

Formulár ZK - Záverečná karta projektu

Riešiteľ: RNDr. Tatiana Betakova, CSc.	Evidenčné číslo projektu: 51-004105
Názov projektu: Surveillance vírusu chrípky na Slovensku, štúdium pH regulujúcej aktivity M2 protónového kanála pomocou mutagenézy a hľadanie nových anti-vírusových látok.	

Na ktorých pracoviskách bol projekt riešený:	Virologický ústav SAV
Ktoré zahraničné pracoviská spolupracovali pri riešení (názov, štát):	National Institute for Medical Research, London, UK
	National and Kapodistrian University of Athens, Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy, Greece
	Florentská Univerzita, Taliansko

Udelené patenty alebo podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory vychádzajúce z výsledkov projektu:	Úžitkový vzor- vypracovanie citlivej metódy na detekciu vírusov chrípky pomocou PCR využívajúc konzervatívny M gén.
	Úžitkový vzor – nadizajnovanie primerov a vypracovanie metódy na určenie subtypov vírusov chrípky pomocou PCR bez predchádzajúcej izolácie vírusov.
Publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu (uveďte i publikácie prijaté do tlače): <i>Uvádzajte maximálne päť najvýznamnejších publikácií.</i>	1. Betakova T. and Hay AJ .Evidence that the CM2 protein of influenza C virus can modify the pH of the exocytic pathway of transfected cells. J.Gen.Virol., 88, 2291-96, 2007
	2. Betakova T, Hay AJ. Stability and function of the influenza A virus M2 ion channel protein is determined by both extracellular and cytoplasmic domains. Arch Virol. 2009;154(1):147-51.
	3. Betakova T, Hay AJ. Comparison of the activities of BM2 protein and its H19 and W23 mutants of influenza B virus with activities of M2 protein and its H37 and W41 mutants of influenza A virus. Arch Virol., 154, 1619-1624, 2009
	4. Gronesová P, Kabat P, Trnka A, Betakova T. Using nested RT-PCR analyses to determine the prevalence of avian influenza viruses in passerines in western Slovakia, during summer 2007. Scand J Infect Dis. 2008 40(11), 954-957.
	5. Gronesova P, Ficova M, Mizakova A, Kabat P, Trnka A, Betakova T. Prevalence of avian influenza viruses, <i>Borrelia garinii</i> , <i>Mycobacterium avium</i> , and <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> in waterfowl and terrestrial birds in Slovakia, 2006. Avian Pathol. 2008, 37(5),537-543
V čom vidíte uplatnenie výsledkov projektu:	Výsledky projektu rozšírili znalosti o iónových kanáloch vírusov chrípky a výsledky z mutagenézy M2 a BM2 proteínu môžu prispieť k pochopeniu funkcie aminokyselín v transmembránovej oblasti pri prenose iónov. Výsledky surveillance vírusov vtáčej chrípky v rokoch 2006 a 2007 na Slovensku poskytujú prvé a jediné údaje o cirkulujúcich kmeňov vtáčej chrípky na našom území. Dokázali sme, že jeden vtáčí jedinec môže byť nainfikovaný súčasne dvomi rôznymi kmeňmi vírusov chrípky.

Charakteristika výsledkov

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

Koexpresiou BM2 proteínu s pH-citlivým HA došlo k redukcii konformačných zmien HA v dôsledku nízkeho pH počas transportu k povrchu bunky. Zistili sme, že BM2 proteín môže zvýšiť pH vo vezikulách o 0,4 jednotky, podobne ako M2 proteín. Nahradenie H19 alanínom alebo leucínom viedlo k strate aktivity BM2, kým mutácia H37A u M2 neinhibovala aktivitu kanála. Substitúciou W23A a W23L sa zrušila aktivita BM2 kanála, kým substitúcia W41L u M2 proteínu aktivitu iónového kanála iba zredukovala, ale nezrušila. Analýzou chimerických proteínov NB/M2 sme zistili, že N- a C- domény stabilizujú štruktúru transmembránovej domény, čo je dôležité pre aktivitu kanála. CM2 proteín vírusu chrípky typu C je schopný redukovat' pH v transportných vezikulách a chrániť HA pred konformačnými zmenami v dôsledku nízkeho pH.

