

Formulár ZK - Záverečná karta projektu

Riešiteľ: Mgr. Iveta Vančová PhD.	Evidenčné číslo projektu: APVT-51-034702
Názov projektu: M3-nový vírusový proteín viažuci chemokíny: štúdium jeho imunologických vlastností a úlohy v patogenéze lymfotropného myšieho herpesvírusu.	

Na ktorých pracoviskách bol projekt riešený:	Virologický ústav SAV, Bratislava
Ktoré zahraničné pracoviská spolupracovali pri riešení (názov, štát):	

Udelené patenty alebo podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory vychádzajúce z výsledkov projektu:	
Publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu (uveďte i publikácie prijaté do tlače alebo pripravované):	<p>Petrová P, Mačáková K, Vančová I, Hájnická V, Kúdelová M, Režuchová I: „Charakterizácia M3 génu myšieho gamaherpesvírusu 72 kódujúceho sekrečný proteín viažuci chemokíny.“ XIV. Konferencie mladých mikrobiológov, Tomáškovy dny, 8. – 10. 6. 2005, Brno, (poster)</p> <p>Petrová Petra: „M3 proteín myšieho gamaherpesvírusu – nový regulátor antivírusovej imunitnej odpovede.“ XIII. Konferencia mladých mikrobiológov „Tomáškovy dny 2004“ ,2 – 4. 6. 2004, (Prednáška)</p> <p>Petrová Petra, M. Kúdelová, M. Valovičová, K. Mačáková, J. Matis, I. Režuchová: “Initial characterization of the murine gammaherpesvirus 72 gene M3 encoding the first herpesvirus soluble chemokine receptor” , 23. Kongrese Československej spoločnosti mikrobiologickej, 6 – 9. 9.2004, Brno, (poster)</p> <p>Belvončíková P., Vančová I, Režuchová I, Kráľová H, Hájnická V, Kúdelová M : Antichemokínová aktivita proteínu M3, sekretovanom cicavčiami bunkami infikovanými MHV72 a MHV68. XVI. Konferencie mladých mikrobiológov „Tomáškovy dny“, 7- 8.júna 2007, Brno (poster)</p> <p>Belvončíková P, Kráľová A, Valovičová M, Kúdelová M, Hájnická V, Režuchová I, Vančová I: „Anti-chemokine activity of secreted M3 protein encoded by Murine gammaherpesvirus strain 72.“ zaslanej do časopisu Viral Immunology (electronic submission)</p>
V čom vidíte uplatnenie výsledkov tohto projektu:	Charakterizácia M3 MHV72 proteínu ako modulátora imunitného systému môže prispieť k objasneniu vzťahu vírus-hostiteľ, k dôkladnejšiemu pohľadu na patogenézu vírusu MHV72. Selektovanie chemokínov viazaných M3 proteínom naznačuje možnosť jeho prípadného terapeutického využitia ako inhibítora zápalových procesov prebiehajúcich počas chronických ľudských ochorení.

Podpisom záverečnej karty riešiteľ vyjadruje svoj súhlas ku zverejneniu údajov v nej uvedených.

Podpis riešiteľa:

Dátum: 18.7.2007

Charakteristika výsledkov

Evidenčné číslo: APVT-51-034702

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu (max. 20 riadkov) - slovensky:

Cieľom projektu bola charakterizácia génu ORF M3 MHV72 a jeho produktu.

Identifikovali sme primárnu štruktúru ORF M3 vírusu MHV-72 (Accession Number DQ378056). V porovnaní s M3 MHV68, sme v sekvencii M3 MHV72 identifikovali jednu kodón meniacu mutáciu v nukleotide 920 (zámena A na G), ktorá mení aminokyselinu Asp³⁰⁷ (GAC na Gly (GGC). Závažnosť tejto mutácie potvrdzuje aj zmena predikovanej sekundárnej štruktúry M3 proteínu, čo spôsobuje zníženú hydrofilicitu a povrchovú dostupnosť v oblasti chemokíny viažúceho miesta. Navyše, táto mutácia spôsobila vznik nového restričného miesta pre enzým BglI, ktoré je MHV72 špecifické.

M3 proteín MHV72, exprimovaný v bunkách BHK21 po infekcii vírusom MHV72, viazal z reakčného prostredia takmer všetok ľudský CCL11 a CCL2 V porovnaní s M3 MHV68 však M3 MHV72 viazal 3-krát menej CXCL8 a 5-krát menej CCL5, a oba M3 proteíny neviazali takmer žiadny CCL3. Produkcia M3 vykazovala závislosť od množstva vírusu pri infekcii a od dĺžky trvania infekcie *in vitro*. Pre M3 MHV72 sme zaznamenali podobné antichemokínové spektrum ako u M3 MHV68, avšak slabšiu aktivitu.

Pripravili sme rekombinantný bakulovírus, ktorý exprimuje M3 MHV72. M3 proteín je sekretovaný extracelulárne, do média produkujúcich hmyzích buniek. Chemokín-viažúce aktivity rekombinantného M3 MHV72 sme porovnávali s M3 MHV68. V prípade oboch M3 proteínov sme dokázali rovnaké antichemokínové spektrum, v prípade CCL2, CCL5, CCL11 a CXCL8 bez významných rozdielov vo väzobnej aktivite, v prípade CCL3 sme však detegovali medzi M3 MHV72 a M3 MHV68 významný, 40% rozdiel. Potvrdili sme potláčanie biologických aktivít chemokínov spôsobené viazaním chemokínov M3 MHV72 proteínom metódou inhibície väzby na bunkový receptor, inhibície chemotaxie granulocytov pod agarom a inhibície cytotoxickej aktivity NK buniek. Rekombinantný M3 proteín sme použili na prípravu anti-M3 imúnneho séra.

Žiaľ, počas riešenia projektu sa nám nepodarilo izolovať rekombinantný M3-del vírus. Taktiež sa nám nepodarilo pomocou nested PCR nájsť žiadny sekvenčný homológ M3 proteínu v cDNA extraktov slinných žliaz kliešťov. Možným riešením by mohla byť aj zmena metodického prístupu, napr. skríňovanie pomocou protilátok. Jednako, získané výsledky sú naplnením základných cieľov projektu.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu (max. 20 riadkov) - anglicky:

The aim of project was characterization of open reading frame (ORF) M3 of MHV72 and its product.

We define the primary structure of the M3 protein of MHV72 (Accession Number DQ378056). Comparison of MHV72 M3 sequence with strain 68 has shown one codon changing mutation in ORF M3 MHV72 at nucleotide 920 (mutation A to G) converted Asp³⁰⁷ (GAC) to Gly (GGC). Importance of this finding supports the fact that mutation causes changes in the predicted secondary structure of the MHV72 M3 protein resulting in lowered hydrophilicity and also surface exposure of region involved in chemokine binding. In addition, this mutation created a new restriction site for *BglI* endonuclease enables to identify specifically the MHV72 strain. The M3 MHV72 protein, expressed in BHK21 cells after infection with MHV72, bound almost all of human CCL11 and CCL2 from reaction milieu. Besides of M3 MHV68, the M3 MHV72 has been shown to bind CXCL8 molecules three times and CCL5 molecules five times weaker than M3 MHV68, but both M3 MHV72 and/or M3 MHV68 does not bind to human CCL3. The M3 production seems to be of the virus doses and duration of *in vitro* infection dependent. Besides of M3 MHV68, we detected similar antichemokine spectrum but weaker binding activity of M3 MHV72. We prepared recombinant baculovirus which expressed M3 of MHV72. Because M3 gene has no transmembrane domain it was secreted extracellularly from producing (infected) insect cells. Chemokine binding activity of recombinant protein M3 was evaluated in comparison with that of MHV68 M3. For both recombinant M3 proteins, we detected similar antichemokine spectrum. In case CCL2, CCL5, CCL11 and CXCL8 without significant differences between M3 MHV72 and M3 MHV68. However for CCL3-binding, we observed marked, 40% difference between M3 MHV72 and M3 MHV68. We confirmed inhibition of biological activities of chemokines caused by M3 proteins chemokines-binding using methods of inhibition of chemokine binding to its cellular receptor, inhibition of chemotaxis under agar, inhibition of cytotoxic NK cells activities. Moreover, recombinant M3 protein was used for preparation of specific mouse anti-M3 immune serum. Unfortunately, during solution time of project, we couldn't isolate a recombinant M3-del virus. Also, we couldn't find sequence homologue of M3 protein into cDNA of ticks salivary glands extract by nested PCR using M3 MHV68 specific primers. The change of methods could be eventual answer, for example screening by means of anti-M3 monoclonal antibodies. Nevertheless, obtained results came up to expectation of project.

Podpis riešiteľa: