

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Nina ČELESNIK

**PRIPRAVA IN DELNI OPIS MONOKLONSKIH PROTITELES
PROTI VIRUSU PTIČJE GRIPE H5N1**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**PREPARATION AND PARTIAL DESCRIPTION OF MONOCLONAL
ANTIBODIES AGAINST H5N1 AVIAN INFLUENZA VIRUS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2008

Čelesnik N. Priprava in delni opis monoklonskih protiteles proti virusu ptičje gripe H5N1.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medodd. študija mikrobiologije, 2008

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za imunologijo in celične kulture na Oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete na Rodici pri Domžalah.

Podpisana Nina Čelesnik se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Mojco Narat, za somentorico dr. Ireno Oven in za recenzentko prof. dr. Olgo Zorman Rojs.

Mentorica: prof. dr. Mojca Narat

Somentorica: dr. Irena Oven

Recenzentka: prof. dr. Olga Zorman Rojs

Komisija za oceno in zagovor diplomskega dela:

Predsednica: prof. dr. Darja Žgur Bertok
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Mojca Narat
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: dr. Irena Oven
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: prof. dr. Olga Zorman Rojs
Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Inštitut za zdravstveno varstvo perutnine

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Nina ČELESNIK

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 616.98-097.3 : 578.74(043) =163.6
KG	aviarna influenza/virus aviarne influence podtipa H5N1/hemaglutinin/nevraminidaza/imunski odziv/mišji imunoglobulini razreda G/monoklonska protitelesa/monoklonska protitelesa proti virusu aviarne influenza podtipa H5N1
AV	ČELESNIK, Nina
SA	NARAT, Mojca (mentorica) / OVEN, Irena (somentorica) / ZORMAN ROJS, Olga (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2008
IN	PRIPRAVA IN DELNI OPIS MONOKLONSKIH PROTITELES PROTI VIRUSU PTIČJE GRIPE H5N1
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	IX, 67 str., 8 pregl., 17 sl., 38 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Visoko patogeni virus podtipa H5N1 povzroča aviarno influenco (AI), ki je v Aziji povzročila veliko ekonomsko škodo. Iz azijske celine se je virus prenesel v Evropo in leta 2006 dosegel tudi našo državo. Okužbe domače perutnine z virusom AI podtipa H5N1 bi v Sloveniji lahko povzročile ogromno gospodarsko škodo. Namen diplomske naloge je bil pridobiti monoklonska protitelesa (mAb), specifična za različne epitope slovenskega izolata virusa H5N1, in jih vsaj delno opisati. Po uspešni imunizaciji miši s slovenskim izolatom virusa H5N1 smo v pridobljenih supernatantih 7 klonov hibridomov preverili aktivnost in specifičnost mAb z metodo iDIBA. Ugotovili smo, da mAb različno reagirajo z virusoma H5N1 in H5N2. Pripravljena mAb smo izolirali ter očistili z gelsko kromatografijo. Frakcije posameznega vzorca z največjo vsebnostjo aktivnih imunoglobulinov G (IgG), smo združili in skoncentrirali. Opazili smo, da se kloni med seboj ločijo tudi po količini sintetiziranih mAb. Z encimskoimunskimi reakcijami posameznih mAb z ločenim virusnimi proteini smo dokazali, da naša mAb prepoznavajo različne virusne proteine H5N1 in H5N2. Izpostavili smo reakcije 3 mAb. Za mAb 1C2C3 in 2F4B6 predpostavljamo, da so najverjetnejše specifična za hemaglutinin (HA) podtipa H5. Za mAb 4H2B4 sklepamo, da so verjetno specifična za podenoto HA1 virusnega HA. mAb 1C2C3 in 2F4B6 smo določili nukleotidno zaporedje variabilne regije težke verige (V_H) IgG in dokazali razlike v komplementarnost določajočih regijah.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC UDC 616.98-097.3 : 578.74(043) =163.6

CX avian influenza/H5N1 avian influenza virus/hemagglutinin/neuraminidase/immune response/murine immunoglobulins of G class/monoclonal antibodies/monoclonal antibodies against H5N1 avian influenza virus

AU ČELESNIK, Nina

AA NARAT, Mojca (supervisor) / OVEN, Irena (co-advisor) / ZORMAN ROJS, Olga (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology

PY 2008

TI PREPARATION AND PARTIAL DESCRIPTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST H5N1 AVIAN INFLUENZA VIRUS

DT Graduation Thesis (University studies)

NO IX, 67 p., 8 tab., 17 fig., 38 ref.

LA sl

AL sl/en

AB The very virulent H5N1 virus is causing highly pathogenic avian influenza (HPAI), a disease that has economically devastated Asia. Outbreaks of HPAI have spread throughout Asia and into Europe, where they reached Slovenia in the year 2006. Massive economical losses would devastate Slovenia if domestic poultry was infected with the HPAI virus. Our purpose was to produce and partially characterize monoclonal antibodies (mAbs) specific for various epitopes of HPAI H5N1 isolate from Slovenia. After a successful immunization of the mice BALB/c with HPAI H5N1 isolate from Slovenia, we determined the activity and the specificity of 7 selected mAbs by iDIBA method. The different mAbs had diverse reactions with H5N1 and H5N2 viruses. The prepared mAbs were isolated and purified by size-exclusion chromatography. Then the fractions of each sample where their mAbs' concentration was the highest were combined and concentrated. We noticed considerable differences among concentrations of produced mAbs. The produced mAbs were proven to be specific for various proteins of H5N1 and H5N2 viruses. We further analyzed 3 mAbs. mAbs 1C2C3 and 2F4B6 showed specific reactions presumably with hemagglutinin (HA) of H5 subtype. mAbs 4H2B4 showed specific reactions presumably with HA1 subunit of HA. The nucleic sequences of variable regions of heavy chains for mAbs 1C2C3 and 2F4B6 were determined. The differences between nucleic sequences were assigned to complementarity determining regions.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VII
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 PROBLEMATIKA AVIARNE INFLUENCE PODTIPIA H5N1	2
2.1.1 Značilnosti virusov aviarne influence tipa A	2
2.1.2 Epidemiologija aviarne influence podtipa H5N1.....	3
2.1.3 Prenos virusa aviarne influence podtipa H5N1 med vrstami in širjenje okužbe	6
2.1.4 Prenos virusa aviarne influence podtipa H5N1 na ljudi in nevarnost pandemije	7
2.2 ZGRADBA VIRUSOV AVIARNE INFLUENCE TIPI A IN ZNAČILNOSTI VIRUSNIH EPITOPOV	10
2.2.1 Zgradba virusov aviarne influence tipa A.....	10
2.2.2 Hemaglutinin.....	12
2.2.3 Nevraminidaza	14
2.2.4 Vloga najpomembnejših antigenskih epitopov virusov aviarne influence tipa A.....	15
2.3 MONOKLONSKA PROTITELESA PROTI VIRUSU AVIARNE INFLUENCE PODTIPIA H5N1	15
2.3.1 Značilnosti monoklonskih protiteles IgG	15
2.3.2 Sintetizirana monoklonska protitelesa proti virusu aviarne influence podtipa H5N1	17
2.3.3 Pomen proizvodnje monoklonskih protiteles proti virusu aviarne influence podtipa H5N1	20

3	MATERIAL IN METODE	21
3.1	PRIPRAVA MONOKLONSKIH PROTITELES PROTI VIRUSU AVIARNE INFLUENCE PODTIPA H5N1	21
3.1.1	Preverjanje prisotnosti specifičnih protiteles	22
3.1.1.1	Encimskoimunska metoda – ELISA.....	23
3.1.1.2	Indirektni encimskoimunski test – iDIBA.....	24
3.2	ČIŠČENJE MONOKLONSKIH PROTITELES.....	25
3.3	REAKCIJE mAb Z VIRUSNIMI PROTEINI H5N1 IN H5N2.....	28
3.3.1	SDS-PAGE elektroforeza.....	28
3.3.2	Prenos proteinov na membrano (prenos western)	29
3.3.3	Encimskoimunska reakcija.....	30
3.4	DOLOČITEV NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA VARIABILNE REGIJE TEŽKE VERIGE IgG.....	30
3.4.1	Izolacija informacijske RNA (mRNA).....	31
3.4.2	Sinteza in pomnoževanje komplementarne DNA (cDNA).....	31
3.4.3	Analiza produktov PCR z agarozno elektroforezo.....	33
3.4.4	Določitev nukleotidnega zaporedja variabilne regije težke verige IgG....	33
4	REZULTATI.....	35
4.1	PREVERJANJE PRISOTNOSTI SPECIFIČNIH PROTITELES V SUPERNATANTIH HIBRIDOMOV	35
4.2	IZOLACIJA mAb IN PREVERJANJE AKTIVNOSTI IZOLIRANIH mAb....	37
4.3	REAKCIJE mAb Z VIRUSNIMI PROTEINI H5N1 IN H5N2	41
4.4	DOLOČITEV NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA VARIABILNE REGIJE TEŽKE VERIGE IgG.....	45
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	51
5.1	RAZPRAVA.....	51
5.2	SKLEPI.....	60
6	POVZETEK.....	61
7	VIRI	63

KAZALO SLIK

Slika 1: Države z okužbami s HPAI H5N1 v obdobju od decembra 2003 do maja 2007 (WHO, 2008b).....	6
Slika 2: Struktura virusov aviarne influence tipa A (Horimoto in Kawaoka, 2001: 132). .	11
Slika 3: Struktura hemaglutinina (Chen in sod., 1998: 413).....	14
Slika 4: Struktura molekule IgG.	16
Slika 5: Shema indirektnih encimskoimunskih metod.....	23
Slika 6 (levo): Preverjanje prisotnosti specifičnih mAb proti Ag virusov H5N1 in H5N2 v supernatantih hibridomov.....	36
Slika 7: Merjenje absorbance v frakcijah posameznih klonov hibridomov.....	37
Slika 8 (levo): Preverjanje prisotnosti specifičnih IgG proti Ag virusov H5N1 in H5N2 v skoncentriranih vzorcih klonov	39
Slika 9: Proteinski profil virusov H5N1 in H5N2.....	42
Sliki 10 (zgoraj) in 11 (spodaj): Encimskoimunski test izoliranih mAb z ločenimi virusnimi proteini H5N1 in H5N2.....	43
Slika 12: Analiza produktov PCR (cDNA) izbranih treh klonov hibridomov.....	46
Slika 13: Kromatogram cDNA V _H IgG 1C2C3.....	47
Slika 14: Kromatogram cDNA V _H IgG 2F4B6.....	47
Slika 15: Kromatogram cDNA V _H kontrolnih mAb proti GAPDH.....	48
Slika 16: Poravnava nukleotidnih zaporedij V _H IgG 1C2C3 in 2F4B6.	49
Slika 17: Poravnava nukleotidnih zaporedij V _H IgG 1C2C3 in kontrolnih mAb proti GAPDH.	49

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Lastnosti LPAI in HPAI virusov pri okužbah perutnine (Horimoto in Kawaoka, 2001: 135; Peiris in sod., 2007: 244).....	3
Preglednica 2: Število primerov okužbe ljudi s HPAI H5N1, prijavljenih Svetovni zdravstveni organizaciji*, do 10.09.2008 (WHO, 2008a: 1).....	6
Preglednica 3: Molekulske mase proteinov virusov aviarne influence tipa A.....	12
Preglednica 4: Strategija izbora klonov hibridomov z metodo ELISA.....	22
Preglednica 5: Uporaba encimskoimunskih metod, za preverjanje prisotnosti specifičnih protiteles.	23
Preglednica 6: Določitev vsebnosti IgG v frakcijah posameznih klonov hibridomov.....	38
Preglednica 7: Določitev vsebnosti in aktivnosti specifičnih IgG v skoncentriranih vzorcih klonov.....	40
Preglednica 8: Reakcije mAb z virusnimi proteini H5N1 in H5N2.....	44

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Ab	protitelo
Ag	antigen
AI	aviarna influenca (avian influenza)
AK	aminokislina
cDNA	komplementarna DNA (complementary DNA)
CDR	hipervariabilne ali komplementarnost določajoče regije IgG (complementarity determining region)
CH	konstantna regija težke verige IgG
CL	konstantna regija lahke verige IgG
ELISA	encimskoimunski test (enzyme-linked immunosorbent assay)
Fab	podenota IgG sestavljena iz dela težke in celotne lahke verige
Fc	podenota IgG sestavljena iz konstantnih delov obeh težkih verig
H	težka veriga Ig
HA	hemaglutinin
HPAI	visoko patogena aviarna influenca (highly pathogenic avian influenza)
iDIBA	indirektni encimskoimunski test (indirect dot-immunobinding assay)
Ig	imunoglobulin
IgG	imunoglobulin razreda G
L	lahka veriga Ig
LPAI	nizko patogena aviarna influenca (low pathogenic avian influenza)
mAb	monoklonsko protitelo
mRNA	informacijska RNA (messenger RNA)
NA	nevraminidaza
NP	nukleoprotein
PCR	verižna reakcija s polimerazo (polymerase chain reaction)
SDS-PAGE	elektroforeza v poliakrilamidnem gelu z natrijevim dodecil sulfatom
SFM	medij brez seruma (serum free medium)
V _H	variabilna regija težke verige IgG
V _L	variabilna regija lahke verige IgG
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija (World Health Organization)

1 UVOD

Epidemija aviarne influence (ang. avian influenza - AI), povzročena z visoko patogenim virusom podtipa H5N1, je v Aziji povzročila veliko ekonomsko škodo. Razširitev okužbe med populacijo vodnih ptic selivk je povzročilo globalno širjenje tega virusa med perutnino in divjimi vodnimi pticami po celotni Aziji do Evrope in Afrike (Alexander, 2007).

Iz ptic se je virus H5N1 prenesel na sesalce, vključno s človekom. Naraščajoče število okužb z virusom H5N1 med ljudmi, večanje števila potencialnih gostiteljev ter hitro geografsko širjenje virusa H5N1 je med ljudmi povzročilo vsesplošno zaskrbljenost. Možnost mutiranja ali genetske prerazporeditve in posledično pridobitev sposobnosti prenosa med ljudmi, se zdi vse bolj verjetna, zato možnost pandemije AI povzročene z virusom podtipa H5N1 med »imunološko naivno« človeško populacijo ni izključena (Hanson in sod., 2006).

Virus H5N1, ki se je dobra razširil med evropskimi državami, je leta 2006 dosegel tudi Slovenijo. Perutinarstvo je tudi pri nas zelo razširjena gospodarska panoga. Okužbe domače perutnine z visoko patogenim virusom H5N1 v Sloveniji bi lahko povzročile ogromno gospodarsko škodo, zato je diagnostika ključnega pomena za pravočasno odkritje in preprečevanje razširitve okužbe.

1.1 NAMEN DELA

Namen diplomske naloge je bil pridobiti monoklonska protitelesa, specifična za različne epitope slovenskega izolata virusa H5N1, in jih vsaj delno opisati.

Ustrezna monoklonska protitelesa bi lahko v prvi vrsti uporabljali za diagnostiko okužb pri perutnini. Nadalje bi bila dobra osnova za pripravo zaščitnih protiteles za preprečevanje okužb pri perutnini. Ob ustreznih modifikacijah bi lahko taka monoklonska protitelesa pripravili tudi kot zaščitno sredstvo pred okužbo ljudi.

2 PREGLED OBJAV

2.1 PROBLEMATIKA AVIARNE INFLUENCE PODTIPIA H5N1

Odkar je virus AI podtipa H5N1, ki primarno povzroča bolezen pri perutnini in pticah, prešel na človeka, je po svetu zavladal kaos in strah ter prepričanje, da bo sledila huda pandemija AI med »imunološko naivno« človeško populacijo (Horimoto in Kawaoka, 2001).

Pandemije običajno povzročajo virusi influence tipa A s povsem novimi podtipi hemaglutinina (HA) in včasih tudi nevraminidaze (NA) ter z možnostjo učinkovitega prenosa med ljudmi. Virus H5N1 zaenkrat še ne izpolnjuje pogojev za pandemičen podtip, saj se je kljub 10-letni epidemiji med perutnino le redko prenesel na ljudi in ni zanesljivih dokazov za direkten prenos med ljudmi. Virus H5N1 bi lahko postal pandemičen v primeru, da bi se direktno prilagodil na človeka ali pa bi z genetsko prerazporeditvijo s prevladujočim podtipom človeške influence pridobil lastnosti, ki bi mu omogočile prenos med ljudmi. Genetska prerazporeditev bi se lahko pojavila v ljudeh ob hkratni okužbi populacije z virusom H5N1 in virusom človeške influence. Lahko pa bi do genetske prerazporeditve prišlo v vmesnem gostitelju npr. prašiču, ki na epitelijskih celicah nosi ptičje in človeške receptorje za virus. Prašiči so v mnogih azijskih gospodinjstvih v tesnem stiku z ljudmi in perutnino. Sčasoma bi lahko naraščajoče geografsko širjenje okužene perutnine in vse več prenosov virusa na sesalske vrste privedlo do večjih genetskih sprememb v virusu H5N1 in do možnosti izpolnitve vseh pogojev za naslednji pandemičen podtip (Peiris in sod., 2007).

2.1.1 Značilnosti virusov aviarne influence tipa A

Virusi influence spadajo v družino *Orthomyxoviridae*. Glede na razlike v strukturi njihovega nukleoproteina (NP) in matričnega proteina (M1) jih delimo v viruse influence tipa A, B in C. Vse viruse AI razvrščamo v tip A. Glede na strukturo njihovih površinskih glikoproteinov, HA in NA, jih dalje razvrščamo v podtipe (Horimoto in Kawaoka, 2001). Poznamo 16 podtipov HA (H1 do H16) in 9 podtipov NA (N1 do N9) virusov AI. Med

pticami krožijo vsi podtipi HA in NA, medtem ko so za sesalce značilni le nekateri izmed njih. Najpogostejsi podtipi, ki jih zasledimo med človeško populacijo, so trije podtipi HA (H1, H2 in H3) in dva podtipa NA (N1 in N2) (Peiris in sod., 2007).

Glede na stopnjo virulence pri perutnini virusa AI tipa A delimo v dve skupini. Visoko patogeni virusi povzročajo tako imenovano visoko patogeno aviarno influenco (HPAI) (ang. highly pathogenic avian influenza) z visoko obolenostjo in poginom do 100 %. Vsi drugi virusi AI povzročajo milejšo, blago respiratorno obolenje, imenovano nizko patogena aviarna influenca (LPAI) (ang. low pathogenic avian influenza). Najznačilnejši podtipi skupine HPAI so H5 in H7, čeprav vsi virusi teh podtipov ne povzročajo HPAI (Alexander, 2000).

Preglednica 1 prikazuje lastnosti LPAI in HPAI virusov pri okužbah perutnine.

Preglednica 1: Lastnosti LPAI in HPAI virusov pri okužbah perutnine (Horimoto in Kawaoka, 2001: 135; Peiris in sod., 2007: 244).

lastnosti	LPAI	HPAI
podtip HA	H1 – H16	H5 in H7
podvajanje	respiratori in/ali gastrointestinalni trakt	večina organov
klinični znaki	blago respiratorno obolenje, depresija, diareja, zmanjšana nesnost	sistemsko obolenje: depresija, pomanjkanje apetita, edem in cianoza rože, podbradkov in kože nog, izcedek iz oči, močno zmanjšana nesnost, respiratorna obolenja (zlasti sinusitis), diareja, motnje centralnega živčnega sistema
pogin	nizek	visok do 100 %
cepitev HA z znotrajceličnimi proteazami	ne	da
zaporedje na mestu cepitve HA	1 arginin	več baznih aminokislinskih ostankov
skupina proteaz, ki cepi HA	encimi podobni tripsinu	- encimi podobni tripsinu - znotrajcelične proteaze prisotne v večini tkiv: proteaze podobne subtilizinu kot furin in PC6

2.1.2 Epidemiologija aviarne influence podtipa H5N1

Leta 1996 so v provinci Guandong na Kitajskem iz gojene gosi izolirali virus HPAI H5N1.

Leta 1997 je virus krožil po južni Kitajski med domačo perutnino in na tamkajšnjih

perutninskih tržnicah. Zaradi okužbe z virusom A/chicken/Hong Kong/97 je bilo pognute in pobite okoli 3 milijone perutnine. Istega leta je v Hong Kongu virus H5N1 prvič okužil človeka in izmed skupno 18 obolelih povzročil 6 smrtnih žrtev. Leta 2003 so se zgodile drastične spremembe, virus H5N1 se je od decembra 2003 do februarja 2004 pojavil v kar osmih državah V in JV Azije (Kitajska, Koreja, Tajska, Vietnam, Japonska, Kambodža, Indonezija in Laos). Malezija je z izbruhom bolezni HPAI med perutnino v avgustu 2004 postala deveta država z okužbami HPAI H5N1 v tej regiji.

Najverjetneje iz domače perutnine, še zlasti rac, ki se prosto gibljejo in prehajajo v stik z divjimi pticami, se je okužba s HPAI H5N1 razširila med populacijo divjih vodnih ptic. Sledile so hujše epidemije med vrstami divjih vodnih ptic, leta 2002 v Hong Kongu in leta 2005 na Kitajskem in v Mongoliji. Z vodnimi pticami selivkami se je virus H5N1 iz jezera v kitajski provinci Qinghai razširil proti zahodu in jugu. Julija 2005 je genetsko sorodna linija virusa zajela perutnino v Rusiji. Kot kaže, se je virus H5N1 do začetka 2006 od tam razširil po ostalih zahodno azijskih in vzhodno evropskih državah. Do začetka aprila 2006 so o okužbah s HPAI H5N1 poročali že iz 31 držav Azije, Evrope in Afrike. Zaradi okužbe z virusom A/chicken/Eurasia and Africa/2003-2006, ki je do maja 2006 zajel 19 azijskih, 7 evropskih in 5 afriških držav, je bilo pognute in pobite preko 100 milijonov perutnine.

V Evropi so virus HPAI H5N1 odkrili pri orlih, ki so jih oktobra 2004 v Bruselj vtihotapili iz Tajske. Prav tako so zaradi okužbe s tem virusom pognile sobne ptice, uvožene iz Tajvana, ki so jih v Angliji oktobra 2005 držali v karanteni. Zaradi okužbe z virusom HPAI H5N1 so v oktobru 2005 pognili labodi na Hrvaškem. Virus H5N1 se je z labodi naglo širil, med januarjem in aprilom 2006 so bili labodi grbci (*Cygnus olor*) in druge divje ptice okužene v Azerbajdžanu, Iranu, Kazahstanu in dvajsetih evropskih državah (vključno s Slovenijo) (Alexander, 2007; WHO, 2008b).

V Sloveniji so okužbo z virusom HPAI H5N1 prvič odkrili 11.02.2006 pri labodu grbcu (*Cygnus olor*) v Mariboru ob reki Dravi. Do konca marca 2006 so odkrili 48 pozitivnih primerov okužb divjih ptic s HPAI H5N1:

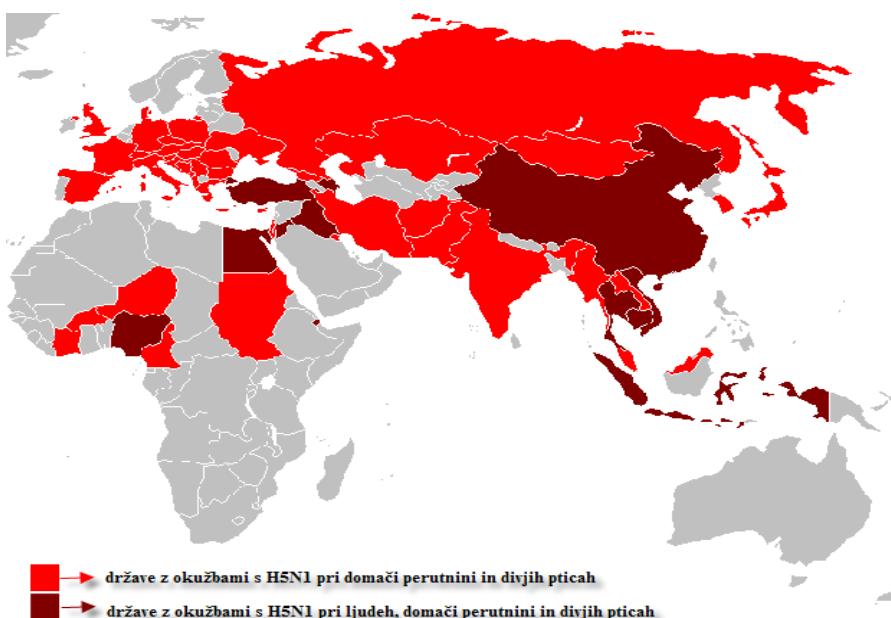
- 44 primerov pri labodu grbcu (*Cygnus olor*)
- 2 primera pri sivi čaplji (*Ardea cinerea*)

- 1 primer pri raci mlakarici (*Anas Platyrhynchos*)
- 1 primer pri dolgorepi raci (*Anas acuta*)

Do okužb je prišlo v okolici Maribora ob reki Dravi, Staršah, Koblerjevem Zalivu in Miljah (Salamon, 2007). Domača perutnina ni bila okužena.

Raziskave zaporedij celih genomov virusnih izolatov HPAI H5N1, ki so ogrozili Evropo, severno Afriko in Srednji Vzhod, so slovenski virusni izolat A/swan/Slovenia/760/2006 filogenetsko uvrstile v evropski-srednje vzhodni-afriški (EMA) klad 1. Slovenski izolat je v vseh delih soroden in ima skupnega prednika z dvemi izolati iz Italije, izolatom iz Bavarske in Češke. Klad EMA z nedavnimi izolati (od leta 2005 dalje) iz Evrope, severne Afrike in Srednjega Vzhoda se jasno loči od treh pretežno azijskih kladov. Vsi skupaj si delijo skupnega prednika, ki izvira iz izvornega izolata hongkonškega seva iz leta 1997. Klad EMA se nadalje loči na 3 podrazrede. Vsi imajo skupnega prednika, ki izvira iz bodisi ruskega virusnega izolata (2005) ali iz virusnega izolata iz kitajske province Qinghai (Salzberg in sod., 2007).

Na sliki 1 so prikazane države, kjer so zasledili okužbe z virusom HPAI H5N1 pri ljudeh, domači perutnini in divjih pticah v obdobju od decembra 2003 do maja 2007.



Slika 1: Države z okužbami s HPAI H5N1 v obdobju od decembra 2003 do maja 2007 (WHO, 2008b).

V preglednici 2 je prikazano število primerov okužbe ljudi s HPAI H5N1, prijavljenih Svetovni zdravstveni organizaciji – WHO, v obdobju od leta 2003 do 10.09.2008.

Preglednica 2: Število primerov okužbe ljudi s HPAI H5N1, prijavljenih Svetovni zdravstveni organizaciji*, do 10.09.2008 (WHO, 2008a: 1).

država	2003		2004		2005		2006		2007		2008		skupno število	
	okužbe	smrti	okužbe	smrti	okužbe	smrti	okužbe	smrti	okužbe	smrti	okužbe	smrti	okužb	smrti
Azerbajdžan	0	0	0	0	0	0	8	5	0	0	0	0	8	5
Bangladeš	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
Kambodža	0	0	0	0	4	4	2	2	1	1	0	0	7	7
Kitajska	1	1	0	0	8	5	13	8	5	3	3	3	30	20
Džibuti	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
Egipt	0	0	0	0	0	0	18	10	25	9	7	3	50	22
Indonezija	0	0	0	0	20	13	55	45	42	37	20	17	137	112
Irak	0	0	0	0	0	0	3	2	0	0	0	0	3	2
Laos	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	2	2
Mjanmar	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
Nigerija	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1
Pakistan	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	0	0	3	1
Tajska	0	0	17	12	5	2	3	3	0	0	0	0	25	17
Turčija	0	0	0	0	0	0	12	4	0	0	0	0	12	4
Vietnam	3	3	29	20	61	19	0	0	8	5	5	5	106	52
Skupno število	4	4	46	32	98	43	115	79	88	59	36	28	387	245

* Svetovna zdravstvena organizacija = WHO (ang. World Health Organization)

Iz preglednice 2 lahko razberemo, da je bilo od leta 2003 do 10.09.2008 število okuženih s HPAI H5N1 387, od tega 63 % smrtnih žrtev. Največje število okužb s HPAI H5N1 je bilo leta 2006 (115), od tega 69 % smrtnih žrtev. Država z največjim številom okužb s HPAI H5N1 je Indonezija. Od 137 okuženih v Indoneziji je bilo kar 82 % smrtnih žrtev.

2.1.3 Prenos virusa aviarne influence podtipa H5N1 med vrstami in širjenje okužbe

Virus AI podtipa H5N1 se je med azijskimi državami močno razširil ter ga je težko zatreli. Razlogi za neuspešno zatiranje so številni. Število okužb z virusom H5N1 med domačo »dvoriščno« perutnino je visoko, kjer so v tesnem stiku piščanci, purani, race in prašiči. Skoraj 70 % perutninarstva v Aziji predstavljajo takšna okolja, ki so idealna za kroženje in prenos virusa H5N1 med različnimi živalskimi vrstami. Race, ki gnezdi na riževih poljih in preletijo daljše razdalje so prav tako odgovorne za prenos virusov HPAI H5N1. Na

daljše razdalje prenašajo virus H5N1 med lokalnimi kmetijami in »dvoriščno« perutnino. Virus H5N1 se je na race že prilagodil in ne povzroča kliničnih znakov, vendar hkrati ni izgubil virulence za ostalo perutnino (Peiris in sod., 2007).

Virus H5N1 stalno kroži na perutninskih tržnicah z živo perutnino, le-te so po mnenju strokovnjakov ključni faktor za zadrževanje virusa v perutninarstvu v Hong Kongu in JV Aziji. Zanimivo je, da so virus H5N1 izolirali tudi iz zdravih ptic, najpogosteje iz rac in gosi. Vir prenosa na tržnicah so tudi kletke za perutnino in ljudje. Virus H5N1 se širi tudi med prireditvami petelinjih bojev. Organiziran trg s perutnino in perutninskimi izdelki je bil glavni vzrok za izbruhe AI H5N1 med leti 2003 in 2004 v Aziji (Peiris in sod., 2007).

Genetsko linijo, ki se je razširila iz Azije v zahodni smeri do Evrope in Srednjega Vzhoda v letih od 2003 do 2006, so prenesle vodne ptice selivke. Vodne ptice selivke, kot kaže, predstavljajo rezervoar virusa H5N1. Z vodnimi pticami selivkami se virus H5N1 hitro širi tudi na daljše geografske razdalje (Peiris in sod., 2007). V vodnih pticah, zlasti iz reda *Anseriformes* (Plojkokljuni), so virusi HPAI H5N1 precej razširjeni. Te ptice z iztrebki močno kontaminirajo vodne habitate (jezera, mlake), kjer se zadržujejo pred selitvijo. Virusi HPAI H5N1 ostanejo v vodi kužni še 4 dni pri 22 °C in preko 30 dni pri 0 °C. Na predelih z mrzlimi zimami obstaja možnost, da virusi H5N1 preživijo zimo v jezerih in tako naslednje leto spomladi predstavljajo vir novih okužb za vodne ptice (Alexander, 2007).

Tudi človeški dejavniki posredno prispevajo k prenosu virusnih okužb in dodatni kontaminaciji okolja, in sicer z uporabo perutninskih iztrebkov za gnojila in krmo za ribe. Neustrezna higiena v hlevih privede do naglega širjenja okužbe z virusom HPAI H5N1 med perutnino (Alexander, 2000).

2.1.4 Prenos virusa aviarne influence podtipa H5N1 na ljudi in nevarnost pandemije

Hemaglutinin, ovojnični protein virusa človeške influence, prepozna in se veže na celične receptorje na površini človeških celic. Receptorji na človeških celicah so sestavljeni iz

sialičnih kislin, ki so vezane na galaktozo z α -2,6 glikozidno vezjo (SA α -2,6). Virusi AI pa prepozna jo receptorje, sestavljene iz sialičnih kislin, vezanih na galaktozo z α -2,3 glikozidno vezjo (SA α -2,3). Receptorje z α -2,3 glikozidno vezjo najdemo na epitelijskih celicah pri pticah. Ne le HA, tudi NA virusov AI ima afiniteto do hidrolize α -2,3 glikozidne vezi. Drugačen tip glikozidne vezi na receptorjih človeških celic, α -2,6 glikozidna vez, je ena od ključnih preprek, da se virusi AI niso prenesli na ljudi. Odkritje obeh tipov receptorjev, vezanih z α -2,6 in z α -2,3 glikozidno vezjo, na človeških epitelijskih celicah spodnjega respiratornega trakta (terminalni bronhioli in alveolarne epitelijске celice) pa je med drugim pojasnilo možnost prenosa virusov AI na ljudi. Nekateri virusni izolati H5N1, izolirani iz ljudi, so celo pridobili mutacije v HA (aminokislinska zamenjava na mestu vezave receptorja) in posledično afiniteto do receptorjev z α -2,3 glikozidno vezjo, a le-to zaenkrat še ni zadostovalo za uspešen prenos virusov AI med ljudmi (Peiris in sod., 2007).

Tako humani kot tudi virusi AI se prenašajo in tvorijo stabilne virusne linije v prašiču. Epitelijске celice pri prašičih vsebujejo namreč oba tipa receptorjev, človeškega z α -2,6 glikozidno vezjo in ptičjega z α -2,3 glikozidno vezjo. Prašiči pogosto predstavljajo vmesne gostitelje. Okužijo jih tako humani kot tudi virusi AI, lahko tudi oboji hkrati. Prisotnost različnih virusov influence hkrati v istem gostitelju, omogoči genetsko prerazporeditev med virusi, kar vodi do nastanka novih genetskih različic virusov in do povzročitve novih epidemij in pandemij ter prenosa virusov influence med vrstami (Peiris in sod., 2007).

Virusi influence se z različnimi oblikami mutacij in rekombinacij skupaj z naravno selekcijo neprestano antigensko spreminjajo ter pri tem povzročajo številne epidemije in pandemije influence. Mutacije in genetske rekombinacije povzročajo spremnjanje površinskih glikoproteinov (HA in NA) in nastanek novih podtipov ter sevov virusa influence tipa A, ki imajo drugačne antigenske lastnosti. Manjšo antigensko spremembo imenujemo antigenski odmik (ang. antigenic drift) in je posledica točkovnih mutacij v virusnem genomu ter sproži pojav novih sevov z malenkostno spremenjeno zgradbo molekul HA. Posledično jih nevtralizacijska protitelesa v gostitelju slabo prepoznavajo. Tako rahlo spremenjeni sevi že sprožijo nastanek vsakoletnih epidemij. Antigenski odmik je značilen za viruse influence tipa A in B. Antigenski premik (ang. antigenic shift) je

posledica genetske prerazporeditve (rekombinacije), pri kateri si različni virusi influence (humanji in živalski) izmenjujejo genomske segmente, ki kodirajo HA in NA. Nastanejo podtipi s povsem novimi strukturami površinskih glikoproteinov, ki jih nevtralizacijska protitelesa ne prepozna več. Ker ne naletijo na uspešen imunski odziv, se novi podtipi virusa influence tipa A hitro širijo in povzročajo obsežne epidemije in celo pandemije. AntigenSKI premik je pojav, ki so ga doslej zasledili le pri virusih influence tipa A (Koren, 2002).

Virus H5N1 se, predvsem z okuženo perutnino, prenaša na sesalce vključno s človekom. Za AI so oboleli že tigri, leopardi in mačke. V njih se virus H5N1 navadno naglo razširi po celiem telesu tudi do možganskega tkiva. Leta 1997 so ga prvič zasledili pri ljudeh. V Hong Kongu so iz 3-letnega dečka izolirali virus AI podtipa H5N1, ki je umrl za posledicami hude pljučnice in Reyevega sindroma. Do konca leta mu je sledilo še 6 ljudi, ki so podlegli posledicam bolezni, povzročene z virusom H5N1, od skupno 18 obolelih (Peiris in sod., 2007).

Vir človeških okužb s HPAI H5N1 leta 1997 v Aziji so predstavljaJE azijske perutninske tržnice z okuženim mesom piščancev, rac, gosi in drugih perutninskih vrst. Virus H5N1 je v vrstah perutnine prisoten v več organih, vključno z gastrointestinalnim traktom, in se v visokih koncentracijah izloča z njihovim fecesom. V človeško telo vstopa preko respiratorne poti, gastrointestinalnega trakta ali očesne veznice. Kužen feces, direkten stik z obolelo perutnino, klanje ali priprava okuženega perutninskega mesa in zaužitje premalo kuhanega mesa je povzročilo večino obolenj pri ljudeh. Pri ljudeh z okužbo s HPAI H5N1 opazimo klinične znake respiratornega obolenja: vročina, kašelj, zadihanost in virusna pljučnica brez bakterijske superinfekcije. Nerespiratori simptomi so diareja, bruhanje in abdominalne bolečine. Raziskave med leti 2003 in 2006 so razkrile, da je bila polovica od 256 obolelih za HPAI H5N1 mlajših od 20 let, 89 % pacientov je bilo mlajših od 40 let. Virus HPAI H5N1 je v tem obdobju povzročil 60 % smrtnost pri ljudeh (Peiris in sod., 2007).

Kljub masovnim obolenjem perutnine in močni izpostavljenosti ljudi med epidemijami AI H5N1 ostajajo obolenja pri ljudeh redka. Izpostavljenost virusu HPAI H5N1 je nujen, a ne

zadosten faktor pri okužbi. Zato vloga dednih genetskih faktorjev za dovzetnost za okužbo s HPAI H5N1 pri ljudeh še ni izključena (Peiris in sod., 2007).

2.2 ZGRADBA VIRUSOV AVIARNE INFLUENCE TIPA A IN ZNAČILNOSTI VIRUSNIH EPITOPOV

2.2.1 Zgradba virusov aviarne influence tipa A

Virusi AI spadajo v družino *Orthomyxoviridae*. Družina *Orthomyxoviridae* sodi v skupino RNA virusov. Vsi predstavniki družine so vijačno somerni virusi z ovojnico (Koren, 2002). Osrednja vijačna nukleokapsida je dodatno zavita, zaradi česar imajo ti virusi različne oblike: sferične, tubularne in filamentozne. Veliki so od 80 do 120 nm (Peiris, 2007). Virusi AI so oviti v ovojnico plazemske membrane, ki jo pridobijo pri izstopu iz gostiteljske celice (Horimoto in Kawaoka, 2001).

Iz ovojnice navzven segata dva tipa ovojničnih glikoziliranih proteinov HA in NA. HA so paličasti trimeri, enakomerno razporejeni po celotni površini virusa. NA so gobi podobni tetramerji, razporejeni asimetrično po površini virusa. Ti dve obliki glikoproteinov sta v lipidno ovojnico »zasidrani« s transmembransko domeno (Horimoto in Kawaoka, 2001).

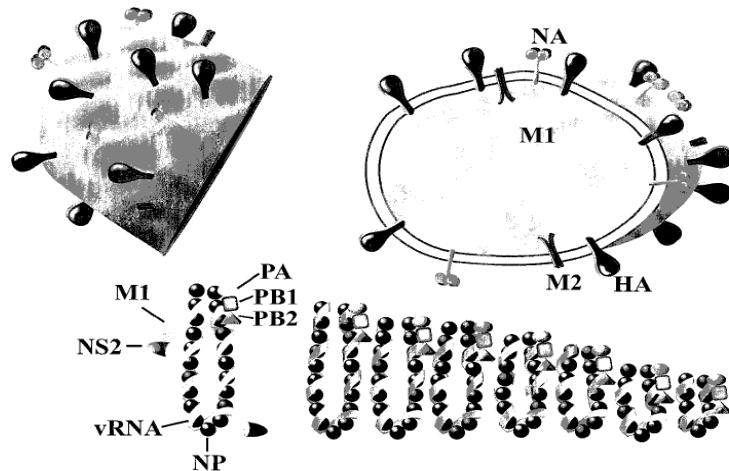
Nekateri izmed neglikoziliranih proteinov virusa so vezani na virusno RNA in skupaj z njo tvorijo ribonukleoproteinski kompleks (RNP). Virusna RNA je v povezavi s proteini locirana v osrednjemu delu, oziroma sredici virusa. Genom sestavlja osem odsekov linearne, negativno polarne, enovijačne RNA. Osem odsekov enovijačne RNA je povezanih s tremi podenotami virusne polimeraze (PB1, PB2 in PA) in z nukleokapsidnim proteinom (NP). Vsi proteini RNP kompleksa sodelujejo pri prepisovanju in podvojevanju molekule RNA (Shaw in sod., 1992).

Neglikozilirani membranski proteini virusa so M1 in M2. Poleg glikoziliranih proteinov je na ovojnico virusa pritrjeno omejeno število membranskih proteinov M2, ki kot NA tvorijo tetramere. Proteini M2 tvorijo H^+ ionski kanal, ki ob nizkem pH ($pH = 5$) v endosomu gostiteljske celice zakisajo sredico virusa in s tem pospešijo virusno slačenje ter sprostitev

nukleokapside v citoplazmo gostiteljske celice. Proteini M2 so zato tarča protivirusnih zaviralcev, kot sta amantadine in rimantadine, ki ovirata njihovo vlogo virusnega ionskega kanala in preprečujeta slačenje virusa (Horimoto in Kawaoka, 2001). Membranski proteini M1 ležijo znotraj ovojnice in sodelujejo pri nadalnjem razmnoževanju virusa. Z odcepitvijo iz RNP kompleksa omogočijo njegov vstop v jedro gostiteljske celice in prepisovanje virusne RNA. Nasprotno z vezavo na novo sintetizirani RNP kompleks, skupaj s proteinom NS2 sodelujejo pri izločanju novo sintetiziranega RNP kompleksa iz jeda gostiteljske celice v citoplazmo (Shaw in sod., 1992).

Neglikozilirani proteini so tudi NS1 in NS2. Proteini NS2 skupaj z membranskimi proteini M1 sodelujejo pri izločanju RNP kompleksa iz jeda gostiteljske celice v citoplazmo, kjer nato pomagajo pri nadaljnji izgradnji virusa. Edini nestrukturni proteini virusa, NS1, imajo več funkcij. Sodelujejo pri izločanju molekul mRNA iz jeda gostiteljske celice in v citoplazmi gostiteljske celice stimulirajo njihov prevod v funkcionalne virusne proteine. Njihova najpomembnejša vloga je preprečevanje aktivnosti interferonov v gostitelju (Horimoto in Kawaoka, 2001).

Slika 2 prikazuje položaj in obliko strukturnih proteinov virusov AI tipa A.



Slika 2: Struktura virusov aviarne influence tipa A (Horimoto in Kawaoka, 2001: 132).

Slika prikazuje položaj in obliko ovojničnih proteinov HA, NA in M2. Prikazan RNP kompleks je sestavljen iz osmih odsekov enoverižne RNA, v povezavi s proteinom NP in tremi polimeraznimi proteini (PA, PB1 in PB2). Protein M1 je povezan tako z RNP kompleksom kot tudi z virusno ovojnico in tesno sodeluje s proteinom NS2. Edini nestrukturni protein virusa je NS1.

Preglednica 3 prikazuje molekulske mase proteinov virusov AI tipa A.

Preglednica 3: Molekulske mase proteinov virusov aviarne influence tipa A.

viri	molekulske mase virusnih proteinov [kDa]											
	PB1	PB2	PA	HA0	NP	NA	HA1	HA2	M1	NS1	NS2	M2
Garcia in sod. (1996)	/	/	/	~74	/	/	~46	~28	/	/	/	/
Ge in sod. (2007)	/	/	/	~74	/	/	~46	~28	/	/	/	/
He in sod. (2007)	/	/	/	/	/	/	~48	/	/	/	/	/
Hsieh in Chang (2006)	/	/	/	72	/	/	/	/	/	/	/	/
Kamps in sod. (2006)	/	/	/	76	/	220*	/	/	/	26	11	/
Ki Choi in sod. (2005)	/	/	/	~75	/	/	/	/	/	/	/	/
Li in sod. (2006)	/	/	/	/	/	/	/	/	~28	~26	/	/
Ohuchi in sod. (1997)	/	/	/	~76	/	~55	~46	~30	/	/	/	/
Shaw in sod. (1992)	96	87	85	75	60	55	/	/	28	25	12	11

HA osnova molekula HA0, razpade na dve podenoti HA1 in HA2.

* 220 kDa je velikost NA tetramerne strukture.

~ = pomeni, da smo molekulske mase ocenili iz priloženih slik v navedenih virih.

2.2.2 Hemaglutinin

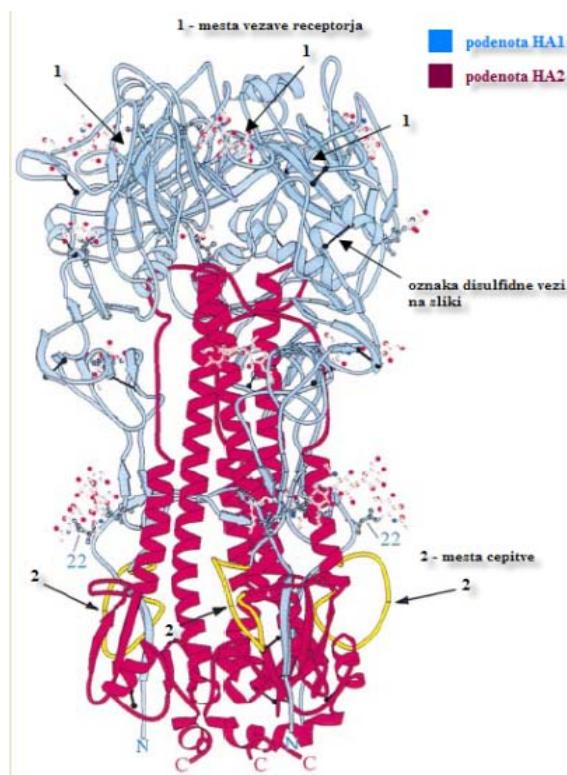
HA je transmembranski glikoprotein tipa I iz približno 568 aminokislin, sestavljen iz N-terminalne zunanje domene in C-terminalnega sidra (Nwe in sod., 2006). Virusu omogoči pritrjevanje na celične receptorje - površinske sialilirane oligosaharide, in hemaglutinacijsko aktivnost. HA sproži okužbo gostiteljske celice, tako da se poveže s celičnimi receptorji in kasneje omogoči širjenje virusa po telesu gostitelja (Horimoto in Kawaoka, 2001).

Virusi influence po vezavi virusnih ovojničnih glikoproteinskih HA s sialično kislino, ki je sestavni del celičnih receptorjev, vstopijo v celice z receptorsko posredovano endocitozo (Koren, 2002). Gostiteljeve celične proteaze posttranslacijsko aktivirajo prekurzorsko molekulo HA (HA0) tako, da jo cepijo na dve podenoti, HA1 in HA2. Proteolitska aktivacija HA0 je bistven proces, ki omogoči okužbo gostitelja (Horimoto in Kawaoka, 2001). Pri endocitozi se citoplazemska membrana uviha v notranjost gostiteljske celice in obda virus. Nastane mešiček, imenovan endosom, ki se odščipne in sprosti v citoplazmo.

Podenoti HA pri nevtralnem pH nista dejavni (Koren, 2002). Nizek pH znotraj endosoma povzroči konformacijske spremembe HA. Amino konec konformacijsko preoblikovane podenote HA2 potem omogoči zlitje virusne ovojnice z membrano endosoma ter pospeši sproščanje virusnega RNP kompleksa v citoplazmo gostiteljske celice (Horimoto in Kawaoka, 2001).