V roku 2006 sme študovali rozšírenie vírusov chrípky u sťahovavých vodných a spevavých vtákov v 3 rôznych lokalitách na východnom a západnom Slovensku. Vypracovali sme metódu na určenie jednotlivých subtypov hemagglutíninu (HA) a neuraminidázy (NA). Najväčšiu diverzitu chrípkových kmeňov sme zaznamenali u vodných vtákov chytených na Senianskych jazerách (východné Slovensko), kde sme v 19 vzorkách detegovali 13 rôznych subtypov vírusov chrípky (H1N2, H2N2, H3N2, H6N6, H7N6, H9N2, H9N5, H9N6, H10N5, H10N6, H12N6, H13N6, and H16N6). V tom istom roku bol vírus H3N5 detegovaný u 50% spevavých vtákov z Parížskych Močiarov (západné Slovensko) a H9N5 vírus bol dominantný u vtákov chytených na Trnavských rybníkoch. U 5 vtákov sme našli rôzne kmene vírusov chrípky vo vzorkách z orofarynxu a kloaky (H13N6 a H1N2; H10N5 a H12N6; H9N5 a H6N5; H10N6 a H7N6; H9N2 a H3N5). V lete 2007 sme testovali vzorky sťahovavých vtákov chytených na západnom Slovensku. U jednotlivých vtákov bolo pozitívnych 18% vzoriek z orofarynxu a 18% vzoriek z kloaky a iba 6,6% vzoriek bolo pozitívnych v orofarynxu a zároveň aj v kloake. Stanovili sme 10 rôznych subtypov HA (H2, H3, H4, H6, H7, H9, H10, H11, H12, and H13) a 4 subtypy NA (N1, N2, N3, and N5). 25% vzoriek obsahovalo vírusové kmene so subtypom H12 a H9, 15% vzoriek obsahovalo vírusy H11 and H10 a 9% vzoriek obsahovalo vírusy H13. V troch prípadoch sme detegovali rôzne kmene u jedného vtáka v orofarynxu a kloake (H13N1 a H12N5; H13N3 a H9N5; H10N2 a H9N5).

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

Co-expression of the BM2 protein with pH-sensitive HA reduces the conversion of HA to its low-pH conformation during transport to the cell surface in the same way as human M2 proteins. BM2 protein is capable of increasing vesicular pH by as much as 0.4 pH units. Mutation analysis showed that replacement of H19 in BM2 protein by A and L resulted in loss of activity, while M2, with the mutation H37A, remained active, but its severe toxicity was intolerable for cells. Whereas substitution of L or A for W23 abolished detectable activity of the BM2 channel, substitution of L for W41 in the M2 protein resulted in a functional ion channel but with reduced activity. The activity of M2/NB chimeras has shown, that the N- and C-terminals of M2 are important for stabilization of the transmembrane domain structure. The CM2 protein of influenza C has capacity to reduce the acidity of the exocytic pathway and reduce conversion of the pH-sensitive HA to its low pH conformation during transport to the cell surface. The prevalence of avian influenza virus (AIV) infections, together with the distribution of different AIV subtypes, was studied in migratory waterfowl and terrestrial birds trapped in three localities in Slovakia during 2006 and 2007. Samples obtained from waterfowl captured in the Senianske Ponds area of Eastern Slovakia showed the highest diversity of AIV isolates. A total of 13 different subtypes were detected in 19 samples from this location (H1N2, H2N2, H3N2, H6N6, H7N6, H9N2, H9N5, H9N6, H10N5, H10N6, H12N6, H13N6, and H16N6). H3N5 virus was detected in 50% of passerines testing positive for AIV in the Parizske Wetlands and H9N5 virus predominated in passerines captured at Trnava Ponds. There were five cases where different AIV infections were detected in oropharyngeal and cloacal samples originating from the same bird (H13N6 and H1N2; H10N5 and H12N6; H9N5 and H6N5; H10N6 and H7N6; and H9N2 and H3N5 in the oropharynx and cloaca, respectively). In western Slovakia in summer 2007, screening of samples revealed that 18% of oropharyngeal and 18% of cloacal samples were positive for AIV. Samples from both the oropharynx and cloaca were positive in only 6.6% of cases. A total of 10 different subtypes of haemagglutinin (H2, H3, H4, H6, H7, H9, H10, H11, H12, and H13) and 4 different subtypes of neuraminidase (N1, N2, N3, and N5) were detected in the samples from this location. The most abundant subtypes of HA in the samples were H12 and H9 (25% each), followed by H11 and H10 (15% each), and H13 (9%). There were 3 cases where different AIV infections were detected in oropharyngeal and cloacal samples originating from the same bird (H13N1 and H12N5; H13N3 and H9N5; H10N2 and H9N5 in the oropharynx and cloaca, respectively).

Podpisom záverečnej karty riešiteľ vyjadruje svoj súhlas so zverejnením údajov v nej uvedených.

Podpis zodp. riešiteľa:

Dátum: 27.11.2009

Podpis štatutárneho zástupcu:

Pečiatka: