | **IF [a]** | **TIB [c]** | **IFA [b]** |
| **W239.17** | + | ++ | + | + | ++ | + | + | + | + |
| **W187.5** | + | + | + | - | - | - | - | - | - |
| **W187.11.2** | + | ++ | + | - | - | - | - | - | - |
| **Z144.88** | + | ++ | + | - | - | - | - | - | - |
| **MW187.6.1** | + | ++ | + | - | - | - | + | ++ | + |
| **MSA6.3** | - | - | - | + | ++ | + | + | - | - |
| **DUV6.15.13** | - | - | - | + | + | + | + | - | - |
| **S62.1.2** | - | - | - | + | + | + | - | - | - |
| **LBV736** | - | + | - | - | + | - | - | + | - |
| **P41** | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

[a] Sąveika tirta IF metodu : „+“ – sąveika yra, „-“– sąveikos nėra.
[b] Sąveika tirta IFA metodu: „++“– stipri sąveika (OT >1,5); „+“ – silpna sąveika (OT 1,49–1,0); „-“ – sąveikos nėra (OT< 0,5).
[c] Sąveika tirta TIB metodu: „+“ – sąveika yra, „-“ – sąveikos nėra.




**3.19 pav.** Mielėse sintetintų *Lyssavirus* genties virusų N baltymų charakterizavimas netiesioginės IFA metodu, naudojant lisavirusams specifiškų MAk rinkinį.
**Fig. 3.19.** Characterisation of yeast-expressed N proteins of RABV, EBLV-1 and EBLV-2 with ten N protein-specific monoclonal antibodies in ELISA

## 3.5.2. MAk prieš RABV rN baltymą gavimas ir charakterizavimas

Siekiant sukurti MAk, trys BALB/c linijos pelės buvo imunizuotos RABV rN baltymu. Hibridizacijai buvo pasirinkta pelė, kurios specifinių antikūnų titras siekė 1:72 000. Po hibridizacijos pavyko gauti dvi hibridomų linijas, sekretuojančias IgG1 klasės antikūnus (4A12, 6G7) ir dvi – IgG2a klasės antikūnus (3G8, 5F12). MAk specifiškumas RABV rN baltymui buvo patvirtintas netiesioginės IFA ir IB metodais.

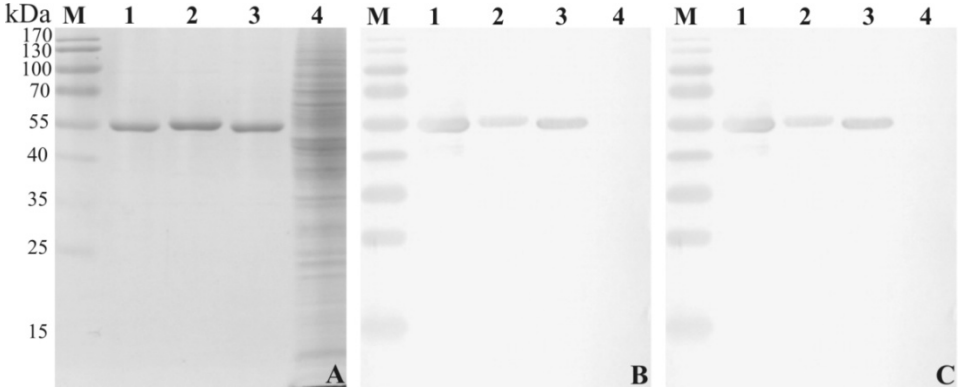
IB metodu buvo tiriama MAk ir denatūruotų N baltymų sąveika. Tik MAk 4A12 ir 6G7 sąveikavo su RABV rN baltymu (3.20 pav.). Buvo padaryta prielaida, kad 3G8 ir 5F12 MAk atpažįsta konformacinius epitopus ir nesąveikauja su denatūruotu, erdvinę struktūrą paradusiu N baltymu, tiriant IB metodu. IFA metodu buvo nustatytos $K_d$ reikšmės. Gautos $K_d$ reikšmės ($K_d$(3G8) = $1{,}4\cdot 10^{-10}$ M; $K_d$(4A12) = $2{,}2\cdot 10^{-9}$ M; $K_d$(5F12) = $2{,}1\cdot 10^{-9}$; $K_d$(6G7) = $3{,}6\cdot 10^{-9}$) parodė, jog MAk prieš RABV rN baltymą pasižymi dideliu afiniškumu antigenui.

### 3.5.2.1. MAk prieš RABV rN baltymą kryžminio specifiškumo tyrimas

Europos žemyne dažniausiai sutinkami ir literatūroje aprašomi trys pagrindiniai pasiutligę sukeliantys virusai, priklausantys *Rhabdoviridae* šeimai, *Lyssavirus* genčiai: klasikinis pasiutligės virusas (RABV), priskirtas 1 genotipui; Europos šikšnosparnių lisavirusas 1 (EBLV-1), priklausantis 5 genotipui ir Europos šikšnosparnių lisavirusas 2 (EBLV-2), priklausantis 6 genotipui. Naudojant ClustalW2 kompiuterinę programą buvo atliktas RABV N, EBLV-1 N ir EBLV-2 N baltymų pirminių baltymų sekų palyginimas (3.21 pav.). Sugretinus pasiutligės virusų N baltymų sekas matyti, kad baltymai yra gana homologiški (3.21 pav.). RABV N baltymo ar. seka skiriasi nuo EBLV-1 N 12,3 %, o nuo EBLV-2 N – 13,4 %. Tarpusavyje EBLV-1 N ir EBLV-2 N baltymai turi 13,3 % nehomologiškų ar. Palyginus pasiutligės virusų pirminę N baltymų struktūrą su tai pačiai *Rhabdoviridae* šeimai priklausančio Indijos vezikulinio stomatito viruso N baltymo struktūra, ar. homologija buvo labai maža, tik 20 % (rezultatas nerodomas). Šie rezultatai rodo, kad pasiutligės virusams priklausantys N baltymai turi išskirtinai homologišką priminę struktūrą. Todėl charakterizuojant naujus MAk prieš RABV N baltymą buvo svarbu nustatyti jų kryžminį specifiškumą su EBLV-1 ir EBLV-2 N baltymais. Kryžminio specifiškumo tyrimas buvo atliktas IFA ir IB metodais.

Ištyrus MAk ir rekombinantinių N baltymų sąveiką, MAk galima suskirstyti į tris grupes (3.12 lentelė):

1) 3G8 ir 5F12 sąveikauja su RABV, EBLV-1 ir EBLV-2 rN baltymais tik netiesiogines IFA metodu, atpažįsta konformacinius epitopus;
2) 4A12 atpažįsta linijinį epitopą RABV, EBLV-1 ir EBLV-2 rN baltymuose (reaguoja netiesioginėje IFA ir IB );
3) 6G7 atpažįsta RABV rN baltymą IFA ir IB, o su EBLV-1, EBLV-2 rN baltymais sąveikauja tik IB. Todėl galima daryti prielaidą, kad šio MAk epitopas RABV rN baltymo paviršiuje yra lengvai pasiekiamas, o EBLV-1 rN, EBLV-2 rN baltymų ta pati seka yra neprieinama antikūnams.




**3.20 pav.** MAk prieš RABV rN baltymą 4A12 (**B**) ir 6G7 (**C**) specifiškumo tyrimas IB metodu, naudojant rekombinantinius *Lyssavirus* genties virusų N baltymus. (**A**) Baltymų elektroforezės nuotrauka. (M – baltymų molekulinio svorio standartas (UAB Fermentas, Lietuva); 1 takelis – RABV rN baltymas; 2 takelis – EBLV-1 rN baltymas; 3 takelis – EBLV-2 rN baltymas; 4 takelis – netransformuotų mielių ląstelių grubus lizatas)

**Fig. 3.20.** Western blot analysis of monoclonal antibodies 4A12 (**B**) and 6G7 (**C**) cross-reactivities with recombinant, yeast expressed N proteins of RABV (lane 1), EBLV-1 (lane 2), EBLV-2 (lane 3), crude lysate of non-transformed yeast cells (lane 10). Lane M, prestained protein ladder (UAB Fermentas, Lithuania). (**A**) As a control the same recombinant proteins were run in SDS polyacrylamide gel and stained with Coomassie blue

```
RABV N (CVS-11)     MDADKIVFKVNNQVVSLKPEIIVDQYEYKYPAIKDLKKPCITLGKAPDLNKAYKSVLSGM 60
EBLV-1 N (RV1423)   MDVNKVVFKVHNQLVSVRPEVISDQYEYKYPAIKDKKKPSITLGKDPDLKTAYKSILSGM 60
EBLV-2 N (RV1333)   MDADRIVFKVHNQLVSVKPEVIVDQYEYKYPAIKDRKKPSITLGKAPDLNRAYKSILSGI 60
                    **.:::****:**:**::**:* ************ ***.***** ***: ****:***:

RABV N (CVS-11)     NAAKLDPDDVCSYLAAAMQFFEGTCPEDWTSYGILIARKGDRITPNSLVEIKRTDVDGNW 120
EBLV-1 N (RV1423)   NAAKLDPDDVCSYLAGAMVLFEGICPEDWTSYGINIAKKGDKITPATLVDIHRTNTEGNW 120
EBLV-2 N (RV1333)   NAARLDPDDVCSYLAAAMALFEGICPDDWESYGILIARKGDKITPANLVNIQRTDVEGNW 120
                    ***:***********.** :*** **:** **** **:***:*** .**:*:**:.:***

RABV N (CVS-11)     ALTGGMELTRDPTVSEHASLVGLLLSLYRLSKISGQNTGNYKTNIADRIEQIFETAPFVK 180
EBLV-1 N (RV1423)   AQTGGQDLTRDPTTPEHASLVGLLLCLYRLSKIVGQNTGNYKTNVADRMEQIFETAPFVK 180
EBLV-2 N (RV1333)   ALAGGQDVIKDPTPAEHASLVGLLLCLYRLSKVSGQNTGNYKTNVADRMEQIFETAPFVK 180
                    * :** :: :*** .**********.******: **********:***:***********

RABV N (CVS-11)     IVEHHTLMTTHKMCANWSTIPNFRFLAGTYDMFFSRIEHLYSAIRVGTVVTAYEDCSGLV 240
EBLV-1 N (RV1423)   IVEHHTLMTTHKMCANWSTIPNFRFLAGAYDMFFARIEHLYSAIRVGTVVTAYEDCSGLV 240
EBLV-2 N (RV1333)   IVEHHTLMTTHKMCANWSTIPNFRFLAGTYDMFFSRIEHLYSAIRVGTVVTAYEDCSGLV 240
                    ****************************:*****:************************

RABV N (CVS-11)     SFTGFIKQINLTAREAILYFFHKNFEEEIRRMFEPGQETAVPHSYFIHFRSLGLSGKSPY 300
EBLV-1 N (RV1423)   SFTGFIKQINLTAREAILYFFHKNFEEEIKRMFEPGQETAVPHSYFIHFRSLGLSGKSPY 300
EBLV-2 N (RV1333)   SFTGFIRQINLTAKEAILYFFHKNFEEEIKRMFEPGQETAVPHSYFIHFRSLGLSGKSPY 300
                    ******:******:***************:****************************

RABV N (CVS-11)     SSNAVGHVFNLIHFVGCYMGQVRSLNATVIAACAPHEMSVLGGYLGEEFFGKGTFERRFF 360
EBLV-1 N (RV1423)   SSNAVGHVFNLIHFVGCYMGQIRSLNATVIQSCAPHEMSVLGGYLGEEFFGKGTFERRFF 360
```

```
EBLV-2 N (RV1333)   SSNAVGHVFNLIHFVGSYMGQVRSLNATVIATCAPHEMSVLGGYLGEEFFGKGTFERRFF 360
                    ****************.****:******** :****************************

RABV N (CVS-11)     RDEKELQEYEAAELTKTDVALADDGTVNSDDEDYFSGETRSPEAVYTRIMMNGGRLKRSH 420
EBLV-1 N (RV1423)   RDEKELQDYEAAESTKVDVALADDGTVNSDDEDFFSGDTRSPEAVYTRIMMNGGRLKRSH 420
EBLV-2 N (RV1333)   RDERELAEHEAIESTKTDVALADDGTVNSDDEELYSGGTRTPEAVYTRIMVNGGKLKKSH 420
                    ***:** ::** * **.***************: :** **:*********:***:**:**

RABV N (CVS-11)     IRRYVSVSSNHQARPNSFAEFLNKTYSNDS- 450
EBLV-1 N (RV1423)   IKRYVSVSANHQARPNSFAEFLNKTYSSDPR 451
EBLV-2 N (RV1333)   IKRYVSVSSNHQARPNSFAEFLNKTYSSDPR 451
                    *:******:******************.*.
```

**3.21 pav.** Lisavirusų: RABV, EBLV-1, EBLV-2 N baltymų pirminės struktūros palyginimas, atliktas ClustalW2 programa. („*“ – homologinės ar.; „:“ – panašią funkcinę grupę turinčios ar.; „.“ – funkciškai panašios ar.)

**Fig. 3.21.** Alignment of RABV, EBLV-1 and EBLV-2 N protein aa sequences. Alignment of selected proteins primary structures was performed using ClustalW2. („*“ – homologous aa sequences; „:“ – aa with a similar functional group; „.“ – functionally similar aa)

**3.12 lentelė.** MAk prieš RABV rN baltymą sąveika su *Lyssavirus* genties virusų rekombinantiniais N baltymais netiesioginės IFA ir IB metodais

**Table 3.12.** Interaction between monoclonal antibodies against RABV rN protein and lyssavirus recombinant N proteins using indirect ELISA and Western bolt analysis

| MAk klono pav. | RABV rN | | EBLV-1 rN | | EBLV-2 rN | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | IFA | IB | IFA | IB | IFA | IB |
| 3G8 | + | - | + | - | + | - |
| 5F12 | + | - | + | - | + | - |
| 4A12 | + | + | + | + | + | + |
| 6G7 | + | + | - | + | - | + |

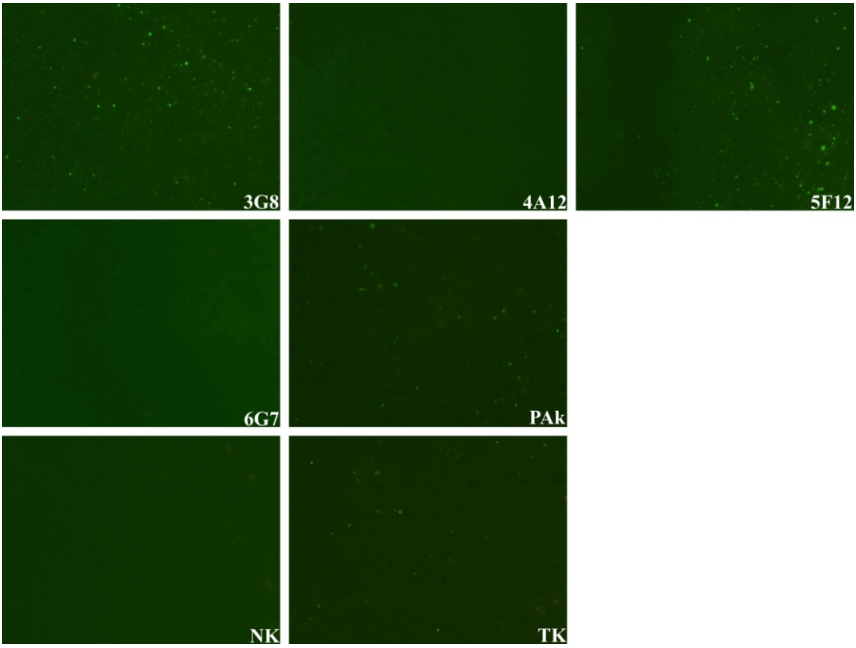
Sąveika tirta IFA metodu: „+“ – sąveika yra, OT >0,5; „-“ – sąveikos nėra, OT< 0,5.
Sąveika tirta IB metodu: „+“ – sąveika yra, „-“ – sąveikos nėra.

### 3.5.2.2. MAk prieš RABV rN baltymą specifiškumo tyrimas *in situ*

Pasiutligės viruso infekcijos metu ląstelėse susiformuoja 2–10 µm skersmens N baltymo agregatai, vadinami Negri kūneliais. Negri kūneliai būdingi tik pasiutligės viruso infekuotoms nervų ląstelėms, todėl jie svarbūs, histologiškai diagnozuojant pasiutligės viruso infekciją. Pagal PSO patvirtintą protokolą, pasiutligės virusų infekcijos diagnostika turi būti atliekama tiesioginės IF metodu, naudojant antikūnus prieš ribonukleobaltymus. Šis metodas laikomas auksiniu standartu, nustatant pasiutligės virusus infekuotų gyvūnų centrinės nervų sistemos audiniuose (http://www.cdc.gov/rabies/diagnosis/direct_fluorescent_antibody.html). Todėl nauji MAk prieš RABV rN baltymą, kurie atpažintų

natūralaus viruso nukleokapsides infekuotuose audiniuose, galėtų būti taikomi pasiutligės virusų diagnostikai.

MAk sąveikos su infekuotais audiniais tyrimams buvo panaudoti karščiu fiksuoti RABV infekuotos lapės smegenų histologiniai mėginiai. Viruso infekcija šiuose mėginiuose buvo patvirtinta tiesioginės IF metodu Lietuvos Nacionaliniame maisto ir veterinarijos rizikos vertinimo institute, Virusologinių tyrimų skyriuje, naudojant komercinius antikūnus. Netiesioginės IF metodu infekuotuose audiniuose RABV nukleokapsides atpažino 3G8 ir 5F12 klonų sekretuojami MAk (3.22 pav.). IF tyrimo metu buvo stebima intensyvi fluorescencija, kuri patvirtina šių MAk ir viruso nukleokapsidžių, arba N baltymų agregatų – Negri kūnelių sąveiką (3.22 pav.). Klonų 4A12 ir 6G7 sekretuojami MAk nereagavo su viruso nukleokapsidėmis.




**3.22 pav.** MAk specifiškumo tyrimas IF metodu, naudojant RABV infekuotos lapės smegenų histologinius mėginius. Tyrimams naudoti antikūnai: 3G8, 4A12, 5F12, 6G7. PAk – pelės poliklonininiai antikūnai prieš RABV rN baltymą. NK – neigiama kontrolė, MAk (7G2) prieš ANDV ir SNV rN baltymus. TK – teigiama kontrolė, MAk (W239.17) prieš europietiškos lapės RABV izoliatą

**Fig. 3.22.** Indirect immunofluorescence staining of hPIV-infected fox brain tissues with monoclonal antibodies (3G8, 4A12, 5F12, 6G7) raised against RABV rN protein. PAk, mouse antiserum rised against RABV rN protein, NK, negative control, monoclonal antibody (7G2) against ANDV and SNV rN proteins, TK, positive control, monoclonal antibody (W239.17) rised against European fox RABV isolate

## 3.5.3. RABV rN baltymo antigeninės struktūros tyrimas

### 3.5.3.1. MAk specifiškumo tyrimas konkurencinės IFA metodu

Kaip minėta 3.5.2.1 skyrelyje, sukurtieji MAk prieš RABV rN baltymą buvo suskirstyti į 3 grupes pagal tai, kaip jie sąveikavo su pasiutligės virusų N baltymais, tiriant IFA ir IB metodais. Buvo padaryta prielaida, kad MAk, priskirti tai pačiai grupei, gali atpažinti tas pačias RABV rN, EBLV-1 rN, EBLV-2 rN baltymų imunodominuojančias sritis (epitopus). Paprasčiausias būdas nustatyti, ar MAk atpažįsta tą patį epitopą baltymo molekulėje – atlikti konkurencinę IFA. Tam tikslui vienas MAk turi būti pažymėtas fermentine žyme. Buvo pasirinkti trys MAk (3G8, 4A12 ir 6G7), t.y., po vieną MAk iš kiekvienos grupės (3.5.2.1 skyrelis) ir konjuguoti su krienų peroksidaze. Žymėto MAk aktyvumo sumažėjimas nuo 50 % ir daugiau konkurencinėje IFA, lyginant sąveiką su kontrole (kontrolė – žymėto MAk ir baltymo sąveika), rodo nežymėto MAk inhibuojantį poveikį. Tokiu atveju nežymėtas ir žymėtas MAk tarpusavyje konkuruoja. Jeigu vyksta konkurencija tarp žymėto ir nežymėto MAk, jų epitopai yra persiklojantys arba šalia vienas kito. Jei konkurencijos nėra – MAk epitopai yra skirtingose baltymo molekulės vietose.

Konkurencinės IFA rezultatai parodė (3.13 lentelė), kad konkurencija vyko tarp žymėto MAk 4A12* ir nežymėto MAk 6G7 bei tarp žymėto MAk 6G7* ir nežymėto 4A12. Taigi, tarpusavyje konkuruoja 4A12, 6G7 klonų sekretuojami antikūnai. Vadinasi, šių MAk epitopai yra persiklojantys arba vienas šalia kito.

Tarpusavyje nekonkuravo MAk 3G8 ir 5F12, todėl šie MAk atpažįsta skirtingus epitopus. IFA ir IB metodais buvo nustatyta, kad MAk 3G8 ir 5F12 atpažįsta konformacinius RABV, EBLV-1 ir EBLV-2 rN baltymų epitopus, todėl buvo mažai tikėtina, kad MAk atpažins tuos pačius konformacinius epitopus.

**3.13 lentelė.** MAk specifiškumo tyrimas konkurencinės IFA metodu. Plokštelėje imobilizuotas RABV rN baltymas

**Table 3.13.** Specificity analysis of monoclonal antibodies by competitive ELISA. RABV rN protein immobilized on a plate

| Nežymėtų MAk klonų pav. / Žymėtų MAk klonų pav. | 3G8 | 5F12 | 4A12 | 6G7 |
|---|---|---|---|---|
| **3G8*** | +++ | + | + | + |
| **4A12*** | + | + | +++ | ++ |
| **6G7*** | + | + | ++ | +++ |

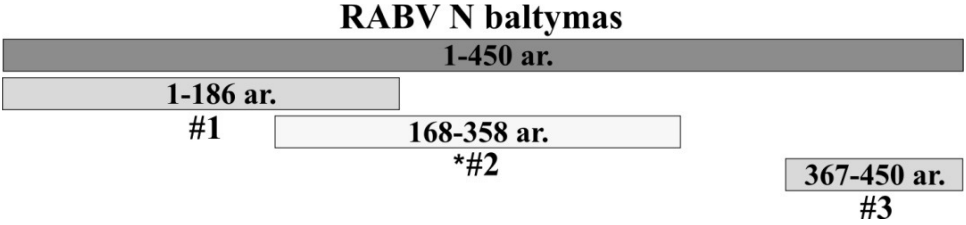
„*“ – MAk žymėti fermentine žyme; „+“ – stebima iki 50 % konkurencija; „++“ – stebima iki 75 % konkurencija; „+++“ – stebima iki 100 % konkurencija; „ “ – homologinė konkurencija.

Konkurencinė IFA buvo atlikta ir su ankščiau sukurtais MAk: W239.17, W187.11.2, ir W187.61, gautais prieš natyvius pasiutligės virusus. Tačiau konkurencijos tarp šių ir žymėtų antikūnų (3G8*, 4A12* ir 6G7*) nebuvo. Kaip buvo minėta 3.5.1. skyriuje, šie MAk taip pat atpažįsta konformacinius pasiutligės N baltymų epitopus ir tiksli jų lokalizacija nežinoma.

### 3.5.3.2. MAk epitopų lokalizavimas, naudojant RABV N baltymo fragmentus

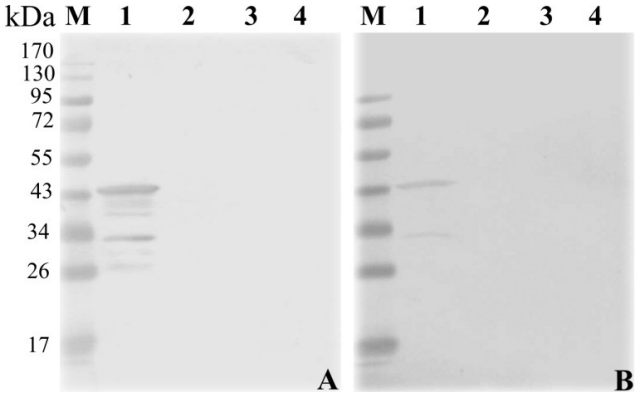
Tiriant RABV, EBLV-1 ir EBLV-2 rN baltymų antigenines savybes, buvo naudojami vakcinuotų gyvūnų serumai ir MAk, ankščiau gauti prieš natyvių virusų N baltymus (3.5.1. skyrelis). Šie tyrimai parodė, kad visų trijų rekombinantinių N baltymų erdvinė struktūra panaši į natūralių virusų. Todėl buvo iškeltas uždavinys ištirti klasikinio pasiutligės viruso N baltymo antigeninę struktūrą, panaudojant RABV N baltymo fragmentus ir MAk prieš šį baltymą.

Tam tikslui buvo konstruojami trys N baltymo seką atkartojantys fragmentai, sulieti su GST: 1–186 ar. (#1); 168–358 ar. (#2) ir 367–450 ar. (#3). Persiklojančių RABV N baltymo fragmentų schema pateikta 3.23 paveiksle. Fragmentai buvo susintetinti *E.coli*. MAk sąveika su fragmentais buvo tiriama IB metodu (antrojo fragmento raiškos nepavyko patvirtinti, 3.23 pav. antrasis fragmentas pažymėtas žvaigždute). Kadangi MAk 3G8 ir 5F12 atpažįsta konformacinius epitopus RABV rN molekulėje (IB nereaguoja), jų epitopų nustatyti nepavyko. MAk 4A12, 6G7 reagavo su pirmuoju fragmentu (3.24 pav.), todėl jų atpažįstami epitopai lokalizuoti nuo 1 iki 186 ar. Anksčiau aprašyti konkurencinės IFA tyrimai parodė, kad MAk 4A12, 6G7 atpažįsta tą patį arba persiklojančius, šalia esančius epitopus.




**3.23 pav.** Persiklojančių RABV N baltymo fragmentų schema
**Fig. 3.23.** Schematic representation of overlapping RABV N protein fragments

IB metodu taip pat buvo ištirta poliklonines antikūnų, susidariusių prieš RABV rN baltymą, sąveika su RABV N baltymo fragmentais. Tyrimas parodė, kad jie nereaguoja nė su vienu fragmentu, taip pat silpnai sąveikauja su pilno ilgio RABV rN baltymu (rezultatai nerodomi). Taigi, RABV rN baltymo struktūra palanki susidaryti antikūnams prieš konformacinius epitopus.

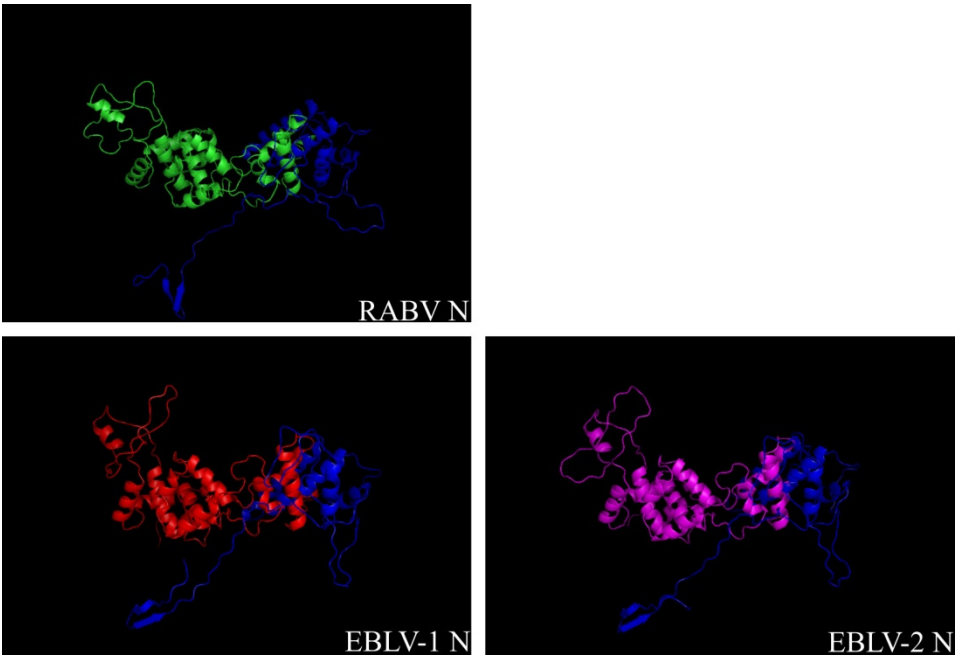



**3.24 pav.** MAk 4A12 (**A**) ir 6G7 (**B**) prieš RABV rN baltymą sąveikos su RABV N baltymo fragmentais tyrimas IB metodu. (M – baltymų molekulinio svorio standartas, (UAB Fermentas, Lietuva); 1 takelis – RABV N baltymo 1–186 ar. seką atkartojantis fragmentas; 2 takelis – RABV N baltymo 168–358 ar. seką atkartojantis fragmentas (šio fragmento raiškos nepavyko patvirtinti); 3 takelis – RABV N baltymo 367–450 ar. seką atkartojantis fragmentas; 4 takelis – neigiama kontrolė, *E.coli* lizatas su tuščia pGEX-KT plazmide)

**Fig. 3.24.** Western blot analysis of monoclonal antibodies 4A12 (**A**) and 6G7 (**B**) reactivities with RABV N protein fragments. (Lyne M, prestained protein molecular mass marker; lane 1, fragment #1(1–186 aa); lane 2, fragment #2 (168–358 aa); lane 3, fragment #3 (367–450 aa); lane 4, negatyve control, *E. coli* lysate transfomed with empty pEX-KT vector)

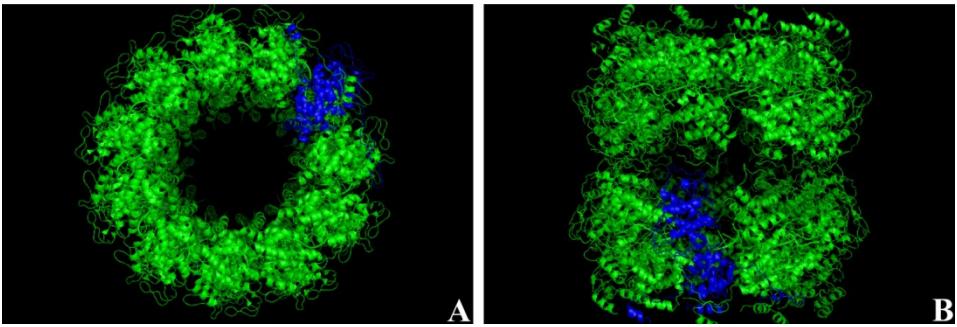
Atlikti RABV rN baltymo antigeninės struktūros tyrimai rodo, kad du MAk (4A12 ir 6G7) atpažino RABV rN baltymo seką tarp 1 ir 186 ar. Atlikus konkurencinę IFA, buvo nustatyta, kad šie MAk tarpusavyje konkuruoja dėl sąveikos su RABV rN baltymu. Taigi, konkurencinė IFA patvirtino, kad jų epitopai lokalizuoti toje pačioje vietoje arba greta vienas kito (nuo 1 iki 186 ar.). MAk 4A12 ir 6G7 atpažįsta RABV, EBLV-1 ir EBLV-2 rN baltymus. Tačiau MAK 6G7 IFA metodu nereagavo su EBLV-1 ir EBLV-2 rN baltymais, o atpažino šiuos N baltymus tik jiems „išsisukus“ (denatūruojančiomis sąlygomis). Todėl galima daryti prielaidą, kad EBLV-1 ir EBLV-2 rN baltymų atveju 6G7 atpažįstamas epitopas dėl skirtingos pasiutligės virusų N baltymų tretinės struktūros antikūnams yra nepasiekiamas. Palyginus RABV, EBLV-1 ir EBLV-2 N baltymų sekas tarpusavyje (3.21 pav.), matyti, kad 1–150 ar. sritis yra ypač variabili, o dėl šių skirtumų ir susidaro skirtingos N baltymų erdvinės struktūros. Kol kas RABV, EBLV-1 ir EBLV-2 N baltymų monomerų kristalografinės struktūros nėra žinomos. Todėl norint palyginti visų trijų N baltymų 1–186 ar. fragmento išsidėstymą erdvėje, reikia sukurti N baltymų modelius. Pasitelkiant

baltymų struktūrų modeliavimo įrankius (baltymo sekos ir struktūros analizės tinklo serverį – *Bioinformatics Tolkit, Max – Planck Institute for Development Biology* (http://toolkit.tuebingen.mpg.de/); tretinės struktūros peržiūros programą – PyMol (http://www.pymol.org/)) buvo sumodeliuotos RABV, EBLV-1, EBLV-2 N baltymų erdvinės struktūros ir modeliuose pažymėta imunogeniška 1–186 ar. seka. Modeliavimas buvo atliekamas šablonu pasirinkus RABV RNR ir N baltymo dalelės struktūros modelį, nes šio komplekso kristalografinė struktūra jau yra žinoma ir pateikta PDB duomenų bazėje (Albertini *et al.* 2006). Gautuose erdvinės struktūros modeliuose RABV, EBLV-1 ir EBLV-2 N baltymų struktūros skirtingos ir 1–186 ar. sritis erdvėje susisuka skirtingai (3.25 pav.). Struktūrų peržiūros programa PyMol analizuojant RABV RNR ir N baltymų formuojamos dalelės modelį ir pažymėjus mėlyna spalva 1–186 ar. fragmentą matyti, kad ši sritis iškelta į RABV nukleokapsidės paviršių ir turėtų būti lengvai prieinama B ląstelėms (3.26 pav.).




**3.25 pav.** *Lyssavirus* genties N baltymų erdvinės struktūros modeliai. Mėlyna spalva pažymėtas imunogeniškas 1–186 ar. fragmentas. Paveiksle pateiktos RABV (CVS-11 atmainos), EBLV-1 (RV1423 atmainos) ir EBLV-2 (RV1333 atmainos) N baltymų erdvinės struktūros modeliai

**Fig. 3.25.** Three-dimensional models of lyssavirus N proteins. Immunogenic fragment aa 1–186 is marked in blue. The figure represents the three-dimensional models of RABV (CVS-11 isolate), EBLV-1 (RV1423 isolate) ir EBLV-2 (RV1333 isolate) N proteins




**3.26 pav.** RABV (CVS-11 atmainos) ribonukleobaltymo erdvinės struktūros modeliai. Mėlyna spalva pažymėtas imunogeniškas N baltymo 1–186 ar. fragmentas. (**A**) RABV nukleokapsidės žiedo (N baltymo kartu su RNR) erdvinės struktūros modelio horizontalios projekcijos vaizdas. (**B**) RABV nukleokapsidės žiedo (N baltymo kartu su RNR) erdvinės struktūros modelio frontalinis vaizdas

**Fig 3.26.** Three-dimensional model of the RABV ribonucleoprotein. Immunogenic N protein fragment aa 1–186 is marked in blue. (**A**) Horizontal projection image of the three-dimensional model of RABV nucleocapsid ring (N protein bound to RNA); (**B**) Frontal image of the three-dimensional model of RABV nucleocapsid ring (N protein bound to RNA)

Naujai sukurtieji MAk buvo palyginti su kitų autorių aprašytaisiais MAk prieš RABV N baltymą. Aprašomi 6 MAk, specifiški RABV N baltymo C galiniam fragmentui nuo 360 iki 383 ar. (Goto *et al.* 2000). Yra duomenų ir apie MAk, specifiškus RABV N baltymo N galiniam fragmentui: jų atpažįstamas epitopas buvo nustatytas N baltymo sekoje tarp 1 ir 42 ar. (Toriumi ir Kawai 2005). Mūsų atlikti tyrimai suteikia naujų žinių apie RABV rN baltymo antigeninę struktūrą, jo galimą išsidėstymą nukleokapsidėje. Literatūroje minima, kad pasiutligės viruso N baltymo N galinė dalis nedalyvauja nukleokapsidės formavime ir sąveikoje su kitais viruso baltymais, pvz., P baltymu (Toriumi ir Kawai 2005). Šie autoriai taip pat parodė, kad MAk prieš 1–42 ar. segmentą sąveikauja su N baltymu net ir tais atvejais, kai N baltymas yra nukleokapsidės struktūroje arba prisijungęs P baltymą. Tuo tarpu MAk prieš N baltymo C galinį segmentą (nuo 388 iki 407 ar.) nesąveikauja su N baltymu, kai jis formuoja minėtas struktūras. Taigi, mūsų gauti rezultatai patvirtina kitų autorių duomenis, kad mažiau struktūrizuotas N galinis domenas yra laisvas ir prieinamas B ląstelėms, todėl prieš šią dalį susidaro antikūnai.

### 3.5.4. Rezultatų, gautų tiriant naujas hibridomas prieš RABV rN baltymą, apibendrinimas

Buvo sukurti 4 IgG klasės MAk (3G8, 4A12, 5F12 ir 6G7) prieš klasikinio pasiutligės viruso rekombinantinį N baltymą, kuris formuoja NPD. Imunizacijai ir klonų atrankai naudotų NPD antigeninė struktūra buvo detaliai ištirta, naudojant gyvūnų antiserumus ir anksčiau aprašytus MAk prieš natyvių virusų N baltymus. MAk 3G8, 4A12, 5F12 ir 6G7 buvo charakterizuoti IFA, IB ir IF metodais, nustatytos $K_d$ (3.14 lentelė).

MAk specifiškumo tyrimas IF metodu, naudojant RABV infekuotos lapės smegenų histologinius mėginius, patvirtino natyvaus viruso ir rekombinantinio N baltymo antigeninės struktūros panašumą. Buvo nustatyta, kad tik konformacinius epitopus atpažįstantys MAk (3G8 ir 5F12) sąveikavo su viruso nukleokapsidėmis infekuotose smegenų ląstelėse. MAk epitopų lokalizacija buvo ištirta konkurencinės IFA metodu ir naudojant persidengiančius N baltymo fragmentus. Buvo nustatyta, kad RABV rN baltymo N galinė dalis (1–186 ar.) yra imunogeniška – prieš ją susidarė du MAk (4A12 ir 6G7), atpažįstantys linijinius epitopus.

**3.14 lentelė**. Apibendrinantys duomenys apie naujus MAk prieš RABV rN baltymą
**Table 3.3.** Summarising data on recently produced monoclonal antibodies against RABV rN protein

| MAk klono pav. | MAk klasė ir poklasė | $K_d$, M | MAk ir RABV N baltymo sąveika | MAk ir EBLV-1 N baltymo sąveika | MAk ir EBLV-2 N baltymo sąveika | RABV N baltymo epitopų lokalizacija |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | IF[a]/IFA[b]/IB[c] | IF[a]/IFA[b]/IB[c] | IF[a]/IFA[b]/IB[c] | |
| **3G8** | IgG1 | $1{,}4\cdot10^{-10}$ | +/+/- | nt./+/- | nt./+/- | konformacinis epitopas |
| **5F12** | IgG1 | $2{,}1\cdot10^{-9}$ | +/+/- | nt./+/- | nt./+/- | konformacinis epitopas |
| **4A12** | IgG2a | $2{,}2\cdot10^{-9}$ | -/+/+ | nt./+/+ | nt./+/+ | 1-186 ar. |
| **6G7** | IgG2a | $3{,}6\cdot10^{-9}$ | -/+/+ | nt./-/+ | nt./-/+ | 1-186 ar. |

[a]Sąveika tirta IF metodu: „+“ – sąveika yra, „-“ – sąveikos nėra, „nt.“ – netikrinta. Tyrimams buvo naudojami karščiu fiksuoti RABV infekuotos lapės smegenų audiniai.
[b]Sąveika tirta IFA metodu: „+“ – sąveika yra, OT>0,5; „-“ – sąveikos nėra, OT<0,5. Tyrimams buvo naudojami RABV, EBLV-1 ir EBLV-2 rN baltymai.
[c]Sąveika tirta IB metodu: „+“ – sąveika yra, „-“ – sąveikos nėra. Tyrimams buvo naudojami RABV, EBLV-1 ir EBLV-2 rN baltymai (2 µg/takeliui).

Naujai sukurtieji MAk prieš RABV rN baltymą gali būti panaudoti, kuriant laboratorinės diagnostikos sistemas RABV ir kitų pasiutligę sukeliančių virusų infekcijai nustatyti. Šių MAk diagnostinė vertė bus ištirta, bendradarbiaujant su

*Friedrich-Loefler Institute* (Vokietija), kur sukaupta didelė pasiutligės virusais infekuotų histologinių mėginių kolekcija.

# Bendrosios išvados

1. Sukurtos 4 hibridomų linijos, sekretuojančios aukšto afiniškumo IgG klasės antikūnus prieš mielėse susintetintą hPIV3 N baltymą. Visi antikūnai specifiškai atpažįsta viruso nukleokapsides hPIV3 infekuotose ląstelėse ir nereaguoja su gimininingu hPIV1.
2. Gauti nauji duomenys apie hPIV3 N baltymo antigeninę struktūrą. HPIV3 N baltymo imunodominuojantys rajonai yra išsidėstę baltymo C galinėje dalyje, tarp 397 ir 446 ar. Identifikuotas hPIV3 N baltymo linijinis epitopas (437–446 ar.), homologiškas tymų viruso N baltymo epitopui.
3. Naudojant mielėse susintetintą Menagle viruso N baltymą, pirmą kartą sukurti monokloniniai antikūnai prieš Menangle virusą, kurie tinka šio viruso laboratorinei diagnostikai. Vienas iš antikūnų (klonas 10G8) kryžmiškai reaguoja su gimininingo Tioman viruso N baltymu. Antikūnų atpažįstami epitopai išsidėstę N baltymo C galinėje dalyje, tarp 431 ir 490 ar.
4. Paramiksovirusų N baltymų antigeninės struktūros tyrimai patvirtina, kad šių baltymų C galinė dalis yra imunodominauojanti ir lokalizuota nukleokapsidės paviršiuje.

5. Sukurti ir detaliai charakterizuoti monokloniniai antikūnai prieš rekombinantinius hantavirusų N baltymus. Antikūnų kryžminis specifiškumas su įvairių hantavirusų N baltymais patvirtina šių virusų glaudų filogenetinį ryšį. Sukurtieji antikūnai atpažįsta hantavirusus infekuotuose žmogaus ir gyvūnų audiniuose ir gali būti panaudoti, kuriant naujas laboratorines diagnostikos sistemas hantavirusų infekcijai nustatyti.
6. Sukurti 4 monokloniniai antikūnai prieš rekombinantinį klasikinio pasiutligės viruso (RABV) N baltymą. Du antikūnai atpažįsta linijinius epitopus, kurie lokalizuoti RABV N baltymo N galinėje dalyje, tarp 1 ir 186 ar. Kiti du antikūnai, atpažįstantys konformacinius epitopus, sąveikauja su viruso nukleokapsidėmis infekuotose smegenų ląstelėse.
7. Monokloniniai antikūnai prieš rekombinantinius virusų N baltymus gali būti panaudoti naujoms virusų diagnostikos sistemoms kurti. Antikūnų sąveika su virusais infekuotose ląstelėse patvirtina rekombinantinių mielėse susintetintų N baltymų ir virusų nukleokapsidžių antigeninį panašumą.

# Literatūra ir šaltiniai


Akira, S.; Uematsu, S.; Takeuchi, O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity, *Cell*, 124: 783.

Albas, A., *et al.* 2005. Laboratory diagnosis of rabies in the west region of Sao Paulo State, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 38(6): 493–495.

Albertini, A. A. V., *et al.* 2006. Crystal structure of the rabies virus nucleoprotein-RNA complex, *Science* 313: 360–363.

Alfadhli, A., *et al.* 2001. Hantavirus nucleocapsid protein oligomerization, *The Journal of Virology* 75: 2019–2023.

Alfadhli, A., *et al.* 2002. Hantavirus nucleocapsid protein coiled-coil domains, *The Journal of Biological Chemistry* 277: 27103–27108.

Andersson, I., *et al.* 2004. Role of actin filaments in targeting of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus nucleocapsid protein to perinuclear regions of mammalian cells, *Journal of Medical Virology* 72: 83–93.

Antic, D., *et al.* 1992. Comparison of the deduced gene products of the L, M and S genome segments of hantaviruses, *Virus Research* 24(1): 35–46.

Antoniukas, L.; Grammel, H.; Reichl, U. 2006. Production of hantavirus Puumala nucleocapsid protein in Saccharomyces cerevisiae for vaccine and diagnostics, *Journal of Biotechnology* 124: 347–362.

Arai, Y. T., *et al.* 2003. New lyssavirus genotype from the Lesser Mouse-eared Bat (Myotis blythi), Kyrghyzstan, *Emerging Infectious Diseases* 9: 333–337.

Araki, K., *et al.* 2001. Truncated hantavirus nucleocapsid proteins for serotyping Hantaan, Seoul, and Dobrava hantavirus infections, *Journal of Clinical Microbiology* 39: 2397–2404.

Badrane, H., *et al.* 2001. Evidence of two Lyssavirus phylogroups with distinct pathogenicity and immunogenicity, *The Journal of Virology* 75: 3268–3276.

Bhella, D., *et al.* 2002. Significant differences in nucleocapsid morphology within the Paramyxoviridae, *Journal of General Virology* 83: 1831–1839.

Biocompare. 2009. 2009 Antibody Report Market Overview and Industry Survey Industry [interaktyvus]. [žiūrėta 2011 02 21]. Prieiga per internetą: <*http://www.biocompare.com/research*>.

Borek, A. P., *et al.* 2006. Respiratory syncytial virus detection by Remel Xpect, Binax Now RSV, direct immunofluorescent staining, and tissue culture, *Journal of Clinical Microbiology* 44(3): 1105–1107.

Boudko, S. P.; Kuhn, R. J.; Rossmann, M. G. 2007. The coiled-coil domain structure of the Sin Nombre virus nucleocapsid protein, *Journal of Molecular Biology* 366: 1538–1544 .

Bouloy, M.; Hannoun, C. 1976. Studies on lumbo virus replication. I. RNA-dependent RNA polymerase associated with virions, *Virology* 69: 258–264.

Bourhis, J. M., *et al.* 2007. *Measles virus nucleoprotein.* New York: Nova Science.

Bowden, T. R., *et al.* 2001. Molecular characterization of Menangle virus, a novel paramyxovirus which infects pigs, fruit bats, and humans, *Virology* 283(2): 358–373.

Brown, E. L.; Lyles, D. S. 2003. Organization of the vesicular stomatitis virus glycoprotein into membrane microdomains occurs independently of intracellular viral components, *The journal of Virology* 77: 3985–3992.

Brummer-Korvenkontio, M., *et al.* 1980. Nephropathia epidemica: detection of antigen in bank voles and serologic diagnosis of human infection, *Journal of Infectious Diseases* 141: 131–134.

Burkhard, P.; Stetefeld, J.; Strelkov, S. V. 2001. Coiled colis: a highly versatile protein folding motif, *Trends in Cell Biology* 11: 82–88.

Callihan, D. R.; Menegus, M. A. 1984. Rapid detection of herpes simplex virus in clinical specimens with human embryonic lung fibroblast and primary rabbit kidney cell cultures, *Journal of Clinical Microbiology* 19: 563–565.

Ceccaldi, P. E., *et al.* 1998. Infection characteristic of rabies virus variants with deletion or insersion in the pseudogene sequence, *Journal of Neuro Virology* 4: 115–119.

Chanok, R. M. 1956. Association of a new type of cytopathogenic myxovirus with infantile croup, *The Journal of Experimental Medicine* 104: 555–576.

Chen, H. L., *et al.* 2010. Detection of EBV in nasopharyngeal carcinoma by quantum dot fluorescent *in situ* hybridization, *Experimental and Molecular Pathology* 89(3): 367–71.

Chu, Y. K., *et al.* 1994. Serological relationships among viruses in the Hantavirus genus, family Bunyaviridae, *Virology* 198(1): 196–204.

Chua, K. B., *et al.* 2002. Tioman virus, a novel paramyxovirus isolated from fruit bats in Malaysia, *Virology* 283: 215–229.

Cox, J. H.; Schneider, L. G.; Muller, W. W. 1992. Eine Antigenvariante der Fuchstollwut in Europa. Tierarztl. Umschau 47, 824–828.

Dargevičius, A., *et al.* 2007. Prevalence of antibodies to hantavirus among hemodialysis patients with end-stage renal failure in Kaunas and its district, *Medicina* 43(Suppl 1): 72–76.

Dietzschold, B., *et al.*1987. Localization and immunological characterization of antigenic domains of the rabies virus internal N and NS proteins, *Virus Research* 8(2): 103–125.

Dietzschold, B., *et al.* 1988. Antigenic diversity of the glycoprotein and nucleocapsid proteins of rabies and rabies-related viruses: implications for epidemiology and control of rabies, *Reviews of Infectious Diseases* 10: S785–S798.

Doms, R. W., *et al.* 1988. Differential effects of mutations in three domains on folding, quaternary structure, and intracellular transport of vesicular stomatitis virus G protein, *The Journal of Cell Biology* 107: 89–99.

Durrer, P., *et al.* 1995. Photolabeling identifies a putative fusion domain in the envelope glycoprotein of rabies and vesicular stomatitis viruses, *The Journal of Biological Chemistry* 270: 17575–17581.

Dutta, J. K.; Dutta, T. K. 1994. Treatment of clinical rabies in man: drug therapy and other measures, *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* 32: 594–597.

Egelman, E. H., *et al.* 1989. The Sendai virus nucleocapsid exists in at least four different helical states, *The Journal of Virology* 63: 2233–2243.

Elgh, F., *et al.* 1998. Development of humoral cross-reactivity to the nucleocapsid protein of heterologous hantaviruses in nephropathia epidemica, *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 22: 309–315.

Engelmann, I., *et al.* 2010. Incidence and impact of herpes simplex and cytomegalovirus detection in the respiratory tract after lung transplantation, *Transplant Infectious Disease* doi: 10.1111/j.1399–3062.2010.00587.x.

Ennis, F. A., *et al.* 1997. Hantavirus pulmonary syndrome: CD8+ and CD4+ cytotoxic T limphocytes, *Virology* 238(2): 380–390.

Enria, D., *et al.* 1996. Hantavirus pulmonary syndrome in Argentina. Possibility of person to person transmission, *Medicina (B Aires)* 56: 709–711.

Espert, L., *et al.* 2003. ISG20, a new interferon-induced RNase specific for single-stranded RNA, defines an alternative antiviral pathway against RNA genomic viruses, *The Journal of Biological Chemistry* 278: 16151.

Esterhuysen, J. J.; Prehaud, C.; Thomson G. R. 1995. A liquid-phase blocking ELISA for the detection of antibodies to rabies virus, *The Journal of Virological Methods* 51: 31–42.

Evans, A. S.; Kaslow, R. A. 1997. *Viral infections of humans. Epidemiology and control.* New York: Plenum publishing corporation.

Feber, M., *et al.* 2004. Identification of viral genomic elements responsible for rabies virus neuroinvasivness, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 16328–16332.

Fleury, M. J., *et al.* 2006. Identification of type-specific and cross-reactive neutralizing conformational epitopes on the major capsid protein of human papillomavirus type 31, *Archives of Virology* 151(8): 1511–1523.

Flood, E. A.; Lyles, D. S. 1999. Assembly of nucleocapsids with cytosolic and membrane-derived matrix proteins of vesicular stomatitis virus, *Virology* 261: 295-308.

Fooks, A. R., *et al.* 2009. Emerging technologies for the detection of rabies virus: challenges and hopes in the 21st century, *PLoS Neglected Tropical Diseases* 3(9): e530.

Franko, M. C., *et al.* 1983. Monoclonal antibodies specific for Hantaan virus, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80(13): 4149–4153.

Fredericksen, B. L.; Whitt, M. A. 1996. Mutations at two conserved acidic amino acids in the glycoprotein of vesicular stomatitis virus affect pH-dependent conformational changes and reduce the pH threshold for membrane fusion, *Virology* 217: 49–57.

Gan, N., *et al.* 2009. Reagentless Amperometric Immunosensor Based on Human Immunodeficiency Virus Diagnosis Marker Glycoprotein 160 Antibody Coated Gold-Magnetic Particles Modified Electrode, *Chinese Journal of Analytical Chemistry* 37(8): 1125–1130.

Gan, N., *et al.* 2010. A Non-enzyme Amperometric Immunosensor for Rapid Determination of Human Immunodeficiency Virus p24 Based on Magnetism Controlled Carbon Nanotubes Modified Printed Electrode, *Chinese Journal of Analytical Chemistry* 38(11): 1556–1562 .

Gaudin, Y., *et al.* 1992. Rabies virus glikoprotein is a trimer, *Virology* 187: 627–632.

Gavrilovskaya, I. N., *et al.* 1987. Determination of specific immune complexes and dynamics of their circulation in patients with hemorrhagic fever with renal syndrome, *Microbiology Zh* 49: 71–76.

Gavrilovskaya, I. N., *et al.* 1999. Cellular entry of hantaviruses which cause hemorrhagic fever with renal syndrome is mediated by beta 3 integrins, *The Journal of Virology* 73(5): 3951–3959.

Gedvilaitė, A., *et al.* 2004. Segments of puumala hantavirus nucleocapsid protein inserted into chimeric polyomavirus-derived virus-like particles induce a strong immune response in mice, *Viral Immunology* 17: 51–68.

Geimonen, E., *et al.* 2002. Pathogenic and nonpathogenic hantaviruses differentially regulate endothelial cell responses, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:13837–13842.

Geldmacher, A., *et al.* 2005. A hantavirus nucleocapsid protein segment exposed on hepatitis B virus core particles is highly immunogenic in mice when applied without adjuvants or in the presence of pre-existing anti-core antibodies, *Vaccine* 23: 3973–3983.

Glass, G., *et al.* 1988. Association of intraspecific wounding with hantaviral infection in wild rats (Rattus norvegicus), *Epidemiology and Infection* 101: 459–472.

Goldwasser, R. A.; Kissling, R. E. 1958. Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 98: 219–223.

Gorbach, S. L., *et al.* 2004. *Infectious Diseases. Third edition.* Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.

Goto, H., *et al.* 2000. Mapping of epitopes and structural analysis of antigenic sites in the nucleoprotein of rabies virus, *Journal of General Virology* 81(Pt1): 119–127.

Gott, P., *et al.* 1993. RNA binding of recombinant nucleocapsid proteins of hantaviruses, *Virology* 194(1): 332–337.

Gruenberg, J.; Stenmark, H. 2004. The biogenesis of multivesicular endosomes, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5: 317–33.

Hall, C. B. 2001. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus, *The New England Journal of Medicine* 344: 1917–1928.

Hamir, A. N.; Moser, G.; Rupprecht, C. E. 1996. Clinicopathologic variation in raccoons infected with different street rabies virus isolates, *The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 8(1): 31–37.

Hammond, C.; Helenius, A. 1994. Folding of VSV G protein: sequential interaction with BiP and calnexin, *Science* 266: 456–458.

Harlow, E.; Lane, D. 1988. *Antibodies. A laboratory manual.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISBN 0-87969-314-2.

Hart, C. A.; Bennett, M. 1999. Hantavirus infections: epidemiology and pathogenesis, *Microbes and Infections* 1: 1229–1237.

Hedman, K.;Vaheri, A.; Brummer-Korvenkontio, M. 1991. Rapid diagnosis of hantavirus disease with an IgG-avidity assay, *Lancet* 338(8779): 1353–1356.

Henrickson, K. J. 2003. Parainfluenza viruses, *Clinical Microbiology Reviews* 16: 242–246.

Hewlett, M. J.; Pettresson, R. F.; Baltimore, D. 1977. Circular forms of Uukuniemi virion RNA:an electron microscopic study, *The Journal of Virology* 21(3): 1085–1093.

Hinson, E. R., *et al.* 2004. Wounding: the primary mode of Seoul virus transmission among male Norway rats, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 70: 310–317.

Hooper, J. W.; Li, D. 2001. Vaccines against hantaviruses, *Current Topics in Microbiology and Immunology* 256: 171–191.

Hooper, P. T., *et al.* 1997. A new lyssavirus the first endemic rabies-related virus recognized in Australia, *Bulletin de l'Institut Pasteur* 95: 209–218.

Howe, C., *et al.* 1967. Morphogenesis of type 2 parainfluenza virus examined by light and electron microscopy, *The Journal of Virology* 1: 215–237.

Huggins, J. W., *et al.* 1991. Prospective, double-blind, concurrent, placebo-controlled clinical trial of intravenous ribavirin therapy of hemorrhagic fever with renal syndrome, *Journal of Infectious Diseases* 164: 1119–1127.

Hujakka, H., *et al.* 2003. Diagnostic rapid tests for acute hantavirus infections: specific tests for Hantaan, Dobrava and Puumala viruses versus a hantavirus combination test, *Journal of Virological Methods* 108: 117–122.

Internetinis šaltinis. Bioinformatic toolkit. Max Planck Institute for Developmental Biology. Žiūrėta: 2010-11-08, internetinė prieiga: http://toolkit.tuebingen.mpg.de/

Internetinis šaltinis. Centers for Disease Control and Pervention. Rabies: direct fluorescent antibody test. Žiūrėta: 2010-11-15, internetinė prieiga: http://www.cdc.gov/rabies/diagnosis/direct_fluorescent_antibody.html

Internetinis šaltinis. Centers for Disease Control and Pervention. Rabies: histologic examination. Žiūrėta: 2010-11-26, internetinė prieiga: http://www.cdc.gov/rabies/diagnosis/histologic.html

Internetinis šaltinis. Centers for Disease Control and Pervention. Rabies: accuracy of the test. Žiūrėta: 2010-11-15, internetinė prieiga: http://www.cdc.gov/rabies/diagnosis/accuracy.html

Internetinis šaltinis. PyMol. A user-sponsored molecular visualization system on an open-source foundation. Žiūrėta: 2010-09-15, internetinė prieiga: http://www.pymol.org/

Internetinis šaltinis. The National Center for Biotechnology Information. Taxonomy browser. Žiūrėta: 2010-11-15, internetinė prieiga: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=11294&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock

Internetinis šaltinis. Viralzone. Hantavirus molecular biology. Žiūrėta: 2010-10-04, internetinė prieiga: http://expasy.org/viralzone/all_by_species/213.html

Internetinis šaltinis. Viralzone. Lyssavirus molecular biology. Žiūrėta: 2010-10-25, internetinė prieiga: http://expasy.org/viralzone/all_by_species/22.html

Internetinis šaltinis. Viralzone. Paramyxoviridae molecular biology. Žiūrėta: 2010-10-04, internetinė prieiga: http://expasy.org/viralzone/all_by_species/556.html

Internetinis šaltinis. Virology on-line. Diagnostic methods in virology. Žiūrėta: 2010-11-22, internetinė prieiga: http://virology-online.com/general/Tests.htm

Internetinis šaltinis. World Health Organization. Rabies - Bulletin - Europe. Diagnosis of rabies in animals. Žiūrėta: 2010-11-26, internetinė prieiga: http://www.who-rabies-bulletin.org/about_rabies/Diagnosis.aspx

Internetinis šaltinis. World Health Organization. Rabies. Current strategies for human rabies pre and post-exposure prophylaxis. Žiūrėta: 2010-11-26, internetinė prieiga: http://www.who.int/rabies/human/WHO_strategy_prepost_exposure/en/index1.html

Internetinis šaltinis. World Health Organization. Rabies. Žiūrėta: 2010-11-26, internetinė prieiga: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs099/en/

Iseni, F., *et al.* 1998. Characterization of rabies virus nucleocapsids and recombinant nucleocapsid-like structures, *Journal of General Virology* 79: 2909-2919.

Yamanishi, K., *et al.* 1984. Antigenic differences between two viruses, isolated in Japan and Korea, that cause hemorrhagic fever with renal syndrome, *The Journal of Virology* 52(1): 231-237.

Yamanishi, K., *et al.* 1988. Development of inactivated vaccine against virus causing haemorrhagic fever with renal syndrome, *Vaccine* 6: 278–282.

Ye, Z. *et al.* 1994. Membrane-binding domains and cytopathogenesis of the matrix protein of vesicular stomatitis virus, *The Journal of Virology* 68: 7386–7396.

Jamehdar, S. A., *et al.* 2007. Antigen-specific lymphocyte proliferation assay and virus neutralization test for measurement of measles-specific immunity in 15–19 years old high school students in Tehran, Iran, *Pakistan Journal of Biological Sciences*10(22): 41444–41447.

Jiang, Y., *et al.* 2010. Characterization of conformation-specific monoclonal antibodies against rabies virus nucleoprotein, *Archives of Virology* 155(8): 1187–1192.

Johnson, K. M., *et al.* 1960. Studies of a new human hemadsorption virus. I. Isolation, properties and characterization, *American Journal of Hygiene* 71: 81–92.

Jonsson, C. B.; Schmaljohn, C. S. 2001. Replication of hantaviruses, *Current Topics in Microbiology and Immunology* 256: 15–32.

Juozapaitis, M., *et al.* 2005. Generation of Sendai virus nucleocapsid-like particles in yeast, *Virus Research* 108: 221–224.

Juozapaitis, M., *et al.* 2007a. Generation of menangle virus nucleocapsid-like particles in yeast Saccharomyces cerevisiae, *Journal of Biotechnology* 130(4): 441–7.

Juozapaitis, M., *et al*. 2007b. Generation of henipavirus nucleocapsid proteins in yeast Saccharomyces cerevisiae, *Virus Research* 124(1–2): 95–102.

Juozapaitis, M., *et al.* 2008. Synthesis of recombinant human parainfluenza virus 1 and 3 nucleocapsid proteins in yeast Saccharomyses cerevisiae. *Virus Research*,: 133: 178–186.

Kallio-Kokko, H., *et al.* 1998. Evaluation of Puumala virus IgG and IgM enzyme immunoassays based on recombinant baculovirus-expressed nucleocapsid protein for early nephropathia epidemica diagnosis, *Clinical and Diagnostic Virology* 10: 83–90.

Kang X., *et al.* 2010. SAho drt ruepporltex real-time RT-PCR assay for detecting, *Virology Journal* 7:113.

Kariwa, H., *et al.* 2003. Synthesis of Seoul virus RNA and structural proteins in cultured cells, *Archives of Virology* 148: 1671–1685.

Karmaus, W., *et al*. 2008. Long-term effects of breastfeeding, maternal smoking during pregnancy, and recurrent lower respiratory tract infections on asthma in children, *Journal of Asthma* 45(8): 688–695.

Katz, F. N.; Lodish, H. F. 1979. Transmembrane biogenesis of the vesicular stomatitis virus glycoprotein, *The Journal of Cell Biology* 80: 416–426.

Kaukinen, P.; Vaheri, A.; Plyusnin, A. 2003. Non-covalent interaction between nucleocapsid protein of Tula hantavirus and small ubiquitin-related modifier-1, SUMO-1, *Virus Research* 92: 37–45.

Kaukinen, P., *et al.* 2004. Oligomerization of Hantavirus N protein: C-terminal alpha-helices interact to form a shared hydrophobic space, *The Journal of Virology* 78: 13669–13677.

Keck, Z. Y., *et al.* 2008. A point mutation leading to hepatitis C virus escape from neutralization by a monoclonal antibody to a conserved conformational epitope, *The Journal of Virology* 82(12): 6067–6072.

Khaiboullina, S. F., *et al.* 2004. Regulation of cellular gene expression in endothelial cells by sin nombre and prospect hill viruses, *Viral Immunology* 17: 234–251.

Khaiboullina, S. F.; Morzunov, S. P.; St Jeor, S. C. 2005a. Hantaviruses: molecular biology, evolution and pathogenesis, *Current Molecular Medicine* 5: 773–790.

Khaiboullina, S. F., *et al.* 2005b. Andes virus stimulates interferon-inducible MxA protein expression in endothelial cells, *Journal of Medical Virology* 75: 267–275.

Kikkert, M., *et al.* 1999. Tomato spotted wilt virus particle morphogenesis in plant cells, *The Journal of Virology* 73(3): 2288–2297.

Killian, M. L. 2008. Hemagglutination assay for the avian influenza virus, *Methods in Molecular Biolog*y 43: 47–52.

King, A. A,; Meredith, C. D.; Thomson, G. R. 1994. The biology of southern African lyssavirus variants, *Current Topics in Microbiology and Immunology* 187: 267–295.

Kirkland, P. D, *et al.* 2001a. Molecular characterization of Menangle virus, a novel paramyxovirus which infects pigs, fruit bats, and humans, *Virology* 283(2): 358–73.

Kirkland, P. D., *et al.* 2001b. Epidemiology and control of Menangle virus in pigs, *Australian Veterinary Journal* 79(3): 190–191.

Knipe, D. M.; Howley, P. M. 2007. *Fields of Virology,Ffifth Eddition.* Phiadelphia, USA: LWW.

Koletzki, D., *et al.* 2000. Puumala (PUU) hantavirus strain differences and insertion positions in the hepatitis B virus core antigen influence B-cell immunogenicity and protective potential of core-derived particles, *Virology* 276(2): 364–375.

Komada, H., *et al.* 1991. Immunological relationships between parainfluenza virus type 4 and other paramyxoviruses studied by use of monoclonal antibodies, *Archives of Virology* 116: 277–283.

Koprowski, H. 1973. Laboratory techniques in rabies: the mouse inoculation test, *Monogr Ser World Health Organization* 22: 85–93.

Kouznetzoff, A.; Buckle, M.; Tordo, N. 1998. Identification of a region of the rabies virus N protein involved in direct binding to the viral RNA, *Journal of General Virology* 79(Pt5): 1005–13.

Kramski, M., *et al.* 2007. Detection and typing of human pathogenic hantaviruses by real-time reverse transcription-PCR and pyrosequencing, *Clinical Chemistry* 53: 1899–1905.

Kristensson, K., *et al.* 1996. Rabies: interactions between neurons and viruses. A review of the history of Negri inclusion bodies, *Neuropathology and Applied Neurobiology* 22: 179–187.

Kučinskaitė, I., *et al.* 2007. Antigenic characterisation of yeast-expressed lyssavirus nucleoproteins, *Virus Genes* 33(3): 521–529.

Kučinskaitė-Kodzė, I., *et al.* 2011. Characterization of monoclonal antibodies against hantavirus nucleocapsid protein and their use for immunohistochemistry on rodent and human samples, *Archives of Virology* 156: 443–456.

Kuypers, J. M., *et al. 1*993. Comparison of dot filter hybridization, Southern transfer hybridization, and polymerase chain reaction amplification for diagnosis of anal human papillomavirus infection, *Journal of Clinical Microbiology* 31: 1003–1006.

Kuzmin, I. V., *et al.* 2003. Bat lyssaviruses (Aravan and Khujand) from Central Asia: phylogenetic relationships according to N, P and G gene sequences, *Virus Research* 97: 65–79.

Kuzmin, I. V., *et al.* 2005. Phylogenetic relationships of Irkut and West Caucasian bat viruses within the genus and suggested quantitative criteria based on the N gene sequence for lyssavirus genotype definition, *Virus Research* 111: 28–43.

Lam, W. Y., *et al.* 2007. Rapid multiplex nested PCR for detection of respiratory viruses, *Journal of Clinical Microbiology* 45: 3631–3640.

Le Blanc, I., *et al.* 2005. Endosome-to-cytosol transport of viral nucleocapsids, *Nature Cell Biology* 7: 653–664.

Lee, B. H., *et al.* 2003. Association of the nucleocapsid protein of the Seoul and Hantaan hantaviruses with small ubiquitin-like modifier-1-related molecules, *Virus Research* 98: 83–91.

Lee, H. W.; Lee, P. E.; Johnson, K. M. 1978. Isolation of the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever, *Journal of Infectious Diseases* 137: 298–308.

Lee, H. W. 1996. *Epidemiology and pathogenesis of haemorrhagic fever with renal sindrome.* New York: In: Elliot RM, editor, The Bunyaviridae.

Lembo, T., *et al.* 2006. Evaluation of a direct, rapid immunohistochemical test for rabies diagnosis, *Emerging Infectious Diseases* 12: 310–313.

Lenard, J.; Vanderoef, R. 1990. Localization of membrane-associated region of vesicular stomatitis virus M protein at the N terminus, using the hydrophobic, photoreactive probe 125-TDI, *The Journal of Virology* 64: 3486–4391.

Li, X. D., *et al.* 2002. Hantavirus nucleocapsid protein interacts with the Fas-mediated apoptosis enhancer Daxx, *Journal of General Virology* 83: 759–66.

Li, Z.; Bai, X.; Bian, H. 2002. Serologic diagnosis of Hantaan virus infection based on a peptide antigen, *Clinical Chemistry* 48: 645–647.

Liu, G. J., *et al.* 2007. Preparation and characterization of three monoclonal antibodies against HIV-1 p24 capsid protein, *Cellular and Molecular Immunology* 4(3): 203–208.

Lober, C., *et al.* 2001. The Hantaan virus glycoprotein precursor is cleaved at the conserved pentapeptide WAASA, *Virology* 289: 224–229.

Loeffelholz, M.; Chonmaitree, T. 2010. Advances in Diagnosis of Respiratory Virus Infections, *International Journal of Microbiology* doi:10.1155/2010/126049.

Longhi, S., *et al.* 2003. The C-terminal domain of the measles virus nucleoprotein is intrinsically disordered and folds upon binding to the C-terminal moiety of the phosphoprotein, *The Journal of Biological Chemistry* 278: 18638–18648.

Love, R. J., *et al.* 2001. Reproductive disease and congenital malformations caused by Menangle virus in pigs, *The Australian Veterinary Journal* 79: 192–198.

Lukauskas, K.; Dranseika, A. 2001. *Rabies situation and oral vaccination of foxes in Lithuania.* Brussel: Rabies annual reports.

Lundkvist, A.; Niklasson, B. 1992. Bank vole monoclonal antibodies against Puumala virus envelope glycoproteins: identification of epitopes involved in neutralization, *Archives of Virology* 126: 93–105.

Lundkvist, A., *et al.* 1996. Characterization of Tula virus antigenic determinants defined by monoclonal antibodies raised against baculovirus-expressed nucleocapsid protein, *Virus Research* 45(1): 29–44.

Lundkvist, A., *et al.* 2002. Mapping of B-cell epitopes in the nucleocapsid protein of Puumala hantavirus, *Viral Immunology* 15: 177–192.

Lupas, A. M.; Van Dyke, M.; Stock, J. 1991. Predicting coiled coils from protein sequences, *Science* 252: 1162–1164.

Mackow, E. R.; Gavrilovskaya, I. N. 2001. Cellular receptors and hantavirus pathogenesis, *Current Topics in Microbiology and Immunology* 256: 91–115.

Maeda, A., *et al.* 2003. The intracellular association of the nucleocapsid protein (NP) of hantaan virus (HTNV) with small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1) conjugating enzyme 9 (Ubc9), *Virology* 305: 288–197.

Maes, P., *et al.* 2004. Detection of Puumala hantavirus antibody with ELISA using a recombinant truncated nucleocapsid protein expressed in *Escherichia coli*, *Viral Immunol*ogy 17(2): 315–321.

Maes, P., *et al.* 2009. Replication reduction neutralization test, a quantitative RT-PCR-based technique for the detection of neutralizing hantavirus antibodies, *Journal of Virological Methods* 159(2): 295–299.

Makela, P. H. 2000. Vaccines, coming of age after 200 years, *FEMS Microbiology Reviews* 24: 9–20.

Malekshahi, S. S., *et al.* 2010. Molecular detection of respiratory viruses in clinical specimens from children with acute respiratory disease in Iran, *Pediatric Infectious Disease Journal* 29: 931–933.

Mason, J. M.; Arndt, K. M. 2004. Coiled coil domains: stability, specificity, and biological implications, *Chembiochem* 6: 170–176.

Matlin, K. S., *et al.* 1982. Pathway of vesicular stomatitis virus entry leading to infection, *Journal of Molecular Biology* 156: 609–631.

McCormick, J. B., *et al.* 1982. Morphological identification of the agent of Korean haemorrhagic fever (Hantaan virus)as a member of the Bunyaviridae, *Lancet* 1: 765–768.

McCreedy, Jr B. J.; McKinnon, K. P.; Lyles, D. S. 1990. Solubility of vesicular stomatitis virus M protein in the cytosol of infected cells or isolated from virions, *The Journal of Virology* 64: 902–906.

McKenna, P. M., *et al.* 2003. Recombinant rhabdoviruses as potential vaccines for HIV-1 and other diseases, *Current HIV research* 1: 229–237.

McQueen, J. L.; Lewis, A. L.; Schneider, N. J. 1960. Rabies diagnosis by fluorescent antibody. I. Its evaluation in a public health laboratory, *The American Public Health Association publishes American Journal of Public Health* 50: 1743–1752.

Mebatsion, T.; Cox, J. H.; Frost, J. W. 1992. Isolation and characterization of 115 street rabies virus isolates from Ethiopia by using monoclonal antibodies: identification of 2 isolates as Mokola and Lagos bat viruses, *Journal of Infectious Diseases* 166: 972–977.

Mebatsion, T.; Weiland, F.; Conzelmann, K. K. 1999. Matrix protein of rabies virus ir responsible for the assambly and budding of bullet-shaped particles and interacts with the transmembrane spike glycoprotein G, *The Journal of Virology* 73: 242–250.

Meisel, H., *et al.* 2006. Development of novel immunoglobulin G (IgG), IgA, and IgM enzyme immunoassays based on recombinant Puumala and Dobrava hantavirus nucleocapsid proteins, *Clinical and Vaccine Immunology* 13: 1349–1357.

Mertens, M., *et al.* 2009. Seroepidemiological study in a Puumala virus outbreak area in South–East Germany, *Medical Microbiology and Immunology* 198: 83–91.

Mertz, G. J., *et al.* 2004. Placebo-controlled, double-blind trial of intravenous ribavirin for the treatment of hantavirus cardiopulmonary syndrome in North America, *Clinical Infectious Diseases* 39: 1307–1313.

Milius, J., *et al.* 2004. Pasiutligės epidemiologinė situacija Lietuvoje (1994–2003 metai), *Veterinarija ir Zootechnika* 27(49): 11–18.

Mir, M. A.; Panganiban, A. T. 2004. Trimeric hantavirus nucleocapsid protein binds specifically to the viral RNA panhandle, *The Journal of Virology* 78: 8281–8288.

Monto, A. S. 1973. The Tecumseh study of respiratory illness. V. Patterns of infection with the parainfluenzaviruses, *American Journal of Epidemiology* 97: 338–348.

Motiejūnas, L. I., *et al.* 1990. Hemorrhagic fever with renal syndrome in Lithuania, *Voprosy virusologii* 35: 72–74.

Niklasson, B., *et al.* 1991. Comparison of European isolates of viruses causing hemorrhagic fever with renal syndrome by a neutralization test, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 45: 660–665.

Obijeski, J. F.; Bishop, D. H.; Palmer, E. L. 1976. Segmented genome and nucleocapsid of La Crosse virus, *The Journal of Virology* 20(3): 664–975.

Padula, P. J., et al. 2000. Genetic diversity, distribution, and serological features of hantavirus infection in five countries in South America, *Journal of Clinical Microbiology* 38: 3029–3035.

Petraitytė, R., *et al.* 2007. Use of Saccharomyces cerevisiae-expressed recombinant nucleocapsid protein to detect Hantaan virus-specific immunoglobulin G (IgG) and IgM in oral fluid, *Clinical and Vaccine Immunology* 14(12): 1603–1608.

Petraitytė, R., *et al.* 2008. Development and evaluation of serological assays for detection of Hantaanvirus-specific antibodies in human sera using yeast-expressed nucleocapsid protein, *Journal of Virological Methods* 148(1–2): 89–95.

Petraitytė, R., *et al.* 2009. Generation of Tioman virus nucleocapsid-like particles in yeast Saccharomyces cerevisiae, *Virus Research* 145: 92–96.

Philbey, A. W., 1998. An apparently new virus (family Paramyxoviridae) infectious for pigs, humans, and fruit bats, *Emerging Infectious Diseases* 42(2): 269–271.

Ravkov, E. V.; Compans, R. W. 2001. Hantavirus nucleocapsid protein is expressed as a membrane-associated protein in the perinuclear region, *The Journal of Virology* 75: 1808–1815.

Ražanskienė, A., *et al.* 2004. High yields of stable and highly pure nucleocapsid proteins of different hantaviruses can be generated in the yeast Saccharomyces cerevisiae, *Journal of Biotechnology* 111: 319–333.

Reed, G., *et al.* 1997. Epidemiology and clinical impact of parainfluenza virus infections in otherwise healthy infants and young children < 5 years old, *Journal of Infectious Diseases* 175: 807–813.

Rojas, A. E., *et al.* 2006. Use of reverse transcription-polymerase chain reaction to determine the stability of rabies virus genome in brains kept at room temperature, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 18: 98–101.

Rose, J. K., *et al.* 1980. Vesicular stomatitis virus glycoprotein is anchored in the viral membrane by a hydrophobic domain near the COOH terminus, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77: 3884–3888.

Rose, J. K.; Gallione, C. J. 1981. Nucleotide sequences of the mRNA's encoding the vesicular stomatitis virus G and M proteins determined from cDNA clones containing the complete coding regions, *The Journal of Virology* 39: 519–528.

Rossier, C.; Patterson, J.; Kolakofsky, D. 1986. La Crosse virus small genome mRNA is made in the cytoplasm, *The Journal of Virology* 58: 647–650.

Ruan, Y., *et al.* 1999. A study on immunogenicity and safety of bivalent inactivated vaccine against hemorrhagic fever with renal syndrome, *Chinese Journal of Preventive Medicine* 33: 340–342.

Rudd, R. J.; Trimarchi, C. V. 1989. Development and evaluation of an *in vitro* virus isolation procedure as a replacement for the mouse inoculation test in rabies diagnosis, *Journal of Clinical Microbiology* 27: 2522–2528.

Ruo, S. L., *et al.* 1991. Monoclonal antibodies to three strains of hantaviruses: Hantaan, R22, Puumala, *Archives of Virology* 119(1–2): 1–11.

Samuel, D., *et al.* 2002. High level expression of recombinant mumps nucleoprotein in Saccharomyces cerevisiae and its evaluation in mumps IgM serology, *Journal of Medical Virology* 66(1): 123–130.

Samuel, D., *et al.* 2003. Development of a measles specific IgM ELISA for use with serum and oral fluid samples using recombinant measles nucleoprotein produced in Saccharomyces cerevisiae, *Journal of Clinical Virology* 28(2): 121–129.

Sandmann, S., *et al.* 2005. Detection of human hantavirus infections in Lithuania, *Infection* 33: 66–72.

Schmaljohn, C. S., *et al.* 1985. Antigenic and genetic properties of viruses linked to hemorrhagic fever with renal syndrome, *Science* 227: 1041–1044.

Schmaljohn, C. S. 1996. *Molecular Biology of Hantaviruses. In "The Bunyaviridae".* New York: Plenum Press.

Schmaljohn, C. S. 2009. Vaccines for hantaviruses, *Vaccine* 27: D61–D64.

Schmidt, J., *et al.* 2005. Development and evaluation of serological assays for detection of human hantavirus infections caused by Sin Nombre virus, *Journal of Clinical Virology* 33: 247–253.

Schmidt, J., *et al.* 2006. Serological assays for the detection of human andes hantavirus infections based on its yeast-expressed nucleocapsid protein, *Intervirology* 49(3): 173–184.

Schneider, L. G., *et al.* 1973. Rabies group-specific ribonucleoprotein antigen and a test system for grouping and typing of rhabdoviruses, *The Journal of Virology* 11: 748–755.

Schneider, L. G., 1980, Antigenic determinants of rabies vaccine. *Proceedings of Cell Culture Rabies Vaccines and their Protective Effect in Man*: Essen, Germany.

Schneider, L. G.; Meyer, S. 1981. *The Replication of Negatyve Strand Viruses. Development in cell biology*: vol. 7. ed. by Bishop, D. H. L.; Compans R. W. 947–953.

Schneider, L. G., *et al.* 1985. Application of monoclonal antibodies for epidemiological investigations and oral vaccination studies. Arctic viruses. *Rabies in the Tropics*: Kuwert, E.; Merieux, C.; Koprowski, H.; Bogel K. pp. 47–59. Springer-Verlag, Berlin.

Schneider, L. G.; Cox, J. H. 1994. Bat lyssaviruses in Europe, *Current Topics in Microbiology and Immunology* 187: 207–218.

Schoehn, G., *et al.* 2001. Structure of recombinant rabies virus nucleoprotein-RNA complex and identification of the phosphoprotein binding site, *The Journal of Virology* 75: 490–498.

Shay, D. K., *et al.* 1999. Bronchiolitis-associated hospitalization among US children 1980–1996, *The Journal of the American Medical Association* 282: 1440–1446.

Shefer, A. M., *et al.* 1994. Hantavirus pulmonary syndrome in California: report of two cases and investigation, *Clinical Infectious Diseases* 19(6): 1105–1109.

Shulman, M.; Wilde, C. D.; Kohler, G. 1978. A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies, *Nature* 276: 269–270.

Slibinskas, R., *et al.* 2004. Synthesis of the measles virus nucleoprotein in yeast Pichia pastoris and Saccharomyces cerevisiae, *Journal of Biotechnology* 107: 115–124.

Smith, J. F.; Pifat, D. Y. 1982. Morphogenesis of sandfly viruses (Bunyaviridae family), *Virology* 121(1): 61–81.

Spiropoulou, C. F. 2001. Hantavirus maturation, *Current Topics in Microbiology and Immunology* 256: 33–46.

Spiropoulou, C. F., *et al.* 2003. Sin Nombre virus glycoprotein trafficking, *Virology* 308(1): 48–63.

Srinivasan, A., *et al.* 2005. Transmission of rabies virus from an organ donor to four transplant recipients, *The New England Journal of Medicine* 325: 1103–1111.

Stein, L. T., *et al.* 2010. Immunohistochemical study of rabies virus within the central nervous system of domestic and wildlife species, *Veterinary Pathology* 47: 630–633.

Sugiyama, K., *et al.* 1987. Four serotypes of haemorrhagic feaver with renal sindrome viruses identified by policlonal and monoclonal antibodies, *Journal of General Virology* 68(Pt4): 979–987.

Sumino, K. C., *et al.* 2010. Detection of respiratory viruses and the associated chemokine responses in serious acute respiratory illness, *Thorax* 65: 639–644.

Svičiulis A, Vaičiuvėnas V, Tilindis B. 1989. *Imunologija.* Vilnius: Mokslas.

Takakura, A., *et al.* 2003. Establishment of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of hantavirus antibody of rats using a recombinant of nucleocapsid protein expressed in *Escherichia coli*, *Experimental Animals* 52(1): 25–30.

Terlizzi, M. E., *et al.* 2009. Quantitative RT real time PCR and indirect immunofluorescence for the detection of human parainfluenza virus 1, 2, 3, *Journal of Virological Methods* 160: 172–177.

Thomas, D., *et al.* 1985. Mass and molecular composition of vesicular stomatitis virus: a scanning transmission electron microscopy analysis, *The Journal of Virology* 54: 598–607.

Tischler, N. D.; Rosemblatt, M.; Valenzuela, P. D. 2008. Characterization of cross-reactive and serotype-specific epitopes on the nucleocapsid proteins of hantaviruses, *Virus Research* 35(1): 1–9.

Toriumi, H.; Kawai, A. 2005. Structural difference recognized by a monoclonal antibody #404–11 between the rabies virus nucleocapsid (NC) produced in virus infected cells and the NC-like structures produced in the nucleoprotein (N) cDNA-transfected cells, *Microbiology and Immunology* 49: 757–770.

Tuffereau, C., *et al.* 1998. Neuronal cell surface molecules mediate specific binding to rabies virus glycoprotein expressed by a recombinant baculovirus on the surface of lepidopteran cells, *The Journal of Virology* 72: 1085–1091.

Umoh, J. U., *et al.* 1990. Identification of fox rabies by a monoclonal antibody directed against nucleocapsid of a street rabies virus, *Zentralblatt fur Veterinarmedizin. Reihe B* 37(2): 153–157.

Upadhyay, C.; Ammayappan, A.; Vakharia, V. N. 2009. Detection of NP, N3 and N7 antibodies to avian influenza virus by indirect ELISA using yeast-expressed antigens, *Virology Journal* 6: 158.

Vachon, M. L., *et al.* 2006. Human parainfluenza type 4 infections, Canada, *Emerging Infectious Diseases* 12(11): 1755–1758.

Vainionpaa, R.; Hyypia, T. 1994. Biology of parainfluenza viruses, *Clinical Microbiology Reviews* 7: 265–275.

Vapalahti,O., et al. 2003. Hantavirus infections in Europe, *The Lancet Infectious Diseases* 3: 653–752.

Venters, C.; Graham, W.; Cassidy, W. 2004. Recombivax-HB: perspectives past, present and future, *Expert Review of Vaccines* 3: 119–129.

Wacharapluesadee, S., *et al.* 2008. Development of a TaqMan real-time RT-PCR assay for the detection of rabies virus, *Journal of Virological Methods* 151: 317–320.

Wang, C. Y., *et al.* 2007. Detection of circulating antigen with a MAb-based sandwich-ELISA and its comparison with specific IgM detection in sera of patients with hemorrhagic fever with renal syndrome, *Hybridoma (Larchmt)* 26(1): 42–45.

Wang, Y., *et al.* 2008. NMR structure of the N-terminal coiled coil domain of the Andes hantavirus nucleocapsid protein, *The Journal of Biological Chemistry* 283: 28297–28304.

Warnes, A.; Fooks, A. R.; Stephenson, J. R. 1994. Production of measles nucleoprotein in different expression systems and its use as a diagnostic reagent, *Journal of Virological Methods* 49: 257–268.

Webster, W. A. 1987. A tissue culture infection test in routine rabies diagnosis, *The Canadian Veterinary Journal* 51: 367–369.

White, J. D., *et al.* 1982. Hantaan virus, aetiological agent of Korean haemorrhagic fever, has Bunyaviridae-like morphology, *Lancet* 1: 768–771.

Wilson, M. B.; Nakane, P.K. 1978. Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. *Immunofluorescence and related techniques.* Knapp, W, Holubar K, Wick G (eds) Elsevier, Amsterdam,: pp 215–244.

Xu, G., *et al.* 2007. A simple sandwich ELISA (WELYSSA) for the detection of lyssavirus nucleocapsid in rabies suspected specimens using mouse monoclonal antibodies, *Biologicals* 35: 297–302.

Xu, X., *et al.* 2002. The RNA binding domain of the hantaan virus N protein maps to a central, conserved region, *The Journal of Virology* 76: 3301–3308.

Zaki, S. R., *et al.* 1995. hantavirus pulmonary syndrome: pathogenesis oh an emerging infectious disease, *The American Journal of Pathology* 146: 552–579.

Zhenqiang, B.; Formenty, P. B. H.; Roth, C. E. 2008. Hantavirus infection: a review and global update, *The Journal of Infection in Developing Countries* 2(1): 3–23.

Zuckerman, A. J., *et al.* 2009. *Principles & practice of clinical virology.* West Susex, UK: Wiley-Blackwell.

Žvirblienė, A., *et al.* 2006. Generation of monoclonal antibodies of desired specificity using chimeric polyomavirus-derived virus-like particles, *The Journal of Immunological Methods* 311: 57–70.

Žvirblienė, A., *et al.* 2007. Mapping of B cell epitopes in measles virus nucleocapsid protein, *Archives of Virology* 152: 25–39.

Žvirblienė, A., *et al.* 2009. Mapping of an antigenic site on the nucleocapsid protein of human parainfluenza virus type 3, *Viral Immunology* 22: 181–188.

Žvirblienė, A., *et al.* 2010. Novel monoclonal antibodies against Menangle virus nucleocapsid protein, *Archives of Virology* 155(1): 13–18.

# Autorės publikacijų disertacijos tema sąrašas

Kučinskaitė-Kodzė, I.; Petraitytė-Burneikienė, R.;. Žvirblienė, A.; Hjelle, B.; Medina, R. A.; Gedvilaitė, A.; Ražanskienė, A.; Schmidt-Chanasit, J.; Mertens, M.; Padula, P.; Sasnauskas, K.; Ulrich, R. G. 2011. Characterization of monoclonal antibodies against hantavirus nucleocapsid protein and their use for immunohistochemistry on rodent and human samples, *Archives of Virology* 156: 443–456. ISSN 0304-8608 (ISI Web of Science).

Žvirblienė, A.; Kučinskaitė-Kodzė, I.; Juozapaitis, M.; Lasickienė, R.; Gritėnaitė, D.; Russell, G.; Bingham, J.; Michalski, W. P.; Sasnauskas, K. 2010. Novel monoclonal antibodies against Menangle virus nucleocapsid protein, *Archives of Virology* 155(1): 13–18. ISSN 0304-8608 (ISI Web of Science).

Žvirblienė, A.; Šėžaitė, I.; Plečkaitytė, M.; Kučinskaitė-Kodzė, I.;.Juozapaitis, M.; Sasnauskas, K. 2009. Mapping of an antigenic site on the nucleocapsid protein of human parainfluenza virus type 3, *Viral Immunology* 22(3):181–188. ISSN 0882-8245 (ISI Web of Science).

Kučinskaitė, I.; Juozapaitis, M.; Serva, A.; Žvirblienė, A.; Johnson, N.; Staniulis, J.; Foks, A. R.; Muller, T.; Sasnauskas, K.; Ulrich, R. 2007. Antigenic characterization of

yeast-expressed lyssavirus nucleoproteins, *Virus Genes* 35: 521–529. ISSN 0920-8569 (ISI Web of Science).

Indrė KUČINSKAITĖ-KODZĖ

NAUJŲ MONOKLONINIŲ ANTIKŪNŲ PRIEŠ VIRUSŲ ANTIGENUS KŪRIMAS, CHARAKTERIZAVIMAS IR TAIKYMAS

Daktaro disertacija

Technologijos mokslai,
chemijos inžinerija (05T), biotechnologija (T490)

PRODUCTION, CHARACTERIZATION AND APPLICATION OF NEW MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST VIRAL ANTIGENS

Doctoral Dissertation

Technological sciences,
Chemical engineering (05T), Biotechnology (T490)

2011 05 13. 12,5. sp.l. Tiražas 20 egz.
Vilniaus Gedimino technikos universiteto
leidykla „Technika“,
Saulėtekio al. 11, 10223 Vilnius,
*http://leidykla.vgtu.lt*
Spausdino UAB „Ciklonas“
J. Jasinskio g. 15, 01111 Vilnius