

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Mindaugas Juozapaitis

***PARAMYXOVIRIDAE ŠEIMOS VIRUSŲ NUKLEOKAPSIDĖS
BALTYMŲ SINTEZĖ MIELĖSE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* IR
JŲ PANAUDOJIMAS DIAGNOSTIKAI***

Daktaro disertacija

Fiziniai mokslai, biochemija (04 P)

Vilnius, 2011

Disertacija rengta 2004-2010 metais Vilniaus universiteto Biotechnologijos instituto Eukariotų genų inžinerijos skyriuje.

Disertacija ginama eksternu.

Mokslinis konsultantas:

Prof. habil. dr. Kęstutis Sasnauskas (VU Biotechnologijos institutas, fiziniai mokslai, biochemija – 04 P)

Disertacija ginama Vilniaus Universiteto Biochemijos mokslo krypties taryboje:

Pirmininkas:

Prof. dr. Virginijus Šikšnys (VU Biotechnologijos institutas, fiziniai mokslai, biochemija – 04 P)

Nariai:

Prof. habil. dr. Aniolas Sruoga (Vytauto Didžiojo universitetas, biomedicinos mokslai, ekologija ir aplinkotyra – 03 B);

Dr. Giedrius Vilkaitis (VU Biotechnologijos institutas, fiziniai mokslai, biochemija – 04 P);

Dr. Arūnas Lagunavičius (Thermo Fisher Scientific, fiziniai mokslai, biochemija – 04 P);

Dr. Aušra Ražanskienė (VU Biotechnologijos institutas, fiziniai mokslai, biochemija – 04 P).

Oponentai:

Dr. Arvydas Kanopka (VU Biotechnologijos institutas, fiziniai mokslai, biochemija – 04 P);

Dr. Artūras Jakubauskas (VUL Santariškių klinikų Hematologijos, onkologijos ir transfuziologijos centras, fiziniai mokslai, biochemija – 04 P).

Disertacija bus ginama viešame Biochemijos mokslo krypties posėdyje 2011 m. birželio mėn. 20 d. 10 val. VU Biotechnologijos instituto konferencijų salėje.

Adresas: Graičiūno 8, Vilnius LT-02241, Lietuva.

Disertacijos santrauka išsiuntinėta 2011 m. __mėn.__d.

Disertaciją galima peržiūrėti VU Biotechnologijos instituto ir Vilniaus Universiteto bibliotekose.

TURINYS

IVADAS.....	8
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	13
1.1. <i>Paramyxoviridae</i> šeimos virusai: sisteminė padėtis, genomai, viruso dalelės sandara ir infekcinis ciklas.....	13
1.2. Nukleokapsidės baltymai: funkcijos, struktūra, biocheminės savybės ir formuojami dariniai	23
1.3. Kvėpavimo takų ligas sukeltys <i>Paramyxoviridae</i> šeimos virusai: patogeninės savybės, sukeltos ligos, paplitimas, imunologija, prevencinės priemonės ir diagnostika	32
1.3.1. Žmogaus paragripo virusai.....	33
1.3.2. Žmogaus respiracinis sincitinis virusas.....	40
1.4. Nauji, šikšnosparnių platinami <i>Paramyxoviridae</i> šeimos virusai: biologiniai bruožai, patogeninės savybės, sukeltos ligos ir epidemiologija	46
1.4.1. Henipah virusai	48
1.4.2. Menangle virusas.....	53
1.5. Virusinių baltymų sintezė heterologinėse baltymų sintezės sistemose ...	56
1.6. <i>Paramyxoviridae</i> šeimos virusų nukleokapsidės baltymų sintezė įvairiose heterologinių baltymų sintezės sistemose.....	60
2. TYRIMŲ METODIKA	63
2.1. MEDŽIAGOS	63
2.1.1. Reagentai.....	63
2.1.2. Fermentai	63
2.1.3. Oligonukleotidai.....	63
2.1.4. Bakterijų ir mielių terpės, ląstelių auginimo sąlygos.....	65
2.1.5. Bakterijų, mielių kamienai ir plazmidės	67
2.2. METODAI.....	67
2.2.1. DNR padauginimas PGR metodu	67
2.2.2. DNR elektroforezė agarozės gelyje	68

2.2.3. DNR fragmentų išskyrimas iš agarozės gelio.....	68
2.2.4. Plazmidinės DNR skyrimas iš <i>E.coli</i> ląstelių.....	68
2.2.5. DNR hidrolizė restrikcijos endonukleazėmis.....	70
2.3.6. DNR 5' fosforo grupės pašalinimas.....	70
2.3.7. DNR ligavimas.....	70
2.2.8. <i>E.coli</i> kompetentinių ląstelių paruošimas.....	71
2.2.9. <i>E.coli</i> kompetentinių ląstelių transformacija.....	71
2.2.10. Mielių <i>Saccharomyces cerevisiae</i> transformacija plazmidine DNR ir transformuotų mielių ląstelių užšaldymas ilgalaikiam saugojimui.....	72
2.2.11. <i>S.cerevisiae</i> transformantų auginimas ir indukcija.....	73
2.2.12. Suardytų mielių ląstelių suspensijos paruošimas ir tiriamų baltymų sintezės lygio nustatymas.....	73
2.2.13. Baltymų gryninimas centrifuguojant per 30 % sacharozės tirpalo sluoksnį ir cezio chlorido tankio gradientu.....	74
2.2.14. vNPD plūduriavimo tankio nustatymas.....	75
2.2.15. Baltymų koncentracijos nustatymas.....	75
2.2.16. Baltymų mėginių paruošimas NDS-PAGE.....	75
2.2.17. Baltymų elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje.....	76
2.2.18. Baltymų imunoblotingas.....	76
2.2.19. Elektroninė mikroskopija.....	78
2.2.20. Visos mielių ląstelės RNR išskyrimas.....	78
2.2.21. RNR išskyrimas iš virusų nukleokapsidę primenančių darinių.....	79
2.2.22. RNR elektroforezė agarozės gelyje su formaldehidu.....	79
2.2.23. RNR hibridizacija su radioaktyviu zonu.....	80
3. DARBO REZULTATAI.....	81
3.1. <i>Paramyxoviridae</i> šeimos virusų nukleokapsidės baltymų sintezė mielėse <i>S.cerevisiae</i>	81
3.1.1. Mielių raiškos vektorių su nukleokapsidės baltymus koduojančiais genais konstravimas ir mielių transformacija.....	81

3.1.2. <i>Paramyxoviridae</i> šeimos virusų nukleokapsidės baltymų sintezė mielėse <i>S.cerevisiae</i> , gryninimas ir savybių tyrimai	91
3.1.2.1. Sendai viruso nukleokapsidės baltymas	91
3.1.2.2. Žmogaus paragripo virusų nukleokapsidės baltymai.....	99
3.1.2.3. Žmogaus respiracinio sincitinio viruso nukleokapsidės baltymas.....	107
3.1.2.4. Henipah virusų nukleokapsidės baltymai	115
3.1.2.5. Menangle viruso nukleokapsidės baltymas.....	122
3.1.2.6. Paramikso virusų nukleokapsidės baltymų sintezės mielėse <i>S.cerevisiae</i> rezultatų apibendrinimas.....	127
3.2. Rekombinantinių <i>Paramyxoviridae</i> šeimos virusų nukleokapsidės baltymų taikymas diagnostikoje	129
3.2.1. Rekombinantinių <i>Paramyxoviridae</i> šeimos virusų nukleokapsidės baltymų antigeninių savybių tyrimas.....	129
3.2.1.1. Žmogaus paragripo virusų 1 ir 3 nukleokapsidės baltymų antigeninės savybės	130
3.2.1.2. Žmogaus respiracinio sincitinio viruso nukleokapsidės baltymo antigeninės savybės	133
3.2.1.3. Henipah virusų nukleokapsidės baltymų antigeninės savybės..	134
3.2.1.4. Menangle viruso nukleokapsidės baltymo antigeninės savybės	135
3.2.2. Mielėse <i>S.cerevisiae</i> susintetintų <i>Paramyxoviridae</i> šeimos virusų nukleokapsidės baltymų panaudojimas monokloninių antikūnų gavimui	136
4. REZULTATŲ APTARIMAS	141
IŠVADOS.....	162
MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS	163
PADĖKA.....	166
LITERATŪROS SĄRAŠAS	167

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

angl. – angliškai

A, C, G, T – adeninas, citozinas, guaninas, timinas

Ap^R – atsparumas ampicilinui

aps/min – apsisukimai per minutę

ar. – amino rūgštis

ASR – atviro skaitymo rėmelis

ATP – adenzintrifosfatas

bp – bazių pora

BSA – jaučio serumo albuminas

kDNR – DNR, komplementari iRNR

CNS – centrinė nervų sistema

CsCl – cezio chloridas

Da – daltonas

DEPC – dietilpirokarbonatas

DNR – deoksiribonukleorūgštis

DTT – ditionitritolis

dNTP – deoksiribonukleozidtrifosfatai

EDTA – etilendiaminotetraacto rūgštis

EM – elektroninis mikroskopas

ET – endoplazminis tinklas

IgM – M klasės imunoglobulinas

IgG – G klasės imunoglobulinas

kb – kilobazė (1000 bp)

kDa – kilodaltonas

NBD – nukleokapsidės prisijungimo sritis

NP⁰ – laisvas NP baltymo monomeras

N:RNR – iš nukleokapsidės baltymų ir ribonukleorūgšties sudaryta nukleokapsidė

iRNR – informacinė ribonukleorūgštis
2µm – dvimikroninė mielių plazmidė
nt – nukleotidas
ORI – replikacijos iniciacijos seka
PAA – poliakrilamidas
PAGE – poliakrilamido gelio elektroforezė
PEG – polietilenglikolis
PGR – polimerazinė grandininė reakcija
P-L – iš P ir L baltymų sudaryta virusinė RNR polimerazė
RE – restrikcijos endonukleazė
RNazė – ribonukleazė
RNR – ribonukleorūgštis
SDS – natrio dodecilsulfatas
SLAM – signalinė limfocitų aktyvacijos molekulė
TEMED - N,N',N',N'-tetrametiletildiaminas
Tris – tris(hidroksimetil)aminometanas
UV – ultravioletas
VPD – virusus primenančios dalelės
vNPD – viruso nukleokapsidę primenančios dalelės

IVADAS

Paramyxoviridea šeimai priklauso plačiai paplitę virusai, sukiantys pavojingas žmogaus ir gyvūnų ligas. Vieni iš pavojingiausių šios šeimos atstovų, priklausančių *Pneumovirus* bei *Respirovirus* gentims, yra kvėpavimo takus pažeidžiantys žmogaus respiracinis sincitinis virusas (hRSV) bei 1 ir 3 serotipų žmogaus paragripo virusai (hPIV1 ir hPIV3) (Chanock, 1957; Chanock ir kt., 1958b). Pasaulio Sveikatos Organizacijos vertinimu, vien žmogaus respiracinis sincitinis virusas kasmet visame pasaulyje sukelia kvėpavimo takų ligas 64 milijonams žmonių, iš kurių 160.000, daugiausia naujagimiai ir vaikai, dėl ligos komplikacijų miršta, o dėl žmogaus paragripo virusų sukeltų kvėpavimo takų ligų kasmet vien tik JAV nuo 15.000 iki 80.000 žmonių yra gydomi sveikatos priežiūros įstaigose (World Health Organization 2009). Kadangi paragripo ir respiracinio sincitinio virusų bei kitų kvėpavimo takus infekuojančių virusų ir šių organizmo sistemą pažeidžiančių bakterijų sukeltos kvėpavimo takų ligos nežymiai skiriasi savo simptomais, todėl nustatyti ligos priežastį, remiantis vien klinikiniais ligos požymiais, dažnai būna neįmanoma. Norint tiksliai nustatyti kvėpavimo takų ligą sukėlusį virusą, rekomenduojama naudoti molekulinės diagnostikos priemones (Hall, 2001; Henrickson, 2003).

Nipah, Hendra ir Menangle virusai (NiV, HeV ir MenV) yra neseniai atrasti *Paramyxoviridae* šeimai priklausančios šikšnosparnių platinami virusai (Chua ir kt., 1999; Philbey ir kt., 1998; Selvey ir Sheridan, 1995). Naujausi duomenys rodo, kad NiV, HeV ir MenV žalingų infekcijų protrūkiai yra negausūs ir pasauliniu mastu iki šiol šių virusų padaryta žala nėra labai didelė (Eaton ir kt., 2006; Philbey ir kt., 2008). Tačiau šie virusai sparčiai kinta, yra platinami įvairių rūšių gyvūnų, sukelia sisteminę infekciją, kurios metu yra pažeidžiamos įvairios organų sistemos, tarp jų ir centrinė nervų sistema, o NiV ir HeV yra mirtinai pavojingi žmogui, todėl yra manoma, kad laikui bėgant ir kintant klimatui šie virusai turi nemažą potencialą tapti plačiai paplitusiais,

pavojingais virusais (Eaton ir kt., 2006; Philbey ir kt., 2008). Kadangi NiV, HeV ir MenV buvo atrasti palyginti neseniai, dėl to žinios apie juos yra pakankamai skurdžios. Nėra sukurtos efektyvios šių virusų infekcijų diagnostikai skirtos priemonės, kurios žymiai palengvintų šių virusų biologijos, paplitimo, patogenezės ir patologijos tyrimus (Wong, 2010).

Dėl minėtų priežasčių šiame darbe aprašyti tyrimai skirti sukurti efektyvias priemones kvėpavimo takų ligas sukeliančių ir neseniai atrastų šikšnosparnių platinamų *Paramyxoviridea* šeimos virusų infekcijų diagnostikai yra savalaikiai ir svarbūs.

Paramyxoviridea šeimos virusų infekcijų diagnostikai naudojami laboratorijoje atliekami metodai yra sudėtingi ir nepakankamai specifiški (Hall, 2001; Henrickson, 2003; Lee ir kt., 1992). Specifiniai šios šeimos virusams antikūnai yra efektyviai aptinkami nustatant jų reakciją su virusiniais antigenais tiesioginės imunofermentinės analizės metodu. Šiam metodui yra reikalingi virusiniai antigenai, todėl šiam tikslui iki šiol dažniausiai yra naudojamos paramikso virusų dalelės. Nors virusų dalelių pagrindu sukurti paramikso virusų infekcijų diagnostikos metodai yra pigūs ir paprasti, jais galima testuoti didelį kiekį mėginių vienu metu, tačiau jie taip pat nėra pakankamai specifiški (Hall, 2001; Henrickson, 2003). Rekombinantinių baltymų panaudojimas specifinių hPIV1, hPIV3, hRSV, NiV, HeV ir MenV antikūnų nustatymui turi daug pranašumų lyginant su virusinių dalelių panaudojimu šiai analizei: paprastesnė antigenų sintezė, lengvesnė metodų standartizacija, didesnis antigenų stabilumas, nėra pavojaus išplatinti virusus ir kita (Bouche ir kt., 1998). Nors naudojant rekombinantinį baltymą aptinkamas siauresnis virusui specifinių antikūnų spektras, tačiau parinkus tinkamą viruso antigeną, įmanoma padidinti diagnostinio testo specifiskumą. Yra žinoma, kad *Paramyxoviridae* šeimos virusų N baltymo C-dalis yra imunogeniška ir skiriasi savo aminorūgščių seka net tarp skirtingų paragripo virusų tipų (Karron ir Collins, 2007). Todėl naudojant šį baltymą netiesioginės

imunofermentinės analizės metodu turėtų būti įmanoma aptikti virusui specifinius antikūnus kraujo serumo ar seilių mėginiuose.

Darbo tikslas ir uždaviniai. Remiantis aukščiau išvardintomis problemomis, buvo iškeltas pagrindinis šio **darbo tikslas**:

- Atlikti hPIV1, hPIV3, hRSV, NiV, HeV ir MenV nukleokapsidės baltymų (N) sintezės tyrimus mielių *S.cerevisiae* svetimų baltymų sintezės sistemoje, apibūdinti rekombinantinių N baltymų savybes ir galimybes panaudoti juos diagnostikoje.

Pagrindiniai *Paramyxoviridae* šeimos virusų baltymai, infekcijos metu sukeliantys imuninės sistemos atsaką, kurio metu yra gaminami specifiniai šiems baltymams antikūnai, yra virusinės dalelės membranoje įsitvirtinę glikoproteinai (Connors ir kt., 1991; Eaton ir kt., 2006; Philbey ir kt., 2008; Ray ir kt., 1988). Tačiau laikui bėgant *Paramyxoviridae* šeimos virusų glikoproteinų antigeninės savybės kinta, imuninio atsako metu šiems baltymams gaminami antikūnai dažnai reaguoja su giminingo viruso analogiškais baltymais (Lamb ir Parks, 2007). *Paramyxoviridae* šeimos virusų glikoproteinų sintezė heterologinėse baltymų sintezės sistemose yra sudėtinga, gaunami tik nedideli šių baltymų kiekiai (Fooks ir kt., 1993; Nayak ir kt., 1985). Mielėse *S.cerevisiae* nepavyko susintetinti tymų viruso H ir kiaulytės viruso HN baltymų, kurių antigeninės savybės būtų panašios į natyvių analogiškų baltymų antigenines savybes (Čiplies ir kt., 2011, spaudoje). *Paramyxoviridae* šeimos virusų N baltymas šių virusų infekcijos metu taip pat sukelia imuninės sistemos atsaką, kurio metu yra gaminami N baltymui specifiniai antikūnai. *Paramyxoviridae* šeimos kiaulytės ir tymų virusų N baltymai buvo sėkmingai susintetinti mielėse *S.cerevisiae* ir *P.pastoris* ir iki pat šiandien yra sėkmingai taikomi šių virusų infekcijų serologinei diagnostikai (Samuel ir kt., 2002; Samuel ir kt., 2003; Slibinskas ir kt., 2004; Slibinskas ir kt., 2003). Todėl hPIV1, hPIV3, hRSV, NiV, HeV ir MenV serologinei diagnostikai tikslinga būtų naudoti mielėse susintetintus šių virusų N baltymus.

Siekiant užsibrėžto darbo tikslo buvo suformuluoti šie **darbo uždaviniai**:

1. Susintetinti hPIV1, hPIV3, hRSV, NiV, HeV ir MenV N baltymus mielių *S.cerevisiae* svetimų baltymų sintezės sistemoje, parinkti optimalias šių baltymų sintezės sąlygas, nustatyti rekombinantinių baltymų sintezės lygį bei apibūdinti jų sintezės mielių ląstelėse efektyvumą.
2. Išgryninti mielių ląstelėse susintetintus rekombinantinius hPIV1, hPIV3, hRSV, NiV, HeV ir MenV N baltymus ir apibūdinti jų savybes.
3. Nustatyti rekombinantinių paramikso virusų N baltymų sąveikos su mielių ląstelės nukleorūgštimis pobūdį ir ištirti šių baltymų C dalies įtaką jų formuojamų virusų nukleokapsidę primenančių darinių stabilumui.
4. Patikrinti, ar mielėse susintetinti rekombinantiniai hPIV1, hPIV3, hRSV, NiV, HeV ir MenV N baltymai tinka šių virusų infekcijų diagnostikai.

Darbo naujumas. *Paramyxoviridea* šeimos kvėpavimo takų ligas sukeliančių virusų infekcijų diagnostikai skirtos sistemos nėra efektyvios (Hall, 2001; Henrickson, 2003). Taip pat iki šiol nėra sukurta efektyvių standartizuotų neseniai atrastų šikšnosparnių platinamų *Paramyxoviridea* šeimos virusų infekcijų diagnostikai skirtų sistemų (Wong, 2010). Galimybės pritaikyti rekombinantinius baltymus pavojingų *Paramyxoviridae* šeimos virusų infekcijų diagnostikai buvo pradėtos tirti maždaug prieš 20 metų (Lamb ir Parks, 2007). Pastarąjį dešimtmetį įvairūs paramikso virusų baltymai buvo susintetinti prokariotų ir aukštesniųjų eukariotų svetimų baltymų sintezės sistemose ir patikrintas jų tinkamumas paramikso virusų diagnostikai (Bhella ir kt., 2002; Fooks ir kt., 1995; Fooks ir kt., 1993; Spehner ir kt., 1991; Warnes ir kt., 1994). Kadangi optimalaus problemos sprendimo vis dar nerasta, šie darbai tęsiami toliau. Darbe atlikti hPIV1, hPIV3, hRSV, NiV, HeV ir MenV N baltymų sintezės mielėse *S.cerevisiae* bei rekombinantinių N baltymų taikymo diagnostikai tyrimai yra naujausias mokslinis darbas šioje tyrimų srityje.

Darbo reikšmė. Pirmiausia šis darbas svarbus praktiniu požiūriu, nes jo metu mielėse *S.cerevisiae* susintetinti hPIV1, hPIV3, hRSV, NiV, HeV ir MenV N

baltymai gali būti sėkmingai naudojami greitų ir pigių šių virusų infekcijų diagnostikai skirtų sistemų kūrimui. Efektyvios šių virusų infekcijų diagnostikos priemonės ne tik pagelbėtų tiksliai ir greitai identifikuoti pavojingus paramikso virusus, bet taip pat žymiai palengvintų šių virusų biologijos, paplitimo, patogenezės ir patologijos tyrimus. Darbe gauti rezultatai atskleidžia naujus rekombinantinių baltymų sintezės mielėse aspektus ir leidžia giliau suvokti paramikso virusų N baltymų ir jų formuojamų darinių savybes.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

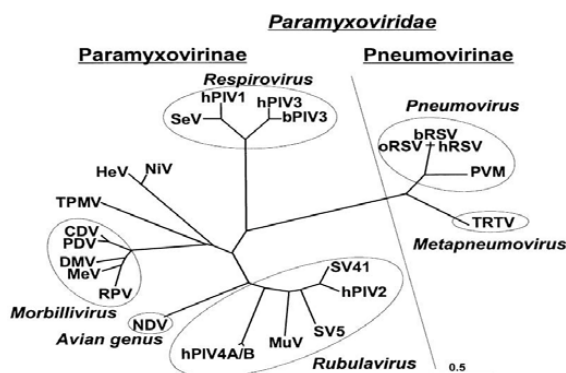
1.1. *Paramyxoviridae* šeimos virusai: sisteminė padėtis, genomai, viruso dalelės sandara ir infekcinis ciklas

Paramyxoviridae šeimai priklauso virusai, kurių dalelės turi dvisluksnį lipidinį apvalkalą su jame įterptais membraniniais virusų glikoproteinais. Šios šeimos virusų genomai yra vientisa viengrandė priešprasmė RNR molekulė. Genominė RNR yra naudojama matrica viruso baltymus koduojančių informacinių RNR (iRNR) ir antigenominės RNR sintezei. Virusinės RNR sintetina viruso koduojama RNR nuskaitanti RNR polimerazė (RnRp), kuri infekcinio ciklo metu kartu su genomine RNR yra įpakuojama į viruso daleles (Lamb ir Parks, 2007). *Paramyxoviridae* šeimos virusų iRNR sintezė vyksta infekuotos ląstelės citoplazmoje. Šios šeimos virusų genomo replikacijai reikalinga pastovi virusinių baltymų sintezė. Susintetintą antigenominę RNR viruso RnRp naudoja matrica genominės RNR sintezei (Curran ir Kolakofsky, 1999). *Paramyxoviridae* šeimos virusai savo savybėmis yra panašūs į *Orthomyxoviridae* (panašūs viruso dalelės apvalkalėlio glikoproteinai) ir *Rhabdoviridae* (panašūs genomai ir panaši virusinių genų raiška) šeimų virusus.

Sisteminė padėtis

Paramyxoviridae virusų šeima priklauso *Mononegavirales* eilei. Šios šeimos virusai pagal Virusų Taksonomijos Tarptautinio Komiteto reglamentą šiuo metu yra suskirstyti į du pošeimius: *Paramyxovirinae* ir *Pneumovirinae*. *Paramyxovirinae* pošeimiui priklauso penkios gentys: *Rubulavirus*, *Avulavirus*, *Respirovirus*, *Henipavirus* ir *Morbillivirus*. Žinomiausi *Rubulavirus* genties atstovai yra kiaulytės virusas bei 2 ir 4 serotipų žmogaus paragripo virusai (Takatsy ir Szafir, 1953), *Avulavirus* genties – 1 serotipo paukščių paragripo virusai, *Respirovirus* genties – Sendai virusas (SeV) bei 1 ir 3 serotipų žmogaus paragripo virusai (hPIV1 ir hPIV3) (Kuroya ir kt., 1953a), *Henipavirus* genties – Nipah ir Hendra virusai (NiV ir HeV) (Eaton ir kt., 2006), o *Morbillivirus* genties

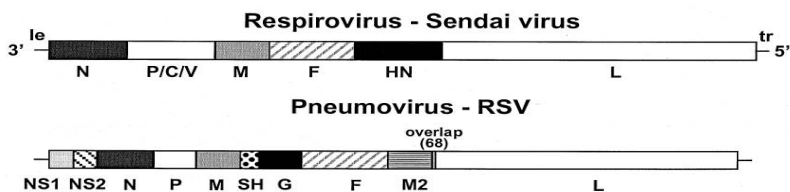
– tymų virusas ir įvairių gyvūnų maro virusai (Mansi, 1951). *Pneumovirinae* pošeimiui priklauso dvi gentys: *Pneumovirus* ir *Metapneumovirus*. Žinomiausias *Pneumovirus* genties atstovas yra žmogaus respiracinis sincitinis virusas (hRSV) (Blount ir kt., 1956), o *Metapneumovirus* genties – neseniai atrastas žmogus metapneumo virusas (van den Hoogen ir kt., 2001). Menangle viruso (MenV), tai pat, kaip ir dar kelių neseniai atrastų paramikso virusų, taksonominė padėtis *Paramyxoviridae* virusų šeimoje iki šiol nėra visiškai aiški (Philbey ir kt., 1998). Šios šeimos virusai yra klasifikuojami remiantis šiais kriterijais: morfologinėmis virusų savybėmis; jų genomo organizacija; virusinių baltymų biologiniu aktyvumu; ribonukleorūgščių sekų, koduojančių virusinius baltymus, panašumu. *Paramyxoviridae* šeimos virusų klasifikacijos ir evoliucinių ryšių schema pateikta 1 paveiksle.



1 pav. *Paramyxoviridae* šeimos virusų klasifikacijos ir evoliucinių ryšių schema (pagal Lamb ir Kolakofsky, 2001). SeV – Sendai virusas, hPIV1 – pirmo serotipo žmogaus paragripo virusas (angl. – *human parainfluenza virus type 1 [hPIV1]*), hPIV3 – trečio serotipo žmogaus paragripo virusas (angl. – *human parainfluenza virus type 3 [hPIV3]*), bPIV3 – trečio serotipo galvijų paragripo virusas (angl. – *bovine parainfluenza virus type 3 [bPIV3]*), oRSV – avių respiracinis sincitinis virusas (angl. – *ovine respiratory syncytial virus [oRSV]*), bRSV – galvijų respiracinis sincitinis virusas (angl. – *bovine respiratory syncytial virus [bRSV]*), hRSV – žmogaus respiracinis sincitinis virusas (angl. – *human respiratory syncytial virus [hRSV]*), PVM – graužikų pneumovirusas (angl. – *murine pneumovirus [PVM]*), TRTV – kalakutų rinotrachėjito virusas (angl. – *turkey rinotracheitis virus [TRTV]*), SV41 – beždžionių virusas 41 (angl. – *simian virus 41 [SV41]*), hPIV2 – antro serotipo žmogaus paragripo virusas (angl. – *human parainfluenza virus type 2 [hPIV2]*), SV5 – beždžionių virusas 5 (angl. – *simian virus 5 [SV5]*), MuV – kiaulytės virusas (angl. – *mumps virus [MuV]*), hPIV4A/B – ketvirtro serotipo žmogaus paragripo virusas (angl. – *human parainfluenza virus type 4 [hPIV4]*), NDV - Newcastle'io ligos virusas (angl. – *Newcastle disease virus [NDV]*), RPV – galvijų maro virusas (angl. – *rinderpest virus [RPV]*), MeV – tymų virusas (angl. – *measles virus [MeV]*), DMV – delfinų morbillivirusas (angl. – *dolphin morbillivirus [DMV]*), PMV – jūrų kiaulės morbillivirusas (angl. – *porpoise morbillivirus [PMV]*), CDV – šunų maro virusas (angl. – *canine distemper virus [CDV]*), TPMV – Tupaia paramikso virusas, HeV – Hendra virusas ir NiV – Nipah virusas.

Genomas

Paramikso virusų genomas yra apytiksliai 15.000-19.000 nukleotidų ilgio RNR molekulė. Genomo galuose yra reguliacinės sekos. 3` genomo gale – 50 nt ilgio reguliacinė seka, vadinama „lyderiu“, ir 5` genomo gale – 50-161 nt ilgio reguliacinė seka, vadinama „prikaba“ (Mink ir kt., 1991; Okazaki ir kt., 1992). Šios genomo reguliacinės sekos yra būtinos viruso transkripcijai ir replikacijai. Tarp genomo reguliacinių sekų tandemiškai išsidėsto nuo 6 iki 10 genų (Varich, 1988). *Paramyxovirinae* pošeimio virusų genomo koduojami genai 3`–5` kryptimi genome yra išsidėstę tokia tvarka: *N*, *P/C/V* (persidengiantys atviri skaitymo rėmeliai), *M*, *F*, *H* (arba *HN*) ir *L*, o *Pneumovirinae* pošeimio visus koduojamų genų tvarka genome 3`–5` kryptimi yra tokia: *NS1*, *NS2*, *N*, *P*, *M*, *SH*, *G*, *F*, *M2* ir *L*. Genomo talpą padidina persidengiantys atviri skaitymo rėmeliai (ASR) *P* gene ir nauji ASR, kurie suformuojami, viruso RnRp įterpiant papildomą nukleotidą į *P* geno iRNR šio geno transkripcijos metu (Hausmann ir kt., 1996; Pelet ir kt., 1991; Spriggs ir Collins, 1986). *Paramyxovirinae* ir *Pneumovirinae* pošeimiams priklausančių Sendai ir žmogaus respiracinio sincitinio virusų genolapiai pateikti 2 paveiksle. Kiekvienas genas savo pradžioje ir gale turi konservatyvias reguliacines sekas, kurios yra būtinos šių genų transkripcijai (Rassa ir kt., 2000).



2 pav. Sendai ir respiracinio sincitinio virusų genomų schemas (pagal Lamb ir Kolakofsky, 2001).

Viruso dalelės sandara

Paramyxoviridae šeimos virusų dalelė (virioną) sudaro dvisluoksnis lipidinis apvalkalas, kuris susiformuoja iš ląstelės šeimininko plazminės

membranos ir įsiterpusių į ją viruso glikoproteinų (Scheid ir kt., 1980). Virusų dalelė dažniausiai yra 150-350 nm skersmens sfera (Pav.3. A), nors gana dažnai aptinkamos ir siūlinės viriono formos. *Paramyxovirinae* šeimos virusų dvisluoksniame lipidiniame apvalkale yra įsiterpę dviejų tipų glikoproteinai: membranų suliejimo baltymas žymimas raide F (*angl. – fusion protein*) ir kraujo ląsteles surišantis baltymas – hemagliutininas, žymimas raide H (*angl. – hemagglutinin*), arba kraujo ląsteles surišantis ir sialo rūgšties grupę hidrolizuojantis baltymas – hemagliutininas-neuraminidazė, žymimas raidėmis HN (*angl. – hemagglutinin-neuraminidase*) (Lamb ir kt., 2006). *Pneumovirinae* šeimiiui priklausančių virusų dalelės dvisluoksniame lipidiniame apvalkale vietoj H arba HN baltymų yra aptinkamas glikoproteinas, kuris yra žymimas raide G (*angl. – glycoprotein*) (Lambert ir Pons, 1983; Levine ir kt., 1987). Integraliniai apvalkalo baltymai viriono paviršiuje formuoja 8-12 nm ilgio smaigus. HN baltymas atlieka keletą funkcijų. Jis ląstelės paviršiuje sąveikauja su sialo rūgšties grupėmis, esančiomis ląstelės paviršiaus baltymų-receptorių oligosacharidinių grandinių galuose (kraujo ląsteles surišantis aktyvumas) (Wemers ir kt., 1987). Be to, Goldžio komplekse esantis HN baltymas nuskelia sialo rūgšties grupę nuo visų baltymų, kurie yra transportuojami į infekuotos ląstelės plazminę membraną (sialo rūgšties grupę hidrolizuojantis aktyvumas). Glikoproteinai HN ir H yra II tipo integraliniai membranų baltymai (Laver ir kt., 1989). *Pneumovirinae* šeimiiui priklausančių virusų G baltymas stipriai skiriasi nuo HN ir H glikoproteinų, neturi sialo rūgšties grupę hidrolizuojančio aktyvumo ir nėra būtinas viruso gyvybiniam ciklui. Kitas paramikso virusų paviršinis glikoproteinas F yra I tipo integralinis membranų baltymas, kuris sulieja viruso dalelės apvalkalėlio ir infekuojamos ląstelės membranas (Connolly ir kt., 2006).

Gausiausias virione yra matriksų baltymas, žymimas raide M (*angl. – matrix protein*), kuris sąveikauja su dvisluoksne lipidine membrana, tačiau nėra membraninis baltymas (Harrison ir kt., 2000). M baltymai jungdamiesi

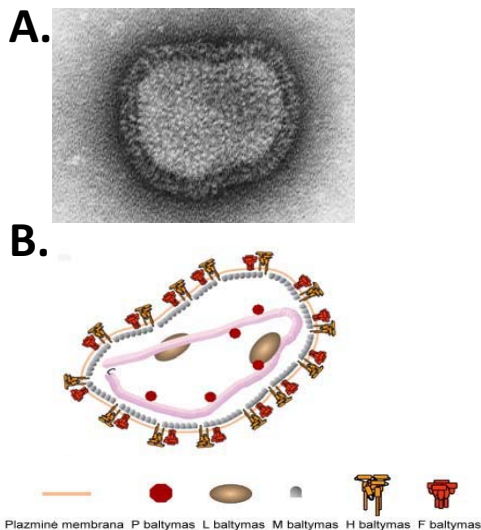
tarpusavyje ir su kitais viruso baltymais formuoja vientisą sluoksnį, kuris iškloja viruso dalelės membraninio apvalkalo vidinį paviršių. Manoma, kad šio baltymo formuojamas sluoksnis suteikia viruso dalelei tvirtumo ir sferinę formą. Išgryninti M baltymai geba jungtis tarpusavyje (Zhirnov, 1990). Jie taip pat sąveikauja su viruso nukleokapsidės baltymu, žymimu raide N (*angl.* – *nucleocapsid protein*). Taip pat M baltymas specifiškai sąveikauja tiek su F, tiek su HN arba H glikoproteinų citoplazminės srities aminorūgštimis (Takimoto ir Portner, 2004). Todėl paramikso virusų matrikso baltymas yra pagrindinis viruso dalelės morfogenezės organizatorius, sąveikaujantis su viruso dalelės integraliniais membranės baltymais, dvisluoksne lipidų membrana ir nukleokapside (Irie ir Sakaguchi, 2007).

Viruso dalelės viduje yra įpakuota nukleokapsidė, kurią sudaro N, P ir L baltymų kompleksas. Šandai viruso nukleokapsidę sudaro 2600 N, 300 P ir 50 L baltymų (Lamb ir Choppin, 1976). N baltymai ir genomine RNR formuoja nukleokapsidės šerdį (N:RNR), prie kurios jungiasi P ir L baltymai (Portner ir kt., 1988). Toks šių paramikso virusų baltymų ir genominės RNR kompleksas gali transkribuoti RNR *in vitro*. Paramikso virusų nukleokapsidė yra palyginti nelankstus spiralinis 20 nm skersmens darinys, kurio centre yra tuščia 5-6 nm diametro ertmė, o atstumas tarp dviejų spiralės vijų yra lygus maždaug 5 nm (Compans ir kt., 1972). Nukleokapsidė visada funkcionuoja kaip kompleksas ir viruso infekcinio ciklo metu nėra išardoma.

Fosfo baltymas, žymimas raide P (*angl.* – *phosphoprotein*), yra svarbus viruso ribonukleorūgščių sintezei (Curran ir kt., 1994). Ląstelėje šis baltymas yra gausiai fosforilinamas (Fuentes ir kt., 2010). Susijungęs su polimerazės baltymu, žymimu didžiąja raide L (*angl.* – *large protein*) ir nukleokapside, jie kartu formuoja paramikso virusų polimerazinį kompleksą, o su laisvu N (N⁰) baltymu formuoja P ir N⁰ baltymų kompleksą, kuris yra būtinas specifiškai įjungiant naujai sintetinamą viruso genomą arba antigenomą į naujai

besiformuojančią nukleokapsidę bei slopina nespecifines N⁰ baltymo sąveikas su ląstelės RNR (Curran ir kt., 1995).

Paramyxoviridae šeimos virusų dalelė matoma elektroniniu mikroskopu ir jos schema parodytos 3 paveiksle.



3 pav. *Paramyxoviridae* šeimos virusų dalelė. A – elektroniniu mikroskopu matomas vaizdas. B – virusinės dalelės schema (pagal Lamb ir Kolakofsky, 2001).

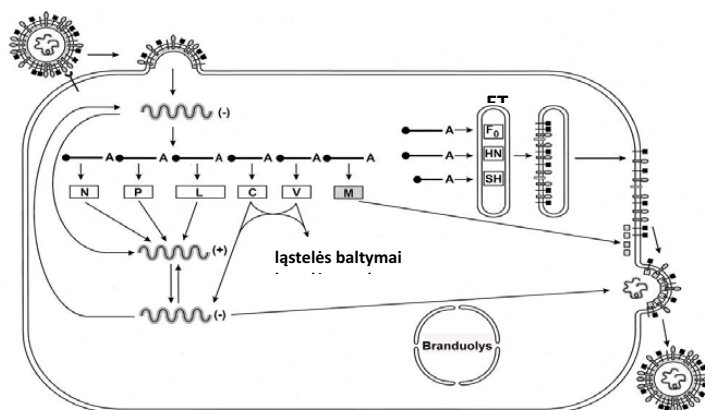
Infekcinis ciklas

Paramikso virusų infekcinis ciklas prasideda nuo viriono prisitvirtinimo ląstelės šeiminko paviršiuje. Prikibimas vyksta, kai viruso dalelės paviršiaus baltymai-glikoproteinai sąveikauja su sialo rūgšties grupėmis, esančiomis ląstelės paviršinių baltymų-receptorių arba lipidų-receptorių oligosacharidinių grandinių galuose (Bowden ir kt., 2010). Sąveika vyksta ne tarp pavienio glikoproteino ir ląstelės receptoriaus, o tarp daugelio. Sąveikos taškų gausa ir stabilumas nulemia infekcijos efektyvumą. Paramikso virusų dalelei prisitvirtinus ląstelės paviršiuje, pasikeičia F glikoproteino struktūra ir viriono membrana dėl šio baltymo struktūrinių pokyčių yra suliejama su ląstelės plazmine membrana (Baker ir kt., 1999). Virusinėje dalelėje M baltymas sąveikauja su nukleokapsidės N baltymais. Virusų apvalkalėlio ir plazminės

membranos susiliejimo metu šios sąveikos nutrūksta, todėl nukleokapsidė patenka į ląstelės citoplazmą (Harrison ir kt., 2000).

Paramyxoviridae šeimos virusų replikacija vyksta ląstelės citoplazmoje. Paramikso virusų infekcinio ciklo schema pavaizduota 4 paveiksle. Daugumos šios šeimos virusų replikacinis ciklas žinduolių ląstelėse trunka nuo 14 iki 30 valandų. Paramikso virusai infekcinio ciklo metu labai įvairiai veikia infekuotų ląstelių baltymų sintezę. Vieni infekcijos metu sustabdo šį procesą, kiti visai jo neslopina (Lamb ir Parks, 2007). Paramikso virusų RNR sintezė prasideda genomo 3` gale. Šiame genomo gale viruso RnRp jungiasi su vieninteliu genomo promotoriumi ir pradeda genomo lyderinės sekos sintezę (Tapparel ir kt., 1998). Anksti, viruso infekcijos metu, RnRp sintetina lyderinę genomines RNR seką ir iRNR. Susintetinusi lyderinę RNR seką, polimerazė turi stabtelėti, nutraukti sąveikas su susintetinta RNR grandine ir, nenušokdama nuo matricos, nuo šio geno pradžioje esančios reguliacinės sekos iš naujo pradėti *N* geno transkripciją. Tik pradėjusi *N* geno transkripciją iš naujo, RnRp efektyviai sintetina pilno ilgio *N* geno iRNR. Kitu atveju, kai RnRp ties lyderinės genomo sekos pabaigos ir *N* geno pradžios sandūra nestabtelėjusi sintetina RNR toliau, nesant replikacinį režimą įjungiančių faktorių RNR sintezė baigiasi *N* geno viduryje. Sėkmingai pradėjusi sintezę *N* geno pradžioje, RnRp nutraukia šį procesą pasiekusi šio geno gale esančią reguliacinę seką (Vidal ir Kolakofsky, 1989). Paramikso virusų RnRp turi guanil ir metil transferazinius aktyvumus, todėl pati modifikuoja sintetintamos iRNR 5` galą – suformuoja „kepurę“. Guanil ir metil transferazinius aktyvumus turi polimerazinio komplekso L baltymas (Ogino ir kt., 2005). Geno gale RnRp stabteli ties 4-7 poli-U nukleotidų seka, kurią naudodama matrica net keliolika kartų iRNR 3` gale susintetina maždaug 200 nukleotidų ilgio poli-A uodegą (Mizumoto ir kt., 1995). Tuomet RnRp nutraukia sąveiką su susintetinta iRNR. Genome vieną nuo kito genus skiria tarpgeninės sritys, kurios gali būti nuo 1 iki 56 nukleotidų ilgio. Toliau nuo genomo 3` galo esantys genai transkribuojami tik tuo atveju,

jeigu sėkmingai yra susintetinamos prieš juos esančių genų iRNR. Virusų RnRp gali pradėti RNR sintezę tik 3' geno gale jungdamasi su šiame geno gale esančiu promotoriumi. Toliau genome išsidėsčiusių genų transkripcija vyksta RnRp nenušokant nuo matricos. Užbaigus vienos iRNR transkripciją, viruso polimerazinis kompleksas ieško kitų reguliacinių sekų, genomine RNR slenkasi abiem kryptimis ir aptikęs artimiausio geno pradžios reguliacinę seką, sintetina šio geno iRNR (Wiegand ir kt., 2007).



4 pav. *Paramyxoviridae* šeimos virusų infekcinio ciklo schema (pagal Lamb ir Kolakofsky, 2001).

Paramikso virusų geno replikacija prasideda tik esant pakankamam virusinių baltymų kiekiui. Manoma, kad viruso RnRp replikacinį režimą įjungia specialus signalas. Šis signalas gali būti nukleokapsidės baltymų modifikacijos (pvz.: fosforilinimas), dėl kurių gali keistis nukleokapsidės struktūra. Kai kurie tyrimai leidžia manyti, kad RnRp replikacinis režimas gali būti įjungiamas kitų ląstelės arba viruso baltymų (Mizumoto, 1992). Tačiau vyrauja prielaida, kad šis režimas yra įjungiamas P-N⁰ baltymų kompleksui jungiantis su naujai sintetinama viruso geno lyderine RNR seka. Šio proceso metu P-N⁰ baltymų kompleksas suyra, o N baltymai jungdamiesi su naujai sintetinama virusine RNR ir sąveikaudami tarpusavyje formuoja naują nukleokapsidę. Iš N baltymų formuojasi spiralinis karkasas, į kurį yra pakuojama sintetinama virusinės RNR grandinė. Manoma, kad būtent šis besiformuojantis darinys įjungia viruso

RnRp replikacinį režimą (Castaneda ir Wong, 1990). Todėl ši, pradėjusi RNR sintezę nuo genomo 3` gale esančio promotoriaus, išlieka aktyvi viso genomo replikacijos metu ir nereaguoja į genų galuose esančius reguliacinius signalus. Polimerazė be jokio stabtelėjimo susintetina pilno ilgio antigenomą, kitaip vadinamą – kopijine viruso RNR. Paramikso virusų RnRp genomui padauginti matrica naudoja antigenominę viruso RNR, kuri taip pat yra įpakuojama nukleokapsidėje. Virusų RnRp pradeda RNR sintezę nuo antigenominės RNR 3` gale esančio promotoriaus. Esant pakankamam virusinių baltymų kiekiui, viruso RnRp sintetina pilno ilgio genomine RNR, kuri kaip ir naujai sintetinama antigenominė RNR, yra iš karto pakuojama į nukleokapsidę (Egelman ir kt., 1989). Trūkstant N baltymų, kuriems jungiantis su sintetinama virusine RNR formuojasi nukleokapsidė, įjungianti replikacinį režimą, RnRp pradėjusi RNR sintezę antigenomo 3` gale sintetina tik trumpą antigenomo lyderinę RNR seką. Antigenomas neturi jokio atviro skaitymo rėmelio ir nėra transliuojamas. Jis yra tarpinė genomo replikacijos grandis. Antigenomas, kaip ir genomas, yra aptinkamas tik nukleokapsidėje, kuri viruso infekcinio ciklo metu yra pakuojama į viruso dalelę. Tačiau viruso dalelių, turinčių nukleokapsidę su įpakuotu antigenomu, aptinkama žymiai mažiau. Tokios dalelės sudaro tik 5-20 % nuo bendro jų kiekio (Lamb ir Parks, 2007).

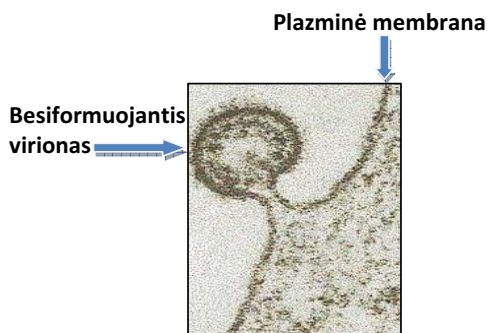
Visų paramikso virusų genomo koduojamų baltymų sintezė vyksta citoplazmoje. Visi susintetinti viruso baltymai, išskyrus virusinės dalelės apvalkalo glikoproteinus, yra brandinami citoplazmoje, tačiau pastarieji bręsta endoplazminiame tinkle, vėliau Goldžio komplekse, o galiausiai kaupiasi ląstelės paviršiuje (plazminėje membranoje) (Chen ir Helenius, 2000).

Visi paramikso virusų infekcinio ciklo etapai vyksta šeimininko ląstelės citoplazmoje (Lamb ir Parks, 2007). Čia susintetinti N baltymai, jungdamiesi su replikuojama viruso genome arba antigenomine RNR, formuoja nukleokapsidės šerdį. Yra žinoma, kad specifinei N baltymų sąveikai su viruso genome arba antigenomine RNR yra svarbi 5` gale esanti nukleotidų seka.

Šią seką atpažįsta P-N⁰ baltymų kompleksas ir tuomet šio komplekso N⁰ baltymas formuoja sąveikas su pirmais šešiais naujai sintetinamo genomo arba antigenomo nukleotidais. Po sąveikos su RNR N baltymas nutraukia sąveiką su P baltymu ir kompleksas galiausiai suyra. Tuomet kitus šešis nukleotidus atpažįsta naujas P-N⁰ baltymų kompleksas ir taip šis procesas kartojasi tol, kol yra įpakuojama visa naujai sintetinamo genomine arba antigenominė RNR molekulė (Curran ir kt., 1995). Nukleokapsidės šerdžiai susijungus su P-L baltymų kompleksu susiformuoja viruso nukleokapsidė. Paramikso virusų infekcinio ciklo metu ląstelės citoplazmoje besiformuojančios naujos nukleokapsidės keliauja plazminės membranos link, o tuo tarpu plazminėje membranoje kaupiasi viruso dalelės apvalkalo glikoproteinai. Jų sankaupos aptinkamos didelį cholesterolio kiekį turinčiose plazminės membranos vietose. Kad susidarytų viruso dalelė, visos jos sudedamosios dalys turi susirinkti viename erdvės taške. Paramikso virusų M baltymas tarpininkauja nukleokapsidei prisijungiant prie viruso dalelės apvalkalo glikoproteinų citoplazminės srities aminorūgščių. Šio baltymo sankaupos yra aptinkamos vidiniame plazminės membranos paviršiuje, maždaug ten pat kur kaupiasi ir viruso dalelės apvalkalo glikoproteinai (Irie ir Sakaguchi, 2007). Procesas, kurio metu prie plazminės membranos susirenka virionas, nėra visiškai aiškus. Kaip jau buvo minėta, M baltymas sąveikauja su glikoproteinų citoplazminės srities aminorūgštimis ir nukleokapsidės N baltymu (Coronel ir kt., 2001). Toliau plazminė membrana išlinksta, apgaubia viruso nukleokapsidę, susidariusios egzocitotinės dalelės anga susiaurėja, membranos kraštai susilieja ir atsiskyrusi nauja viruso dalelė patenka į aplinką. Reikėtų paminėti, kad kai kurių paramikso virusų Goldžio komplekse bręstanti neuraminidazė nuskelia sialo rūgšties grupes nuo visų paviršinių baltymų ir lipidų. Dėl šios priežasties užkrėstos ląstelės paviršiniai baltymai ir lipidai neturi sialo rūgšties, o naujos viruso dalelės lengviau atsiskiria nuo ląstelės

šeimininko paviršiaus ir negali prikibti ir iš naujo užkrėsti (Nayak ir kt., 2009).

Viriono formavimosi procesas yra pavaizduotas 5 paveiksle.



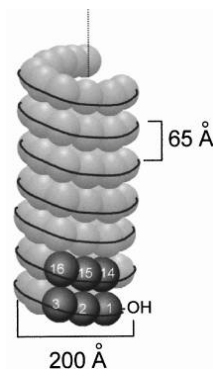
5 pav. Plazminės membranos paviršiuje besiformuojantis *Paramyxoviridae* šeimos virusų virionas. Elektroniniu mikroskopu matomas vaizdas (pagal Lamb ir Kolakofsky, 2001).

1.2. Nukleokapsidės baltymas: funkcijos, struktūra, biocheminės savybės ir formuojami dariniai

Nukleokapsidės baltymas dalyvauja daugelyje procesų, tačiau reikšmingiausias iš jų yra paramikso virusų replikacija. Jos metu šis baltymas formuoja nukleokapsidę, kurioje yra įpakuojama naujai sintetinama viruso genominė arba antigenominė RNR. Ant naujai sintetintos RNR grandinės besirenkantis N baltymų karkasas gali būti veiksnys, kuris įjungia paramikso virusų RnRp replikacinį režimą (Marriott ir kt., 2001). Nukleokapsidės sandara ir viruso replikacijos bei transkripcijos mechanizmai pastaruoju metu yra tiriama labai intensyviai.

Svarbi *Paramyxovirinae* šeimos virusų savybė yra ta, kad kiekvienas N baltymas nukleokapsidėje sąveikauja su šešiais RNR grandinės nukleotidais (Vulliemoz ir Roux, 2001). Šių virusų genomo ir antigenomo dvylika 3`-terminalinių nukleotidų yra identiški. Viruso genominės arba antigenominės RNR sintezės metu P-N⁰ baltymų kompleksas atpažįsta ką tik susintetintą terminalinę seką ir sąveikauja nuo pat pirmo nukleotido sintetintos RNR grandinės 5` gale. Tikslus N baltymo monomerų jungimasis kas 6 nukleotidus tęsiasi tol, kol yra pasiekiamas sintetintos RNR grandinės 3` galas (Vulliemoz ir Roux, 2001). Taip formuojasi nukleokapsidė, kurioje N baltymai suformuoja

taisyklingą spiralinį karkasą, o RNR grandinė būna įpakuota šiame karkase taip, kad dvylika 3-terminalinių nukleotidų išsidėsto tiksliai ant pirmo ir antro nukleokapsidės subvienetų. Genomo ir antigenomo terminalinių promotorių sekos, veikiančios *cis* konformacijoje, efektyvumas labai priklauso nuo tikslaus jos elementų išsidėstymo N baltymo subvienetų atžvilgiu nukleokapsidėje (Cordey ir Roux, 2006). Sendai viruso genomo promotorių sudaro dvi dalys: pirmas promotoriaus elementas – trisdešimties 3`-terminalinių nukleotidų seka. Dvylika galinių nukleotidų yra supakuoti pirmuose dviejuose nukleokapsidės N baltymuose; antrą elementą suformuoja kas 6 pozicijas tris kartus periodiškai pasikartojantys C arba GC nukleotidai, esantys ties 13, 14 ir 15 nukleokapsidės subvienetais. Kiekviena nukleokapsidinės spiralės vija yra sudaryta iš 13 N baltymų, todėl abu promotoriaus elementai nukleokapsidės spiralėje išsidėsto vienoje plokštumoje, greta vienas kito ir tiksliai nukleokapsidę sudarančių N baltymo subvienetų atžvilgiu (Salinas ir Roux, 2005). Manoma, kad nukleokapsidėje N baltymas suformuoja šešis funkcinio požiūriu skirtingus sąveikos „taškus“, ties kuriais išsidėsto 6 nukleotidai. Viruso RNR polimerazė negali tinkamai atpažinti „reikalingo signalo“, jeigu promotoriaus sekos nukleotidai išsidėsto ties jiems nebūdingais N baltymo sąveikos su RNR „taškais“ (Vulliamoz ir Roux, 2001). Visi aukščiau įvardinti veiksniai daro įtaką viruso RNR sintezės iniciacijai nuo aptarto promotoriaus, kurio struktūra yra pavaizduota 6 paveiksle.

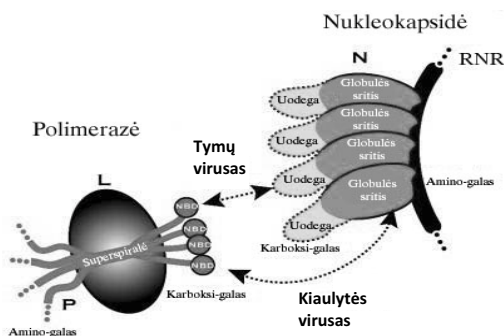


6 pav. *Paramyxovirinae* pošeimio virusų nukleokapsidės schema ir genomo promotoriaus struktūra (pagal Lamb ir Kolakofsky, 2001).

Nors nukleokapsidės baltymai sąveikauja su RNR, beveik visų *Paramyxoviridae* šeimos virusų N baltymai turi neigiamą suminį krūvį (nuo -7 iki -12). Tik kiaulytės viruso N baltymo suminis krūvis yra teigiamas (+2). Palyginus *Paramyxovirinae* pošeimio virusų N baltymus buvo nustatyta, kad N baltymo N dalis (ar. 1-400) yra santykinai konservatyvi, o C dalis (ar. 400 iki galo) stipriai įvairuoja. N baltymo C dalis dažniausiai turi didelio neigiamo krūvio sritį ir yra jautri proteazių poveikiui. N baltymo N dalis atsako už spiralinę nukleokapsidės struktūrą, kuri formuojasi tarpusavyje jungiantis N baltymams. Taip pat ši N baltymo dalis sąveikauja su RNR. N baltymas neturi klasikinių RNR surišančių motyvų. Nukleokapsidės baltymo vidurinėje dalyje buvo nustatyta konservatyvi aminorūgščių seka (F-X4-Y-X4-S-Y-A-M-G). Ši baltymo dalis yra hidrofobinė, todėl vyrauja nuomonė, kad minėta seka gali būti atsakinga už N baltymų tarpusavio sąveiką (N:N), formuojantis nukleokapsidei (Morgan ir kt., 1984). Manoma, kad specifinė RNR surišimo vieta N baltymuose galutinai susidaro tik šiems baltymams susijungus tarpusavyje, kadangi mutantiniai N baltymai, negalintys sąveikauti tarpusavyje, taip pat negeba pakuoti ir RNR. N baltymo C dalyje yra didžioji dauguma fosforilinimo vietų ir antigeninių nukleokapsidės baltymo sričių. Buvo manoma, kad N baltymo sritis, kuria N⁰ ir N:RNR sąveikauja su P baltymu arba P-L baltymų kompleksu, taip pat yra C dalyje, tačiau neseni tyrimai netikėtai parodė, kad šiuo atžvilgiu *Paramyxoviridae* virusai tarpusavyje skiriasi. Tymų viruso atveju Nukleokapsidės baltymas su P-L baltymų kompleksu sąveikauja savo C dalimi, o kiaulytės viruse kontaktas vyksta per nukleokapsidės baltymo N dalies domeną (Kingston ir kt., 2004). Tai schematiškai parodyta 7 pav.

Tymų viruso P baltymo C dalies sritis NBD jungiasi su trumpa tymų viruso N baltymo seka (ar. 477-505) C dalyje, o kiaulytės viruso atveju analogiška NBD sritis sąveikauja su seka (ar. 1-398) N baltymo N dalyje. SeV atveju buvo nustatyti du N baltymo C dalies regionai (ar. 426-497 ir 456-524), kurie

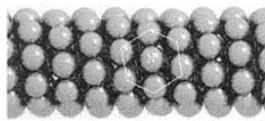
formuoja sąveikas su P baltymu. Tuo tarpu kiaulės rubulaviruso N baltymo su P baltymu sąveikaujanti sritis lokalizuota N baltymo N dalies sekoje (ar. 1-333) (Svenda ir kt., 2002). N baltymo C dalis priklauso baltymų grupei, kuriai yra būdinga silpnai išreikšta tretinė baltymo struktūra. Tokie polipeptidai dėl savo struktūros ir sąlyginai didelio lankstumo nematomi elektroniniu mikroskopu, taip pat yra jautrūs proteazių poveikiui. Tačiau jie geba formuoti tvirtus kontaktus su įvairios erdvinės struktūros ir silpno giminingumo paviršiais. Šios savybės leidžia N baltymo C daliai sąveikauti su keliais skirtingos erdvinės organizacijos partneriais (Longhi ir kt., 2003). Buvo nustatyta, kad N baltymo C dalis yra nebūtina nukleokapsidės formavimuisi ir genomines RNR pakavimui, o delecijos N baltymo N dalyje eliminuoja abu minėtus aktyvumus. Tuo tarpu iš N baltymų neturinčių C dalies suformuota nukleokapsidė negali būti transkribuojama ir replikuojama (Longhi ir kt., 2003).



7 pav. Virusinės polimerazės jungimosi prie tymų ir kiaulytės virusų nukleokapsidžių schema (pagal Kingston ir kt., 2004). "NBD" žymi jungimosi su nukleokapsidės sritį P baltymo gale. P baltymas pavaizduotas kaip tetrameras, bet nei kiaulytės, nei tymų virusų P oligomerizacijos būvis nenustatytas.

Pneumovirinae pošeimio virusų N baltymų sekos buvo palygintos su *Paramyxovirinae* pošeimio virusų nukleokapsidės baltymo N dalimi (ar. 1-400) ir buvo nustatytos trys homologiškos sritys, kurios turi panašią antrinę struktūrą. Nors abiejų pošeimių virusų N baltymai gana stipriai skiriasi savo ilgiu, tačiau funkcinių sričių organizacija išlieka ta pati. Žmogaus kvėpavimo sincitinio viruso N baltymą taip pat galima suskirstyti į N ir C dalis, iš kurių

pirmoje yra sritis (ar. 1-92), atsakinga už N:N ir N:RNR kontaktus formuojantis nukleokapsidei, o su antra (ar. 200-391) kontaktuoja M baltymas. Šioje baltymo dalyje yra dvi sekos (ar. 241-260 ir 301-335), atsakingos už sąveiką su P baltymu. Buvo nustatyta ir trečia sąveikos su P baltymu seka, bet tik N baltymo N dalyje (ar. 46-65). hRSV nukleokapsidės baltyme buvo aptikta sritis (ar. 121-160), kuria N baltymai nukleokapsidės spiralėje formuoja kontaktus su gretimo spiralės žingsnio N baltymais, taip sutvirtindami spiralinę N:RNR struktūrą (Murphy ir kt., 2003). Pastarosios sąveikos yra pavaizduotos 8 paveiksle.



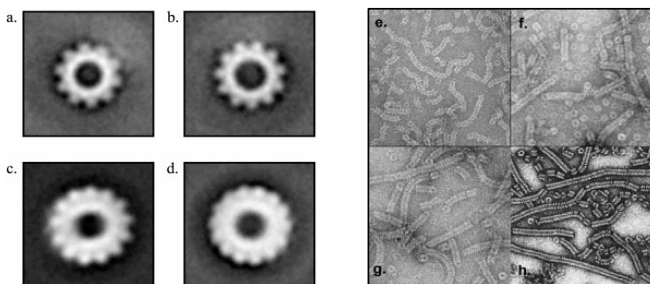
Nukleokapsidės spiralę palaikantys N:N ryšiai

8 pav. *Pneumovirinae* pošeimio hRSV nukleokapsidės spiralę palaikantys N:N baltymų ryšiai (pagal Murphy ir kt., 2003).

Paramyxovirinae pošeimio virusų atstumas tarp dviejų nukleokapsidės spiralės vijų yra lygus 4.7-6.4 nm (9 pav. f, g ir h), o vieną nukleokapsidės spiralės viją sudaro 13 arba 14 N baltymų bei 80 nt ilgio RNR grandinė (9 pav. c ir d). *Pneumovirinae* pošeimiui priklausančio hRSV viena nukleokapsidės spiralės vija gali būti sudaryta iš 9, 10 arba 11 N baltymų (9 pav. a ir b), o atstumas tarp dviejų nukleokapsidės spiralės vijų yra lygus 7 nm (9 pav. e) (Bhella ir kt., 2002). Ji yra ne tokia kompaktiška ir pasižymi gana dideliu lankstumu, palyginus ją su *Paramyxovirinae* pošeimio virusų nukleokapsidėmis.

Naudojant EM gaunamos nukleokapsidžių mikrografijos analizuojamos pasitelkus įvairius kompiuterinius metodus, stengiantis rekonstruoti erdvinę nukleokapsidės struktūrą. Tymų viruso N baltymų formuojamos nukleokapsidės pasirodė pernelyg lanksčios tokiai analizei, tačiau tam tiko tripsinu paveiktos nukleokapsidės be N baltymo C dalies. Pastarųjų erdvinę struktūrą nustatyta su 11.8 Å skiriamąja geba (Schoehn ir kt., 2004). Gautame

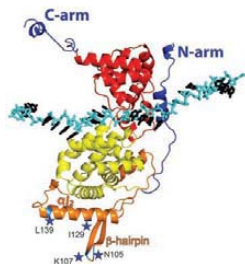
modelyje N baltymai, sudaryti iš trijų sričių, tarpusavyje formuoja dvi jungtis, kurių viena yra arti spiralinės ašies, o kita – N baltymo sekos viduryje. Skirtingai nei *Pneumovirinae* virusų atveju, tymų viruso nukleokapsidėje nėra jokių jungčių tarp N baltymų, esančių gretimuose spiralės žingsniuose. RNR pažymėjus *cis*-platina buvo nustatytas tankio padidėjimas arčiau spiralinės nukleokapsidės ašies. Tai leidžia manyti, jog genomas yra įpakuotas vidinėje nukleokapsidės spiralės dalyje.



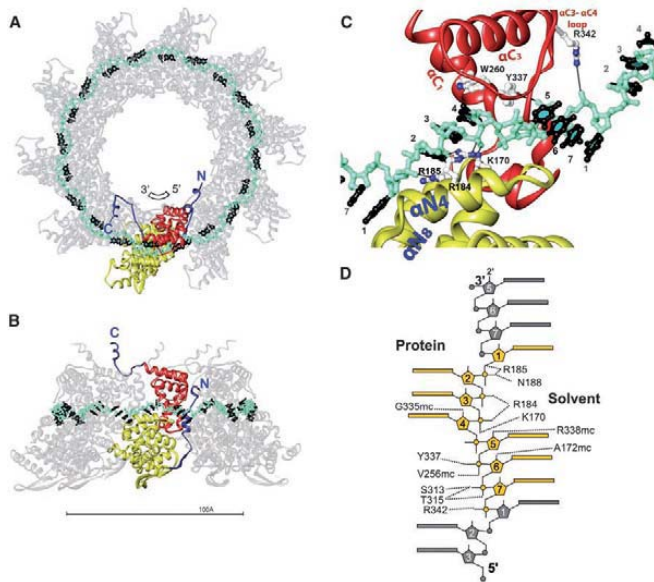
9 pav. *Paramyxoviridae* šeimos virusų nukleokapsidės spiralės vijų ir nukleokapsidžių vaizdai (pagal Bhella ir kt., 2002). Nukleokapsidės spiralės vijų (a-d) – tai vidurkinės projekcijos, kompiuterinių programų pagalba apskaičiuotos iš 500 atskirų žiedų vaizdų elektroninės mikroskopijos nuotraukose: a. hRSV iš 10 N baltymų sudaryta nukleokapsidės spiralės vija; b. hRSV iš 11 N baltymų sudaryta nukleokapsidės spiralės vija; c. TyV iš 13 N baltymų sudaryta nukleokapsidės spiralės vija; d. SV5 iš 14 N baltymų sudaryta nukleokapsidės spiralės vija. Šių virusų nukleokapsidės pavaizduotos neapdorotose, elektroninėse mikrografijose: e. hRSV nukleokapsidės; f. SV5 nukleokapsidės; g. TyV nukleokapsidės; h. SeV nukleokapsidės.

Neseniai buvo nustatyta tiksli nukleokapsidinės spiralės vijos, sudarytos iš dešimties hRSV N baltymų, struktūra (11 A ir B pav.) (Tawar ir kt., 2009). Gauti duomenys rodo, kad nukleokapsidinės spiralės vijoje RNR grandinė yra įpakuota išorinėje vijos dalyje suformuotame griovyje, kurio krūvis yra neigiamas (10 ir 11 C pav.). Vaizdžiai tariant, RNR molekulė nukleokapsidinės spiralės viją juosia kaip diržas liemenį. Kiekvienas spiralinės vijos subvienetas formuoja sąveikas su septyniais nukleotidais, o visą viją juosia 70 nukleotidų ilgio RNR grandinė. Kaip jau buvo minėta, paramikso virusų N baltymas yra sudarytas iš N ir C dalių, kurias, kaip rodo struktūrinės analizės duomenys, jungia nestruktūrizuota amino rūgščių seka, vaizdžiai tariant, panašiai kaip rėmą ir langą jungia vyriai. RNR sąveikai skirtas griovys yra N baltymo N ir C

dalių sandūroje. Sandūroje sąveikos tarp N ir C dalių formuoja vidinį griovio paviršių, o kilpa, jungianti α_{C3} ir α_{C4} spirales, nepilnai dengia griovyje įpakuotos RNR grandinės išorinį paviršių (10 pav.). N baltymo N ir C dalis sudaro stuktūrizuotos sritys – vadinamos N šerdimi ir C šerdimi, ir nuo jų besidriekią nestruktūrizuotos N-terminalinė ir C-terminalinė uodegos, kurios stuktūrizuojasi tik sąveikaudamos su gretimais nukleokapsidinės spirales vijos N baltymais. Tiek N, tiek C N baltymo dalys su šalia esančiais spirales vijos subvienetais sąveikauja šonais, tačiau šios sąveikos yra labai silpnos, daugiausiai palaikomos trumpalaikių van der Waals'o ryšių. Sąveikaujantys paviršiai yra gausiai hidratuoti, o N baltymų formuojamą spirales viją sutvirtina ją juosianti RNR grandinė ir N baltymo N dalies terminalinė uodega (ar. 1-35), įsiterpanti į šalia esančio spirales vijos subvieneto stuktūrizuotą sritį (11 A ir B pav.). Silpnos šoninės N baltymų sąveikos paaiškina šių baltymų formuojamos spiralinės stuktūros lankstumą, kuris, matyt, yra būtinas viruso polimerazei transkribuojant ir replikuojant šioje stuktūroje įpakuotą virusinę RNR. Šios stuktūros subvienetai arba jų dalys gana laisvai gali šiek tiek judėti vienas kito atžvilgiu nesuardydami pačios stuktūros, kurią sutvirtina ją juosianti RNR grandinė ir N baltymo N dalies terminalinė uodega, įsiterpusi į šalia esantį spirales vijos subvienetą. C terminalinė uodega nusidriekia virš stuktūrizuotos N baltymo C šerdies būtent toje vijoje, kur turėtų glaustis kita spirales vija (Tawar ir kt., 2009).



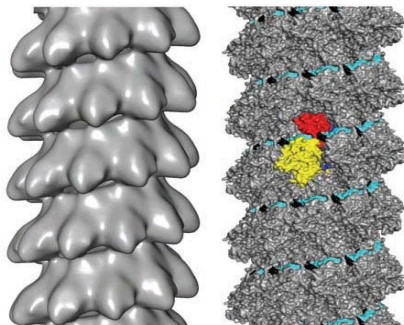
10 pav. Trimatis hRSV N baltymo stuktūros vaizdas (pagal Tawar ir kt., 2009). N baltymo N dalies šerdis pažymėta geltona spalva, C dalies šerdis – raudona spalva, o nestruktūrizuotos N baltymo N ir C dalių terminalinės uodegos pažymėtos tamsiai mėlyna spalva. Įpakuotos RNR grandinės fosforibozinis karkasas yra pažymėtas šviesiai mėlyna spalva, o azotinės bazės – juoda spalva. Oranžine spalva pažymėta variabili hRSV N baltymo sritis.



11 pav. A ir B – trimatis nukleokapsidinės spiralės vijos, sudarytos iš dešimties hRSV N baltymų, struktūros vaizdas. A – vaizdas iš viršaus, B – vaizdas iš šono. C – trimatis hRSV N baltymo struktūros vaizdas (pagal Tawar ir kt., 2009). Brūkšnys – 100 Å. N baltymo N dalies šerdis pažymėta geltona spalva, C dalies šerdis – raudona spalva, o nestruktūrizuotos N baltymo N ir C dalių terminalinės uodegos pažymėtos tamsiai mėlyna spalva. Įpakuotos RNR grandinės fosforibozinis karkasas yra pažymėtas šviesiai mėlyna spalva, o azotinės bazės – juoda spalva. D – RNR sąveikos su hRSV N baltymu schema (pagal Tawar ir kt., 2009). Geltona spalva pažymėta į vieną nukleokapsidinės spiralės vijos N baltymą įpakuotos RNR grandinės dalis.

Taip pat hRSV nukleokapsidės struktūra buvo rekonstruota naudojant elektroniniu mikroskopu gautus vaizdus (12 pav.) ir palyginta su nustatyta nukleokapsidinės spiralės vijos, sudarytos iš dešimties hRSV N baltymų, struktūra (Tawar ir kt., 2009). Gauti duomenys rodo, kad N baltymo N dalis formuoja elektroniniu mikroskopu matomus nukleokapsidinės spiralės iškilumus, primenančius „eglutės“ raštą, o C dalis formuoja su kita spiralės vija besiglaudžiantį N baltymo paviršių. Yra nustatyta, kad hRSV N baltymo C dalis sąveikauja su viruso M baltymu (Irie ir Sakaguchi 2007). Ši sąveika reikalinga pakuojuant nukleokapsidę į viruso dalelę. Tačiau struktūrinės analizės duomenys rodo, kad būtent ši N baltymo dalis glūdi giliau spiralės struktūroje, todėl gana sunku įsivaizduoti, kaip ši dalis geba formuoti sąveiką su viruso M baltymu. Matyt, tai galima paaiškinti tuo, kad iš N baltymų suformuota nukleokapsidės spiralė yra pakankamai lankstus darinys. Tiek sąveikaujančio N

baltymo, tiek N baltymo, esančio kitoje spiralės vijoje, atsikišusi N dalis gali šiek tiek pasislinkti abiem kryptimis. Be to, kiti tyrimai rodo, kad N baltymo C dalies struktūra gali keistis ir galbūt todėl šiek tiek pasislinkti išorės link, todėl M baltymas gali sąveikauti su nukleokapsidėje esančio N baltymo C dalimi. Struktūrinės analizės duomenys rodo, kad su kiekvienu hRSV N baltymu formuoja sąveikas septyni įpakuotos į nukleokapsidę RNR grandinės nukleotidai (Tawar ir kt., 2009). Antro, trečio ir ketvirto nukleotidų azotinės bazės yra nukreiptos į N baltymo RNR sąveikai skirtą griovio vidų. Penkto, šešto, septinto ir kito N baltymo pirmo nukleotidų azotinės bazės yra įspraustos tarp dviejų gretimų spiralės vijos subvienetų ir nukreiptos nuo N baltymo į išorę. Gana netikėta, bet detali iš dešimties hRSV N baltymų suformuotos nukleokapsidės spiralės vijos erdvinės struktūros analizė parodė, kad N baltymai formuoja jungtis ne su RNR azotinėmis bazėmis, kaip buvo manyta anksčiau, bet su fosforiboziniu karkasu, todėl ribonukleorūgščių seka neturi didelės įtakos hRSV N baltymo sąveikai su RNR (11 pav. B).



12 pav. hRSV nukleokapsidės struktūra (pagal Tawar ir kt., 2009). N baltymo N dalies šerdis pažymėta geltona spalva, C dalies šerdis – raudona spalva. Įpakuotos RNR grandinės fosforibozinis karkasas yra pažymėtas šviesiai mėlyna spalva, o azotinės bazės – juoda spalva.

Struktūrinis hRSV nukleokapsidės spiralės modelis leidžia įsivaizduoti, kaip viruso polimerazė gali slinkti nukleokapsidėje įpakuota viruso RNR grandine ir naudoti ją kaip matricą transkripcijai ir replikacijai neišardydama iš N baltymų suformuoto spiralinio nukleokapsidės karkaso (Tawar ir kt., 2009). Labai tikėtina, kad atsikišusi N baltymo N dalis viruso polimerazei gali tarnauti

kaip svirtis. Šia svirtį polimeraziniam kompleksui palenkus žemyn, N baltymo RNR sąveikos griovys tampa platesnis ir antro, trečio ir ketvirto įpakuotų nukleotidų azotinės bazės, kurios yra nukreiptos į N baltymo RNR sąveikai skirto griovio vidų, išsilaisvina ir pasisuka išorės link. Tuomet vienuolikos paeilui į nukleokapsidę įpakuotos RNR nukleotidų azotinės bazės tampa nukreiptos nuo spiralės karkaso į išorę. Į išorę nukreiptas RNR azotines bazes viruso polimerazė gali naudoti kaip matricą viruso RNR sintezei. Labai tikėtina, kad transkripcijos ir replikacijos metu nukleokapside slinkdama viruso polimerazė vienu metu spaudžia kelių gretimų N baltymų N dalį žemyn, taip iš nukleokapsidės gniaužtų išlaisvindama dar ilgesnę įpakuotos RNR grandinę. Nors struktūrinės analizės duomenimis paremtas hRSV polimerazės slinkties modelis yra labai patrauklus, tačiau jam patvirtinti reikalingi detalesni tyrimai.

1.3. Kvėpavimo takų ligas sukiantys *Paramyxoviridae* šeimos virusai: patogeninės savybės, sukiamos ligos, paplitimas, imunologija, prevencinės priemonės ir diagnostika

Didžioji dalis *Paramyxoviridae* šeimos virusų yra kvėpavimo takų parazitai. Jie sukelia įvairių rūšių gyvūnams kvėpavimo takų ligas, kurios savo simptomais yra panašios į gripą. Pavyzdžiui, *Paramyxovirinae* pošeimio *Rubulavirus* genčiai priklausantys virusai sukelia kvėpavimo takų ligas šunų šeimai priklausančių rūšių gyvūnams: vilkams, lapėms, šunims ir t.t. *Avulavirus* genties virusas, vadinamas pirmo serotipo paukščių paragripo virusu, sukelia kvėpavimo takų sutrikimus paukščiams, o *Respirovirus* genties virusai yra graužikų ir galvijų kvėpavimo takų parazitai. *Pneumovirinae* pošeimui priklauso tokie kvėpavimo takų ligas sukiantys virusai kaip galvijų respiracinis sincitinis virusas, pelių pneumonijos virusas ir paukščių metapneumo virusas (Lamb ir Parks, 2007). Pateikti pavyzdžiai rodo, kad daugelis *Paramyxoviridae* šeimos virusų pažeidžia įvairių rūšių gyvūnų kvėpavimo takų sistemą, tačiau didžiausią susirūpinimą kelia tie šios šeimos

atstovai, kurie sukelia kvėpavimo takų ligas žmogui. Vieni iš pavojingiausių yra *Respirovirus* genčiai priklausantys pirmo ir trečio serotipų žmogaus paragripo virusai bei *Pneumovirus* genties atstovas, žmogaus respiracinis sincitinis virusas. Šie virusai yra ypatingai pavojingi naujagimiams, vaikams, senyvo amžiaus žmonėms bei žmonėms su sutrikusia imunine sistema ir sukelia tokias kvėpavimo takų ligas kaip pneumonija, bronchitas ir krupas (Karron ir Collins, 2007). Nors žmogaus kvėpavimo takus pažeidžiantys paramikso virusai yra intensyviai tiriami jau 40 metų, tačiau iki šiol nėra sukurtos nei nuo šių virusų infekcijų apsaugančios vakcinos, nei veiksmingos priešinfekcinės priemonės, o kasmet dėl šių virusų sukeltų kvėpavimo takų ligų miršta šimtai tūkstančių žmonių, daugiausia kūdikių ir vaikų.

1.3.1. Žmogaus paragripo virusai

Žmogaus paragripo virusai, kurie šiuo metu yra suskirstyti į keturis serologinius tipus, buvo atrasti 1956-60 metais. Pirmo, antro ir trečio serotipų žmogaus paragripo virusai (hPIV1, hPIV2 ir hPIV3) buvo išskirti iš apatinių kvėpavimo takų ligomis sergančių kūdikių ir vaikų, o ketvirto serotipo (hPIV4) – iš lengvomis viršutinių kvėpavimo takų ligomis sergančių vaikų ir jaunų žmonių (Chanock ir kt., 1958b; Johnson ir kt., 1960). Atradus šiuos virusus paaiškėjo, kad jie daugeliu atveju yra vaikų krupo (hPIV1, hPIV2 ir hPIV3), taip pat pneumonijos bei bronchito (hPIV3) priežastis (Chanock ir Parrott, 1965; Glezen ir Denny, 1973). Yra nustatyta, kad šie virusai, kartu paėmus, sukelia didžiąjai daliai kūdikių ir vaikų ūmias kvėpavimo takų ligas ir šiuo atžvilgiu nusileidžia tik žmogaus respiraciniam sincitiniam virusui. Patys pavojingiausi yra trečio ir pirmo serologinių tipų žmogaus paragripo virusai, kurie priklauso *Respirovirus* genčiai. Maždaug 15 % pneumonijos, 50 % bronchito ir 40 % krupo atvejų, užregistruojamų pediatriinėse ligoninėse, yra sukeliami būtent šios genties žmogaus paragripo virusų. *Rubulavirus* genčiai priskiriamas antro tipo žmogaus paragripo virusas yra mažiau pavojingas. Kūdikiams ir vaikams

jis dažniausiai sukelia krupą ir tik retais atvejais – bronchitą arba pneumoniją. Kaip jau buvo minėta, ketvirto serotipo žmogaus paragripo virusas, taip pat priklausantis *Rubulavirus* genčiai, vaikų kvėpavimo takų ligas sukelia retai ir šio viruso sukelti kvėpavimo takų sutrikimai yra žymiai švelnesni (Glezen ir Denny, 1973; Glezen, 1984; Glezen ir kt., 1984). Prieš atrandant žmogaus paragripo virusus, pirmas paragripo virusas buvo išskirtas iš pelių, inokuliuotų autopsiniu mėginiu paimtu iš kvėpavimo takų liga sergančio kūdikio. Šio viruso, dar vadinamo Sendai virusu (SeV), kilmė iki šiol nėra visiškai aiški. Yra manoma, kad Sendai virusas, giminingas pirmo serotipo žmogaus paragripo virusui, yra greičiau graužikų parazitas nei natūralus žmogaus kvėpavimo takų ligų sukėlėjas, nors pirmą kartą buvo išskirtas tiriant būtent šiuo virusu užsikrėtusio kūdikio atvejį (Kuroya ir kt., 1953a). Šis virusas ilgą laiką buvo naudojamas kaip modelis *Respirovirus* genties virusams tirti.

Žmogaus paragripo virusai dauginasi kvėpavimo takų gleivinės epitelio ląstelėse. Pirmiausia, infekcijos metu, šie virusai pažeidžia nosies ir gerklės gleivines. Taip pat gali užkimšti sinusus ir ausies trimitą. Tai gali sukelti sinusitą ir vidurinės ausies uždegimą. Daugeliui užsikrėtusių pacientų virusai gali pažeisti ir bronchus. hPIV1 ir hPIV2 infekcijų metu šiems virusams pažeidus gerklas ir viršutinę trachėjos dalį išsivysto krupo sindromas. Kai kuriais atvejais hPIV1 ir hPIV2 infekcijos gali plisti net į apatinę trachėjos dalį bei bronchus. Tokių infekcijų metu šiuose kvėpavimo takuose kaupiasi sutirštėjusios gleivės, kurios blokuoja dujų apykaitą. Taip pat į apatinę trachėjos dalį bei bronchus išplitusios hPIV1 ir hPIV2 infekcijos gali sukelti plaučių uždegimą. Infekcijos metu hPIV3 dažniausiai pažeidžia apatinius kvėpavimo takus ir sukelia bronchitą arba plaučių uždegimą (Parrott ir kt., 1959).

Pagrindinis veiksnys, kuris daro įtaką žmogaus paragripo virusų patogenezei, yra šių virusų replikacijos efektyvumas (Karron ir kt., 2005). Efektyviau besireplikuojantys virusai sukelia sunkesnės formos kvėpavimo takų ligas. Atlikti tyrimai rodo, kad šių virusų infekcijų metu sukeliamas

imuninės sistemos atsakas taip pat pažeidžia kvėpavimo takų gleivinės ląsteles (Welliver ir kt., 1982). Žmogaus paragripo virusai yra pneumotropiniai virusai. Receptorius, reikalingus šių virusų infekcijai, turi įvairių audinių ląstelės, tačiau jie gali replikuotis tik kvėpavimo takų gleivinės epitelyje (Tashiro ir kt., 1990). Šių virusų infekcijų tropiškumą lemia trys pagrindiniai veiksniai: pirmas, hPIV1 ir hPIV4 glikoproteinai F ir HN visiškai subręsta tik kvėpavimo takų gleivinėje, kur juos hidrolizuoja gleivinės ląstelių sekretuojamos proteazės; antras, hPIV3 dalelės morfogenezė vyksta tik apikalinėje kvėpavimo takų gleivinės epitelio ląstelių membranoje; ir trečias, žmogaus paragripo virusų infekcijoms išplisti į kitų organizmo sistemų audinius neleidžia įgimtas imuninės sistemos atsakas (Johnson ir kt., 1982; Nagai 1995; Park ir kt., 2003).

Žmogaus paragripo virusai yra plačiai paplitę ir aptinkami visur, kur yra atliekama kvėpavimo takų ligas sukeliančių virusų diagnostika. Šie virusai yra labiausiai pavojingi kūdikystės ir ankstyvos vaikystės metu. Serologinės stebėsenos tyrimai parodė, kad hPIV3 maždaug 60 % vaikų užsikrečia pirmų dvejų gyvenimo metų laikotarpyje. Sulaukus ketverių, šiuo virusu būna užsikrėtę maždaug 80 % vaikų. Infekcijos hPIV1 ir hPIV2 ištinka šiek tiek vėliau, tačiau pirmų penkerių gyvenimo metų laikotarpyje šiais virusais užsikrečia maždaug 75 % vaikų. Per pirmuosius šešis gyvenimo mėnesius hPIV3 užsikrėtusiems kūdikiams dažniausiai sukelia pneumoniją ir bronchitą, o antrais gyvenimo metais hPIV1 ir hPIV2 užsikrėtusiems vaikams dažniausiai sukelia krupą. Vyresniems vaikams ir suaugusiems infekcijos žmogaus paragripo virusais tik labai retai sukelia rimtesnes kvėpavimo takų ligas. Pastaruoju metu hPIV1 epidemijos kyla kiekvieną nelyginių metų rudenį, o hPIV2 infekcijų protrūkiai kartojasi kasmet, taip pat rudens sezono metu. hPIV3 infekcijų protrūkiams nėra būdingas sezoniškumas, todėl jie kyla kasmet įvairiu metų laiku. Žmogaus paragripo virusai plinta iš žmogaus žmogui tiesioginio kontakto metu arba per stambius skysčio lašus, tačiau aplinkoje šie

virusai išlieka gyvybingi labai neilgai (Denny ir kt., 1983; Knott ir kt., 1994; Reed ir kt., 1997).

Žmogaus paragripo virusai suaugusiems sukelia stiprų imuninės sistemos atsaką. Kūdikių ir mažamečių vaikų imuninė sistema nėra visiškai išsivysčiusi, todėl šių virusų infekcijų metu reaguoja labai vangiai. Pavyzdžiui, žmogaus paragripo virusų infekcijų metu kūdikių nosies gleivinėje yra aptinkami šiems virusams specifiniai IgA klasės antikūnai, kurie pasižymi silpnu virusus neutralizuojančiu aktyvumu, o kraujo serume yra aptinkami tik nedideli virusus neutralizuojančių IgG klasės antikūnų kiekiai. Silpnas kūdikių imuninės sistemos atsakas į žmogaus paragripo virusų infekcijas paaiškina tai, kad šiais virusais kūdikystėje ir ankstyvoje vaikystėje pakartotinai yra užsikrečiama labai dažnai. Iš dalies kūdikius nuo infekcijų apsaugo virusus neutralizuojantys IgG klasės antikūnai, kuriuos jie gauna iš motinos per kraujotakos sistemą arba su pienu (Crowe, 2001). Žmogaus paragripo virusus neutralizuojantys IgG klasės antikūnai aptinkami kraujo serume efektyviai apsaugo nuo šių virusų infekcijų žemuosius kvėpavimo takus, tačiau šie antikūnai nėra veiksmingi viršutinėje kvėpavimo sistemos dalyje. Taip yra dėl to, kad tik labai nedideli šios klasės antikūnų kiekiai iš kraujotakos sistemos patenka į kvėpavimo takų gleivinę. Atlikti tyrimai rodo, kad suaugusiųjų viršutinius kvėpavimo takus nuo pakartotinės infekcijos žmogaus paragripo virusais efektyviausiai apsaugo virusus neutralizuojantys IgA klasės antikūnai sekretuojami į nosiaryklės gleivinę (Mazanec ir kt., 1992).

Užsikrėtus žmogaus paragripo virusais yra stimuliuojamas imuninės sistemos atsakas, kurio metu yra gaminami beveik kiekvienam šių virusų baltymui specifiniai IgG klasės antikūnai, tačiau tik viriono glikoproteinams specifiniai antikūnai pasižymi virusą neutralizuojančiu aktyvumu (Ray ir kt., 1988). Taip pat šių virusų infekcijų metu svarbų vaidmenį vaidina ir ląstelinis imunitetas, nors jis yra trumpalaikis ir neapsaugo organizmo nuo pakartotinių infekcijų. Eksperimentiniai duomenys rodo, kad žmogaus paragripo virusų

infekcijų metu kvėpavimo takų gleivinės epitelyje didėjant CD8+ citotoksinių T limfocitų kiekiui mažta viruso titras. Yra manoma, kad šie limfocitai, eliminuodami infekuotas kvėpavimo takų gleivinės ląsteles, neleidžia viruso infekcijai plisti ir taip padeda organizmui šalinti virusą iš užkrėstos kvėpavimo takų sistemos (Kast ir kt., 1991). Buvo nustatyta, kad SeV užkrėtus peles, kurių imuninės sistemos ląstelės CD8+ nefunkcionuoja, padidėja šių pelių mirtingumas. Tuo tarpu pelėse, kurių imuninės sistemos ląstelės CD4+ neatlieka savo funkcijų, jas užkrėtus SeV, sutrinka virusui specifinių IgG klasės antikūnų gamyba, tačiau šios pelės virusą šalina iš infekuotų kvėpavimo takų taip pat efektyviai kaip ir tos, kurių imuninė sistema veikia normaliai (Hou ir kt., 1992). Įgimtas imunitetas taip pat vaidina svarbų vaidmenį slopinant žmogaus paragripo virusų infekcijas, tačiau šie virusai koduoja baltymus, kurie blokuoja kai kuriuos ląstelės signalo perdavimo kelius, įjungiančius įgimto imuniteto atsaką į viruso infekciją. Yra nustatyta, kad žmogaus paragripo virusų C ir V baltymai blokuoja ląstelės šeimininko α , β ir γ interferonų sintezę (Hall ir kt., 1978).

Iki pat šiandien nėra sukurta jokių žmogaus paragripo virusų gyvybinį ciklą blokuojančių vaistų. Kadangi žmogaus paragripo virusų sukeltamos kvėpavimo takų ligos yra pavojingiausios kūdikiams ir mažamečiams vaikams, todėl juos nuo šių virusų infekcijų padėtų apsaugoti pediatriškos vakcinos. Vakcina prieš hPIV3 būtų veiksminga tik tuomet, jei kūdikiai būtų skiepijami antrą gyvenimo mėnesį, o vakcinomis, skirtomis apsaugoti nuo infekcijų hPIV1 ir hPIV2, turėtų būti skiepijama šiek tiek vėliau, šeštą gyvenimo mėnesį. Pirmuosius šešis gyvenimo mėnesius imuninė sistema yra labai inertiška. Imuninio atsako metu yra gaunami tik nedideli antigenai specifinių antikūnų kiekiai, todėl sukurti efektyvias vakcinas, apsaugančias kūdikius ir mažamečius vaikus nuo infekcijų žmogaus paragripo virusais yra nelengvas uždavinys (Crowe, 2001). Siekiant sukurti tokias vakcinas, visų pirma, šiam tikslui buvo panaudotos inaktyvuotos žmogaus paragripo virusų dalelės. Išbandžius šias

vakcinas, buvo nustatyta, kad jos yra imunogeniškos ir sukelia kūdikiams specifinį imuninį atsaką, tačiau neapsaugo jų nuo šių virusų infekcijų (Fulginiti ir kt., 1969). Tai pat buvo išbandyta vakcina, kuri buvo pagaminta naudojant vabzdžių ląstelėse susintetintus rekombinantinius hPIV3 glikoproteinus HN ir F. Rekombinantinių baltymų pagrindu pagaminta vakcina imunizavus peles, paaiškėjo, kad ji apsaugo nuo infekcijos hPIV3, tačiau atlikti klinikiniai tyrimai parodė, kad ši vakcina yra neveiksminga ja paskiepijus mažamečius vaikus (Ambrose ir kt., 1991). Pastaruoju metu labai intensyviai yra tiriamos potencialios žmogaus paragripo virusų vakcinas, kurioms gaminti yra naudojami arba heterologiniai gyvūnų paragripo virusai, arba žmogaus paragripo virusai, turintys mutacijas, slopinančias šių virusų replikaciją. Su kai kuriais šių vakcinų variantais šiuo metu jau yra atliekami klinikiniai tyrimai, bet ar jos yra veiksmingos, paaiškės tik gavus rezultatus (Karron ir Collins, 2007). Tiriamos pediatrinės vakcinas kol kas yra vienintelė potenciali priemonė, kuria ateityje gal būt bus įmanoma apsaugoti kūdikius ir mažamečius vaikus nuo infekcijų žmogaus paragripo virusais.

Kadangi įvairių virusų sukeliama kvėpavimo takų ligos tik nežymiai skiriasi savo klinikiniais simptomais, todėl šių virusų diagnostikai yra rekomenduojama naudoti molekulinis metodus. Tiksliai žmogaus paragripo virusų infekcijų diagnostikai yra dažniausiai naudojami tiesioginiai viruso nustatymo metodai. Vienas jų yra paremtas paties viruso išskyrimu iš pacientų kvėpavimo takų išskyrų. Šiam tikslui virusas, esantis tiriamame mėginyje, yra padauginamas ląstelių kultūrose, o po to yra nustatoma šio viruso tapatybė. Kartais tiriamas mėginys yra koncentruojamas tam, kad būtų padidintas šio diagnostinio testo jautrumas (Lee ir kt., 1992). Tačiau paties viruso išskyrimu paremtas diagnostikos metodas turi ir trūkumų. Ne visus gamtoje egzistuojančius to paties viruso variantus įmanoma efektyviai padauginti šiam tikslui skirtose ląstelių kultūrose. Siekiant išvengti klaidingos diagnozės, reikia saugotis virusų padauginimui naudojamų ląstelių kultūrų užkrato. Kitas

žmogaus paragripo virusų diagnostikos metodas yra paremtas šių virusų baltymų aptikimu kvėpavimo takų ligomis sergančių pacientų nosies ir gerklės gleivinių mėginiuose. Virusų baltymai tiriamuose mėginiuose yra aptinkami imunofluorescencine reakcija naudojant šių virusų baltymams specifinius antikūnus. Taip pat pacientų kvėpavimo takų išskyrose naudojant atvirkštinės transkripcijos ir polimerazinę grandininę reakcijas yra aptinkama ir žmogaus paragripo virusų genomine RNR (Henrickson, 2003). Nors šių virusų diagnostikai naudojami tiesioginiai virusų aptikimo metodai yra labai specifiniai, tačiau jais galima diagnozuoti virusą dažniausiai tik infekcijos metu. Šiuos diagnostikos testus gali atlikti tik kvalifikuoti specialistai, naudodamiesi specialia įranga. Taip pat egzistuoja tikimybė jiems užsikrėsti diagnozuojamais virusais. Žmogaus paragripo virusų infekcijų diagnostikai yra naudojami ir serologiniai metodai, tokie kaip hemagliutinacijos inhibicijos, komplekto fiksacijos arba neutralizacijos testai. Šie metodai nėra pakankamai specifiški, jais dažnai nėra įmanoma nustatyti infekciją sukėlusio paragripo viruso tipo, tačiau galima aptikti virusui specifinius antikūnus infekcijos metu arba infekcijai pasibaigus. Specifiniai žmogaus paragripo virusams antikūnai yra efektyviai aptinkami nustatant jų reakciją su virusiniais antigenais tiesioginės imunofermentinės analizės (IFA) metodu. IFA yra reikalingi virusiniai antigenai, todėl šiam tikslui yra naudojamos žmogaus paragripo virusų dalelės, išskirtos iš žmogaus ląstelių kultūrų. Nors žmogaus paragripo virusų infekcijos diagnostikos metodas yra pigus ir paprastas, juo galima testuoti didelį kiekį mėginių vienu metu, tačiau jis taip pat nėra pakankamai specifiškas. Tiesioginės IFA metodu, kaip antigeną naudojant virusų daleles, nėra įmanoma nustatyti paragripo virusų tipo, nes šių virusų antigeninės savybės yra labai panašios (Henrickson, 2003).

1.3.2. Žmogaus respiracinis sincitinis virusas

Žmogaus respiracinis sincitinis virusas (hRSV) pirmą kartą buvo išskirtas 1956 metais iš šimpanzės, sergančios lengva peršalimo liga (Blount ir kt., 1956). Netrukus po to buvo nustatyta, kad šis virusas dažniausiai sukelia ūmias kvėpavimo takų ligas kūdikiams ir vaikams (Chanock ir Finberg, 1957; Chanock ir kt., 1957). Šiandien yra pripažįstama, kad hRSV yra pavojingiausias iš virusų, sukeliančių ūmias pediatriškas respiracines organizmo sistemos ligas pasauliniu mastu. Kai kuriose pasaulio dalyse šis virusas sukeliama ligų skaičiumi nurungia kartu paėmus visus kitus mikroorganizmus ir virusus, sukeliančius ūmias kvėpavimo takų ligas kūdikiams. hRSV yra pavojingiausias kūdikiams ir mažamečiams vaikams, tačiau retai sukelia sunkius kvėpavimo sistemos sutrikimus suaugusiems asmenims ir vyresnio amžiaus vaikams. Šis virusas taip pat yra ypatingai pavojingas senyvo amžiaus žmonėms ir asmenims su sutrikusia imunine sistema (Falsey ir kt., 2005; Falsey ir Walsh, 2005; Hall ir kt., 1986). Pasaulio Sveikatos Organizacijos vertinimu, hRSV kasmet visame pasaulyje sukelia kvėpavimo takų ligas 64 milijonams žmonių, iš kurių 160.000, daugiausia naujagimiai ir vaikai, dėl ligos komplikacijų miršta (World Health Organization 2009).

Žmogaus respiracinis sincitinis virusas yra priskiriamas *Pneumovirinae* pošeimio *Pneumovirus* genčiai ir nuo kitų paramikso virusų skiriasi tuo, kad koduoja du papildomus nestruktūrinius baltymus NS1 ir NS2, kurie, kaip tyrimai rodo, šio viruso infekcijos metu blokuoja ląstelės interferonų atsaką jungiančius signalinius kelius (Bossert ir kt., 2003). Taip pat šis virusas, skirtingai nei daugelis kitų paramikso virusų, prie ląstelės tvirtinasi abiem apvalkalo glikoproteinais F ir G. Šie viruso glikoproteinai gali sąveikauti su labai įvairiais ląstelės paviršiaus baltymais, tokiais kaip chemokinių receptoriai CX3CR1, aneksinas II bei su ląstelės paviršiaus matrikso gliukozaminoglikanais, su heparino arba hondroitino sulfatu. Abiem apvalkalo baltymais viruso dalelė

tvirtinasi prie ląstelės, tačiau pašalinus glikoproteiną G koduojantį geną nesutrunka tokio viruso gyvybinis ciklas, nors virusas tampa mažiau infektyvus (Techaarpornkul ir kt., 2002; Tripp ir kt., 2001). Taip pat viruso baltymą F aktyvinanti hidrolizė, skirtingai nei žmogaus paragripo virusų atveju, vyksta ląstelės trans-Goldžio komplekse, kuriame baltymo F pirmtaką hidrolizuoja substilizino tipo furino endoproteazė. Šią proteazę turi beveik kiekviena ląstelė, todėl šis veiksnys neriboja hRSV infekcijos tropizmo (Gonzalez-Reyes ir kt., 2001). Nors viruso dalelė prie ląstelės gali tvirtintis sąveikaudama su įvairiais ląstelės paviršiaus baltymais ir angliavandeniais, tačiau hRSV dažniausiai replikuojasi poliarizuotose kvėpavimo takų gleivinės epitelio ląstelėse, turinčiose mikrogaurelius. Taip pat šis virusas gali infekuoti ir kai kurias imuninės sistemos ląsteles, kurios infekcijos metu infiltruoja kvėpavimo takų epitelio sluoksnį (Becker ir kt., 1992). hRSV dalelės formuojasi tik apikalinėje poliarizuotos kvėpavimo takų gleivinės epitelio ląstelės dalyje, o susiformavusios dalelės dažnai lieka prikibusios prie ląstelės ir tik nedidelė dalis naujai susiformavusių viruso dalelių gali atsiskirti nuo užkrėstos ląstelės paviršiaus. Yra manoma, kad taip atsitinka dėl to, kad hRSV neturi baltymo, pavyzdžiui tokio kaip paragripo arba gripo virusų neuraminidazė, kuris nuskeltų nuo ląstelės paviršiuje esančių molekulių tas grupes, kuriomis virusinė dalelė tvirtinasi prie ląstelės. Todėl hRSV infekcijos metu didžioji dalis naujai susiformavusių viruso dalelių neatsiskiria nuo ląstelės ir formuoja siūlines struktūras infekuotos ląstelės paviršiuje (Bachi, 1988). hRSV infekuotus žinduolių ląstelių kultūras yra stebima, kad kai kurios šiuo virusu infekuotos ląstelės susilieja ir formuoja daugiabranduolius iš kelių susiliejusių ląstelių suformuotus darinius vadinamus sincitijais, nuo ko ir kilo šio viruso pavadinimas. Tačiau šie citopatologiniai dariniai nėra dažnai aptinkami hRSV infekcijos metu *in vivo* (Zhang ir kt., 2002). Taip pat hRSV nuo kitų paramikso virusų skiriasi ir savo genomo struktūra, bei kai kuriais mechanizmais, reguliuojančiais genomo transkripciją ir replikaciją viruso infekcinio ciklo

metu. Pavyzdžiui, hRSV polimerazės replikacinį režimą įjungia ne naujai besiformuojanti nukleokapsidė, o M2-1 baltymas, kurį koduoja tik *Pneumovirus* genčiai priklausantys virusai. Taip pat hRSV geno ilgis neturi būti šešių kartotinis ir reguliacinės geno sekos skiriasi nuo *Paramyxovirinae* pošeimio virusų (Collins ir Crowe, 2007).

Žmogaus respiracinis sincitinis virusas yra plačiai paplitęs visame pasaulyje ir kasmet, infekcinių protrūkių metu, sukelia sunkias kvėpavimo takų ligas, nuo kurių labiausiai kenčia vaikai iki vieno metų amžiaus. Serologinės stebėsenos tyrimai parodė, kad hRSV maždaug 70 % vaikų užsikrečia pirmųjų gyvenimo metų laikotarpyje, o sulaukę dvejų šiuo virusu būna užsikrėtę beveik visi. Per pirmuosius dvejus gyvenimo metus hRSV kūdikiams ir vaikams dažniausiai sukelia pneumoniją ir bronchitą, rečiau krupą ir stambesnių kvėpavimo takų uždegimą (Henderson ir kt., 1979a; Henderson ir kt., 1979b). Vyresniems vaikams ir suaugusiems hRSV infekcijos tik labai retai sukelia rimtesnius kvėpavimo takų sutrikimus. Dažniausiai šio viruso infekcijos būna asimptominės arba sukelia tik lengvas peršalimo ligas (Parrott ir kt., 1973). Vidutinio klimato zonose hRSV epidemijos kyla kiekvienais metais, šaltojo sezono metu. Jos prasideda vėlyvą rudenį ir tęsiasi maždaug penkis mėnesius iki pat pavasario vidurio, tačiau niekuomet šio viruso infekciniai protrūkiai nekyla vasaros sezono metu (Brandt ir kt., 1973). Subtropiniuose ir tropiniuose regionuose hRSV infekcijų protrūkiai yra registruojami ištisus metus. Gausesni infekciniai protrūkiai dažniausiai kyla lietingų sezonų metu (Doraisingham ir kt., 1987).

Žmogaus respiracinis sincitinis virusas infekuoja tik žmogų, o virusas plinta per kvėpavimo takų išskyras, dideliuose išskyrų lašuose. Virusui plisti reikalingas artimas kontaktas su užsikrėtusiu individu arba jis plinta per viruso dalelėmis užterštą ranką, jomis liečiant nosies arba junginės gleivinę (Hall ir Douglas, 1981). hRSV infekcija prasideda nosiaryklės gleivinėje ir po vienos-trijų dienų plinta į žemesnius kvėpavimo takus. Šis virusas, kaip jau buvo

minėta, daugiausia replikuojasi kvėpavimo takų gleivinės epitelio ląstelėse, turinčiose mikrogauzelius. Taip pat buvo nustatyta, kad hRSV kvėpavimo takų sistemos gleivinėje gali infekuoti makrofagus ir monocitus. Nors kai kuriais atvejais viruso antigenai yra aptinkami ir kraujyje, tačiau iki šiol nebuvo užregistruotas nei vienas šio viruso sukeltos viremijos atvejis. Kūdikių kvėpavimo takų sistemoje hRSV infekcijos metu sukelti citopatologiniai simptomai yra panašūs į tuos, kuriuos dažniausiai sukelia kiti kvėpavimo takus pažeidžiantys virusai. hRSV mažiems dažniausiai sukelia bronchitą ir plaučių uždegimą, kurių metu yra pažeidžiamas bronchų epitelis, vyksta intensyvi šio kvėpavimo takų gleivinės sluoksnio ląstelių nekrozė ir proliferacija, žūsta daug epitelio ląstelių, turinčių mikrogauzelius. Į pažeistas kvėpavimo takų epitelio vietas plūsta imuninės sistemos ląstelės, dėl to pabrūkinama pomukozinis ir jungiamasis gleivinės epitelio sluoksniai. Taip pat infekcijos metu gausiai yra sekretuojamos gleivės, kurios kartu su žuvusių ląstelių liekanomis ir imuninės sistemos ląstelėmis užkemša bronchioles ir alveoles, tuomet jos pabrūkinama ir galiausiai suyra (Collins ir Crowe, 2007).

Taip pat, kaip ir žmogaus paragripo virusų infekcijų metu, užsikrėtus žmogaus respiraciniu sincitiniu virusu svarbų vaidmenį vaidina įgytas imuninės sistemos atsakas, kurio metu yra gaminami beveik kiekvienam šio viruso baltymui specifiniai IgG klasės antikūnai, tačiau tik viriono glikoproteinams specifiniai antikūnai pasižymi virusą neutralizuojančiu aktyvumu (Connors ir kt., 1991). Nors hRSV specifiniai IgG klasės antikūnai kraujyje išlieka ilgą laiką ir gali apsaugoti nuo pakartotinės infekcijos mažuosius kvėpavimo takus, tačiau jie neapsaugo nuo infekcijos viršutinių kvėpavimo takų (Collins ir Crowe, 2007). hRSV infekcijos metu nosiaryklės gleivinėje yra sekretuojami virusui specifiniai IgA klasės antikūnai, kurie efektyviai slopina šio viruso replikaciją viršutiniuose kvėpavimo takuose, tačiau šio tipo imuninės sistemos atsakas yra trumpalaikis ir neapsaugo nuo pakartotinės infekcijos kito epideminio sezono metu (Henderson ir kt., 1979b). Kūdikiai specifinius hRSV

virusui IgG klasės antikūnus gali gauti iš motinos per placentą nėštumo metu. Tačiau iš motinos gautų antikūnų titrai nėra pakankamai dideli ir pilnai neapsaugo kūdikių nuo hRSV infekcijos bei šio viruso sukeltų kvėpavimo takų ligų. Manoma, kad iš motinos gauti antikūnai pirmomis gyvenimo savaitėmis iš dalies apsaugo organizmą nuo infekcijos, tačiau su laiku jų kiekis sparčiai mažta ir nors jie gali sušvelninti infekcijos padarinius pirmaisiais gyvenimo mėnesiais, tačiau jie tuo pat metu slopina kūdikio imuninę sistemą, dėl to gali daryti daugiau žalos nei būti naudingi (Murphy ir kt., 1986). Kokį poveikį hRSV infekcijai daro virusui specifiniai antikūnai, patenkantys į kūdikio kvėpavimo takų sistemą su motinos pienu, iki šiol nėra aišku. Svarbų vaidmenį hRSV infekcijos metu vaidina ir ląstelinis imuninės sistemos atsakas. Yra nustatyta, kad pirmomis infekcijos dienomis kvėpavimo takų sistemoje padidėja CD8+ citotoksinių T limfocitų kiekis. Šios ląstelės eliminuoja užkrėstas ląsteles ir moduliuoja imuninės sistemos atsaką sekretuodamos limfokinas, ypač interferoną γ . Infekcijos metu imuninės sistemos CD8+ ir CD4+ limfocitai taip pat neleidžia viruso infekcijai plisti ir padeda organizmui šalinti virusą iš užkrėstų kvėpavimo takų. Užsikrėtus hRSV, skirtingai nei žmogaus paragripo virusų infekcijų metu, kvėpavimo takų išskyrose yra aptinkami tik negausūs interferonų α ir β kiekiai. Buvo nustatyta, kad žmogaus respiracinis sincitinis virusas savo nestruktūriniai NS1 ir NS2 baltymais žymiai efektyviau slopina įgimtos imuninės sistemos atsaką nei žmogaus paragripo virusai *P* geno koduojamais baltymais (Collins ir Crowe, 2007).

Žmogaus respiracinis sincitinis virusas yra vienas iš pavojingiausių infekcinių patogenų, nuo kurio sukeltų ūmių kvėpavimo takų ligų kasmet visame pasaulyje miršta apie šimtas tūkstančių kūdikių ir mažamečių vaikų. Pediatriinės vakcinos, apsaugančios nuo infekcijos hRSV, sukūrimas yra vienas iš pagrindinių uždavinių, kurį šiuo metu kelia Pasaulio Sveikatos Organizacijos specialistai (World Health Organization 2009). Kadangi kūdikiai hRSV dažniausiai užsikrečia antrą-septintą gyvenimo savaitę, todėl siekiant juos

apsaugoti nuo šio viruso infekcijos jie turėtų būti skiepijami pirmą-antrą gyvenimo savaitę. Sukurti vakciną, kuri tokiame ankstyvame amžiuje sukeltų nuo viruso infekcijos apsaugantį imuninės sistemos atsaką, tikrai yra sudėtingas uždavinys. Naujagimių imuninė sistema nėra visiškai išsivysčiusi, taip pat iš motinos nėštumo metu per placentą gauti antikūnai pirmomis gyvenimo savaitėmis pakankamai stipriai slopina humoralinį kūdikio imuninės sistemos atsaką, todėl silpnai imuninę sistemą stimuliuojantys antigenai dažniausia yra neveiksmingi (Crowe ir Williams, 2003). Pirmi bandymai sukurti nuo hRSV infekcijos apsaugančią vakciną, šiam tikslui naudojant formalinu inaktyvuotas hRSV daleles, buvo labai nesėkmingi. Virusų dalelių pagrindu sukonstruotomis vakcinomis paskiepijus kūdikius paaiškėjo, kad jos yra ne tik visiškai neveiksmingos, bet taip pat stimuliuoja tokį imuninės sistemos atsaką, kuris viruso infekcijos metu neslopina viruso replikacijos ir daro žalą kvėpavimo takų sistemai. Todėl šia vakcina paskiepytiems kūdikiams užsikrėtus hRSV virusu, šis virusas sukėlė žymiai ūmesnes kvėpavimo takų ligas, palyginus su tais kūdikiais, kurie nebuvo vakcinuoti (Prince ir kt., 2001). Iki šiol siekiant sukurti nuo hRSV infekcijos apsaugančią vakciną buvo tirti įvairūs vakcinavimo būdai. Eksperimentinių vakcinų gamybai buvo naudojami tiek rekombinantiniai hRSV viruso dalelės apvalkalo glikoproteinai, tiek imunogeninius viruso baltymų epitopus formuojantys sintetiniai peptidai. Buvo išbandytos DNR ir virusinių vektorių pagrindu sukonstruotos vakcinos. Taip pat buvo išmėgintos vakcinos, kurioms sukurti buvo naudojami arba galvijų respiracinis sincitinis virusas, arba žmogaus respiracinio sincitinio viruso variantai, turintys mutacijas, slopinančias šio viruso replikaciją. Tačiau nei viena išmėginta vakcinavimo strategija iki šiol nebuvo pakankamai sėkminga, todėl veiksmingos nuo hRSV infekcijos apsaugančios pediatriškos vakcinos teks dar palaukti (Hall, 2001). Verta paminėti, kad kovojant su hRSV infekcija šiuo metu yra sėkmingai naudojami neutralizuojantys humanizuoti monokloniniai antikūnai (Synagis™ Palivizumab, MedImmune).

Tiksliai žmogaus respiracinio sincitinio viruso infekcijų diagnostikai, taip pat kaip ir žmogaus paragripo virusų infekcijų diagnostikai, yra naudojami tiesioginiai viruso nustatymo metodai. Žinduolių ląstelių kultūrose hRSV replikuojasi neefektyviai, todėl diagnostinis metodas, paremtas viruso padauginimu, yra nejautrus (Hall, 2001). hRSV infekcijos metu kvėpavimo takų išskyrose naudojant imunofluorescencinę reakciją yra aptinkami šio viruso baltymai, arba naudojant atvirkštinės transkripcijos ir polimerazinę grandininę reakcijas galima aptikti šio viruso genominę RNR. hRSV infekcijų serologinei diagnostikai dažniausiai yra naudojamas tiesioginės imunofermentinės analizės metodas. Šiam metodui yra reikalingi virusiniai antigenai, todėl šiam tikslui iki šiol yra naudojamos arba hRSV dalelės, arba rekombinantiniai virusinės dalelės apvalkalo glikoproteinai. Kadangi hRSV infekcijos metu humoralinis kūdikių imuninės sistemos atsakas yra silpnas, todėl tiesioginės imunofermentinės analizės metodu ne visuomet pavyksta aptikti hRSV virusui specifinius antikūnus hRSV užsikrėtusių kūdikių kraujo serumo arba seilių mėginiuose. Atlikti tyrimai parodė, kad šiam diagnostikos metodui naudojant rekombinantinius hRSV baltymus galima aptikti žymiai mažesnius virusui specifinių antikūnų kiekius ir taip padidinti šio diagnostinio metodo jautrumą (Collins ir Crowe, 2007).

1.4. Nauji, šikšnosparnių platinami *Paramyxoviridae* šeimos virusai: biologiniai bruožai, patogeninės savybės, sukeltos ligos ir epidemiologija

Per pastaruosius kelis dešimtmečius buvo aptikta keletas naujų pavojingų *Paramyxoviridae* šeimai priklausančių virusų, kuriuos platina *Chiroptera* būrio šikšnosparniai. Nors neseniai aptikti paramikso virusai nėra pavojingi juos platinantiems sparnuotiesiems žinduoliams, tačiau šiais virusais gali užsikrėsti net kelių sausumos žinduolių rūšių gyvūnai ir kai kuriems jų šie virusai sukelia sisteminę infekciją: pažeidžia kvėpavimo takus, kraujotakos ir nervų sistemas. Kai kurie iš šių virusų yra mirtinai pavojingi žmogui (Eaton ir

kt., 2007). Vieni pavojingiausių yra Hendra ir Nipah virusai, aptikti 1994 ir 1997 metais (Chua ir kt., 1999; Selvey ir Sheridan, 1995). Buvo nustatyta, kad šiais virusais užsikrėtus žmogui, jie pažeidžia kvėpavimo takų sistemą ir sukelia neurologinius sutrikimus. Hendra ir Nipah virusai papildė vis didėjantį mirtinai pavojingų žmogui šikšnosparnių platinamų virusų sąrašą, kurį pradėjo 1934 metais aptiktas pasiutligės virusas ir šiuo metu užbaigia sunkų ūmų respiracinį sindromą sukeltantys koronavirusai, aptikti 2005 metais (Li ir kt., 2005; Sulkin ir Allen, 1974). Mažiau pavojingas yra *Paramixoviridae* šeimai priklausantis Menangle virusas, kurį taip pat platina *Chiroptera* būrio šikšnosparniai. Šis virusas buvo aptiktas 1997 metais per infekcinį protrūkį vienoje iš Australijos kiaulidžių (Philbey ir kt., 1998). Buvo nustatyta, kad infekcija Menangle virusu sukėlė reprodukcinės kiaulių ligas, dėl kurių ženkliai sumažėjo kiaulių vados, o infekciją sukeliančios šio viruso dalelės buvo aptiktos paršelių, gimusių negyvų, nervų sistemos audiniuose. Menangle virusas, jį palyginus su Nipah ir Hendra virusais, nėra toks pavojingas žmogui, iki šiol buvo užregistruoti tik keli atvejai, kurių metu šiuo virusu nuo kiaulių užsikrėtę kiaulidės darbuotojai susirgo į gripą panašia kvėpavimo takų liga (Bowden ir kt., 2001). Tačiau atsižvelgus į tai, kad kol kas apie Menangle virusą yra žinoma labai nedaug, jis gali daugintis kvėpavimo takų ir nervų sistemos audiniuose, ir į tai, kad šiuo virusu gali užsikrėsti ir žmogus, todėl Menangle virusas taip pat kelia nemažą susidomėjimą ir yra priskiriamas potencialiai pavojingų virusų grupei. Neseniai buvo aptikti dar keli nauji virusai, Tioman virusas, šikšnosparnių paragripo virusas ir Mapuera virusas, kurie, nustačius jų savybes, buvo priskirti *Paramixoviridae* šeimai (Chua ir kt., 2001; Henderson ir kt., 1995). Šie virusai taip pat yra nuosaikūs šikšnosparnių parazitai, dažniausiai šių virusų infekcijos sparnuotiesiems žinduoliams nesukelia ūmių ligų arba yra visiškai asimptominės, tačiau ar jie kelia pavojų kitų rūšių gyvūnams, tarp jų ir žmogui, iki šiol nėra aišku.

Neseniai atrastų, šikšnosparnių platinamų *Paramixoviridae* šeimos virusų tyrimai tik įsibėgėja. Hendra ir Nipah virusus, mirtinai pavojingus žmogui, yra leidžiama tirti tik ketvirto saugumo lygmens reikalavimus atitinkančiose laboratorijose, todėl šių virusų tyrimai į priekį juda labai lėtai. Iki šiol nėra aišku, kaip šie virusai plinta, kokias dar gyvūnų rūšis jie gali užkrėsti, mažai yra žinoma apie jų patogenines ir patologines jų savybes (Eaton ir kt., 2006). Taip pat trūksta ir tinkamų molekulinį įrankių šių virusų tyrimams, nėra sukurtos nei nuo šių virusų infekcijų apsaugančios vakcinos, nei efektyvios priešinfekcinės priemonės. Nors šių virusų diagnostikai laboratorijose yra naudojami įvairūs metodai, tačiau nėra sukurta standartizuotų šių virusų diagnostikai skirtų sistemų. Kadangi kai kurie neseniai atrasti, šikšnosparnių platinamami *Paramixoviridae* šeimos virusai yra labai pavojingi žmogui, dėl to jie kelia didelį susidomėjimą, tačiau žinios apie juos kol kas yra pakankamai skurdžios (Eaton ir kt., 2007).

1.4.1. Henipah virusai

Hendra ir Nipah virusų dalelių ir nukleokapsidžių morfologinės savybės yra panašios į *Paramyxovirinae* pošeimio virusų, o genomo struktūra labiausiai sutampa su šio pošeimio *Reaprovirus* ir *Morbillivirus* gentims priklausančių virusų genomo struktūra. Tačiau šie virusai pasižymi ir unikaliomis savybėmis, kurios nėra būdingos kitiems paramikso virusams. Todėl Hendra ir Nipah virusai buvo išskirti į atskirą gentį, kuri yra priskiriama *Paramyxovirinae* pošeimiui ir vadinama *Henipavirus* gentimi (Eaton ir kt., 2006). Visų pirma į akis krenta tai, kad henipah virusų genomas yra maždaug 2700 nk ilgesnis nei kitų paramikso virusų ir šie virusai genomo 5' ir 3' galuose turi unikalias genčiai specifines reguliacines sekas (Wang ir kt., 2000). Tačiau neseniai aptiktų, dar kol kas nesuklasifikuotų, Tupaia ir J paramikso virusų genomai taip pat yra panašaus ilgio ir šiuo aspektu labai nesiskiria nuo Nipah ir Hendra virusų genomų (Jack ir kt., 2005; Tidona ir kt., 1999). Nors visų virusų, kurių

genomas yra nesegmentuota viengrandė priešprasmė RNR molekulė, polimerazės aktyvų centrą formuoja tokia pati aminorūgščių seka (GDNQ), tačiau henipah virusų ši seka (GDNE) skiriasi. Taip pat henipah virusai yra unikalūs tuo, kad koduojamų genų 3' gale turi ilgas netransliuojamas reguliacines sekas. Nors Hendra ir Nipah virusų beveik visi koduojami baltymai savo ilgiu tik nežymiai skiriasi nuo analogiškų baltymų, kuriuos koduoja *Reapirivirus* ir *Morbillivirus* gentims priklausantys paramikso virusai, tačiau P baltymas yra net 200 aminorūgščių ilgesnis nei kitų paramikso virusų (Wang ir kt., 2000).

Henipah virusai tai pat pasižymi unikaliomis biologinėmis savybėmis. Jie yra vieninteliai ypatingai patogeniški zoonotiniai paramikso virusai, kurie, kaip yra nustatyta, gali infekuoti ne tik kelių rūšių šikšnosparnius, bet ir keleto rūšių sausumos žinduolius, priklausančius net keturiems žinduolių būriams (Wang ir kt., 2001). Nipah virusas yra ypatingai pavojingas žmogui. Pirmas užregistruotas didelis šio viruso sukeltas infekcinis protrūkis įvyko 1999 metais Singapūre, kurio metu nuo kiaulių užsikrėtė 256 kiaulidėse dirbantys žmonės, iš kurių 40 % mirė (Paton ir kt., 1999). Siekiant užkirsti kelią Nipah virusui plisti, Singapūre buvo išskersta net milijonas kiaulių. Nuo tada iki pat šiandien visoje pietų Azijoje Nipah virusas sukėlė dar dvylika didelių infekcinių protrūkių, kurių metu buvo nustatyta, kad šiuo virusu galima užsikrėsti vartojant infekuotą vaisiaėdžių šikšnosparnių seilėmis arba šlapimu užterštus vaisius ir jų produktus, taip pat šį virusą gali platinti užsikrėtęs žmogus. Visi Nipah viruso sukelti infekciniai protrūkiai pasižymėjo dideliu mirčių skaičiumi. Pavyzdžiui, 2004 metais kilus infekciniam protrūkiui Bangladeše, maždaug 75 % Nipah virusu užsikrėtusių žmonių mirė (Rahman ir kt., 2010). Kaip jau buvo minėta, Nipah virusu dažniausiai užsikrečia kiaulės, kurioms šis virusas sukelia kvėpavimo takų ligas ir daugeliu atvejų joms jis nėra mirtinai pavojingas. Tačiau nuo infekuotų kiaulių gali užsikrėsti ir žmogus, todėl kilus Nipah viruso infekcijų protrūkiui kiaulidėse, šie gyvuliai yra masiškai

skerdžiami. Hendra virusu dažniausiai užsikrečia arkliai, kuriems šis virusas yra mirtinai pavojingas. Arkliams Hendra virusas sukelia sunkias kvėpavimo takų ir neurologines ligas. Taip pat Hendra virusu gali užsikrėsti ir žmogus, kuriam šis virusas labiausiai pažeidžia nervų sistemą (Eaton ir kt., 2006). Nors iki šiol užregistruotų Hendra virusu užsikrėtusių žmonių skaičius yra labai kuklus, tik šeši atvejai, tačiau šis virusas taip pat yra pavojingas. Trys iš šešių Hendra virusu užsikrėtusių žmonių mirė (Wong, 2010). Pirmas užregistruotas Hendra viruso sukeltas infekcinis protrūkis įvyko 1994 metais vienoje iš Australijos arklidžių, kurio metu šiuo virusu užsikrėtė dvidešimt vienas arklys. Visi užsikrėtę arkliai susirgo ūmiomis kvėpavimo takų ligomis ir trylika iš jų mirė. Taip pat šio infekcinio protrūkio metu nuo arklių užsikrėtė vienas arklidės darbininkas ir jojimo treneris, kuriems Hendra virusas sukėlė į gripą panašias kvėpavimo takų ligas ir neurologinius sutrikimus, o jojimo treneris netrukus mirė (Eaton ir kt., 2006). Nuo tada iki pat šiandien daugiausia Australijos Queensland'o regiono arklidėse buvo užregistruota dar dešimt infekcinių protrūkių, kuriuos sukėlė Hendra virusas (Wong, 2010). Nors šie protrūkiai nėra gausūs, tačiau įvertinus šio viruso potencialą plisti ir sukelti mirtinai pavojingas nervų sistemos ligas žmogui, jis kaip ir Nipah virusas yra priskiriamas ypatingai pavojingų virusų grupei, kurio taip pat derėtų pasisaugoti.

Henipah virusų infekcijos šikšnosparniams nesukelia jokių pastebimų ligos simptomų. Atlikus serologinės stebėsenos tyrimus, įvairių Australijoje gyvenančių pteropidų kraujyje buvo aptikti dideli henipah virusams specifinių antikūnų kiekiai, tačiau nei Nipah, nei Hendra viruso infekcijų nepavyko susieti nei su viena šikšnosparnių liga. Taip pat buvo atlikti eksperimentiniai tyrimai, kurių metu henipah virusais specialiai buvo užkrėstos net kelios Australijoje gyvenančių šikšnosparnių rūšys, tačiau eksperimentinės infekcijos užkrėstiems gyvūnams nesukėlė jokių ligos simptomų (Rahman ir kt., 2010). Skirtingai nei šikšnosparniams, henipah virusais užsikrėtus kitų rūšių sausumos žinduoliams,

šie virusai sukelia sisteminę infekciją, kurios metu yra pažeidžiamos net kelios organizmo sistemos. Priklausomai nuo žinduolių rūšies šių virusų infekcijos gali sukelti ūmias kvėpavimo takų ligas arba stipriai pažeisti nervų sistemą. Didelė dalis šiais virusais užsikrėtusių sausumos žinduolių miršta. Hendra virusu užsikrėtus arkliais, šis virusas sukelia ūmią ir dažnai mirtiną kvėpavimo takų ligą, kurios metu gyvulus karščiuoja, sutrinka jo koordinacija, patinsta snukis ir formuojasi gausios nosiaryklės išskyros. Nipah virusu užsikrėtus kiaulėms, taip pat labiausiai yra pažeidžiami kvėpavimo takai. Šiuo virusu užsikrėtęs gyvulus taip pat karščiuoja, padažnėja kvėpavimo ritmas ir kamuoja sausas, sunkus kosulys. Tačiau arkliais užsikrėtus Hendra virusu, o kiaulėms – Nipah virusu, šių virusų infekcijos neapsiriboja vien tik kvėpavimo takais. Jų metu taip pat yra pažeidžiama ir nervų sistema. Nipah ir Hendra virusais užsikrėtus žmogui, šie virusai dažniausiai sukelia ūmų nervų sistemos uždegimą, tačiau ne retai kartu yra pažeidžiami ir kvėpavimo takai (Eaton ir kt., 2006).

Henipah virusais užsikrėtus sausumos žinduoliams, šie virusai replikuojasi kraujagyslių sienelės ląstelėse, todėl daugelyje organų sukelia sisteminių kraujagyslių uždegimą, nors klinikiniai simptomai dažniausiai susiformuoja tik šiems virusams pažeidus kvėpavimo takus ir/arba nervų sistemos kraujotaką bei centrinės nervų sistemos ląsteles. Užsikrėtus Nipah virusu, šio viruso antigenai yra aptinkami parenchimos neuronuose, sincitinėse endotelio bei bronchų ir alveolių epitelio ląstelėse, o užsikrėtus Hendra virusu, šio viruso dalelės yra aptinkamos nosies gleivinės išskyrose, šlapime, smegenyse ir plaučiuose (Hooper ir kt., 2001). Skirtingai nei arkliais, infekavus šikšnosparnius mirtinomis arkliais Hendra viruso dalelių dozėmis, tik kai kuriems jų infekcija sukėlė negausius pavienius vaskulito židinius plaučiuose, blužnyje, smegenų dangale, inkstuose arba žarnyne, o viruso dalelės buvo aptiktos ne endotelio, bet vidurinių kraujagyslių sienelės dangalą formuojančio sluoksnio ląstelėse (Williamson ir kt., 1998). Yra manoma, kad

dvi pagrindinės priežastys lemia tai, kad šikšnosparniams, skirtingai nei kitiems sausumos žinduoliams, užsikrėtus henipah virusais, šie virusai nesukelia sisteminės infekcijos. Viena iš priežasčių yra ta, kad šikšnosparniuose šie virusai dauginasi ne kraujagyslių endotelio, bet vidurinį kraujagyslių sienelės dangalą formuojančio sluoksnio ląstelėse. Yra manoma, kad būtent todėl infekcijos henipah virusais šikšnosparniams nesukelia ligų, kurių priežastis yra sisteminis kraujotakos takų uždegimas, kylantis šiems virusams pažeidus kraujagyslių endotelio sluoksnį. Taip pat stebina ir tai, kad henipah virusais užsikrėtus šikšnosparniams, jų organizmo audiniuose yra aptinkami tik labai nedideli viruso antigenų kiekiai. Todėl yra manoma, kad šikšnosparniai turi kažkokius nuo infekcijų henipah virusais apsaugančius veiksnius, kurių neturi šių virusų infekcijoms jautrūs kiti sausumos žinduoliai. Tačiau kokie tai yra veiksniai, iki šiol nėra aišku (Eaton ir kt., 2006).

Neseniai atlikti tyrimai parodė, kad henipah virusų infekcijų tropizmas, šių virusų virulentiškumas ir infekuojamų gyvūnų įvairovė labai priklauso nuo šių virusų koduojamų baltymų G ir F funkcijų. Be to, henipah virusų P geno koduojami baltymai moduliuoja šių virusų virulentiškumą blokuodami įvairius ląstelės interferonų atsaką įjungiančius signalinius kelius. Buvo nustatyta, kad henipah virusų G baltymas, pritvirtinantis viruso dalelę prie ląstelės, skirtingai nei kitų paramikso virusų analogišką funkciją atliekantys baltymai, sąveikauja su glikoproteinu efrinu B2, kurį savo paviršiuje turi beveik kiekviena ląstelė (Negrete ir kt., 2005). Šis ląstelės paviršiaus baltymas yra labai konservatyvus ir yra aptinkamas ne tik visose žinduolių rūšyse, bet taip pat šį baltymą turi varliagyvių ir net pinčių ląstelės (Drescher, 2002). Didžiosios dalies paramikso virusų baltymai, pritvirtinantys viruso dalelę prie ląstelės, sąveikauja su sialo rūgšties grupę turinčiais ląstelės paviršiaus glikoproteinais ir glikolipidais, kurių yra gausu tik kai kurių organizmo audinių ląstelių paviršiuje. Taip pat skirtingose gyvūnų rūšyse pakankamą kiekį molekulių su sialo rūgšties grupe turi skirtingų audinių ląstelės. Manoma, kad būtent tai riboja didžiosios dalies

paramikso virusų infekcijų tropizmą ir šių virusų infekuojamų gyvūnų įvairovę (Lamb ir Parks, 2007). Kadangi glikoproteino efrino B2 yra gausiai aptinkama beveik visų organizmo audinių ląstelių paviršiuje ir šis baltymas yra labai konservatyvus, todėl tai iš dalies paaiškina, kodėl henipah virusais, skirtingai nei kitais paramikso virusais, gali užsikrėsti įvairių rūšių gyvūnai, o šių virusų infekcijų metu virusų replikacijos židiniai yra aptinkami įvairių organizmo sistemų audiniuose. Taip pat buvo nustatyta, kad henipah virusų F baltymą aktyvinanti hidrolizė vyksta ląstelės endosomose, o šią hidrolizę atlieka baltymas katepsinas L, kurį turi kiekviena ląstelė (Pager ir kt., 2004). Dalies paramikso virusų F baltymas yra aktyvuojamas tik ląstelės paviršiuje. Šią funkciją atlieka sekretuojamos proteazės. Todėl šie paramikso virusai gali daugintis tik tame audinyje, kurio ląstelės sekretuoja tinkamą F baltymą aktyvinantį fermentą (Lamb ir Parks, 2007). Kadangi henipah virusų F baltymą aktyvinanti hidrolizė vyksta ląstelės endosomoje šiam baltymui iš endoplazminio tinklo keliant link ląstelės membranos, o šią hidrolizę atliekantį fermentą turi beveik kiekviena ląstelė, todėl šis veiksnys neriboja šių virusų infekcijų tropizmo. Ištyrus henipah virusų *P* geno koduojamų baltymų funkcijas, paaiškėjo, kad šie baltymai gali blokuoti ląstelės interferonų atsaką aktyvuojančius signalinius kelius ne tik ląstelės citoplazmoje, kur šį atsaką blokuoja kitų paramikso virusų *P* geno koduojami baltymai, bet ir branduolyje. Yra manoma, kad henipah virusai, skirtingai nei kiti paramikso virusai, dėl unikalių *P* geno koduojamų baltymų funkcijų žymiai efektyviau slopina įgimtą imuninės sistemos atsaką, dėl to jie gali infekuoti įvairių rūšių gyvūnus ir sukelti siteminę infekciją (Eaton ir kt., 2006).

1.4.2. Menangle virusas

MenV buvo aptiktas 1997 m. per infekcinį protrūkį vienoje iš Australijos kiaulidžių. Buvo nustatyta, kad infekcija šiuo virusu sukėlė reprodukcinės kiaulių ligas, dėl kurių ženkliai sumažėjo kiaulių vados, o MenV buvo aptiktas

paršelių, gimusių negyvų, nervų sistemos audiniuose (Philbey ir kt., 1998). Nustačius naujai aptikto viruso genomo seką ir palyginus šio viruso koduojamų baltymų sekas ir reguliacines genomo sritis su kitų paramikso virusų, paaiškėjo, kad jos yra labiausiai panašios į *Rubulavirus* genties paramikso virusų, todėl MenV buvo priskirtas *Rubulavirus* genčiai. Tačiau buvo aptiktas ir vienas esminis skirtumas. MenV HN baltymo aminorūgščių seka nėra pakankamai panaši į kitų paramikso virusų, o neuraminidazės aktyvų centrą formuojančios aminorūgštys skiriasi nuo kitų paramikso virusų analogišką funkciją atliekančio HN baltymo aktyvų centrą formuojančių aminorūgščių. Beje, HN baltymo neuraminidazinę funkciją atliekantį aktyvų centrą formuojančios aminorūgštys yra labai konservatyvios. Manoma, kad MenV HN baltymas gali neturėti neuraminidazinio aktyvumo, nors savo erdvine struktūra, kaip rodo struktūrinės analizės duomenys, gauti naudojant baltymų struktūrą įvertinančius algoritmus, yra panaši į *Rubulavirus* genties paramikso virusų. Taip pat gali būti, kad MenV HN baltymo neuraminidazinį aktyvumą turintis centras yra suformuotas iš kitokių aminorūgščių (Bowden ir kt., 2001). Ar MenV HN baltymas turi neuraminidazinį aktyvumą, iki šiol nėra aišku.

Iki pat šiandien buvo užregistruotas tik vienintelis MenV sukeltas infekcinis protrūkis, kurio metu paaiškėjo, kad šis virusas infekuoja kiaules ir sukelia reprodukcinės šių gyvulių ligas (Philbey ir kt., 2007). Sumažėja jų paršiovimosi dažnis, pagausėja savaiminių persileidimo atvejų, šiuo virusu užsikrėtusių kiaulių vadose padidėja paršelių, gimusių negyvų, skaičius. Infekuotų gimusių negyvų paršelių galūnės, kaukolė ir snukis dažniausiai yra nepilnai išsivystę ir stipriai deformuoti, taip pat smarkiai būna pažeistos jų galvos ir stuburo smegenys (Philbey ir kt., 2007). MenV infekcinio protrūkio metu specifiniai virusui antikūnai buvo aptikti infekcijos nuniokotoje ir dar keliose netoliese esančiose kaulidėse auginamų kiaulių kraujo serumuose. Taip pat šį virusą neutralizuojantys antikūnai buvo aptikti dviejų kaulidės

darbininkų, turėjusių tiesioginį kontaktą su užsikrėtusiomis kiaulėmis, kraujyje. Abu infekuoti kiaulidės darbuotojai susirgo į gripą panašia liga bei buvo išbirti. Po šio infekcinio protrūkio nuniokotos kiaulidės apylinkėse gyvenančių šikšnosparnių kraujo serume taip pat buvo aptikti MenV specifiniai antikūnai. Po šio atradimo buvo padaryta prielaida, kad būtent šie sparnuotieji žinduoliai yra infekcijos šaltinis. Po vienintelio infekcinio protrūkio paaiškėjus, kad MenV yra platinamas šikšnosparnių, nuo kurių gali užsikrėsti kiaulės, o nuo infekuotų kiaulių – ir žmogus, ir šis virusas gali sukelti reprodukcinės kiaulių ligas bei pažeisti besilaukiančios kiaulės vaisiaus nervų sistemą, Menangle virusu buvo labai susidomėta ir prasidėjo šio viruso tyrimai (Philbey ir kt., 1998). Šiandien jau yra nustatyta, kad serologinių MenV infekcijos požymių galima aptikti dažniausiai trijose *Pteropus* genties šikšnosparnių rūšyse: *P.poliocephalus*, *P.alecto* ir *P.conspicillatus*. Šios šikšnosparnių rūšys gyvena Australijos žemyne ir Papua Naujojoje Gvinėjoje. Yra manoma, kad būtent šiame areale yra paplitęs ir Menangle virusas. Iki pat šiandien nėra aišku, kaip šis virusas plinta. Nors specifiniai MenV antikūnai yra aptinkami daugelio Australijoje gyvenančių *Pteropus* genties šikšnosparnių kraujo serume, tačiau iki šiol nei iš vieno šiuos antikūnus turinčio suaugusio individo nepavyko išskirti paties viruso. Taip pat MenV nepavyko aptikti serologinius infekcijos požymius turinčių šikšnosparnių šlapime ir išmatose. Nustatyta, kad suaugusiems šikšnosparniams MenV nesukelia jokių ligos simptomų (Philbey ir kt., 2008). Taip pat jokių ligų šis virusas nesukelia, nei suaugusioms kiaulėms, nei tik gimusiems gyviems paršeliams. Yra manoma, kad MenV išsivysčiusiame organizme replikuoja labai negausiai, todėl nepavyksta aptikti paties viruso, nors to pakanka sukelti imuninį organizmo atsaką, kurio metu yra gaminami šiam virusui specifiniai antikūnai. Tačiau MenV virusu užsikrėtus besivystančiam vaisiui, jo ląstelėse virusas replikuoja labai gausiai ir sukelia stiprius apsigimimus. Jei ši prielaida yra teisinga, tuomet išsivystęs organizmas turėtų turėti kažkokius nuo gausios viruso replikacijos apsaugančius veiksnius,

kurių neturi besivystantis vaisius (Philbey ir kt., 2008). Remiantis šiomis prielaidomis yra manoma, kad dėl neefektyvios MenV replikacijos infekuotiems suaugusiems individams virusas nesukelia jokių ligos simptomų, o į aplinką patenka tik labai mažas skaičius infektyvių šio viruso dalelių, dėl to nepavyksta jų aptikti. Spėjama, kad efektyviausiai šis virusas plinta užsikrėtus nuo motinos vaisiui tokioje vystymosi stadijoje, kurioje šio viruso infekcija nebedaro žalos. Taip virusas yra perduodamas iš kartos į kartą, o gimę negyvi infekuoti individai gali būti infektyvių viruso dalelių, patenkančių į aplinką, šaltinis (Philbey ir kt., 2008).

Menangle viruso tyrimai tik įsibėgėja. Ar šis neseniai atrastas zoonotinis šikšnosparnių platinamas virusas kelia rimtą pavojų kitoms gyvūnų rūšims, tarp jų ir žmogui, nėra iki galo aišku. Reikia tikėtis, kad į šį klausimą pavyks atrasti atsakymą ateityje prieš įvykstant dar vienam šio viruso sukeltam infekciniam protrūkiui.

1.5. Virusinių baltymų sintezė heterologinėse baltymų sintezės sistemose

Heterologinių baltymų sintezės sistemos yra sukurtos daugelyje organizmų, pradedant bakterijomis ir baigiant aukštesniaisiais eukariotais, žinduolių ląstelių kultūromis. Heterologinių baltymų sintezės sistemos yra naudojamos daugelio virusinių baltymų sintezei, o šiose sistemose susintetinti virusiniai baltymai yra naudojami įvairiems tikslams.

Rekombinantiniai virusiniai baltymai susintetinti heterologinėse sistemose yra naudojami šių baltymų struktūros ir savybių tyrimams, virusinių ligų diagnostikai, vakcinų kūrimui, ląstelėje vykstančių procesų analizei ir daugelyje kitų mokslinių tyrimų sričių. Akivaizdu, kad žmogaus ligas sukeliantys virusai replikuojausi aukštesniųjų eukariotų ląstelėse ir šiems virusams padauginti dažniausiai naudojamos žinduolių ląstelių kultūros. Šios ląstelės labiausiai tinka ir žmogų infekuojančių virusų baltymų sintezei, nes jos turi tinkamus šiuos baltymus modifikuojančius fermentus, ir sistemas

reikalingas šių baltymų brandinimui. Heterologinėse sistemose susintetinti rekombinantiniai virusų baltymai nuo natyvių analogiškų baltymų gali skirtis savo savybėmis ir erdvine struktūra. Tyrimams, kuriuose yra naudojami heterologinėse sistemose susintetinti rekombinantiniai virusų baltymai, yra svarbu, kad šie baltymai savo savybėmis kuo mažiau skirtųsi nuo natyvių analogiškų baltymų. Suprantama, kad žinduolių ląstelių kultūrose susintetinti žmogaus virusų baltymai dažniausiai savo savybėmis būna panašūs į analogiškus natyvius baltymus. Tačiau, tokios sintezės sistemos yra gana sudėtingos, sunku išauginti didesnę ląstelių biomasę ir išgryninti patį baltymą, todėl gaunama maža šiose sistemose sintetinamo baltymo išeiga. Pastaruoju metu ieškoma būdų dideliems rekombinantinių virusinių baltymų kiekiams gauti, nes plačiai paplitusių infekcinių ligų diagnostikai ir prevencijai reikalingi dideli šių baltymų kiekiai. Kita vertus, heterologinėje sintezės sistemoje susintetintas baltymas turi išsaugoti jam būdingas savybes.

Mikroorganizmai dauginasi greitai, todėl nesunku užauginti didelį norimą baltymą sintetinančių ląstelių biomasės kiekį. Greičiausiai dauginasi prokariotiniai organizmai – bakterijos, todėl juose yra išbandyta beveik daugelio virusų baltymų sintezė. Nustatyta, kad bakterijose susintetinti žmogaus virusų baltymai neturi kai kurių šiems baltymams būdingų savybių, dėl to yra silpni antigenai ir jų panaudojimas yra ribotas. Pavyzdžiui, rekombinantinis tymų viruso N baltymas susintetintas *E.coli* bakterijose, buvo prastas diagnostinis reagentas lyginant su tymų viruso N baltymu, kuris buvo susintetintas vabzdžių ir žinduolių ląstelėse (Warnes ir kt., 1994). Dar labiau skiriasi natyvių ir bakterijose susintetintų virusinių glikoproteinų, kurie normaliu atveju bręsta endoplazminiame tinkle ir Goldžio komplekse, savybės. Pavyzdžiui, gripo viruso kraują-agliutinuojantis baltymas HA, homologiškas paramikso virusų HN ir H glikoproteinams, šį baltymą sintetinant bakterijose suformuoja kitokią erdvinę struktūrą ir nesąveikauja su gripo virusą neutralizuojančiais monokloniniais antikūnais (Nayak ir kt., 1985). Be to,

bakterijose susintetintų baltymų panaudojimas žmogui yra ribotas dėl galimo įvairių endotoksinų poveikio. Kai bakterijos, kaip producentas, pasirodo netinkamos, dėmesys krypta į eukariotinius mikroorganizmus, tokius kaip mielės.

Iš pirmo žvilgsnio atrodytų, kad žemesnieji eukariotai panašiai kaip ir bakterijos gali būti netinkami virusinių baltymų sintezei dėl to, kad mielių ir aukštesniųjų eukariotų baltymų brandinimo sistemos skiriasi (Hu ir kt., 1994a; Hu ir kt., 1994b; Hu ir Norrby, 1994). Tačiau imunologinių tyrimų duomenys rodo, kad *P.pastoris* mielėse susintetintu gripo viruso HA baltymu imunizuotos pelės yra atsparios letaliai gripo viruso infekcijai (Saelens ir kt., 1999), o šis baltymas, susintetintas mielėse *S.cerevisiae*, sąveikauja su specifiniais antikūnais taip pat efektyviai kaip ir natyvus šio baltymo analogas (Jabbar ir kt., 1985). Pakankamai imunogeniškus virusinius baltymus gali gaminti ir aukštesnieji, žinduoliams tolimi eukariotai. Parodyta, kad transgeninio tabako, sintetinančio tymų viruso H baltymą, lapų ekstraktu galima sukelti tymų virusą neutralizuojančių antikūnų gamybą pelėse, netgi imunizavus jas orališkai (Huang ir kt., 2001). Jau minėtas tymų viruso N baltymas, susintetintas vabzdžių ląstelėse, taip pat puikiai tiko tymų viruso infekcijų diagnostikai. Daugybė eksperimentų patvirtino, kad mielėse susintetinti įvairūs žinduolių baltymai savo struktūra bei biologiniu aktyvumu nesiskiria nuo analogiškų baltymų, gaunamų šiuos baltymus sintetinant aukštesniųjų eukariotų ląstelėse (Munder ir Hinnen, 1999).

Kepimo mielės *S.cerevisiae* yra plačiai naudojamos heterologinių baltymų sintezei. Jos gerai auga nebrangiose terpėse, šiose mielėse baltymų sekrecijos keliai ir potransliacinės modifikacijos yra panašios į aukštesniųjų eukariotų, neturi endotoksinų, taip pat yra nepavojingos žmogui. Daugumoje atvejų svetimų genų raiškai mielėse yra naudojami mielių genų promotoriai. Vektoriumi dažniausiai yra naudojama plazmidė, kuri paprastai mielių *S.cerevisiae* ląsteles transformuoja žiedinėje formoje, turi selektyvų geną-

žymenį ir yra daugiakopijinė. Didelis kopijų skaičius priklauso nuo jos sudėtyje esančio dvimikroninės mielių plazmidės fragmento, kuris užtikrina šios plazmidės nepriklausomą replikaciją ir stabilų palaikymą ląstelėje. Nežiūrint visų patogumų, heterologinius baltymus koduojančių genų raiška mielėse *S.cerevisiae* nėra garantuota ir priklauso nuo daugelio veiksnių. Naudojant tą patį mielių promotorių, mielių geno raiška dažnai yra kelias dešimtis ar šimtus kartų stipresnė nei heterologinio geno raiška. Tai lemia pati geno seka, kuri gali daryti įtaką heterologinės iRNR stabilumui, ir nuo to priklauso šios iRNR kiekis ląstelėje (Mellor ir kt., 1985). Taip pat sintetinamas svetimasis baltymas gali būti nuodingas ląstelei ir stabdyti jos augimą (Shuster ir kt., 1989), kartais jo sintezė gali būti netgi letali (Caumont ir kt., 1996). Gavus norimo baltymo sintezę ir padidinus išeią optimizuojant sintezės sąlygas bei baltymo gryninimo procedūrą, svarbu įsitikinti, ar baltymas pasižymi jam būdingomis savybėmis. Mielėse *S.cerevisiae* sekretuojami baltymai dažnai būna hiperglikozilinti, o tai gali pakeisti šiose mielėse sintetinamo heterologinio glikoproteino savybes bei iššaukti nepageidaujamą pašalinį imuninį atsaką, šiuo baltymu vakcinuojant žmogų (Cremata ir kt., 1998). Iki šiol mielėse yra susintetinta daugelis įvairių virusų glikoproteinų, padedančių *in vitro* ir *in vivo* tirti įvairias sąveikas bei pasižymintį natyviame viruso baltymui būdingomis antigeninėmis savybėmis (Jabbar ir kt., 1985). Reikia pažymėti, kad pirmoji rekombinantinė vakcina, skirta kovai su žmogaus hepatito B virusu, buvo susintetinta mielių *S.cerevisiae* svetimų baltymų sintezės sistemoje (Makela, 2000). Virusinių baltymų, sintetintamų ir brandinamų ląstelės citoplazmoje, sintezė mielėse nėra tokia komplikauta, kaip viruso dalelės apvalkalo glikoproteinų. Dažniausiai mielėse *S.cerevisiae* susintetinti *Paramyxoviridae* šeimos virusų nukleokapsidės baltymai pasižymi natyviems analogiškiems baltymams būdingomis savybėmis (Samuel ir kt., 2002; Samuel ir kt., 2003; Slibinskas ir kt., 2004; Slibinskas ir kt., 2003).

1.6. *Paramyxoviridae* šeimos virusų nukleokapsidės baltymų sintezė įvairiose heterologinių baltymų sintezės sistemose

Paramikso virusų N baltymai, susintetinti heterologinėse baltymų sintezės sistemose, formuoja virusų nukleokapsidę primenančias daleles (vNPD). Buvo nustatyta, kad naudojant adeno virusų ir vakcinijos virusų pagrindu sukonstruotus vektorius, žinduolių ląstelėse susintetintas tymų viruso N baltymas formuoja vNPD ir šiam procesui nėra reikalinga virusinės RNR bei kiti viruso baltymai (Fooks ir kt., 1995; Spehner ir kt., 1991). Nors žinduolių ląstelėse susintetinti rekombinantiniai paramikso virusų N baltymai savo savybėmis yra panašūs į natyvius analogiškus paramikso virusų N baltymus, tačiau naudojant šią heterologinių baltymų sintezės sistemą neįmanoma gauti didelių N baltymo kiekių. Taip pat įvairių paramikso virusų N baltymai sėkmingai buvo susintetinti ir vabzdžių ląstelėse, naudojant bakulovirusų pagrindu sukonstruotą svetimų baltymų sintezei skirtą vektorių (Fooks ir kt., 1993). Buvo nustatyta, kad vabzdžių ląstelėse susintetinti paramikso virusų N baltymai taip pat formuoja vNPD nesant virusinės RNR ir kitų viruso baltymų. Naudojant vabzdžių ląsteles paramikso virusų N baltymų sintezei yra gaunami gana dideli šių baltymų kiekiai. Be to, šioje sistemoje susintetintų paramikso virusų N baltymų formuojamas vNPD galima išgryninti naudojant paprastus gryninimo metodus, juos centrifuguojant per tankų sacharozės tirpalo sluoksnį, o po to CsCl tankio gradientu. Vabzdžių ląstelėse susintetintų paramikso virusų N baltymų formuojamos vNPD, jas stebint EM, yra labai panašios į paramikso virusų nukleokapsidę, kuri formuojasi šių virusų infekcijų metu žinduolių ląstelėse (Bhella ir kt., 2002; Bhella ir kt., 2004; Schoehn ir kt., 2004). Tačiau rekombinantinių baltymų formuojamos vNPD yra šiek tiek ilgesnės ir turi mažesnį lyginamąjį svorį (Fooks ir kt., 1993). Taip gali būti dėl to, kad vabzdžių ląstelėse susintetintų paramikso virusų N baltymų formuojamos vNPD yra be virusinės RNR, kuri suteikia nukleokapsidei papildomą svorį ir, galbūt, riboja jos ilgį. Yra manoma, kad vabzdžių ląstelėse

susintetinti paramikso virusų N baltymai renkasi į virusų nukleokapsidę primenančius darinius nesąveikaudami su RNR arba šiems dariniams susiformuoti reikalinga nespecifinė sąveika su vabzdžių ląstelės citoplazmoje esančia RNR (Fooks ir kt., 1993). Taip pat buvo nustatyta, kad vabzdžių ląstelėse susintetintų tymų viruso N baltymų formuojamos vNPD, jas išgryninus, yra labai imunogeniškos ir reaguoja su sveikstančių nuo tymų pacientų kraujo serumu. Todėl šioje sistemoje susintetintas tymų viruso N baltymas gali būti sėkmingai naudojamas šio viruso infekcijų diagnostikai. Be to, vabzdžių ląstelėse susintetintų paramikso virusų N baltymų formuojamos vNPD yra sėkmingai naudojamos detaliems šių virusų nukleokapsidės morfologijos tyrimams (Bhella ir kt., 2002). Nors vabzdžių ląstelių heterologinių baltymų sintezės sistema puikiai tinka paramikso virusų N baltymų sintezei, tačiau naudojant šią sistemą nėra paprasta gauti didelius biomasės kiekius, dėl to, norint gauti didelius kiekius N baltymų, būtų patogiau naudoti mielių arba bakterijų sistemas skirtas svetimų baltymų sintezei. Keleto paramikso virusų N baltymų buvo mėginta susintetinti bakterijose (Warnes ir kt., 1995). Tačiau bakterijose susintetinti paramikso N baltymai neformuoja tokių vNPD, kurias formuoja tie patys N baltymai, susintetinti aukštesniųjų eukariotų svetimų baltymų sintezės sistemose. Bakterijose susintetintas žmogaus respiracinio sincitinio viruso N baltymas formuoja tik nukleokapsidės žiedus, kuriuos sudaro dešimt arba vienuolika tarpusavyje susijungusių N baltymų (Tawar ir kt., 2009). Taip pat bakterijose susintetinti paramikso virusų N baltymai yra neimunogeniški, prasti diagnostiniai reagentai. Matyt, šioje sistemoje susintetinti N baltymai skiriasi savo erdvine struktūra nuo natyvių baltymų (Warnes ir kt., 1994). *Paramyxoviridae* šeimos kiaulytės ir tymų virusų N baltymai buvo sėkmingai susintetinti mielėse *S.cerevisiae* ir *P.pastoris* (Samuel ir kt., 2002; Samuel ir kt., 2003; Slibinskas ir kt., 2004; Slibinskas ir kt., 2003). Buvo gautos didelės šių baltymų išeišgos. Nustatyta, kad mielėse susintetinti kiaulytės ir tymų virusų N baltymai formuoja vNPD, yra

imunogeniški, pasižymi natyviems N baltymams būdingomis antigeninėmis savybėmis, todėl buvo sėkmingai pritaikyti šių virusų infekcijų serologinei diagnostikai. Tai pat naudojant mielėse susintetintus rekombinantinius kiaulytės ir tymų virusų N baltymus buvo gauti specifiniai šiems virusams antikūnai (Žvirblienė ir kt., 2007).

2. TYRIMŲ METODIKA

2.1. MEDŽIAGOS

2.1.1. Reagentai

Visi šiame darbe naudoti reagentai yra aukščiausios prieinamos kokybės. Ruošiant tirpalus reagentai tirpinti vandenyje, jei darbe pateiktose metodikose nenurodyta kitaip.

2.1.2. Fermentai

Veršelio žarnų šarminė fosfatazė, DNR polimerazės, T4 DNR ligazė, dezoksiribonukleazė I, ribonukleazė A ir visos darbe naudotos restrikcijos endonukleazės buvo pagamintos uždaroje akcinėje bendrovėje „Fermentas“.

2.1.3. Oligonukleotidai

DNR padauginimui PGR metodu naudoti oligonukleotidų pradmenys:

1. Sintetinant SeV *N* geną raiškai mielėse *S.cerevisiae*:

5' – CAACTAGTACAATGGCTGGATTGTTGAGCACC

3' – GTACTAGTTTAGATTCTCTACCCAGCT

2. Sintetinant hPIV1 *N* geną raiškai mielėse *S.cerevisiae*:

5' – AACTAGTACAATGGCAGGTCTACTAAGTACT

3' – AGTACTAGTTTAAATTCCTCCTATCCCTGCAGCCGC

3. Sintetinant hPIV3 *N* geną raiškai mielėse *S.cerevisiae*:

5' – TATTCTAGAACAATGTTGAGCCTATTTGATACATTTA

3' – TTGTCTAGATTAGTTGCTTCCAAATGCATTAACAGA

4. Sintetinant hRSV *N* geną raiškai mielėse *S.cerevisiae*:

5' – GCACTAGTACAATGGCTCTTAGCAAAGTCAAGTTG

3' – TTTACTAGTTTAAAGCTCTACATCATTATCT

5. Sintetinant NiV *N* geną raiškai mielėse *S.cerevisiae*:

5' – AAACTAGTACAATGAGTGATATCTTTGAAGAG

3' – AAAACTAGTTTACACATCAGCTCTGACGAAATCT

6. Sintetinant HeV *N* geną raiškai mielėse *S.cerevisiae*:

5' – AGAACTAGTACAATGAGTGATATATTTGACGAG

3' – GATACTAGTTTACACGTCTGCTCTAACAAAG

7. Sintetinant MenV *N* geną raiškai mielėse *S.cerevisiae*:

5' – TTACTAGTACAATGGCCACACTTTTAAGGAGC

3' – ACATCTAGAAATGATACTTGGGC

8. Sintetinant NiV-*N*_(N1-399) geną raiškai mielėse *S.cerevisiae*:

5' – AAAACTAGTACAATGAGTGATATCTTTGAAGAG

3' – AAAACTAGTTTATGTTTCCTGAACTGCAGCAGCG

9. Sintetinant HeV-*N*_(N1-399) geną raiškai mielėse *S.cerevisiae*:

5' – AGAACTAGTACAATGAGTGATATATTTGACGAG

3' – GTACTAGTTTAGATTCTCTACCCAGCT

10. Sintetinant MenV-*N*_(N1-399) geną raiškai mielėse *S.cerevisiae*:

5' – TTACTAGTACAATGGCCACACTTTTAAGGAGC

3' – AGATCTAGATTAGGTGACTGCTGCTGACATATCC

11. Sintetinant MenV-*N*_(C6His) geną raiškai mielėse *S.cerevisiae*:

5' – TTACTAGTACAATGGCCACACTTTTAAGGAGC

3' – GTTATTAGTAGTCTAGATTAGTGATGGTGATGGTGATGCAT

12. Sintetinant MenV-*N*_(N1-400+C6His) geną raiškai mielėse *S.cerevisiae*:

5' – TTACTAGTACAATGGCCACACTTTTAAGGAGC

3' – GTTATTAGTAGTCTAGATTAGTGATGGTGATGGTGATGTCT

13. Sintetinant MenV-*N*_(N1-430+C6His) geną raiškai mielėse *S.cerevisiae*:

5' – TTACTAGTACAATGGCCACACTTTTAAGGAGC

3' – GTTATTAGTAGTCTAGATTAGTGATGGTGATGGTGATGATT

14. Sintetinant MenV-*N*_(N1-460+C6His) geną raiškai mielėse *S.cerevisiae*:

5' – TTACTAGTACAATGGCCACACTTTTAAGGAGC

3' – GTTATTAGTAGTCTAGATTAGTGATGGTGATGGTGATGGGG

15. Sintetinant *MenV-N*_(N1-490+C6His) geną raiškai mielėse *S.cerevisiae*:

5' – TTACTAGTACAATGGCCACACTTTTAAGGAGC

3' – GTTATTAGTAGTCTAGATTAGTGATGGTGATGGTGATGCC

16. Sintetinant *TyV-N*_(N1-400) koduojančią DNR seką klonavimui *E.coli* bakterijose:

5' – TTACTAGTACAATGGCCACACTTTTAAGGAGC

3' – TTACTAGTTTAATGCATTGCAATCTCTGAAACAAGC

17. Sintetinant *hRSV-N*_(C275-392) koduojančią DNR seką klonavimui *E.coli* bakterijose:

5' – AGTTATGCATGCTAGTGTGCAAGCA

3' – TTTACTAGTTTAAAGCTCTACATCATTATCT

18. Sintetinant chimerinį *N*_(TyV-N-N1-400+hRSV-N-C275-392) geną raiškai mielėse *S.cerevisiae*:

5' – TTACTAGTACAATGGCCACACTTTTAAGGAGC

3' – TTTACTAGTTTAAAGCTCTACATCATTATCT

Oligonukleotidų pradmenys DNR sekos nustatymui

1. Į *pFGG3* plazmide įklonuotos sekos nustatymui skirti *GAL7* geno promotoriaus ir transkripcijos terminatoriaus pradmenys:

GAL7P – ATTATGCAGAGCATCAACATG

GAL7T – GTCTTTGTAGATAATGAATCTG

2. Į *pBluescript* plazmide įklonuotos sekos nustatymui skirti pradmenys:

M13/pUC-22-mer – GCCAGGGTTTTCCCAGTCACGA

M13/pUC-24-mer – GAGCGGATAACAATTCACACAGG

2.1.4. Bakterijų ir mielių terpės, ląstelių auginimo sąlygos

LB terpė (Sambrook ir kt., 1989)

1 % peptonas

0.5 % mielių ekstraktas

0.75 % NaCl

<u>Agarizuota LB terpė</u> (Sambrook ir kt., 1989)	2 % agaras
	1 % peptonas
	0.5 % mielių ekstraktas
	0.75 % NaCl
<u>MEPD terpė</u> (Guthrie ir Fink, 1991)	2 % gliukozė
	2 % peptonas
	1 % mielių ekstraktas
<u>Agarizuota MEPD terpė</u> (Guthrie ir Fink, 1991)	2 % agaras
	2 % gliukozė
	2 % peptonas
	1 % mielių ekstraktas
<u>MEPG terpė</u> (Guthrie ir Fink, 1991)	2.5 % galaktozė
	2 % peptonas
	1 % mielių ekstraktas
<u>Agarizuota MEPG terpė</u> (Guthrie ir Fink, 1991)	2 % agaras
	2 % galaktozė
	2 % peptonas
	1 % mielių ekstraktas

E.coli ląstelės buvo auginamos agarizuotoje arba skystoje terpėje 37°C temperatūroje. Bakterinių transformantų atrankai ir auginimui į terpes buvo pridedama 50 µg/ml ampicilino. Mielių ląstelės buvo auginamos agarizuotoje arba skystoje terpėje 28-30°C temperatūroje. *S.cerevisiae* transformantų atrankai ir biomasės auginimui į agarizuotą bei skystą MEPD terpes buvo pridedama po 0.0125 % formaldehido.

2.1.5. Bakterijų, mielių kamienai ir plazmidės

Plazmidžių konstravimui naudoti *Escherichia coli* kamienas *DH5α* (*F-gyrA96 (Nal^r) recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17 (rk-mk+) glnV44 deoR Δ(lacZYA-argF)U169 [φ80dΔ(lacZ)M15]*).

Transformantų gavimui naudoti mielių *Saccharomyces cerevisiae* kamienai: *AH 22-214 (a ura3 leu2 his3)*, *214Δpep4 (a ura3 leu2 his3 Δpep4)* ir *FH4 (α/α)*.

Plazmidės:

pSeV(+)-V-C365R – vektorius su klonuotu SeV *N* genu (Huang ir kt., 2000)

pFastBacHT-NiV – vektorius su klonuotu NiV *N* genu (Chua ir kt., 2000)

pFastBacHT-HeN – vektorius su klonuotu HeV *N* genu (Wang ir kt., 2000)

pCR4-TOPO-MenV-N7 – vektorius su klonuotu MenV *N* genu (Bowden ir kt., 2001)

pFGG3 – mielių *S.cerevisiae* svetimų baltymų sintezės vektorius (Slibinskas ir kt., 2004)

pBluescript II KS(+) – klonavimo vektorius, ApR; *ColE1* replikonas (Alting-Mees ir Short, 1989)

pBluescript II KS(-) – klonavimo vektorius, ApR; *ColE1* replikonas (Alting-Mees ir Short, 1989)

2.2. METODAI

2.2.1. DNR padauginimas PGR metodu

Polimerazinės grandininės reakcijos mišiniai sudaryti pagal gamintojo rekomendacijas (UAB “Fermentas”, 2004-2005) su 2.5 mM MgSO₄ koncentracija galutiniame mišinyje. Dauginant *N* genus, skirtus raiškai mielėse *S.cerevisiae*, buvo naudota Pfu DNR polimerazė (UAB “Fermentas”). PGR vykdyta "Eppendorf Mastercycler" DNR amplifikatoriuje gamintojo

rekomenduotomis sąlygomis (UAB „Fermentas“), atliekant 30 amplifikacijos ciklą ir parenkant pradmenų prisijungimo temperatūrą atsižvelgus į konkrečiu atveju naudotus pradmenis.

2.2.2. DNR elektroforezė agarozės gelyje

DNR elektroforezė buvo atliekama 0.8-1.4 % agarozės, ištirpintos TAE buferyje (0.04 M Tris-acetato ir 0.2 mM EDTA), geliuose su 0.1 µg/ml etidžio bromidu, naudojant horizontalias agarozės plokšteles ir veikiant 10 V/cm stiprumo įtampa. Elektroforezės aparato talpa taip pat buvo užpildoma TAE buferiu. Pasibaigus elektroforetiniam frakcionavimui geliai buvo analizuojami transiluminatoriaus "Fotodyne" UV šviesoje (Sambrook ir kt., 2001).

2.2.3. DNR fragmentų išskyrimas iš agarozės gelio

Šiam tikslui ruošiant agarozės gelį naudojamos plačius takelius formuojančios šukos. Į vieną ar kelis takelius įnešamas DNR fragmentų mišinys (5-20 µg DNR į vieną takelį). Į gretimus takelius įnešami DNR fragmentų ilgio standartai. Po elektroforezės UV šviesoje gelyje pažymima vieta, kurioje išsidėstęs reikiamo dydžio fragmentas. Išpjauta agarozės juostelė su DNR fragmentu susmulkinama ir patalpinama į „Eppendorf“ firmos mikrocentrifugos mėgintuvėlį. DNR fragmentai iš agarozės gelio buvo išskiriami naudojant „Amresco“ agarozės gelio ekstrahavimo rinkinį K220–50RXN gamintojo rekomenduotomis sąlygomis (Amresco, JAV).

2.2.4. Plazmidinės DNR skyrimas iš *E.coli* ląstelių

Plazmidinė DNR buvo skiriama šarminės lizės metodu. Priklausomai nuo eksperimento tikslo buvo naudojamos įvairios šio metodo modifikacijos.

Plazmidinių DNR minipreparatų ruošimas

Šis metodas naudojamas norint atlikti plazmidžių restrikcinę analizę.

Plazmidiniai DNR minipreparatai buvo paruošti naudojant UAB „Fermento“ „GeneJET™ Plazmid Miniprep Kit“ rinkinį gamintojo rekomenduotomis sąlygomis (UAB „Fermentas“).

Plazmidinių DNR midipreparatų ruošimas

Šis metodas naudojamas norint išskirti didesnį kiekį plazmidinės DNR.

Tiriama kolonija užsėjama į 200 ml skystos LB terpės su ampicilinu, auginama per naktį, maišant purtyklėje 200 aps/min greičiu 37°C temperatūroje. Centrifuguojama 5 min 1600 x g atitinkančia išcentrine jėga 0°C temperatūroje. Supernatantas nupilamas, ląstelės suspenduojamos 20 ml distiliuoto vandens. Prie gautos ląstelių suspensijos pridėjus 2 tūrius 0.2 N NaOH – 1 % NDS tirpalo, mišinys švelniai sumaišomas, 5 min laikomas kambario temperatūroje. Po to pridedama 1.5 tūrio 3 M NaAc tirpalo (pH 4.8). Gerai sumaišoma, palaikoma 0.5-1 val 4°C temperatūros šaldytuve ir centrifuguojama 15-25 min 8.000 x g atitinkančia išcentrine jėga 0°C temperatūroje. DNR iš supernatanto išsodinama pridėnant lygų tūrį izopropanolio. Centrifuguojama 20 min 8000 aps/min greičiu. Nuosėdos ištirpinamos 4 ml vandens. Po to pridedama 0.5 tūrio 12 M LiCl tirpalo, laikoma 0.5-1 val 4°C temperatūroje. Centrifuguojama 10 min 10.000 x g atitinkančia išcentrine jėga. Plazmidinė DNR iš supernatanto išsodinama 0.65 tūrio izopropanolio. Centrifuguojama 10 min 2500 aps/min greičiu. Nuosėdos praplaunamos 70 % etanoliu, tirpinamos 400 µl vandens, į kurį įdedama 4 µl 10 mg/ml RNazės. Laikoma 20 min 37°C temperatūros termostate. Po to užpilama lygiu tūriu fenolio–chloroformo mišiniu. Gerai sumaišoma ir centrifuguojama 3 min 12.000 x g atitinkančia išcentrine jėga. Vandeningą fazę nusiurbiamą, pridedama 1/10 tūrio 3 M NaAc tirpalo (pH 5.2) ir 2 tūriai 96 % etanolio. Gerai sumaišius laikoma 20 min –70°C temperatūros šaldytuve ir centrifuguojama 10 min 12.000 x g atitinkančia išcentrine jėga. DNR nuosėdos

porą kartų praplaunamos 70 % etanoliu, išdžiovinamos ir ištirpinamos dejonizuotame vandenyje (Sambrook ir kt., 2001).

2.2.5. DNR hidrolizė restrikcijos endonukleazėmis

DNR hidrolizė vykdoma optimaliomis (buferiniai tirpalai bei inkubacijos temperatūra buvo parenkami pagal gamintojo rekomendacijas) kiekvienai restrikcijos endonukleazei sąlygomis (UAB „Fermentas“). 1 µg DNR hidrolizuoti imami 1-2 restrikcijos endonukleazės aktyvumo vienetai ir reakcijos mišinys inkubuojamas 1-2 val. Po inkubacijos, reakcijos mišinį naudojant elektroforetiniam DNR frakcionavimui, į 10 µl mėginį būdavo pridėdama 1 µl dažo (0.04 % bromfenolio mėlio, 0.04 % ksilolcianolio, 30 % glicerino). Jei restrikcijos endonukleaze paveikta DNR buvo naudojama kitose fermentinėse reakcijose, reakcijos mišinys buvo ekstrahuojamas fenolio–chloroformo mišiniu ir išsodinamas etilo alkoholiu.

2.3.6. DNR 5` fosforo grupės pašalinimas

DNR 5` fosforo grupės pašalinimui buvo naudojama šarminė fosfatazė išskirta iš veršiuko žarnų (CIAP). Reakcija vykdoma gamintojo rekomenduotomis sąlygomis (UAB „Fermentas“). Po reakcijos mišinys buvo ekstrahuojamas fenolio-chloroformo mišiniu ir išsodinamas etilo alkoholiu.

2.3.7. DNR ligavimas

DNR ligavimo reakcija buvo vykdoma ligavimo buferyje 2 val 25°C temperatūroje arba per naktį 4°C temperatūroje, pridėjus 1-5 vnt T4 DNR ligazės (UAB „Fermentas“). Vektoriaus ir DNR fragmentų santykis ligavimo mišinyje 1:4. Įvykus reakcijai, ligavimo mišiniu (T4 DNR polimerazė inaktyvuojama laikant 10 min 65°C temperatūroje) transformuojamos kompetentinės *E.coli* ląstelės.

2.2.8. *E.coli* kompetentinių ląstelių paruošimas

E.coli kolonija inkubuojama per naktį 5 ml LB terpės 37°C temperatūroje, purtant 200 rpm 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 550 nm bangos ilgio) tomis pačiomis sąlygomis. Auginimą nutraukus visos tolesnės procedūros atliekamos ledo vonioje. Ląstelės surenkamos centrifuguojant 10 min 800 x g atitinkančia išcentrine jėga. Supernatantas nupilamas, ląstelės suspenduojamos 5 ml I tirpalo (100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM Tris-HCl, pH 7.5-8) ir vėl centrifuguojama tomis pačiomis sąlygomis. Supernatantas nupilamas, ląstelės suspenduojamos 2.5 ml II tirpalo (100 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, 5 mM Tris-HCl, pH 7.5-8) ir ši suspensija laikoma 0.5-1 valandą. Po to ląstelės centrifuguojamos tomis pačiomis sąlygomis. Supernatantas nupilamas, ląstelės suspenduojamos 1/15 pradinio tūrio II tirpalo ir naudojamos transformacijai.

2.2.9. *E.coli* kompetentinių ląstelių transformacija

Vykdam transformaciją vienam mėginiui imama 200 µl kompetentinės kultūros ir 1-5 µg ligavimo mišinio DNR (20 µl ligavimo mišinio) arba 0.04-0.1 µg natyvių plazmidžių DNR. Kompetentinių ląstelių ir DNR mišinys 30 min laikomas lede, po to pernešamas į 42°C temperatūros vandens vonią ir inkubuojamas 1.5 min, vėliau 1-2 min laikomas lede. Po to DNR ir ląstelių mišinys užpilamas 1 ml LB terpės ir 1 val inkubuojamas 37°C temperatūroje. Ląstelės nusodinamos centrifuguojant 5 min 1600 x g atitinkančia išcentrine jėga ir išsėjamos ant agarizuotos LB terpės su ampicilinu. Lėkštelės inkubuojamos 37°C temperatūroje per naktį.

2.2.10. Mielių *Saccharomyces cerevisiae* transformacija plazmidine DNR ir transformuotų mielių ląstelių užšaldymas ilgalaikiam saugojimui

Į 5 ml MEPD terpės užsėjamas mielių kamienas, kuris bus naudojamas transformacijai. Auginama per naktį 30°C temperatūros kratytuve. Kultūra skiedžiama ta pačia terpe ir inkubuojama 30°C temperatūros kratytuve iki optinio tankio 1-1.5 (bangos ilgis 600 nm). Ląstelės centrifuguojamos 5 min 800 x g atitinkančia išcentrine jėga. Plaunamos 5 ml TE (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.5) buferio ir vėl nucentrifuguojamos tomis pačiomis sąlygomis. Ląstelės suspenduojamos 3 ml 0.1 M LiCl (ištirpinto TE buferyje) tirpalo ir inkubuojamos 1 val 30°C temperatūroje. Po to nusodinamos centrifuguojant 5 min 800 x g atitinkančia išcentrine jėga ir suspenduojamos 100 µl 0.1 M LiCl tirpalo.

Transformacijai naudojama 15 µl aukščiau aprašytu būdu gautų kompetentinių ląstelių ir 5 µl plazmidinės DNR. Mišinys inkubuojamas 30 min 25-30°C temperatūroje. Po to pridedama 2 tūriai 50 % PEG-4000 (TE buferyje), inkubuojama 1 val 30°C temperatūroje, 20 min laikoma 42°C temperatūroje. Tada mišinys užpilamas 1 ml MEPD terpės ir inkubuojama per naktį 30°C temperatūros termostate. Po 12-16 val inkubacijos į terpę pridedama vandeniu praskiesto formaldehido tirpalo, iki 0.0125 % galutinės jo koncentracijos. Inkubuojama 2-3 val Tada ląstelės nusodinamos 6 sekundes centrifuguojant stalinėje mikrofugoje ir išsėjamos ant agarizuotos MEPD terpės su 0.0125 % formaldehido. Po dviejų dienų išaugę transformantų kolonijos persėjamos ant MEPD terpės su 0.025 % formaldehido. Tolesnei analizei imami tik gerai šioje terpėje augantys transformantai.

Gauti patikrinti mielių transformantai užšaldomi ilgalaikiam saugojimui MEPD terpėje su glicerinu. Tuo tikslu *S.cerevisiae* transformantų kolonija per naktį auginama 5 ml MEPD terpės su formaldehidu 30°C temperatūros kratytuve iki 6-10 optinio tankio vienetų (esant 600 nm bangos ilgiui), tada

ląstelės centrifuguojamos 5 min 800 x g atitinkančia išcentrine jėga ir suspenduojamos 1 ml MEPD terpės su 18 % glicerino. Gauta suspensija nedelsiant užšaldoma –70°C temperatūroje ir saugoma.

2.2.11. *S.cerevisiae* transformantų auginimas ir indukcija

S.cerevisiae transformantai auginami 24 val 30°C temperatūroje, purtant kratytuve 250 rpm greičiu, skystoje MEPD terpėje su formaldehidu. Ląstelės atskiriamos nuo terpės centrifuguojant 5 min 800 x g atitinkančia išcentrine jėga ir suspenduojamos indukuojančioje terpėje MEPG su tokia pat 0.0125 % formaldehido koncentracija. Indukcija, palaikant tokias pat inkubacijos sąlygas, vykdoma 24 val Tada ląstelės vėl nucentrifuguojamos taip pat, gautos biomasės užšaldomos ir ardamos iškart arba koncentruojamos ilgesniam laikui –70°C temperatūroje.

2.2.12. Suardytų mielių ląstelių suspensijos paruošimas ir tiriamų baltymų sintezės lygio nustatymas

Indukuotos mielių ląstelės surenkamos 5 min centrifuguojant 800 x g atitinkančia išcentrine jėga. Supernatantas nupilamas, ląstelės suspenduojamos vandenyje ir centrifuguojamos taip pat. Supernatantas nupilamas, centrifuguojama 30 sek. Ląstelių biomasė pasveriami ir įdedama į ledo vonią, užpilama ardymo tirpalu (AT – 50 mM natrio fosfatas, pH 7.4, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF [fenilmetilsulfonyl fluoridas – proteazių inhibitorius]), ardymo tirpalo/ląstelių svorio santykis 10:1, ląstelės suspenduojamos. Pridedami stiklo rutuliukai. Bandymams naudotos drėgnos mielių biomasės ir stiklo rutuliukų svorių santykis – 1:2. 1 min ardoma intensyviai purtant ant kratyklės, 1 min šaldoma ledo vonioje. Atliekami 8 tokie ciklai. Tada į mėgintuvėlį pridedamas 2 x NDS-PAGE pavyzdžių buferio (2.2.16.) tūris, lygus naudoto ardymo buferio tūriui. Gerai sumaišius mėgintuvėlis iš ledo vonios iškart perkeliamas į 100°C temperatūrą ir

inkubuojama 10 min Taip paruošti mėginiai frakcionuojami NDS-PAGE metodu (2.2.17.).

N baltymų kiekis suardytoje mielių ląstelių suspensijoje (SLS) nustatytomas lyginant N baltymo kiekį SLS su žinomomis išgryninto N baltymo koncentracijomis baltymų imunoblotingo metodu (2.2.18.) naudojant specifinius N baltymui antikūnus. N baltymo kiekis SLS apskaičiuojamas naudojant vaizdo analizės programą ImageQuantTM TL (GE Healthcare, JAV). Apskaičiuotas N baltymo kiekį padalinamas iš bendro SLS baltymų kiekio, nustatyto Bradford metodu (2.2.15.), ir gautą reikšmę padauginus iš 100 % apskaičiuojamas santykinis N baltymo kiekis. Trijuose identiška paruoštuose mėginiuose suskaičiuojamas santykinis N baltymo kiekis, šio kiekio vidurkis ir standartinis nuokrypis.

2.2.13. Baltymų gryninimas centrifuguojant per 30 % sacharozės tirpalo sluoksnį ir cezio chlorido tankio gradiente

Visi veiksmai atliekami šaldant mielių ląsteles ledo vonioje. Ląstelių biomasė suspenduojama užpylus du tūrius AT, pridedama 2 tūriai stiklo rutuliukų. 1 min ardoma intensyviai purtant ant kratyklės, 1 min šaldoma ledo vonioje. Atliekami 8 tokie ciklai. Tada suardyta mielių ląstelių suspensija 20 min nucentrifuguojama 10.000 x g atitinkančia išcentrine jėga (Beckman centrifuga, JA-14 rotoriuje, 12.000 aps/min) 0°C temperatūroje, supernatantas – tirpių baltymų frakcija – surenkamas.

Tirpių baltymų frakcija (TBF) patalpinama virš 30% sacharozės tirpalo (ištirpintos ardymo tirpale) sliuoksnio ultracentrifuginiame mėgintuvėlyje. Sacharozės tirpalo sluoksnis ir virš jo patalpinta TBF frakcija 3 val centrifuguojama 100.000 x g atitinkančia išcentrine jėga (Beckman-Coulter ultracentrifuga, Ti60 rotoriuje, 38.000 aps/min) 0°C temperatūroje. Nucentrifugavus gautos baltyminės nuosėdos ištirpinamos ardymo tirpale (bandymui naudotos biomasės svorio ir AT tūrio santykis – 1:4).

Toliau sacharozės sluoksnį įveikę N baltymai centrifuguojami iš skirtingos koncentracijos CsCl tirpalo sluoksnių (1.38; 1.35; 1.32; 1.29; 1.26 g/ml AT) suformuotame tankio gradiente. CsCl tirpalo sluoksniai ir virš jų patalpinti sacharozės sluoksnį įveikę N baltymai 36 val centrifuguojami $100.000 \times g$ atitinkančia išcentrine jėga (Beckman-Coulter ultracentrifuga, Ti60 rotorijoje, 38.000 aps/min) 0°C temperatūroje. Po šio gryninimo žingsnio surenkamos 1 ml tūrio CsCl tirpalo frakcijos ir išmatuojamas jų tankis.

2.2.14. vNPD plūduriavimo tankio nustatymas

Virusinių baltymų sudaromų vNPD plūduriavimo tankis CsCl gradiente buvo nustatomas refraktometru, matuojant CsCl frakcijų su didžiausiomis vNPD koncentracijomis tankį dejonizuoto vandens atžvilgiu ir išvedant tų frakcijų tankių vidurkį. Visais tirtų N baltymų atvejais vNPD plūduriavimo tankis buvo nustatomas keleto (trijų arba daugiau) nepriklausomų baltymų gryninimo procedūrų metu. Atlikus tris nepriklausomus bandymus apskaičiuojamas vNPD plūduriavimo tankio vidurkis ir standartinis nuokrypis.

2.2.15. Baltymų koncentracijos nustatymas

Baltymų koncentracija buvo nustatoma Bradford metodu (Bradford 1976). Metodas pagrįstas baltymų sugebėjimu sudaryti kompleksus su Kumasi briliantiniu mėliu G. Kompleksų koncentracija nustatoma spektrofotometriškai (bangos ilgis 595 nm). Tiriama baltymo koncentracija nustatyta pagal kalibracinę kreivę, sudaromą iš žinomų BSA baltymo koncentracijų ir išmatuotų jų optinių tankių.

2.2.16. Baltymų mėginių paruošimas NDS-PAGE

Ruošiant mėginius, SLS arba bet kurios gautos skiriant baltymus frakcijos mėginys maišomas su $2 \times$ NDS-PAGE pavyzdžių buferiu (0.125 M Tris-HCl, pH 6,8, 4 % NDS, 0.02 % bromfenolio mėlynojo, 20 % glicerino ir 2 % 2-

merkptoetanolio) santykiu 1:1. Mėginiai 10 min virinami 100°C temperatūroje.

2.2.17. Baltymų elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje

Elektroforezei naudojamas 12 % skirstomasis poliakrilamido gelis (12 % akrilamido/N,N'-metilenbisakrilamido 30:0.8, 0.375 M Tris-HCl, pH 8.8, 0.1 % NDS, 0.1 % amonio persulfato ir 0.001 % TEMED), ir mažos koncentracijos koncentruojantis gelis (4 % akrilamido/N,N'-metilenbisakrilamido 30:0.8, 0.125 M Tris-HCl, pH 6.8, 0.1 % NDS, 0.1 % amonio persulfato ir 0.001 % TEMED). Elektroforezei naudojamas Tris-glicino/SDS elektroforezės buferis (0.3 % Tris, 1.44 % glicinas ir 0.1 % NDS). Ji atliekama vertikalios elektroforezės aparate, palaikant tokius maksimalius ribojančius parametrus: 60 mA nuolatinės srovės stiprį ir 200 V įtampą.

Po elektroforezės gelis dažomas Kumasi mėliu (40 % etanolis, 0.1 % Coomassie Brilliant Blue R-250, 10 % acto rūgštis) 30 min švelniai purtant, po to 2 kartus po 1 val tokiomis pat sąlygom plaunamas blukinančiu tirpalu (5 % acto rūgštis, 10 % etanolis).

2.2.18. Baltymų imunoblotingas

Atliekant baltymų imunoblotingą (BIB) baltymai iš pradžių išfrakcionuojami 10 % koncentracijos PAA gelyje (sudėtis tokia pat, kaip ir aprašyto 2.2.17. skyrelyje, tik akrilamido/N,N'-metilenbisakrilamido 30:0.8 koncentracija yra 10 %) elektroforezės būdu, palaikant 2.2.17. suminėtas sąlygas. Apytiksliai tiriamų baltymų dydžiui nustatyti kartu frakcionuojami nudažytų baltymų molekulinio svorio standartai (pagaminti UAB "Fermentas"). Po elektroforezės PAA gelis įmerkiamas į baltymų pernešimo buferį (10 % metanolis, 150 mM glicinas, 25 mM Tris-HCl, pH 8.3), ten pat įdedama ir forma bei dydžiu gelį atitinkanti nitroceliuliozinės "Hybond-ECL" tipo membranos atraiža. Laikoma 10 min. Tada atliekamas pussausis

išfrakcionuotų baltymų pernešimas ant nitroceliuliozinės membranos. Ant baltymų pernešimo aparato ("Biometra") katodinio pado viena ant kitos sudedamos keturios pernešimo buferyje sušlapintos 1 mm storio gelio dydžio sugeriamo popieriaus atraižos. Ant jų dedama pernešimo buferyje pamirkyta nitroceliuliozinė membrana, ant kurios viršaus atsargiai užklojamas gelis su tiriamais baltymais. Ant šio sumuštinio viršaus vėl dedamos keturios tokio pat dydžio sušlapintos sugeriamo popieriaus atraižos. Viskas iš viršaus prislegiama anodiniu aparato padu ir 40 min vykdomas baltymų pernešimas iš gelio ant membranos, palaikant pastovią 12 V įtampą.

Po pernešimo membranoje su prisitvirtinusiis baltymais likęs "neužimtas" plotas 1 val kambario temperatūroje blokuojamas 5 % pieno miltelių, ištirpintų TTBS buferyje (0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 0.1 % Tween²⁰), tirpale. Trumpai praskalavus TTBS, membrana 1 val orbitaliniame hibridizatoriuje ("Biometra") 25°C temperatūroje plaunama su 0.1-0.2 ml/cm² tūrio reikiamai TTBS buferyje praskiestu pirminių antikūnų prieš tiriamą baltymą tirpalu (praskiedimą nurodo gamintojas). Neprisijungę pirminiai antikūnai nuo membranos atplaunami 3 kartus po 15 min inkubuojant su 1.5 ml/cm² tūrio TTBS buferiu tomis pat sąlygomis. Tada 1 val plaunama su TTBS praskiestu antrinių antikūnų, konjuguotų su krienų peroksidaze, tirpalu, kurio tūris ir praskiedimas toks pat kaip ir pirminių antikūnų atveju. Atplaunama taip pat, kaip ir nuo pirminių antikūnų. Prieš ryškirimą membrana dar 2 kartus po 5 min atplaunama 2 ml/cm² tūrio TBS buferiu (0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.6), kad būtų pašalintas į TTBS buferio sudėtį įeinantis Tween²⁰. Su antikūniais reaguojančių baltymų juostelės ant membranos išryškinamos vykstant krienų peroksidazės fermentinei reakcijai, kurios metu susidaro spalvoti junginiai. Darbe naudotas ryškalas su 4-chloro-1-naftolio substratu (15 mg 4-chloro-1-naftolio, 3 ml etanolio, 25 ml TBS, 20 µl 30 % H₂O₂, sudėtų išvardinta eilės tvarka) arba komercinis UAB "Fermentas" gamybos "TMB Blotting" ryškalas su 3,3',5,5'-tetrametilbenzidino (TMB) substratu.

2.2.19. Elektroninė mikroskopija

Tiriami mėginiai buvo užnešami ant anglimi padengto paladžio tinklelio su 400 akučių ir dažomi 2 % vandeniniu uranilacetato tirpalu. Tinkleliai su dažytais pavyzdžiais analizuojami elektroniniu mikroskopu JEM-100S.

2.2.20. Visos mielių ląstelės RNR išskyrimas

Visa mielių ląstelės RNR šiame darbe buvo išskirta rūgštaus fenolio metodu (Schmitt ir kt., 1990). Mielės *S.cerevisiae* užaugintos 5 ml MEPD terpės, indukuoti 5 ml MEPG terpės. Ląstelės išsodintos centrifuguojant 5 min 800 x g atitinkančia išcentrine jėga ir suspenduotos 400 µl AE buferio (50 mM natrio acetato, pH 5.3, 10 mM EDTA), suspensija perkeliama į Ependorf tipo mėgintuvėlį ir pridedama 40 µl 10 % NDS tirpalo. Sumaišius pridedamas lygus tūris rūgštaus fenolio (prisotinto AE buferiu iki pH 5.3), sumaišoma ir inkubuojama 65°C temperatūroje 4 min. Tada mišinys staigiai atšaldomas ledo vonioje ir inkubuojamas kol pasirodo fenolio kristalai (3-5 min). Centrifuguojama stalinėje centrifugoje 12.000 x g atitinkančia išcentrine jėga. Vandeninė fazė nusiurbama į kitą mėgintuvėlį ir ekstrahuojama fenolio-chloroformo (1:1) mišiniu kambario temperatūroje. Vandeninė fazė perkeliama į mėgintuvėlį, veiktą 0.1 % DEPC (dietilpirokarbonato) tirpalu, pridedama 1/10 tūrio 3 M natrio acetato (pH 5.3, veikto DEPC) tirpalo bei 2.5 tūrio etanolio, sumaišoma ir inkubuojama 2 val –70°C temperatūroje. RNR išsodinama centrifuguojant 10 min 16.000 x g atitinkančia išcentrine jėga 4°C temperatūroje, nuosėdos praplaunamos 80 % etanoliumi ir suspenduojamos 20 µl DEPC veikto vandens. Išskirta RNR laikoma užšaldyta –70°C temperatūroje.

2.2.21. RNR išskyrimas iš virusų nukleokapsidę primenančių darinių

100 µg išgrynintų iš N baltymų suformuotų virusų nukleokapsidę primenančių dalelių (vNPD) ištirpinta 500 µl fosfatinio buferio (50 mM natrio fosfatas, pH 7.4, 1 mM EDTA). Padalinus ištirpintas vNPD į dvi lygias dalis, viena dalis buvo inkubuojama 37°C temperatūroje 20 min, esant 10 µg/ml DNazės I koncentracijai, o kita – 10 µg/ml RNazės A koncentracijai. Po inkubacijos į abu mėginius buvo pridedama 1/10 tūrio 10 % SDS tirpalo ir lygus tūris rūgštaus fenolio bei inkubuojama 4 min 65°C temperatūroje, o po to 5 min 0°C temperatūroje. Tada abu mėginiai centrifuguojami 3 min stalinėje centrifugoje kambario temperatūroje maksimaliu greičiu. Toliau visi išskyrimo etapai vykdomi naudojant tik 0.1 % DEPC apdorotus antgalius, ependorfus, vandenį ir kitus reikmenis, turėsiančius sąlytį su tiriamu mėginiu. Supernatantas nusiurbiamas, į jį pridedama 1/10 tūrio 3 M natrio acetato (pH 5.3), 2.5 tūrio etanolio bei 20 µg/ml glikogeno ir sumaišius laikoma –70°C per naktį. RNR išsodinama centrifuguojant stalinėje centrifugoje 15 min 14.000 aps/min greičiu 4°C temperatūroje. Nuosėdos tirpinamos dejonizuotame vandenyje. Išskirta RNR laikoma užšaldyta –70°C temperatūroje. Prieš analizę į mėginius buvo pridedama 1/10 tūrio 10 × DNazės I buferio (UAB „Fermentas“) ir 10 µg/ml DNazės I koncentracija arba 10 µg/ml RNazės A koncentracija ir inkubuojama 20 min 37°C temperatūroje.

2.2.22. RNR elektroforezė agarozės gelyje su formaldehidu

Prieš elektroforezę analizuojami išskirtos RNR mėginiai buvo maišomi lygiomis dalimis su 2 × RNR pavyzdžių buferiu (UAB „Fermentas“), turinčiu 95 % formamido ir 0.025 % etidžio bromido. Tada RNR denatūruojama 70°C temperatūroje 5 min ir atšaldoma ledo vonioje. Taip paruošti mėginiai frakcionuojami agarozės gelyje su formaldehidu (1-1.5 % agarozės ir 2.2 M formaldehido MOPS buferyje), (Sambrook ir Russell 2001)

rekomenduojamomis sąlygomis. Elektroforezė vykdoma 4-5 val MOPS buferyje (0.2 M MOPS (3-[N-morpholino]propansulfoninė rūgštis), pH 7.0, 20 mM natrio acetato ir 10 mM EDTA, pH 8.0), palaikant 5 V/cm elektrinio lauko stiprumą. Po elektroforezės gelis analizuojamas transiliuminatoriaus ("Fotodyne") UV šviesoje.

2.2.23. RNR hibridizacija su radioaktyviu zonu

Atliekant RNR hibridizaciją buvo naudojami standartiniai protokolai (Sambrook ir Russell 2001). Agarozės gelyje su formaldehidu išfrakcionuota RNR buvo pernešama ant nailoninės membranos ir imobilizuojama UV šviesa. Tada atliekama hibridizacija su ^{32}P žymėta totaline mielių ląstelės RNR. Po hibridizacijos nailoninės membranos analizuotos autoradiografijos būdu, naudojant aparatą Phosphor-Imager (Amersham Biosciences), pagal gamintojo rekomendacijas.

3. DARBO REZULTATAI

Pagrindinis šio darbo tikslas buvo susintetinti *Paramyxoviridae* šeimos virusų nukleokapsidės (N) baltymus mielėse *S.cerevisiae* ir iširti, ar mielėse sintetinami šios šeimos virusų N baltymai formuoja virusų nukleokapsidę primenančias daleles (vNPD), ir ar šie baltymai tinka paramikso virusų infekcijų diagnostikai. Tokia pat tvarka išdėstyti ir šio darbo rezultatai: 3.1. skyriuje aprašant paramikso virusų N baltymų sintezę mielėse bei jų savybes, o 3.2. skyriuje – tyrimus, skirtus nustatyti, ar mielėse susintetinti baltymai tinka diagnostikai.

Šis darbas atliktas Biotechnologijos instituto Eukariotų genų inžinerijos skyriuje, bendradarbiaujant su to pačio instituto Imunologijos ir ląstelės biologijos skyriumi (vadovė A.Žvirblienė), Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Vaikų ligų klinika, Lietuvos AIDS centru, Hirosimos universiteto Biomedicinos mokslų aukštąja mokykla, Japonija (*angl. – Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, Japan*), de Salud Carlos III instituto Nacionaliniu mikrobiologijos centru (NMC), Ispanija, (*angl. – National Center of Microbiology, de Salud Carlos III Institute, Spain*) ir Australijos gyvūnų sveikatos priežiūros laboratorija (AGSPL), Australija (*angl. – Australian Animal Health Laboratory, Australia*).

3.1. *Paramyxoviridae* šeimos virusų nukleokapsidės baltymų sintezė mielėse *S.cerevisiae*

3.1.1. Mielių raiškos vektorių su nukleokapsidės baltymus koduojančiais genais konstravimas ir mielių transformacija

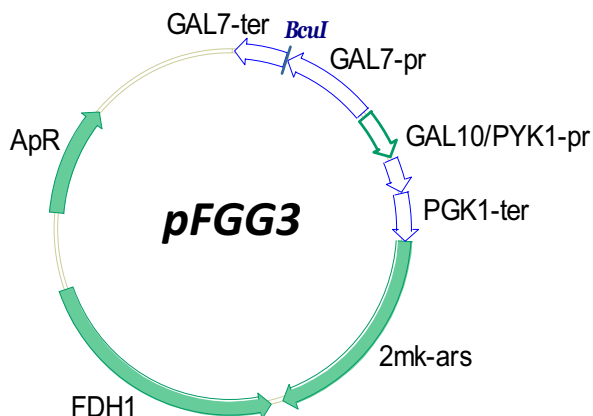
Sendai viruso (SeV) N baltymą koduojantis genas gautas plazmidėje *pSeV(+)-V-C365R* iš dr. T. Sakaguchi (Biomedicinos mokslų aukštoji mokykla, Hirosimos universitetas, Japonija) (Huang ir kt., 2000). Seka yra identiška SeV kamieno Z N geno sekai, įregistruotai GenBank duomenų bazėje. Sekos atpažinimo numeris – M30202.

1 ir 3 serotipų žmogaus paragripo virusų (hPIV1 ir hPIV3), taip pat žmogaus respiracinio sincitinio viruso (hRSV) *N* genai gauti iš dr. M. Coiras (NMC, de Salud Carlos III institutas, Ispanija). NMC šie genai padauginėti atvirkštinės transkripcijos ir polimerazine grandinine reakcijomis (AT-PGR), abi reakcijas atliekant vienu metu. Atvirkštinės transkripcijos reakcijoje pirmine seka naudotos virusų genomo RNR buvo išskirtos iš surinktų hPIV1, hPIV3 ir hRSV užsikrėtusių pacientų gerklės gleivinės mėginių. AT-PGR padauginėti *N* genai buvo klonuoti bakterinėje plazmidėje *pBluescript II KS(+)* naudojant Eco32I restrikcijos endonukleazės (RE) taikinį. Gautos plazmidės *pBlsc-hPIV-1-N*, *pBlsc-hPIV-3-N* ir *pBlsc-hRSV-N* panaudotos tolesniuose tyrimuose. Plazmidėse klonuotų genų nukleotidų sekos buvo nustatytos Biotechnologijos instituto Sekoskaitos centre ir, naudojant FASTA programą, palygintos su duomenų bazėse esančiomis sekomis. Palyginamoji analizė parodė, kad klonuoto hPIV1 *N* geno koduojama baltymo seka labiausiai sutampa su baltymų banko duomenų bazėje įregistruota hPIV1 kamieno C39 (99.046 % homologija, sekos atpažinimo numeris AAA46828.1) *N* baltymo seka. Klonuoto hPIV3 *N* geno koduojama baltymo seka labiausiai sutampa su baltymų banko duomenų bazėje įregistruota hPIV3 kamieno C-243 (98.123 % homologija, sekos atpažinimo numeris BAA32570.1) *N* baltymo seka, o hRSV *N* geno seka yra identiška hRSV kamieno A2 *N* geno sekai (sekos atpažinimo numeris X00001.1). Paramikso virusai, kaip ir dauguma RNR virusų, sparčiai kinta, todėl gautų genų nukleotidų sekos skyrėsi 1-2 % nuo genų banke esančių sekų. hPIV-1, hPIV-3 ir hRSV tirti *N* baltymus koduojantys genai gauti naudojant AT-PGR ir iš pacientų išskirtą virusų genomo RNR, todėl gautų *N* genų sekos galėjo turėti AT-PGR metu polimerazių padarytų klaidų. Siekiant išvengti tokių klaidų, buvo atlikta po tris nepriklausomus kiekvieno *N* geno klonavimo ir sekoskaitos eksperimentus. Įsitikinus, kad trijų nepriklausomų bandymų rezultatai sutampa, klonuotų hPIV1 ir hPIV3 *N* genų sekos buvo įregistruotos GenBank duomenų bazėje (atpažinimo numeriai EU346886.1 ir EU346887.1).

Nipah, Hendra ir Menangle virusų (NiV, HeV ir MenV) N baltymus koduojantys genai gauti plazmidėse *pFastBacHT-NiV*, *pFastBacHT-HeN* ir *pCR4-TOPO-MenV-N7* iš dr. W. P. Michalski (AGSPL, Australija) (Bowden ir kt., 2001; Chua ir kt., 2000; Wang ir kt., 2000). Sekos yra identiškos N genų sekoms, įregistruotoms GenBank duomenų bazėje. Sekų atpažinimo numeriai: NiV N geno – AF212302, HeV N geno – AF017149 ir MenV N geno – AF326114.

Paramikso virusų N baltymų sintezei mielėse *S.cerevisiae* tirti naudotas svetimų baltymų sintezei mielėse *S.cerevisiae* skirtas vektorius – plazmidė *pFGG3* (Slibinskas ir kt., 2004). Šis vektorius turi 2 μ m plazmidės fragmentą, kuris užtikrina vektoriaus autonominę replikaciją mielėse *S.cerevisiae*. Vektoriaus schema pateikta 13 paveiksle. *pFGG3* plazmidė replikuojasi tiek mielėse *S.cerevisiae*, tiek *E.coli* bakterijose. Mielėse replikaciją užtikrina jos turimas 2 μ m plazmidės fragmentas, turintis mielių *S.cerevisiae* replikacijos pradžios seką, o *E.coli* bakterijose – bakterijų vektoriaus *pIC19H* dalis, turinti *E.coli* plazmidės *ColE1 ORI* seką. Transformantų atrankai bakterijose naudojamas atsparumą ampicilinui suteikiantis *bla* genas, koduojantis β -laktamazę. Transformantų atrankai mielėse naudojamas *Candida maltosa* formaldehido dehidrogenazės genas *FDH1*, suteikiantis atsparumą formaldehidui (Sasnauskas ir kt., 1992). *pFGG3* plazmidė turi du galaktoze įjungiamus *GAL7* ir *GAL10/PYK1* genų promotorius, po kurių sekų galima įterpti tiriamą baltymą koduojančią DNR seką. Nors abu promotoriai yra panašiai įjungiami ir yra panašaus stiprumo, tačiau juos naudojant kartu vienoje svetimų baltymų genų raiškos sistemoje *GAL7* promotorius iš dalies slopina *GAL10/PYK1* promotoriaus aktyvumą. Taip yra, matyt, dėl transkripciją reguliuojančio Gal4p baltymo trūkumo, nes ląstelėje yra ribotas šio baltymo molekulių skaičius. Gal4p baltymas yra būtinas įjungiant abu promotorius, tačiau šis baltymas efektyviau jungiasi su *GAL7* promotoriaus reguliacine seka nei su analogiška seka *GAL10/PYK1* promotoriuje. Dėl šios priežasties *GAL7* promotoriui tenka didesnis Gal4p baltymo molekulių skaičius, todėl toje

pačioje ląstelėje *GAL7* veikia efektyviau nei *GAL10/PYK1*. Biotechnologijos instituto Eukariotų genų inžinerijos skyriuje dr. R. Slibinsko atlikti tyrimai parodė, kad efektyvesnė tymų ir kiaulytės virusų N baltymų genų raiška mielėse *S.cerevisiae* gaunama naudojant *pFGG3* plazmidės *GAL7* promotorių. Todėl šiame darbe paramikso virusų N baltymų sintezės mielėse tyrimams pasirinktas *GAL7* promotorius. 13 paveiksle pavaizduotoje *pFGG3* plazmidėje iš karto po *GAL7* promotoriaus sekos yra *GAL7* geno transkripcijos terminatorius, kurį žymi trumpinys *GAL7-ter*. Abi transkripcijos reguliacines sekas, promotorių ir transkripcijos terminatorių, skiria *BcuI* RE taikiny, kuris yra naudojamas tiriamą baltymą koduojančios DNR sekos klonavimui konstruojant raiškos vektorius.



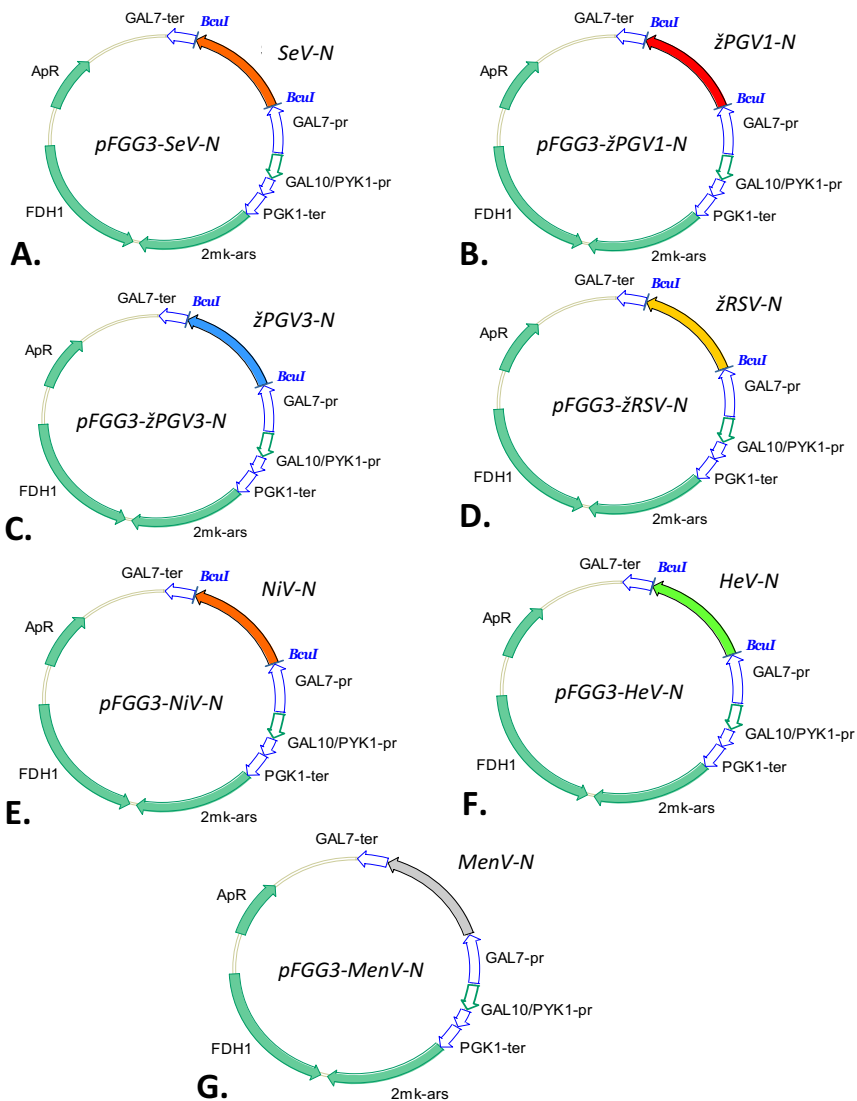
13 pav. Darbe naudoto svetimų baltymų sintezei mielėse *S.cerevisiae* skirto vektorius *pFGG3* schema. Sekų žymėjimai tokie: *ApR* – β-laktamazės genas, *FDH1* – formaldehido dehidrogenazės genas, *2mk-ars* – 2 μm mielių plazmidės fragmentas, *GAL7-pr* ir *GAL10/PYK1-pr* – galaktoze įjungiamų mielių *S.cerevisiae* genų promotoriai, *GAL7-ter* ir *PGK1-ter* – transkripcijos terminatorių sekos, *BcuI* – *BcuI* restrikcijos endonuklezės taikiny.

Siekiant sukonstruoti vektorius tiriamų paramikso virusų N baltymų sintezei mielėse *S.cerevisiae*, *pFGG3* plazmidė hidrolizuota *BcuI* RE. Po hidrolizės nuo susidariusių lipnių DNR galų veikiant šarminė fosfataze CIAP (angl. – *calf intestine alkaline phosphatase*) pašalinta fosfato grupė, tokiu būdu išvengiant vektoriaus susijungimo į pradinę žiedinę plazmidės formą

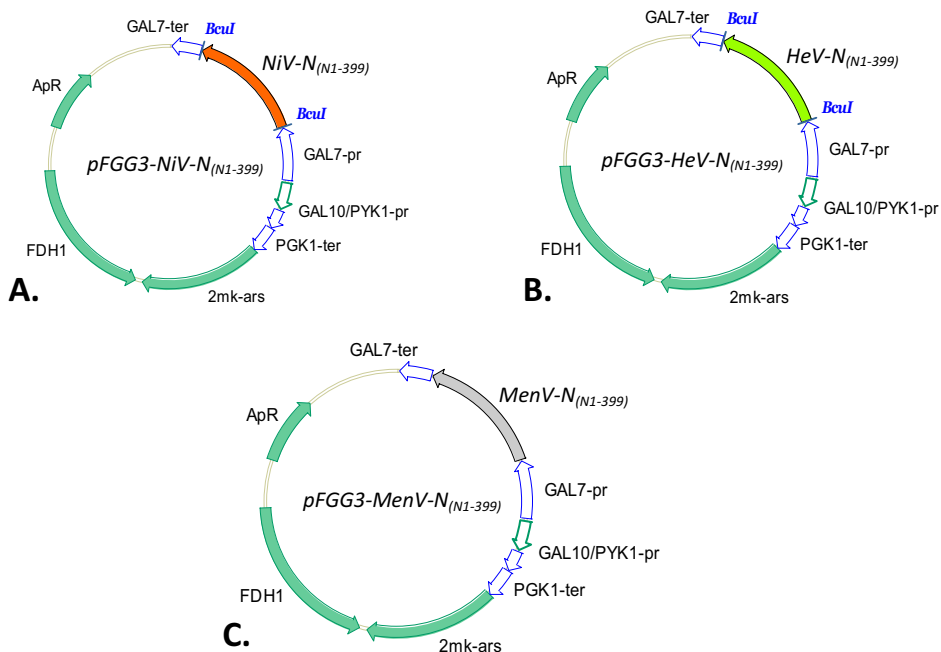
vėlesniame konstravimo etape. SeV, hPIV1, hPIV3, hRSV, NiV, HeV ir MenV N baltymus koduojančios DNR sekos buvo padaugintos polimerazinės grandininės reakcijos (PGR) metodu. Reakcijoje pirmine seka naudoti plazmidėse *pSeV(+)-V-C365R*, *pBlsc-hPIV1-N*, *pBlsc-hPIV3-N*, *pBlsc-hRSV-N*, *pFastBacHT-NiV*, *pFastBacHT-HeN* ir *pCR4-TOPO-MenV-N7* klonuoti N baltymų genai. Siekiant, kad PGR būtų kuo tikslesnė, ji atlikta su Pfu DNR polimeraze. Išskyrus MenV atvejį, naudojant specifinius PGR pradmenis dauginamų DNR sekų 5` ir 3` galuose buvo prijungiamas BcuI RE taikiny. Kadangi MenV N baltymo genas turi BcuI RE taikinį baltymą koduojančioje dalyje, dauginant šią DNR seką PGR naudotais pradmenimis 5` ir 3` galuose prijungtas XbaI RE taikiny. Šį taikinį hidrolizavus XbaI RE susidaro lipnūs dvigrandės DNR galai, identiški BcuI RE suformuojamiems lipniems galams. Padaugintos N baltymus koduojančios DNR sekos hidrolizuotos BcuI arba XbaI RE ir naudojant BcuI RE taikinį klonuotos *pFGG3* vektoriuje po galaktoze įjungiamo *GAL7* promotoriaus sekos. Gautos N baltymų sintezei mielėse *S.cerevisiae* skirtos plazmidės *pFGG3-SeV-N*, *pFGG3-hPIV1-N*, *pFGG3-hPIV3-N*, *pFGG3-hRSV-N*, *pFGG3-NiV-N*, *pFGG3-HeV-N* ir *pFGG3-MenV-N*. Šių plazmidžių schemas pateiktos 14 paveiksle. Klonuotų DNR fragmentų sekos buvo papildomai nustatytos Biotechnologijos instituto Sekoskaitos centre ir įsitikinta, kad šios sutampa su pirminėmis sekomis.

Siekiant ištirti kaip NiV, HeV ir MenV N baltymų C-dalis veikia šių baltymų gebėjimą formuoti nukleokapsidę primenančius darinius, šiame darbe sukonstruoti vektoriai skirti NiV, HeV ir MenV N baltymų be C-dalies sintezei mielėse *S.cerevisiae*. Šiam tikslui PGR padaugintos NiV, HeV ir MenV N baltymų N-dalį (1-399 ar.) koduojančios DNR sekos hidrolizuotos BcuI (NiV ir HeV atvejais) arba XbaI (MenV atveju) RE ir naudojant BcuI RE taikinį klonuotos *pFGG3* vektoriuje po galaktoze įjungiamo *GAL7* promotoriaus sekos. Plazmidėse *pFGG3-NiV-N*, *pFGG3-HeV-N* ir *pFGG3-MenV-N* klonuotos pilno ilgio N baltymus koduojančios DNR sekos PGR naudotos pirminėmis

sekomis. Gauti vektoriai *pFGG3-NiV-N_(N1-399)*, *pFGG3-HeV-N_(N1-399)* ir *pFGG3-MenV-N_(N1-399)*, kurių schemas pateiktos 15 paveiksle. Klonuotų DNR fragmentų sekos patikrintos Biotechnologijos instituto Sekoskaitos centre ir įsitikinta, kad šios sutampa su pirminėmis sekomis.



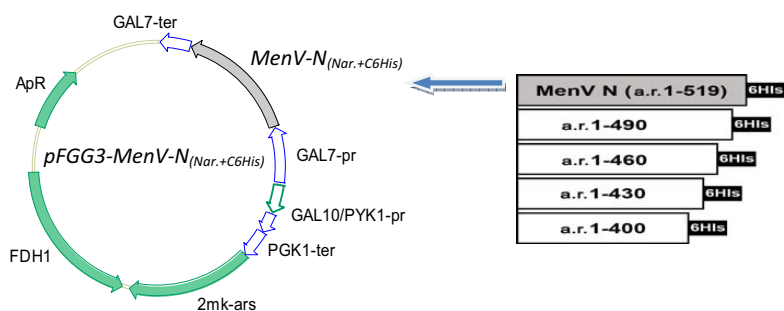
14 pav. Sukonstruotų paragripo virusų N baltymų sintezei mielėse *S.cerevisiae* skirtų vektorių schemas. **A.** SeV, **B.** hPIV1, **C.** hPIV3, **D.** hRSV, **E.** NiV, **F.** HeV ir **G.** MenV. Sekų žymėjimai tokie: *ApR* – β-laktamazės genas, *FDH1* – formaldehido dehidrogenazės genas, *2mk-ars* – 2 μm mielių plazmidės fragmentas, *GAL7-pr* ir *GAL10/PYK1-pr* – galaktoze įjungiamų mielių *S.cerevisiae* genų promotoriai, *GAL7-ter* ir *PGK1-ter* – transkripcijos terminatorių sekos, *BclI* – BclI restrikcijos endonukleazės taikiny.



15 pav. Sukonstruotų paragripo virusų N baltymų be C-dalies sintezei mielėse *S.cerevisiae* skirtų vektorių schemas. **A.** NiV, **B.** HeV ir **C.** MenV. Sekų žymėjimai tokie: *ApR* – β-laktamazės genas, *FDH1* – formaldehido dehidrogenazės genas, *2mk-ars* – 2 μm mielių plazmidės fragmentas, *GAL7-pr* ir *GAL10/PYK1-pr* – galaktoze įjungiamų mielių *S.cerevisiae* genų promotoriai, *GAL7-ter* ir *PGK1-ter* – transkripcijos terminatorių sekos, *BclI* – BclI restrikcijos endonuklezės taikiny.

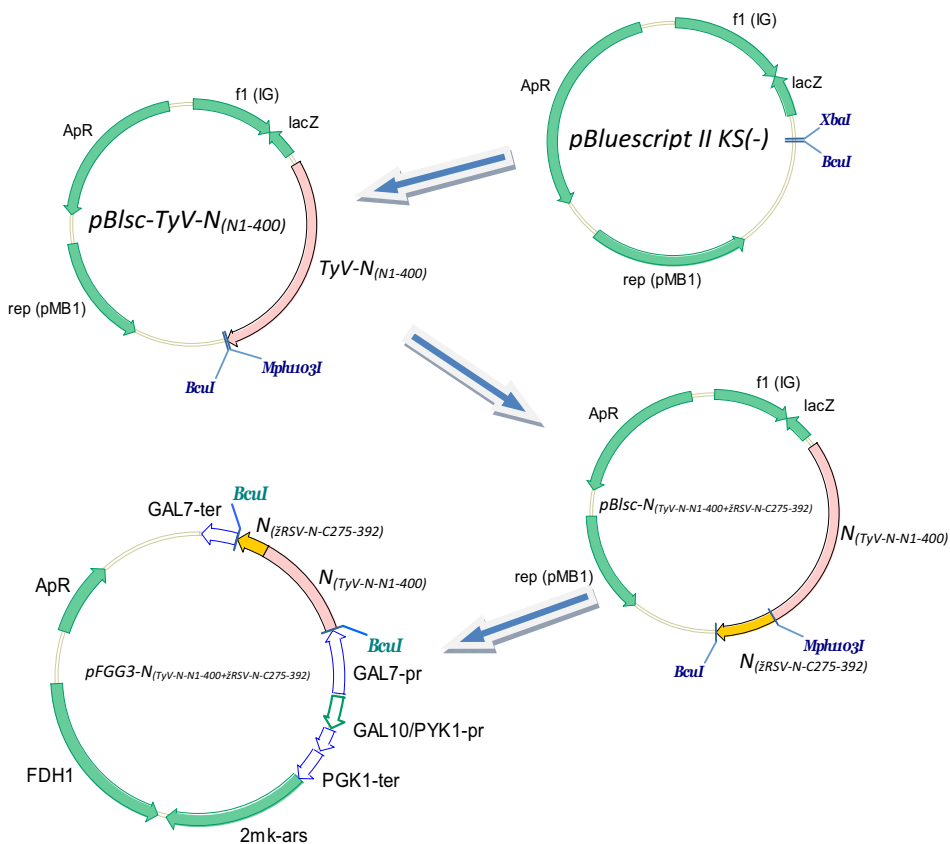
MenV N baltymo antigeninėms sritims nustatyti buvo sukonstruoti vektoriai, skirti sutrumpintų MenV N baltymo variantų sintezei mielėse *S.cerevisiae*. PGR metodu buvo padaugintos sutrumpintus MenV N baltymo variantus koduojančios DNR sekos. Buvo sukonstruoti vektoriai, skirti MenV N baltymo fragmentų be 29, 59, 89 ir 119 C-galinių ar. sintezei mielėse *S.cerevisiae*. Sutrumpintų genų konstravimui buvo panaudoti 3' galo pradmenys, koduojantys šešias His ar., įterptas iškart po paskutinės baltymo ar., prieš translacijos STOP signalo tripletą. Tokiu būdu, PGR naudotais pradmenimis daugintų DNR sekų 3' galuose buvo prijungtos 6His koduojančios sekos. Plazmidėje *pFGG3-MenV-N* klonuota pilno ilgio N baltymą koduojanti seka PGR naudota pirmine seka. Padaugintos sutrumpintus MenV N baltymo variantus koduojančios DNR sekos, naudojant XbaI RE taikinį,

klonuotos *pFGG3* vektoriuje po galaktoze įjungiamo *GAL7* promotoriaus sekos. Gauti vektoriai *pFGG3-MenV-N_(N1-490+C6His)*, *pFGG3-MenV-N_(N1-460+C6His)*, *pFGG3-MenV-N_(N1-430+C6His)* ir *MenV-N_(N1-400+C6His)*. Šių vektorių konstravimo schema pateiktos 15 paveiksle. Klonuotų DNR fragmentų sekos patikrintos Biotechnologijos instituto Sekoskaitos centre ir įsitikinta, kad šios sutampa su pirmine seka. Šiam tyrimui tokiu pat būdu sukonstruotas vektorius, skirtas pilno ilgio MenV N baltymo su 3` gale prijungta 6His seka sintezei mielėse *S.cerevisiae*. Gautas vektorius *pFGG3-MenV-N_(C6His)*, kurio schema tai pat pateikta 16 paveiksle.



16 pav. Sukonstruotų sutrumpintų MenV N baltymo variantų sintezei mielėse *S.cerevisiae* skirtų vektorių schema. Sekų žymėjimai tokie: *ApR* – β -laktamazės genas, *FDH1* – formaldehido dehidrogenazės genas, *2mk-ars* – 2 μ m mielių plazmidės fragmentas, *GAL7-pr* ir *GAL10/PYK1-pr* – galaktoze įjungiamų mielių *S.cerevisiae* genų promotoriai, *GAL7-ter* ir *PGK1-ter* – transkripcijos terminatorių sekos. Trumpinys ar. – aminorūgštys.

Monokloniniams antikūnams, kurie specifiskai reaguotų su hRSV N baltymo C-dalies ar. seka, gauti sukonstruotas vektoriai, skirtas chimerinio N baltymo, sujungus tymų viruso (TyV) N baltymo N-dalį (1-400 ar.) su hRSV N baltymo C-dalimi (275-392 ar.), sintezei mielėse *S.cerevisiae*. Visų pirma, TyV N baltymo N-dalį koduojanti DNR seka padauginta PGR naudojant iš dr. R. Slibinsko gautoje plazmidėje *pFGG3-MeV-N* klonuotą TyV N baltymo seką pirmine seka. PGR naudotais pradmenimis daugintos DNR sekos 5` gale buvo prijungtas BclI RE taikiny, o 3` gale buvo prijungtos Mph1103I ir BclI RE taikinių sekos. Padauginta seka hidrolizuota BclI RE ir naudojant XbaI RE taikinį klonuota bakterinėje plazmidėje *pBluescript II KS(-)*.



17 pav. Chimerinio N baltymo, kurį sudaro sujungta tymų viruso (TyV) N baltymo N-dalis (1-400 ar.) su hRSV N baltymo C-dalimi (275-392 ar.), sintezei mielėse *S.cerevisiae* skirto vektoriaus konstravimo schema. Sekų žymėjimai tokie: ApR – β-laktamazės genas, FDH1 – formaldehido dehidrogenazės genas, 2mk-ars – 2 μm mielių plazmidės fragmentas, GAL7-pr ir GAL10/PYK1-pr – galaktoze įjungiamų mielių *S.cerevisiae* genų promotoriai, GAL7-ter ir PGK1-ter – transkripcijos terminatorių sekos, XbaI, BclI ir Mph1103I – XbaI, BclI ir Mph1103I restrikcijos endonukleazių taikiniai.

Gauta plazmidė *pBlsc-TyV-N_(N1-400)*, kurios schema pateikta 15 B paveiksle. Patikrinus, kad klonuota seka atitinka pirminę seką, toliau *pBlsc-TyV-N_(N1-400)* plazmidė hidrolizuota Mph1103I ir BclI RE. Po hidrolizės, atlikus elektroforezę, plazmidė išskirta iš agarozės gelio. hRSV N baltymo C-dalį koduojanti DNR seka taip pat padauginta PGR. Reakcijai pirmine seka naudota *pFGG3-hRSV-N* plazmidėje klonuota hRSV N geno seka, o pradmenimis prijungti Mph1103I ir BclI RE taikiniai 5' ir 3' galuose. Padauginta seka hidrolizuota Mph1103I ir BclI RE ir klonuota paruoštoje plazmidėje *pBlsc-TyV-N_(N1-400)* naudojant Mph1103I ir BclI RE taikinius po TyV N baltymo N-dalį

koduojančios sekos. Naudojant šiuos taikinius, vektoriuje klonuota hRSV N baltymo C-dalies seka atsidūrė tame pačiame skaitymo rėmelyje, kaip ir TyV N baltymo N-dalies seka. Tokiu būdu bakterinėje plazmidėje *pBluescript II KS(-)* klonuota chimerinį N baltymą koduojanti DNR seka. Gauta plazmidė pažymėta trumpiniu *pBlsc-N_(TyV-N-N1-400+hRSV-N-C275-392)*, jos schema pateikta 17 paveiksle. Nustačius klonuoto DNR fragmento seką, įsitikinta, kad ši sutampa su pirminėmis sekomis. Kitame konstravimo etape chimerinį N baltymą koduojanti DNR seka padauginta PGR pradmenimis 5` ir 3` galuose prijungiant Bcul RE taikinius. PGR plazmidėje *pBlsc-N_(TyV-N-N1-400+hRSV-N-C275-392)* klonuoto chimerinio baltymo seka naudota pirmine seka. Hidrolizavus padaugintą seką Bcul RE, ši, naudojant Bcul RE taikinį, klonuota paruoštame pFGG3 vektoriuje po galaktoze įjungiamo GAL7 promotoriaus sekos. Gauta plazmidė *pFGG3-N_(TyV-N-N1-400+hRSV-N-C275-392)*. Jos schema pateikta 17 paveiksle. Taip pat įsitikinta, kad klonuota seka sutampa su PGR naudota pirmine seka.

Sukonstruoti paramikso virusų N baltymų sintezei mielėse *S.cerevisiae* skirti vektoriai *pFGG3-SeV-N*, *pFGG3-hPIV1-N*, *pFGG3-hPIV3-N*, *pFGG3-hRSV-N*, *pFGG3-NiV-N*, *pFGG3-HeV-N* ir *pFGG3-MenV-N* bei pradinė kontrolinė plazmidė *pFGG3* panaudoti mielių *S.cerevisiae* kamieno *214Δpep4* transformacijai. Vektorius *pFGG3-SeV-N* ir kontrolinė plazmidė *pFGG3* tai pat buvo naudoti dar dviejų mielių *S.cerevisiae* kamienų *FH4C* ir *AH 22-214* transformacijose. Trys skirtingi mielių kamienai naudoti norint patikrinti, ar skirtinguose mielių kamienuose keičiasi SeV N baltymo sintezė. Kamienas *214Δpep4*, turintis *pep4* mutaciją, pasirinktas dėl to, kad jis neturi aktyvaus *PEP4* geno, koduojančio vakuolinę peptidazę A, aktyvuojančią kitas vakuolines peptidazes. Tikėtasi, kad tai gali sustabdyti ar bent slopinti N baltymų hidrolizę sintezės mielėse ir gryninimo metu. Sukonstruoti vektoriai *pFGG3-NiV-N_(N1-399)*, *pFGG3-HeV-N_(N1-399)*, *pFGG3-MenV-N_(N1-399)*, *pFGG3-MenV-N_(C6His)*, *pFGG3-MenV-N_(N1-490+C6His)*, *pFGG3-MenV-N_(N1-460+C6His)*, *pFGG3-MenV-N_(N1-430+C6His)*, *MenV-N_(N1-400+C6His)* ir *pFGG3-N_(TyV-N-N1-400+hRSV-N-C275-392)*, buvo naudoti tik mielių

S.cerevisiae kamieno *214Δpep4* transformacijai. Svetimų baltymų sintezei skirto vektoriaus, turinčio mielių *S.cerevisiae* 2 μm plazmidės replikacijos pradžios seką, kopijų skaičius mielių ląstelėje yra apie 50 vienetų. Mielių transformantai, įgavę aukščiau minėtas rekombinantines plazmidės, buvo atrinkti auginant ant agarizuotos MEPD terpės su formaldehidu (0.0125 %). Atrinktų mielių transformantai buvo tikrinti persėjant ant tos pačios terpės tik su dvigubai didesne formaldehido koncentracija (0.025 %). Su tokiu formaldehido kiekiu susidoroja tik didelį *FDH1* geno kopijų skaičių turinčios mielių ląstelės, o tos, kurios dalijimosi metu pameta plazmidę, žūsta. Eksperimentams naudotos šviežiai transformuotos mielės. Retais atvejais jos buvo užšaldomos –70°C temperatūroje skystoje MEPD terpėje su glicerinu, o prireikus atgaivinamos ant agarizuotos MEPD terpės su formaldehidu.

3.1.2. *Paramyxoviridae* šeimos virusų nukleokapsidės baltymų sintezė mielėse *S.cerevisiae*, gryninimas ir savybių tyrimai

3.1.2.1. Sendai viruso nukleokapsidės baltymas

Sendai viruso (SeV) N baltymo sintezei mielėse *S.cerevisiae* tirti pradžioje naudotos tokios sintezės indukcijos sąlygos, kurios labiausiai tiko tymų ir kiaulytės virusų N baltymų sintezei tos pačios rūšies mielėse (remtasi dr. R. Slibinsko atliktais tyrimais). Sukonstruotu SeV N baltymo sintezei mielėse *S.cerevisiae* skirtu vektoriumi *pFGG3-SeV-N* (žr. skyrių 3.1.1., vektoriaus schema pateikta 14 A pav.) transformuotos laukinio tipo mielės *S.cerevisiae*, kamienas *FH4C*. Vektoriumi transformuotos mielės padaugintos 24 val inkubuojant skystoje mitybinėje MEPD terpėje (žr. Metodinę dalį, skyrius 2.2.11.) su formaldehidu (0.0125 %) 30°C temperatūroje purtant kolbose (250 aps/min). Vektoriuje *pFGG3* SeV N baltymo geno transkripcija įjungžiama *GAL7* promotoriaus, perkėlus mieles į skystą mitybinę MEPG terpę, kurioje vietoj gliukozės anglies šaltiniu naudojama galaktozė (1.5 %). Šioje terpėje mielės inkubuotos 24 val 30°C temperatūroje kolbose intensyviai maišant

(250 aps/min). Po 24 val auginimo indukcijos sąlygomis, mielių ląstelės surinktos 5 min centrifuguojant 800 x g atitinkančia išcentrine jėga. Pasvėrus surinktas ląsteles, jos praskiestos ardymo tirpalu (AT) (žr. Metodinę dalį, skyrius 2.2.12.) (drėgnos mielių biomasės svorio ir AT tūrio santykis – 1:10) ir suardytos intensyviai purtant su stiklo rutuliukais periodiškai šaldant leduose. Bandymui naudotos drėgnos mielių biomasės ir stiklo rutuliukų svorių santykis – 1:2, kaip aprašyta Metodų dalies 2.2.12. skyriuje.

Suardytų ląstelių suspensija (SLS) analizuota NDS-PAGE metodu (žr. Metodinę dalį, skyrius 2.2.17.). Šiuo metodu SLS mėginyje, jį lyginant su kontroliniu mėginiu (plazmide *pFGG3* transformuotų laukinio tipo mielių *S.cerevisiae* SLS), aptiktas ~ 60 kDa molekulinės masės (MM) papildomas baltymas (18 pav., 2 takelis). Naudojant žiniatinklyje laisvai prieinamą programą (žiniatinklio svetainė Nr. 1), apskaičiuota, kad SeV N baltymo teorinė MM yra lygi ~ 57 kDa. Tirtame mėginyje NDS-PAGE metodu nustatyta papildomo baltymo MM buvo ~ 3 kDa didesnė nei programa apskaičiuota teorinė SeV N baltymo MM. Remiantis publikuotais duomenimis įsitikinta, kad NDS-PAGE metodu nustatyta aptikto papildomo baltymo MM sutapo su kitų tyrėjų tokiu pat metodu nustatyta iš SeV viruso dalelių išskirto pilno ilgio N baltymo MM (Neubert ir kt., 1991; Sakaguchi ir kt., 1993). Padaryta prielaida, kad po indukcijos vektoriumi *pFGG3-SeV-N* transformuotų mielių SLS aptiktas pilno ilgio SeV N baltymas.

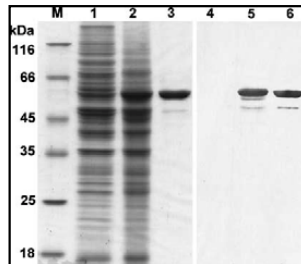
Mielėse susintetinto baltymo tapatybė buvo patvirtinta baltymų imunoblotingo (BIB) metodu (žr. Metodinę dalį, skyrius 2.2.18.) BIB analizėje naudotas SeV dalelėmis imunizuoto triušio kraujo serumas, gautas iš dr. T. Sakaguchi (Biomedicinos mokslų aukštoji mokykla, Hirosimos universitetas, Japonija). NDS-PAGE metodu vektoriumi *pFGG3-SeV-N* transformuotų mielių SLS aptiktas papildomas baltymas stipriai reagavo su SeV dalelėmis imunizuoto triušio kraujo serumu (18 pav., 5 takelis). Neigiamos kontrolės mėginyje jokio signalo neaptikta (18 pav., 4 takelis). Vektoriumi *pFGG3-SeV-N*

transformuotų mielių SLS su SeV dalelėmis imunizuoto triušio kraujo serumu reagavo dar du baltymai, kurių MM buvo: vieno ~ 2 kDa, o kito ~ 6 kDa mažesnė už pilno ilgio SeV N baltymo MM. Padaryta prielaida, kad šie du baltymai yra trumpesni SeV N baltymo variantai, kurių SLS buvo aptikti nedideli kiekiai. Trumpesnius N baltymo variantus pavyko aptikti tik BIB metodu. Tai rodo, kad mielėse sintetinamas SeV N baltymas yra stabilus ir tik nedidelė jo dalis yra degraduojama baltymus hidrolizuojančių fermentų.

Išsitikinus, kad laukinio tipo mielėse *S.cerevisiae* vyksta SeV N baltymo sintezė, toliau nustatyta optimali šiam baltymui sintezės indukcijos trukmė ir parinkta optimali N geno raišką įjungiančios medžiagos – galaktozės – koncentracija. Parenkant sintezės sąlygas, po indukcijos suardžius mieles SLS buvo matuojamas santykinis N baltymo kiekis. Tai buvo atliekama lyginant N baltymo kiekį SLS su žinomomis išgryninto N baltymo koncentracijomis BIB metodu naudojant specifinius SeV N baltymui antikūnus (SeV dalelėmis imunizuoto triušio kraujo serumą). SeV N baltymo kiekis SLS apskaičiuotas naudojant vaizdo analizės programą (žr. “Metodinę dalį”, skyrius 2.2.12.). Šį N baltymo kiekį padalinus iš bendro SLS baltymų kiekio ir gautą reikšmę padauginus iš 100 % apskaičiuotas santykinis SeV N baltymo kiekis. Trijuose identiška paruoštuose mėginiuose suskaičiavus santykinį baltymo kiekį, gautas šio kiekio vidurkis ir apskaičiuotas standartinis nuokrypis. SeV N baltymo sintezė tirta po 8, 12, 16, 20, 24, 28 ir 32 val trukusios indukcijos. Po indukcijos, surinkus mielių ląsteles ir jas suardžius, nustatyta, kad SeV N baltymo kiekis sparčiai didėjo mieles auginant indukcijos sąlygomis 16 val, paskui N baltymo kiekis didėjo nežymiai, kol po 24 val trukusios indukcijos pasiekęs maksimumą pradėjo mažėti. Nustatyta, kad po 24 val trukusios indukcijos SeV N baltymo kiekis mielių *S.cerevisiae* kamieno FH4C SLS sudarė 8.8 ± 0.7 % nuo bendro ląstelės baltymų kiekio. Matuojant santykinį N baltymo kiekį nustatyta, kad indukcinėje terpėje padidinus galaktozės koncentraciją nuo 1.5 iki 2.5 % SeV N baltymo sintezės lygis padidėjo ~ 25 %.

