

2. STRESZCZENIE

Parapoxvirus Orf (ORFV), nazywany także wirusem ospy owczej należy do rodziny *Poxviridae*, dużych i strukturalnie złożonych wirusów DNA o silnych właściwościach immunogennych. Ze względu na swoje immunostymulujące oraz immunomodulujące właściwości, atenuowany szczep D1701-V stanowi obecnie jeden z bardziej obiecujących wektorów szczepionkowych. Jednym z głównych powodów jest fakt, że indukowana przez ORFV odpowiedź immunologiczna jest nie tylko silna, ale co bardzo istotne, specyficzna względem produktu genu wprowadzanego, a nie samego wektora. Istotnym etapem na drodze do udoskonalenia wektora szczepionkowego jest identyfikacja oraz charakterystyka białek wirusowych o potencjalnych właściwościach immunomodulacyjnych. W przypadku wirusa Orf przykładem takich białek są białka zawierające powtórzenia ankirynowe.

Głównym celem tej pracy była wstępna charakterystyka produktów genów *ORFV126*, *ORFV128* i *ORFV129* wirusa Orf, kodujących trzy z pięciu białek zawierających powtórzenia ankirynowe – ANK-1 ANK-2 i ANK-3. W związku z brakiem specyficznych przeciwciał pozwalających na detekcję białek ANK, moim pierwszym zadaniem było uzyskanie monospecyficznych surowic poliklonalnych skierowanych przeciw tym białkom. Białka ANK zostały nadprodukowane w bakteryjnym systemie ekspresyjnym, oczyszczone metodą elucji z membrany PVDF, a następnie użyte do immunizacji królików. Otrzymane surowice poliklonalne zostały wykorzystane do analizy ekspresji i wewnątrzkomórkowej lokalizacji białek ANK, zarówno w komórkach zakażonych wirusem Orf jak i w komórkach transfekowanych odpowiednimi plazmidami. Szczegółowa mutageneza białek ANK-1 i ANK-2 pozwoliła na identyfikację specyficznych motywów oraz sekwencji odpowiedzialnych za ich wewnątrzkomórkową lokalizację.

Białko ANK-1 zawiera dziesięć powtórzeń ankirynowych i jest eksprymowane jako produkt genu pośredniego lub późnego. Wyniki przedstawione w niniejszej pracy pokazują po raz pierwszy mitochondrialną lokalizację białka ANK-1. Mutageneza białka ANK-1 oraz wykorzystanie mikroskopii konfokalnej w celu analizy lokalizacji zmutowanych form białka fuzyjnego ANK-1-EGFP pokazała, że kluczową rolę w kierowaniu białka ANK-1 do mitochondriów odgrywają położone w jego centralnym rejonie dwa powtórzenia ankirynowe - AR8 i AR9. Motywy te stanowią nową klasę sekwencji odpowiedzialnych za kierowanie białek do mitochondriów. Pełna forma białka ANK-1 oraz formy skrócone, których mitochondrialna lokalizacja została wcześniej pokazana przy użyciu technik mikroskopii

konfokalnej, były wykrywane we frakcjach mitochondrialnych izolowanych zarówno z komórek transfekowanych jak i zakażonych wirusem Orf. Przedstawione wyniki po raz pierwszy pokazują kolokalizację poxwirusowego białka zawierającego powtórzenia ankirynowe z mitochondriami i sugerują, że powtórzenia ankirynowe mogą stanowić nowy typ sekwencji kierujących białka do mitochondriów.

Białko ANK-2 zawiera dziesięć powtórzeń ankirynowych i jest ekspresowane jako produkt genu wczesnego. W permissywnych komórkach ssaczy linii Vero, zarówno transfekowanych jak i zakażonych wirusem Orf, białko ANK-2 było zlokalizowane w jądrze komórkowym. Punktowa lokalizacja białka ANK-2 okazała się specyficzna dla jąderek oraz tzw. plamek jądrowych (ang. nuclear speckles). W niepermissywnych mysich komórkach linii NIH 3T3, białko ANK-2 znajdowało się głównie w cytoplazmie. Wynik ten może wskazywać na rolę białka ANK-2 w determinacji tropizmu oraz specyficzności wirusa Orf względem określonych tkanek gospodarza. Uzyskane wyniki sugerują również, że jądrowa lokalizacja białka ANK-2 jest niezależna od obecności innych białek wirusa Orf oraz jego replikacji w komórce. Mutageneza białka ANK-2 wykazała, że kluczową rolę w kierowaniu białka ANK-2 do jądra komórkowego i jego kolokalizację z jąderkami odgrywa C-terminalny fragment położony pomiędzy aminokwasami 433 i 474. Sekwencja odpowiedzialna za jądrową akumulację białka ANK-2 pokrywa się z potencjalnym sygnałem lokalizacji jądrowej (NLS) oraz rejonem ARM, podczas gdy kolokalizacja z plamkami jądrowymi wydaje się być zależna od obecności i integralności rejonów zawierających powtórzenia ankirynowe.

Białko ANK-3 zawiera dziewięć powtórzeń ankirynowych i jest ekspresowane jako produkt genu wczesnego. W zakażonych komórkach permissywnej dla wirusa Orf linii Vero ANK-3 zlokalizowane było w jądrze komórkowym, przy czym lokalizacja ta jest niespecyficzna dla jąderek. Podobny wynik zaobserwowano w komórkach transfekowanych, zarówno Vero jak i niepermissywnych komórkach NIH 3T3. Jądrowa lokalizacja białka ANK-3 wydaje się być niezależna od obecności innych białek wirusa Orf oraz jego replikacji.

Przedstawione wyniki stanowią istotny wstęp do badań mających na celu identyfikację białek komórkowych oddziaływujących z białkami ANK, a przez to mogą przyczynić się do poznania ich funkcji, w szczególności ich roli w replikacji oraz determinacji tropizmu i wirulencji wirusa Orf.