

ABSTRAKT

Hlavným cieľom práce bolo vytvorenie monoklonálnej protilátky proti VP1 proteínu BK vírusu pre štúdium jednotlivých krokov jeho replikačného cyklu. BK vírus je ľudský polyomavírus spôsobujúci u imunosuprimovaných pacientov závažné ochorenie - nefropatiu asociovanú s polyomavírusom (PVAN) po transplantácii obličiek, alebo hemoragickú cystitídu po transplantácii kostnej drene. Virióny BK vírusu majú kapsidu s ikozahedrálnou symetriou pozostávajúcu z 360 molekúl hlavného kapsidového proteínu VP1 a dvoch minoritných štruktúrnych proteínov VP2 a VP3, ktoré však nie sú exponované na povrchu kapsidy. VP1 je silne imunogénny, čo dáva možnosť produkovať protilátky umožňujúce sledovanie BK vírusu detekciou kapsidového proteínu. Ako antigén pre imunizáciu myši pre prípravu hybridómov boli použité štruktúry prázdnych BK vírusových kapsíd produkovaných v hmyzích bunkách z rekombinantného bakulovírusu. Klonovaním hybridómov vzniknutých fúziou myelómových buniek a B-lymfocytov z imunizovanej myši sa podarilo získať radu primárnych klonov. Jeden z nich bol klonovaný do homogenity a monoklonálna protilátka proti VP1 BK vírusu bola čistená z hybridómového média afinitnou chromatografiou. Z výsledkov testovania vyplýva, že získaná protilátka 5/G10/A5/B2/8 rozpoznáva konformačný epitop a dá sa používať pre detekciu proteínu VP1 i viriónov v bunkách metódou nepriamej imunofluorescencie. Protilátka nedetekuje VP1 sekvenčne príbuzného vírusu SV40.

Minoritné proteíny VP2 a VP3 polyomavírusov sa viažu na vnútrobunkové membrány a perforujú ich. Bolo postulované, že táto ich vlastnosť by mohla byť vírusom využívaná k uvoľneniu viriónov z endoplazmatického retikula do cytosólu na jeho ceste do bunkového jadra. Predpokladá sa, že VP3 na membránach oligomerizuje a vytvára otvory pre únik rozvoľnených viriónov. Schopnosť VP3 oligomerizovať sme chceli dokázať metódou BiFC (bimolecular fluorescence complementation). Pre tento účel bola navrhnutá séria primerov pre konštrukciu 4 plazmidov pre expresiu VP3 proteínu fúzaného s jednou alebo druhou časťou žltého fluorescenčného proteínu v oboch orientáciách. Konštrukty boli overené sekvenovaním. Dva skonštruované plazmidy pcDNA3-NYFP-VP3 exprimujúci fúzny proteín pozostávajúci z N-terminálnej časti YFP pripojeného na N-konci VP3 proteínu a pcDNA3-VP3-NYFP exprimujúci fúzny proteín tiež N-terminálnej časti YFP 6 na C-konci VP3 proteínu mali správne sekvencie a sú pripravené k použitiu. Zatiaľ sa nepodarila konštrukcia vektoru nesúceho gén pre fúzny proteín C-terminálnej časti YFP a VP3 v oboch orientáciách, kde sekvenovanie dokázalo sekvenčné poruchy. Preto zatiaľ nebolo možné objasnenie oligomerizácie VP3 proteínov touto metódou komplementácie YFP - BiFC realizovať.

Kľúčové slová: polyomavírus, BKV, VP1, antigén, VP2, VP3, oligomerizácia, BiFC