Naudojant parinktas optimalias indukcijos sąlygas, SLS apskaičiuotas SeV N baltymo kiekis sudarė $11.0 \pm 0.6\%$ nuo bendro ląstelės baltymų kiekio.

Parinkus optimalias sintezės indukcijos sąlygas SeV N baltymo sintezė tirta kituose dviejuose mielių *S.cerevisiae* kamienuose AH 22-214 ir 214 Δ pep4. Jokių pastebimų SeV N baltymo sintezės skirtumų tarp naudotų mielių *S.cerevisiae* kamienų neaptikta. Dr. R. Slibinsko atlikti tyrimai taip pat neparodė jokių tyimų ir kiaulytės virusų N baltymų sintezės skirtumų tyrimams naudotuose skirtinguose mielių *S.cerevisiae* kamienuose (Samuel ir kt., 2003; Slibinskas ir kt., 2004). Šiame darbe tirtų paramikso virusų N baltymų sintezei buvo naudotas tik mielių *S.cerevisiae* kamienas 214 Δ pep4, kuris turi mažiau baltymus hidrolizuojančių fermentų.



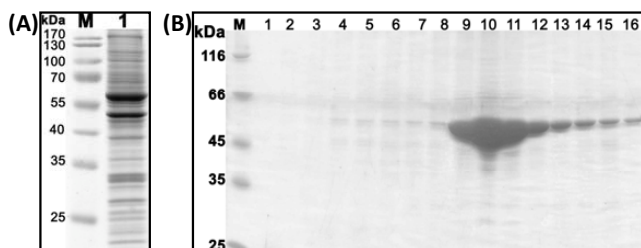
18 pav. Mielėse *S.cerevisiae* susintetinto SeV N baltymo analizė SDS-PAGE metodu (1-3) ir imunoblotingu naudojant SeV dalelėmis imunizuoto triušio kraujo serumą (4-6). M – baltymų molekulinio svorio standartas (UAB „Fermentas“) 116, 66, 45, 35, 25 ir 18 kDa; 1 ir 4 takeliai – 20 μ g indukuotų pFGG3 vektoriumi transformuotų mielių *S.cerevisiae* SLS; 2 ir 5 takeliai – 20 μ g indukuotų pFGG3-SeV-N vektoriumi transformuotų mielių *S.cerevisiae* SLS; 3 ir 6 takeliai – 5 μ g išgryninto mielėse *S.cerevisiae* susintetinto SeV N baltymo.

Atrinkus SeV N baltymo sintezei skirtą mielių *S.cerevisiae* kamieną (214 Δ pep4) ir parinkus šio baltymo sintezei optimalias indukcijos sąlygas, toliau mielėse susintetintas SeV N baltymas buvo grynintas. SeV N baltymo sintezei skirtos mielės užaugintos ir indukuotos optimaliomis sąlygomis. Po indukcijos surinktos mielių ląstelės suardytos. Tirpių baltymų frakcijai (TBF) atskirti SLS 20 min centrifuguota 10.000 x g atitinkančia išcentrine jėga (Beckman centrifuga, JA-14 rotoriuje, 12.000 aps/min). Gautos nuosėdos atskirtos nuo TBF ir ištirpintos tokiame pat AT tūryje, kokiame buvo praskiestos surinktos mielių ląstelės. TBF ir ištirpintų nuosėdų mėginiai

analizuoti BIB metodu naudojant specifinius SeV N baltymui antikūnus. Tik nedidelis SeV N baltymo kiekis aptiktas nuo TBF atskirtose nuosėdose. Šis sudarė tik 2 ± 1 % nuo to N baltymo kiekio, kuris nustatytas TBF. Ši analizė leido daryti prielaidą, kad mielėse susintetintas SeV N baltymas yra tirpus, o nedidelis jo kiekis galėjo atsidurti nuosėdose dėl mielių ląstelių, kurių nepavyko suardyti.

Toliau mielėse *S.cerevisiae* susintetintas SeV N baltymas grynintas TBF centrifuguojant per 30 % sacharozės tirpalo sluoksnį (žr. Metodinę dalį, skyrius 2.2.13.). Sacharozės tirpalo sluoksnis ir virš jo patalpinta TBF 3 val centrifuguota $100.000 \times g$ atitinkančia išcentrine jėga (Beckman-Coulter ultracentrifuga, Ti60 rotoriuje, 38.000 aps/min). Tankų sacharozės sluoksnį gali įveikti tik didelio tankio ir MM baltymai ar jų dariniai. Žinoma, kad N baltymai jungdamiesi tarpusavyje ir su RNR formuoja didelio tankio ir MM darinį – nukleokapsidę, kuri, ją veikiant didele išcentrine jėga, turėtų prasiskverbti pro 30 % sacharozės tirpalą. Nucentrifugavus gautos baltyminės nuosėdos ištirpintos AT (bandymui naudotos biomasės svorio ir AT tūrio santykis – 1:4) ir tikrintos NDS-PAGE metodu (19 A pav.). Didžioji dalis mielėse susintetinto SeV N baltymo aptikta nuosėdose. Nedidelis N baltymo kiekis buvo aptiktas sacharozės tirpalo sluoksnyje, o tirpale virš jo N baltymo aptikti nepavyko (neparodyta). Tai leido daryti prielaidą, kad didžioji dalis mielėse susintetinto SeV N baltymo formuoja didelio tankio ir MM darinius. NDS-PAGE metodu nustatyta, kad po šio gryninimo žingsnio nepakito SeV N baltymo MM. Nei ištirpintose baltymų nuosėdose, nei sacharozės tirpale santykinis N baltymo kiekis nebuvo matuotas. Toliau SeV N baltymas grynintas pro sacharozės sluoksnį prasiskverbusius baltymus centrifuguojant iš skirtingos koncentracijos CsCl tirpalo sluoksnių suformuotame tankio gradientu (žr. Metodinę dalį, skyrius 2.2.13.). CsCl tirpalo sluoksniai ir virš jų patalpintos ištirpintos baltymų nuosėdos 36 val centrifuguoti $100.000 \times g$ atitinkančia išcentrine jėga (Beckman-Coulter ultracentrifuga, Ti60 rotoriuje,

38.000 aps/min.). Po šio gryninimo žingsnio surinktos 1 ml tūrio CsCl tirpalo frakcijos ir išmatuotas jų tankis. Viršutinės frakcijos tankis buvo lygus 1.16 g/cm^3 , o apatinės – 1.38 g/cm^3 . NDS-PAGE metodu atlikus surinktų frakcijų analizę, didžiausias SeV N baltymo kiekis nustatytas $1.29\text{-}1.32 \text{ g/cm}^3$ tankio CsCl tirpalo sluoksnyje. Šiame sluoksnyje aptiktos tik negausios mielių ląstelės baltymų priemaišos. Taip pat įsitikinta, kad nepakito gryninamo N baltymo MM. Didžiausią SeV N baltymo kiekį turinčios frakcijos sujungtos, praskiestos 1.31 g/cm^3 tankio CsCl tirpalu ir dar kartą centrifuguotos tokiomis pat sąlygomis. Po to NDS-PAGE metodu atlikus surinktų CsCl tirpalo frakcijų analizę didžiausias SeV N baltymo kiekis nustatytas tokio pat tankio CsCl tirpalo sluoksnyje kaip ir po pirmo karto (19 B pav.). Po šio gryninimo žingsnio didžiausią N baltymo kiekį turinčiose frakcijose beveik neliko mielių ląstelių baltymų priemaišų. Taip pat nepakito ir N baltymo MM. Tai rodo, kad mielėse susintetintas SeV N baltymas gryninant nėra degraduojamas baltymus hidrolizuojančių fermentų. Didžiausią SeV N baltymo kiekį turinčios CsCl tirpalo frakcijos sujungtos ir dializuotos natrio fosfato druskų tirpale (NFDТ) su 1 mM EDTA. Po dializės NDS-PAGE metodu sujungtų frakcijų mėginyje aptiktas daugiausiai tik pilno ilgio SeV N baltymas (18 pav., 3 takelis). Jo tapatybė patvirtinta BIB metodu naudojant SeV N baltymui specifinius antikūnus (18 pav., 6 takelis). Išgryninto SeV N baltymo mėginyje NDS-PAGE ir BIB metodais aptiktas ir trumpesnis SeV N baltymo variantas, kurio MM buvo ~ 6 kDa mažesnė už pilno ilgio SeV N baltymo MM. Trumpesnio N baltymo varianto išgrynintam mėginyje aptikta palyginti nedaug. Vaizdo analizės programa nustatytas SeV N baltymo grynumas. Programa apskaičiuota, kad išgrynintame mėginyje SeV N baltymas sudarė > 95 % nuo bendro baltymų kiekio. Po gryninimo gauta mielėse *S.cerevisiae* susintetinto SeV N baltymo išėiga yra pateikta rezultatus apibendrinančioje 1 lentelėje, Rezultatų dalies 3.1.2.1. skyriuje.

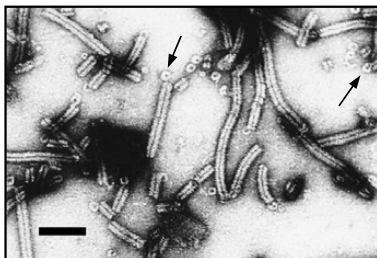


19 pav. Mielėse *S.cerevisiae* sintetinto SeV N baltymo gryninimas centrifuguojant per 30 % sacharozės tirpalo sluoksnį (A) ir po to centrifuguojant CsCl gradientu (B). (A): M – baltymų molekulinio svorio standartas (UAB „Fermentas“) 170, 130, 100, 70, 55, 40, 35 ir 25 kDa; 1 takelis – 20 µg baltymų prasiskverbusių pro 30 % sacharozės tirpalo sluoksnį SDS-PAGE. (B): M – baltymų molekulinio svorio standartas (UAB „Fermentas“) 116, 66, 45, 35 ir 25 kDa; 1-16 takeliuose – parodyta po antro centrifugavimo CsCl gradientu surinktų CsCl tirpalo frakcijų SDS-PAGE. Frakcijos užneštos iš kairės į dešinę, nuo lengviausių iki sunkiausių.

Išgryninto SeV N baltymo koncentracija nustatyta Bredfordo metodu (žr. Metodinę dalį, skyrius 2.2.15.). Dalis išgryninto N baltymo tirpalo praskiesta gliceroliu iki 50 % tūrio ir laikyta –20°C temperatūroje, kita dalis liofilizuota ir laikyta 4°C temperatūroje. Po mėnesio baltymo mėginiai tikrinti NDS-PAGE metodu. Nustatyta, kad abiem būdais užkonservuotas išgrynintas SeV N baltymas gali būti saugiai laikomas ilgą laiką.

Išgryninus mielėse susintetintą SeV N baltymą, tirtos jo savybės. Liofilizuotas N baltymas ištirpintas vandenyje ir analizuotas elektroniniu mikroskopu (EM) (žr. Metodinę dalį, skyrius 2.2.19.). EM analizė parodė, kad mielėse susintetintas SeV N baltymas formuoja paramikso virusų nukleokapsidę primenančias daleles (20 pav.). Šie dariniai savo išvaizda yra panašūs į tiesius arba truputį lenktus 20 nm skersmens ir nuo 20 iki 300 nm ilgio vamzdelius, kurių pakraščiuose yra aiškiai matomi „eglutės“ raštą primenantys susiaurėjimai. Vamzdelio viduryje matoma ~ 3-4 nm skersmens tamsi juosta, kuri driekiasi išilgai vamzdelio per visą jo ilgį. Stebėti vamzdeliai yra įvairaus ilgio, tačiau vienodo skersmens. Kai kuriuose matomi gilūs pleišto formos susiaurėjimai, kurie nėra panašūs į „eglutės“ raštą primenančius susiaurėjimus. Taip pat EM stebėti ir paskiri krumpliaratį primenantys nukleokapsidės spiralės žiedai, iš N baltymų suformuotas darinys, sudarytas iš

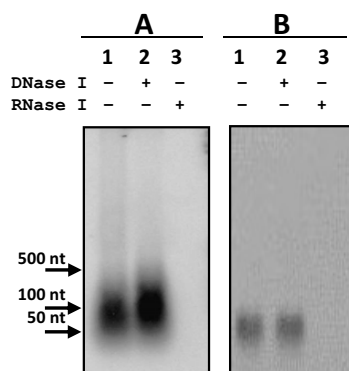
vienos ar kelių nukleokapsidės spiralės vijų (20 pav.). Šių žiedinių struktūrų išgryninto SeV N baltymo mėginyje aptikta palyginti nedaug. Remiantis publikuotais duomenimis įsitikinta, kad labai panašūs dariniai aptikti EM stebint išgrynintą N baltymą, išskirtą iš įvairių paramikso virusų dalelių (Heggeness ir kt., 1981). EM metodu atlikta analizė patvirtino, kad mielėse susintetintas SeV N baltymas formuoja viruso nukleokapsidę primenančias daleles.



20 pav. Išgryninto mielėse *S.cerevisiae* susintetinto SeV N baltymo elektroninė mikrofotografija. Padidinta 100.000 kartų, brūkšnys – 100 nm. Rodyklėmis pažymėti nukleokapsidės spiralės žiedai.

Įsitikinus, kad mielėse susintetintas SeV N baltymas formuoja viruso nukleokapsidę primenančias daleles, siekta nustatyti, ar šie dariniai savo struktūroje turi nukleorūgštis. Nukleorūgščių analizei naudotas išgryninto SeV N baltymo mėginys padalintas į dvi lygias dalis, viena jų veikta dezoksiribonukleaze I (DNase I, 20 min 37°C, 10 µg/ml), o kita – ribonukleaze A (RNase A, 20 min 37°C, 10 µg/ml). Iš nukleazėmis paveiktų mėginių nukleorūgštys išskirtos kaitinant su rūgščiu fenoliu 65°C temperatūroje (žr. Metodinę dalį, skyrius 2.2.21.). DNase ir RNase veikti mėginiai padalinti į tris lygias dalis. Viena dalis veikta DNase I (20 min 37°C, 10 µg/ml), antra – RNase A (20 min 37°C, 10 µg/ml), o trečia – 20 min inkubuota 37°C temperatūroje. Po šio žingsnio nukleorūgšties mėginiai frakcionuoti agarozės gelyje su formaldehidu (žr. Metodinę dalį, skyrius 2.2.22.) ir analizuoti nukleorūgščių hibridizacijos (NH) metodu (žr. Metodinę dalį, skyrius 2.2.23.). Hibridizacijos zondų naudota ³²P pažymėta mielių ląstelės RNR. NH metodu atlikus analizę paaiškėjo, kad nukleorūgštys, išskirtos iš DNase veikto N

baltymų mėginio, buvo atsparios DNazės I poveikiui (21 A pav., 2 takelis), NH metodu aptikti 60-500 nt ilgio RNR fragmentai, tačiau jokie NH signalo nepavyko nustatyti, išskirtas nukleorūgštis paveikus RNaze A (21 A pav., 3 takelis). Nukleorūgštys, išskirtos iš RNase A veikto N baltymų mėginio, taip pat buvo atsparios DNazės I poveikiui (21 B pav., 2 takelis), tačiau šiuo atveju NH metodu buvo aptikti tik 60-80 nt ilgio RNR fragmentai. Kaip ir pirmu atveju, jokie NH signalo nepavyko nustatyti, išskirtas nukleorūgštis paveikus RNaze A (21 B pav., 3 takelis). Šiuo tyrimu įsitikinta, kad mielėse susintetinto SeV N baltymo formuojami virusų nukleokapsidę primenantys dariniai į savo struktūrą yra įjungę 60-500 nt ilgio mielių ląstelės RNR. Veikiant RNase, N baltymo dariniai nuo hidrolizės apsaugo tik 60-80 nt ilgio RNR fragmentus.



21 pav. Iš mielėse *S.cerevisiae* susintetintų SeV N baltymų formuojamų vNPD išskirta RNR hibridizuota su ^{32}P pažymėta mielių ląstelės RNR NH metodu. 100 μg vNPD buvo veikta DNaze I (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (A) arba 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNaze A (B). Po to iš veiktų vNPD buvo išskirta RNR naudojant rūgštų fenolį, kaitinant 65 $^{\circ}\text{C}$ temperatūroje (A-B). Iš vNPD išskirta RNR buvo: 1 takelis – neveikta; 2 takelis – veikta DNase I (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$); 3 takelis – veikta RNase A (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

3.1.2.2. Žmogaus paragripo virusų nukleokapsidės baltymai

1 ir 3 serotipų žmogaus paragripo virusų (hPIV1 ir hPIV3) N baltymų sintezei mielėse *S.cerevisiae*, pradžioje, taip pat, kaip ir SeV N baltymo sintezės mielėse atveju, naudotos tokios pat sintezės indukcijos sąlygos (žr. Rezultatų dalį, skyrius 3.1.2.1.). Ištyrus SeV N baltymo sintezę trijuose mielių *S.cerevisiae* kamienuose *FH4C*, *AH 22-214* ir *214 Δ pep4*, jokių pastebimų šio

baltymo sintezės skirtumų tarp naudotų mielių kamienų neaptikta. Todėl toliau šiame darbe paramikso virusų N baltymų sintezei buvo naudotas mielių *S.cerevisiae* kamienas *214Δpep4*. Sukonstruotais hPIV1 ir hPIV3 N baltymų sintezei mielėse *S.cerevisiae* skirtais vektoriais *pFGG3-hPIV1-N* ir *pFGG3-hPIV3-N* (žr. skyrių 3.1.1., vektorių schemas pateiktos 14 B ir C pav.) transformuotos mielės *S.cerevisiae*, kamienas *214Δpep4*. Vektoriais transformuotas mieles padauginus skystoje mitybinėje terpėje su formaldehidu, jos 24 val augintos indukcijos sąlygomis.

Po indukcijos, suardžius mieles, NDS-PAGE metodu tirti SLS mėginiai taip pat, kaip ir SeV N baltymo sintezės mielėse atveju (žr. Rezultatų dalį, skyrius 3.1.2.1.). Šiuo metodu *pFGG3-hPIV1-N* vektoriumi transformuotų mielių SLS mėginyje, jį lyginant su neigiamos kontrolės mėginiu, aptiktas ~ 60 kDa MM papildomas baltymas (22 A pav., 2 takelis). *pFGG3-hPIV3-N* vektoriumi transformuotų mielių SLS mėginyje aptikto papildomo baltymo MM buvo lygi ~ 66 kDa (22 B pav., 2 takelis). Naudojant žiniatinklyje laisvai prieinamą programą apskaičiuota, kad kiekvieno tirtų N baltymų teorinė MM yra lygi ~ 58 kDa. *pFGG3-hPIV1-N* vektoriumi transformuotų mielių SLS NDS-PAGE metodu aptikto papildomo baltymo MM buvo ~ 2 kDa didesnė nei programa apskaičiuota teorinė hPIV1 N baltymo MM, o *pFGG3-hPIV3-N* vektoriumi transformuotų mielių SLS – ~ 8 kDa didesnė nei programa apskaičiuota teorinė hPIV3 N baltymo MM. Remiantis publikuotais duomenimis įsitikinta, kad abiem tirtais atvejais NDS-PAGE metodu nustatyta aptikto papildomo baltymo MM maždaug sutapo su tokiu pat metodu nustatytomis iš hPIV1 ir hPIV3 dalelių išskirtų pilno ilgio N baltymų MM (Henrickson, 2003; Miyahara ir kt., 1992). Padaryta prielaida, kad po indukcijos vektoriais *pFGG3-hPIV1-N* ir *pFGG3-hPIV3-N* transformuotų mielių SLS aptikti pilno ilgio hPIV1 ir hPIV3 N baltymai.

Mielėse susintetintų N baltymų tapatybė patvirtinta BIB metodu. Kadangi hPIV1 N baltymo ar. seka yra panaši į SeV N baltymo ar. seką, todėl

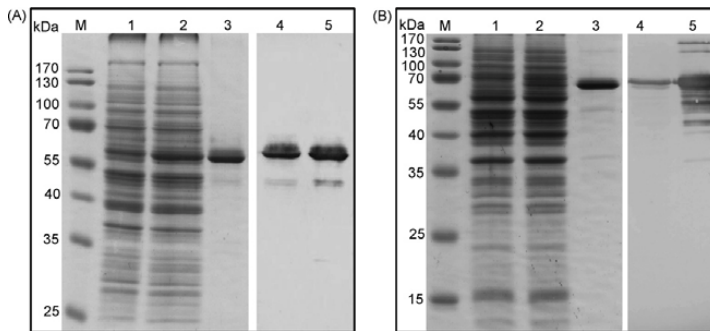
mielėse susintetinto hPIV1 N baltymo tapatybei patvirtinti BIB analizėje buvo naudotas SeV dalelėmis imunizuoto triušio kraujo serumas (žr. Rezultatų dalį, skyrius 3.1.2.1.). *pFGG3-hPIV1-N* vektoriumi transformuotų mielių SLS NDS-PAGE metodu aptiktas papildomas baltymas stipriai reagavo su BIB analizėje naudotu SeV baltymams specifiniu kraujo serumu (22 A pav., 4 takelis). Be to, tirtame mėginyje su šiuo serumu silpnai reagavo ir kitas baltymas, kurio MM buvo lygi ~ 50 kDa. Padaryta prielaida, kad šis baltymas yra peptidazių degraduotas, trumpesnis mielėse susintetinto hPIV1 N baltymo variantas. Kadangi trumpesnio N baltymo varianto buvo aptikta tik labai nedaug, tai leido manyti, kad mielėse susintetintas hPIV1 N baltymas yra atsparus mielių ląstelės peptidazių poveikiui. Jokie baltymai *pFGG3-hPIV3-N* vektoriumi transformuotų mielių SLS, kaip ir neigiamos kontrolės mėginyje, su SeV baltymams specifiniu kraujo serumu nereagavo. *pFGG3-hPIV3-N* vektoriumi transformuotų mielių SLS NDS-PAGE metodu aptikto papildomo baltymo tapatybė buvo patvirtinta BIB metodu naudojant hPIV3 baltymams specifinius polikloninius ožkos antikūnus (Chemicon, JAV). Tirtame SLS mėginyje joks kitas baltymas, išskyrus tą, kuris buvo aptiktas NDS-PAGE metodu, su šiuo serumu nereagavo (22 B pav., 4 takelis). Todėl buvo padaryta prielaida, kad mielėse sintetinamas hPIV3 N baltymas tai pat yra atsparus mielių ląstelės peptidazių poveikiui.

Įsitikinus, kad žmogaus paragripo virusų 1 ir 3 N baltymai yra sintetinami mielėse *S.cerevisiae* toliau buvo nustatytos šių baltymų sintezei optimalios indukcijos sąlygos. hPIV1 ir hPIV3 N baltymų sintezė mielėse tirta po 8, 12, 16, 20, 24, 28 ir 32 val trukusios indukcijos taip pat, kaip ir SeV N baltymo atveju (žr. "Rezultatų dalį", skyrius 3.1.2.1.). Po indukcijos, suardžius mielių ląsteles ir SLS išmatavus santykinį N baltymo kiekį nustatyta, kad hPIV1 N baltymo kiekis sparčiai didėjo mieles auginant indukcijos sąlygomis 16 val, paskui N baltymo kiekis didėjo nežymiai ir po 24 val pasiekęs maksimumą pradėjo mažėti. hPIV3 N baltymo kiekis sparčiai didėjo mieles auginant indukcijos sąlygomis 20 val, o

savo maksimumą pasiekė taip pat po 24 val. Toliau buvo nustatyta, kad abiem tirtais atvejais indukcinėje terpėje padidinus galaktozės kiekį nuo 1.5 iki 2.5 % tirtų N baltymų sintezės lygis padidėjo ~ 25 %. Toliau didinant galaktozės kiekį indukcinėje terpėje, tirtų N baltymų sintezės lygis išliko toks pats. Naudojant parinktas optimalias indukcijos sąlygas, SLS apskaičiuoti hPIV1 ir hPIV3 N baltymų kiekiai sudarė 3.4 ± 0.4 % ir 1.4 ± 0.1 % nuo bendro ląstelės baltymų kiekio.

Parinkus optimalias sintezės indukcijos sąlygas, toliau mielėse susintetinti hPIV1 ir hPIV3 N baltymai buvo gryninti. Po indukcijos surinktos hPIV1 N baltymą sintetinančios mielės *S.cerevisiae*, suardytos ir atskirta tirpių baltymų frakcija taip pat, kaip ir mielėse susintetinto SeV N baltymo atveju (žr. Rezultatų dalį, skyrius 3.1.2.1.). Nuo TBF atskirtos nuosėdos ištirpintos tokiame pat AT tūryje, kokiame buvo praskiestos surinktos mielių ląstelės. Kadangi su hPIV1 N baltymu reaguoja SeV N baltymui specifiniai antikūnai, todėl šiuo atveju TBF ir ištirpintų nuosėdų mėginiai analizuoti BIB metodu naudojant SeV dalelėmis imunizuoto triušio kraujo serumą. Tik nedidelis hPIV1 N baltymo kiekis aptiktas nuo TBF atskirtose nuosėdose. Šis sudarė 3 ± 0.8 % nuo to N baltymo kiekio, kuris buvo nustatytas TBF. Tai rodo, kad mielėse susintetintas hPIV1 N baltymas yra tirpus, o nedidelis jo kiekis galėjo atsidurti nuosėdose vien tik dėl mielių ląstelių, kurių nepavyko suardyti. hPIV3 N baltymo atveju, BIB metodu naudojant hPIV3 baltymams specifinius polikloninius ožkos antikūnus ~ 30 % mielėse susintetinto hPIV3 N baltymo buvo aptikta nuo TBF atskirtose nuosėdose. Tai rodo, kad didelė dalis mielėse susintetinto hPIV3 N baltymo yra netirpi. Netirpų N baltymą veikiant didele išcentrine jėga, jis kartu su suardytų mielių ląstelių liekanomis koncentruojasi nuosėdose. Buvo padaryta prielaida, kad dalis mielėse susintetinto hPIV3 N baltymo gali būti netirpi dėl hidrofobinių sąveikų. Šiai prielaidai patikrinti hPIV3 N baltymą sintetinančios mielės suardytos AT su įvairiomis detergentų Tween²⁰ arba Triton X-100 koncentracijomis. Atskyrus TBF, šios frakcijos ir

ištirpintų nuosėdų mėginiai analizuoti BIB metodu. Paaiškėjo, kad ~90 % mielėse susintetinto netirpus hPIV3 N baltymo ištirpo AT naudojant 2 % detergento Tween²⁰ arba 1 % detergento Triton X-100 koncentracijas. Tai patvirtino prielaidą, kad dalis mielėse susintetinto hPIV3 N baltymo yra netirpi dėl hidrofobinių sąveikų. Todėl gryninant mielėse susintetintą hPIV3 N baltymą, visuose gryninimo tirpaluose buvo naudota 2 % detergento Tween²⁰ koncentracija.



22 pav. Mielėse *S.cerevisiae* susintetintų hPIV1 ir hPIV1 N baltymų analizė SDS-PAGE metodu (A ir B, 1-3 takeliai) ir imunoblotingu (A ir B, 4-5 takeliai). Imunoblotingas su SeV dalelėmis imunizuoto triušio kraujo serumu (A, 4-5 takeliai) ir su hPIV3 baltymams specifiniais polikloniniais ožkos antikūnais (B, 4-5 takeliai). (A): M – baltymų molekulinio svorio standartas (UAB „Fermentas“) 170, 130, 100, 70, 55, 40, 35 ir 25 kDa; 1 takelis – 20 µg indukuotų *pFGG3* vektoriumi transformuotų mielių *S.cerevisiae* SLS; 2 ir 4 takeliai – 20 µg induktos *pFGG3-hPIV1-N* vektoriumi transformuotų mielių *S.cerevisiae* SLS; 3 ir 5 takeliai – 2 µg išgryninto mielėse *S.cerevisiae* susintetinto hPIV N baltymo. (B): M – baltymų molekulinio svorio standartas (UAB „Fermentas“) 170, 130, 100, 70, 55, 40, 35, 25 ir 15 kDa; 1 takelis – 20 µg indukuotų *pFGG3* vektoriumi transformuotų mielių *S.cerevisiae* SLS; 2 ir 4 takeliai – 20 µg induktos *pFGG3-hPIV3-N* vektoriumi transformuotų mielių *S.cerevisiae* SLS; 3 ir 5 takeliai – 2 µg išgryninto mielėse *S.cerevisiae* susintetinto hPIV N baltymo.

Toliau mielėse *S.cerevisiae* susintetinti hPIV1 ir hPIV3 N baltymai gryninti taip pat, kaip ir mielėse susintetintas SeV N baltymas, TBF centrifuguojant per 30 % sacharozės tirpalo sluoksnį (žr. Rezultatų dalį, skyrius 3.1.2.1.). Nucentrifugavus, gautos baltyminės nuosėdos ištirpintos AT ir tikrintos SDS-PAGE metodu. Didžioji dalis mielėse susintetintų hPIV1 ir hPIV3 N baltymų po šio gryninimo žingsnio aptikta nuosėdose ir tik nedideli kiekiai sacharozės tirpalo sluoksnyje. Taip pat nustatyta, kad nei vienu, nei kitu tirtu atveju tirpale virš tankaus sacharozės sluoksnio po centrifugavimo N baltymo neliko.

NDS-PAGE metodu atlikta analizė parodė, kad po šio gryninimo žingsnio nepakito abiejų grynintų N baltymų MM. Toliau mielėse susintetinti hPIV1 ir hPIV3 N baltymai buvo gryninti du kartus centrifuguojant CsCl tankio gradientu taip pat, kaip ir mielėse susintetintas SeV N baltymas (žr. Rezultatų dalį, skyrius 3.1.2.1.). Po pirmo centrifugavimo surinktos CsCl tankio gradientu frakcijos ir analizuotos NDS-PAGE metodu. Šiuo metodu didžiausi grynintų N baltymų kiekiai nustatyti 1.28 – 1.30 g/cm³ tankio CsCl tirpalo sluoksnyje. Šiame sluoksnyje abiejų grynintų N baltymų atvejais aptiktos tik negausios mielių ląstelės baltymų priemaišos. Taip pat įsitikinta, kad nepakito grynintų N baltymų MM. Didžiausius N baltymo kiekius turinčios frakcijos sujungtos, praskiestos 1.31 g/cm³ tankio CsCl tirpalu ir dar kartą centrifuguotos tokiomis pat sąlygomis. Po to, NDS-PAGE metodu atlikus surinktų CsCl tankio gradientu frakcijų analizę, didžiausi grynintų N baltymų kiekiai nustatyti tokio pat tankio CsCl tirpalo sluoksnyje kaip ir po pirmo centrifugavimo. Po šio gryninimo žingsnio abiem tirtais atvejais didžiausią N baltymo kiekį turinčiose frakcijose beveik neliko mielių ląstelės baltymų priemaišų. Taip pat nepakito ir grynintų N baltymų MM. Tai rodo, kad mielėse susintetinti hPIV1 ir hPIV3 N baltymai, juos gryninant, išlieka stabilūs ir nėra intensyviai degraduojami ląstelės baltymus hidrolizuojančių fermentų. Didžiausią hPIV1 N baltymo kiekį turinčios CsCl tirpalo frakcijos sujungtos ir dializuotos NFDT su 1 mM EDTA. Po dializės NDS-PAGE metodu sujungtų frakcijų mėginyje aptiktas daugiausiai tik pilno ilgio hPIV1 N baltymas (22 A pav., 3 takelis). Jo tapatybė patvirtinta BIB metodu naudojant SeV dalelėmis imunizuoto triušio kraujo serumą (22 A pav., 5 takelis). Išgryninto hPIV1 N baltymo mėginyje BIB metodu taip pat aptiktas nedidelis kiekis ~ 10 kDa trumpesnio N baltymo varianto. Naudojant vaizdo analizės programą apskaičiuotas hPIV1 N baltymo grynumas. Paaiškėjo, kad išgrynintame mėginyje hPIV1 N baltymas sudarė > 95 % nuo bendro baltymų kiekio. CsCl tankio gradientu frakcijos, kuriose buvo nustatytos didžiausios hPIV3 N baltymo koncentracijos, sujungtos ir

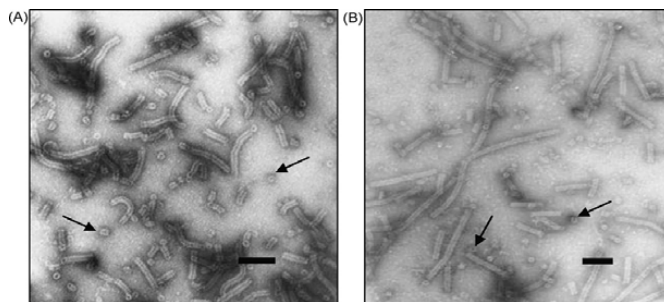
dializuotos NFDI su 1 mM EDTA. Po dializės sujungtų frakcijų mėginyje NDS-PAGE metodu aptiktas daugiausiai tik pilno ilgio hPIV3 N baltymas (22 B pav., 3 takelis), kurio tapatybė patvirtinta BIB metodu naudojant hPIV3 baltymams specifinius polikloninius ožkos antikūnus (22 B pav., 5 takelis). Išgryninto hPIV3 N baltymo mėginyje NDS-PAGE metodu taip pat buvo aptikti negausūs kiekiai baltymų, kurių: vieno MM buvo ~ 12 kDa mažesnė, antro – ~ 28 kDa mažesnė, o trečio – ~ 60 kDa didesnė nei pilno ilgio hPIV3 N baltymo MM (~ 66 kDa). Atlikus BIB analizę paaiškėjo, kad tiek mažesnės, tiek didesnės MM baltymai, SDS-PAGE metodu aptikti išgryninto hPIV3 N baltymo mėginyje, reagavo su hPIV3 baltymams specifiniais polikloniniais ožkos antikūnais. BIB metodu naudojant šiuos antikūnus taip pat buvo aptikti dar keletas dalinai sudegraduoatų hPIV3 N baltymo variantų. Tai rodo, kad mielėse susintetintas hPIV3 N baltymas jį gryninat yra negausiai degraduojamas, taip pat labai nedidelė jo dalis formuoja ~ 125 kDa MM agregatus, kuriuose N baltymai yra susijungę kovalentinėmis jungtimis. Naudojant vaizdo analizės programą apskaičiuotas hPIV3 N baltymo grynumas. Paaiškėjo, kad išgrynintame mėginyje hPIV3 N baltymas sudarė > 95 % nuo bendro baltymų kiekio. Po gryninimo gautos mielėse *S.cerevisiae* susintetintų hPIV1 ir hPIV3 N baltymų išėigos yra pateiktos rezultatus apibendrinančioje 1 lentelėje, „Rezultatų“ dalies 3.1.2.1. skyriuje.

Išgrynintų hPIV1 ir hPIV3 N baltymų koncentracijos nustatytos Bredfordo metodu. Abiem tirtais atvejais dalis išgryninto N baltymo tirpalo praskiesta gliceroliu iki 50 % tūrio ir laikyta –20°C temperatūroje, kita dalis liofilizuota ir laikyta 4°C temperatūroje. Po mėnesio baltymų mėginiai tikrinti NDS-PAGE metodu. Nustatyta, kad abiem būdais užkonservuoti išgryninti hPIV1 ir hPIV3 N baltymai gali būti saugiai laikomi ilgą laiką.

Siekiant nustatyti, ar mielėse susintetinti hPIV1 ir hPIV3 N baltymai formuoja viruso nukleokapsidę primenančias daleles, išgryninti jų mėginiai buvo tirti elektroniniu mikroskopu. EM analizė parodė, kad mielėse

susintetintas hPIV1 N baltymas formuoja vNPD, truputį lenktus 20 nm skersmens ir nuo 20 iki 200 nm ilgio vamzdelius, kurių pakraščiuose yra matomi „eglutės“ raštą primenantys susiaurėjimai (23 A pav.). Vamzdelio viduryje buvo matoma ~ 3-4 nm skersmens tamsi juosta, kuri driekėsi išilgai vamzdelio per visą jo ilgį. Kai kuriuose vamzdeliuose buvo matomi gilūs pleišto formos susiaurėjimai. Taip pat EM stebėti ir paskiri krumpliaratį primenantys nukleokapsidės spiralės žiedai, kurių išgryninto hPIV1 N baltymo mėginyje aptikta šiek tiek daugiau nei mielėse susintetinto SeV N baltymo atveju (žr. Rezultatų dalį, skyrius 3.1.2.1.). Mielėse susintetinto išgryninto hPIV3 N baltymo mėginyje EM stebėtos vNPD buvo panašios į 20 nm skersmens ir nuo 20 iki 400 nm ilgio vamzdelius su „eglutės“ raštą primenančiais susiaurėjimais, maždaug vienodu atstumu pasikartojančiais per visą vamzdelio ilgį (23 B pav.). Stebėtos mielėse susintetintų hPIV3 N baltymų formuojamos vNPD buvo mažiau lenktos ir santykinai tiesios jas lyginant su mielėse susintetintų SeV ir hPIV1 N baltymų formuojamomis vNPD. Taip pat išgryninto hPIV3 N baltymo mėginyje aptikta tik keletas nukleokapsidės spiralės žiedų. Tai rodo, kad mielėse susintetinti hPIV3 N baltymai efektyviau formuoja viruso nukleokapsidę primenančias daleles, kurios yra mažiau paslankios ir pusanthro karto arba dvigubai ilgesnės nei mielėse susintetintų SeV arba hPIV1 N baltymų formuojamos vNPD.

Įsitikinus, kad mielėse *S.cerevisiae* susintetinti hPIV1 ir hPIV3 N baltymai formuoja viruso nukleokapsidę primenančias daleles, padaryta prielaida, kad šių baltymų antigeninės savybės turėtų būti panašios į natyvių hPIV1 ir hPIV3 N baltymų antigenines savybes. Todėl mielėse susintetinti ir išgryninti hPIV1 ir hPIV3 N baltymai buvo naudoti monokloniniams pelės antikūnams, specifiniams natyviems hPIV1 ir hPIV3 N baltymams, gauti. Šis darbas buvo atliktas Biotechnologijos instituto Imunologijos ir ląstelės biologijos skyriuje vadovaujant dr. A. Žvirblienei.



23 pav. Išgrynintų mielėse *S.cerevisiae* susintetintų hPIV1 (A) ir hPIV3 (B) N baltymų elektroninės mikroskopijos. Padidinta 100.000 kartų, brūkšny – 100 nm. Rodyklėmis pažymėti nukleokapsidės spiralės žiedai.

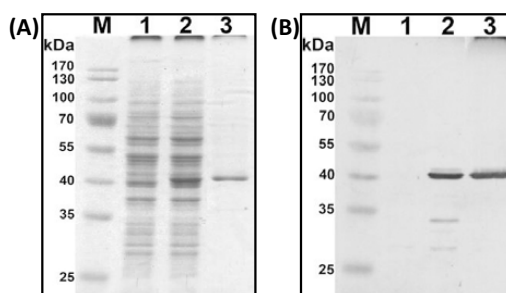
3.1.2.3. Žmogaus respiracinio sincitinio viruso nukleokapsidės baltymas

Kaip ir prieš tai šiame darbe aprašytais pirmikso virusų N baltymų sintezės mielėse atvejais, žmogaus respiracinio sincitinio viruso (hRSV) N baltymo sintezė tirta mielių *S.cerevisiae* kamieno *214Δpep4*. Sukonstruotu hRSV N baltymo sintezei mielėse *S.cerevisiae* skirtu vektoriumi *pFGG3-hRSV-N* (žr. skyrių 3.1.1., vektoriaus schema pateikta 14 D pav.) transformuotos mielės *S.cerevisiae*, kamienas *214Δpep4*, buvo padaugintos skystoje mitybinėje terpėje su formaldehidu ir po to augintos indukcijos sąlygomis taip pat kaip ir SeV N baltymo sintezės mielėse atveju (žr. Rezultatų dalį, skyrius 3.1.2.1.).

Po indukcijos, suardžius mieles, NDS-PAGE metodu buvo tirtas SLS mėginys. Šiuo metodu *pFGG3-hRSV-N* vektoriumi transformuotų mielių SLS mėginyje, jį lyginant su neigiamos kontrolės mėginiu, aptiktas ~ 44 kDa MM papildomas baltymas (24 A pav., 2 takelis). Šio baltymo MM sutapo tiek su programa apskaičiuota teorine hRSV N baltymo MM, tiek su MM, kuri, remiantis publikuotais duomenimis, tokiu pat metodu buvo nustatyta iš hRSV dalelių išskirto pilno ilgio N baltymui (Garcia-Barreno ir kt., 1996). Tai rodo, kad po indukcijos *pFGG3-hRSV-N* vektoriumi transformuotų mielių SLS aptiktas pilno ilgio hRSV N baltymas. Mielėse susintetinto baltymo tapatybė buvo patvirtinta BIB metodu naudojant hRSV baltymams specifinius polikloninius ožkos antikūnus (Chemicon, JAV) (24 B pav., 2 takelis). Tirtame

SLS mėginyje taip pat su šiais antikūnais reagavo ~ 30 ir ~ 34 kDa MM baltymai. Buvo manyta, kad šie baltymai yra iš dalies degraduoti mielėse sintetinamo hRSV N baltymo variantai. Kadangi tirtame SLS mėginyje trumpesnių hRSV N baltymo variantų buvo aptikti tik nedideli kiekiai, tai rodo, kad mielėse *S.cerevisiae* sintetinamas hRSV N baltymas yra pakankamai atsparus mielių ląstelės baltymus hidrolizuojančių fermentų poveikiui.

Įsitikinus, kad žmogaus respiracinio sincitinio viruso N baltymas yra sintetinamas mielėse *S.cerevisiae*, toliau buvo nustatytos šio baltymo sintezei optimalios indukcijos sąlygos. *pFGG3-hRSV-N* vektoriumi transformuotų mielių *S.cerevisiae* SLS išmatavus santykinį hRSV N baltymo kiekį po įvairių laiko tarpų trukusios indukcijos nustatyta, kad maksimalus šio viruso N baltymo kiekis buvo gautas mieles auginant indukcijos sąlygomis 24 val. Taip pat įsitikinta, kad indukcinėje terpėje pakėlus galaktozės koncentraciją nuo 1.5 iki 2.5 % hRSV N baltymo sintezės lygis padidėjo ~ 25 %. Toliau indukcinėje terpėje didinant galaktozės koncentraciją, tirtu N baltymo sintezės lygis išliko toks pats. Naudojant parinktas optimalias indukcijos sąlygas, SLS apskaičiuotas hRSV N baltymo kiekis sudarė 3.2 ± 0.3 % nuo bendro ląstelės baltymų kiekio.



24 pav. Mielėse *S.cerevisiae* susintetinto hRSV N baltymo analizė SDS-PAGE metodu (A) ir imunoblotingu naudojant hRSV baltymams specifinius polikloninius ožkos antikūnus (B). M – baltymų molekulinio svorio standartas (UAB „Fermentas“) 170, 130, 100, 70, 55, 40, 35 ir 25 kDa; 1 takelis – 20 µg indukuotų *pFGG3* vektoriumi transformuotų mielių *S.cerevisiae* SLS; 2 takelis – 20 µg indukuotų *pFGG3-hRSV-N* vektoriumi transformuotų mielių *S.cerevisiae* SLS; 3 takelis – 1 µg išgryninto mielėse *S.cerevisiae* susintetinto hRSV N baltymo.

Parinkus optimalias sintezės indukcijos sąlygas, toliau mielėse susintetintas hRSV buvo grynintas. Po indukcijos surinktos hRSV N baltymą

sintetinančios mielės *S.cerevisiae*, suardytos ir atskirta tirpių baltymų frakcija taip pat, kaip ir mielėse susintetinto SeV N baltymo atveju (žr. Rezultatų dalį, skyrius 3.1.2.1.). Nuo TBF atskirtos nuosėdos ištirpintos tokiame pat AT tūryje, kokiame buvo praskiestos surinktos mielių ląstelės. TBF ir ištirpintų nuosėdų mėginiai analizuoti BIB metodu naudojant hRSV baltymams specifinius polikloninius ožkos antikūnus. Atlikus BIB analizę, tik nedidelis hRSV N baltymo kiekis aptiktas nuo TBF atskirtose nuosėdose. Tai rodo, kad mielėse susintetintas hRSV N baltymas yra tirpus.

Įsitikinus, kad mielėse *S.cerevisiae* susintetintas hRSV N baltymas yra tirpus, toliau jis buvo grynintas TBF centrifuguojant per 30 % sacharozės tirpalo sluoksnį taip pat, kaip ir mielėse susintetintas SeV N baltymas (žr. Rezultatų dalį, skyrius 3.1.2.1.). Nucentrifugavus, gautos baltyminės nuosėdos ištirpintos AT ir tikrintos NDS-PAGE metodu. Didžioji dalis mielėse susintetinto hRSV N baltymo po šio gryninimo žingsnio aptikta nuosėdose ir tik nedideli kiekiai sacharozės tirpalo sluoksnyje. Taip pat nustatyta, kad tirpale virš tankaus sacharozės sluoksnio po centrifugavimo hRSV N baltymo neliko. NDS-PAGE metodu atlikta analizė parodė, kad po šio gryninimo žingsnio nepakito N baltymo MM.

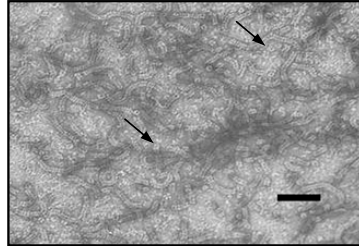
Toliau mielėse susintetintas hRSV N baltymas buvo grynintas du kartus centrifuguojant CsCl tankio gradientu taip pat, kaip ir mielėse susintetintas SeV N baltymas (žr. Rezultatų dalį, skyrius 3.1.2.1.). Nucentrifugavus du kartus surinktos CsCl tankio gradientu frakcijos ir analizuotos NDS-PAGE metodu. Šiuo metodu didžiausi gryninto N baltymo kiekiai nustatyti 1.28 – 1.29 g/cm³ tankio CsCl tirpalo sluoksnyje, kuriame buvo aptiktos tik negausios mielių ląstelės baltymų priemaišos. Taip pat įsitikinta, kad nepakito gryninto N baltymo MM. Didžiausią hRSV N baltymo kiekį turinčios CsCl tirpalo frakcijos sujungtos ir dializuotos NFDT su 1 mM EDTA. Po dializės NDS-PAGE metodu sujungtų frakcijų mėginyje aptiktas tik pilno ilgio hRSV N baltymas (24 A pav., 3 takelis). Jo tapatybė patvirtinta BIB metodu naudojant hRSV

baltymams specifinius polikloninius ožkos antikūnus (24 B pav., 3 takelis). Tirtame išgryninto N baltymo mėginyje jokie kiti baltymai su šiais antikūnais nereagavo. Padaryta prielaida, kad mielėse susintetintas hRSV N baltymas, jį gryninant, išlieka stabilus. Naudojant vaizdo analizės programą, apskaičiuotas hRSV N baltymo grynumas. Paaiškėjo, kad išgrynintame mėginyje hRSV N baltymas sudarė > 96 % nuo bendro baltymų kiekio. Po gryninimo gauta mielėse *S.cerevisiae* susintetinto hRSV N baltymo išėiga yra pateikta rezultatus apibendrinančioje 1 lentelėje, Rezultatų dalies 3.1.2.6. skyriuje.

Išgryninto hRSV N baltymo koncentracija nustatyta Bredfordo metodu. Dalis išgryninto N baltymo tirpalo praskiesta gliceroliu iki 50 % tūrio ir laikyta – 20°C temperatūroje, kita dalis liofilizuota ir laikyta 4°C temperatūroje. Po mėnesio baltymų mėginiai tikrinti NDS-PAGE metodu. Nustatyta, kad abiem būdais užkonservuotas išgrynintas hRSV N baltymas gali būti saugiai laikomas ilgą laiką.

Siekiant nustatyti, ar mielėse susintetintas hRSV N baltymas formuoja paramikso virusų nukleokapsidę primenančias daleles, išgrynintas jo mėginys buvo tirtas EM. Paaiškėjo, kad mielėse susintetintas hRSV N baltymas, taip pat, kaip ir kiti šiame darbe tirti mielėse susintetinti paramikso virusų N baltymai, formuoja vNPD (25 pav.). Tačiau hRSV N baltymo formuojami dariniai buvo panašūs į stipriai lenktus 18 nm skersmens ir nuo 20 iki 100 nm ilgio vamzdelius, kai kurie iš jų buvo susirietę net į žiedą. Tai rodo, kad mielėse susintetinto hRSV N baltymo formuojamos vNPD yra labai paslankios ir maždaug dvigubai trumpesnės nei mielėse susintetinto hPIV1 N baltymo formuojamos vNPD (žr. Rezultatų dalį, skyrius 3.1.2.2.). Stebėtų vamzdelių pakraščiuose buvo matomi „eglutės“ raštą primenantys susiaurėjimai, o viduryje ~ 2-3 nm skersmens tamsi juosta. Taip pat išgrynintame, hRSV N baltymo mėginyje EM stebėti ir nukleokapsidės spiralės žiedai, kurių tirtame mėginyje, jį lyginant su kitų šiame darbe tirtų mielėse susintetintų ir išgrynintų paramikso virusų N baltymų mėginiais, buvo palyginti daug (25 pav.). Tai rodo,

kad didelė dalis mielėse susintetintų hRSV N baltymų negeba formuoti ilgesnių nei kelios spiralės vijos viruso nukleokapsidę primenančių darinių arba šie dariniai yra nepatvarūs ir gryninimo metu subyra į nukleokapsidės spiralės žiedus. Didelė dalis žiedų buvo vos įžiūrimi, matėsi tik neryškūs jų kontūrai.



25 pav. Išgryninto mielėse *S.cerevisiae* susintetinto hRSV N baltymo elektroninė mikrofotografija. Padidinta 100.000 kartų, brūkšnys – 100 nm. Rodyklėmis pažymėti nukleokapsidės spiralės žiedai.

Įsitikinus, kad mielėse *S.cerevisiae* susintetintas hRSV N baltymas formuoja viruso nukleokapsidę primenančias daleles, padaryta prielaida, kad šio baltymo antigeninės savybės turėtų būti panašios į natyvaus hRSV N baltymo antigenines savybes. Todėl mielėse susintetintas ir išgrynintas hRSV N baltymas buvo naudotas monokloniniams pelės antikūnams gauti. Tačiau, pamėginus kelis kartus, specifinių hRSV N baltymui monokloninių antikūnų gauti nepavyko. Šis darbas buvo atliktas Biotechnologijos instituto Imunologijos ir ląstelės biologijos skyriuje, vadovaujant dr. A. Žvirblienei. Padaryta prielaida, kad mielėse susintetintas hRSV N baltymas nėra pakankamai imunogeniškas. Matyt, vien šio baltymo nepakanka sužadinti pelės imuninės sistemos atsakui, kurio metu stimuliuojami B limfocitai gamintų antigenui specifinius antikūnus. Todėl buvo nuspręsta mielėse *S.cerevisiae* susintetinti chimerinį N baltymą, sudarytą iš tymų viruso N baltymo N-dalies (1-400 ar.), sujungtos su hRSV N baltymo C-dalimi (275-392 ar.), ir šį baltymą išgryninus panaudoti specifiniams hRSV N baltymo C-dalies ar. sekai monokloniniams pelės antikūnams gauti. Mielėse susintetintas tymų viruso N baltymas yra labai imunogeniškas (Samuel ir kt., 2003). Šiuo baltymu įmunizavus peles buvo gauta daug specifinių monokloninių antikūnų, kurių

vieni reagavo su N-dalies, o kiti su C-dalies tymų viruso N baltymo ar. sekomis (Žvirblienė ir kt., 2007). Todėl buvo manyta, kad chimeriniu N baltymu imunizavus peles, imunogeniška tymų viruso N baltymo N-dalis pakankamai stipriai sužadins pelės imuninį atsaką. Tikėtasi, kad šio atsako metu taip pat bus stimuliuojami ir tie B limfocitai, kurie gamins hRSV N baltymo C-dalies ar. sekai specifinius antikūnus.

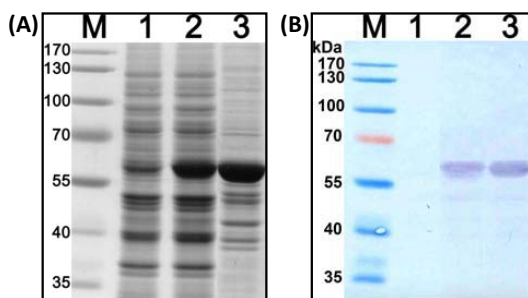
Šiam tikslui sukonstruotu chimerinio N baltymo sintezei mielėse *S.cerevisiae* skirtu vektoriumi *pFGG3-N*_(TYV-N-N1-400+hRSV-N-C275-392) (žr. skyrių 3.1.1., vektoriaus schema pateikta 17 pav.) transformuotos mielės *S.cerevisiae*, kamienas *214Δpep4*, buvo padaugintos skystoje mitybinėje terpėje su formaldehidu ir po to augintos indukcijos sąlygomis, kaip aprašyta ankščiau (žr. Rezultatų dalį, skyrius 3.1.2.1.).

Po indukcijos surinktos mielių ląstelės buvo suardytos ir NDS-PAGE metodu tirtas SLS mėginys. Šiuo metodu tirtame mėginyje, jį lyginant su neigiamos kontrolės mėginiu, buvo aptiktas papildomas ~ 60 kDa MM baltymas (26 A pav., 2 takelis), kurio MM buvo ~ 3 kDa didesnė nei programa apskaičiuota teorinė chimerinio N baltymo MM (57 kDa). Naudojant žiniatinklyje laisvai prieinamą programą (žiniatinklio svetainė Nr. 1) buvo apskaičiuota, kad chimerinis N baltymas turi palyginti didelį neigiamą krūvį (netenka krūvio, kai pH yra lygus 5.07). Turbūt todėl šis baltymas PAA gelyje veikiant elektros srovei juda lėčiau nei panašios MM baltymas NDS-PAGE analizėje naudotas kaip MM standartas. Padaryta prielaida, kad tirtoje SLS aptiktas papildomas baltymas yra pilno ilgio chimerinis N baltymas. Jo tapatybė buvo patvirtinta BIB metodu naudojant tymų viruso N baltymo N-daliai specifinius monokloninius FH1G antikūnus, gautus iš dr. A. Žvirblienės (26 B pav., 2 takelis). SLS apskaičiuotas santykinis mielėse susintetinto chimerinio N baltymo kiekis, kuris buvo lygus 10.8 ± 0.9 % nuo bendro ląstelės baltymų kiekio.

Įsitikinus, kad mielės *S.cerevisiae* sintetina chimerinį N baltymą, toliau šis baltymas buvo grynintas. Gryninimui naudotos tokios pat procedūros, kaip ir mielėse susintetinto SeV N baltymo gryninimo atveju (žr. Rezultatų dalį, skyrius 3.1.2.1.). Nucentrifugavus SLS suspensiją, buvo atskirta TBF. NDS-PAGE metodu nustatyta, kad beveik visas mielėse susintetinto chimerinio N baltymo kiekis liko TBF, tik labai nedidelė jo dalis buvo aptikta nuo TBF atskirtose nuosėdose. Tai rodo, kad mielėse susintetintas chimerinis N baltymas yra tirpus. Toliau TBF buvo centrifuguota per 30 % sacharozės tirpalo sluoksnį. Nucentrifugavus, NDS-PAGE metodu buvo nustatyta, kad grynintas chimerinis N baltymas koncentravosi pro tankų sacharozės sluoksnį prasiskverbusių baltymų formuojamose nuosėdose. Padaryta prielaida, kad mielėse susintetintas chimerinis N baltymas formuoja didelio tankio ir MM darinius. Toliau, pro sacharozės sluoksnį parsiskverbę baltymai buvo ištirpinti AT ir du kartus centrifuguoti CsCl tankio gradientu. NDS-PAGE metodu išanalizavus surinktą CsCl tankio gradiento frakcijų mėginius didžiausi chimerinio N baltymo kiekiai buvo nustatyti 1.26–1.28 g/cm³ tankio CsCl tirpalo sluoksnyje. Tai rodo, kad mielėse susintetintas chimerinis N baltymas, jį centrifuguojant CsCl tankio gradientu, koncentruojasi mažesnio tankio CsCl tirpalo sluoksnyje nei šiame darbe gryninti mielėse susintetini paramikso virusų N baltymai. Šiame sluoksnyje NDS-PAGE metodu buvo aptiktos negausios mielių ląstelės baltymų priemaišos. Taip pat įsitikinta, kad nepakito gryninto N baltymo MM. Didžiausią chimerinio N baltymo kiekį turinčios CsCl tirpalo frakcijos sujungtos ir dializuotos NFDT su 1 mM EDTA. Po dializės NDS-PAGE metodu sujungtų frakcijų mėginyje aptiktas daugiausiai pilno ilgio chimerinis N baltymas, tačiau matėsi ir negausios mielių ląstelės baltymų priemaišos (26 A pav., 3 takelis). Išgryninto chimerinio N baltymo tapatybė buvo patvirtinta BIB metodu naudojant tymų viruso N baltymo N-daliai specifinius monokloninius FH1G antikūnus (26 B pav., 3 takelis). Išgryninto chimerinio N baltymo koncentracija nustatyta Bredfordo metodu. Naudojant

vaizdo analizės programą apskaičiuotas chimerinio N baltymo grynumas. Paaiškėjo, kad išgrynintame mėginyje chimerinis N baltymas sudarė > 75 % nuo bendro baltymų kiekio.

Siekiant nustatyti, ar mielėse susintetintas chimerinis N baltymas formuoja viruso nukleokapsidę primenančias daleles, išgrynintas jo mėginys buvo tirtas EM, tačiau šiame mėginyje jokių vNPD aptikti nepavyko. Mielėse susintetintas chimerinis N baltymas, jį veikiant didele išcentrine jėga, sugeba prasiskverbi pro tankų sacharozės tirpalo sluoksnį. Tai rodo, kad jis formuoja didelio tankio ir MM darinius. Tačiau išgryninto chimerinio N baltymo mėginyje jį stebint EM jokių aiškios formos darinių aptikti nepavyko, todėl buvo padaryta prielaida, kad šio baltymo formuojami dariniai gali būti netvarkingai tarpusavyje susijungusių chimerinių N baltymų agregatai.



26 pav. Mielėse *S.cerevisiae* susintetinto chimerinio $N_{(TYV-N-N1-400+hRSV-N-C275-392)}$ baltymo analizė SDS-PAGE metodu (A) ir imunoblotingu naudojant tymų viruso N baltymo N-daliai specifinius monokloninius FH1G antikūnais (B). M – baltymų molekulinio svorio standartas (UAB „Fermentas“) 170, 130, 100, 70, 55, 40 ir 35 kDa; 1 takelis – 20 μ g (A) ir 10 μ g (B) indukuotų *pFGG3* vektoriumi transformuotų mielių *S.cerevisiae* SLS; 2 takelis – 20 μ g (A) ir 10 μ g (B) indukuotų *pFGG3-N_{(TYV-N-N1-400+hRSV-N-C275-392)}* vektoriumi transformuotų mielių *S.cerevisiae* SLS; 3 takelis – 10 μ g (A) ir 4 μ g (B) išgryninto mielėse *S.cerevisiae* susintetinto chimerinio $N_{(TYV-N-N1-400+hRSV-N-C275-392)}$ baltymo.

Nors buvo nustatyta, kad mielėse *S.cerevisiae* susintetintas chimerinis N baltymas neformuoja viruso nukleokapsidę primenančių dalelių, tačiau naudojant išgrynintą chimerinį N baltymą buvo mėginta gauti specifinius hRSV N baltymo C-dalies ar. sekai monokloninius pelės antikūnus. Pamėginus kelis kartus, specifiškai su hRSV N baltymo C-dalies ar. seka reaguojančių monokloninių antikūnų gauti nepavyko. Gali būti, kad eksperimentuose

naudotos pelės pastoviai susiduria su labai artimu virusų ir todėl į šį žmogaus viruso baltymą reaguoja kaip į savą baltymą. Šis darbas buvo atliktas Biotechnologijos instituto Imunologijos ir ląstelės biologijos skyriuje, vadovaujant dr. A. Žvirblienei.

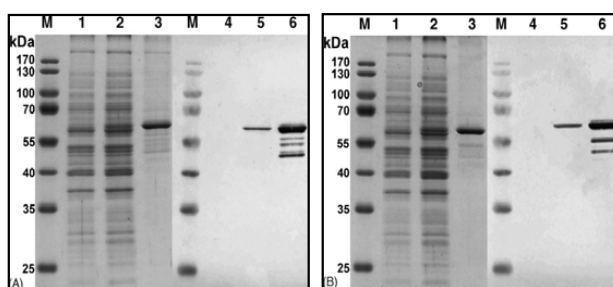
3.1.2.4. Henipah virusų nukleokapsidės baltymai

Nipah ir Hendra virusų (NiV ir HeV, kartu – Henipah virusų) N baltymų sintezė tirta mielių *S.cerevisiae* kamiene *214Δpep4*. Sukonstruotais Henipah virusų N baltymų sintezei mielėse *S.cerevisiae* skirtais vektoriais *pFGG3-NiV-N* ir *pFGG3-HeV-N* (žr. skyrių 3.1.1., vektorių schemos pateiktos 14 E ir F pav.) transformuotos *S.cerevisiae* mielės, kamienas *214Δpep4*, buvo padaugintos skystoje mitybinėje terpėje su formaldehidu ir po to augintos indukcijos sąlygomis, kaip aprašyta anksčiau (žr. Rezultatų dalį, skyrius 3.1.2.1.).

Po indukcijos, suardžius mieles, NDS-PAGE metodu tirti SLS mėginiai. Šiuo metodu vektoriais *pFGG3-NiV-N* ir *pFGG3-HeV-N* transformuotų mielių SLS mėginiuose, juos lyginant su neigiamos kontrolės mėginiu, aptikti ~ 62 kDa MM papildomi baltymai (27 A ir B pav., 2 takelis), kurių MM buvo ~ 4 kDa didesnės nei programa apskaičiuotos tirtų Henipah virusų N baltymų teorinės MM (abiems atvejais ~ 58 kDa). Padaryta prielaida, kad po indukcijos *pFGG3-NiV-N* ir *pFGG3-HeV-N* vektoriais transformuotų mielių SLS aptikti pilno ilgio NiV ir HenV N baltymai. Kadangi nebuvo galimybės gauti šiems baltymams specifinių antikūnų, todėl jų tapatybės nebuvo patvirtintos BIB metodu.

Įsitikinus, kad Henipah virusų N baltymai yra sintetinami mielėse *S.cerevisiae*, toliau buvo nustatytos šių baltymų sintezei optimalios indukcijos sąlygos. Šiems sąlygoms nustatyti SLS buvo matuojami santykiniai N baltymų kiekiai. Šiems kiekiams išmatuoti buvo naudoti Henipah virusų N baltymams specifiniai monokloniniai 1G3 antikūnai. Šie monokloniniai antikūnai buvo gauti peles imunizavus šiame darbe mielėse *S.cerevisiae* susintetintu ir išgrynintu NiV N baltymu. Henipah virusų N baltymų sintezė mielėse tirta po

8, 12, 16, 20, 24, 28 ir 32 val trukusios indukcijos taip pat, kaip ir SeV N baltymo atveju (žr. Rezultatų dalį, skyrius 3.1.2.1.). Po indukcijos, suardžius mielių ląsteles ir SLS išmatavus santykinį N baltymo kiekį nustatyta, kad abiem tirtais atvejais N baltymo kiekis sparčiai didėjo mieles auginant indukcijos sąlygomis 16 val, o savo maksimumą pasiekė po 24 val Toliau buvo nustatyta, kad abiem tirtais atvejais indukcinėje terpėje padidinus galaktozės kiekį nuo 1.5 iki 2.5 % tirtų N baltymų sintezės lygis padidėjo ~ 25 %. Naudojant parinktas optimalias indukcijos sąlygas, SLS apskaičiuoti NiV ir HeV N baltymų kiekiai sudarė $5.3 \pm 0.6 \%$ ir $5.3 \pm 0.4 \%$ nuo bendro ląstelės baltymų kiekio.



27 pav. Mielėse *S.cerevisiae* susintetintų NiV ir HeV N baltymų analizė SDS-PAGE metodu (A ir B, 1-3 takeliai) ir imunoblotingu naudojant Henipah virusų N baltymams specifiniais monokloninius 1G3 antikūnus (A ir B, 4-6 takeliai). M – baltymų molekulinio svorio standartas (UAB „Fermentas“) 170, 130, 100, 70, 55, 40, 35 ir 25 kDa; 1 ir 4 takeliai – 20 μ g indukuotų *pFGG3* vektoriumi transformuotų mielių *S.cerevisiae* SLS; 2 ir 5 takeliai – 20 μ g indukuotos *pFGG3-NiV-N* vektoriumi transformuotų mielių *S.cerevisiae* SLS; 3 ir 6 takeliai – 2 μ g išgryninto mielėse *S.cerevisiae* susintetinto NiV N baltymo. (B) SDS-PAGE (1-3) ir imunoblotingas su Henipah virusų N baltymams specifiniais monokloniniais 1G3 antikūnais (4-6). M – baltymų molekulinio svorio standartas (UAB „Fermentas“) 170, 130, 100, 70, 55, 40, 35 ir 25 kDa; 1 ir 4 takeliai – 20 μ g indukuotų *pFGG3* vektoriumi transformuotų mielių *S.cerevisiae* SLS; 2 ir 5 takeliai – 20 μ g induktų *pFGG3-HeV-N* vektoriumi transformuotų mielių *S.cerevisiae* SLS; 3 ir 6 takeliai – 2 μ g išgryninto mielėse *S.cerevisiae* susintetinto HeV N baltymo.

Ištyrinėjus, kad mielės *S.cerevisiae* sintetina Henipah virusų N baltymus ir parinkus šių baltymų sintezei optimalias indukcijos sąlygas, toliau šie baltymai buvo gryninti. Gryninimui naudotos tokios pat procedūros, kaip ir mielėse susintetinto SeV N baltymo gryninimo atveju (žr. Rezultatų dalį, skyrius 3.1.2.1.). Nucentrifugavus SLS suspensiją ir atskyrus TBF, NDS-PAGE metodu nustatyta, kad abiem tirtais atvejais didžioji dalis mielėse susintetintų N baltymų liko TBF. Toliau TBF buvo centrifuguota per 30 % sacharozės tirpalo

sluoksni. Nucentrifugavus, NDS-PAGE metodu buvo įsitikinta, kad abiem tirtais atvejais gryninti N baltymai koncentravosi pro tankų sacharozės sluoksni prasiskverbusių baltymų formuojamose nuosėdose. Pro sacharozės sluoksni parsiskverbę baltymai buvo ištirpinti AT ir du kartus centrifuguoti CsCl tankio gradiente. NDS-PAGE metodu išanalizavus surinktų CsCl tankio gradiento frakcijų mėginius abiem tirtais atvejais didžiausi N baltymo kiekiai buvo nustatyti 1.28 – 1.30 g/cm³ tankio CsCl tirpalo sluoksnyje. Taip pat šiame sluoksnyje abiem tirtais atvejais buvo aptiktos ir negausios mielių ląstelės baltymų priemaišos. Įsitikinta, kad nepakito ir grynintų N baltymų MM. Didžiausius NiV N baltymo kiekius turinčios CsCl tirpalo frakcijos sujungtos ir dializuotos NFDT su 1 mM EDTA. Po dializės NDS-PAGE metodu sujungtų frakcijų mėginyje buvo aptiktas daugiausia tik pilno ilgio NiV N baltymas (27 A pav., 3 takelis). Tai pat tirtame mėginyje buvo nustatytos ir negausios mielių ląstelės baltymų priemaišos bei iš dalies degraduoti trumpesnio ilgio NiV N baltymo variantai, kurių tapatybė buvo patvirtinta BIB metodu naudojant Henipah virusų N baltymams specifinius monokloninius 1G3 antikūnus (27 A pav., 6 takelis). Tai rodo, kad nedidelė dalis mielėse susintetinto NiV N baltymo yra sudegraduojama gryninimo procedūrų metu. Naudojant vaizdo analizės programą apskaičiuotas NiV N baltymo grynumas. Paaiškėjo, kad išgrynintame mėginyje NiV N baltymas sudarė 88 % nuo bendro baltymų kiekio. CsCl tankio gradiento frakcijos, kuriose buvo nustatytos didžiausios HeV N baltymo koncentracijos, sujungtos ir dializuotos NFDT su 1 mM EDTA. Po dializės NDS-PAGE metodu sujungtų frakcijų mėginyje taip pat buvo aptiktas daugiausia tik pilno ilgio HeV N baltymas (27 B pav., 3 takelis), tačiau, kaip ir NiV N baltymo atveju, išgrynintame mėginyje buvo nustatytas nedidelis kiekis mielių ląstelės baltymų priemaišų ir nedideli kiekiai iš dalies sudegradotų trumpesnių HeV N baltymo variantų, kurių tapatybė buvo patvirtinta BIB metodu (27 B pav., 6 takelis). Naudojant vaizdo analizės programą apskaičiuotas HeV N baltymo grynumas. Paaiškėjo, kad

išgrynintame mėginyje HeV N baltymas sudarė 90 % nuo bendro baltymų kiekio. Po gryninimo gautos mielėse *S.cerevisiae* susintetintų Henipah virusų N baltymų išėigos yra pateiktos rezultatus apibendrinančioje 1 lentelėje, Rezultatų dalies 3.1.2.6. skyriuje.

Išgrynintų Henipah virusų N baltymų koncentracijos nustatytos Bredfordo metodu. Abiem tirtais atvejais dalis išgryninto N baltymo tirpalo buvo praskiesta gliceroliu iki 50 % tūrio ir laikyta –20°C temperatūroje, kita dalis liofilizuota ir laikyta 4°C temperatūroje. Po mėnesio baltymų mėginiai tikrinti NDS-PAGE metodu. Nustatyta, kad abiem būdais užkonservuoti išgryninti Henipah virusų N baltymai gali būti saugiai laikomi ilgą laiką.

Siekiant patvirtinti mielėse susintetintų Henipah virusų N baltymų tapatybes, išgryninti Henipah virusų N baltymai buvo analizuoti tandeminės masių spektrometrijos (MS/MS) metodu. Ši analizė buvo atlikta Australijos gyvūnų sveikatos priežiūros laboratorijoje (AGSPL), Australijoje. Išgryninti Henipah virusų N baltymai vienu atveju veikti tripsinu, kitu – chimotripsinu ir trečiu –endopeptidaze AspN (16 val 37°C). Po N baltymų hidrolizės gauti peptidai atvirkštinių fazių chromatografijos metodu atskirti Vydac C18 kolonėlėje (Grace Davison, JAV), aukšto slėgio skysčių chromatografijos sistemoje Surveyor-MS (Thermo, JAV) (Juozapaitis ir kt., 2007b). Atvirkštinių fazių chromatografijos metodu atskyrus peptidus, jų fragmentų masių spektrai buvo nustatyti naudojant LCQ keturių polių jonų-spąstų masės spektrometrą (Thermo, JAV) (Juozapaitis ir kt., 2007b). Nustatyti peptidų fragmentų masių spektrai buvo įvertinti ir palyginti su baltymų duomenų bazėje esančiais neapdorotais žinomos sekos peptidų fragmentų masių spektrais *in sillico* algoritmu Sequest (Eng ir kt., 2008) (Thermo, JAV). Pagal fragmentų masių spektrą nustatytos peptidų sekos palygintos su GenBank duomenų bazėje esančiomis baltymų sekomis ir su nedideliu skaičiumi Henipah virusų N baltymų sekų. Labiausiai su Henipah virusų N baltymų sekomis sutampantys peptidai, kurių panašumo lygmuo (Xcorr) apskaičiuotas algoritmu Sequest

buvo didesnis už 2, priskirti tirtų N baltymų ar. sekoms. MS/MS metodu abiem tirtais atvejais pavyko nustatyti 92 % mielėse susintetinto N baltymo sekos. 28 paveiksle šiuo metodu nustatytos mielėse susintetintų Henipah virusų N baltymų sekos yra paryškintos. Taip pat MS/MS metodu buvo nustatyta, kad abiem tirtais atvejais mielėse sintetinamas N baltymas yra modifikuojamas pašalinant metioniną ir acetilinant antroje pozicijoje esantį seriną. Yra žinoma, kad taip pat yra modifikuojami natyvūs Menangle ir Hendra virusų N baltymai (Shiell ir kt., 2002).

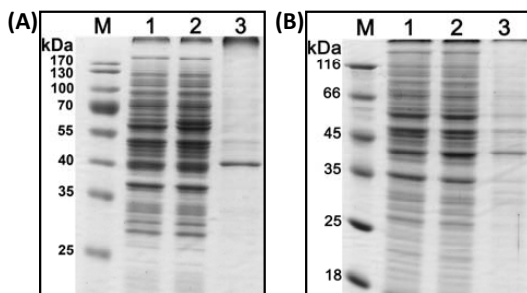
Siekiant nustatyti, ar mielėse susintetinti Henipah virusų N baltymai formuoja viruso nukleokapsidę primenančias daleles, išgryninti jų mėginiai buvo tirti elektroniniu mikroskopu. EM analizė parodė, kad, skirtingai nei kiti šiame darbe mielėse susintetinti paramikso virusų N baltymai, mielėse susintetinti Henipah virusų N baltymai daugiausia formuoja tik nukleokapsidės spiralės žiedus, sudarytus iš vienos ar kelių spiralės vijų (30 A ir B pav.). Taip pat, abiem tirtais atvejais, išgrynintą N baltymo mėginį stebint EM matėsi ir paramikso virusų nukleokapsidę primenančios dalelės, tačiau šių darinių, jų skaičių lyginant su nukleokapsidės spiralės žiedų skaičiumi, tirtuose mėginiuose buvo nedaug (30 A ir B pav.). Šiek tiek daugiau vNPD matėsi EM stebint išgryninto NiV N baltymo mėginį (30 A pav.). Tai rodo, kad didžioji dalis mielėse susintetintų Henipah virusų N baltymų negeba formuoti ilgesnių nei kelios spiralės vijos viruso nukleokapsidę primenančių spiralinių darinių arba šie dariniai yra nepatvarūs ir gryninimo metu subyra į nukleokapsidės spiralės žiedus. Mielėse susintetintų Henipah virusų N baltymų formuojamos vNPD buvo panašios į šiek tiek lenktus 20 nm skersmens ir nuo 20 iki 100 nm ilgio vamzdelius, kurių pakraščiai turi „eglutės“ raštą primenančius susiaurėjimus, o viduryje matosi ~ 3-4 nm skersmens tamsi juosta, besidriekianti išilgai vamzdelio per visą jo ilgį.

		1		50
NiV N	(1)	MSDIFDEAASFRSYQSKLGRDGRASAATATLTKIRIFVPATNSPELRWE		
HeV N	(1)	MSDIFDEAASFRSYQSKLGRDGRASAATATLTKIRIFVPATNSPELRWE		
		51		100
NiV N	(51)	LTLFALDVIRSPSAAESMKVGAFTLISMYSERPGALIRSLNDPDIEAV		
HeV N	(51)	LTLFALDVIRSPSAAESMKVGAFTLISMYSERPGALIRSLNDPDIEAV		
		101		150
NiV N	(101)	IIDVGSMLNGIPVMERRGDKAQEEMEGLMRLLKTAPESSKGGKTPFVDSRA		
HeV N	(101)	IIDVGSMLNGIPVMERRGDKAQEEMEGLMRLLKTAPESSKGGKTPFVDSRA		
		151		200
NiV N	(151)	YGLRITDMSTLVSAVITIEAQIWILLAKAVTAPDTAEESSTRRWAKYVQQ		
HeV N	(151)	YGLRITDMSTLVSAVITIEAQIWILLAKAVTAPDTAEESSTRRWAKYVQQ		
		201		250
NiV N	(201)	FRVNFALTOQWLTEMNLLSQSLSVRKFVMEILLEVKKGGSAGRAVEI		
HeV N	(201)	FRVNFALTOQWLTEMNLLSQSLSVRKFVMEILLEVKKGGSAGRAVEI		
		251		300
NiV N	(251)	ISDIGNYVEETGMAGFFATIRFGLETRYPALALNEFQSDLNTIKSLMLLY		
HeV N	(251)	ISDIGNYVEETGMAGFFATIRFGLETRYPALALNEFQSDLNTIKSLMLLY		
		301		350
NiV N	(301)	REIGPRAPYMLLEESIQTKEFAPGGYPLLWSFAMGVATTIDRSMGALNIN		
HeV N	(301)	REIGPRAPYMLLEESIQTKEFAPGGYPLLWSFAMGVATTIDRSMGALNIN		
		351		400
NiV N	(351)	RGYLEPMYFRLGQKSARHHAGGIDQNMANKLGTSSDQVAELAAAVQETS		
HeV N	(351)	RGYLEPMYFRLGQKSARHHAGGIDQNMANKLGTSSDQVAELAAAVQETS		
		401		450
NiV N	(401)	GROENNVQAREAKFAAGGVLGGGQDIDEEEPTEHSGRQSVTFKREMS		
HeV N	(401)	GROENNVQAREAKFAAGGVLGGGQDIDEEEPTEHSGRQSVTFKREMS		
		451		500
NiV N	(451)	SSLADSVFPSSSVSTSGGTRLTNSLLNLRSLAAKAKETASNAITDIPA		
HeV N	(451)	SSLADSVFPSSSVSTSGGTRLTNSLLNLRSLAAKAKETASNAITDIPA		
		501		531
NiV N	(501)	ISNRTQGESEKKNOLKPAQNLDLDFRADV		
HeV N	(500)	PNRFPQADSGRKKDDQEPKPAQNLDLDFRADV		

28 pav. Palygintos NiV N baltymo (Chua ir kt., 2000; atpažinimo numeris: AF212302) ir HeV N baltymo (Wang ir kt., 2000; atpažinimo numeris: AF017149) amino rūgščių sekos. Pabrauktos sekos buvo nustatytos MS/MS metodu.

Žinoma, kad paramikso virusų N baltymo N-dalies amino rūgščių seka (a.r. 1-399) formuoja kompaktišką erdvinę struktūrą, todėl ši N baltymo dalis yra atspari net kai kurių peptidazių poveikiui, o C-dalies amino rūgščių sekos (a.r. nuo 400 iki galo) erdvinė struktūra yra nekompaktiška, kintanti ir jautri peptidazių poveikiui (Habchi ir kt., 2010). Su N baltymo C-dalies amino rūgščių seka sąveikauja net keletas kitų viruso ir ląstelės baltymų, todėl C-dalis kompaktiškiau susilanksto tik tuomet, kai ji susijungia su kitu viruso baltymu (Habchi ir kt., 2010). Buvo padaryta prielaida, kad būtent paslanki N baltymo C-dalis mielėse sintetiniams Henipah virusų N baltymams trukdo rinktis į ilgesnį nei kelios spiralės vijos darinį. Šiai prielaidai patikrini mielėse *S.cerevisiae* buvo susintetinti ir išgryninti Henipah virusų N baltymų variantai su pašalinta C-dalimi (abiem atvejais ar. 1-400). Šiam tikslui sukonstruotais NiV ir HeV N baltymų be C-dalies sintezei mielėse *S.cerevisiae* skirtais vektoriais *pFGG3-NiV-N_(N1-399)* ir *pFGG3-HeV-N_(N1-399)* (žr. skyrių 3.1.1., vektorių schemas pateiktos 15 A ir B pav.) transformuotos mielės *S.cerevisiae*,

kamienas *214Δpep4*. Šie baltymai buvo susintetinti mielėse, o po to išgryninti taip pat, kaip ir pilno ilgio Henipah virusų N baltymai (29 A ir B pav.).

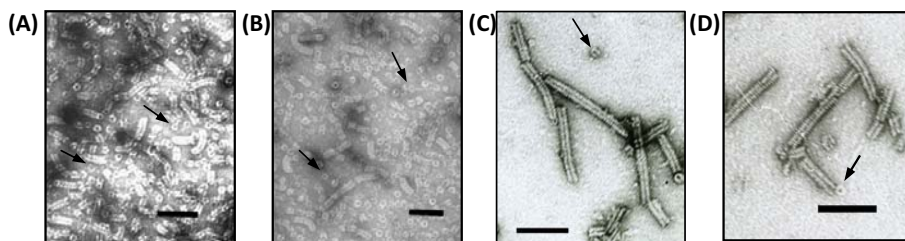


29 pav. Mielėse *S.cerevisiae* susintetintu NiV N_(N1-399) (A) ir HeV N_(N1-399) (B) baltymų analizė SDS-PAGE metodu. (A): M – baltymų molekulinio svorio standartas (UAB „Fermentas“) 170, 130, 100, 70, 55, 40, 35 ir 25 kDa; 1 takelis – 20 μg indukuotų *pFGG3* vektoriūmi transformuotų mielių *S.cerevisiae* SLS; 2 takelis – 20 μg indukuotos *pFGG3-NiV-N_(N1-399)* vektoriūmi transformuotų mielių *S.cerevisiae* SLS; 3 takelis – 1 μg išgryninto mielėse *S.cerevisiae* susintetinto NiV N_(N1-399) baltymo. (B): M – baltymų molekulinio svorio standartas (UAB „Fermentas“) 116, 66, 45, 35, 25 ir 18 kDa; 1 takelis – 20 μg indukuotų *pFGG3* vektoriūmi transformuotų mielių *S.cerevisiae* SLS; 2 takelis – 20 μg indukuotos *pFGG3-HeV-N_(N1-399)* vektoriūmi transformuotų mielių *S.cerevisiae* SLS; 3 takelis – 1 μg išgryninto mielėse *S.cerevisiae* susintetinto HeV N_(N1-399) baltymo.

Stebint išgrynintus Henipah virusų N baltymų be C-dalies mėginius EM matėsi tik virusų nukleokapsidę primenantys ilgi dariniai, tačiau šių į tiesius vamzdelius panašių darinių pakraščiuose nesimatė aiškių „eglutės“ raštą primenančių susiaurėjimų (30 C ir D pav.). Stebėti vamzdeliai buvo 2 nm siauresni (18 nm) nei pilno ilgio mielėse susintetintų Henipah virusų N baltymų formuojamos vNPD ir nuo 50 iki 400 nm ilgio, o jų viduryje matėsi ~ 3-4 nm skersmens tamsi juosta. Stebėtuose mėginiuose buvo aptikta vos keletas nukleokapsidės spiralės žiedų. Tai rodo, kad mielėse sintetunami Henipah virusų N baltymai be C-dalies labai efektyviai renkasi į ilgą nukleokapsidines spirales, kurios yra nepaslankios ir patvarios.

Įsitikinus, kad mielėse *S.cerevisiae* susintetinti Henipah virusų N baltymai formuoja viruso nukleokapsidę primenančias daleles, padaryta prielaida, kad šių baltymų antigeninės savybės turėtų būti panašios į natyvių Henipah virusų N baltymų antigenines savybes. Todėl mielėse susintetinti ir išgryninti Henipah virusų N baltymai buvo naudoti monokloniniams pelės antikūnams,

specifiniams natyviems Henipah virusų N baltymams, gauti. Šis darbas buvo atliktas Biotechnologijos instituto Imunologijos ir ląstelės biologijos skyriuje vadovaujant dr. A. Žvirblienei.



30 pav. Išgrynintų mielėse *S.cerevisiae* susintetintų NiV N (A), HeV N (B), NiV N_(N1-399) (C) ir HeV N_(N1-399) (D) baltymų elektroninės mikrofotografijos. Padidinta 100.000 kartų, brūkšny – 100 nm. Rodyklėmis pažymėti nukleokapsidės spirales žiedai.

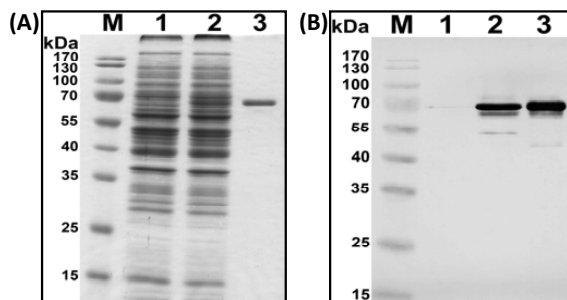
3.1.2.5. Menangle viruso nukleokapsidės baltymas

Menangle viruso (MenV) N baltymo sintezė tirta mielių *S.cerevisiae* kamiene *214Δpep4*. Sukonstruotu MenV N baltymo sintezei mielėse *S.cerevisiae* skirtu vektoriumi *pFGG3-MenV-N* (žr. skyrių 3.1.1., vektoriaus schema pateikta 14 G pav.) transformuotos mielės *S.cerevisiae*, kamienas *214Δpep4*, buvo padaugintos skystoje mitybinėje terpėje su formaldehidu ir po to augintos indukcijos sąlygomis, kaip aprašyta anksčiau (žr. Rezultatų dalį, skyrius 3.1.2.1.).

Po indukcijos, suardžius mieles, NDS-PAGE metodu tirtas SLS mėginys. Šiuo metodu vektoriumi *pFGG3-MenV-N* transformuotų mielių SLS mėginyje, jį lyginant su neigiamos kontrolės mėginiu, aptiktas ~ 67 kDa MM papildomas baltymas, kurio MM buvo ~ 8 kDa didesnės nei programa apskaičiuota MenV N baltymo teorinė MM (~ 59 kDa) (31 A pav. 2 takelis). Naudojant programą tai pat buvo apskaičiuota, kad MenV N baltymas turi palyginti didelį neigiamą krūvį (netenka krūvio, kai pH yra lygus 4.94). Turbūt todėl šis baltymas PAA gelyje veikiant elektros srovei juda lėčiau nei panašios MM baltymas NDS-PAGE analizėje naudotas kaip MM standartas. Padaryta prielaida, kad po indukcijos *pFGG3-MenV-N* vektoriumi transformuotų mielių SLS aptiktas pilno

ilgio MenV N baltymas. Kadangi nebuvo galimybės gauti šiam baltymui specifinių antikūnų, todėl jo tapatybė nebuvo patvirtinta BIB metodu.

Įsitikinus, kad MenV N baltymas yra sintetinamas mielėse *S.cerevisiae*, toliau buvo nustatytos šio baltymo sintezei optimalios indukcijos sąlygos. Šioms sąlygoms nustatyti SLS buvo matuojamas santykinis MenV N baltymo kiekis. Šiam kiekiui išmatuoti buvo naudoti MenV N baltymui specifiniai monokloniniai 2D1 antikūnai (Žvirblienė ir kt., 2010). Šie monokloniniai antikūnai buvo gauti peles imunizavus šiame darbe mielėse *S.cerevisiae* susintetintu ir išgrynintu MenV N baltymu. SLS išmatavus santykinį MenV N baltymo kiekį po įvairių laiko tarpų trukusios indukcijos nustatyta, kad maksimalus šio viruso N baltymo kiekis buvo gautas mieles auginant indukcijos sąlygomis 24 val. Toliau buvo nustatyta, kad indukcinėje terpėje padidinus galaktozės koncentraciją nuo 1.5 iki 2.5 % MenV N baltymo sintezės lygis padidėjo ~ 25 %. Naudojant parinktas optimalias indukcijos sąlygas, SLS apskaičiuotas MenV N baltymo kiekis sudarė 1.8 ± 0.2 % nuo bendro ląstelės baltymų kiekio.



31 pav. Mielėse *S.cerevisiae* susintetinto MenV N baltymo analizė SDS-PAGE metodu (A) ir imunoblotingu naudojant MenV N baltymui specifiniais monokloninius 2D1 antikūnus (B). M – baltymų molekulinio svorio standartas (UAB „Fermentas“) 170, 130, 100, 70, 55, 40, 35, 25 ir 15 kDa; 1 takelis – 20 µg indukuotų *pFGG3* vektoriūmi transformuotų mielių *S.cerevisiae* SLS; 2 takelis – 20 µg indukuotų *pFGG3-MenV-N* vektoriūmi transformuotų mielių *S.cerevisiae* SLS; 3 takelis – 1 µg išgryninto mielėse *S.cerevisiae* susintetinto MenV N baltymo.

Įsitikinus, kad mielės *S.cerevisiae* sintetina MenV N baltymą ir parinkus šio baltymo sintezei optimalias indukcijos sąlygas, toliau šis baltymas buvo grynintas. Gryninimui naudotos tokios pat procedūros, kaip ir mielėse

susintetinto SeV N baltymo gryninimo atveju (žr. Rezultatų dalį, skyrius 3.1.2.1.). Nucentrifugavus SLS suspensiją ir atskyrus TBF, NDS-PAGE metodu nustatyta, kad didžioji dalis mielėse susintetinto MenV N baltymo liko TBF. Toliau TBF buvo centrifuguota per 30 % sacharozės tirpalo sluoksnį. Nucentrifugavus, NDS-PAGE metodu buvo įsitikinta, kad MenV N baltymas koncentravosi pro tankų sacharozės sluoksnį prasiskverbusių baltymų formuojamose nuosėdose. Pro sacharozės sluoksnį parsiskverbę baltymai buvo ištirpinti AT ir du kartus centrifuguoti CsCl tankio gradientu. NDS-PAGE metodu išanalizavus surinktų CsCl tankio gradiento frakcijų mėginius didžiausi MenV N baltymo kiekiai buvo nustatyti 1.29 – 1.31 g/cm³ tankio CsCl tirpalo sluoksnyje. Šiame sluoksnyje nebuvo aptiktos ląstelės baltymų priemaišos ir įsitikinta, kad nepakito gryninto N baltymo MM. Didžiausius MenV N baltymo kiekius turinčios CsCl tirpalo frakcijos sujungtos ir dializuotos NFDT su 1 mM EDTA. Po dializės NDS-PAGE metodu sujungtų frakcijų mėginyje buvo aptiktas tik pilno ilgio NiV N baltymas (31 A pav. 3 takelis). Taip pat tirtame mėginyje BIB metodu naudojant MenV N baltymui specifinius monokloninius 2D1–B antikūnus buvo nustatyti labai nedideli kiekiai iš dalies sudegraduočių trumpesnio ilgio MenV N baltymo variantų (31 B pav. 3 takelis). Tai rodo, kad mielėse susintetintas MenV N baltymas yra stabilus ir nėra sudegraduojamas gryninimo procedūrų metu. Naudojant vaizdo analizės programą apskaičiuotas MenV N baltymo grynumas. Paaiškėjo, kad išgrynintame mėginyje MenV N baltymas sudarė >96 % nuo bendro baltymų kiekio. Po gryninimo gauta mielėse *S.cerevisiae* susintetinto MenV N baltymo išėiga yra pateikta rezultatus apibendrinančioje 1 lentelėje, Rezultatų dalies 3.1.2.6. skyriuje.

Išgryninto MenV N baltymo koncentracija nustatyta Bredfordo metodu. Dalis išgryninto N baltymo tirpalo buvo praskiesta gliceroliu iki 50 % tūrio ir laikyta –20°C temperatūroje, kita dalis liofilizuota ir laikyta 4°C temperatūroje. Po mėnesio baltymo mėginys tikrintas NDS-PAGE metodu. Nustatyta, kad

abiem būdais užkonservuotas išgrynintas MenV N baltymas gali būti saugiai laikomas ilgą laiką.

Siekiant patvirtinti mielėse susintetinto MenV N baltymo tapatybę, išgrynintas MenV N baltymas buvo analizuotas MS/MS metodu taip pat, kaip ir mielėse susintetinti ir išgryninti Henipah virusų N baltymai (žr. Rezultatų dalį, skyrius 3.1.2.4.) (Juozapaitis ir kt., 2007a). Ši analizė buvo atlikta Australijos gyvūnų sveikatos priežiūros laboratorijoje (AGSPL), Australijoje. MS/MS metodu pavyko nustatyti 87 % mielėse susintetinto N baltymo sekos. 32 paveiksle šiuo metodu nustatyta mielėse susintetinto MenV N baltymo seka yra paryškinta. Taip pat MS/MS metodu buvo nustatyta, kad mielėse sintetinas MenV N baltymas yra modifikuojamas pašalinant metioniną ir acetilinant antroje pozicijoje esantį seriną. Yra žinoma, kad taip pat yra modifikuojami natyvūs Menangle ir Hendra virusų N baltymai (Shiell ir kt., 2002).

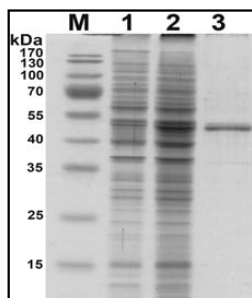
	1	50
MenV N (1)	MSVFRAFELFTLEQEQNEHGNDIELPPETLRTNIKVCTLNNQEPQARHD	
	51	100
MenV N (51)	MMCFCRLRIASNSARAHAHKTGAILTLLSLPTAMMQNHLRIADRSPPADIE	
	101	150
MenV N (101)	RLEIDGFEPGTFRLRANARTPMTNGEVTALNLMAQDLPDTYSNDTPFLNE	
	151	200
MenV N (151)	NTETEQCDEMEQFLNAIYSVLVQVWVTVCKCMTAHDQPTGSDERRLAKYQ	
	201	250
MenV N (201)	QOGRLDQRVALQPELRRQIQTCIRSSLTIRQFLTHELOTARKQGAITGKY	
	251	300
MenV N (251)	YAMVGDIGKYIDNAGMSAFFMTMRFALGTRKWPPLAALAFSGELLKLSIM	
	301	350
MenV N (301)	QLYRGLGDRARYMALLEMSEMMEFAPANYPLCYSYAMGIGSVQDPMRNY	
	351	400
MenV N (351)	TFARPFLLNPAYFQLGVETANRQQGSVDKAMAAELGLTEDEKRDMSAAVTR	
	401	450
MenV N (401)	LTTGRGGNQAQELINVMGARQGRDQGRGNFDYDVVEENEETESDSDNDE	
	451	500
MenV N (451)	ECETONRPLPPIQMPQONIDWEVRLAEIERNQOQAARDRPOAVVTADVH	
	501	519
MenV N (501)	QEPVDARVDEQDMLLDLDM	

28 pav. MenV N baltymo (Bowden ir kt., 2001; atpažinimo numeris: AF326114) amino rūgščių seka. Pabrauktos sekos buvo nustatytos MS/MS metodu.

Siekiant nustatyti, ar mielėse susintetintas MenV N baltymas formuoja viruso nukleokapsidę primenančias daleles išgrynintas jo mėginys buvo tirtas elektroniniu mikroskopu. EM analizė parodė, kad MenV N baltymas taip pat, kaip ir mielėse susintetinti Henipah virusų N baltymai, daugiausia formuoja tik nukleokapsidės spiralės žiedus, sudarytus iš vienos ar kelių spiralės vijų (34 A

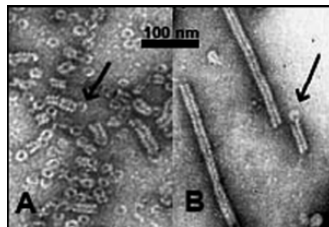
pav.). Išgryninto N baltymo mėginyje jį stebint EM matėsi vos keli turintys daugiau nei kelias vijas paramikso virusų nukleokapsidę primenantys dariniai. Tai rodo, kad didžioji dalis mielėse susintetinto MenV N baltymo negeba formuoti ilgesnių nei kelios spiralės vijos viruso nukleokapsidę primenančių spiralinių darinių arba šie dariniai yra nepatvarūs ir gryninimo metu subyra į nukleokapsidės spiralės žiedus. Mielėse susintetinto MenV N baltymo formuojamos vNPD buvo panašios į trumpus vos 50 nm ilgio ir 20 nm skersmens vamzdelius, kurių pakraščiai turi „eglutės“ raštą primenantčius susiaurėjimus, o viduryje matosi ~ 3-4 nm skersmens tamsi juosta. Tai pat, kaip ir mielėse susintetintų Henipah virusų N baltymų atvejais, buvo padaryta prielaida, kad būtent paslanki MenV N baltymo C-dalis mielėse sintetinamam MenV N baltymui trukdo formuoti viruso nukleokapsidę primenantčius spiralinius darinius, kurie būtų ilgesni nei kelios spiralės vijos. Šiai prielaidai patikrini mielėse *S.cerevisiae* buvo susintetintas ir išgrynintas MenV N baltymo variantas su pašalinta C-dalimi (a.r. 1-399).

Šiam tikslui sukonstruotu MenV N baltymo be C-dalies sintezei mielėse *S.cerevisiae* skirtu vektoriumi *pFGG3-MenV-N_(N1-399)* (žr. skyrių 3.1.1., vektoriaus schema pateikta 15 C pav.) transformuotos mielės *S.cerevisiae*, kamienas *214Δpep4*. Šis baltymas buvo susintetintas mielėse, o po to išgrynintas taip pat, kaip ir pilno ilgio MenV N baltymas (33 pav.).



33 pav. Mielėse *S.cerevisiae* susintetinto MenV N_(N1-399) baltymo analizė SDS-PAGE metodu. M – baltymų molekulinio svorio standartas (UAB „Fermentas“) 170, 130, 100, 70, 55, 40, 35, 25 ir 15 kDa; 1 takelis – 20 μg indukuotų *pFGG3* vektoriumi transformuotų mielių *S.cerevisiae* SLS; 2 takelis – 20 μg indukuotos *pFGG3-MenV-N_(N1-399)* vektoriumi transformuotų mielių *S.cerevisiae* SLS; 3 takelis – 1 μg išgryninto mielėse *S.cerevisiae* susintetinto MenV N_(N1-399) baltymo.

Stebint išgryninto MenV N baltymo be C-dalies mėginį EM matėsi tik ilgi virusų nukleokapsidę primenančios dalelės (34 B pav.). Šių į tiesius vamzdelius panašių darinių pakraščiuose nesimatė aiškių „eglutės“ raštą primenančių susiaurėjimų. Stebėti vamzdeliai buvo 2 nm siauresni (18 nm) nei pilno ilgio mielėse susintetinto MenV N baltymo formuojamos vNPD ir nuo 50 iki 400 nm ilgio. Stebėtame mėginyje buvo aptikta vos keletas nukleokapsidės spiralės žiedų. Tai rodo, kad mielėse susintetinti MenV N baltymai be C-dalies, tai pat, kaip ir analogiški Henipah virusų N baltymai, labai efektyviai formuoja ilgą nukleokapsidines spirales, kurios yra nepaslankios ir patvarios.



34 pav. Išgrynintų mielėse *S.cerevisiae* susintetintų MenV N (A) ir N_(N1-399) (B) baltymų elektroninės mikroskopijos. Padidinta 100.000 kartų, brūkšny – 100 nm. Rodyklėmis pažymėti nukleokapsidės spiralės žiedai.

Įsitikinus, kad mielėse *S.cerevisiae* susintetintas MenV N baltymas formuoja viruso nukleokapsidę primenančias daleles, padaryta prielaida, kad šio baltymo antigeninės savybės turėtų būti panašios į natyvaus MenV N baltymo antigenines savybes. Todėl mielėse susintetintas ir išgrynintas MenV N baltymas buvo naudotas monokloniniams pelės antikūnams gauti. Šis darbas buvo atliktas Biotechnologijos instituto Imunologijos ir ląstelės biologijos skyriuje, vadovaujant dr. A. Žvirblienei.

3.1.2.6. Paramikso virusų nukleokapsidės baltymų sintezės mielėse *S.cerevisiae* rezultatų apibendrinimas

Paramikso virusų nukleokapsidės baltymų sintezės mielėse *S.cerevisiae* ir savybių tyrimų pagrindiniai rezultatai yra apibendrinti 1 lentelėje. Lentelėje pateikti dydžiai buvo gauti iš 3 bandymų.

1 lentelė. Paramikso virusų nukleokapsidės baltymų sintezės mielėse *S.cerevisiae* rezultatai

Dydis	SeV N	žPIV1 N	žPIV3 N	hRSV N	NiV N	HeV N	MenV N
Optimalus indukcijos laikas	24val	24val	24val	24val	24val	24val	24val
Optimali indukcijai galaktozės koncentracija	2.5%	2.5%	2.5%	2.5%	2.5%	2.5%	2.5%
Baltymų kiekis SLS	11.0 ± 0,6%	3.4 ± 0.4%	1.4 ± 0.1%	3.2 ± 0.3%	5.3 ± 0.4%	5.3 ± 0.6 %	1.8 ± 0.2%
Gauta drėgnos indukuotos biomasės	-23g/L	-26g/L	-30g/L	-20g/L	-24g/L	-24g/L	-29g/L
Išgryninto baltymo išeiga (iš drėgnos biomasės)	-1.2mg/1g	-0.7mg/1g	-0.5mg/1g	-0.9mg/1g	-0.8mg/1g	-0.8mg/1g	-0.3mg/1g
Išgryninto baltymo išeiga (iš mielių kultūros)	-28mg/1L	-20mg/1L	-16mg/1L	-18mg/1L	-20mg/1L	-20mg/1L	-10mg/1L
NPD plūduriavimo tankis	1.29-1.32 g/cm ³	1.28-1.30 g/cm ³	1.28-1,30 g/cm ³	1.28-1.29 g/cm ³	1.28-1,30 g/cm ³	1.28-1.30 g/cm ³	1.29-1.31 g/cm ³
NPD ilgis/plotis	20-300nm 20nm	20-200nm 20nm	20-400nm 20nm	20-100nm 18nm	20-100nm 20nm	20-100nm 20nm	20-50nm 20nm
NPD žiedų kiekis	Nedidelis	Nedidelis	Labai nedidelis	Didelis	Laibai didelis	Laibai didelis	Laibai didelis
NPD be C-dalies	Netirta	Netirta	Netirta	Netirta	Formuoja	Formuoja	Formuoja
NPD be C-dalies ilgis/plotis	Netirta	Netirta	Netirta	Netirta	50-300nm 18nm	50-300nm 18nm	50-400nm 18nm
NPD be C-dalies žiedų kiekis	Netirta	Netirta	Netirta	Netirta	Labai nedidelis	Labai nedidelis	Labai nedidelis
Ar formuojami NPD įjungia RNR	Taip	Netirta	Netirta	Netirta	Netirta	Netirta	Netirta
Į NPD įjungtos RNR ilgis	50-500 nt	Netirta	Netirta	Netirta	Netirta	Netirta	Netirta
RNR ilgis, kurią NPD apsaugo nuo RNazių poveikio	50-80 nt	Netirta	Netirta	Netirta	Netirta	Netirta	Netirta
N baltymų degradacija sintezės metu	+ - - -	+ - - -	+ - - -	+ - - -	- - - -	- - - -	+ - - -
N baltymų degradacija gryninimo metu	+ - - -	+ - - -	+ + - -	- - - -	+ + - -	+ + - -	+ - - -
Imunogeniškas	Netirta	Taip	Taip	Ne	Taip	Taip	Taip
Modifikuotas (Be pirmo Met, 2 pozicijoje acetilintas Ser)	Netirta	Netirta	Netirta	Netirta	Taip	Taip	Taip

3.2. Rekombinantinių *Paramyxoviridae* šeimos virusų nukleokapsidės baltymų taikymas diagnostikoje

3.2.1. Rekombinantinių *Paramyxoviridae* šeimos virusų nukleokapsidės baltymų antigeninių savybių tyrimas

Mielėse *S.cerevisiae* susintetintų paramikso virusų N baltymų antigeninės savybės buvo tiriamos imunofermentinės analizės (IFA) metodu. Mielėse susintetinti žmogaus paragripo virusų 1 ir 3 bei žmogaus respiracinio sincitinio viruso N baltymai šiuo metodu buvo tiriami Biotechnologijos instituto Imunologijos ir ląstelės biologijos skyriuje, vadovaujant dr. A. Žvirblienei. Kadangi su Henipah ir Menangle virusais yra leidžiama dirbti tik ketvirto saugumo lygmens reikalavimus atitinkančioje laboratorijoje, todėl mielėse susintetintų šių virusų N baltymų antigeninės savybės buvo tiriamos Australijos gyvūnų sveikatos priežiūros laboratorijoje, Australijoje. Mielėse susintetintų paramikso virusų N baltymų antigeninės savybės buvo tiriamos netiesioginės IFA metodu. Trumpai apie patį metodą. Šis metodas skiriasi nuo klasikinės IFA tuo, kad, visų pirma, šulinėliuose buvo sorbuojamas antigenas, šiuo atveju mielėse susintetintas ir išgrynintas N baltymas. Po sorbcijos šulinėliai buvo blokuojami jaučio serumo albuminu, po to užpildomi tiriamu kraujo serumu ir inkubuojami 1 val. Po inkubacijos šulinėliai buvo kelis kartus plaunami ir inkubuojami su IgG klasės antikūnams specifiniais antriniais antikūnais anti-IgG, sujungtais su krienų peroksidaze, arba IgG, IgM, IgA ir IgE klasių antikūnams specifinių baltymų A ir G mišiniu. Šie baltymai taip pat buvo sujungti su krienų peroksidaze. Pridedant peroksidazės substrato, buvo gaunama spalvinė reakcija, kurios intensyvumas buvo matuojamas spektrofotometru (Tecan, Austrija) 450 nm bangos ilgio šviesoje.

3.2.1.1. Žmogaus paragripo virusų 1 ir 3 N nukleokapsidės baltymų antigeninės savybės

Siekiant nustatyti, ar mielėse *S.cerevisiae* susintetintų žmogaus paragripo virusų 1 ir 3 N baltymų antigeninės savybės yra panašios į šių virusų natyvių N baltymų antigenines savybes, netiesioginės IFA metodu buvo tirta šių baltymų reakcija su kraujo serumų mėginiais, surinktais iš pacientų, kuriems buvo nustatyta paragripo virusų infekcija. Kraujo serumai buvo surinkti ir charakterizuoti de Salud Carlos III instituto Nacionaliniame mikrobiologijos centre, Ispanijoje. Šiam tyrimui buvo naudoti 16 kraujo serumo mėginių, surinktų iš 11 kvėpavimo takų ligomis sergančių vaikų, kuriems buvo nustatyta paragripo virusų infekcija. Septyni mėginiai buvo surinkti ligos piko metu, o devyni – pacientams pasveikus, maždaug pora savaitių po to, kai pasireiškė pirmieji ligos požymiai. Iš penkių pacientų buvo paimti suporuoti mėginiai: tiek ligos piko metu, tiek pacientams pasveikus (2 lentelė). Surinktų serumų mėginiai buvo patikrinti komerciniu testu, skirtu žmogaus paragripo virusų infekcijų serologinei diagnostikai (IBL-HPIV1/2/3, Vokietija) (2 lentelė). Po to, charakterizuoti kraujo serumų mėginiai buvo tirti tiesioginės IFA metodu naudojant mielėse susintetintus ir išgrynintus hPIV 1 ir 3 N baltymus. Vieni IFA naudoti šulinėliai buvo sorbuoti mielėse *S.cerevisiae* susintetintu ir išgrynintu hPIV1 N baltymu, kiti – mielėse *S.cerevisiae* susintetintu ir išgrynintu hPIV3 N baltymu. Su sorbuotais N baltymais sąveikaujantiems kraujo serumo IgG klasės antikūnams nustatyti buvo naudoti žmogaus IgG klasės antikūnams specifiniai antriniai antikūnai anti-IgG, sujungti su krienų peroksidaze (BioRad, JAV). Naudojant mielėse susintetintus hPIV N baltymus tiesioginės IFA metodu hPIV specifiniams IgG klasės antikūnams nustatyti, 10 mėginių iš 16 (62.5 %) tyrimo rezultatai sutapo su komercinio testo rezultatais, o šešių mėginių – nesutapo (2 lentelė). Iš nesutapusių visi buvo klaidingai teigiami. Klaidingai teigiami rezultatai gali reikšti, kad naudojant mielėse susintetintus hPIV N baltymus tiesioginės IFA

metodu įmanoma nustatyti mažesnes hPIV specifinių IgG klasės antikūnų koncentracijas. Palyginus tiesioginės IFA metodu gautus duomenis su komercinio testo rezultatais, įsitikinta, kad mielėse susintetinti ir išgryninti hPIV N baltymai reaguoja su IgG klasės antikūnais, specifiniais žmogaus paragripo virusams. Tai rodo, kad mielėse susintetintų žmogaus paragripo virusų N baltymų antigeninės savybės yra panašios į šių virusų natyvių N baltymų antigenines savybes. Komerciniu testu nebuvo įmanoma nustatyti infekciją sukėlusio paragripo viruso tipo. Tiesioginės IFA metodu naudojant mielėse susintetintus žmogaus paragripo virusų N baltymus penkiais tirtais serumų atvejais pavyko nustatyti infekciją sukėlusio paragripo viruso tipą (2 lentelė, serumų Nr.: 2, 5, 11, 12 ir 13).

Siekiant patvirtinti, kad mielėse *S.cerevisiae* susintetinti hPIV 1 ir 3 N baltymai specifiškai reaguoja su tirtų kraujo serumų antikūnais, išgrynintų N baltymų mėginiai buvo analizuoti BIB metodu naudojant tuos kraujo serumus, kuriuose tiesioginės IFA metodu buvo aptikti žmogaus paragripo virusų N baltymams specifiški IgG klasės antikūnai. BIB metodu nustatyta, kad mielėse susintetinti hPIV 1 ir 3 N baltymai specifiškai reaguoja su tirtais kraujo serumais (35 B ir C pav., 1 ir 2 takeliai). Mielėse susintetintas ir išgrynintas pasiutligės viruso CVS N baltymas su tirtais kraujo serumais nereagavo (35 C ir B pav., 3 takelis).

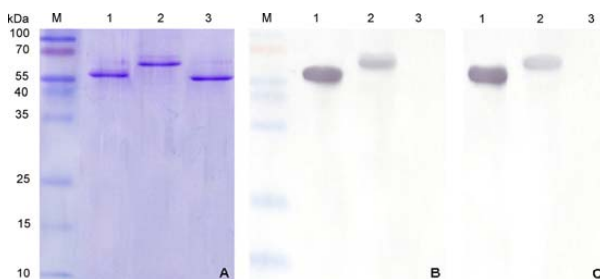
Apibendrinus gautus rezultatus, galima teigti, kad mielėse *S.cerevisiae* susintetinti žmogaus paragripo virusų 1 ir 3 N baltymai tinka šių virusų infekcijų serologinei diagnostikai.

2 lentelė. Mielėse *S.cerevisiae* susintetintų hPIV 1 ir 3 nukleokapsidės baltymų reakcija su paragripo virusais užsikrėtusių žmonių kraujo serumais

Nr.	Mėginys	IBL-hPIV1/2/3 IgG IFA	hPIV1 N IgG IFA	hPIV3 N IgG IFA	Tipas	Serologinė klasifikacija
1	1-s	0.32 +/-	3.39 +++	3.32 +++	hPIV1	
2	1-p	2.16 +++	3.29 +++	3.19 +++		Kryžminė reakcija
3	2-s	0.10 -	0.39 +/-	0.43 +/-		
4	2-p	0.46 +/-	2.97 +++	0.55 +		hPIV1
5	3-s	0.09 -	0.22 -	0.29 -		
6	3-p	0.33 +/-	0.23 -	2.35 +++		hPIV3
7	4-s	0.31 +/-	0.82 +	2.73 +++		
8	4-p	0.42 +/-	1.21 ++	2.45 ++		Kryžminė reakcija
9	5-s	0.14 -	0.07 -	0.10 -		
10	5-p	0.13 -	0.07 -	0.10 -		Neigiamas
11	6-s	0.58 +	0.35 +/-	0.79 +	hPIV3	hPIV3
12	7-s	0.36 +/-	0.29 -	0.98 +		hPIV3
13	8-p	0.16 -	2.56 +++	0.44 +/-	hPIV1	hPIV1
14	9-p	0.09 -	0.29 -	0.47 +/-		Įtariamas hPIV3
15	10-p	0.10 -	0.39 -	0.48 +/-		Įtariamas hPIV3
16	11-p	0.12 -	0.25 -	0.49 +/-		Įtariamas hPIV3
Kontroliniai mėginiai iš IBL-hPIV1/2/3 IgG IFA testo						
Teigiamas		2.39 +++	2.93 +++	3.06 +++		
Neigiamas		0.06 -	0.08 -	0.08 -		

+++; OD reikšmė, >1.5; ++; OD reikšmė, 1.0-1.5; +; OD reikšmė, 0.5-1.0; OD reikšmė, 0.3-0.5; -: OD reikšmė, <0.3.

s - paimtas mėginys ligos piko metu, p - mėginys paimtas pasveikus



35 pav. Išgrynintų mielėse *S.cerevisiae* susintetintų hPIV1 ir hPIV3 N baltymų sąveika su šiais virusais užsikrėtusių žmonių kraujo serumo antikūnais. SDS-PAGE (A). Imunoblotingas su hPIV 1 ir 3 N baltymams teigiamais kraujo serumais (2 lentelė): kraujo serumas 1-s (B) ir kraujo serumas 1-p (C). M – baltymų molekulinio svorio standartas (UAB „Fermentas“) 100, 70, 55, 40, 35, 25, 15 ir 10 kDa; 1 takelis – 1 μg išgryninto mielėse *S.cerevisiae* susintetinto hPIV1 N baltymo; 2 takelis – 1 μg išgryninto mielėse *S.cerevisiae* susintetinto hPIV1 N baltymo; 3 takelis – 1 μg išgryninto mielėse *S.cerevisiae* susintetinto pasiutligės viruso CVS N baltymo.

3.2.1.2. Žmogaus respiracinio sincitinio viruso nukleokapsidės baltymo antigeninės savybės

Mielėse *S.cerevisiae* susintetinto žmogaus respiracinio sincitinio viruso N baltymo antigeninės savybės taip pat buvo tirtos netiesioginės IFA metodu. Šiam tikslui buvo surinkti 61 kvėpavimo takų ligomis sergančių vaikų kraujo serumų mėginiai. Šis darbas buvo atliktas Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Vaikų ligų klinikoje ir Lietuvos AIDS centre. Surinkti kraujo serumo mėginiai visų pirma buvo ištirti tiesioginės imunofluorescencijos (IF) metodu, naudojant komercinius antikūnus (Chemicon, JAV). Dviejuose mėginiuose IF metodu buvo nustatytas hRSV virusas. Po to surinkti kraujo serumo mėginiai buvo tirti komerciniu testu, skirtu hRSV infekcijos serologinei diagnostikai (IBL-HRSV, Vokietija). Komerciniu testu 34 mėginiuose buvo nustatyti hRSV specifiniai IgG klasės antikūnai. IF metodu ir komerciniu testu charakterizuoti kraujo serumo mėginiai buvo tirti tiesioginės IFA metodu naudojant mielėse susintetintą hRSV N baltymą. IFA naudoti šulinėliai buvo sorbuoti mielėse *S.cerevisiae* susintetintu ir išgrynintu hRSV N baltymu, o su šiuo baltymu reaguojantys kraujo serumo IgG klasės antikūnai buvo nustatyti žmogaus IgG klasės antikūnams specifiniais antriniais antikūnais anti-IgG, sujungtais su krienų peroksidaze (BioRad, JAV). Naudojant mielėse susintetintą hRSV N baltymą tiesioginės IFA metodu hRSV specifiniams IgG klasės antikūnams nustatyti, 57 mėginių iš 61 (93.4 %) tyrimo rezultatai sutapo su komercinio testo rezultatais, o keturių mėginių – nesutapo. Iš jų trys buvo klaidingai teigiami, o vienas – klaidingai neigiamas. Klaidingai neigiamas rezultatas gali reikšti, kad šiame mėginyje yra antikūnų, specifinių kitiems hRSV baltymams, bet ne N baltymui. Klaidingai teigiami rezultatai gali reikšti, kad naudojant mielėse susintetintą hRSV N baltymą tiesioginės IFA metodu įmanoma nustatyti mažesnes hRSV specifinių IgG klasės antikūnų koncentracijas. Palyginus tiesioginės IFA metodu gautus duomenis su komercinio testo rezultatais, įsitikinta, kad mielėse susintetintas ir išgrynintas hRSV N baltymas

reaguoja su IgG klasės antikūnais, specifiniais žmogaus respiraciniam sincitiniam virusui. Tai rodo, kad mielėse susintetinto hRSV N baltymo antigeninės savybės yra panašios į šio viruso natyvaus N baltymo antigenines savybes. Apibendrinus gautus rezultatus, galima teigti, kad mielėse *S.cerevisiae* susintetintas ir išgrynintas žmogaus respiracinio sincitinio viruso N baltymas tinka šio viruso infekcijos serologinei diagnostikai.

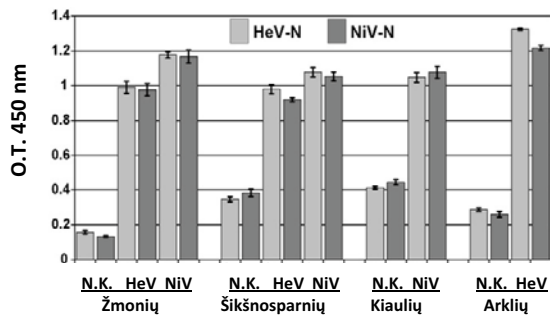
3.2.1.3. Henipah virusų nukleokapsidės baltymų antigeninės savybės

Hendra virusu infekuoto žmogaus, šikšnosparnio ir arklio kraujo serumai, bei Nipah virusu infekuoto žmogaus, šikšnosparnio ir kiaulės kraujo serumai, kurie buvo gauti iš AGSPL serumų banko, Australijoje, buvo naudoti mielėse susintetintų Henipah virusų N baltymų antigeninėms savybėms tirti. Kai kurie iš tyrimams naudotų serumų buvo surinkti net per pirmuosius registruotus Hendra ir Nipah virusų infekcijų protrūkius, kilusius 1994 m Queensland'e, Australijoje, ir 1998 m Nipah'e, Malaizijoje. Kadangi skirtingose gyvūnų rūšyse šių virusų infekcijų metu virusų baltymams specifinių skirtingos klasės antikūnų koncentracijos gali skirtis, todėl mielėse susintetintų Henipah virusų N baltymų antigeninėms savybėms nustatyti tiesioginė IFA buvo atlikta su baltymų G ir A mišiniu (Zymed, JAV). Šie baltymai reaguoja su įvairių klasių antikūnais įvairiose gyvūnų rūšyse. Vieni IFA naudoti šulinėliai buvo sorbuoti mielėse *S.cerevisiae* susintetintu HeV N baltymu, kiti – mielėse *S.cerevisiae* susintetintu NiV N baltymu. Atlikus IFA, buvo nustatyta, kad abu mielėse susintetinti baltymai reagavo su teigiamais kraujo serumų mėginiais (36 pav.). Tai rodo, kad mielėse susintetintų Henipah virusų N baltymų antigeninės savybės yra panašios į šių virusų natyvių N baltymų antigenines savybes. Kadangi Henipah virusų N baltymų ar. sekos yra labai panašios, todėl mielėse susintetintas NiV N baltymas panašiai reagavo su Hendra virusui teigiamais kraujo serumais, o mielėse susintetintas HeV N baltymas – su Nipah virusui teigiamais kraujo serumais. Apibendrinus gautus rezultatus, galima teigti, kad

mielėse susintetinti ir išgryninti Henipah virusų N baltymai tinka šių virusų infekcijų serologinei diagnostikai įvairiose gyvūnų rūšyse. Tačiau reikia pažymėti, kad naudojant mielėse susintetintus Henipah virusų N baltymus tiesioginės IFA metodu tirtuose šikšnosparnių ir kiaulių neigiamos kontrolės mėginiuose buvo nustatyta gana stipri nespecifinė sąveika – fonas. Todėl prieš naudojant mielėse susintetintus Henipah virusų N baltymus šių virusų infekcijų protrūkių tyrimams ir serologinei stebėsenai, mielėse susintetintų Henipah virusų N baltymų pagrindu pagamintus tiesioginės IFA testus reikėtų optimizuoti. Taip pat reikia pabrėžti, kad IFA naudojant mielėse susintetintus Henipah virusų N baltymus nėra įmanoma atskirti Nipah ir Hendra virusų infekcijų.

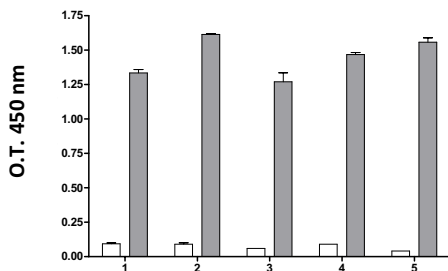
3.2.1.4. Menangle viruso nukleokapsidės baltymo antigeninės savybės

Mielėse susintetinto Menangle viruso N baltymo antigeniškumas buvo analizuotas naudojant specialiai šiuo virusu užkrėstų penkių kiaulių kraujo serumus, kurie taip pat buvo gauti iš AGSPL serumų banko, Australijoje. Kaip neigiama kontrolė buvo naudoti tų pačių kiaulių kraujo serumai, surinkti prieš pat infekciją Menangle virusu. Kraujo serumų mėginiai buvo tirti tiesioginės IFA metodu. IFA naudoti šulinėliai buvo sorbuoti mielėse *S.cerevisiae* susintetintu ir išgrynintu MenV N baltymu, o su šiuo baltymu reaguojantys kraujo serumo antikūnai buvo nustatyti baltymu A sujungtu su krienų peroksidaze (Zymed, JAV). Atlikus IFA, buvo nustatyta, kad mielėse susintetintas MenV N baltymas reagavo su teigiamais kraujo serumų mėginiais (37 pav.). Jokio reikšmingo signalo nustatyti nepavyko neigiamos kontrolės mėginiuose. Tai rodo, kad mielėse susintetinto Menangle viruso N baltymo antigeninės savybės yra panašios į šio viruso natyvaus N baltymo antigenines savybes. Todėl mielėse susintetintas ir išgrynintas baltymas gali būti naudojamas serologinių testų, skirtų MenV specifiniams antikūnams aptikti, kūrimui ir standartizacijai.



Kraujo serumai

36 pav. Išgrynintų mielėse *S.cerevisiae* susintetintų NiV ir NeV N baltymų sąveika su šiais virusais užsikrėtusių gyvūnų kraujo serumo antikūnais analizuota tiesioginės IFA metodu. N.K. – neigiama kontrolė; HeV – Hendra virusu užsikrėtęs gyvūnas; NiV – Nipah virusu užsikrėtęs gyvūnas; HeV-N – išgrynintas mielėse *S.cerevisiae* susintetintas HeV N baltymas; NiV-N – išgrynintas mielėse *S.cerevisiae* susintetintas NiV N baltymas. O.T. – optinis tankis. Pateikti dydžiai buvo gauti iš 3 bandymų. Pakalaidų ribos žymi standartinį nuokrypį.



37 pav. Išgryninto mielėse *S.cerevisiae* susintetinto MenV N baltymo sąveika su šiuo virusu užkrėstų kiaulių kraujo serumo antikūnais analizuota tiesioginės IFA metodu. 1-5 bandymui naudotos penkios specialiai MenV užkrėstos kiaulės. Balti stulpeliai – prieš užkrečiant surinkti bandymui naudotų kiaulių kraujo serumo mėginiai. Pilki stulpeliai – MenV užkrėstų kiaulių kraujo serumo mėginiai. O.T. – optinis tankis. Pateikti dydžiai buvo gauti iš 3 bandymų. Pakalaidų ribos žymi standartinį nuokrypį.

3.2.2. Mielėse *S.cerevisiae* susintetintų *Paramyxoviridae* šeimos virusų nukleokapsidės baltymų panaudojimas monokloninių antikūnų gavimui

Nustačius, kad mielėse *S.cerevisiae* susintetintų paramikso virusų N baltymų struktūra ir antigeninės savybės yra panašios į analogiškų virusų natyvių N baltymų antigenines savybes, šie baltymai buvo panaudoti

monokoniniams antikūnams (mAk) gauti. Šie darbai buvo atlikti Biotechnologijos instituto Imunologijos ir ląstelės biologijos skyriuje, vadovaujant dr. A. Žvirblienei. Naudojant mielėse susintetintus hPIV1, hPIV3, NiV ir MenV N baltymus buvo gauti šiems baltymams specifiniai antikūnai, kurių savybės pateiktos 3 lentelėje.

3 lentelė. hPIV1, hPIV3, NiV ir MenV N baltymams specifinių antikūnų savybės

Rek. N baltymas	mAk	BIB reakcija				BIB reakcija su mielių SLS baltymais
		hPIV1 N	hPIV3 N	SeV N	hRSV N	
hPIV1 N	7F5	+	-	-	-	-
hPIV3 N	5B6	+/-	+	-	-	-
	9F2	-	+	-	-	-
	9G10	+/-	+	-	-	-
Rek. N baltymas	mAk	BIB reakcija				BIB reakcija su mielių SLS baltymais
		NiV N	HeV N	MenV N	TiV ¹ N	
NiV N	1G3	+	+	-	-	-
	10A12	+	+	-	-	-
MenV	2D1	-	-	+	-	-
	4G11	-	-	+	-	-
	10G8	-	-	+	+	-
Rek. N baltymas	mAk	BIB reakcija		IF reakcija ²		
		NiV N be C-dalies	MenV N be C-dalies	MenV ³	MenV (-) ⁴	TiV ⁵
NiV N	1G3	+	-			
	10A12	+	-			
MenV	2D1	-	-	+	-	-
	4G11	-	-	+	-	-
	10G8	-	-	+	-	-

Rek. – rekombinantinis; BIB – baltymų imunoblotingas; SLS – suardytų ląstelių suspensija; IF – imunofluorescencinė

1 – Tioman virusas yra naujas paramikso virusas, aptiktas Malaizijoje keliose šikšnosparnių rūšyse (Chua ir kt., 2001)

Šis virusas savo struktūra ir antigeninėmis savybėmis yra labai panašus į Menangle virusą (Chua ir kt., 2002)

2 – Šis tyrimas buvo atliktas Australijos gyvūnų sveikatos priežiūros laboratorijoje, Australijoje

3 – Menangle virusu infekuotų kiaulių paršelių, gimusių negyvų, smegenų mėginiai

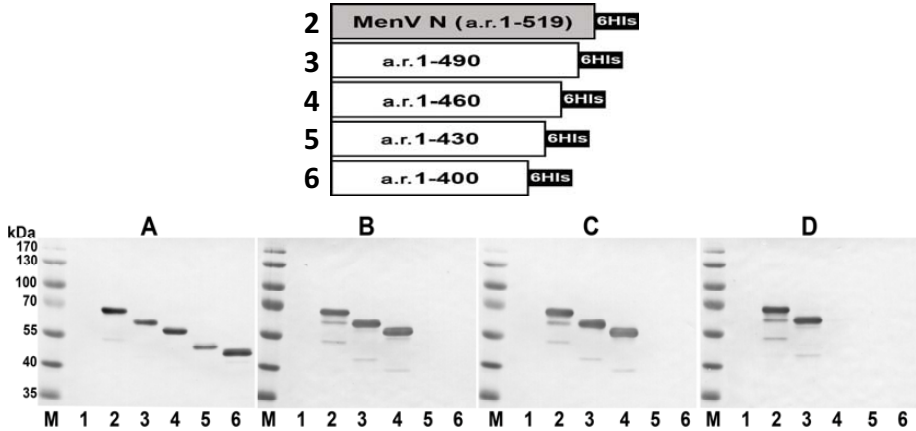
4 – Neinfekuotų, sveikų paršelių smegenų mėginiai

5 – Tioman virusu infekuotų kiaulių limfmazgių mėginiai

Kaip rodo lentelėje pateikti duomenys, gauti mAk yra specifiniai hPIV1, hPIV3, NiV ir MenV N baltymams ir gali būti naudojami šių virusų infekcijų diagnostikai. Reiktų tik pabrėžti, kad NiV N baltymui specifiniai mAk reaguoja ir su HeV N baltymu, todėl šiuos antikūnus naudojant diagnostikai nebūtų įmanoma atskirti Nipah ir Hendra virusų.

Kaip jau buvo aprašyta šio darbo rezultatų dalies 3.1.2.3. skyriuje, naudojant mielėse *S.cerevisiae* susintetintą hRSV N baltymą nepavyko gauti specifinių šiam baltymui mAk. Buvo padaryta prielaida, kad šio viruso N baltymas nėra pakankamai imunogeniškas, nors kaip rodo šiame darbe aprašyti tyrimai (žr. Rezultatų dalį, skyrius 3.2.1.2.), hRSV infekuotų pacientų kraujo serume yra aptinkami N baltymui specifiniai IgG klasės antikūnai, kurie specifiskai reaguoja ir su mielėse susintetintu hRSV N baltymu. Gali būti, kad vien N baltymo nepakanka užtektinai stipriai stimuliuoti imuninę sistemą. Nors mielėse *S.cerevisiae* susintetintas hRSV N baltymas savo antigeninėmis savybėmis yra panašus į natyvų šio viruso N baltymą, tačiau, matyt, hRSV infekcijos metu kiti viruso baltymai vaidina svarbų vaidmenį stimuliuojant imuninę sistemą. Siekiant apeiti šią kliūtį, mielėse *S.cerevisiae* buvo susintetintas, o po to išgrynintas chimerinis N baltymas, sudarytas iš tymų viruso N baltymo N-dalies, sujungtos su hRSV N baltymo C-dalimi (žr. Rezultatų dalį, skyrius 3.1.1.3.). Žinant, kad tymų viruso N baltymas yra labai imunogeniškas (Žvirblienė ir kt., 2007), buvo tikėtasi kad chimeriniu N baltymu imunizavus peles, imunogeniška tymų viruso N baltymo N-dalis pakankamai stipriai sužadins pelės imuninę atsaką, kurio metu bus gaminami hRSV N baltymo C-dalies ar. sekai specifiniai antikūnai. Naudojant mielėse *S.cerevisiae* susintetintą chimerinį N baltymą nepavyko gauti mAk specifinių hRSV N baltymo C-dalies ar. sekai. Tai rodo, kad nors mielėse susintetintas hRSV N baltymas yra panašus savo antigeninėmis savybėmis į natyvų šio viruso N baltymą, bet yra neimunogeniškas ir be kitų viruso baltymų pagalbos negeba užtektinai stipriai stimuliuoti imuninės sistemos atsaką.

Siekiant detaliau charakterizuoti mAk gautus prieš MenV N baltymą, buvo atlikti tyrimai MenV N baltymo ar. sekos sritims su kuriomis reaguoja MenV N baltymui specifiniai mAk (klonai 2D1, 4G11 ir 10G8) nustatyti. Mielėse *S.cerevisiae* buvo susintetinti sutrumpinti MenV N baltymo variantai be 29, 59, 89 ir 119 C-galinių ar., turintys 6His seką, prijungtą C gale, ir pilno ilgio MenV N baltymas, taip pat turinis 6His seką, prijungtą C gale. Šiam tikslui buvo sukonstruoti sintezei mielėse *S.cerevisiae* skirti vektoriai, su įklonuotais genais koduojančiais pilno ilgio ir sutrumpintus MenV N baltymo variantus su 6His sekomis baltymo C gale: *pFGG3-MenV-N_(C6His)*, *pFGG3-MenV-N_(N1-490+C6His)*, *pFGG3-MenV-N_(N1-460+C6His)*, *pFGG3-MenV-N_(N1-430+C6His)*, *MenV-N_(N1-400+C6His)* (žr. skyrių 3.1.1., vektorių schema pateikta 16 pav.). Sukonstruoti vektoriai buvo panaudoti mielių *S.cerevisiae*, kamienas 214Δ*pep4*, transformacijai. Gauti transformantai buvo padauginami skystoje mitybinėje MEPD terpėje su formaldehidu ir po 24 val tikslinio baltymo sintezė buvo indukuota galaktoze, kaip aprašyta anksčiau. Po indukcijos, suardžius mielių ląsteles, SLS mėginiai buvo tirti BIB metodu naudojant anti-tetra-his mAk (Qiagen, JAV). Šiuo metodu buvo patvirtinta, kad mielės *S.cerevisiae* sintetina pilno ilgio ir sutrumpintus MenV N baltymus, turinčius 6His seką C gale (38 A pav. 2-6 takeliai). Toliau, BIB metodu buvo nustatyta, kad visi trys mAk, specifiniai MenV N baltymui (klonai 2D1, 4G11 ir 10G8), reaguoja su pilno ilgio MenV N baltymu ir su sutrumpintu šio baltymo variantu be 29 C-galinių ar. (38 B-D pav., 2-3 takeliai), o nereaguoja su sutrumpintais MenV N baltymo variantais be 89 ir 119 C-galinių ar. (38 B-D pav., 5-6 takeliai). Du iš tirtų mAk (klonai 2D1 ir 4G11) reagavo su sutrumpintu MenV N baltymo variantu be 59 C-galinių ar. (38 B-C pav., 4 takelis), o klono 10G8 mAk nereagavo (38 D pav., 4 takelis). Gauti duomenys rodo, kad du iš trijų mAk (klonai 2D1 ir 4G11) reaguoja su MenV N baltymo ar. seka, kuri prasideda 430 ar. ir baigiasi 460 a.r., o klono 10G8 mAk reaguoja su MenV N baltymo ar. seka, kuri prasideda 460 ar. ir baigiasi 490 ar.



38 pav. Siekiant detaliau charakterizuoti mAk gautus prieš MenV N baltymą imunoblotingo metodu buvo analizuota MenV N baltymui specifinių mAk antikūnų reakcija su mielėse susintetintais sutrumpintais MenV N baltymo variantais. Imunoblotingas naudojant: A – anti-tetra-his mAk (Qiagen, JAV); B – MenV N baltymui specifinius klonu 2D1 mAk; C – MenV N baltymui specifinius klonu 4G11 mAk; D – MenV N baltymui specifinius klonu 10G8 mAk. M – baltymų molekulinio svorio standartas (UAB „Fermentas“) 170, 130, 100, 70, 55, 40, ir 35 kDa; 1 takelis – 20 µg indukuotų *pFGG3* vektoriūmi transformuotų mielių *S.cerevisiae* SLS; 2 takelis – 20 µg indukuotų *pFGG3-MenV-N_(C6His)* vektoriūmi transformuotų mielių *S.cerevisiae* SLS; 3 takelis – 20 µg indukuotų *pFGG3-MenV-N_(N1-490+C6His)* vektoriūmi transformuotų mielių *S.cerevisiae* SLS; 4 takelis – 20 µg indukuotų *pFGG3-MenV-N_(N1-460+C6His)* vektoriūmi transformuotų mielių *S.cerevisiae* SLS; 5 takelis – 20 µg indukuotų *pFGG3-MenV-N_(N1-430+C6His)* vektoriūmi transformuotų mielių *S.cerevisiae* SLS; 6 takelis – 20 µg indukuotų *pFGG3-MenV-N_(N1-400+C6His)* vektoriūmi transformuotų mielių *S.cerevisiae* SLS.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

Paramyxoviridea šeimai priklauso plačiai paplitę virusai, sukeliantys pavojingas žmogaus ir gyvūnų ligas. Vieni iš pavojingiausių šios šeimos atstovų, priklausančių *Pneumovirus* bei *Respirovirus* gentims, yra kvėpavimo takus pažeidžiantys žmogaus respiracinis sincitinis virusas bei 1 ir 3 serotipų žmogaus paragripo virusai (Chanock, 1957; Chanock ir kt., 1958b). Pasaulio Sveikatos Organizacijos vertinimu, vien žmogaus respiracinis sincitinis virusas kasmet visame pasaulyje sukelia kvėpavimo takų ligas 64 milijonams žmonių, iš kurių 160.000, daugiausia naujagimiai ir vaikai, dėl ligos komplikacijų miršta, o dėl žmogaus paragripo virusų sukeltų kvėpavimo takų ligų kasmet vien tik JAV nuo 15.000 iki 80.000 žmonių yra gydomi sveikatos priežiūros įstaigose (World Health Organization 2009).

Kadangi paragripo ir respiracinio sincitinio virusų bei kitų kvėpavimo takus infekuojančių virusų ir šią organizmo sistemą pažeidžiančių bakterijų sukeltos kvėpavimo takų ligos labai nežymiai skiriasi savo simptomais, todėl nustatyti ligos priežastį, remiantis vien klinikiniais ligos požymiais, dažnai būna neįmanoma. Norint tiksliai nustatyti kvėpavimo takų ligą sukėlusį virusą, tam, kad būtų įmanoma taikyti tinkamą gydymą, rekomenduojama naudoti molekulinės diagnostikos priemones (Hall, 2001; Henrickson, 2003). Taip pat šios diagnostikos priemonės yra būtinos kvėpavimo takų ligas sukeliančių virusų paplitimui, patogenezei ir patologijai tirti.

Šiame darbe aprašytais tyrimais buvo siekiama sukurti efektyvias priemones kvėpavimo takų ligas sukeliančių 1 ir 3 serotipų paragripo bei respiracinio sincitinio virusų infekcijų serologinei diagnostikai. Šių virusų diagnostikai yra naudojami įvairūs laboratorijoje atliekami metodai, kurie yra aprašyti Literatūros apžvalgoje, skyriuose 1.3.1. ir 1.3.2. Tačiau daugelis jų turi įvairių trūkumų.

Specifiniai paragripo ir respiraciniam sincitiniam virusams antikūnai yra efektyviai aptinkami nustatant jų reakciją su virusiniais antigenais tiesioginės

imunofermentinės analizės (IFA) metodu. IFA yra reikalingi virusiniai antigenai, todėl šiam tikslui iki šiol yra naudojamos paragripo ir respiracinio sincitinio virusų dalelės, išskirtos iš žmogaus ląstelių kultūrų. Tiesioginės IFA metodu naudojant kaip antigeną virusų daleles nėra įmanoma nustatyti paragripo virusų tipo, nes šių virusų antigeninės savybės yra labai panašios (Hall, 2001; Henrickson, 2003).

Rekombinantinių baltymų panaudojimas specifinių hPIV1, hPIV3 ir hRSV antikūnų nustatymui turi daug pranašumų lyginant su virusinių dalelių panaudojimu šiai analizei: paprastesnė antigenų sintezė, lengvesnė metodų standartizacija, didesnis antigenų stabilumas, nėra pavojaus išplatinti virusus ir kita (Bouche ir kt., 1998). Nors naudojant rekombinantinį baltymą aptinkamas siauresnis virusui specifinių antikūnų spektras, tačiau parinkus tinkamą viruso antigeną, įmanoma padidinti diagnostinio testo specifiškumą. Yra žinoma, kad *Paramyxoviridae* šeimos virusų N baltymo C-dalis yra imunogeniška ir skiriasi savo amino rūgščių seka net tarp paragripo virusų tipų (Karron ir Collins, 2007). Todėl naudojant šį baltymą netiesioginės IFA metodu turėtų būti įmanoma aptikti viruso tipui specifinius antikūnus kraujo serumo ar seilių mėginiuose.

Šiame darbe atlikti hPIV1, hPIV3 ir hRSV N baltymų sintezės tyrimai žemesniųjų eukariotų – mielių *S.cerevisiae* – svetimų baltymų sintezės sistemoje ir apibūdintos gautų rekombinantinių N baltymų savybės bei jų tinkamumas diagnostikai. Biotechnologijos instituto Imunologijos ir ląstelės biologijos skyriuje (vadovė A.Žvirblienė), naudojant mielėse susintetintus rekombinantinius hPIV1 ir hPIV3 N baltymus, buvo gauti specifiniai šių virusų N baltymams monokloniniai antikūnai, tinkantys šių virusų diagnostikai.

Nipah ir Hendra virusai buvo atrasti tik praėjusio tūkstantmečio paskutinį dešimtmetį, kilus infekciniams protrūkiams, kurių metu buvo nustatyta, kad šie virusai yra mirtinai pavojingi žmogui ir daro žalą gyvulininkystei (Chua ir kt., 1999; Selvey ir Sheridan, 1995). Ištyrus jų savybes

jie buvo priskirti *Paramyxoviridae* šeimos virusams. NiV ir HeV yra platinami *Pteropodidae* šeimos *Pteropus* genties šikšnosparnių, kuriems šie virusai nėra pavojingi, dažniausiai nesukelia ligos simptomų (Wang ir kt., 2001). Tačiau jais gali užsikrėsti įvairių rūšių žinduoliai, tokie kaip arkliai, kiaulės ir t.t., tame tarpe ir žmogus, kuriems šie virusai gali sukelti mirtiną sisteminę infekciją. Menangle virusas yra dar vienas neseniai atrastas šikšnosparnių platinamas virusas, kuris nėra toks pavojingas žmogui. MenV buvo aptiktas 1997 m. per infekcinį protrūkį vienoje iš Australijos kiaulidžių (Philbey ir kt., 2007). Buvo nustatyta, kad infekcija šiuo virusu sukėlė reprodukcinės kiaulių ligas, dėl kurių ženkliai sumažėjo kiaulių vados, o MenV buvo aptiktas paršelių, gimusių negyvų, nervų sistemos audiniuose (Philbey ir kt., 1998).

Naujausi duomenys rodo, kad NiV, HeV ir MenV žalingų infekcijų protrūkiams yra negausūs ir pasauliniu mastu iki šiol šių virusų padaryta žala nėra labai didelė (Eaton ir kt., 2006; Philbey ir kt., 2008). Tačiau reikia atsižvelgti į tai, kad šie virusai sparčiai kinta, yra platinami įvairių rūšių gyvūnų, sukelia sisteminę infekciją, kurios metu yra pažeidžiamos įvairios organų sistemos, tame tarpe ir centrinė nervų sistema, ir svarbiausia tai, kad NiV ir HeV yra mirtinai pavojingi ne tik gyvuliams, bet ir žmogui, todėl yra manoma, kad su laiku šie virusai turi nemažą potencialą tapti plačiai paplitusiais, mirtį nešančiais virusais (Eaton ir kt., 2006). Kadangi NiV, HeV ir MenV buvo atrasti palyginti neseniai, o NiV ir HeV galima tirti tik ketvirto saugumo lygmens laboratorijose, todėl šių virusų tyrimai į priekį juda labai lėtai (Eaton ir kt., 2006; Philbey ir kt., 2008). Nėra iki galo aišku, kokių dar rūšių gyvūnai juos platina, nedaug tėra žinoma apie jų paplitimą, iki galo nenustatyta, kurių audinių ląstelės įvairių rūšių gyvūnuose yra tinkamos jiems daugintis, nežinomi jų plitimo keliai, nėra iki galo išaiškinti šių virusų patogenezės ir patologijos mechanizmai. Taip pat iki pat šiandien nėra sukurtos šių virusų infekcijų diagnostikai skirtos standartizuotos priemonės, kurios žymiai

palengvintų šių virusų biologijos, paplitimo, patogenezės ir patologijos tyrimus (Wong, 2010).

Remiantis biotechnologijos instituto Eukariotų genų inžinerijos skyriuje atliktais dr. R. Slibinsko tyrimais, yra žinoma, kad mielėse *S.cerevisiae* ir *P.pastoris* susintetinti *Paramyxoviridae* šeimos kiaulytės ir tymų virusų N baltymai buvo sėkmingai pritaikyti šių virusų infekcijų serologinei diagnostikai (Samuel ir kt., 2002; Samuel ir kt., 2003; Slibinskas ir kt., 2004; Slibinskas ir kt., 2003). Tai pat naudojant mielėse susintetintus rekombinantinius kiaulytės ir tymų virusų N baltymus buvo gauti specifiniai šiems virusams antikūnai (Žvirblienė ir kt., 2007). Todėl šiame darbe buvo atlikti NiV, HeV ir MenV N baltymų sintezės tyrimai žemesniųjų eukariotų – mielių *S.cerevisiae* – svetimų baltymų sintezės sistemoje ir apibūdintos gautų rekombinantinių N baltymų savybės bei jų tinkamumas diagnostikai. Biotechnologijos instituto Imunologijos ir ląstelės biologijos skyriuje (vadovė A.Žvirblienė), naudojant mielėse susintetintus rekombinantinius NiV ir MenV N baltymus buvo gauti specifiniai šių virusų N baltymams monokloniniai antikūnai, tinkantys šių virusų diagnostikai.

Pagrindiniai *Paramyxoviridae* šeimos virusų baltymai, infekcijos metu sukeltys imuninės sistemos atsaką, kurio metu yra gaminami specifiniai šiems baltymams antikūnai, yra virusinės dalelės membranoje įsitvirtinę glikoproteinai, iš kurių vieni pritvirtina viruso dalelę infekuojamos ląstelės paviršiuje (hPI viruso HN baltymas; hRS, Henipah ir Men virusų G baltymas), o kiti sulieja viruso dalelės ir infekuojamos ląstelės membranas (F baltymas) (Connors ir kt., 1991; Eaton ir kt., 2006; Philbey ir kt., 2008; Ray ir kt., 1988). Tačiau su laiku *Paramyxoviridae* šeimos virusų glikoproteinų antigeninės savybės kinta, imuninio atsako metu šiems baltymams gaminami antikūnai dažnai reaguoja su giminingo viruso analogiškais baltymais (Lamb ir Parks, 2007). *Paramyxoviridae* šeimos virusų glikoproteinų sintezė heterologinėse baltymų sintezės sistemose yra sudėtinga, gaunami tik nedideli šių baltymų

kiekiai (Fooks ir kt., 1993; Nayak ir kt., 1985). Mielėse *S.cerevisiae* nepavyko susintetinti tymų viruso H ir kiaulytės viruso HN baltymų, kurių antigeninės savybės būtų panašios į natyvių analogiškų baltymų antigenines savybes (remtasi dr. R. Slibinsko atliktais tyrimais). Dėl šių priežasčių *Paramixoviridae* šeimos virusų glikoproteinai nėra tinkami antigenai, kurių pagrindu, naudojant mielėse susintetintus rekombinantinius šių baltymų analogus, būtų įmanoma sukurti efektyvias sistemas šios šeimos virusų serologinei diagnostikai.

Paramixoviridae šeimos virusų N baltymas, šių virusų infekcijos metu, taip pat sukelia imuninės sistemos atsaką, kurio metu yra gaminami N baltymui specifiniai antikūnai, aptinkami kraujo serume ir kai kuriais atvejais seilėse (Connors ir kt., 1991; Eaton ir kt., 2006). Kadangi N baltymas atlieka daug funkcijų, todėl jis yra labai konservatyvus. Nors giminingų virusų N baltymo N-dalis yra panaši savo ar. seka, tačiau imunogeniška C-dalis skiriasi (Habchi ir kt., 2010; Morgan ir kt., 1984). Kaip jau buvo minėta, *Paramyxoviridae* šeimos kiaulytės ir tymų virusų N baltymai buvo sėkmingai susintetinti mielėse *S.cerevisiae* ir *P.pastoris* ir iki pat šiandien yra taikomi šių virusų infekcijų serologinei diagnostikai (Samuel ir kt., 2002; Samuel ir kt., 2003; Slibinskas ir kt., 2004; Slibinskas ir kt., 2003). Remiantis aukščiau paminėtais faktais buvo nuspręsta, kad hPIV1, hPIV3, hRSV, NiV, HeV ir MenV serologinei diagnostikai tikslinga būtų naudoti mielėse susintetintus šių virusų N baltymus. Šių baltymų sintezė mielėse *S.cerevisiae* yra aprašyta darbo rezultatuose.

Paramyxoviridea šeimos *Respirovirus* genčiai priklausantis Sendai virusas yra labai panašus į pirmo serotipo žmogaus paragripo virusą, tačiau nėra pavojingas žmogui, nors pirmą kartą buvo aptiktas ir išskirtas tiriant būtent šiuo virusu užsikrėtusio žmogaus atvejį (Kuroya ir kt., 1953a; Kuroya ir kt., 1953b). Šis virusas infekuoja peles ir ilgą laiką buvo naudojamas kaip modelis *Respirovirus* genties virusams tirti. Todėl siekiant įsitikinti, ar svetimų baltymų

sintezės sistema mielėse *S.cerevisiae* tinka *Respirovirus* genties virusų N baltymų sintezei, pradžioje šioje sistemoje buvo tirta SeV N baltymo sintezė.

Darbo eigoje buvo sukonstruoti 10 N baltymų sintezei mielėse *S.cerevisiae* skirtų vektorių. Naudojant šiuos vektorius virusų nukleokapsidės baltymų sintezė daugiausia tirta mielių *S.cerevisiae* 214 Δ pep4 kamiene.

Šiame darbe nustatytas SeV N baltymo sintezės lygis mielėse *S.cerevisiae* (11 % nuo bendro ląstelės baltymų kiekio) buvo dvigubai didesnis už tą, kuris dažniausiai yra gaunamas svetimus baltymus sintetinant šioje mielių sistemoje (1-5 % nuo bendro ląstelės baltymų kiekio) (Dargevičiūtė ir kt., 2002; Gellissen ir Hollenberg, 1997; Sasnauskas ir kt., 2002; Valenzuela ir kt., 1982). Kaip pavyzdį galima pateikti gautą kiaulytės viruso N baltymo kiekį suardytų indukuotų mielių ląstelių suspensijoje, kuris sudarė 3,5 % nuo bendro ląstelės baltymų kiekio (Samuel ir kt., 2002). Tačiau SeV N baltymo sintezės lygis nebuvo toks aukštas, kokį pavyko gauti mieles *S.cerevisiae* naudojant tymų viruso N baltymo arba hepatito B viruso šerdies baltymo sintezei (18 % ir 40 % nuo bendro ląstelės baltymų kiekio (Kniskern ir kt., 1986; Slibinskas ir kt., 2004)).

Nustačius hPIV1, hPIV3, hRSV, NiV, HeV ir MenV N baltymų kiekius indukuotų mielių *S.cerevisiae* SLS (3.4 %, 1.4 %, 3.2 %, 5.3 %, 5.3 % ir 1.8 % nuo bendro ląstelės baltymų kiekio) paaiškėjo, kad šie baltymai yra sintetinami taip pat efektyviai kaip ir daugelis kitų heterologinių baltymų, kurių sintezė buvo tirta mielėse *S.cerevisiae*, tačiau šių N baltymų sintezės lygiai yra nuo dviejų iki aštuonių kartų mažesni nei SeV N baltymo (11 % nuo bendro ląstelės baltymų kiekio). Nustatyta, kad iš tirtų N baltymų hPIV3 ir MenV N baltymai mielėse *S.cerevisiae* yra sintetinami prasčiausiai (1.4 % ir 1.8 % nuo bendro ląstelės baltymų kiekio). hPIV1 ir hRSV N baltymų sintezės lygiai (3.4 % ir 3.2 % nuo bendro ląstelės baltymų kiekio) yra panašūs į kiaulytės viruso N baltymo (3.5 % nuo bendro ląstelės baltymų kiekio), o NiV ir

HeV N baltymų du kartus mažesni (5.3 % ir 5.3 % nuo bendro ląstelės baltymų kiekio) nei SeV N baltymo (11 % nuo bendro ląstelės baltymų kiekio).

Kodėl mielėse *S.cerevisiae* gauti tokie savo struktūra ir kai kuriais atvejais net ar. seka (hPIV1 ir hPIV3 N baltymai) panašių N baltymų sintezės lygio skirtumai, neatlikus specialiai tam skirtų tyrimų, būtų gana sunku pasakyti, tačiau galima įvardinti bent kelias priežastis: sintetinių skirtingų baltymų iRNR gali skirtis savo stabilumu bei transliacijos efektyvumu, baltymai gali būti nevienodai jautrūs peptidazių poveikiui, baltymai gali būti „toksiški“ mielių ląstelėms arba formuoti tokią erdvinę struktūrą, kuri įjungia ląstelės baltymų kokybės kontrolės sistemą (Kaufman, 1999; Wickner ir kt., 1999).

Matuojant santykinį N baltymo kiekį suardytų indukuotų mielių ląstelių suspensijoje, buvo parinktos optimalios šiame darbe tirtų N baltymų sintezės sąlygos. Buvo nustatyta optimali sintezės indukcijos trukmė ir parinkta optimali N genų raišką įjungiančios medžiagos – galaktozės – koncentracija. Nustatyta, kad visais tirtais atvejais didžiausi N baltymų kiekiai yra gaunami mielės *S.cerevisiae* auginant indukcijos sąlygomis 24 val. Yra žinoma, kad tokia pati sintezės indukcijos trukmė yra optimali ir tymų bei kiaulytės virusų N baltymų sintezei mielėse *S.cerevisiae* (remtasi dr. R. Slibinsko atliktais tyrimais). Taip pat buvo nustatyta, kad mielės auginant indukcijos sąlygomis ilgiau nei 24 val visais tirtais atvejais santykinis N baltymo kiekis suardytų mielių ląstelių suspensijoje mažta. Matyt, mielės indukuojant kolbose ilgiau nei 24 val, mielių ląstelių kultūros tankis pasiekia tokią ribą, kada pradeda trūkti mitybinių medžiagų, kurios yra būtinos efektyviai rekombinantinio N baltymo sintezei. Be to, trūkstant mitybinių medžiagų, mielės ląstelėje gali būti įjungiamos sistemos, kurios hidrolizuoja gausiai sintetinius baltymus tam, kad palaikytų gyvybines funkcijas. Kita galima priežastis, stabdanti mielių augimą ir kartu svetimų baltymų sintezę yra mielėms toksiškų metabolitų (etanolio, rūgščių) koncentracijos didėjimas (Caumont ir kt., 1996; Shuster ir kt., 1989). Taip pat nustatyta, kad visais tirtais atvejais didžiausi N baltymų

kiekiai yra gaunami indukcinėje terpėje naudojant 2.5 % galaktozės koncentraciją.

Ištyrus SeV N baltymo sintezę trijuose mielių *S.cerevisiae* kamienuose FH4C, AH 22-214 ir 214Δ*pep4*, nepavyko aptikti pastebimų šio baltymo sintezės skirtumų tarp naudotų mielių kamienų. Dr. R. Slibinsko atlikti tyrimai taip pat neparodė jokių tyimų ir kiaulytės virusų N baltymų sintezės skirtumų tyrimams naudotuose skirtinguose mielių *S.cerevisiae* kamienuose. Todėl šiame darbe tirtų paramikso virusų N baltymų sintezei buvo naudotas tik mielių *S.cerevisiae* kamienas 214Δ*pep4*. Šis kamienas, turintis *pep4* mutaciją, pasirinktas dėl to, kad jis neturi aktyvaus *PEP4* geno, koduojančio vakuolinę peptidazę A, aktyvuojančią kitas vakuolines peptidazes (Westphal ir kt., 1996). Tikėtasi, kad tai gali sustabdyti ar bent slopinti N baltymų hidrolizę suardžius mieles, gryninimo metu.

Pagrindinė priežastis, trukdanti gauti didelius rekombinantinių baltymų kiekius, gali būti jų nestabilumas mielių ląstelėse. Šiame darbe baltymų imunoblotingo metodu išanalizavus indukuotų mielių suardytų ląstelių suspensijas, buvo įsitikinta, kad visi šiame darbe tirti N baltymai yra stabilūs mielių *S.cerevisiae* ląstelėse. Tik labai nedideli kiekiai N baltymų degradacijos produktų BIB metodu buvo nustatyti hPIV1, hPIV3, hRSV ir MenV N baltymus sintetinančių mielių suardytų ląstelių suspensijose. Jokių N baltymų degradacijos produktų BIB metodu nepavyko aptikti NiV ir HeV N baltymus sintetinančiose mielėse. Palyginus su kitomis sistemomis, naudotomis paramikso virusų N baltymų sintezei, šiame darbe naudota mielių *S.cerevisiae* svetimų baltymų sintezės sistema pasižymėjo išskirtiniu stabilumu su minimalia tiriamų N baltymų degradacija.

NDS-PAGE metodu buvo nustatytos SeV, hPIV1, hPIV3, hRSV, NiV, HeV ir MenV rekombinantinių N baltymų MM, kurios yra lygios ~ 60, 60, 66, 44, 62, 62 ir 67 kDa. Įsitikinta, kad mielėse *S.cerevisiae* susintetinto hRSV N baltymo MM sutampa su teoriškai apskaičiuota šio baltymo MM (~ 44 kDa), o SeV,

hPIV1, hPIV3, NiV, HeV ir MenV rekombinantinių N baltymų molekulinės masės yra ~ 3, 2, 8, 4, 4 ir 8 kDa didesnės nei teoriškai apskaičiuotos šių baltymų MM (~ 57, 58, 58, 58, 58 ir 59 kDa). Teorinė ir NDS-PAGE metodu nustatyta N baltymo MM gali skirtis dėl įvairių priežasčių: dėl N baltymo suminio krūvio, darančio įtaką jo elektroforeziniam judrumui PAA gelyje; dėl po-transliacinių N baltymo modifikacijų; taip pat NDS-PAGE metodu be tinkamo baltymų MM standarto neįmanoma labai tiksliai įvertinti baltymo MM. Todėl lyginant NDS-PAGE metodu nustatytą ir teorinę N baltymo MM gautas iki 4 kDa skirtumas gali būti tik vertinimo paklaida. Tačiau hPIV3 ir MenV rekombinantinių N baltymų nustatytos ir teorinės MM skiriasi net ~ 8 kDa. Panašus NDS-PAGE metodu nustatytos ir apskaičiuotos hPIV3 N baltymo MM skirtumas buvo aprašytas tiriant natyvų N baltymą, susintetintą hPIV3 užkrėstose žinduolių ląstelėse (Henrickson, 2003; Miyahara ir kt., 1992). Rekombinantinio MenV N baltymo atveju tokį didelį NDS-PAGE metodu nustatytos ir teorinės MM skirtumą galima būtų aiškinti tuo, kad šis baltymas turi palyginti didelį neigiamą krūvį (izoelektrinis taškas yra lygus 4,94). Turbūt todėl šis baltymas PAA gelyje veikiant elektros srovei juda lėčiau nei panašios MM baltymas NDS-PAGE analizėje naudotas kaip MM standartas.

Siekiant įsitikinti, ar mielėse susintetinti N baltymai yra tirpūs, indukuotos mielių SLS buvo nucentrifuguotos ir atskirtos tirpios baltymų frakcijos. Nustatyta, kad tirti mielėse *S.cerevisiae* susintetinti N baltymai, išskyrus hPIV3 N baltymą, yra tirpūs. Maždaug 30 % mielėse *S.cerevisiae* susintetinto hPIV3 N baltymo buvo aptikta nuo tirpios baltymų frakcijos atskirtose nuosėdose. Tai rodo, kad dalis mielėse susintetinto hPIV3 N baltymo yra netirpi. Yra žinoma, kad paramikso virusų N baltymo N-dalies amino rūgščių seka (a.r. 1-399) formuoja kompaktišką erdvinę struktūrą, o C-dalies amino rūgščių sekos (a.r. nuo 400 iki galo) erdvinė struktūra yra nekompaktiška, kintanti ir jautri peptidazių poveikiui. Su N baltymo C-dalies amino rūgščių seka sąveikauja net keletas kitų viruso ir ląstelės baltymų, todėl

C-dalis kompaktiškiau susilanksto tik tuomet, kai ji susijungia su kitu viruso ar ląstelės baltymu (Habchi ir kt., 2010; Morgan ir kt., 1984). Buvo padaryta prielaida, kad dalis mielėse susintetintų hPIV3 N baltymų yra netirpi dėl hidrofobinių sąveikų, kurios gali formuotis sąveikaujant kelių hPIV3 N baltymų hidrofobinėms C dalies sritims tarpusavyje arba su hidrofobiniais netirpiaisi ląstelės komponentais. Kadangi hPIV3 N baltymo C dalis sąveikauja net su keletu kitų viruso ir ląstelės baltymų, todėl trūkstant kažkurio arba kažkurių iš jų, hidrofobinės hPIV3 N baltymo C dalies sritys gali būti atviros nespecifinėms sąveikoms. Dėl šių sąveikų dalis mielėse susintetintų hPIV3 N baltymų gali formuoti agregatus, kuriuos veikiant didele išcentrine jėga, jie kartu su suardytų mielių ląstelių liekanomis koncentruotųsi nuosėdose. Šiai prielaidai patikrinti hPIV3 N baltymą sintetinančios mielės buvo suardytos AT su įvairiomis detergentų Tween²⁰ arba Triton X-100 koncentracijomis. Atskyrus tirpią baltymų frakciją, nustatyta, kad ~ 90 % mielėse susintetinto netirpaus hPIV3 N baltymo ištirpsta AT naudojant 2 % detergento Tween²⁰ arba 1 % detergento Triton X-100 koncentracijas. Tai patvirtina prielaidą, kad dalis mielėse susintetinto hPIV3 N baltymo yra netirpi dėl hidrofobinių sąveikų. Todėl siekiant išvengti mielėse susintetintų hPIV3 N baltymų agregacijos gryninimo metu, visuose gryninimo tirpaluose buvo naudojama 2 % detergento Tween²⁰ koncentracija.

Šiame darbe buvo siekta sukurti efektyvią paramikso virusų N baltymų sintezės sistemą mielėse *S.cerevisiae* ir patikrinti ar šioje sistemoje susintetinti SeV, hPIV1, hPIV3, hRSV, NiV, HeV ir MenV N baltymai formuoja viruso nukleokapsidę primenančias daleles (vNPD). Yra žinoma, kad tokius darinius be kitų virusinių baltymų pagalbos formuoja aukštesniųjų ir žemesniųjų eukariotų ląstelėse susintetinti rekombinantiniai virusų N baltymai (Bhella ir kt., 2002; Bhella ir kt., 2004; Fooks ir kt., 1993; Schoehn ir kt., 2004). Jei ląstelės baltymai dalyvauja susidarant vNPD, tai jie turėtų būti konservatyvūs mielėse ir žinduolių ląstelėse. Šiame darbe tirti mielėse susintetinti N baltymai

buvo centrifuguojami per tankų sacharozės tirpalo sluoksnį (30 %) ir po to gryninami du kartus centrifuguojant CsCl tankio gradiente. Nustatyta, kad visi šiame darbe tirti paramikso virusų N baltymai, juos veikiant didele išcentrine jėga, sugeba įveikti tankų sacharozės tirpalo sluoksnį. Tai rodo, kad šių baltymų formuojami dariniai yra didelio tankio ir didelės MM. Po šio gryninimo žingsnio, tirtus N baltymus nucentrifugavus CsCl tankio gradiente, nustatyta, kad jie koncentruojasi 1.28 – 1.32 g/cm³ tankio CsCl tirpalo sluoksnyje, kas būdinga ir daugeliui kitų virusų daleles arba virusų nukleokapsidę primenančių dalelių su nukleorūgštimis arba be jų (Dargeviciute ir kt., 2002; Gedvilaite ir kt., 2000; HV ir Dermott, 1976; Samuel ir kt., 2002; Samuel ir kt., 2003; Sasnauskas ir kt., 2002; Slibinskas ir kt., 2004; Slibinskas ir kt., 2003). Gautos išgrynintų rekombinantinių SeV, hPIV1, hRSV, NiV, HeV N baltymų išėigos (~ 28, 20, 18, 20, 20 mg/L indukuotos mielių kultūros) buvo panašios į išgryninto mielėse *S.cerevisiae* susintetinto kiaulytės viruso N baltymo išėigą (~ 23 mg/L indukuotos mielių kultūros), o išgrynintų rekombinantinių hPIV1 ir MenV N baltymų išėigos (~ 16, 10 mg/L indukuotos mielių kultūros) buvo ~ 1.5-3 kartus mažesnės nei kitų šiame darbe tirtų paramikso virusų N baltymų. Nors šiame darbe gautos tirtų paramikso virusų N baltymų išėigos toli gražu neprilygsta toms išėigoms, kurias pavyko gauti išgryninus mielėse *S.cerevisiae* ir *P.pastoris* susintetintą tymų viruso N baltymą (150 ir 400 mg/L indukuotos mielių kultūros (Slibinskas ir kt., 2004)), tačiau šiame darbe įsitikinta, kad naudojant mielių *S.cerevisiae* svetimų baltymų sintezės sistemą laboratorinėmis sąlygomis galima gauti pakankamai didelius kiekius išgrynintų tirtų paramikso virusų N baltymų.

Nustatyta, kad šiame darbe tirti mielėse susintetinti paramikso virusų N baltymai gryninimo metu išlieka stabilūs. Negausūs hidrolizuotų N baltymų kiekiai, kuriuos pavyko aptikti tik BIB metodu, nustatyti išgrynintuose mielėse *S.cerevisiae* susintetintų SeV, hPIV1, hPIV3, NiV, HeV ir MenV N baltymų mėginiuose, o išgryninto rekombinantinio hRSV N baltymo mėginyje jokių N

baltymo degradacijos produktų BIB metodu aptikti nepavyko. Įsitikinta, kad šiame darbe mielėse susintetinti ir išgryninti paramikso virusų N baltymai gali būti ilgą laiką saugiai laikomi 50 % glicerolio tirpale, -20°C temperatūroje arba ilgam laikui konservuojami juos liofilizuojant. Nustatyta, kad šiais būdais užkonservuoti tirti rekombinantiniai N baltymai ilgą laiką išlieka stabilūs, taip pat nekinta jų struktūra bei antigeninės savybės.

Elektroniniu mikroskopu stebint mielėse *S.cerevisiae* susintetintus SeV, hPIV1 ir hPIV3 N baltymus, buvo nustatyta, kad jie formuoja spiralinius virusų nukleokapsidę primenančias daleles, panašias į tiesius arba truputį lenktus 20 nm skersmens ir nuo 20 iki 400 nm ilgio vamzdelius, su „eglutės“ raštą primenančiais susiaurėjimais, maždaug vienodu atstumu pasikartojančiais per visą vamzdelio ilgį. Šie dariniai, juos stebint EM, savo išvaizda nesiskiria nuo tų, kuriuos formuoja natyvūs SeV, hPIV1 ir hPIV3 N baltymai šių virusų infekcijų metu žinduolių ląstelėse (Heggeness ir kt., 1981; Henrickson, 2003; Miyahara ir kt., 1992). Taip pat yra žinoma, kad panašius darinius formuoja tiek mielėse *P.pastoris*, tiek mielėse *S.cerevisiae* susintetinti tymų ir kiaulytės virusų N baltymai (Samuel ir kt., 2002; Samuel ir kt., 2003; Slibinskas ir kt., 2004; Slibinskas ir kt., 2003). Išgrynintus mielėse susintetintų SeV, hPIV1 ir hPIV3 N baltymų mėginius, stebint EM, buvo aptikti ir krumpliaratį primenantys žiediniai dariniai, sudaryti iš N baltymų, susijungusių tarpusavyje į vieną ar kelias nukleokapsidinės spiralės vijas. Tačiau šių darinių rekombinantinių N baltymų mėginiuose buvo aptikta labai nedaug. Tai rodo, kad mielėse susintetinti SeV, hPIV1 ir hPIV3 N baltymai formuoja ilgesnias nei kelios spiralės vijos vNPD ir šie dariniai yra patvarūs, nesuirsta gryninimo procedūrų metu. EM nustatyta, kad mielėse susintetinto hPIV3 N baltymo formuojamos vNPD yra vienos ilgiausių (iki 400 nm ilgio), be to, jos yra atsparios detergento Tween²⁰ poveikiui, kuris buvo naudojamas šių baltymų gryninimui.

Elektroniniu mikroskopu stebint mielėse *S.cerevisiae* susintetintus hRSV N baltymus, nustatyta, kad šie baltymai taip pat formuoja vNPD. Nors šie dariniai savo išvaizda yra labai panašūs į paragripo virusų (SeV, hPIV1 ir hPIV3) rekombinantinių N baltymų formuojamus analogiškus darinius, tačiau skiriasi tuo, kad yra žymiai trumpesni, iki 100 nm ilgio, ir paslankesni. Juos stebint EM, matosi, kad kai kurie jų yra susirietę net į žiedą. Mielėse susintetintų hRSV N baltymų formuojamos vNPD, jas stebint EM, savo išvaizda nesiskiria nuo tų, kuriuos formuoja natyvūs hRSV N baltymai šio viruso infekcijos metu žinduolių ląstelėse (Garcia-Barreno ir kt., 1996). Išgrynintų rekombinantinių hRSV N baltymų mėginyje, jį stebint EM, tai pat matosi daug nukleokapsidinės spiralės žiedų. Tai rodo, kad didelė dalis mielėse susintetintų hRSV N baltymų neformuoja ilgesnių nei kelios spiralės vijos vNPD arba šie dariniai yra nepatvarūs ir gryninimo metu subyra į vienos arba kelių vijų nukleokapsidės spiralės žiedus. Neseniai buvo nustatyta detali nukleokapsidės spiralės vijos, sudarytos iš dešimties hRSV N baltymų, erdvinė struktūra (Tawar ir kt., 2009). Gauti duomenys rodo, kad jungtis, kurios formuojasi tarp į spiralės viją susijungusių N baltymų, yra labai nepatvarios. Gali būti, kad šių jungčių pakanka N baltymams suformuoti stabilų nukleokapsidinės spiralės žiedą, tačiau daugiau vijų turintis darinys turi būti sutvirtintas į jį įjungiamos ribonukleorūgščių grandinės. Be to, detali nukleokapsidės spiralės vijos erdvinės struktūros analizė parodė, kad N baltymai formuoja jungtis ne su RNR azotinėmis bazėmis, kaip buvo manyta anksčiau, bet su fosforiboziniu karkasu, todėl ribonukleorūgščių seka neturi didelės įtakos N baltymo sąveikai su RNR. Remiantis struktūriniais hRSV N baltymo tyrimais, galima daryti prielaidą, kad dalis mielėse susintetintų hRSV N baltymų, besijungdami tarpusavyje, tuo pačiu metu jungiasi ir su mielių ląstelės citoplazmoje esančia RNR, todėl formuoja daugiau nei kelias vijas turinčius spiralinius vNPD. Tačiau rekombinantiniai hRSV N baltymai, juos lyginant, pavyzdžiui, su šiame darbe mielėse susintetintais paragripo virusų (SeV, hPIV1 ir hPIV3) N baltymais, dėl

įvairių priežasčių gali neefektyviai sąveikauti su mielių ląstelės RNR. Todėl tie rekombinantiniai hRSV N baltymai, kurie nesudaro jungčių su mielių ląstelės RNR, formuoja tik vienos, kelių vijų nukleokapsidinės spiralės žiedą, kuris yra palaikomas tik N baltymų tarpusavio sąveikų. Mielėse *S.cerevisiae* susintetinti hRSV N baltymai formuoja vNPD nesant kitų virusinių baltymų (Bhella ir kt., 2002). Kai kurie tyrimai rodo, kad efektyviai hRSV N baltymų sąveikai su RNR gali būti reikalingi ir kiti viruso baltymai (Collins ir Crowe, 2007). Taip pat negalima atmesti prielaidos, kad rekombinantinių N baltymų formuojamos vienos ar kelių vijų spiralinės vNPD taip pat sąveikauja su mielių ląstelės RNR, tačiau įjungiamos RNR ilgis nėra pakankamas didesniai vijų skaičiui. Norint nustatyti tikrąją priežastį, kodėl mielėse susintetinti hRSV N baltymai neefektyviai formuoja ilgesnes nei kelios spiralės vijos vNPD, reikalingi papildomi tyrimai.

Analizė elektroniniu mikroskopu analizė parodė, kad mielėse susintetinti NiV, HeV ir MenV N baltymai daugiausia formuoja vos vienos ar kelių vijų nukleokapsidinės spiralės žiedus. Daugiau vijų turinčių spiralinių darinių išgrynintuose mielėse susintetintų NiV, HeV ir MenV N baltymų mėginiuose buvo aptikta palyginti nedaug. Daugiausiai NiV N baltymo mėginyje ir mažiausiai MenV N baltymo mėginyje. Tai rodo, kad ilgesnes nei kelios spiralės vijos vNPD mielėse susintetinti NiV, HeV ir MenV N baltymai formuoja labai neefektyviai. Tačiau šie dariniai yra panašūs į natyvių N baltymų formuojamą nukleokapsidę (Eaton ir kt., 2006). Tam, kad būtų nustatyta, dėl kokios priežasties mielėse susintetinti NiV, HeV ir MenV N baltymai taip neefektyviai formuoja ilgesnes vNPD, taip pat kaip ir mielėse susintetinto hRSV N baltymo atveju, būtų reikalingi papildomi tyrimai. Yra žinoma, kad paramikso virusų N baltymo C-dalies amino rūgščių sekos (a.r. nuo 400 iki galo) erdvinė struktūra yra nekompaktiška ir kintanti (Habchi ir kt., 2010; Morgan ir kt., 1984). Buvo padaryta prielaida, kad nekompaktiškos erdvinės struktūros paslanki N baltymo C dalis gali trukdyti N baltymų tarpusavio

sąveikoms, susidarančioms tarp į nukleokapsidinės spiralės viją besijungiančių N baltymų arba gretimose spiralės vijose esančių N baltymų. Šiame darbe buvo nustatyta, kad neturintys C dalies mielėse susintetinti NiV, HeV ir MenV N baltymai labai efektyviai formuoja ilgas, tiesias ir kompaktiškas vNPD, kuriu pakraščiuose nesimato aiškiai išreikštų „eglutės“ raštą primenančių susiaurėjimų. Sutrumpintų rekombinantinių NiV, HeV ir MenV N baltymų mėginiuose, juos stebint EM, buvo aptikti vos keli nukleokapsidiniai žiedai. Gauti duomenys rodo, kad nekompaktiškos erdvinės struktūros N baltymo C dalis arba gali trukdyti mielėse susintetintiems pilno ilgio NiV, HeV ir MenV N baltymams formuoti ilgesnes nei kelios spiralės vijos vNPD, arba iš rekombinantinių N baltymų suformuoti ilgi spiraliniai dariniai dėl paslankios N baltymo C dalies gali būti labai nestabilūs ir, juos gryninant, subyrėti į nukleokapsidės žiedus. Yra manoma, kad paslanki N baltymo C dalis viruso nukleokapsidei suteikia lankstumo, neleidžia N baltymams suformuoti labai kompaktiško spiralinio darinio, todėl viruso polimerazė, neišardydama šios struktūros, sugeba transkribuoti ir replikuoti joje įjungtą virusinę RNR. O įjungta RNR savo ruožtu sutvirtina lankstų, nekompaktišką iš N baltymų suformuotą spiralinį nukleokapsidės karkasą (Tawar ir kt., 2009). Atsižvelgus į tai, būtų galima daryta prielaidą, kad mielėse susintetinti pilno ilgio NiV, HeV ir MenV N baltymai, skirtingai nei šiame darbe mielėse susintetinti paragripo virusų N baltymai, labai neefektyviai sąveikauja su nespecificine mielių ląstelės RNR, kuri turėtų stabilizuoti šių baltymų formuojamas ilgesnes nei kelios spiralės vijos vNPD. Todėl rekombinantinių NiV, HeV ir MenV N baltymų formuojamos vNPD yra vos vienos ar kelių spiralės vijų ilgio. Tačiau šiai prielaidai patvirtinti reikalingi papildomi tyrimai.

Yra žinoma, kad *Paramyxoviridae* šeimos virusų N baltymų formuojama nukleokapsidė apsaugo viruso genomine RNR nuo ribonukleazijų poveikio (Lamb ir Parks, 2007). Šiame darbe nustatyta, kad mielėse *S.cerevisiae* susintetintų SeV N baltymų formuojamos vNPD į savo struktūrą yra įjungę 60-

500 nt ilgio mielių ląstelės RNR. Tai patvirtina prielaidą, kad mielėse susintetinti paramikso virusų N baltymai sąveikauja su mielių ląstelės RNR. Veikiant RNase A, rekombinantinių SeV N baltymų formuojamos vNPD nuo hidrolizės apsaugo tik 60-80 nt ilgio RNR fragmentus. Tiriant išgrynintus mielėse susintetintų tymų ir kiaulytės virusų N baltymų formuojamas vNPD, buvo gauti panašūs rezultatai – visa į vNPD įjungta RNR veikiant RNase A buvo dalinai degraduojama į 80-200 nt ilgio RNR fragmentus (remtasi dr. R. Slibinsko atliktais tyrimais). Yra nustatyta, kad paramikso virusų nukleokapsidėje virusinė RNR yra įsukta per visą iš N baltymų suformuoto spiralinio darinio ilgį, o viena spiralės vija įjungia apie 80 nt ilgio RNR seką (Bhella ir kt., 2002; Egelman ir kt., 1989). Paveikus rekombinantinio SeV N baltymo formuojamas vNPD RNase A, išlikę 60-80 nt ilgio RNR fragmentai turėtų būti apsaugoti iš 10-13 N baltymų suformuoto darinio. Tiek SeV N baltymų pakanka suformuoti vienos spiralės vijos nukleokapsidės žiedą. Tačiau išgrynintų mielėse susintetintų SeV N baltymų mėginį stebint EM, vienos ar kelių vijų vNPD buvo aptikta vos keletas. Tai rodo, kad rekombinantinių SeV N baltymų formuojamose ilgesnėse nei kelios spiralės vijos vNPD įjungta mielių ląstelės RNR, maždaug toje vietoje kur prasideda nauja spiralės vija, yra jautri ribonukleazijų poveikiui. Gali būti, kad rekombinantinių SeV N baltymų formuojamose vNPD mielių ląstelės RNR yra įjungiamas ne taip specifiskai kaip virusinė RNR nukleokapsidei formuojantis viruso infekcijos metu žinduolių ląstelėse. Todėl nespecifiskai įjungta mielių ląstelės RNR seka kai kuriose iš rekombinantinių SeV N baltymų suformuotų spiralinių vNPD vietose yra atvira ribonukleazijų poveikiui. Tačiau šiai prielaidai patvirtinti reikalingi papildomi tyrimai.

Šiame darbe mielėse *S.cerevisiae* susintetintų SeV, hPIV1, hPIV3 ir hRSV N baltymų tapatybės buvo patvirtintos BIB metodu naudojant SeV, žPG1V, hPIV3 ir hRSV imunizuotų gyvūnų kraujo serumus. Kadangi nebuvo galimybės gauti NiV, HeV ir MenV baltymams specifinių antikūnų, todėl mielėse

susintetintų šių virusų N baltymų tapatybės buvo patvirtintos šiuos baltymus analizuojant tandeminės masių spektrometrijos (MS/MS) metodu. Ši analizė buvo atlikta Australijos gyvūnų sveikatos priežiūros laboratorijoje (AGSPL), Australijoje. Taip pat šiuo metodu nustatyta, kad mielėse susintetinti NiV, HeV ir MenV N baltymai yra modifikuojami pašalinant metioniną ir acetilinant antroje pozicijoje esantį seriną. Yra žinoma, kad taip pat yra modifikuojami natyvūs Menangle ir Hendra virusų N baltymai (Shiell ir kt., 2002). Tai rodo, kad baltymai atsakingi už po-transliacines NiV, HeV ir MenV N baltymų modifikacijas yra konservatyvūs mielėse ir žinduolių ląstelėse.

Siekiant nustatyti, ar šiame darbe tirtų mielėse *S.cerevisiae* susintetintų paramikso virusų N baltymų antigeninės savybės yra panašios į natyvių analogiškų virusų N baltymų antigenines savybes tiesioginės imunofermentinės analizės (IFA) metodu buvo tiriama rekombinantinių N baltymų reakcija su atitinkamais virusais užsikrėtusių žmonių ir gyvūnų kraujo serumais. Tiesioginės IFA metodu rekombinantiniai paragripo virusų 1 ir 3 bei žmogaus respiracinio sincitinio viruso N baltymai buvo tiriami Biotechnologijos instituto Imunologijos ir ląstelės biologijos skyriuje, vadovaujant dr. A. Žvirblienei. Kadangi su Henipah ir Menangle virusais yra leidžiama dirbti tik ketvirto saugumo lygmens reikalavimus atitinkančioje laboratorijoje, todėl mielėse susintetintų šių virusų N baltymų antigeninės savybės buvo tiriamos Australijos gyvūnų sveikatos priežiūros laboratorijoje, Australijoje.

Palyginus tiesioginės IFA metodu gautus duomenis su komercinio testo rezultatais (IBL-hPIV1/2/3 IgG IFA), kuriame kaip antigenas yra naudojamos paragripo virusų dalelės, įsitikinta, kad rekombinantiniai hPIV1 ir hPIV3 N baltymai reaguoja su IgG klasės antikūnais, paragripo virusais užsikrėtusių žmonių kraujo serumuose (Žvirblienė ir kt., 2009). Tai rodo, kad mielėse susintetintų žmogaus paragripo virusų N baltymų antigeninės savybės yra panašios į šių virusų natyvių N baltymų antigenines savybes, todėl paragripo

virusų infekcijų metu prieš šių virusų N baltymus susidarantys polikloniniai žmogaus kraujo serumo antikūnai gali būti sėkmingai aptinkami naudojant mielėse susintetintus hPIV1 ir hPIV3 N baltymus. IFA metodu naudojant rekombinantinius paragripo virusų N baltymus penkiais tirtais serumų atvejais iš septynių pavyko nustatyti infekciją sukėlusio paragripo viruso tipą, ko neįmanoma padaryti naudojant komercinį testą (Lentelė 2). Tai rodo, kad paragripo virusų infekcijų serologinei diagnostikai IFA naudojant mielėse susintetintus paragripo virusų N baltymus būtų galima padidinti diagnostinio testo specifiškumą.

Taip pat buvo įsitikinta, kad šiame darbe mielėse *S.cerevisiae* susintetinto respiracinio sincitinio viruso N baltymo antigeninės savybės yra panašios į natyvaus analogiško N baltymo antigenines savybes. Tiesioginės IFA analizės metodu nustatyta, kad rekombinantinis hRSV N baltymas reaguoja su IgG klasės antikūnais šiuo virusų užsikrėtusių žmonių kraujo serumuose. Naudojant mielėse susintetintą hRSV N baltymą tiesioginės IFA metodu hRSV specifiniams IgG klasės antikūnams nustatyti, 57 mėginių iš 61 (93.4 %) tyrimo rezultatai sutapo su komercinio testo rezultatais (IBL-hRSV IgG IFA), kuriame kaip antigenas yra naudojamos respiracinio sincitinio viruso dalelės, o keturių mėginių – nesutapo. Iš jų trys buvo klaidingai teigiami, o vienas – klaidingai neigiamas. Klaidingai neigiamas rezultatas gali reikšti, kad tirtame mėginyje yra antikūnų, specifinių kitiems hRSV baltymams, bet ne N baltymui. Klaidingai teigiami rezultatai gali reikšti, kad naudojant mielėse susintetintą hRSV N baltymą tiesioginės IFA metodu įmanoma nustatyti mažesnes hRSV specifinių IgG klasės antikūnų koncentracijas. Gauti rezultatai rodo, kad mielėse *S.cerevisiae* susintetintas žmogaus respiracinio sincitinio viruso N baltymas gali būti sėkmingai naudojamas šio viruso infekcijos serologinei diagnostikai.

Atlikus IFA, buvo nustatyta, kad mielėse *S.cerevisiae* susintetinti NiV, HeV ir MenV N baltymai reaguoja su atitinkamais virusais užsikrėtusių gyvūnų ir žmogaus kraujo serumais. Tai rodo, kad rekombinantinių NiV, HeV ir MenV

N baltymų antigeninės savybės yra panašios į šių virusų natyvių N baltymų antigenines savybes. Todėl NiV, HeV ir MenV infekcijų metu prieš šių virusų N baltymus susidarantys kraujo serumo polikloniniai antikūnai gali būti sėkmingai aptinkami įvairiose gyvūnų rūšyse, naudojant mielėse susintetintus NiV, HeV ir MenV N baltymus. Tačiau reikia pabrėžti, kad Henipah virusų N baltymų ar. sekos yra labai panašios, todėl abu mielėse susintetinti Henipah virusų N baltymai vienodai reaguoja tiek su Nipah virusui, tiek su Hendra virusui teigiamais kraujo serumais, todėl IFA naudojant mielėse susintetintus Henipah virusų N baltymus nėra įmanoma atskirti Nipah ir Hendra virusų infekcijų.

Įsitikinus, kad šiame darbe mielėse *S.cerevisiae* susintetintų paramikso virusų N baltymų struktūra ir antigeninės savybės yra panašios į analogiškų virusų natyvių N baltymų struktūrą ir antigenines savybes, šie baltymai buvo panaudoti mAk gauti. Šie darbai buvo atlikti Biotechnologijos instituto Imunologijos ir ląstelės biologijos skyriuje, vadovaujant dr. A. Žvirblienei. Šiame darbe nustatyta, kad naudojant rekombinantinius hPIV1, hPIV3, NiV ir MenV N baltymus, gauti šiems baltymams specifiniai mAk tinka šių virusų diagnostikai (Juozapaitis ir kt., 2007a; Žvirblienė ir kt., 2010; Žvirblienė ir kt., 2009). Kadangi Henipah virusų N baltymų ar. sekos yra labai panašios, todėl mAk gauti buvo naudojamas tik rekombinantinis NiV N baltymas. Tačiau reikia pažymėti, kad gauti NiV N baltymui specifiniai mAk reaguoja ir su HeV N baltymu, todėl šiuos antikūnus naudojant diagnostikai nebūtų įmanoma atskirti Nipah ir Hendra virusų infekcijų. Taip pat šiame darbe buvo detaliau charakterizuoti gautų MenV N baltymui specifinių mAk epitopai. Nustatyta, kad du iš trijų gautų mAk (klonai 2D1 ir 4G11) reaguoja su MenV N baltymo ar. seka, kuri prasideda 430 ar. ir baigiasi 460 a.r, o klonas 10G8 mAk reaguoja su MenV N baltymo ar. seka, kuri prasideda 460 ar. ir baigiasi 490 ar. Naudojant mielėse *S.cerevisiae* susintetintą hRSV N baltymą specifinių šiam baltymui mAk gauti nepavyko. Buvo padaryta prielaida, kad vien N baltymo nepakanka

užtektinai stipriai stimuliuoti imuninę sistemą. Nors rekombinantinis hRSV N baltymas savo antigeninėmis savybėmis yra panašus į natyvų šio viruso N baltymą, tačiau, matyt, hRSV infekcijos metu kiti viruso baltymai vaidina svarbų vaidmenį stimuliuojant imuninę sistemą. Siekiant apeiti šią kliūtį, mielėse *S.cerevisiae* buvo susintetintas chimerinis N baltymas, sudarytas iš tymų viruso N baltymo N-dalies, sujungtos su hRSV N baltymo C-dalimi. Žinant, kad tymų viruso N baltymas yra labai imunogeniškas (Žvirblienė ir kt., 2007), buvo tikėtasi, kad chimeriniu N baltymu imunizavus peles, imunogeniška tymų viruso N baltymo N-dalis pakankamai stipriai sužadins pelės imuninį atsaką, kurio metu bus gaminami hRSV N baltymo C-dalies ar. sekai specifiniai antikūnai. Tačiau naudojant chimerinį N baltymą nepavyko gauti mAk specifinių hRSV N baltymo C-dalies ar. sekai. Tai rodo, kad nors mielėse susintetintas hRSV N baltymas yra panašus savo antigeninėmis savybėmis į natyvų šio viruso N baltymą, bet yra neimunogeniškas ir be kitų šio viruso baltymų pagalbos negeba užtektinai stipriai stimuliuoti imuninės sistemos atsaką.

Daug baltymų, svarbių tiriamuoju ir praktiniu požiūriu, buvo susintetinti mielių *S.cerevisiae* svetimų baltymų sintezės sistemoje. Šios mielės yra gerai iširtos ir sukaupta daug duomenų apie jų genetiką ir fiziologiją. Be to, remiantis jų naudojimu kepimui ir rauginimui, mielės *S.cerevisiae* yra pripažintos kaip saugus organizmas, priskiriamas kategorijai GRAS (*angl.* – „*generally regarded as safe*“). Dėl paprastesnių genų raiškos technologijų virusinių baltymų sintezė tapo lengvesnė ir efektyvesnė tiek eukariotų, tiek prokariotų svetimų baltymų sintezės sistemose. Genetinių manipuliacijų paprastumas, rekombinantinių baltymų išėiga ir natyviems baltymams būdingos po-transliacinės modifikacijos dažnai nulemia tai, kokią sistemą tenka rinktis svetimų baltymo sintezei. Mielės *S.cerevisiae* yra vienaląsčiai eukariotai, kurie, priešingai nei bakterijos, turi po-transliacinio baltymų brendimo procesus ir yra patogūs genetinėms manipuliacijoms atlikti. Mielės

turi keletą svarbių privalumų sintetinant virusinius baltymus: mielėse susintetinti baltymai neturi toksinių priemaišų ir gali būti naudojami vakcinoms ir diagnostikai. Lyginant šiame darbe gautas tirtų rekombinantinių paramikso virusų N baltymų išėigas, mielių *S.cerevisiae* svetimų baltymų sintezės sistema yra žymiai pranašesnė už analogiškas aukštesniųjų eukariotų sistemas. Šio darbo metu nustatyta, kad mielėse *S.cerevisiae* susintetinti paramikso virusų N baltymai tinka šių virusų infekcijų diagnostikai, todėl žymiai naudingiau sintetinti nukleokapsidės baltymus mielėse, nes galima gauti didesnius jų kiekius, nei aukštesniųjų eukariotų ląstelėse, nenukenčiant N baltymų kokybei.

Apibendrinant šiame darbe gautus rezultatus galima teigti, kad mielės *S.cerevisiae* puikiai tinka paramikso virusų N baltymų sintezei. Mielėse susintetinti SeV, hPIV1, hPIV3, hRSV, NiV, HeV ir MenV N baltymai savo savybėmis yra panašūs į natyvius analogiškų virusų N baltymus: formuoja virusų nukleokapsidę primenančias daleles, sąveikauja su ribonukleorūgštimis ir turi natyviems virusų N baltymams būdingas po-transliacines modifikacijas (Shiell ir kt., 2002). Be to, rekombinantinių hPIV1, hPIV3, hRSV, NiV, HeV ir MenV N baltymų antigeninės savybės yra labai panašios į natyvių analogiškų virusų N baltymų antigenines savybes. Taip pat įsitikinta, kad šiame darbe mielėse *S.cerevisiae* susintetinti hPIV1, hPIV3, hRSV, NiV, HeV ir MenV N baltymai tinka šių virusų infekcijų serologinei diagnostikai.

IŠVADOS

1. Mielėse *S.cerevisiae* susintetinti SeV, hPIV1, hPIV3, hRSV, NiV, HeV ir MenV N baltymai formuoja virusų nukleokapsidę primenančias daleles. Vidutinė baltymų SeV, hPIV1, hPIV3, hRSV, NiV, HeV ir MenV N išeiga yra 1.2, 0.7, 0.5, 0.9, 0.8, 0.8, ir 0.3 mg iš 1 g drėgnos mielių *S.cerevisiae* biomasės.
2. Mielėse *S.cerevisiae* susintetinti hPIV1, hPIV3, hRSV, NiV, HeV ir MenV N baltymai pasižymi antigeninėmis savybėmis, būdingomis natyviems analogišku virusų N baltymams.
3. Rekombinantinių NiV, HeV ir MenV N baltymų C dalis destabilizuoja šių baltymų formuojamas virusų nukleokapsidę primenančias daleles.
4. Rekombinantinių SeV N baltymų formuojamos virusų nukleokapsidę primenančios dalelės nespecifiškai įjungia mielių ląstelės RNR ir ją iš dalies apsaugo nuo RNazės A poveikio.
5. Mielėse *S.cerevisiae* susintetinti hPIV1, hPIV3, hRSV, NiV, HeV ir MenV N baltymai yra puikus įrankis šių virusų infekcijų serologinės diagnostikos sistemų kūrimui.

MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS

Disertacijoje pateikta medžiaga paskelbta šiuose straipsniuose:

Juozapaitis M, Slibinskas R, Staniulis J, Sakaguchi T, Sasnauskas K. 2005.

Generation of Sendai virus nucleocapsid-like particles in yeast. *Virus Res* 108:221-4

Juozapaitis M, Coiras M, Staniulis J, Sasnauskas K. 2006. Synthesis of human respiratory syncytial virus nucleoprotein in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biologija* 3:79-82.

Juozapaitis M, Serva A, Kučinskaite I, Žvirblienė A, Slibinskas R, et al. 2007. Generation of menangle virus nucleocapsid-like particles in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biotechnol* 130:441-7

Juozapaitis M, Serva A, Žvirblienė A, Slibinskas R, Staniulis J, et al. 2007. Generation of henipavirus nucleocapsid proteins in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Virus Res* 124:95-102

Juozapaitis M, Žvirblienė A, Kučinskaite I, Šėžaitė I, Slibinskas R, et al. 2008. Synthesis of recombinant human parainfluenza virus 1 and 3 nucleocapsid proteins in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Virus Res* 133:178-86

Žvirblienė A, Šėžaitė I, Plečkaitytė M, Kučinskaitė-Kodžė I, **Juozapaitis M**, Sasnauskas K. 2009. Mapping of an antigenic site on the nucleocapsid protein of human parainfluenza virus type 3. *Viral Immunol* 22:181-8

Žvirblienė A, Kučinskaitė-Kodžė I, **Juozapaitis M**, Lasickienė R, Gritėnaitė D, et al. 2010. Novel monoclonal antibodies against Menangle virus nucleocapsid protein. *Arch Virol* 155:13-8

Su disertacijoje pateikta medžiaga nesusiję straipsniai:

Juozapaitis M, Antoniukas L. 2007. [Influenza virus]. *Medicina (Kaunas)* 43:919-29

- Kučinskaitė I, **Juozapaitis M**, Serva A, Žvirblienė A, Johnson N, et al. 2007. Antigenic characterisation of yeast-expressed lyssavirus nucleoproteins. *Virus Genes* 35:521-9
- Petraitytė R, Tamošiūnas PL, **Juozapaitis M**, Žvirblienė A, Sasnauskas K, et al. 2009. Generation of Tioman virus nucleocapsid-like particles in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Virus Res* 145:92-6
- Wunderlich K, **Juozapaitis M**, Manz B, Mayer D, Gotz V, et al. 2010. Limited compatibility of polymerase subunit interactions in influenza A and B viruses. *J Biol Chem* 285:16704-12
- Wunderlich K, **Juozapaitis M**, Ranadheera C, Kessler U, Martin A, et al. 2011. Identification of high-affinity PB1-derived peptides with enhanced affinity to the PA protein of influenza A virus polymerase. *Antimicrob Agents Chemother* 55:696-702

Disertacijoje pateikta medžiaga paskelbta šiose konferencijose:

- Juozapaitis M**, Coiras M, Sasnauskas K. Synthesis of recombinant human respiratory syncytial virus nucleoprotein in yeast. XIII International Conference on Negative Strand Viruses, June 17-22, 2006, Salamanca, Spain.
- Juozapaitis M**, Coiras M, Staniulis J, Sasnauskas K. Žmonių kvėpavimo sincitinio viruso nukleokapsidės baltymo sintezė mielėse *S.cerevisiae*. Lietuvos Biochemikų draugija. Biochemija: mokslas ir žinių visuomenė. IX-asis suvažiavimas – konferencija. 2006 m. birželio mėn 16-18, Tolieja.
- Sasnauskas K, Gedvilaite A, Slibinskas R, **Juozapaitis M**, Žvirblienė A, Ulrich R. Generation of viral proteins as virus-like particles in yeast. 7th ScanBalt Forum and Biomaterials Days 2008, September 24-26, Vilnius.
- Žvirblienė A, Šežaitė I, Plačkaitytė M, Kučinskaitė-Kodžė I, **Juozapaitis M**, Sasnauskas K. Mapping of an antigenic site on the nucleocapsid protein

of human parainfluenza virus type 3. XIV International Conference on Negative Strand Viruses, June 20-25, 2010, Brugge, Belgium.

PADĖKA

Norėčiau nuoširdžiai padėkoti savo darbo vadovui prof. habil. dr. Kęstučiui Sasnauskui už suteiktą galimybę vykdyti mokslinius tyrimus ir darbui sudarytas sąlygas, už vertingus patarimus, kritines pastabas, planuojant eksperimentus bei ruošiant disertaciją.

Taip pat esu labai dėkingas visam EGIS kolektyvui: Rimantui Slibinskui, Evaldui Čypliui, Daliai Gritėnaitei, Laimai Servaitei, Andriui Servai ir kitiems už diskusijas, vertingus patarimus, gerą nuotaiką, šaunią atmosferą ir stiprų moralinį palaikymą. Taip pat noriu padėkoti Juratei Makariūnaitei už techninę pagalbą ir moralinį palaikymą.

Ypatingai esu dėkingas savo motinai ir draugei Dainai, kurios visada buvo stiprios ir labai mane palaikė.

Šis darbas buvo atliktas Vilniaus universiteto Biotechnologijos institute ir buvo finansuojamas iš Lietuvos valstybinio mokslo fondo ir Lietuvos mokslo tarybos projektų B-11/2004-2006 ir AUT-14/2008-2010 lėšų.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- Alting-Mees MA, Short JM. 1989. pBluescript II: gene mapping vectors. *Nucleic Acids Res* 17:9494
- Ambrose MW, Wyde PR, Ewasyshyn M, Bonneau AM, Caplan B, et al. 1991. Evaluation of the immunogenicity and protective efficacy of a candidate parainfluenza virus type 3 subunit vaccine in cotton rats. *Vaccine* 9:505-11
- Bachi T. 1988. Direct observation of the budding and fusion of an enveloped virus by video microscopy of viable cells. *J Cell Biol* 107:1689-95
- Baker KA, Dutch RE, Lamb RA, Jardetzky TS. 1999. Structural basis for paramyxovirus-mediated membrane fusion. *Mol Cell* 3:309-19
- Becker S, Soukup J, Yankaskas JR. 1992. Respiratory syncytial virus infection of human primary nasal and bronchial epithelial cell cultures and bronchoalveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 6:369-74
- Bhella D, Ralph A, Murphy LB, Yeo RP. 2002. Significant differences in nucleocapsid morphology within the Paramyxoviridae. *J Gen Virol* 83:1831-9
- Bhella D, Ralph A, Yeo RP. 2004. Conformational flexibility in recombinant measles virus nucleocapsids visualised by cryo-negative stain electron microscopy and real-space helical reconstruction. *J Mol Biol* 340:319-31
- Blount RE, Jr., Morris JA, Savage RE. 1956. Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. *Proc Soc Exp Biol Med* 92:544-9
- Bossert B, Marozin S, Conzelmann KK. 2003. Nonstructural proteins NS1 and NS2 of bovine respiratory syncytial virus block activation of interferon regulatory factor 3. *J Virol* 77:8661-8
- Bouche F, Ammerlaan W, Fournier P, Schneider F, Muller CP. 1998. A simplified immunoassay based on measles virus recombinant hemagglutinin protein for testing the immune status of vaccinees. *J Virol Methods* 74:77-87

- Bowden TA, Crispin M, Jones EY, Stuart DI. 2010. Shared paramyxoviral glycoprotein architecture is adapted for diverse attachment strategies. *Biochem Soc Trans* 38:1349-55
- Bowden TR, Westenberg M, Wang LF, Eaton BT, Boyle DB. 2001. Molecular characterization of Menangle virus, a novel paramyxovirus which infects pigs, fruit bats, and humans. *Virology* 283:358-73
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-54
- Brandt CD, Kim HW, Arrobio JO, Jeffries BC, Wood SC, et al. 1973. Epidemiology of respiratory syncytial virus infection in Washington, D.C. 3. Composite analysis of eleven consecutive yearly epidemics. *Am J Epidemiol* 98:355-64
- Castaneda SJ, Wong TC. 1990. Leader sequence distinguishes between translatable and encapsidated measles virus RNAs. *J Virol* 64:222-30
- Caumont AB, Jamieson GA, Pichuanes S, Nguyen AT, Litvak S, Dupont C. 1996. Expression of functional HIV-1 integrase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* leads to the emergence of a lethal phenotype: potential use for inhibitor screening. *Curr Genet* 29:503-10
- Chanock R, Finberg L. 1957. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). II. Epidemiologic aspects of infection in infants and young children. *Am J Hyg* 66:291-300
- Chanock R, Roizman B, Myers R. 1957. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). I. Isolation, properties and characterization. *Am J Hyg* 66:281-90
- Chanock RM. 1957. Recovery of a new type of myxovirus from infants with croup. *Ann N Y Acad Sci* 67:287-95

- Chanock RM, Parrott RH. 1965. Acute Respiratory Disease in Infancy and Childhood: Present Understanding and Prospects for Prevention. *Pediatrics* 36:21-39
- Chanock RM, Parrott RH, Bell JA, Rowe WP, Huebner RJ. 1958a. New viruses observed in children with respiratory diseases. *Public Health Rep* 73:193-5
- Chanock RM, Parrott RH, Cook K, Andrews BE, Bell JA, et al. 1958b. Newly recognized myxoviruses from children with respiratory disease. *N Engl J Med* 258:207-13
- Chen W, Helenius A. 2000. Role of ribosome and translocon complex during folding of influenza hemagglutinin in the endoplasmic reticulum of living cells. *Mol Biol Cell* 11:765-72
- Chua KB, Bellini WJ, Rota PA, Harcourt BH, Tamin A, et al. 2000. Nipah virus: a recently emergent deadly paramyxovirus. *Science* 288:1432-5
- Chua KB, Goh KJ, Wong KT, Kamarulzaman A, Tan PS, et al. 1999. Fatal encephalitis due to Nipah virus among pig-farmers in Malaysia. *Lancet* 354:1257-9
- Chua KB, Wang LF, Lam SK, Crameri G, Yu M, et al. 2001. Tioman virus, a novel paramyxovirus isolated from fruit bats in Malaysia. *Virology* 283:215-29
- Chua KB, Wang LF, Lam SK, Eaton BT. 2002. Full length genome sequence of Tioman virus, a novel paramyxovirus in the genus Rubulavirus isolated from fruit bats in Malaysia. *Arch Virol* 147:1323-48
- Collins PL, Crowe JE, Jr. Respiratory Syncytial Virus and Human Metapneumovirus. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Straus SE, Martin MA, Roizman B, eds. *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins. 2007. 2:1601-1646
- Compans RW, Mountcastle WE, Choppin PW. 1972. The sense of the helix of paramyxovirus nucleocapsids. *J Mol Biol* 65:167-9

- Connolly SA, Leser GP, Yin HS, Jardetzky TS, Lamb RA. 2006. Refolding of a paramyxovirus F protein from prefusion to postfusion conformations observed by liposome binding and electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:17903-8
- Connors M, Collins PL, Firestone CY, Murphy BR. 1991. Respiratory syncytial virus (RSV) F, G, M2 (22K), and N proteins each induce resistance to RSV challenge, but resistance induced by M2 and N proteins is relatively short-lived. *J Virol* 65:1634-7
- Cordey S, Roux L. 2006. Transcribing paramyxovirus RNA polymerase engages the template at its 3' extremity. *J Gen Virol* 87:665-72
- Coronel EC, Takimoto T, Murti KG, Varich N, Portner A. 2001. Nucleocapsid incorporation into parainfluenza virus is regulated by specific interaction with matrix protein. *J Virol* 75:1117-23
- Cremata JA, Montesino R, Quintero O, Garcia R. 1998. Glycosylation profiling of heterologous proteins. *Methods Mol Biol* 103:95-105
- Crowe JE, Jr. 2001. Influence of maternal antibodies on neonatal immunization against respiratory viruses. *Clin Infect Dis* 33:1720-7
- Crowe JE, Jr., Williams JV. 2003. Immunology of viral respiratory tract infection in infancy. *Paediatr Respir Rev* 4:112-9
- Curran J, Kolakofsky D. 1999. Replication of paramyxoviruses. *Adv Virus Res* 54:403-22
- Curran J, Marq JB, Kolakofsky D. 1995. An N-terminal domain of the Sendai paramyxovirus P protein acts as a chaperone for the NP protein during the nascent chain assembly step of genome replication. *J Virol* 69:849-55
- Curran J, Pelet T, Kolakofsky D. 1994. An acidic activation-like domain of the Sendai virus P protein is required for RNA synthesis and encapsidation. *Virology* 202:875-84

- Dargeviciute A, Brus Sjolander K, Sasnauskas K, Kruger DH, Meisel H, et al. 2002. Yeast-expressed Puumala hantavirus nucleocapsid protein induces protection in a bank vole model. *Vaccine* 20:3523-31
- Denny FW, Murphy TF, Clyde WA, Jr., Collier AM, Henderson FW. 1983. Croup: an 11-year study in a pediatric practice. *Pediatrics* 71:871-6
- Doraisingham S, Goh KT, Ling AE. 1987. Epidemiology of viral infections in Singapore. *Ann Acad Med Singapore* 16:243-9
- Drescher U. 2002. Eph family functions from an evolutionary perspective. *Curr Opin Genet Dev* 12:397-402
- Eaton BT, Broder CC, Middleton D, Wang LF. 2006. Hendra and Nipah viruses: different and dangerous. *Nat Rev Microbiol* 4:23-35
- Eaton BT, Broder CC, Middleton D, Wang LF. Henipavirus. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Straus SE, Martin MA, Roizman B, eds. *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins. 2007. 2:1587-1600
- Egelman EH, Wu SS, Amrein M, Portner A, Murti G. 1989. The Sendai virus nucleocapsid exists in at least four different helical states. *J Virol* 63:2233-43
- Eng JK, Fischer B, Grossmann J, Maccoss MJ. 2008. A fast SEQUEST cross correlation algorithm. *J Proteome Res* 7:4598-602
- Falsey AR, Hennessey PA, Formica MA, Cox C, Walsh EE. 2005. Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults. *N Engl J Med* 352:1749-59
- Falsey AR, Walsh EE. 2005. Respiratory syncytial virus infection in elderly adults. *Drugs Aging* 22:577-87
- Fooks AR, Schadeck E, Liebert UG, Dowsett AB, Rima BK, et al. 1995. High-level expression of the measles virus nucleocapsid protein by using a replication-deficient adenovirus vector: induction of an MHC-1-

restricted CTL response and protection in a murine model. *Virology* 210:456-65

Fooks AR, Stephenson JR, Warnes A, Dowsett AB, Rima BK, Wilkinson GW. 1993. Measles virus nucleocapsid protein expressed in insect cells assembles into nucleocapsid-like structures. *J Gen Virol* 74 (Pt 7):1439-44

Fuentes SM, Sun D, Schmitt AP, He B. 2010. Phosphorylation of paramyxovirus phosphoprotein and its role in viral gene expression. *Future Microbiol* 5:9-13

Fulginiti VA, Eller JJ, Sieber OF, Joyner JW, Minamitani M, Meiklejohn G. 1969. Respiratory virus immunization. I. A field trial of two inactivated respiratory virus vaccines; an aqueous trivalent parainfluenza virus vaccine and an alum-precipitated respiratory syncytial virus vaccine. *Am J Epidemiol* 89:435-48

Garcia-Barreno B, Delgado T, Melero JA. 1996. Identification of protein regions involved in the interaction of human respiratory syncytial virus phosphoprotein and nucleoprotein: significance for nucleocapsid assembly and formation of cytoplasmic inclusions. *J Virol* 70:801-8

Gedvilaite A, Frommel C, Sasnauskas K, Micheel B, Ozel M, et al. 2000. Formation of immunogenic virus-like particles by inserting epitopes into surface-exposed regions of hamster polyomavirus major capsid protein. *Virology* 273:21-35

Gellissen G, Hollenberg CP. 1997. Application of yeasts in gene expression studies: a comparison of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* and *Kluyveromyces lactis* -- a review. *Gene* 190:87-97

Glezen P, Denny FW. 1973. Epidemiology of acute lower respiratory disease in children. *N Engl J Med* 288:498-505

Glezen WP. 1984. Reactive airway disorders in children. Role of respiratory virus infections. *Clin Chest Med* 5:635-43

- Glezen WP, Frank AL, Taber LH, Kasel JA. 1984. Parainfluenza virus type 3: seasonality and risk of infection and reinfection in young children. *J Infect Dis* 150:851-7
- Gonzalez-Reyes L, Ruiz-Arguello MB, Garcia-Barreno B, Calder L, Lopez JA, et al. 2001. Cleavage of the human respiratory syncytial virus fusion protein at two distinct sites is required for activation of membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9859-64
- Guthrie C, Fink G. Guide to yeast genetics and molecular biology. Methods in Enzymology. Academic Press, San Diego. 1991.
- Habchi J, Mamelli L, Darbon H, Longhi S. 2010. Structural disorder within Henipavirus nucleoprotein and phosphoprotein: from predictions to experimental assessment. *PLoS One* 5:e11684
- Hall CB. 2001. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus. *N Engl J Med* 344:1917-28
- Hall CB, Douglas RG, Jr. 1981. Modes of transmission of respiratory syncytial virus. *J Pediatr* 99:100-3
- Hall CB, Douglas RG, Jr., Simons RL, Geiman JM. 1978. Interferon production in children with respiratory syncytial, influenza, and parainfluenza virus infections. *J Pediatr* 93:28-32
- Hall CB, Powell KR, MacDonald NE, Gala CL, Menegus ME, et al. 1986. Respiratory syncytial viral infection in children with compromised immune function. *N Engl J Med* 315:77-81
- Harrison MS, Sakaguchi T, Schmitt AP. 2000. Paramyxovirus assembly and budding: building particles that transmit infections. *Int J Biochem Cell Biol* 42:1416-29
- Hausmann S, Jacques JP, Kolakofsky D. 1996. Paramyxovirus RNA editing and the requirement for hexamer genome length. *RNA* 2:1033-45

- Heggeness MH, Scheid A, Choppin PW. 1981. The relationship of conformational changes in the Sendai virus nucleocapsid to proteolytic cleavage of the NP polypeptide. *Virology* 114:555-62
- Henderson FW, Clyde WA, Jr., Collier AM, Denny FW, Senior RJ, et al. 1979a. The etiologic and epidemiologic spectrum of bronchiolitis in pediatric practice. *J Pediatr* 95:183-90
- Henderson FW, Collier AM, Clyde WA, Jr., Denny FW. 1979b. Respiratory-syncytial-virus infections, reinfections and immunity. A prospective, longitudinal study in young children. *N Engl J Med* 300:530-4
- Henderson GW, Laird C, Dermott E, Rima BK. 1995. Characterization of Mapuera virus: structure, proteins and nucleotide sequence of the gene encoding the nucleocapsid protein. *J Gen Virol* 76 (Pt 10):2509-18
- Henrickson KJ. 2003. Parainfluenza viruses. *Clin Microbiol Rev* 16:242-64
- Hooper P, Zaki S, Daniels P, Middleton D. 2001. Comparative pathology of the diseases caused by Hendra and Nipah viruses. *Microbes Infect* 3:315-22
- Hou S, Doherty PC, Zijlstra M, Jaenisch R, Katz JM. 1992. Delayed clearance of Sendai virus in mice lacking class I MHC-restricted CD8+ T cells. *J Immunol* 149:1319-25
- Hu A, Cattaneo R, Schwartz S, Norrby E. 1994a. Role of N-linked oligosaccharide chains in the processing and antigenicity of measles virus haemagglutinin protein. *J Gen Virol* 75 (Pt 5):1043-52
- Hu A, Kovamees J, Norrby E. 1994b. Intracellular processing and antigenic maturation of measles virus hemagglutinin protein. *Arch Virol* 136:239-53
- Hu A, Norrby E. 1994. Role of individual cysteine residues in the processing and antigenicity of the measles virus haemagglutinin protein. *J Gen Virol* 75 (Pt 9):2173-81

- Huang C, Kiyotani K, Fujii Y, Fukuhara N, Kato A, et al. 2000. Involvement of the zinc-binding capacity of Sendai virus V protein in viral pathogenesis. *J Virol* 74:7834-41
- Huang Z, Dry I, Webster D, Strugnell R, Wesselingh S. 2001. Plant-derived measles virus hemagglutinin protein induces neutralizing antibodies in mice. *Vaccine* 19:2163-71
- HV TH, Dermott E. 1976. Circular and elongated linear forms of measles virus nucleocapsid. *Nature* 264:473-4
- Irie T, Sakaguchi T. 2007. [Paramyxovirus budding]. *Uirusu* 57:1-7
- Jabbar MA, Sivasubramanian N, Nayak DP. 1985. Influenza viral (A/WSN/33) hemagglutinin is expressed and glycosylated in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:2019-23
- Jack PJ, Boyle DB, Eaton BT, Wang LF. 2005. The complete genome sequence of J virus reveals a unique genome structure in the family Paramyxoviridae. *J Virol* 79:10690-700
- Johnson KM, Chanock RM, Cook MK, Huebner RJ. 1960. Studies of a new human hemadsorption virus. I. Isolation, properties and characterization. *Am J Hyg* 71:81-92
- Johnson RA, Prince GA, Suffin SC, Horswood RL, Chanock RM. 1982. Respiratory syncytial virus infection in cyclophosphamide-treated cotton rats. *Infect Immun* 37:369-73
- Juozapaitis M, Serva A, Kucinskaite I, Žvirblienė A, Slibinskas R, et al. 2007a. Generation of menangle virus nucleocapsid-like particles in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biotechnol* 130:441-7
- Juozapaitis M, Serva A, Žvirblienė A, Slibinskas R, Staniulis J, et al. 2007b. Generation of henipavirus nucleocapsid proteins in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Virus Res* 124:95-102
- Karron RA, Collins PL. Parainfluenza Viruses. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Straus SE, Martin MA, Roizman B, eds. *Fields Virology*.

- 5th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins. 2007. 1:1497-1526
- Karron RA, Wright PF, Belshe RB, Thumar B, Casey R, et al. 2005. Identification of a recombinant live attenuated respiratory syncytial virus vaccine candidate that is highly attenuated in infants. *J Infect Dis* 191:1093-104
- Kast WM, Roux L, Curren J, Blom HJ, Voordouw AC, et al. 1991. Protection against lethal Sendai virus infection by in vivo priming of virus-specific cytotoxic T lymphocytes with a free synthetic peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:2283-7
- Kaufman RJ. 1999. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev* 13:1211-33
- Kingston RL, Baase WA, Gay LS. 2004. Characterization of nucleocapsid binding by the measles virus and mumps virus phosphoproteins. *J Virol* 78:8630-40
- Kniskern PJ, Hagopian A, Montgomery DL, Burke P, Dunn NR, et al. 1986. Unusually high-level expression of a foreign gene (hepatitis B virus core antigen) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 46:135-41
- Knott AM, Long CE, Hall CB. 1994. Parainfluenza viral infections in pediatric outpatients: seasonal patterns and clinical characteristics. *Pediatr Infect Dis J* 13:269-73
- Kuroya M, Ishida N, Shiratori T. 1953a. Newborn virus pneumonitis (type Sendai). II. The isolation of a new virus. *Tohoku J Exp Med* 58:62
- Kuroya M, Yoshinari Y, Ishida N, Noda K, Koseki E. 1953b. Isolation of a virus from a sporadic case of Izumi fever. *Tohoku J Exp Med* 58:22
- Lamb RA, Choppin PW. 1976. Synthesis of influenza virus proteins in infected cells: translation of viral polypeptides, including three P polypeptides, from RNA produced by primary transcription. *Virology* 74:504-19

- Lamb RA, Kolakofsky D. Paramyxoviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Straus SE, Martin MA, Roizman B, eds. *Fields Virology*. 4th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins. 2001. 1:1305-1340.
- Lamb RA, Paterson RG, Jardetzky TS. 2006. Paramyxovirus membrane fusion: lessons from the F and HN atomic structures. *Virology* 344:30-7
- Lamb RA, Parks GD. Paramyxoviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Straus SE, Martin MA, Roizman B, eds. *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins. 2007. 1:1449-1496
- Lambert DM, Pons MW. 1983. Respiratory syncytial virus glycoproteins. *Virology* 130:204-14
- Laver WG, Thompson SD, Murti KG, Portner A. 1989. Crystallization of Sendai virus HN protein complexed with monoclonal antibody Fab fragments. *Virology* 171:291-3
- Lee SH, Boutilier JE, MacDonald MA, Forward KR. 1992. Enhanced detection of respiratory viruses using the shell vial technique and monoclonal antibodies. *J Virol Methods* 39:39-46
- Levine S, Klaiber-Franco R, Paradiso PR. 1987. Demonstration that glycoprotein G is the attachment protein of respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 68 (Pt 9):2521-4
- Li W, Shi Z, Yu M, Ren W, Smith C, et al. 2005. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science* 310:676-9
- Longhi S, Receveur-Brechot V, Karlin D, Johansson K, Darbon H, 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. *J Biol Chem* 278:18638-48
- Makela PH. 2000. Vaccines, coming of age after 200 years. *FEMS Microbiol Rev* 24:9-20

- Mansi W. 1951. The isolation of a neurotropic virus from a dog suffering from the so-called nervous distemper. *Br Vet J* 107:214-29
- Marriott A, Harding W, Devlin N, Benwell G. 2001. The delivery of orthodontic care in New Zealand. Part I: Analysis of a census of orthodontists. *N Z Dent J* 97:87-92
- Mazanec MB, Lamm ME, Lyn D, Portner A, Nedrud JG. 1992. Comparison of IgA versus IgG monoclonal antibodies for passive immunization of the murine respiratory tract. *Virus Res* 23:1-12
- Mellor J, Dobson MJ, Roberts NA, Kingsman AJ, Kingsman SM. 1985. Factors affecting heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 33:215-26
- Mink MA, Stec DS, Collins PL. 1991. Nucleotide sequences of the 3' leader and 5' trailer regions of human respiratory syncytial virus genomic RNA. *Virology* 185:615-24
- Miyahara K, Kitada S, Yoshimoto M, Matsumura H, Kawano M, et al. 1992. Molecular evolution of human paramyxoviruses. Nucleotide sequence analyses of the human parainfluenza type 1 virus NP and M protein genes and construction of phylogenetic trees for all the human paramyxoviruses. *Arch Virol* 124:255-68
- Mizumoto K. 1992. [Host cell proteins involved in paramyxovirus transcription and replication]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 37:2792-7
- Mizumoto K, Muroya K, Takagi T, Omata-Yamada T, Shibuta H, Iwasaki K. 1995. Protein factors required for in vitro transcription of Sendai virus genome. *J Biochem* 117:527-34
- Morgan EM, Re GG, Kingsbury DW. 1984. Complete sequence of the Sendai virus NP gene from a cloned insert. *Virology* 135:279-87
- Munder T, Hinnen A. 1999. Yeast cells as tools for target-oriented screening. *Appl Microbiol Biotechnol* 52:311-20

- Murphy BR, Alling DW, Snyder MH, Walsh EE, Prince GA, et al. 1986. Effect of age and preexisting antibody on serum antibody response of infants and children to the F and G glycoproteins during respiratory syncytial virus infection. *J Clin Microbiol* 24:894-8
- Murphy LB, Loney C, Murray J, Bhella D, Ashton P, Yeo RP. 2003. Investigations into the amino-terminal domain of the respiratory syncytial virus nucleocapsid protein reveal elements important for nucleocapsid formation and interaction with the phosphoprotein. *Virology* 307:143-53
- Nagai Y. 1995. Virus activation by host proteinases. A pivotal role in the spread of infection, tissue tropism and pathogenicity. *Microbiol Immunol* 39:1-9
- Nayak DP, Balogun RA, Yamada H, Zhou ZH, Barman S. 2009. Influenza virus morphogenesis and budding. *Virus Res* 143:147-61
- Nayak DP, Davis AR, McQueen NL, Bos TJ, Jabbar MA, et al. 1985. Biological and immunological properties of haemagglutinin and neuraminidase expressed from cloned cDNAs in prokaryotic and eukaryotic cells. *Vaccine* 3:165-71
- Negrete OA, Levroney EL, Aguilar HC, Bertolotti-Ciarlet A, Nazarian R, et al. 2005. EphrinB2 is the entry receptor for Nipah virus, an emergent deadly paramyxovirus. *Nature* 436:401-5
- Neubert WJ, Eckerskorn C, Homann HE. 1991. Sendai virus NP gene codes for a 524 amino acid NP protein. *Virus Genes* 5:25-32
- Ogino T, Kobayashi M, Iwama M, Mizumoto K. 2005. Sendai virus RNA-dependent RNA polymerase L protein catalyzes cap methylation of virus-specific mRNA. *J Biol Chem* 280:4429-35
- Okazaki K, Tanabayashi K, Takeuchi K, Hishiyama M, Yamada A. 1992. Molecular cloning and sequence analysis of the mumps virus gene encoding the L protein and the trailer sequence. *Virology* 188:926-30

- Pager CT, Wurth MA, Dutch RE. 2004. Subcellular localization and calcium and pH requirements for proteolytic processing of the Hendra virus fusion protein. *J Virol* 78:9154-63
- Park MS, Garcia-Sastre A, Cros JF, Basler CF, Palese P. 2003. Newcastle disease virus V protein is a determinant of host range restriction. *J Virol* 77:9522-32
- Parrott RH, Kim HW, Arrobio JO, Hodes DS, Murphy BR, et al. 1973. Epidemiology of respiratory syncytial virus infection in Washington, D.C. II. Infection and disease with respect to age, immunologic status, race and sex. *Am J Epidemiol* 98:289-300
- Parrott RH, Vargosko A, Luckey A, Kim HW, Cumming C, Chanock R. 1959. Clinical features of infection with hemadsorption viruses. *N Engl J Med* 260:731-8
- Paton NI, Leo YS, Zaki SR, Auchus AP, Lee KE, et al. 1999. Outbreak of Nipah-virus infection among abattoir workers in Singapore. *Lancet* 354:1253-6
- Pelet T, Curran J, Kolakofsky D. 1991. The P gene of bovine parainfluenza virus 3 expresses all three reading frames from a single mRNA editing site. *EMBO J* 10:443-8
- Philbey AW, Kirkland PD, Ross AD, Davis RJ, Gleeson AB, et al. 1998. An apparently new virus (family Paramyxoviridae) infectious for pigs, humans, and fruit bats. *Emerg Infect Dis* 4:269-71
- Philbey AW, Kirkland PD, Ross AD, Field HE, Srivastava M, et al. 2008. Infection with Menangle virus in flying foxes (*Pteropus* spp.) in Australia. *Aust Vet J* 86:449-54
- Philbey AW, Ross AD, Kirkland PD, Love RJ. 2007. Skeletal and neurological malformations in pigs congenitally infected with Menangle virus. *Aust Vet J* 85:134-40

- Portner A, Murti KG, Morgan EM, Kingsbury DW. 1988. Antibodies against Sendai virus L protein: distribution of the protein in nucleocapsids revealed by immunoelectron microscopy. *Virology* 163:236-9
- Prince GA, Curtis SJ, Yim KC, Porter DD. 2001. Vaccine-enhanced respiratory syncytial virus disease in cotton rats following immunization with Lot 100 or a newly prepared reference vaccine. *J Gen Virol* 82:2881-8
- Rahman SA, Hassan SS, Olival KJ, Mohamed M, Chang LY, et al. 2010. Characterization of Nipah virus from naturally infected Pteropus vampyrus bats, Malaysia. *Emerg Infect Dis* 16:1990-3
- Rassa JC, Wilson GM, Brewer GA, Parks GD. 2000. Spacing constraints on reinitiation of paramyxovirus transcription: the gene end U tract acts as a spacer to separate gene end from gene start sites. *Virology* 274:438-49
- Ray R, Glaze BJ, Compans RW. 1988. Role of individual glycoproteins of human parainfluenza virus type 3 in the induction of a protective immune response. *J Virol* 62:783-7
- Reed G, Jewett PH, Thompson J, Tollefson S, Wright PF. 1997. Epidemiology and clinical impact of parainfluenza virus infections in otherwise healthy infants and young children < 5 years old. *J Infect Dis* 175:807-13
- Saelens X, Vanlandschoot P, Martinet W, Maras M, Neiryck S, et al. 1999. Protection of mice against a lethal influenza virus challenge after immunization with yeast-derived secreted influenza virus hemagglutinin. *Eur J Biochem* 260:166-75
- Sakaguchi T, Takao S, Kiyotani K, Fujii Y, Nakayama T, Yoshida T. 1993. Expression of the HN, F, NP and M proteins of Sendai virus by recombinant vaccinia viruses and their contribution to protective immunity against Sendai virus infections in mice. *J Gen Virol* 74 (Pt 3):479-84

- Salinas Y, Roux L. 2005. Replication and packaging properties of short Paramyxovirus defective RNAs. *Virus Res* 109:125-32
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 1989.
- Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 2001.
- Samuel D, Sasnauskas K, Jin L, Beard S, Žvirblienė A, et al. 2002. High level expression of recombinant mumps nucleoprotein in *Saccharomyces cerevisiae* and its evaluation in mumps IgM serology. *J Med Virol* 66:123-30
- Samuel D, Sasnauskas K, Jin L, Gedvilaite A, Slibinskas R, 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*. *J Clin Virol* 28:121-9
- Sasnauskas K, Bulavaite A, Hale A, Jin L, Knowles WA, et al. 2002. Generation of recombinant virus-like particles of human and non-human polyomaviruses in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Intervirology* 45:308-17
- Sasnauskas K, Jomantiene R, Januska A, Lebediene E, Lebedys J, Janulaitis A. 1992. Cloning and analysis of a *Candida maltosa* gene which confers resistance to formaldehyde in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 122:207-11
- Scheid A, Hsu M, Choppin PW. 1980. Role of paramyxovirus glycoproteins in the interactions between viral and cell membranes. *Soc Gen Physiol Ser* 34:119-30
- Schmitt ME, Brown TA, Trumpower BL. 1990. A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 18:3091-2

- Schoehn G, Mavrakis M, Albertini A, Wade R, Hoenger A, Ruigrok RW. 2004. The 12 A structure of trypsin-treated measles virus N-RNA. *J Mol Biol* 339:301-12
- Selvey L, Sheridan J. 1995. Outbreak of Severe Respiratory Disease in Humans and Horses Due to a Previously Unrecognized Paramyxovirus. *J Travel Med* 2:275
- Shiell BJ, Beddome G, Michalski WP. 2002. Mass spectrometric identification and characterisation of the nucleocapsid protein of Menangle virus. *J Virol Methods* 102:27-35
- Shuster JR, Moyer DL, Lee H, Dennis A, Smith B, Merryweather JP. 1989. Yeast mutants conferring resistance to toxic effects of cloned human insulin-like growth factor I. *Gene* 83:47-55
- Slibinskas R, Samuel D, Gedvilaite A, Staniulis J, Sasnauskas K. 2004. Synthesis of the measles virus nucleoprotein in yeast *Pichia pastoris* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biotechnol* 107:115-24
- Slibinskas R, Žvirblienė A, Gedvilaite A, Samuel D, Jin L, et al. 2003. Synthesis of mumps virus nucleocapsid protein in yeast *Pichia pastoris*. *J Biotechnol* 103:43-9
- Spehner D, Kirn A, Drillien R. 1991. Assembly of nucleocapsidlike structures in animal cells infected with a vaccinia virus recombinant encoding the measles virus nucleoprotein. *J Virol* 65:6296-300
- Spriggs MK, Collins PL. 1986. Sequence analysis of the P and C protein genes of human parainfluenza virus type 3: patterns of amino acid sequence homology among paramyxovirus proteins. *J Gen Virol* 67 (Pt 12):2705-19
- Sulkin SE, Allen R. 1974. Virus infections in bats. *Monogr Virol* 8:1-103
- Svenda M, Hjertner B, Linne T, Berg M. 2002. Both the P and V proteins of the porcine rubulavirus LPMV interact with the NP protein via their respective C-terminal unique parts. *Virus Res* 83:31-41

- Takatsy G, Szafir E. 1953. [Isolation of mumps virus and its significance]. *Orv Hetil* 94:460-3
- Takimoto T, Portner A. 2004. Molecular mechanism of paramyxovirus budding. *Virus Res* 106:133-45
- Tapparel C, Maurice D, Roux L. 1998. The activity of Sendai virus genomic and antigenomic promoters requires a second element past the leader template regions: a motif (GNNNNN)₃ is essential for replication. *J Virol* 72:3117-28
- Tashiro M, Yamakawa M, Tobita K, Klenk HD, Rott R, Seto JT. 1990. Organ tropism of Sendai virus in mice: proteolytic activation of the fusion glycoprotein in mouse organs and budding site at the bronchial epithelium. *J Virol* 64:3627-34
- Tawar RG, Duquerroy S, Vonrhein C, Varela PF, Damier-Piolle L, et al. 2009. Crystal structure of a nucleocapsid-like nucleoprotein-RNA complex of respiratory syncytial virus. *Science* 326:1279-83
- Techaarpornkul S, Collins PL, Peeples ME. 2002. Respiratory syncytial virus with the fusion protein as its only viral glycoprotein is less dependent on cellular glycosaminoglycans for attachment than complete virus. *Virology* 294:296-304
- Tidona CA, Kurz HW, Gelderblom HR, Darai G. 1999. Isolation and molecular characterization of a novel cytopathogenic paramyxovirus from tree shrews. *Virology* 258:425-34
- Tripp RA, Jones LP, Haynes LM, Zheng H, Murphy PM, Anderson LJ. 2001. CX3C chemokine mimicry by respiratory syncytial virus G glycoprotein. *Nat Immunol* 2:732-8
- Valenzuela P, Medina A, Rutter WJ, Ammerer G, Hall BD. 1982. Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature* 298:347-50

- van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, et al. 2001. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med* 7:719-24
- Varich NL. 1988. [Structural organization of the genome of paramyxoviruses]. *Mol Gen Mikrobiol Virusol*:3-14
- Vidal S, Kolakofsky D. 1989. Modified model for the switch from Sendai virus transcription to replication. *J Virol* 63:1951-8
- Vulliemoz D, Roux L. 2001. "Rule of six": how does the Sendai virus RNA polymerase keep count? *J Virol* 75:4506-18
- Wang L, Harcourt BH, Yu M, Tamin A, Rota PA, et al. 2001. Molecular biology of Hendra and Nipah viruses. *Microbes Infect* 3:279-87
- Wang LF, Yu M, Hansson E, Pritchard LI, Shiell B, et al. 2000. The exceptionally large genome of Hendra virus: support for creation of a new genus within the family Paramyxoviridae. *J Virol* 74:9972-9
- Warnes A, Fooks AR, Dowsett AB, Wilkinson GW, Stephenson JR. 1995. Expression of the measles virus nucleoprotein gene in Escherichia coli and assembly of nucleocapsid-like structures. *Gene* 160:173-8
- Warnes A, Fooks AR, Stephenson JR. 1994. Production of measles nucleoprotein in different expression systems and its use as a diagnostic reagent. *J Virol Methods* 49:257-68
- Welliver RC, Wong DT, Middleton E, Jr., Sun M, McCarthy N, Ogra PL. 1982. Role of parainfluenza virus-specific IgE in pathogenesis of croup and wheezing subsequent to infection. *J Pediatr* 101:889-96
- Wemers CD, de Henau S, Neyt C, Espion D, Letellier C, et al. 1987. The hemagglutinin-neuraminidase (HN) gene of Newcastle disease virus strain Italien (ndv Italien): comparison with HNs of other strains and expression by a vaccinia recombinant. *Arch Virol* 97:101-13

- Westphal V, Marcusson EG, Winther JR, Emr SD, van den Hazel HB. 1996. Multiple pathways for vacuolar sorting of yeast proteinase A. *J Biol Chem* 271:11865-70
- Wickner S, Maurizi MR, Gottesman S. 1999. Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science* 286:1888-93
- Wiegand MA, Bossow S, Schlecht S, Neubert WJ. 2007. De novo synthesis of N and P proteins as a key step in Sendai virus gene expression. *J Virol* 81:13835-44
- Williamson MM, Hooper PT, Selleck PW, Gleeson LJ, Daniels PW, et al. 1998. Transmission studies of Hendra virus (equine morbillivirus) in fruit bats, horses and cats. *Aust Vet J* 76:813-8
- Wong KT. 2010. Emerging epidemic viral encephalitides with a special focus on henipaviruses. *Acta Neuropathol* 120:317-25
- World Health Organization. Update September 2009. The World Health Report: Acute Respiratory Infections. (http://www.who.int/vaccine_research/disease/ari/en/index2.html)
- Zhang L, Peeples ME, Boucher RC, Collins PL, Pickles RJ. 2002. Respiratory syncytial virus infection of human airway epithelial cells is polarized, specific to ciliated cells, and without obvious cytopathology. *J Virol* 76:5654-66
- Zhirnov OP. 1990. Solubilization of matrix protein M1/M from virions occurs at different pH for orthomyxo- and paramyxoviruses. *Virology* 176:274-9
- Zvirblienė A, Kucinskaite-Kodze I, Juozapaitis M, Lasickiene R, Gritenaite D, et al. 2010. Novel monoclonal antibodies against Menangle virus nucleocapsid protein. *Arch Virol* 155:13-8
- Zvirblienė A, Kucinskaite I, Sezaite I, Samuel D, Sasnauskas K. 2007. Mapping of B cell epitopes in measles virus nucleocapsid protein. *Arch Virol* 152:25-39

Zvirblienė A, Sezaitė I, Pleckaitytė M, Kucinskaitė-Kodžė I, Juozapaitis M, Sasnauskas K. 2009. Mapping of an antigenic site on the nucleocapsid protein of human parainfluenza virus type 3. *Viral Immunol* 22:181-8

1. **Žiniatinklio svetainė.** Adresas: www.expasy.org/tools/pi_tool.html