Stopnja virulence virusa je primarno odvisna od zgradbe HA. HA LPAI virusov lahko cepijo le zunajcelične proteaze v celicah respiratornega ali gastrointestinalnega trakta, tako ti virusi povzročijo le blage lokalne okužbe (preglednica 1, točka 2.1.1). Medtem ko HA HPAI virusov cepijo znotrajcelične proteaze raznolikih tipov celic, tako lahko ti virusi povzročijo hude sistemske okužbe v gostitelju (preglednica 1, točka 2.1.1). Zmožnost celičnih proteaz, da cepijo HA virusa, je odvisna od dveh strukturnih lastnosti HA. Cepitev je odvisna od aminokislinske sekvence HA na mestu cepitve in od strukture ogljikovih hidratov v bližini tega mesta. HA LPAI virusov imajo na mestu cepitve eno samo molekulo arginina, medtem ko imajo HPAI virusi več baznih aminokislinskih ostankov (arginina in lizina) na mestu cepitve. Veriga ogljikovih hidratov v bližini določa dostop celičnih proteaz do mesta cepitve HA (Horimoto in Kawaoka, 2001). V preglednici 1 (točka 2.1.1) so povzete nekatere lastnosti HA, ki se razlikujejo med LPAI in HPAI virusi.

Na sliki 3 je prikazana struktura hemaglutinin.



Slika 3: Struktura hemaglutinina (Chen in sod., 1998: 413).

Na sliki 3 je prikazana struktura prekurzorske molekule HA0. Označena so mesta vezave na celične receptorje (puščice 1), mesta cepitve prekurzorske molekule HA0 na podenoti HA1 in HA2 (puščice 2, obarvano rumeni) in disulfidne vezi, ki so na sliki označene s črnimi povezavami med vijačnicami. Mesta vezave receptorja so na podenoti HA1, ki predstavlja »glavo« molekule (obarvana modro). Podenota HA2 predstavlja manjši del molekule (vijačnice v ospredju, obarvane rožnato).

2.2.3 Nevraminidaza

NA je transmembranski glikoprotein tipa II, sestavljen iz N-terminalnega sidra in C-terminalne zunanje domene (Horimoto in Kawaoka, 2001). NA je sialidaza - eksoglukozidaza, ki hidrolizira z α -glikozidno vezjo vezano sialično kislino na glikoproteinih, glikolipidih in oligosaharidih. Cepi terminalno vezane virusne in celične sialične kisline ter s tem prepreči spojitev virionov (Shaw in sod., 1992). NA cepi sialične kisline iz HA, iz drugih molekul NA in iz glikoproteinov in glikolipidov na celičnih površinah. NA cepi tudi sialične kisline mucina. Z mucinsko plastjo, ki ščiti pred vdori

patogenov, je obdan respiratorni epitelij gostitelja. Tako NA omogoča širjenje in prehod virusa skozi respiratorni epitelij do tarčnih celic v gostitelju (Peiris in sod., 2007).

NA je zanimiva tarča za protivirusna zdravila. Nevraminidazni inhibitor oseltamivir (Tamiflu®), je trenutno najustreznejše zdravilo za zdravljenje okužb z virusom H5N1 pri ljudeh. Nevraminidazni inhibitorji so analogi sialičnih kislin, ki se selektivno vežejo na NA virusa in tako preprečijo njihovo delovanje. Ena sama nukleotidna zamenjava, mutacija na aminokislinskem mestu 292, sprememba iz arginina v lizin, že povzroči odpornost virusa na zaviralce NA, kot sta oseltamivir in zanamavir (Kamps in sod., 2006).

2.2.4 Vloga najpomembnejših antigenskih epitopov virusov aviarne influence tipa A

Virusna glikozilirana ovojnična proteina, HA in NA, sta najpomembnejša antigenska epitopa pri vseh virusih influence. HA je glavni antigen in imunogen virusov influence, saj je ob okužbi z virusom zanj specifična večina sintetiziranih protiteles (Ab) v gostitelju. Prisotnost HA sproži tvorbo nevtralizacijskih protiteles, ki so ključni del obrambnega imunskega sistema gostitelja. Sintetizirana Ab proti HA preprečijo vezavo HA na površinske celične receptorje in s tem onemogočijo vstop virusa v celice ter nadaljnje širjenje virusa po telesu gostitelja (Horimoto in Kawaoka, 2001).

NA je poleg HA tudi pomemben antigen virusov influence. Protitelesa, ki se tvorijo proti NA, so za zaščito gostitelja enako pomembna, saj onemogočajo sproščanje virusa iz okuženih celic v gostitelju (Horimoto in Kawaoka, 2001).

2.3 MONOKLONSKA PROTITELESA PROTI VIRUSU AVIARNE INFLUENCE PODTIPA H5N1

2.3.1 Značilnosti monoklonskih protiteles IgG

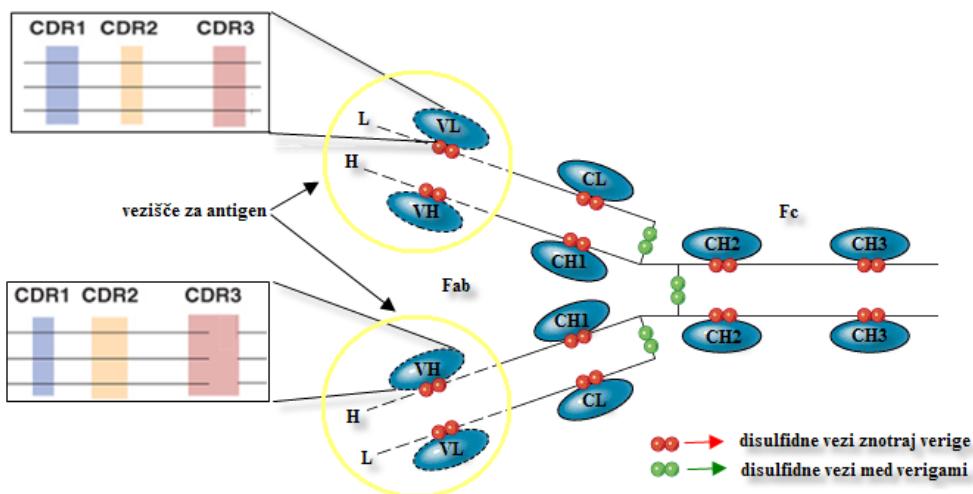
Ab ali imunoglobulini (Ig) so del humoralnega imunskega sistema. Pri sesalcih zasledimo več razredov Ab, največ protiteles v krvi je razreda G (IgG). IgG so glikozilirani globularni proteini z molekulsko maso ~ 150 kDa. Imajo simetrično strukturo in so sestavljeni iz dveh

enakih težkih polipeptidnih verig označenih s črko γ in dveh enakih lahkih polipeptidnih verig povezanih z disulfidnimi vezmi (Vozelj, 2000).

Funkcionalni enoti Ab sta Fc in Fab. Na enoti Fab je specifično vezišče za antigen in predstavlja spremenljivi (variabilni) del molekule. Vezišče za antigen je sestavljeno iz variabilnega dela lahke (V_L) in variabilnega dela težke verige (V_H). Strukturno skladnost z epitopi na antigenu (Ag) določa šest krajsih segmentov variabilnega področja, po trije v težki (H) in lahki (L) verigi. Ta hipervariabilna področja ali komplementarnost določajoče regije – CDR (ang. complementarity determining region) imajo največjo idiotipsko variabilnost med Ab (Obermajer in sod., 2007).

Pri pticah je imunoglobulinu razreda G pri sesalcih funkcionalno homologna imunoglobulinska molekula Ab IgY. Po strukturi se od IgG razlikuje v strukturi H verige in v položaju ter številu disulfidnih vezi. V nasprotju z IgG imajo IgY še eno dodatno domeno v konstantni regiji H verige in drugačno pregibno regijo (Warr in sod., 1995).

Tridimenzionalna struktura molekule IgG je podobna črki Y in je predstavljena na sliki 4.



Slika 4: Struktura molekule IgG.

V sistemu imunske obrambe se v limfocitih B proizvajajo specifična Ab proti prisotnim Ag epitopom. Po klonalni teoriji vsak limfocit B lahko proizvaja le en tip variabilne regije, IgG ali IgY, ki reagira samo z enim epitopom na Ag.

Monoklonska protitelesa (mAb) so v sistemih *in vitro* pridobljena iz Ab enega samega klena limfocita B. Njihova bistvena prednost pred poliklonskimi Ab je v definirani specifičnosti, homogenosti in možnosti pridobivanja v neomejenih količinah. Tehniko priprave mAb sta prva razvila Köhler in Milstein leta 1975. Njena osnova je postopek priprave hibridomskih celic z združitvijo limfocitov B, ki proizvajajo specifična mAb, in mielomske celic, ki se neomejeno delijo v pogojih *in vitro*. Hibridomske celične linije tako neomejeno proizvajajo specifična mAb proti izbranemu Ag (Köhler in Milstein, 1975).

Večina mAb je mišjega izvora. S pridom se uporabljo v diagnostične in raziskovalne namene. Za uporabo v namene zdravljenja ljudi pa jih je potrebno precej spremeniti, saj kot tuj protein pri ljudeh sprožijo imunski odziv (HAMA).

2.3.2 Sintetizirana monoklonska protitelesa proti virusu aviarne influence podtipa H5N1

Horimoto in sodelavci (2004) so izdelali mišja mAb IgG2a specifična za HPAI H5N1 A/Hong Kong/156/97, humani virusni izolat. Izmed šestih klonov hibridomov so štirje izločali mAb proti podenoti HA1, ki so tudi inhibirala hemadsorpcijo virusnih hemaglutininov. Dva klena sta izločala mAb proti podenoti HA2. mAb, specifična za podenoto HA1 omenjenega izolata, se niso vezala na HA humanega virusnega izolata H5N1 iz leta 2003 (A/Hong Kong/213/2003). Omenjeni rezultati so pripeljali do ugotovitve raziskovalcev, da obstajajo antigenske razlike med humanimi virusnimi izolati iz leta 1997 in 2003. mAb, specifična za podenoto HA2, so se vezala z HA obeh humanih virusnih izolatov H5N1 (iz 1997 in 2003). Slednja ugotovitev je vodila raziskovalce do še enega spoznanja, da je podenota HA2 najverjetneje bolj ohranjena in manj imunogena od podenote HA1.

mAb proti virusu H5N1, ki so jih proizvedli Smith in sodelavci (2006), so uporabili v testu inhibicije hemaglutinacije. mAb so jim pomagala pri določanju antigenskih karakteristik virusa HPAI H5N1, ki se je razširil med perutnino v Indoneziji in Vietnamu, med leti 2003 in 2005. Ugotovili so, da se je ena sama genetska linija virusa razširila po celotni

Indoneziji, med leti 2003 in 2005, najverjetneje z gibanjem perutnine. Hkrati so spoznali, da se je virus H5N1 med Indonezijo in Vietnamom sčasoma genetsko spremenil in tvoril dve geografsko ločeni skupini.

Hanson in sodelavci (2006) so sintetizirali himerna mAb proti HA virusa HPAI H5N1. Najprej so pripravili mišja mAb, specifična za HA izolata A/Vietnam/1203/2004 in izolata A/Hong Kong/213/2003. Z nevtralizacijskim testom so odbrali mAb, ki so nevtralizirala virus H5N1 omenjenih izolatov. Pripravili so dvoje himernih mAb tako, da so vsebovala mišje variabilne regije lahke in težke verige ter konstantna področja človeške lahke verige κ in težke verige IgG1. V miškah so testirali učinkovitost zaščite himernih mAb pred okužbo in zdravljenja s himernimi mAb po okužbi z virusom H5N1. Obe mAb sta pokazali učinkovito zaščito pred okužbo miši z izolatom A/Vietnam/1203/2004, če so bila vbrizgana 24 ur pred vnosom virusa. Doza 1 mg mAb na kg telesne teže miši je pri enem klonu mAb že zadostovala za popolno zaščito miši pred okužbo z virusom H5N1. Pri tem klonu mAb so testirali še učinkovitost zdravljenja po okužbi z virusom. Enaka doza mAb je preprečila razvoj bolezni, če so bila mAb injicirana 24 ur po okužbi z virusom. mAb so zaščitila miši tudi pri injiciranju po 72 urah od okužbe z virusom, a so bile zato potrebne večje doze mAb. V tej študiji so dokazali zaščitni potencial dvoje himernih mAb pred in po okužbi z virusom H5N1 (del klada I).

He in sodelavci (2007) so sintetizirali vrsto IgG in IgM mAb, specifičnih za HA podtipa H5 virusa H5N1, in jih uporabili kot sestavni del ELISA testa - AC-ELISA (ang. antigen capture ELISA), za dokaz virusov ali virusnih Ag H5N1. Sintetizirali so mAb proti podenoti HA1 rekombinantnega HA iz HPAI H5N1 izolata A/goose/Guangdong/97 in proti HA H5N2 izolata A/chicken/Singapore/98. Med testiranji so odbrali mAb, ki je zelo dobro reagiralo s H5 in hkrati ni inhibiralo hemaglutinacije. Neuspešna inhibicija hemaglutinacije je kazalo na to, da se mAb veže z linearimi epitopi na HA, ki so prisotni v inaktiviranih in liziranih humanih virusih vzorcih. Drugo odbrano mAb je inhibiralo hemaglutinacijo in nevtraliziralo virus, kar je kazalo na to, da prepoznavata konformacijske oblike HA, ki so prisotne v živih virusih. Kombinacija obeh mAb je dajala najmočnejše signale v AC-ELISA testu. Raziskovalci so pokazali enako učinkovitost testa za vzorce okužene perutnine in humane vzorce. Pokazali so, da je AC-ELISA hitra in enostavna

presejalna metoda z dobro specifičnostjo in visoko občutljivostjo za direktno identifikacijo HPAI virusa podtipa H5 v humanih kliničnih vzorcih.

Simmons in sodelavci (2007) so pridobili mAb človeškega porekla, specifična za virus HPAI H5N1, in preverili njihovo zaščitno učinkovitost v miškah pred in po okužbi z virusom. Človeška mAb so pripravili tako, da so s pomočjo virusa Epstein-Barr (EBV) razvili nesmrtnе spominske celice B iz vietnamskih pacientov, ki so preboleli okužbo z virusom HPAI H5N1. Spominske celice B so tako neomejeno proizvajale specifična mAb. Z nevtralizacijskim testom so testirali navzkrižno reaktivnost mAb proti različnim genetskim linijam – kladom virusa H5N1, ki so krožili po Vietnamu in Indoneziji, v letih 2004 in 2005. Klada I in II sta se med seboj po AK sestavi razlikovala za 4 % – 5 %. Nekatera mAb so bila navzkrižno reaktivna in niso razlikovala med kladi, druga so bila specifična le za klad I. V testiranjih *in vivo* so le-ta mAb učinkovito zaščitila miške pred okužbo z izolatom A/Vietnam/1203/2004 (del klada I). Raziskovalci so predstavili zanimiv koncept izolacije humanih mAb iz periferne krvi pacientov, ki so okužbo preboleli, in tudi potencialno možnost uporabe mAb za preprečevanje HPAI pri zdravih ljudeh.

Yang in sodelavci (2008) so sintetizirali in uporabili mAb proti nukleoproteinu (NP) virusov influence tipa A. NP je notranja antigenska determinanta in je mnogo bolj ohranjena med virusi influence tipa A, kot sta zunanjega ovojnična proteina HA in NA. mAb proti NP so tako prepoznavala 15 različnih virusov influence tipa A, tudi H5N1. S sintetiziranimi mAb so izvedli več imunskih testov, kot so imunofluorescenčni test, imunohistokemični test, kompetativna ELISA in drugi. mAb proti NP so se izkazala kot zelo uporabna za razvoj hitrih diagnostičnih testov za potrditev AI.

Kaverin in sodelavci (2007) so s pomočjo vrste mAb specifičnih za HA podtipa H5, preučevali Ag epitope H5, izolata HPAI H5N1 A/Vietnam/1203/2004 (del klada I). Ta specifična mAb, ki so jih uporabili, so tudi del kompleta za potrditev prisotnosti virusa H5N1 v vzorcu (CDC Influenza Reagent Kit, ZDA) in se uporablajo za vse splošno preučevanje trenutno prisotnih virusov HPAI H5N1. Presenetilo jih je odkritje dveh mAb, ki sta imeli sposobnost vezave na dve ločeni antigenski mesti na H5. S pomočjo mAb so ugotovili znatne razlike v antigenski strukturi H5 med LPAI H5N2 in HPAI H5N1.

Ugotovili so tudi, da razporeditev antigensko pomembnih AK sprememb v H5, nesovпадa s filogenetsko delitvijo virusov H5N1 na posamezne klade. Predlagali so, da bi se morala tudi ta dognanja upoštevati pri izbiri ustreznega podtipa za pripravek cepiva.

2.3.3 Pomen proizvodnje monoklonskih protiteles proti virusu aviarne influence podtipa H5N1

Sintetizirana mAb se uporablja za *in vitro* preučevanja virusa H5N1. Specifična mAb se uporablja za preučevanje antigenskih karakteristik posameznih virusnih izolatov (Horimoto in sod., 2004; Smith in sod., 2006), tako se lahko prepozna izoblikovanje ločenih genetskih linij, določa stopnjo njihove sorodnosti in izoblikuje filogenetska drevesa. Odkritje antigenskih razlik med posameznimi izolati pripomore k boljšemu vpogledu na epidemiologijo virusa in odkritju potencialnega vira prenosa. S specifičnimi mAb preučujejo posamezne virusne proteine, kot so HA, NA, NP in drugi, ter tudi njihovo evolucijo (Yang in sod., 2008; Kaverin in sod., 2007).

V diagnostiki se mAb uporablja v vrsti imunskih testov (encimskoimunski testi, imunofluorescenčni testi, hemaglutinacijski testi, hemadsorbcijski testi ipd.) za neposredno dokazovanje virusov in virusnih proteinov H5N1 (Smith in sod., 2006; He in sod., 2007; Yang in sod., 2008).

Poleg tega imajo mAb, specifična za virus HPAI H5N1, potencialno možnost uporabe kot zaščitno sredstvo pred in po okužbi z virusom (Hanson in sod., 2006; Simmons in sod., 2007). Kot terapevtska zaščitna sredstva za preprečevanje okužbe z virusom bi jih lahko uporabljali za zaščito perutnine in ob ustrezeni modifikaciji tudi za ljudi. Na splošno velja, da terapevtska mAb predstavljajo najhitreje rastočo skupino novih bioloških zdravil, po predvidevanjih naj bi se tržna vrednost terapevtskih mAb v prihodnjih letih povečevala kar za 30 % na leto. Za uporabo v terapevtske namene je ključna lastnost mAb specifično prepoznavanje in vezava vezavnega mesta (epitopa) na tarčni molekuli (Ag), kar omogoča ciljano zdravljenje (Obermajer in sod., 2007).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 PRIPRAVA MONOKLONSKIH PROTITELES PROTI VIRUSU AVIARNE INFLUENCE PODTIPA H5N1

Monoklonska protitelesa smo pripravili po standardni metodi (Goding, 1986). Uporaba poskusnih živali za namen pridobivanja mAb je bila odobrena z dovoljenjem 323-02-237/2005/2, ki sta ga izdala Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano ter Veterinarska uprava Republike Slovenije.

Intraperitonealno smo petkrat, z enomesečnimi presledki, imunizirali miš BALB/c s slovenskim izolatom inaktiviranega virusa HPAI H5N1 (A/swan/Slovenia/649/2006). Pri zadnji pozitivni imunizaciji smo Ag mešanici poleg inaktiviranega virusa H5N1 dodali še virus H5N2 (VLDIA097 HAG-INFH5, GD - Diagnostics, Nizozemska). Inaktiviran virus H5N1 so za nas pripravili na Veterinarski fakulteti pri prof. dr. Olgi Zorman Rojs, v okviru skupnega projekta: Molekularna in imunološka analiza slovenskih izolatov virusa aviarne influence H5N1.

Po tretji in četrti imunizaciji smo v vzorcih seruma imunizirane miši BALB/c preverili prisotnost Ab proti virusu H5N1 in H5N2 z metodo iDIBA (metoda opisana v točki 3.1.1.2).

Miš BALB/c smo tri dni po zadnji imunizaciji žrtvovali s cervikalno dislokacijo, ji sterilno odvzeli vranico in s sejanjem na najlonskem situ pripravili primarno celično kulturo vraničnih celic in izvedli fuzijo.

Vranične celice miši BALB/c smo pomešali z mielomskimi celicami linije NS-1 v razmerju 7:1. Fuzijo smo po standardnem postopku izvedli s polietilenglikolom 1.300 – 1.600 (PEG, Sigma, ZDA), razredčenim z DMEM v volumskem razmerju 1:1 (Liddell in Cryer, 1991).

Kot presejalno metodo za testiranje hibridomov smo izvajali metodo ELISA (metoda opisana v točki 3.1.1.1). Po testiranju smo izbrane klone namnožili, polovico celic zamrznili, drugo polovico pa klonirali po metodi »limiting dilution« (Liddell in Cryer, 1991).

Po ponovnem testiranju z metodo ELISA (metoda opisana v točki 3.1.1.1) smo izbrane klone gojili v obogatenem mediju brez seruma (SFM) (Hyclone, ZDA). Izmed kloniranih hibridomov smo jih za nadaljnja testiranja izbrali 7. Od vsakega kloniranega hibridoma smo del celic zamrznili, del celic pa namnožili in zbirali supernatante za natančnejšo analizo mAb.

Z metodo ELISA smo izbirali klone glede na značilnosti navedene v preglednici 4.

Preglednica 4: Strategija izbora klonov hibridomov z metodo ELISA.

vzorec	antigen		
	H5N1	H5N2	alantoisna tekočina
supernatanti klonov hibridomov	+	+	-
	+	-	-
	-	+	-

Opomba: + = pozitivna reakcija vzorca na antigen, - = negativna reakcija vzorca na antigen

Vse pozitivne hibridome smo zamrznili v tekočem dušiku. Hibridomi so shranjeni v genski banki Laboratorija za imunologijo in celične kulture (Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko).

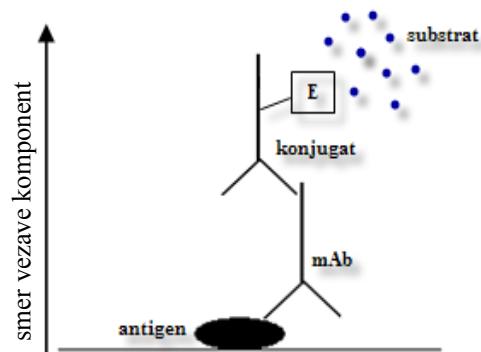
3.1.1 Preverjanje prisotnosti specifičnih protiteles

V vseh stopnjah poskusa, med samo pripravo, čiščenjem in izolacijo mAb smo preverjali prisotnost specifičnih Ab. V preglednici 5 je prikazano katerih encimskoimunskih metod smo se posluževali na posamezni stopnji. Na sliki 5 je prikazana shema indirektnih encimskoimunskih metod.

Preglednica 5: Uporaba encimskoimunskega metoda, za preverjanje prisotnosti specifičnih protiteles.

vzorec	encimskoimunska metoda	
	ELISA	iDIBA
serum imunizirane miši BALB/c	-	+
supernatanti klonov hibridomov	+	+
izolirana mAb	-	+

Opomba: + = izvedba testa z izbranim vzorcem, - = test ni bil izveden z izbranim vzorcem



Slika 5: Shema indirektnih encimskoimunskega metod.

3.1.1.1 Encimskoimunska metoda – ELISA

Metodo ELISA (ang. enzyme-linked immunosorbent assay) smo izvajali po standardnem postopku (Harlow in Lane, 1988). ELISA je izredno občutljiva raziskovalna in diagnostična metoda, primerna za analizo večjega števila vzorcev hkrati.

Z metodo ELISA smo v supernatantih klonov hibridomov preverjali prisotnost mAb na:

- | | |
|---------------------|--|
| virus H5N1 | – izolat A/swan/Slovenia/649/2006 (Veterinarska fakulteta) |
| virus H5N2 | – VLDIA097 HAG-INFH5, GD - Diagnostics, Nizozemska |
| alantoisno tekočino | – lasten vir (Rodica pri Domžalah) |

Viruse AI za njihovo razmnoževanje inokulirajo v alantoisno votlino oplojenih kokošjih jajc. Lahko bi se zgodilo, da bi nekaj proteinov iz alantoisne tekočine ostalo v izolatu virusa, s katerim smo imunizirali. Zato bi lahko nastala tudi Ab proti tem proteinom. Z

metodo ELISA smo zato testirali tudi, če katera od nastalih Ab reagirajo s proteini alantoisne tekočine.

Zgoraj navedene Ag smo redčili v razmerju 1:320 in 100 µl posamezne redčitve nanesli v luknjice na celotni mikrotiterski plošči (Greiner Bio-One, Nemčija). Mikrotitersko ploščo smo inkubirali čez noč na 4 °C. Naslednji dan smo s spiralnikom (ELISA Washer Bio-tek ELx50, ZDA) ploščo trikrat sprali z 0,05 % pufrom Tween-PBS (TPBS). V vsaki luknjici na mikrotiterski plošči smo 1 uro blokirali nevezana mesta, z dodatkom 300 µl 5 % nemastnega mleka v prahu, raztopljenega v pufru PBS. Ponovili smo trikratno spiranje z 0,05 % TPBS. V luknjice smo dodali 100 µl posameznih supernatantov hibridomov in kontrol (gojišče – negativna kontrola in mišji serum anti-H5N1, redčen v razmerju 1:500 – pozitivna kontrola) ter inkubirali 1 uro. Sledilo je petkratno spiranje z 0,05 % TPBS. Nato smo 45 min inkubirali v sekundarnih Ab (100 µl na luknjico): kunčja Ab proti mišjim IgG, konjugirana s peroksidazo (Sigma A9044, ZDA), redčena v razmerju 1:10000. Spirali smo še petkrat z 0,05 % TPBS. Po spiranju smo dodali 150 µl substrata v posamezno luknjico in inkubirali 45 min v temi. Substrat ABTS smo pripravili po navodilih proizvajalca (Pierce Biotechnology, 34026, ZDA). Reakcijo smo zaustavili z dodatkom 1 % raztopine SDS. Intenzitetu nastalih barvnih reakcij smo merili spektrofotometrično z merjenjem absorbance pri 405 nm (ELISA Reader EL808, Bio-Tek, ZDA). Vse zgoraj navedene inkubacije so potekale na sobni temperaturi.

3.1.1.2 Indirektni encimskoimunski test – iDIBA

Supernatante izbranih klonov smo testirali z indirektnim oziroma posrednim encimskoimunskim testom iDIBA (ang. indirect dot-immunobinding assay). iDIBA test (Benčina in sod., 1992) je v laboratoriju dobro vpeljan in omogoča hitro detekcijo specifičnih Ab v imunskemu serumu in drugih vzorcih, ki vsebujejo Ab.

Z iDIBA testom smo želeli v supernatantih hibridomov preveriti prisotnost in aktivnost specifičnih mAb proti Ag inaktiviranega virusa H5N1, izolata A/swan/Slovenia/649/2006

(Veterinarska fakulteta) in Ag virusa H5N2 (VLDIA097 HAG-INFH5, GD - Diagnostics, Nizozemska). Ag sta bila redčena s pufrom PBS pH 7,2 (PBS) v razmerju 1:50.

Na membrano Immobilon PVDF (Millipore, ZDA) smo narisali mrežo kvadratkov velikosti 25 mm² ter jo aktivirali z nekaj sekundnim namakanjem v 100 % metanolu. Nato smo jo za 5 min prenesli še v destilirano vodo (dH₂O). Na membrano smo nanesli po 3 µl Ag ustrezne redčitve ter membrano inkubirali 45 min v 0,5 % TPBS. V vsakem supernatantu z mAb smo 45 min inkubirali po eno enoto membrane z identičnimi nanosi Ag. Nespecifična Ab so se pri spiranju, trikrat po 10 min v 0,05 % TPBS, sprala z membrane. Nato smo 45 min inkubirali, v sekundarnih Ab: kunčja Ab proti mišjim IgG, konjugirana s peroksidazo (Sigma A9044, ZDA), redčena v razmerju 1:4000. Spirali smo še dvakrat po 10 min v 0,05 % TPBS in enkrat po 10 min v PBS. Po dodatku encimskega substrata True Blue (Kirkegaard & Perry Laboratories, ZDA) je potekla encimska reakcija, ki smo jo zaznali z modrim obarvanjem. Ocena rezultata testa je bila subjektivna, intenziteto barve smo ocenili z oznakami +++ za močno obarvanje, ++ za dobro vidno, vendar manj intenzivno obarvanje in + za rahlo modro obarvanje, vendar še vedno jasno ločljivo glede na negativno kontrolo, (+) za zelo rahlo obarvanje, a ločljivo od negativne kontrole. Vse zgoraj navedene inkubacije so potekale na sobni temperaturi.

Membrano smo inkubirali tudi v pufru PBS in obogatenem mediju brez seruma (Hyclone, ZDA), ki ne vsebujeta Ab (negativni kontroli). Kontrola specifične vezave konjugata je bil trak z Ag, ki smo ga inkubirali samo v konjugiranih Ab. Na ta način smo preverili, da se konjugat sam po sebi ne veže na Ag. Za pozitivno reakcijo je bila potrebna predhodna specifična vezava naših primarnih Ab.

3.2 ČIŠČENJE MONOKLONSKIH PROTITELES

Iz supernatantov izbranih klonov hibridomov 1G6D11, 1H4B9, 2F4B6, 1C2C3, 1C2B5, 4H2B4 in 1H4B11 smo najprej z nasičenim amonijevim sulfatom oborili Ab IgG, nato pa jih osamili z ločevanjem na gelski kromatografiji.

Zbrali smo 30 ml supernatanta vsakega izbranega klena. Po protokolu (Harlow in Lane, 1988) smo najprej oborili Ab IgG. Celoten volumen (30 ml) vsakega supernatanta smo ločeno centrifugirali pri 3000xg, 30 min. Oborine smo zavrgli, supernatant vsakega klena pa prenesli v ločene čaše, jim dodali magnetna mešala in postavili na magnetni mešalnik. Med stalnim rahlom mešanjem posameznega vzorca smo ob rob čaše s kapalko počasi dodajali nasičen amonijev sulfat in sicer do dosežene 50 % nasičenosti amonijevega sulfata v posameznem vzorcu. Da smo dosegli 50 % nasičenost amonijevega sulfata v posameznem vzorcu, je bilo potrebno dodati enak volumen popolnoma nasičenega amonijevega sulfata, kot je bil volumen vsakega vzorca (30 ml). Da bi se mAb iz posameznih vzorcev popolnoma oborila, smo vzorce inkubirali čez noč v hladilniku na 4 °C. Naslednji dan smo oborjena Ab vzorcev ločeno centrifugirali pri 3000xg, 30 min. Na tej stopnji smo supernatante posameznih vzorcev zavrgli, centrifugirke dobro osušili in usedline posameznih vzorcev, z vsebovanimi mAb, ločeno resuspendirali v 10 % začetnega volumna posameznega vzorca (3 ml) sterilnega pufra PBS.

Oborjena Ab smo izolirali z gelsko kromatografijo z ločevanjem po velikosti. To je hitra in enostavna metoda za čiščenje mAb. Princip ločevanja z gelsko kromatografijo temelji na velikosti, večje molekule (mAb IgG) po gelu potujejo hitreje od manjših molekul in se zato iz gela hitreje izločijo.

Uporabili smo Sephadex® S-200-HR medij (Sigma, ZDA) in kolono pripravili v skladu z navodili GE Healthcare, Sephadex® S-200-HR (GE Healthcare, Švedska).

Pufer PBS smo po priporočilih proizvajalca avtoklavirali. Za 50 ml kolone (V) smo odpipetirali 75 ml posedenega gela ($1,5 \times V$) in gel na presesalni buči ločili od etanolne raztopine ter ga spirali s PBS. Spran gel smo s PBS razredčili do 100 ml ($2 \times V$) in ga enakomerno vlili v pričvrščeno kolono na stojalu ter počakali, da se je posedel. Pred izvedbo kromatografije smo kolono uravnotežili s 100 ml PBS ($2 \times V$).

Na pripravljeno kolono smo nanašali 3 ml posameznega oborjenega vzorca in kolono spirali s PBS. Ves čas spiranja posameznega vzorca s pufrom PBS, smo zbirali frakcije po 3 ml. Po vsakem ločevanju posameznega oborjenega vzorca smo kolono regenerirali s 50

ml (1 x V) raztopine visoke ionske jakosti (1 M NaCl v pufru PBS pH 7,2) in kolono ponovno uravnotežili s 100 ml PBS (2 x V).

V vseh zbranih frakcijah posameznega vzorca smo preverili prisotnost in aktivnost mAb IgG z metodo iDIBA, kot je opisano pod točko 3.1.1.2.

Vsebnost mAb IgG v posameznih frakcijah, zbranih po čiščenju z gelsko kromatografijo, smo merili spektrofotometrično pri 280 nm. Merjenje absorbance pri 280 nm je hitra in enostavna metoda za kvantifikacijo proteinov.

Spektrofotometer (Shimadzu UV-160A, Japonska) smo predhodno umerili s pufrom PBS.

Iz izmerjenih absorbanc pri 280 nm smo izračunali koncentracijo mAb IgG v posamezni frakciji (Harlow in Lane, 1988):

$$A_{280} = 1,35 \rightarrow c_{IgG} = 1 \text{ mg/ml}$$

$$c_{IgG \text{ v frakciji}} = (A_{\text{frakcije}} * 1 \text{ mg/ml}) / 1,35 \quad \dots (1)$$

Frakcije posameznega vzorca, kjer smo spektrofotometrično izmerili največjo vsebnost mAb IgG in hkrati določili tudi njihovo aktivnost, smo združili. Združene frakcije posameznih vzorcev smo ločeno centrifugirali pri 7300xg, 10 min z ultrafiltracijo (Amicon® Ultra-4, Millipore, ZDA) in zaradi velikega volumna večkrat ponovili. Centrifugiranje je potekalo pri temperaturi 20 °C.

Vsak posamezen koncentriran vzorec smo s pufrom PBS pH 7,2 dopolnili do 3 ml. Glede na izhodiščno koncentracijo posameznih izhodnih supernatantov (v 30 ml) smo vsak posamezen vzorec koncentrirali v razmerju 1:10. Tako so imeli vsi koncentrirani vzorci pred nadaljnjiimi postopki enako volumsko izhodišče.

Koncentriranim vzorcem (1:10) smo ponovno izmerili absorbance pri 280 nm in izračunali koncentracijo Ab IgG v posameznem vzorcu - klonu hibridomov.

Z iDIBA testom na membrani smo, enako kot pri točki 3.1.1.2, preverili aktivnost izoliranih in koncentriranih Ab IgG. Celoten postopek in razredčine Ag so bile enake. Koncentrirani vzorci so bili redčeni s puferom PBS pH 7,2 v razmerju 1:10. To pomeni, da smo s ponovnim redčenjem dosegli enako koncentracijo, kot je bila izhodiščna koncentracija v posameznem izhodnem supernatantu (v 30 ml).

3.3 REAKCIJE mAb Z VIRUSNIMI PROTEINI H5N1 IN H5N2

Želeli smo določiti, katere proteine virusov H5N1 in H5N2 prepoznavajo naša izolirana Ab. V testiranjih smo znova uporabili inaktiviran virus H5N1, izolat A/swan/Slovenia/649/2006 (Veterinarska fakulteta) in virus H5N2 (VLDIA097 HAG-INFH5, GD - Diagnostics, Nizozemska). Da bi se prepričali o specifični vezavi Ab na Ag, smo za kontrolo na gel nanesli tudi alantoino tekočino. V ta namen smo z SDS-PAGE elektroforezo ločili proteine virusov po velikosti ter jih s prenosom western prenesli na membrano in izvedli ločene encimskoimunske reakcije s sedmimi kloni izoliranih mAb.

3.3.1 SDS-PAGE elektroforeza

SDS-PAGE elektroforezo smo izvajali po standardnem postopku (Harlow in Lane, 1988). Najprej smo SDS-PAGE elektroforezo izvedli za optimizacijo koncentracije ter za ogled proteinskega profila virusov H5N1 in H5N2. Pripravili smo 10 % ločevalni in 4 % nabijalni gel. Za nanašanje vzorcev smo uporabili nastavek z desetimi stezami. Na gel smo najprej nanesli različne razredčine obeh virusov. Od prve do četrte steze gela smo nanašali virus H5N1 (Veterinarska fakulteta), redčitve so si sledile v navedenem vrstnem redu: nerazredčen, redčitev 1:2, redčitev 1:4, redčitev 1:8. Na peto stezo gela smo nanesli molekularni označevalec z molekulskimi masami 200 kDa, 150 kDa, 120 kDa, 100 kDa, 85 kDa, 70 kDa, 60 kDa, 50 kDa, 40 kDa, 30 kDa, 25 kDa in 10 kDa (Fermentas, Unstained Protein Ladder, SM0661). Od šeste do devete steze gela smo nanašali virus H5N2 (VLDIA097 HAG-INFH5, GD - Diagnostics, Nizozemska), redčitve so si sledile v navedenem vrstnem redu: redčitev 1:20, redčitev 1:40, redčitev 1:80, redčitev 1:160. Pripravljenim razredčinam vzorcev smo dodali nanašalni pufer v razmerju 3:2 (36 µl

vzorca in 24 µl nanašalnega pufra). Vzorce smo segrevali 4 minute na 100 °C in nato nanašali 60 µl vzorca na stezo.

Elektroforeza je bila izvedena z aparaturom Dual Gel Caster, Mighty Small SE245 (Hoefer, ZDA) po navodilih proizvajalca. Za ločevanje proteinov v gelu smo uporabili naslednje elektroforetske pogoje: ločevanje v nabijальнem gelu 80 V, 45 min in ločevanje v ločevalnem gelu 120 V, 2 uri.

Po izvedeni elektroforezi smo gelobarvali z barvilo Coomassie Brilliant Blue (Sigma B0149, ZDA).

Ko smo določili optimalno koncentracijo Ag H5N1 in H5N2, smo z SDS-PAGE elektroforezo izvedli poskus. Priprava gela in vzorcev je bila enaka, kot je navedeno pri optimizaciji postopka. Na prvo stezo gela smo nanesli virus H5N1 (Veterinarska fakulteta) redčen s pufrom PBS v razmerju 1:3. Na drugo stezo smo nanesli virus H5N2 (VLDIA097 HAG-INFH5, GD - Diagnostics, Nizozemska) redčen s pufrom PBS v razmerju 1:50. Na tretjo stezo smo nanesli alantoinsko tekočino. Na četrto stezo smo nanesli 5 µl molekularnega označevalca z molekulskimi masami 11 kDa, 17 kDa, 26 kDa, 34 kDa, 43 kDa, 56 kDa, 72 kDa, 95 kDa, 130 kDa in 170 kDa (Fermentas, Prestained Protein Ladder, SM0671). Omenjene tri vzorce in molekularni označevalci na četrti stezi smo po enaki shemi nanašali preko celotnega gela. Pripravili smo dvakrat po dva gela z desetimi stezami, tako smo pridobili 10 enot gela z enakimi nanosi. Elektroforezo smo izvedli pod enakimi pogoji kot pri optimizaciji postopka.

3.3.2 Prenos proteinov na membrano (prenos western)

Po končanem poskusu (opisanem v točki 3.3.1) smo prenesli ločene proteine virusov iz poliakrilamidnega gela na membrano Immobilon PVDF (Millipore, ZDA) po postopku prenosa western ter dobili enak vzorec ločenih proteinov kot na gelu (Benčina in sod., 1994).

Pred izvedbo prenosa, smo s pufrom za moker prenos (100 ml 10x elektroforetskega pufra, 200 ml 100 % metanola, 700 ml dH₂O) dobro prepojili blazinice in filter papirje. Gel smo za 5 min namočili v pufru za prenos, membrano smo predhodno aktivirali (namočili za nekaj sekund v 100 % metanol) in jo potem prepojili s pufrom za prenos. Na katodni pokrov smo nalagali v sledečem vrstnem redu: 2 blazinici, 4 filter papirje v velikosti gela, gel, membrano v velikosti gela obrnjeno z licem proti gelu, 4 filter papirje v velikosti gela, 2 blazinici. Celoten »sendvič« smo zatesnili še z anodnim pokrovom. Ob vsakem nalaganju smo med posameznimi plastmi iztisnili vse zračne mehurčke in pazili, da so se vse plasti dobro in tesno prilegale. Prenos je bil izveden z aparaturo Xcell SureLock, Blot Module (Invitrogen, ZDA) in je tekel 1 uro in pol pri 25 V in 190 mA.

Zgoraj opisani postopek smo ponovili za vsak posamezen gel (štirikrat).

3.3.3 Encimskoimunska reakcija

Membrane s ponavljajočimi štirimi nanosi: H5N1 1:3, H5N2 1:50, alantoinsna tekočina in molekularni označevalec (opisano v točki 3.3.2), smo ločili na posamezne enote membrane z enakimi nanosi in izvedli ločene encimskoimunske reakcije s sedmimi kloni izoliranih mAb (po postopku opisanem v točki 3.1.1.2).

3.4 DOLOČITEV NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA VARIABILNE REGIJE TEŽKE VERIGE IgG

Ugotovili smo, da so mAb klonov hibridomov 1C2C3, 2F4B6 in 4H2B4 specifična za različne epitope virusov H5N1 ter H5N2. Na podlagi dobljenih rezultatov smo želeli le-ta mAb še bolj podrobno opisati. Trem izbranim mAb smo želeli določiti nukleotidno zaporedje variabilne regije težke verige (V_H) IgG.

3.4.1 Izolacija informacijske RNA (mRNA)

Iz celic izbranih treh klonov smo najprej ločeno izolirali mRNA. mRNA smo izolirali z reagentom TRIzol® (Invitrogen, ZDA), po navodilih proizvajalca Invitrogen, TRIzol® Reagent (Invitrogen, ZDA).

Celične suspenzije smo centrifugirali pri 900 rpm, 10 min, da smo odstranili supernatant z gojiščem in mrtvimi celicami. Potem smo celice lizirali z dodatkom 1 ml TRIzol® reagenta (Invitrogen, ZDA) na $5-10 \times 10^6$ celic in inkubirali posamezne homogenizirane vzorce 5 min pri sobni temperaturi za popoln razpad nukleoproteinskih kompleksov. Po inkubaciji smo vsakemu vzorcu dodali 200 µl kloroforma (Fluka, BioChemica, Švica) in vsebino z rahlim obračanjem epice dobro premešali ter inkubirali 3 min pri sobni temperaturi. Sledče centrifugiranje je trajalo 15 min pri 4 °C in 12000xg. Zgornjo vodno fazo z RNA smo previdno prenesli v ločene epice in RNA posameznih klonov oborili z dodatkom 500 µl 2-propanola (Merck, ZDA). Po 10 min inkubaciji na sobni temperaturi je sledilo 10 min centrifugiranje pri 12000xg in 4 °C. Na dnu epic smo opazili oborine RNA, ki smo jih očistili z dodatkom 1 ml 75 % etanola. Po temeljitem mešanju vsebine in 5 min centrifugiranju pri 7500xg na 4 °C, smo posamezne očiščene oborine RNA na sobni temperaturi popolnoma osušili. Na zraku osušene oborine RNA posameznih klonov smo ločeno raztopili v 20 µl Milli-Q vode in jih shranili na – 80 °C za kasnejšo uporabo.

3.4.2 Sinteza in pomnoževanje komplementarne DNA (cDNA)

Izolirane mRNA izbranih treh klonov smo z verižno reakcijo s polimerazo obratno prepisali v cDNA, z encimom reverzno transkriptazo. Verižna reakcija s polimerazo (ang. polymerase chain reaction – PCR) je metoda za hitro pomnoževanje DNA *in vitro*. Reverzna transkriptaza je encim, ki zaporedje mRNA prepiše v komplementaren zapis DNA – cDNA (ang. complementary DNA). Za ta namen smo uporabili cDNA komplet za obratno prepisovanje (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, ZDA). Komplet vsebuje začetne oligonukleotide, ki se vežejo naključno na več mestih na RNA in nam omogočijo pomnoževanje vseh v vzorcu prisotnih RNA molekul. Za kontrolo smo izolirali tudi mRNA klena, ki izloča mAb proti GAPDH

(gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza). Ta mAb so specifična za Ag GAPDH, zato smo pričakovali, da bo njihovo nukleotidno zaporedje drugačno od nukleotidnega zaporedja mAb, ki so specifična za Ag virusov H5N1 in H5N2.

Po navodilih proizvajalca Applied Biosystems, High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, ZDA) smo najprej pripravili izhodiščno zmes (2X RT master mix) na ledu. Za vsako reakcijo smo dodali 2 µl pufra (10X RT Buffer), 0,8 µl zmesi deoksiribonukleozidtrifosfatov (dNTP-jev) (25X dNTP Mix (100 mM)), 2 µl zmesi začetnih oligonukleotidov (10X RT Random Primers), 1 µl encima reverzne transkriptaze (MultiScribe™ Reverse Transcriptase), 1 µl inhibitorja RNaz (RNase Inhibitor) in 3,2 µl dH₂O. Na ledu smo vse sestavine dobro premešali in za vsako reakcijo odpipetirali 10 µl v vdolbinico na plošči. V vdolbinico smo dodali 10 µl posamezne izolirane mRNA (0,1 µg/µl) (točka 3.4.1) vsakega klena in mRNA kontrole GAPDH. V napravi za PCR (2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems, ZDA) smo nastavili sledeči program pomnoževanja: 1. stopnja: 95 °C, 3 min; 2. stopnja, 30 ciklov: 94 °C, 45 sekund; 60 °C, 45 sekund; 72 °C, 45 sekund; 3. stopnja: 72 °C, 7 min.

Za nadaljnjo pomnoževanje sintetiziranih cDNA posameznih klonov smo ponovno pripravili PCR reakcijo. Želeli smo pomnožiti V_H IgG vseh izbranih klonov. Uporabili smo dva začetna oligonukleotida (GE Healthcare, Anglija), ki sta bila komplementarna vsak enemu koncu odseka V_H IgG.

Najprej smo pripravili izhodiščno zmes na ledu. Za vsako reakcijo smo dodali 2 µl 10X reakcijskega pufra, 2 µl 25 mM MgCl₂, 2 µl 2 mM dNTP-jev, 0,4 µl začetnega oligonukleotida 1 (Heavy Primer 1) (10 pmol/µl) (Mouse ScFv Module, GE Healthcare, Anglija), 0,4 µl začetnega oligonukleotida 2 (Heavy Primer 2) (10 pmol/µl) (Mouse ScFv Module, GE Healthcare, Anglija), 0,16 µl encima Taq DNA Polymerase, #EP0402 (5 U/µl) (Fermentas, ZDA) in 11,04 µl dH₂O. Na ledu smo vse sestavine dobro premešali in za vsako reakcijo odpipetirali 18 µl v vdolbinico na plošči. V vdolbinico smo dodali 2 µl posamezne sintetizirane cDNA vsakega klena in cDNA kontrole GAPDH. V napravi za PCR (2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems, ZDA) smo nastavili sledeči program

pomnoževanja: 1. stopnja: 95 °C, 3 min; 2. stopnja, 30 ciklov: 94 °C, 45 sekund; 55 °C, 1 min; 72 °C, 1 min; 3. stopnja: 72 °C, 7 min.

3.4.3 Analiza produktov PCR z agarozno elektroforezo

Pomnoženo cDNA posameznih klonov smo ločili z agarozno elektroforezo. Z barvanjem gela smo direktno zaznali cDNA in določili položaj ter velikost odsekov.

Pripravili smo 1,5 % agarozni gel z dodatkom etidijevega bromida. Na prvo stezo gela smo nanesli 6 µl molekularnega označevalca s štirinajstimi odseki DNA (velikost v baznih parih - bp): 3000 bp, 2000 bp, 1500 bp, 1200 bp, 1000 bp, 900 bp, 800 bp, 700 bp, 600 bp, 500 bp, 400 bp, 300 bp, 200 bp in 100 bp (Fermentas, GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder, SM0323). Na drugo stezo gela smo nanesli kontrolo, klon GAPDH. Na tretjo stezo gela smo nanesli klon 1C2C3, na četrto stezo klon 2F4B6 in na peto stezo klon 4H2B4. Vzorcem smo dodali nanašalni pufer v razmerju 4:1 (12 µl vzorca in 3 µl nanašalnega pufra). Na stezo smo nanašali 15 µl vzorca.

Z agarozno elektroforezo smo ločevali cDNA pri 100 V, 30 min.

3.4.4 Določitev nukleotidnega zaporedja variabilne regije težke verige IgG

Ločenim odsekom cDNA ustreznih velikosti na agaroznem gelu smo želeli določiti nukleotidno zaporedje. Odseke cDNA smo morali sprva izrezati iz gela in jih očistiti ter tako pripraviti za določevanje nukleotidnega zaporedja V_H IgG.

Za čiščenje odsekov cDNA posameznih klonov iz izrezanega gela smo uporabili komplet za čiščenje PCR produktov (High Pure PCR Product Purification Kit, Roche, Švica). S čiščenjem DNA smo odstranili nevezane dNTP-je, začetne oligonukleotide, soli in encim polimerazo.

V skladu z navodili Roche, High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Švica) smo najprej iz agaroznega gela izrezali željene odseke cDNA ter jih prenesli v

mikrocentrifugirke. Izrezane odseke smo stehiali. Izbranim trem klonom 1C2C3, 2F4B6 in 4H2B4 smo za 100 mg mase gela odseka dodali 300 µl vezalnega pufra. Masa gela odseka GAPDH je bila 200 mg, zato smo mu dodali 600 µl vezalnega pufra. Agarozni gel smo raztopili tako, da smo ga v vezalnem pufru inkubirali 10 min na 56 °C in medtem močno stresali z vibracijskim mešalnikom. Ko se je agarozni gel popolnoma raztopil in se je DNA posameznih klonov iz njega sprostila, smo trem izbranim klonom dodali 150 µl, klonu GAPDH pa 300 µl izopropanola ter močno stresali na vibracijskem mešalniku. Premešan vzorec smo prenesli na kolone za čiščenje (High Pure Filter Tube, Roche, Švica). Čistili smo z dodatkom 500 µl pufra za spiranje in z 1 min centrifugiranjem pri 13000xg. Postopek smo ponovili. DNA je med spiranjem ostala vezana na filtru na koloni. Nazadnje smo z dodatkom 30 µl elucijskega pufra, v mikrocentrifugirko ločeno zbrali očiščeno DNA izbranih klonov in kontrole. Očiščene odseke cDNA smo tako pripravili za določitev nukleotidnega zaporedja.

Pripravili smo PCR reakcijo za določevanje nukleotidnega zaporedja V_H IgG. Za vsak klon smo pripravili dve reakcijski mešanici tako, da smo enkrat dodali začetni oligonukleotid 1 (Heavy Primer 1) (10 pmol/µl) (Mouse ScFv Module, GE Healthcare, Anglija) in drugič začetni oligonukleotid 2 (Heavy Primer 2) (10 pmol/µl) (Mouse ScFv Module, GE Healthcare, Anglija). Vsak od začetnih nukleotidov je bil komplementaren enemu koncu odseka V_H IgG. V vdolbinico na plošči smo za vsako reakcijsko mešanico odpipetirali 2 µl 5X reakcijskega pufra, 5 µl očiščene cDNA posameznega klena, 0,5 µl začetnega oligonukleotida (Heavy Primer 1 ali Heavy Primer 2) (10 pmol/µl) (Mouse ScFv Module, GE Healthcare, Anglija), 0,8 µl obarvanih dNTP-jev s polimerazo (BigDye® terminator, Applied Biosystems, ZDA) in 1,7 µl dH₂O. Preostanek očiščene cDNA posameznih klonov smo shranili na -20 °C. Tako pripravljene PCR mešanice smo vstavili v napravo za določevanje nukleotidnega zaporedja (3130xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems, ZDA).

4 REZULTATI

4.1 PREVERJANJE PRISOTNOSTI SPECIFIČNIH PROTITELES V SUPERNATANTIH HIBRIDOMOV

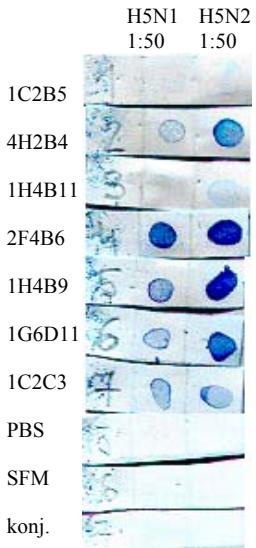
Po fuziji vraničnih celic miši BALB/c z mielomskimi celicami linije NS-1 je nastalo 426 klonov hibridomov. Po testiranju hibridomov s presejalno metodo ELISA in ob upoštevanju reakcij na vseh Ag in kontrolah je bilo odbranih 30 klonov.

Izmed 30 klonov smo izbrali 7 klonov, ki so po ponovnem testiranju z metodo ELISA imeli najmočnejšo reakcijo na bodisi samo Ag virusa H5N1 oziroma samo na Ag virusa H5N2 ali pa so reagirali z obema Ag hkrati in obenem niso reagirali z alantoinsko tekočino. Le-te smo v nadaljevanju preverili še z drugimi testi.

Z zbranimi supernatanti sedmih klonov hibridomov 1G6D11, 1H4B9, 2F4B6, 1C2C3, 1C2B5, 4H2B4, 4H2B4 in 1H4B11 smo izvedli iDIBA test. V supernatantih hibridomov smo želeli preveriti prisotnost in aktivnost specifičnih Ab proti Ag virusov H5N1 in H5N2. Rezultat smo ocenili subjektivno na podlagi intenzitete modrega obarvanja z oznakami prikazanimi v legendi k sliki 6.

Slika 6 in legenda k sliki 6 prikazujeta rezultate testa.

Legenda k sliki 6:



vzorec	H5N1 1:50	H5N2 1:50
1C2B5	(+)	(+)
4H2B4	++	+++
1H4B11	-	+
2F4B6	+++	+++
1H4B9	++	+++
1G6D11	++	+++
1C2C3	++	++
PBS	-	-
SFM	-	-
konj.	-	-

Opomba: +++ = zelo močna reakcija
 ++ = močna reakcija
 + = manj močna reakcija
 (+) = šibka reakcija
 - = negativna reakcija

Slika 6 (levo): Preverjanje prisotnosti specifičnih mAb proti Ag virusov H5N1 in H5N2 v supernatantih hibridomov.

Posamezni trakovi so bili inkubirani v navedenih (vodoravno) supernatantih hibridomov in negativnih kontrolah. PBS = fosfatni pufer s pH 7,2. SFM = medij brez seruma (Hyclone, ZDA). Konj. = oznaka za konjugat (sekundarna kunčja Ab proti mišjim IgG konjugirana s peroksidazo (Sigma A9044, ZDA). Ag virusov H5N1 in H5N2 sta bila redčena s pufrom PBS pH 7,2 v razmerju 1:50 in sta bila nanesena na drugi in tretji kvadratki membrane takoj za oznako (številka v prvem stolpcu).

Na osnovi intenzitete reakcije in navzkrižne reaktivnosti z obema Ag, smo posamezne klone oziroma posamezna mAb razdelili v tri skupine (slika 6 in legenda k sliki 6):

- 1. skupino predstavlja mAb, ki zelo močno reagirajo s H5N2 in nekoliko manj intenzivno s H5N1: mAb 4H2B4, 1H4B9 ter 1G6D11.
- 2. skupino predstavlja mAb, ki reagirajo z obema Ag enako, a vendar vsaka podskupina z drugačno intenziteto:
 - 2a skupina: mAb 2F4B6 reagirajo zelo močno z obema Ag.
 - 2b skupina: mAb 1C2C3 reagirajo močno, a manj intenzivno z obema Ag.
 - 2c skupina: mAb 1C2B5 šibko reagirajo z obema Ag.
- 3. skupino predstavlja mAb, ki reagirajo le z Ag H5N2: mAb 1H4B11.

S sekundarnimi kunčjimi Ab proti mišjim IgG (Sigma A9044, ZDA) smo v supernatantih hibridomov preverjali prisotnost le Ab razreda G (IgG). Iz dobljenih rezultatov lahko

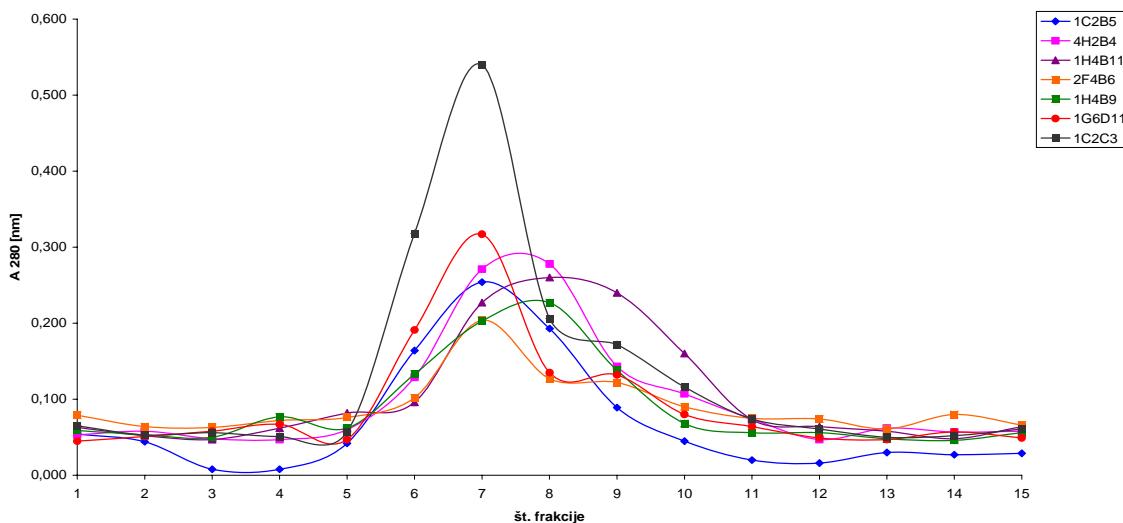
sklepamo, da so le-ta prisotna. Iz dobljenih rezultatov negativnih kontrol pa lahko zaključimo, da je bila vezava mAb v supernatantih izbranih hibridomov na Ag virusov H5N1 in H5N2 specifična.

4.2 IZOLACIJA mAb IN PREVERJANJE AKTIVNOSTI IZOLIRANIH mAb

Z metodo iDIBA in ELISA smo dokazali, da kloni hibridomov 1G6D11, 1H4B9, 2F4B6, 1C2C3, 1C2B5, 4H2B4 in 1H4B11 izločajo IgG, ki specifično prepoznavajo Ag virusov H5N1 in H5N2. Da bi ta Ab nadalje opisali, smo le-ta iz posameznih supernatantov predhodno oborili z nasičenim amonijevim sulfatom in jih izolirali ter ustrezeno očistili z gelsko kromatografijo z ločevanjem po velikosti. Z gelsko kromatografijo smo zbirali frakcije posameznih klonov po 3 ml in v njih preverili aktivnost ter vsebnost IgG.

Vsebnost IgG smo določili z uporabo spektrofotometra (Shimadzu UV-160A, Japonska), z merjenjem absorbance pri valovni dolžini 280 nm.

Rezultati merjenja absorbance so grafično predstavljeni na sliki 7, vrednosti izmerjenih absorbanc pa v preglednici 6.



Slika 7: Merjenje absorbance v frakcijah posameznih klonov hibridomov.

Na abscisni osi so nanizane frakcije posameznih klonov hibridomov (oznake desno zgoraj) in njim pripadajoče absorbance pri 280 nm na ordinatni osi.

Iz izmerjenih absorbanc pri 280 nm smo izračunali koncentracijo mAb IgG v posamezni frakciji klonov (formula (1), točka 3.2).

V preglednici 6 so predstavljeni izračuni koncentracij.

Preglednica 6: Določitev vsebnosti IgG v frakcijah posameznih klonov hibridomov.

št. frakcije	1C2B5		4H2B4		1H4B11		2F4B6		1H4B9		1G6D11		1C2C3	
	A 280 nm	c [mg/ml]	A 280 nm	c [mg/ml]	A 280 nm	c [mg/ml]	A 280 nm	c [mg/ml]						
1	0,054	0,040	0,053	0,039	0,063	0,047	0,079	0,059	0,059	0,044	0,045	0,033	0,065	0,048
2	0,044	0,033	0,058	0,043	0,052	0,039	0,064	0,047	0,053	0,039	0,051	0,038	0,053	0,039
3	0,008	0,006	0,048	0,036	0,047	0,035	0,063	0,047	0,050	0,037	0,058	0,043	0,056	0,041
4	0,008	0,006	0,047	0,035	0,062	0,046	0,072	0,053	0,077	0,057	0,067	0,050	0,051	0,038
5	0,042	0,031	0,060	0,044	0,082	0,061	0,076	0,056	0,062	0,046	0,047	0,035	0,057	0,042
6	0,164	0,121	0,129	0,096	0,096	0,071	0,102	0,076	0,133	0,099	0,191	0,141	0,318	0,236
7	0,254	0,188	0,271	0,201	0,227	0,168	0,204	0,151	0,203	0,150	0,317	0,235	0,540	0,400
8	0,193	0,143	0,278	0,206	0,260	0,193	0,127	0,094	0,227	0,168	0,135	0,100	0,206	0,153
9	0,089	0,066	0,143	0,106	0,240	0,178	0,122	0,090	0,138	0,102	0,132	0,098	0,172	0,127
10	0,045	0,033	0,107	0,079	0,160	0,119	0,090	0,067	0,068	0,050	0,080	0,059	0,116	0,086
11	0,020	0,015	0,074	0,055	0,073	0,054	0,075	0,056	0,056	0,041	0,064	0,047	0,074	0,055
12	0,016	0,012	0,047	0,035	0,064	0,047	0,074	0,055	0,056	0,041	0,049	0,036	0,061	0,045
13	0,030	0,022	0,062	0,046	0,058	0,043	0,061	0,045	0,048	0,036	0,047	0,035	0,05	0,037
14	0,027	0,020	0,057	0,042	0,048	0,036	0,080	0,059	0,046	0,034	0,057	0,042	0,052	0,039
15	0,029	0,021	0,058	0,043	0,064	0,047	0,066	0,049	0,056	0,041	0,049	0,036	0,061	0,045

Frakcije posameznega klena, kjer smo določili največjo vsebnost IgG (preglednica 6, poudarjene vsebnosti), smo združili in skoncentrirali z ultrafiltracijo (Amicon® Ultra-4, Millipore, ZDA). Glede na izhodiščno koncentracijo posameznih izhodnih supernatantov (v 30 ml) smo vsak posamezen vzorec koncentrirali v razmerju 1:10. Koncentriranim vzorcem (v razmerju 1:10) smo določili vsebnost IgG.

Z iDIBA testom smo ponovno preverili prisotnost in aktivnost specifičnih IgG proti Ag virusov H5N1 in H5N2, celoten postopek in razredčine Ag so bile enake kot v točki 4.1. Koncentrirani vzorci so bili redčeni s pufom PBS pH 7,2 v razmerju 1:10. S ponovnim redčenjem smo dosegli enako koncentracijo, kot je bila izhodiščna koncentracija v posameznem izhodnem supernatantu (v 30 ml).

Slika 8 in legenda k sliki 8 povzemata rezultate iDIBA testa.

Legenda k sliki 8

	H5N1 1:50	H5N2 1:50	vzorec redčen 1:10	H5N1 1:50	H5N2 1:50	c IgG [mg/ml] koncentriran 1:10
1C2B5			1C2B5	++	+++	0,352
4H2B4			4H2B4	-	(+)	0,471
1H4B11			1H4B11	-	(+)	0,467
2F4B6			2F4B6	+++	(+)	0,231
1H4B9			1H4B9	++	+++	0,350
1G6D11			1G6D11	++	+++	0,425
1C2C3			1C2C3	++	+++	0,879

Opomba: +++ = zelo močna reakcija
 ++ = močna reakcija
 + = manj močna reakcija
 (+) = šibka reakcija
 - = negativna reakcija

Slika 8 (levo): Preverjanje prisotnosti specifičnih IgG proti Ag virusov H5N1 in H5N2 v skoncentriranih vzorcih klonov.

Posamezni trakovi so bili inkubirani v navedenih (vodoravno) izoliranih in koncentriranih vzorcih klonov (redčenih s pufrom PBS pH 7,2 v razmerju 1:10). Ag virusov H5N1 in H5N2 sta bila redčena s pufrom PBS pH 7,2 v razmerju 1:50 in sta bila nanesena na drugi in tretji kvadratek membrane takoj za oznako (številka v prvem stolpcu). Koncentracija IgG je bila pomerjena v koncentriranem vzorcu (1:10).

Na osnovi intenzitete reakcije in navzkrižne reaktivnosti z obema Ag, smo posamezna skoncentrirana IgG ponovno razdelili v tri skupine (slika 8 in legenda k sliki 8):

- 1. skupino predstavlja IgG, ki zelo močno reagirajo s H5N2 in nekoliko manj intenzivno s H5N1: IgG 1C2B5, 1H4B9, 1G6D11 in 1C2C3.
- 2. skupina ima drugačne lastnosti kot v točki 4.1 (slika 6 in legenda k sliki 6), predstavlja IgG, ki zelo močno reagirajo s H5N1 in šibko s H5N2: IgG 2F4B6.
- 3. skupino predstavlja IgG, ki reagirajo le z Ag H5N2: mAb 4H2B4, 1H4B11.

Vsebnosti in aktivnosti IgG v posamezni in v združenih frakcijah so predstavljene v preglednici 7.

Preglednica 7: Določitev vsebnosti in aktivnosti specifičnih IgG v skoncentriranih vzorcih klonov.

vzorec	rezultati testiranj					
1C2B5	zdržene frakcije	6	7	8	/	
	A 280 nm v posamezni frakciji	0,164	0,254	0,193		
	c IgG [mg/mL] v posamezni frakciji	0,121	0,188	0,143		
	A 280 nm koncentriranega vzorca	0,475				
	c IgG [mg/mL] koncentriranega vzorca (1:10)	0,352				
	iDIBA koncentriranega vzorca (redčen 1:10)	H5N1 1:50	++			
		H5N2 1:50	+++			
4H2B4	zdržene frakcije	6	7	8	/	
	A 280 nm v posamezni frakciji	0,129	0,271	0,278		
	c IgG [mg/mL] v posamezni frakciji	0,096	0,201	0,206		
	A 280 nm koncentriranega vzorca	0,636				
	c IgG [mg/mL] koncentriranega vzorca (1:10)	0,471				
	iDIBA koncentriranega vzorca (redčen 1:10)	H5N1 1:50	-			
		H5N2 1:50	(+)			
1H4B11	zdržene frakcije	7	8	9	/	
	A 280 nm v posamezni frakciji	0,227	0,260	0,240		
	c IgG [mg/mL] v posamezni frakciji	0,168	0,193	0,178		
	A 280 nm koncentriranega vzorca	0,630				
	c IgG [mg/mL] koncentriranega vzorca (1:10)	0,467				
	iDIBA koncentriranega vzorca (redčen 1:10)	H5N1 1:50	-			
		H5N2 1:50	(+)			
2F4B6	zdržene frakcije	6	7	8	/	
	A 280 nm v posamezni frakciji	0,102	0,204	0,127		
	c IgG [mg/mL] v posamezni frakciji	0,076	0,151	0,094		
	A 280 nm koncentriranega vzorca	0,312				
	c IgG [mg/mL] koncentriranega vzorca (1:10)	0,231				
	iDIBA koncentriranega vzorca (redčen 1:10)	H5N1 1:50	+++			
		H5N2 1:50	(+)			
1H4B9	zdržene frakcije	6	7	8	/	
	A 280 nm v posamezni frakciji	0,133	0,203	0,227		
	c IgG [mg/mL] v posamezni frakciji	0,099	0,150	0,168		
	A 280 nm koncentriranega vzorca	0,473				
	c IgG [mg/mL] koncentriranega vzorca (1:10)	0,350				
	iDIBA koncentriranega vzorca (redčen 1:10)	H5N1 1:50	++			
		H5N2 1:50	+++			
1G6D11	zdržene frakcije	6	7	8	/	
	A 280 nm v posamezni frakciji	0,191	0,317	0,135		
	c IgG [mg/mL] v posamezni frakciji	0,141	0,235	0,100		
	A 280 nm koncentriranega vzorca	0,574				
	c IgG [mg/mL] koncentriranega vzorca (1:10)	0,425				
	iDIBA koncentriranega vzorca (redčen 1:10)	H5N1 1:50	++			
		H5N2 1:50	+++			
1C2C3	zdržene frakcije	6	7	8	10	
	A 280 nm v posamezni frakciji	0,318	0,540	0,206		
	c IgG [mg/mL] v posamezni frakciji	0,236	0,400	0,153		
	A 280 nm koncentriranega vzorca	1,187				
	c IgG [mg/mL] koncentriranega vzorca (1:10)	0,879				
	iDIBA koncentriranega vzorca (redčen 1:10)	H5N1 1:50	++			
		H5N2 1:50	+++			

Pri izolaciji vsakega posameznega vzorca z gelsko kromatografijo smo največje vsebnosti IgG (c IgG v mg/ml) zaznali od šeste do desete frakcije. Najvišjo koncentracijo IgG smo

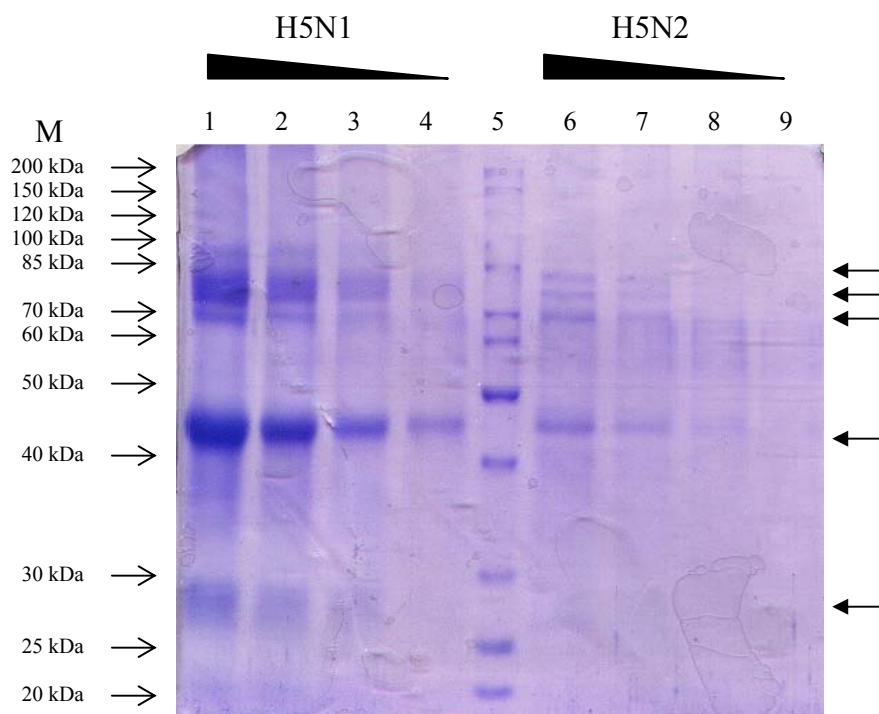
določili pri klonu 1C2C3, po koncentriranju vzorca (1:10) je le-ta znašala 0,879 mg/ml, po koncentriranju vzorcev (1:10) so bile koncentracije klonov sledeče: 4H2B4 (0,471 mg/ml), 1H4B11 (0,467 mg/ml), 1G6D11 (0,425 mg/ml), 1C2B5 (0,352 mg/ml) in 1H4B9 (0,350 mg/ml) (preglednica 6). Najnižjo koncentracijo 0,231 mg/ml smo po koncentriranju (1:10) določili pri klonu 2F4B6 (preglednica 7).

Ugotovimo lahko, da se kloni mAb med seboj razlikujejo, po reakciji z Ag in tudi po količini sintetiziranih Ab.

4.3 REAKCIJE mAb Z VIRUSNIMI PROTEINI H5N1 IN H5N2

Da bi ocenili in določili optimalno koncentracijo ter si ogledali proteinski profil virusov H5N1 in H5N2, smo na poliakrilamidni gel najprej nanesli različne razredčine obeh virusov.

Na sliki 9 je prikazan proteinski profil obeh virusovobarvan z barvilm Coomassie Brilliant Blue (Sigma B0149, ZDA).



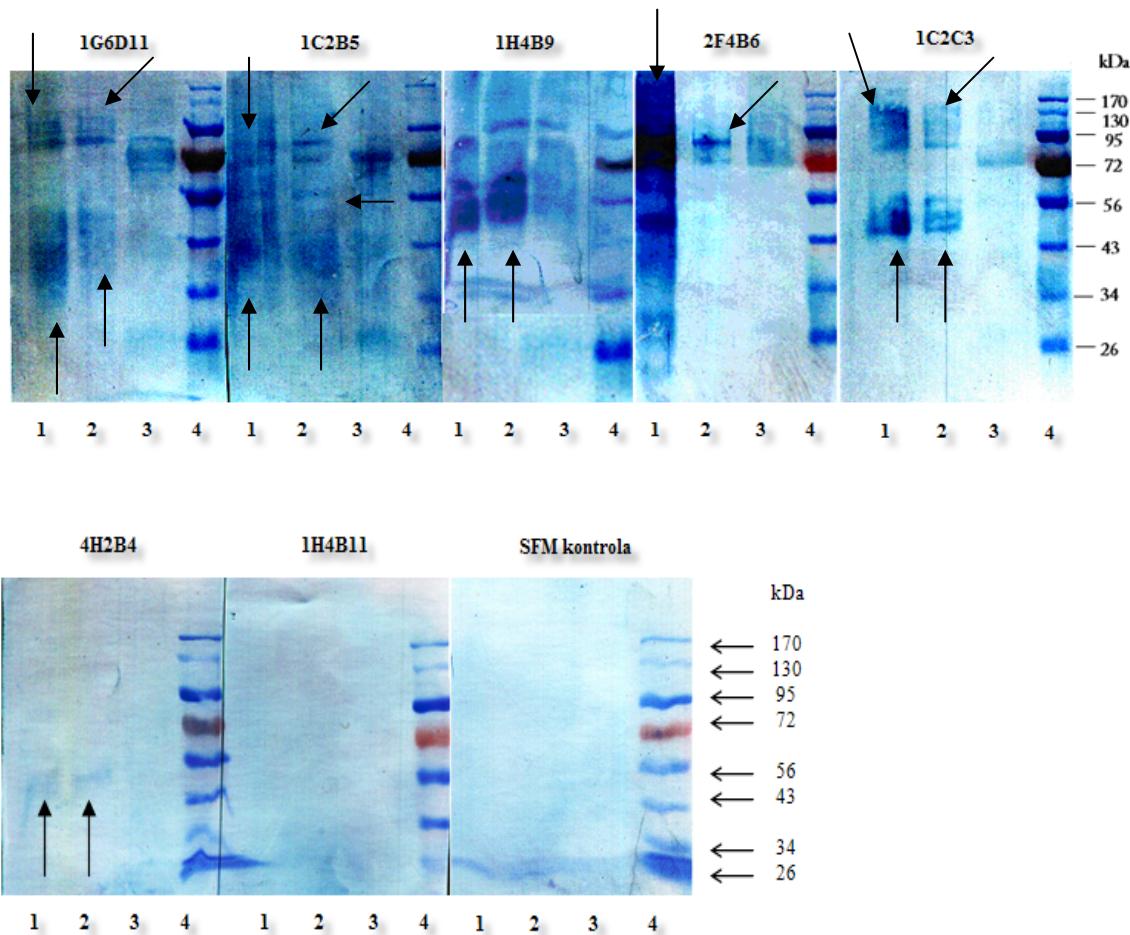
Slika 9: Proteinski profil virusov H5N1 in H5N2.

Steza 1: H5N1 nerazredčen, steza 2: H5N1 redčitev 1:2, steza 3: H5N1 redčitev 1:4, steza 4: H5N1 redčitev 1:8, steza 5: molekularni označevalec (Fermentas, Unstained Protein Ladder, SM0661) z molekulskimi masami na gelu od 200 kDa do 20 kDa (oznake levo ob gelu), steza 6: H5N2 redčitev 1:20, steza 7: H5N2 redčitev 1:40, steza 8: H5N2 redčitev 1:80, steza 9: H5N2 redčitev 1:160. M = molekularni označevalec. Puščice na desni označujejo proteinske lise virusov H5N1 in H5N2. Gel je bil obarvan z barvilm Coomassie Brilliant Blue (Sigma B0149, ZDA).

Pri virusu H5N1 smo določili proteinske lise velikosti \sim 100 kDa, \sim 80 kDa, \sim 70 kDa, \sim 45 kDa in \sim 28 kDa (slika 9, puščice desno). Pri virusu H5N2 smo določili proteinske lise velikosti \sim 84 kDa, \sim 80 kDa, \sim 70 kDa in \sim 45 kDa (slika 9, puščice desno). Intenziteta obarvanih proteinskih lis pri virusih H5N1 in H5N2 (slika 9) skladno pada z naraščajočimi razredčinami nanesenih virusov. Število proteinov H5N1 in H5N2 vidnih na gelu, se razlikuje. Pri virusu H5N2 nismo zaznali proteinske lise velikosti \sim 28 kDa. Zaradi različne kvalitete virusnih izolatov, smo uporabili različne koncentracije omenjenih virusov za nadaljnja testiranja. Za ločena testiranja z izoliranimi mAb, smo virus H5N1 uporabili redčenega v razmerju 1:3, H5N2 pa v manjši koncentraciji oziroma redčenega v razmerju 1:50. Želeli smo, da bo njihova intenziteta na gelu primerljiva.

Želeli smo določiti, katere proteine virusov H5N1 in H5N2 prepoznavajo naša izolirana Ab. Z SDS-PAGE elektroforezo smo ločili proteine virusov po velikosti ter jih s prenosom western prenesli na membrano in izvedli ločene encimskoimunske reakcije s sedmimi kloni izoliranih mAb.

Slike 10 in 11 predstavljata encimskoimunski test mAb s proteini virusov H5N1 in H5N2.



Sliki 10 (zgoraj) in 11 (spodaj): Encimskoimunski test izoliranih mAb z ločenimi virusnimi proteini H5N1 in H5N2.

Steza 1: H5N1 redčitev 1:3, steza 2: H5N2 redčitev 1:50, steza 3: alantoisna tekočina, steza 4: molekularni označevalec (Fermentas, Prestained Protein Ladder, SM0671) z molekulskimi masami na membrani od 170 kDa do 26 kDa (oznake desno ob membrani). Posamezni trakovi membrane z enakimi nanosi, so bili inkubirani v navedenih izoliranih klonih mAb in negativni kontroli - mediju brez seruma (SFM) (Hyclone, ZDA). Puščice na sliki označujejo encimskoimunske reakcije mAb posameznih klonov z virusnimi proteini H5N1 in H5N2.

V preglednici 8 smo ovrednotili rezultate iz slike 10 in 11.

Preglednica 8: Reakcije mAb z virusnimi proteini H5N1 in H5N2.

mAb	H5N1		H5N2		alantoinsna tekočina	
	reakcije s proteini velikosti [kDa]	predvideni virusni proteini*	reakcije s proteini velikosti [kDa]	predvideni virusni proteini*		
1G6D11	~100	PB1	~100	PB1	~72	
	~80	HA0	~80	HA0		
	~50	HA1	od ~50 do ~45			
	~28	HA2, M1	HA1			
1C2B5	~80	HA0	~80	HA0	~72	
	~60	NP, NA	~60	NP, NA		
	~45	HA1	~45	HA1		
1H4B9	~60	NP, NA	~60	NP, NA	~72, ~95	
	~45	HA1	~45	HA1		
2F4B6	Močno s celotnim proteinskim profilom	PB1, PB2, PA, HA0, NP, NA, HA1, HA2, M1, NS1, NS2, M2	~80	HA0	~72	
1C2C3	od ~130 do ~80	PB1,PB2,PA,HA0	od ~130 do ~80	PB1,PB2,PA,HA0	~72	
	~56	NA	~56	NA		
	~45	HA1	~45	HA1		
4H2B4	~45	HA1	~45	HA1	-	
1H4B11	-	-	-	-	-	
SFM (kontrola)	-	-	-	-	-	

* Predpostavili smo s katerimi virusnimi proteini reagirajo navedena mAb, na podlagi velikosti virusnih proteinov navedenih v preglednici 3 (točka 2.2.1).

~ = pomeni, da smo molekulske mase ocenili iz slik 10 in 11.

Ugotovili smo, da kloni mAb reagirajo z virusnimi proteini različnih velikosti (sliki 10 in 11). Te velikosti virusnih proteinov smo primerjali z velikostmi virusnih proteinov navedenih v preglednici 3 (točka 2.2.1). Na podlagi specifičnih reakcij smo predpostavili, s katerimi virusnimi proteini H5N1 in H5N2 najverjetneje reagirajo posamezna mAb (preglednica 8). Posamezen klon mAb 1C2B5, 1H4B9, 1C2C3 in 4H2B4 je navzkrižno reagiral z enakimi proteini obeh virusov, H5N1 in H5N2. mAb 2F4B6 so zelo močno reagirala s celotnim proteinskim profilom virusa H5N1 in le z enim proteinom H5N2. mAb 1G6D11 so prav tako reagirala z več proteini virusa H5N1 kot z virusom H5N2. mAb 1H4B11 pa niso reagirala ne s proteini virusa H5N1 in ne s proteini virusa H5N2.

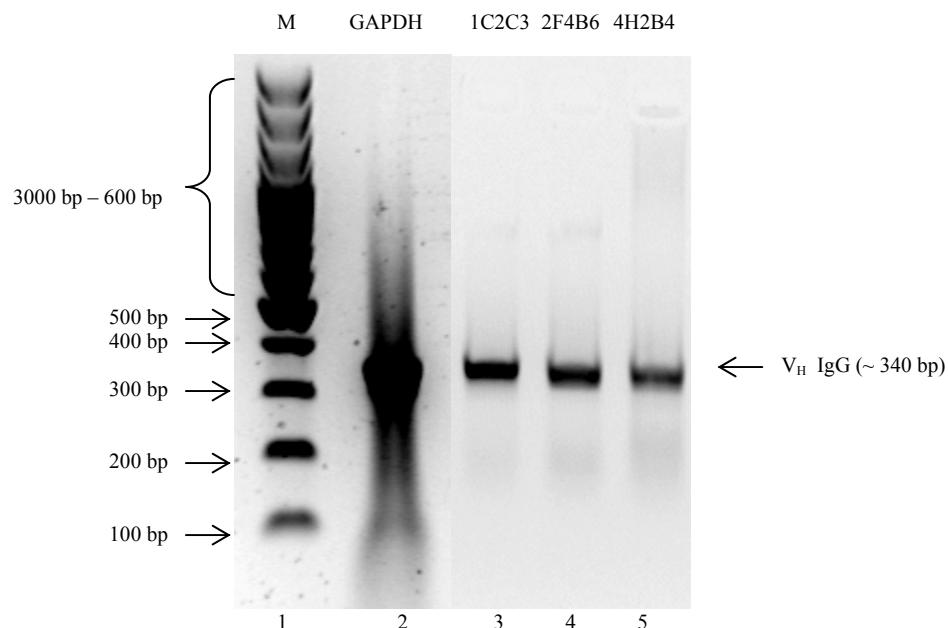
Opazili smo, da skoraj vsa mAb (razen mAb 4H2B4 in 1H4B11) navzkrižno reagirajo s proteinom alantoisne tekočine velikosti ~ 72 kDa (slika 10). mAb 1H4B9 so navzkrižno reagirala tudi s proteinom alantoisne tekočine velikosti ~ 95 kDa (slika 10, 1H4B9). Reakcije, ki so se pojavile tako pri H5N1, H5N2 in alantoisni tekočini, smo ocenili kot nespecifične reakcije. Z inkubacijo v mediju brez seruma smo potrdili, da le-ta ne vsebuje mAb (slika 11, SFM kontrola).

4.4 DOLOČITEV NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA VARIABILNE REGIJE TEŽKE VERIGE IgG

Ugotovili smo, da so mAb klonov hibridomov 1C2C3, 2F4B6 in 4H2B4 specifična za različne epitope virusov H5N1 ter H5N2. Da bi dobljena mAb bolj podrobno opisali, smo izolirali mRNA. Iz izolirane mRNA izbranih klonov smo z encimom reverzno transkriptazo sintetizirali cDNA. Pomnoženo cDNA smo ločili z agarozno elektroforezo. Z barvanjem gela smo direktno zaznali cDNA in določili položaj in velikost odsekov.

Za kontrolo smo izolirali tudi mRNA klona, ki izloča mAb proti GAPDH (gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza). Ta mAb so specifična za Ag GAPDH, zato smo pričakovali, da bo njihovo nukleotidno zaporedje drugačno od nukleotidnega zaporedja mAb, ki so specifična za Ag virusov H5N1 in H5N2.

Na sliki 12 so prikazani rezultati ločevanja odsekov cDNA na agaroznem gelu.



Slika 12: Analiza produktov PCR (cDNA) izbranih treh klonov hibridomov.

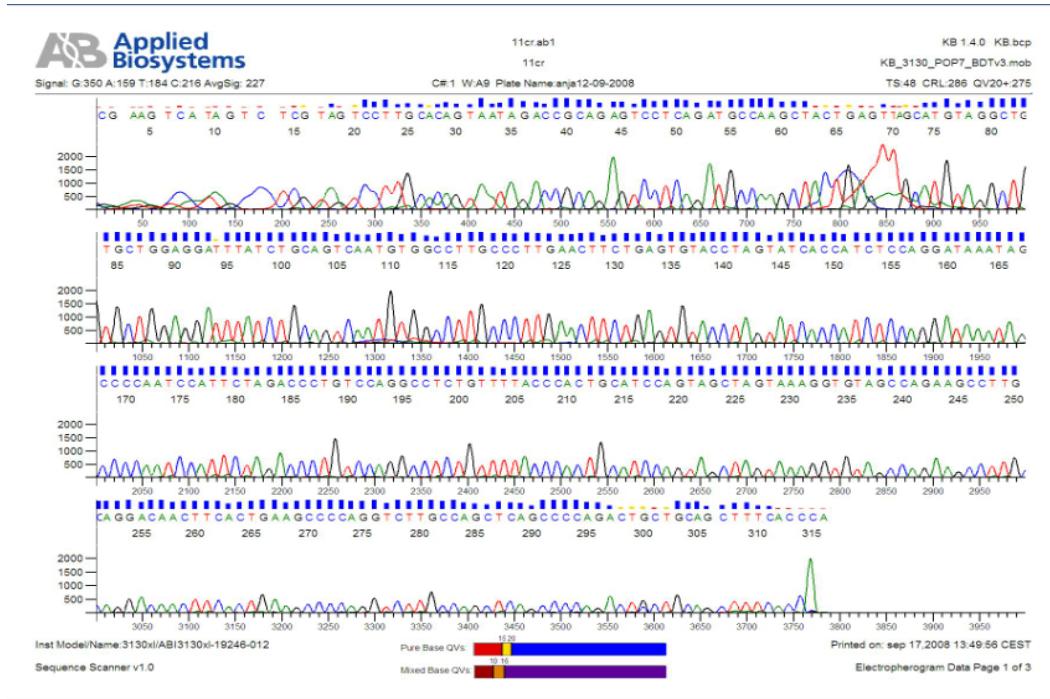
Steza 1: molekularni označevalec (M) (Fermentas, GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder, SM0323), velikosti v baznih parih (bp) na gelu od 3000 bp do 100 bp (oznake levo ob gelu), steza 2: kontrola – klon GAPDH, steza 3: klon 1C2C3, steza 4: klon 2F4B6, steza 5: klon 4H2B4. Puščica desno prikazuje V_H IgG velikosti ~ 340 bp pri izbranih klonih.

Puščica desno na sliki 12 prikazuje V_H IgG velikosti ~ 340 bp pri izbranih klonih. Najuspešneje smo pomnožili cDNA kontrolnega klona GAPDH v velikosti ~340 bp (slika 12, GAPDH). Odsek cDNA v velikosti ~ 340 bp smo opazili tudi pri izbranih klonih 1C2C3, 2F4B6 in 4H2B4 (slika 12, 1C2C3, 2F4B6 in 4H2B4). Iz dobljenih rezultatov na sliki 12 lahko sklepamo, da smo uspešno pomnožili V_H pri klonih 1C2C3, 2F4B6 in kontrolnem klonu GAPDH, medtem ko se je cDNA klona 4H2B4 pomnožila slabše (manj intenzivno obarvanje v primerjavi s cDNA klonov 1C2C3 in 2F4B6) (slika 12, 4H2B4).

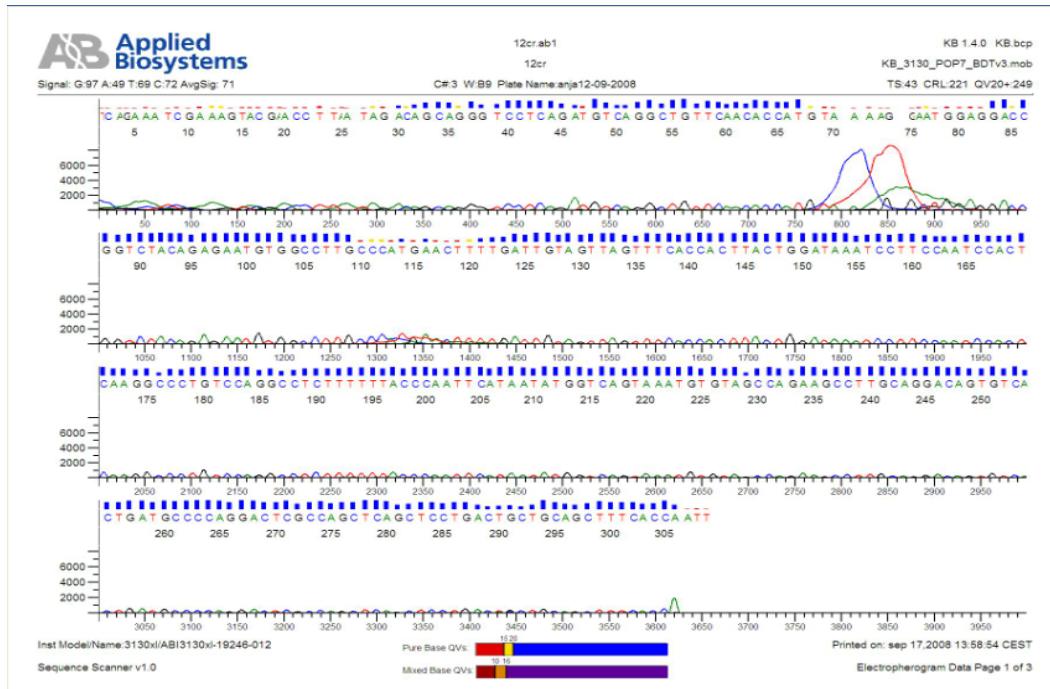
Odseke cDNA velikosti ~ 340 bp klonov 1C2C3, 2F4B6, 4H2B4 in kontrolnega klona GAPDH smo izrezali iz gela, očistili in pripravili za določitev nukleotidnega zaporedja, ki smo ga analizirali z napravo za določevanje nukleotidnega zaporedja (3130xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems, ZDA).

Slike 13, 14 in 15 prikazujejo kromatograme nukleotidnih zaporedij cDNA V_H IgG 1C2C3, 2F4B6 in kontrolnih mAb proti GAPDH.

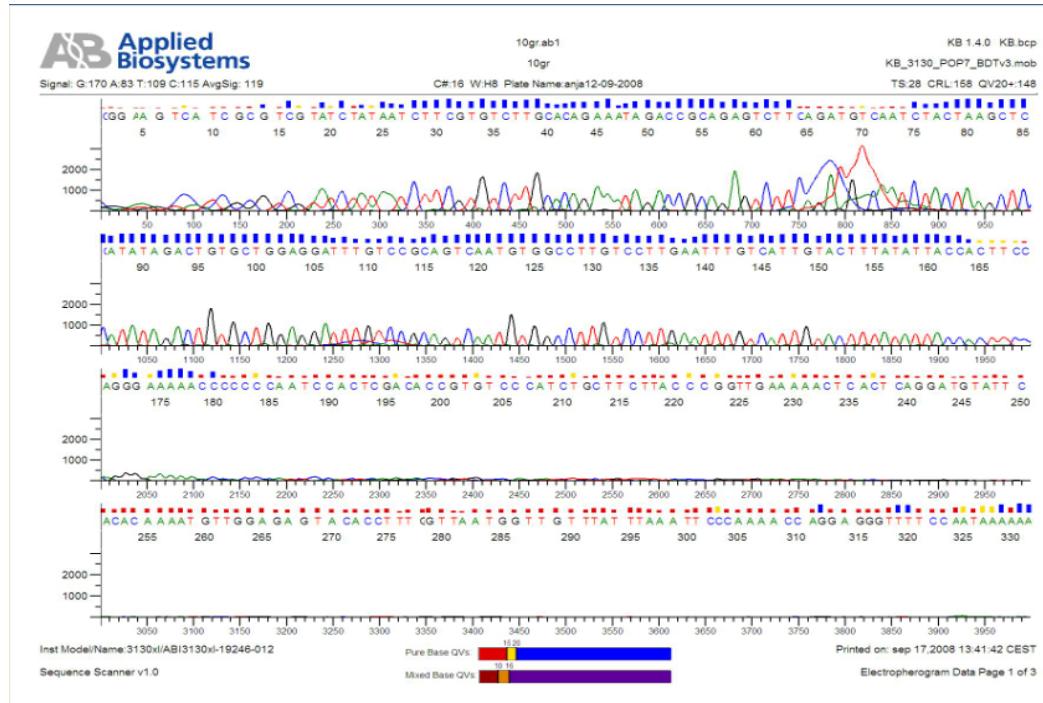
Čelesnik N. Priprava in delni opis monoklonskih protiteles proti virusu ptičje gripe H5N1.
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medodd. študija mikrobiologije, 2008



Slika 13: Kromatogram cDNA V_H IgG 1C2C3.



Slika 14: Kromatogram cDNA V_H IgG 2F4B6



Slika 15: Kromatogram cDNA VH kontrolnih mAb proti GAPDH.

Analiza nukleotidnega zaporedja pomnoženega odseka VH IgG klona 4H2B4 na napravi za določevanje nukleotidnega zaporedja ni uspela, zato smo pri nadaljnji obdelavi podatkov upoštevali le nukleotidna zaporedja VH IgG 1C2C3, 2F4B6 in kontrolnih mAb proti GAPDH (slika 13, 1C2C3, slika 14, 2F4B6 in slika 15, GAPDH).

Da bi primerjali podobnosti v nukleotidnem zaporedju cDNA izbranih klonov 1C2C3 in 2F4B6, smo jih s programom ClustalW2, dostopnim na podatkovni bazi EMBL – EBI, poravnali posebej med seboj in s kontrolnim klonom GAPDH.

Slika 16 prikazuje poravnavo nukleotidnih zaporedij VH IgG 1C2C3 in 2F4B6.

Slika 17 prikazuje poravnavo nukleotidnih zaporedij VH IgG 1C2C3 in kontrolnih mAb proti GAPDH.

1c2c3	--TGGGTGAAAGCTGCAGCAGTCTGGGCTGACGTGCCAAGACCTGGGCTTCAGTGAAG 58
2f4b6RC	AATTGGTGAAAGCTGCAGCAGTCAAGGAGCTGACGTCTGGCGAGTCCTGGGCATCAGTGACA 60 *****
1c2c3	TTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTACTAGCTACTGGATGCAGTGGGTAAAACAG 118
2f4b6RC	CTGTCTGCAAGGCTTCTGGCTACACATTACTGACCATAATTATGAATTGGTAAAAAAAG 120 *****
1c2c3	AGGCCCTGGACAGGGTCTAGAATGGATTGGGCTATTATCCTGGAGATGGTATACTAGG 178
2f4b6RC	AGGCCCTGGACAGGGCTTGTAGGGATTGGAGGATTATCCAGTAAGTGGTAAACTAAC 180 *****
1c2c3	TACACTCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGCAGATAATCCTCCAG-CACAGC 237
2f4b6RC	TACAATCAAAGTTCATGGCAAGGCCACATTCTCTGTAGACCGGTCCCTCATCTCTT 240 *****
1c2c3	CTACATGCAACTCAGTAGCTTGGCATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGGAC 297
2f4b6RC	GTACATGGTGTGAACGCCGACATCTGAGGACCCCTGCTGTCTATTAAAGGTC---- 294 *****
1c2c3	TACGAGGGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCTCAAAA 352
2f4b6RC	-----GTACTTTCGATTCTGA----- 311 * *** * * *

Slika 16: Poravnava nukleotidnih zaporedij V_H IgG 1C2C3 in 2F4B6.

* = označuje ohranjene regije v nukleotidnem zaporedju.

gapdh	-----GTGGGGAACCTGGG-CATCACTGA-GCT 27
1c2c3	TGGGTGAAAGCTGCAGCAGTCTGGGCTGAGCTGCCAAGACCTGGGCTTCAGTGAAGTT 60 *** * ***** * *** *** *
gapdh	GTCCTGCA--GCTCTGGCTACAC-TTCACTGAGTATATTATACACTGGTAAAGCAGAA 84
1c2c3	GTCCTGCAAGGCCCTCTGGCTACACTTACTAGCTACTGGATGCAGTGGTAAAACAGAG 120 *****
gapdh	GCTCTGGACAGGGCTTGTAGTTGGGGTTTCTGGAAAGTGGTAATATAAAGTA 144
1c2c3	GCTCTGGACAGGGCTTGTAGAATGGATGGGCTATTATCTGGAGATGGTATACTAGGTA 180 * *****
gapdh	CAATGACAATTCAAGGACAAGGCCACATTGACTCGGGACAATCTCCAGCACAGCTA 204
1c2c3	CACTCAGAAGTTCAAGGCCACATTGACTGCAGATAATCTCCAGCACAGCTA 240 *** * ***
gapdh	TATGGAGCTTAGATGAGATGACATCTGAAGACTCTCGGGCTATTCTGTGCAAGACAGA 264
1c2c3	CATGCAACTCAGTAGCTTGGCATCTGAGGACTCTCGGGCTATTACTGTGCAAG----- 294 *** * ***
gapdh	AGATTATAGATAACGCGCAAGGGACTACTGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGCTCTCTC 324
1c2c3	-GACTACGAGG----GCTATGGACTACTGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGCTCTCTC 348 *** *
gapdh	AA-- 326
1c2c3	AAAA 352 **

Slika 17: Poravnava nukleotidnih zaporedij V_H IgG 1C2C3 in kontrolnih mAb proti GAPDH.

* = označuje ohranjene regije v nukleotidnem zaporedju.

Iz slik 16 in 17 je razvidno, da so nukleotidna zaporedja klonov 1C2C3, 2F4B6 in kontrolnega klena GAPDH nekoliko različna. Primerjava nukleotidnih zaporedij vseh treh klonov kaže na nekoliko večjo podobnost v zaporedju cDNA V_H IgG klonov 1C2C3 in 2F4B6 (slika 16), medtem ko se zaporedje kontrolnega klena GAPDH pričakovano nekoliko bolj razlikuje od ostalih dveh (slika 17). Podobnosti so na sliki označene z *. Sklepamo, da to verjetno predstavlja območja ohranjene regije v V_H IgG. Na kratkih odsekih, kjer opazimo razlike v nukleotidnih zaporedjih, predvidevamo, da ta območja lahko predstavljajo hipervariabilne regije oziroma komplementarnost določajoče regije - CDR v variabilni regiji težke verige IgG.

Nukleotidnim zaporedjem smo s programom BLAST na podatkovni bazi NCBI poiskali najbolj podobna zaporedja. Nukleotidna zaporedja klonov 1C2C3, 2F4B6 in kontrolnega klena GAPDH so bila najbolj podobna mišemu genu V_H (podatki niso prikazani). Iz dobljenih rezultatov lahko zaključimo, da smo uspeli specifično pomnožiti V_H IgG 1C2C3 in 2F4B6, ki se razlikujeta med sabo tudi v nukleotidnem zaporedju, ki ju kodira.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Visoko patogeni virus podtipa H5N1 povzroča AI, ki je v Aziji povzročila veliko ekonomsko škodo. Iz azijske celine se je virus prenesel v Evropo in leta 2006 dosegel tudi našo državo. V Sloveniji smo okužbe s tem virusom zasledili le pri divjih vodnih pticah, največ pri labodu grbcu (*Cygnus olor*) (Salamon, 2007). mAb specifična za slovenski izolat virusa H5N1 bi lahko uporabili za diagnostiko okužb pri perutnini in ob ustreznih modifikacijih tudi kot zaščitna terapevtska sredstva za preprečevanje širjenja okužb z virusom H5N1 med perutnino v Sloveniji. Namen diplomske naloge je bil pridobiti mAb, specifična za različne epitope slovenskega izolata virusa HPAI H5N1, in jih vsaj delno opisati.

mAb smo pripravili s tehniko, ki sta jo razvila Köhler in Milstein leta 1975. Za pripravo specifičnih mišjih mAb smo miš BALB/c imunizirali z večkratnim vnosom slovenskega izolata inaktiviranega virusa H5N1 ob dodatku adjuvantov. Zadnji pozitivni imunizaciji smo Ag mešanici poleg H5N1 dodali še virus H5N2. Imunski odgovor, nastanek specifičnih Ab, smo med posameznimi imunizacijami preverjali z iDIBA testom.

S selekcijo hibridomskih celic s presejalno metodo ELISA smo odbrali hibridomske celične linije, ki so proizvajale mAb z želeno specifiko. Viruse AI za njihovo razmnoževanje inokulirajo v alantoisno votlino oplojenih kokošjih jajc. Lahko bi se zgodilo, da bi nekaj proteinov iz alantoisne tekočine ostalo v izolatu virusa, s katerim smo imunizirali. Zato bi lahko nastala tudi Ab proti tem proteinom. Z metodo ELISA smo testirali tudi, če katera od nastalih Ab reagirajo s proteini alantoisne tekočine in le-ta izločili. Izbranih 7 klonov je imelo najmočnejšo reakcijo z bodisi samo Ag virusa H5N1 oziroma samo z Ag virusa H5N2 ali pa so reagirali z obema Ag hkrati in obenem niso reagirali z alantoisno tekočino.

Pred izolacijo mAb iz supernatantov sedmih klonov hibridomov: 1G6D11, 1H4B9, 2F4B6, 1C2C3, 1C2B5, 4H2B4 in 1H4B11 smo ponovno preverili njihovo aktivnost in specifičnost z metodo iDIBA. Poleg supernatantov posameznih klonov smo v test vključili tudi negativni kontroli (pufer PBS in medij brez seruma – SFM) in potrdili, da ne vsebujeta Ab. Kontrolirali smo tudi specifičnost vezave konjugata. Ugotovili smo, da se konjugat sam po sebi ne veže na Ag, potrebna je predhodna vezava primarnih Ab, prisotnih v supernatantih klonov. S konjugatom (sekundarna kunčja Ab proti mišjim IgG) smo z encimskoimunskimi testi (ELISA in iDIBA) vedno potrjevali prisotnost le Ab IgG. Na osnovi intenzitete reakcije in navzkrižne reaktivnosti z obema Ag, H5N1 in H5N2, smo posamezne klone oziroma posamezna mAb razdelili v tri skupine. Prva skupina je močno reagirala s H5N2 in nekoliko manj intenzivno s H5N1. Druga skupina je reagirala z obema Ag enako, a vsak klon znotraj skupine z drugačno intenziteto. Tretja skupina je šibko reagirala le s H5N2.

Vseh 7 klonov je specifično reagiralo vsaj z enim Ag (H5N1 ali H5N2) in da bi pripravljena mAb podrobnejše opisali, smo jih morali najprej iz posameznih supernatantov izolirati in ustrezno očistiti. V naslednjem koraku smo z nasičenim amonijevim sulfatom oborili mAb iz supernatantov posameznih klonov. Posamezne oborine smo raztopili v 3 ml pufra PBS kar pomeni, da smo jih glede na koncentracijo v izhodnih supernatantih (v 30 ml) skoncentrirali. Posamezna oborjena mAb smo očistili z gelsko kromatografijo z ločevanjem po velikosti. V zbranih frakcijah posameznega vzorca smo pričakovali, da se bodo izločila mAb IgG (Andrew in Titus, 1997).

V frakcijah posameznega vzorca smo preverili aktivnost (z metodo iDIBA) in spektrofotometrično pomerili vsebnost IgG, da bi določili, v katerih frakcijah se je izločila večina aktivnih mAb IgG posameznih klonov. Absorbance smo merili pri valovni dolžini 280 nm, kjer absorbirajo aromatične AK proteinov (mAb IgG). Rezultate merjenja absorbance smo grafično predstavili in ugotovili, da se večina mAb izloči med 6. in 10. frakcijo, kar je glede na velikost molekul IgG povsem pričakovano (Andrew in Titus, 1997). Iz izmerjenih absorbanc smo (formula (1), točka 3.2) izračunali koncentracijo IgG v posamezni frakciji.

Ker so bila aktivna mAb IgG prisotna v več zaporednih frakcijah posameznega klonu, smo frakcije z največjo vsebnostjo IgG združili in z ultrafiltracijo skoncentrirali na manjši volumen. Vsak posamezen klon smo glede na koncentracijo v izhodnih supernatantih (v 30 ml) skoncentrirali (na 3 ml). Očiščenim in koncentriranim vzorcem smo ponovno določili vsebnost IgG. Vsebnosti mAb IgG v posameznih klonih so bile različne. Najvišjo koncentracijo IgG je imel klon 1C2C3, v koncentriranem vzorcu je le-ta znašala 0,879 mg/ml, najnižjo pa klon 2F4B6, v koncentriranem vzorcu je le-ta znašala 0,231 mg/ml. Ugotovili smo, da se kloni med seboj ne ločijo le po reakciji z Ag, temveč tudi po količini sintetiziranih mAb.

Z iDIBA testom smo v koncentriranih vzorcih ponovno preverili prisotnost in aktivnost specifičnih mAb IgG proti Ag virusov H5N1 in H5N2. Posamezne koncentrirane vzorce smo pred izvedbo testa redčili s pufrom PBS (pH 7,2), v razmerju 1:10. S ponovnim redčenjem smo dosegli enako koncentracijo, kot je bila v posameznem izhodiščnem supernatantu (v 30 ml). Na osnovi intenzitete reakcije in navzkrižne reaktivnosti z obema Ag smo posamezne klone oziroma posamezna mAb IgG ponovno razdelili v tri skupine. Prva skupina je močno reagirala s H5N2 in nekoliko manj intenzivno s H5N1. Druga skupina je imela drugačne lastnosti kot pri testiranju vzorcev z iDIBO pred postopki izolacije in čiščenja mAb. Tokrat smo v drugo skupino razporedili mAb, ki so zelo močno reagirala s H5N1 in šibkeje s H5N2. Tretja skupina je ponovno šibko reagirala le s H5N2.

Ker smo posamezne vzorce po koncentriranju redčili, so bile vsebnosti mAb IgG v testiranjih vzorcev z iDIBO pred (supernatanti hibridomov) in po izolaciji (koncentrirani vzorci) specifičnih mAb IgG, primerljive. mAb 1H4B9 in 1G6D11 so pred in po izolaciji močneje reagirala s H5N2 kot s H5N1. mAb 1H4B11 so pri obeh testiranjih reagirala le s H5N2. mAb 1C2C3 so v obeh primerih reagirala z obema Ag, malenkostna razlika je lahko le posledica subjektivne ocene rezultata. mAb 1C2B5 so močneje reagirala po izolaciji, kar je skladno s pričakovanji, saj so bila mAb po izolaciji očiščena in zato aktivnejša.

Ob primerjavi rezultatov obeh testiranj pa ugotovimo, da vsi niso povsem skladni. mAb 2F4B6 so po izolaciji še vedno zelo intenzivno reagirala s H5N1, a le še šibko s H5N2. mAb 4H2B4 so po izolaciji skoraj povsem izgubila aktivnost na oba Ag, saj so le še šibko

reagirala s H5N2. Do zmanjšane aktivnosti po izolaciji mAb 2F4B6 in 4H2B4 je najverjetneje prišlo zaradi različnih pogojev pri izvedbi testiranj. Pri testiranjih smo namreč uporabljali različne pripravke virusov H5N1 in H5N2. Posamezni pripravki virusov H5N1 in H5N2 so bili različne kvalitete in zato je pri testiranjih niso zagotovili povsem enakih pogojev. Možno je tudi, da so omenjena mAb med postopki čiščenja izgubila del aktivnosti. Majhna sprememba je možna v variabilni regiji mAb (2F4B6), ki ne vpliva na vezavo na epitop na H5N1, vpliva pa na vezavo na epitop na H5N2. Navzkrižne reakcije so šibkejše kot specifične in jih ob rahli konformacijski spremembi Ag ali Ab ne zaznamo več. Nastala imunska reakcija med Ag in Ab je odvisna od lastnosti obeh (Vozelj, 2000).

Ponovno smo zabeležili razlike med posameznimi kloni v reakcijah z virusoma H5N1 in H5N2. Razlike med kloni smo žeeli še podrobnejše analizirati in določiti, katere virusne proteine H5N1 in H5N2 prepoznavajo naša izolirana mAb. V ta namen smo z SDS-PAGE elektroforezo najprej ločili virusne proteine H5N1 in H5N2 ter si tako ogledali njun proteinški profil. SDS-PAGE elektroforezo smo uporabili, ker je to metoda za identifikacijo ter oceno homogenosti in čistosti proteinov. Število proteinov, vidnih na gelu, se je med virusoma H5N1 in H5N2 razlikovalo. Razlog je lahko v tem, da sta virusna izolata različnega porekla in pripravljenata (očiščena, inaktivirana) na različen način. Virus H5N1, izolat A/swan/Slovenia/649/2006, so za nas pripravili in inaktivirali na Veterinarski fakulteti (prof. dr. Olga Zorman Rojs), virus H5N2 pa smo dobili iz Nizozemske (VLDIA097 HAG-INFH5, GD - Diagnostics, Nizozemska). Zaradi različne kvalitete virusnih izolatov smo za nadaljnja testiranja uporabili virus H5N1 redčen v razmerju 1:3 in virus H5N2 redčen v razmerju 1:50, da je bila intenziteta na gelu med njima primerljiva.

Omenjeni razredčini virusov smo nanesli na poliakrilamidni gel, jih s prenosom western prenesli na membrano in izvedli ločene encimskoimunske reakcije s sedmimi kloni izoliranih mAb. Ugotovili smo, da kloni mAb reagirajo z različnimi virusnimi proteini H5N1 in H5N2. Velikosti virusnih proteinov, s katerimi so reagirala posamezna mAb, smo primerjali z velikostmi virusnih proteinov, objavljenih v različnih znanstvenih člankih (preglednica 3, točka 2.2.1). Da bi lahko z gotovostjo trdili s katerimi virusnimi proteini

reagirajo posamezna mAb, bi morali določiti AK zaporedje ločenih virusnih proteinov H5N1 in H5N2.

mAb 1G6D11 in 1C2C3 so reagirala s proteini velikosti od ~130 do ~100 kDa, kar bi lahko ustrezalo podenoti virusne polimeraze PB1 (Shaw in sod., 1992). mAb 1C2C3 bi lahko reagirala tudi s preostalima podenotama virusne polimeraze, PB2 in PA (Shaw in sod., 1992). mAb 1G6D11, 1C2B5 in 1C2C3 so reagirala s proteinom velikosti ~80 kDa kar bi, predvidoma, lahko ustrezalo prekurzorski molekuli HA (HA0) (Garcia in sod., 1996; Ge in sod., 2007; Hsieh in Chang, 2006; Kamps in sod., 2006; Ki Choi in sod., 2005; Ohuchi in sod. 1997; Shaw in sod., 1992). Reakcije mAb 1C2B5 in 1H4B9 s proteinom velikosti ~60 kDa bi lahko bile specifične za nukleokapsidni protein NP ali za NA (Ohuchi in sod. 1997; Shaw in sod., 1992). mAb 1C2C3 so reagirala s proteinom velikosti ~56 kDa, kar ustreza objavljeni velikosti ovojničnega proteina virusa, NA (Ohuchi in sod. 1997; Shaw in sod., 1992). Velikosti proteinov od ~50 do ~45 kDa, s katerimi so reagirala mAb 1G6D11, 1C2B5, 1H4B9, 1C2C3 in 4H2B4, bi lahko ustrezale podenoti HA1 (Garcia in sod., 1996; Ge in sod., 2007; He in sod., 2007; Ohuchi in sod. 1997). mAb 1G6D11 so reagirala še s proteinom velikosti ~28 kDa, kar ustreza velikosti bodisi podenote HA2 ali membranskemu proteinu M1 (Garcia in sod., 1996; Ge in sod., 2007; Li in sod., 2006; Ohuchi in sod. 1997; Shaw in sod., 1992).

Za mAb 2F4B6 veljajo vse zgoraj navedene reakcije, saj so močno reagirala s celotnim proteinskim profilom virusa H5N1 in le s proteinom velikosti ~80 kDa virusa H5N2 (Garcia in sod., 1996; Ge in sod., 2007; He in sod., 2007; Hsieh in Chang, 2006; Kamps in sod., 2006; Ki Choi in sod., 2005; Li in sod., 2006; Ohuchi in sod. 1997; Shaw in sod., 1992). mAb 1H4B11 so očitno izgubila že tako šibko aktivnost, ki so jo kazala v izvedenih encimskoimunskih reakcijah in tako niso reagirala z nobenim virusnim proteinom. Če povzamemo navedene reakcije mAb z virusnimi proteini, so posamezna mAb 1C2B5, 1H4B9, 1C2C3 in 4H2B4 navzkrižno reagirala z enakimi proteini obej Ag. mAb 2F4B6 in 1G6D11 pa so reagirala z več proteini virusa H5N1.

V test smo vključili tudi alantoisno tekočino. Reakcije, ki so se pojavile tako pri H5N1, H5N2 in alantoisni tekočini, smo ocenili kot nespecifične. Za navzkrižno reakcijo Ab

zadostuje že, da so si epitopi na različnih Ag dovolj podobni. Z inkubacijo v mediju brez seruma smo ponovno potrdili, da le-ta ne vsebuje Ab.

Za nadaljnja testiranja smo izbrali tri klone mAb, ki so se med seboj precej razlikovali in pokazali specifičnost za različne epitope virusov H5N1 in H5N2. mAb 1C2C3 smo izbrali, ker so pri izvedenih encimskoimunskih reakcijah (iDIBA in ELISA) vedno zelo močno in hitro reagirala. Pri encimskoimunski reakciji z ločenimi virusnimi proteini so najverjetnejše prepoznavala prekurzorsko molekulo HA (HA0) in njeno večjo razpadno podenoto HA1 (tako H5N1 kot H5N2) zato je zelo verjetno, da so specifična za HA podtipa H5.

mAb 2F4B6 smo izbrali, ker so pri encimskoimunski reakciji z ločenimi virusnimi proteini H5N1 najverjetnejše prepoznavala prekurzorsko molekulo HA (HA0) in obe njeni razpadni podenoti HA1 in HA2. Pri virusu H5N2 pa predpostavljamo, da so prepoznavala le prekurzorsko molekulo HA (HA0). Najverjetnejše so tudi mAb 2F4B6 specifična za HA podtipa H5. mAb proti HA bi bila ključni del obrambnega sistema, saj je HA glavni Ag virusov influence. mAb bi lahko preprečila pritrditev in vstop virusa v celico (Horimoto in Kawaoka, 2001). Da bi lahko z gotovostjo trdili, da so mAb 1C2C3 in 2F4B6 specifična za HA podtipa H5, bi morali izvesti dodatna testiranja. Lahko bi mAb 1C2C3 in 2F4B6 uporabili v testu inhibicije hemaglutinacije in se tako prepričali, če inhibirajo hemaglutinacijsko aktivnost virusov H5N1 in H5N2.

mAb 4H2B4 smo izbrali, ker so reagirala le s proteinom velikosti ~ 45 kDa pri obeh virusih. mAb 4H2B4 bi lahko bila specifična za podenoto HA1 podtipa H5 (Garcia in sod., 1996; Ge in sod., 2007; He in sod., 2007; Ohuchi in sod. 1997). Podenota HA1 je bolj variabilna in imunogena od podenote HA2 (Horimoto in sodobniki, 2004). mAb specifična za podenoto HA1 bi lahko uporabili za *in vitro* preučevanje antigenskih razlik med posameznimi virusnimi izolati.

Lahko bi testirali učinkovitost proizvedenih mišjih mAb v oplojenih kokošjih jajcih. Na ta način bi preverili, če mAb v njih inhibirajo razmnoževanje virusa H5N1. Kot Hanson in sodelavci (2006) bi učinkovitost zaščite proizvedenih mišjih mAb lahko testirali tudi *in vivo* v miškah. Učinkovitost zaščite pred okužbo z virusom H5N1 bi preverili z

vbrizganjem mAb pred vnosom virusa. Učinkovitost zdravljenja mAb po okužbi z virusom bi lahko preverili tako, da bi jih vbrizgali naknadno, po vnosu virusa H5N1.

Trem izbranim klonom 1C2C3, 2F4B6 in 4H2B4 smo za podrobnejši opis želeli določiti nukleotidno zaporedje V_H IgG. Najprej smo izbranim trem klonom ločeno izolirali molekule mRNA, ki nosijo genetski zapis, ki se prevede v funkcionalne proteine. Iz izolirane mRNA izbranih klonov smo najprej z encimom reverzno transkriptazo sintetizirali molekulo cDNA. mRNA namreč hitro razpade, medtem ko je njen prepis, cDNA, bolj obstojen za nadaljno analizo. Z reakcijo PCR smo pomnožili odseke cDNA velikosti ~ 340 bp. Glede na uporabljene začetne oligonukleotide in podatke iz literature smo sklepali, da smo uspešno pomnožili V_H IgG.

Z napravo za določevanje nukleotidnega zaporedja smo dobili nukleotidna zaporedja V_H IgG 1C2C3, 2F4B6 in kontrolnih mAb proti GAPDH, medtem ko analiza nukleotidnega zaporedja V_H IgG klona 4H2B4 ni uspela. Vzrok za to lahko iščemo v nekoliko slabšem pomnoževanju odseka cDNA (V_H IgG) 4H2B4 z reakcijo PCR, kar je razvidno tudi iz slike 12 (točka 4.4). Za slabše pomnoževanje so lahko krivi začetni oligonukleotidi, ki verjetno ne nalegajo optimalno na cDNA klona 4H2B4, zato bi bilo potrebno postopek pomnoževanja cDNA tega klona še izboljšati in uporabiti ustreznejše začetne oligonukleotide za njegovo pomnoževanje. Obenem bi bilo morda potrebno ponovno izolirati mRNA in sintetizirati novo cDNA.

Nukleotidna zaporedja V_H IgG klonov 1C2C3 in 2F4B6 smo s programom ClustalW2 na podatkovni bazi EMBL – EBI poravnali posebej med seboj in s kontrolnimi mAb proti GAPDH. Za kontrolo smo uporabili mAb proti GAPDH (gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza). mAb tega klona so specifična za Ag GAPDH, zato smo pričakovali, da se bo njihovo nukleotidno zaporedje bolj razlikovalo od nukleotidnega zaporedja mAb, specifičnih za Ag virusov H5N1 in H5N2, medtem ko si bodo le-ta med seboj bolj podobna. Rezultati poravnave zaporedja V_H IgG 1C2C3 s kontrolnimi mAb proti GAPDH so bili v skladu s pričakovanji, saj smo opazili kar nekaj razlik med zaporedji. Ob poravnavi zaporedij V_H IgG 1C2C3 in 2F4B6, ki sta specifični za virusa H5N1 in H5N2,

smo potrdili domnevo, da sta si med seboj bolj podobni kot z zaporedjem kontrolnih mAb proti GAPDH.

Zaporedji V_H IgG 1C2C3 in 2F4B6 sta med seboj bolj podobni. Sklepamo, da gre na mestih podobnosti za ohranjene regije v V_H IgG. Na nekaterih odsekih pa se zaporedji tudi razlikujeta med seboj. Čeprav nismo točno določili mesta hipervariabilnih regij, pa lahko glede na približno lokacijo in podatke iz literature predvidevamo, da mesta razlik med zaporedji predstavljajo območja CDR. Razlike v delovanju izbranih klonov IgG smo potrdili tudi z encimskoimunskimi testiranji. Tako podatki, ki smo jih pridobili z encimskoimunskimi testiranji sovpadajo z rezultati analize na molekularni ravni.

Šest krajsih odsekov (do 10 AK) variabilnega področja kaže posebno spremenljivost. Ta najbolj variabilna področja lahkih in težkih verig Ig imenujemo hipervariabilne regije oziroma komplementarnost določajoče regije – CDR. Tri regije CDR v lahki in tri regije CDR v težki verigi združene v tridimensionalno zgradbo – vezišče za antigen, tvorijo površino, ki je komplementarna tridimensionalni površini Ag. AK zaporedja regij CDR so odločilnega pomena za specifičnost vezanja Ag. Kakršnekoli spremembe (delecije ali insercije) v regiji CDR lahko spremenijo specifičnost Ab. Moramo poudariti, da pri vezanju Ag sodelujejo tudi ogrodni deli veziča - ostali predeli variabilnih področij (Vozelj, 2000). Kljub izredni variabilnost AK v regiji CDR so aromatične AK, kot sta tirozin in triptofan, pogosteje prisotne (Davies in Cohen, 1996). Regije CDR so prisotne v obeh verigah Ig, a imajo regije CDR težke verige znatnejši stik z Ag. V centru veziča za antigen je regija CDR3 težke verige - CDR H3 (slika 4, točka 2.3.1), zato je nukleotidno zaporedje v tem delu ponavadi najbolj raznoliko (Polonelli in sod., 2008). Tudi mi smo opazili večjo raznolikost med zaporedji v C-terminalnem delu pomnoženih odsekov. Če bi določili še nukleotidna zaporedja V_L naših mAb, bi tako poznali vsa najpomembnejša področja, ki pridejo v stik z epitopi na Ag.

Na podatkovni bazi NCBI smo s programom BLAST med vsemi zaporedji v podatkovni bazi poiskali že opisana zaporedja, ki so bila najbolj podobna našim, pridobljenih iz klonov 1C2C3 in 2F4B6. Ugotovili smo, da so naša pridobljena zaporedja najbolj podobna

mišemu genu za V_H . Iz tega sklepamo, da smo specifično pomnožili V_H IgG 1C2C3 in 2F4B6.

Vsa pridobljena mAb specifična za slovenski izolat virusa H5N1 bi lahko *in vitro* uporabili za diagnostiko okužb pri perutnini. V diagnostiki bi pridobljena mAb lahko uporabili v vrsti imunskeih testov: v encimskoimunskeih testih, imunofluorescenčnih testih, hemaglutinacijskih testih, hemadsorbcijskih testih in drugih. Z mAb bi neposredno dokazovali virus in virusne proteine H5N1.

Z natančnim opisom vseh lastnosti proizvedenih mAb bi lahko le-ta koristila tudi za *in vitro* preučevanje virusa H5N1. Morebitno odkritje antigenskih razlik med posameznimi virusnimi izolati v Sloveniji bi pripomoglo k boljšemu vpogledu na epidemiologijo virusa in odkritju potencialnega vira prenosa.

Ob ustreznih modifikacijih bi proizvedena mAb lahko uporabili kot zaščitna terapevtska sredstva pred in po okužbi perutnine z virusom H5N1. Obdržali bi mišje hipervariabilne regije IgG, ki tvorijo antigen vezavno mesto, vse ostale predele IgG molekule pa bi zamenjali z ustreznimi deli Ab IgY. Z ustreznimi predelanimi mAb bi lahko preprečevali širjenje okužbe z virusom H5N1 med perutnino v Sloveniji.

S himerizacijo proizvedenih mAb bi lahko pripravili primerna zaščitna sredstva za preprečevanje okužbe z virusom H5N1 tudi pri ljudeh (Hanson in sod., 2006). S himerizacijo mišjih mAb bi zmanjšali imunogenost in povečali njihovo biološko učinkovitost. Potrebno bi bilo zamenjati konstantna področja lahke in težke verige mišjega Ab z ustreznimi področji človeškega Ab. Z ohranitvijo področij CDR mišjega Ab in z zamenjavo vseh ostalih predelov IgG z ustreznimi področji človeškega IgG bi imunogenost humaniziranih Ab dodatno zmanjšali (Obermajer in sod., 2007).

Proizvedena mAb, specifična za različne epitope virusov H5N1 in H5N2, lahko kadarkoli ponovno pridobimo v večjih količinah. Vsi hibridomi so namreč shranjeni v genski banki Laboratorija za imunologijo in celične kulture Oddelka za zootehniko na Biotehniški fakulteti.

5.2 SKLEPI

- Slovenski izolat inaktiviranega virusa aviarne influence podtipa H5N1 je dober imunogen.
- Pridobili smo več klonov hibridomov, ki proizvajajo specifična mAb proti proteinskim epitopom virusa aviarne influence.
- Z metodo iDIBA smo ugotovili, da hibridomi proizvajajo mAb, ki različno reagirajo z Ag virusov H5N1 in H5N2.
- Iz supernatantov sedmih klonov hibridomov: 1G6D11, 1H4B9, 2F4B6, 1C2C3, 1C2B5, 4H2B4 in 1H4B11 smo z gelsko kromatografijo izolirali in ustrezno očistili specifična mAb.
- mAb IgG se med seboj niso ločila le po reakciji z Ag virusov H5N1 in H5N2, temveč tudi po količini sintetiziranih mAb.
- Ugotovili smo, da naša mAb prepoznavajo različne virusne proteine H5N1 in H5N2. Predvideli smo, za katere epitope virusov H5N1 in H5N2 so specifična posamezna mAb.
- Izpostavili smo reakcije treh mAb. Za mAb 1C2C3 in 2F4B6 predpostavljam, da so najverjetneje specifična za hemaglutinin podtipa H5. Za mAb 4H2B4 sklepamo, da so verjetno specifična za podenoto HA1 virusnega hemaglutinina.
- mAb 1C2C3 in 2F4B6 smo določili nukleotidno zaporedje varabilne regije težke verige. V komplementarnost določajočih regijah težke verige smo zabeležili odločilne razlike med njima, ki definirajo specifičnost vezanja Ag.

6 POVZETEK

Epidemija AI, povzročena z visoko patogenim virusom podtipa H5N1, je v Aziji povzročila veliko ekonomsko škodo. Najverjetneje se je okužba z virusom H5N1 iz udomačene perutnine razširila med populacijo divjih vodnih ptic. Z divjimi vodnimi pticami selivkami pa sta se virus in posledično AI globalno razširila tudi v Evropo in Afriko. Za AI so poleg številnih vrst ptic oboleli tudi sesalci, vključno s človekom. V Sloveniji smo okužbe z virusom H5N1 zasledili le pri divjih vodnih pticah, največ pri labodu grbcu (*Cygnus olor*). Okužbe domače perutnine z visoko patogenim virusom AI podtipa H5N1 v Sloveniji bi lahko povzročile ogromno gospodarsko škodo, zato je diagnostika ključnega pomena za pravočasno odkritje in preprečevanje razširitve okužbe.

Namen diplomske naloge je bil pridobiti monoklonska protitelesa, specifična za različne epitope slovenskega izolata virusa H5N1, in jih vsaj delno opisati.

Miš BALB/c smo imunizirali z večkratnim vnosom inaktiviranega pripravka virusa AI podtipa H5N1, izoliranega v Sloveniji. Uspešnost imunizacije in tvorbo specifičnih Ab smo preverjali z encimskoimunskeimi metodami kot sta iDIBA in ELISA. V pridobljenih supernatantih sedmih klonov hibridomov: 1G6D11, 1H4B9, 2F4B6, 1C2C3, 1C2B5, 4H2B4 in 1H4B11, smo ponovno preverili aktivnost in specifičnost mAb z metodo iDIBA. Ugotovili smo, da mAb različno reagirajo z virusoma H5N1 in H5N2. Na osnovi intenzitete reakcije in navzkrižne reaktivnosti z obema Ag smo posamezna mAb razdelili v tri skupine. Da bi pripravljena mAb podrobnejše opisali, smo jih najprej izolirali in ustrezno očistili. mAb smo iz posameznih supernatantov hibridomov oborili z nasičenim amonijevim sulfatom. Posamezna oborjena mAb smo očistili z gelsko kromatografijo z ločevanjem po velikosti. V frakcijah posameznega vzorca smo preverili aktivnost in spektrofotometrično pomerili vsebnost IgG. Zaporedne frakcije posameznega vzorca z največjo vsebnostjo aktivnih IgG smo združili in skoncentrirali. V očiščenih in koncentriranih vzorcih smo ponovno preverili aktivnost in spektrofotometrično pomerili vsebnost IgG. Ugotovili smo, da se kloni med seboj ne ločijo le po reakcijah s H5N1 in H5N2, temveč tudi po količini sintetiziranih mAb. Na osnovi intenzitete reakcije in navzkrižne reaktivnosti s H5N1 in H5N2 smo mAb tokrat razdelili v tri nekoliko drugače

zasnovane skupine. Razlike med mAb smo podrobneje analizirali z encimskoimunskimi reakcijami posameznih mAb, z ločenimi virusnimi proteini. Dokazali smo, da naša mAb prepoznavajo različne virusne proteine H5N1 in H5N2. Predvideli smo za katere epitope virusov H5N1 in H5N2 bi lahko bila specifična posamezna mAb. Izpostavili smo reakcije treh mAb. Za mAb 1C2C3, ki so najverjetneje prepoznavala prekurzorsko molekulo HA (HA0) in njeno večjo razpadno podenoto HA1 obeh virusov sklepamo, da so verjetno specifična za HA podtipa H5. Za mAb 2F4B6, ki so najverjetneje prepoznavala prekurzorsko molekulo HA (HA0) in obe njeni razpadni podenoti HA1 in HA2 virusa H5N1 ter HA0 virusa H5N2, predpostavljam, da so verjetno prav tako specifična za HA podtipa H5. Za mAb 4H2B4, ki so reagirala le s proteinom velikosti ~45 kDa pri obeh virusih, sklepamo, da so verjetno specifična za podenoto HA1 virusnega HA. mAb 1C2C3 in 2F4B6 smo določili nukleotidno zaporedje V_H IgG. V ta namen smo izbranim klonom sprva ločeno izolirali molekule mRNA. Z reverzno transkriptazo smo zapis prepisali v cDNA. Za nadaljnjo pomnoževanje sintetiziranih cDNA smo uporabili začetne oligonukleotide specifične za pomnoževanje V_H IgG. Velikosti posameznih pomnoženih odsekov cDNA so bile ustrezne (~340 bp), zato smo jih pripravili za določevanje nukleotidnega zaporedja. Ko smo nukleotidni zaporedji V_H IgG 1C2C3 in 2F4B6 med seboj poravnali s programom ClustalW2, smo za krajše odseke, kjer smo opazili razlike v nukleotidnih zaporedjih, predpostavili, da pripadajo regijam CDR.

Ustrezna monoklonska protitelesa bi lahko v prvi vrsti uporabljali za diagnostiko okužb pri perutnini. Nadalje bi bila dobra osnova za pripravo zaščitnih protiteles za preprečevanje okužb pri perutnini. Ob ustreznih modifikacijah bi lahko taka monoklonska protitelesa pripravili tudi kot zaščitno sredstvo pred okužbo ljudi.

7 VIRI

Alexander D.J. 2000. A review of avian influenza in different bird species. *Veterinary Microbiology*, 74: 3-13

Alexander D.J. 2007. An overview of the epidemiology of avian influenza. *Vaccine*, 25: 5637-5644

Andrew S.M., Titus J.M. 1997. Purification and fragmentation of antibodies. V: Current protocols in immunology. Margulies D. (ed.). New York, John Wiley: 55-61

Benčina D., Bradbury J.M. 1992. Combination of immunofluorescence and immunoperoxidase techniques for serotyping mixtures of *Mycoplasma* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 30: 407-410

Benčina D., Kleven S.H., Elfaki M.G., Snoj A., Dovč P., Dorrer D., Russ I. 1994. Variable expression of epitopes on the surface of *Mycoplasma gallisepticum* demonstrated with monoclonal antibodies. *Avian Pathology*, 23: 19-36

Chen J., Ho Lee K., Steinhauer D.A., Stevens D.J., Skehel J.J., Wiley D.C. 1998. Structure of the hemagglutinin precursor cleavage site, a determinant of influenza pathogenicity and the origin of the labile conformation. *Cell*, 95: 409-417

Davies D.R., Cohen G.H. 1996. Interactions of protein antigens with antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93: 7-12

Garcia M., Crawford J.M., Latimer J.W., Rivera-Cruz E., Perdue M.L. 1996. Heterogeneity in the haemagglutinin gene and emergence of the highly pathogenic phenotype among recent H5N2 avian influenza viruses from Mexico. *Journal of General Virology*, 77: 1493-1504

Čelesnik N. Priprava in delni opis monoklonskih protiteles proti virusu ptičje gripe H5N1.
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medodd. študija mikrobiologije, 2008

Ge J., Deng G., Wen Z., Tian G., Wang Y., Shi J., Wang X., Li Y., Hu S., Jiang Y., Yang C., Yu K., Bu Z., Chen H. 2007. Newcastle disease virus-based live attenuated vaccine completely protects chickens and mice from lethal challenge of homologous and heterologous H5N1 avian influenza viruses. *Journal of Virology*, 81, 1: 150-158

Goding J.W. 1986. Monoclonal antibodies: Principles and practice. 2nd ed. London, Academic Press: 315 str.

Hanson B.J., Boon A.C.M., Lim A.P.C., Webb A., Eong Ooi E., Webby R.J. 2006. Passive immunoprophylaxis and therapy with humanized monoclonal antibody specific for influenza A H5 hemagglutinin in mice. *Respiratory Research*, 7: 126-135

Harlow E., Lane D. 1988. Antibodies: A laboratory manual. 1st ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory: 726 str.

He Q., Velumani S., Du Q., Lim C.W., Ng F.K., Donis R., Kwang J. 2007. Detection of H5 avian influenza viruses by antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay using H5-specific monoclonal antibody. *Clinical and Vaccine Immunology*, 14, 5: 617-623

Horimoto T., Fukuda N., Iwatsuki-Horimoto K., Guan Y., Lim W., Peiris M., Sugii S., Odagiri T., Tashiro M., Kawaoka Y. 2004. Antigenic differences between H5N1 human influenza viruses isolated in 1997 and 2003. *Journal of Veterinary Medical Science*, 66, 3: 303-305

Horimoto T., Kawaoka Y. 2001. Pandemic threat posed by avian influenza A viruses. *Clinical Microbiology Reviews*, 14, 1: 129-149

Hsieh S.M., Chang S.C. 2006. Insufficient perforin expression in CD8⁺ T cells in response to hemagglutinin from avian influenza (H5N1) virus. *Journal of Immunology*, 176: 4530-4533

Čelesnik N. Priprava in delni opis monoklonskih protiteles proti virusu ptičje gripe H5N1.
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medodd. študija mikrobiologije, 2008

Kamps B.S., Hoffmann C., Preiser W. 2006. Influenza report 2006. Paris, Flying Publisher: 225 str.

Kaverin N.V., Rudneva I.A., Govorkova E.A., Timofeeva T.A., Shilov A.A., Kochergin-Nikitsky K.S., Krylov P.S., Webster R.G. 2007. Epitope mapping of the hemagglutinin molecule of a highly pathogenic H5N1 influenza virus with monoclonal antibodies. *Journal of Virology*, 81, 23: 12911-12917

Ki Choi Y., Dzung Nguyen T., Ozaki H., Webby R.J., Puthavathana P., Buranathal C., Chaisingh A., Auewarakul P., Hanh N.T.H., Kit Ma S., Yan Hui P., Guan Y., Peiris J.S.M., Webster R.G. 2005. Studies of H5N1 influenza virus infection of pigs by using viruses isolated in Vietnam and Thailand in 2004. *Journal of Virology*, 79, 16: 10821-10825

Köhler G., Milstein C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256: 495-497

Koren S. 2002. Splošna medicinska virologija. 1. izdaja. Ljubljana, Medicinski razgledi: 201 str.

Li Z., Jiang Y., Jiao P., Wang A., Zhao F., Tian G., Wang X., Yu K., Bu Z., Chen H. 2006. The NS1 gene contributes to the virulence of H5N1 avian influenza viruses. *Journal of Virology*, 80, 22: 11115-11123

Liddell J.E., Cryer A. 1991. A practical guide to monoclonal antibodies. New York, John Wiley: 98 str.

Nwe N., He Q., Damrongwatanapokin S., Du Q., Manopo I., Limlamthong Y., Fenner B.J., Spencer L., Kwang J. 2006. Expression of hemagglutinin protein from the avian influenza virus H5N1 in a baculovirus/insect cell system significantly enhanced by suspension culture. *BMC Microbiology*, 6: 16-22

Obermajer N., Premzl A., Kos J. 2007. Terapevtska monoklonska protitelesa. V: Biološka zdravila: Od gena do učinkovine. Štrukelj B., Kos J. (ur.). 1. izdaja. Ljubljana, Slovensko farmacevtsko društvo: 532-578

Ohuchi M., Ohuchi R., Feldmann A., Klenk H.D. 1997. Regulation of receptor binding affinity of influenza virus hemagglutinin by its carbohydrate moiety. *Journal of Virology*, 71, 11: 8377-8384

Peiris J.S.M., de Jong M.D., Guan Y. 2007. Avian influenza virus (H5N1): A threat to human health. *Clinical Microbiology Reviews*, 20, 2: 243-267

Polonelli L., Ponton J., Elguezabal N., Moragues M.D., Casoli C., Pilotti E., Ronzi P., Dobroff A.S., Rodrigues E.G., Juliano M.A., Maffei D.L., Magliani W., Conti S., Travassos L.R. 2008. Antibody complementarity-determining regions (CDRs) can display differential antimicrobial, antiviral and antitumor activities. *PLOS One*, 3, 6: 2371-2379

Salamon S. 2007. Follow-up report No.: 4. OIE Ref: 4740, report date: 06/02/2007, country: Slovenia. Paris. World organization for animal health – OIE (6. feb. 2007).
http://www.oie.int/wahid-prod/reports/en_fup_0000004740_20070206_151215.pdf
(5. sep. 2008): 3 str.

Salzberg S.L., Kingsford C., Cattoli G., Spiro D.J., Janies D.A., Mehrez Aly M., Brown I.H., Couacy-Hymann E., De Mia G.M., Huu Dung D., Guercio A., Joannis T., Safar Maken Ali A., Osmani A., Padalino I., Saad M.D., Savić V., Sengamalay N.A., Yingst S., Zaborsky J., Zorman-Rojs O., Ghedin E., Capua I. 2007. Genome analysis linking recent european and african influenza (H5N1) viruses. *Emerging Infectious Diseases*, 13, 5: 713-718

Shaw M.W., Arden N.H., Maassab H.F. 1992. New aspects of influenza viruses. *Clinical Microbiology Reviews*, 5, 1: 74-92

Čelesnik N. Priprava in delni opis monoklonskih protiteles proti virusu ptičje gripe H5N1.
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medodd. študija mikrobiologije, 2008

Simmons C.P., Bernasconi N.L., Sugitan A.L., Mills K., Ward J.M., Van Vinh Chau N., Tinh Hien T., Sallusto F., Quang Ha D., Farrar J., de Jong M.D., Lanzavecchia A., Subbarao K. 2007. Prophylactic and therapeutic efficacy of human monoclonal antibodies against H5N1 influenza. PLOS Medicine, 4, 5: 0928-0936

Smith G.J.D., Naipospos T.S.P., Nguyen T.D., de Jong M.D., Vijaykrishna D., Usman T.B., Hassan S.S., Nguyen T.V., Dao T.V., Bui N.A., Leung Y.H.C., Cheung C.L., Rayner J.M., Zhang J.X., Zhang L.J., Poon L.L.M., Li K.S., Nguyen V.C., Hien T.T., Farrar J., Webster R.G., Chen H., Peiris J.S.M., Guan Y. 2006. Evolution and adaptation of H5N1 influenza virus in avian and human hosts in Indonesia and Vietnam. Virology, 350: 258-268

Vozelj M. 2000. Temelji imunologije. 1. izdaja. Ljubljana, DZS: 552 str.

Warr G.W., Magor K.E., Higgins D.A. 1995. IgY: Clues to the origins of modern antibodies. Immunology Today, 16: 392-398

WHO. 2008a. Cumulative number of confirmed human cases of avian influenza A/(H5N1) reported to WHO. Atlanta. World health organization – WHO (10. sep. 2008). http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2008_09_10/en/index.html (10. sep. 2008): 1 str.

WHO. 2008b. H5N1 avian influenza: Timeline of major events. Atlanta. World health organization – WHO (8. sep. 2008).
http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/Timeline_08.09.08.pdf
(10. sep. 2008): 28 str.

Yang M., Berhane Y., Salo T., Li M., Hole K., Clavijo A. 2008. Development and application of monoclonal antibodies against avian influenza virus nucleoprotein. Journal of Virological Methods, 147, 2: 265-274

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Mojci Narat in somentorici dr. Ireni Oven za vodenje in strokovno pomoč pri raziskovalnem delu ter oblikovanju diplomske naloge.

Recenzenti prof. dr. Olgi Zorman Rojs se zahvaljujem za strokoven posvet in hiter ter temeljit pregled diplomske naloge.

Za pomoč pri tehnični izvedbi poskusov bi se rada zahvalila Simoni Salmič.

Svojim staršem, fantu in prijateljem se zahvaljujem za podporo, zaupanje in spodbudo v trenutkih, ko sem jo najbolj potrebovala.