



Międzyuczelniany Wydział
Biotechnologii

Uniwersytetu Gdańskiego
i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

ROZPRAWA DOKTORSKA

Mgr Beata Marta Gromadzka

Konstrukcja i zastosowanie cząsteczek wirusopodobnych (VLPs)
do monitorowania i zapobiegania niektórym infekcjom
wywołanym przez wirusy RNA

Construction and application of virus-like particles (VLPs) to monitor
and prevent certain RNA virus infections

Praca przedstawiona
Radzie Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Gdańskiego
celem uzyskania stopnia doktora
w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych
w dyscyplinie naukowej biotechnologia

Promotor: Prof. dr hab. Bogusław Szewczyk
Zakład Szczepionek Rekombinowanych

GDAŃSK 2023

....”W mocy człowieka leży wyćpienie wszelkich zaraźliwych chorób na ziemi” A gdy to mówił, najmądrzejsi lekarze na kuli ziemskiej stukali się palcami w czoło i mówili: „Biedny człowiek –oszałał”

... – Niech pan mi ratuje synka. Niech pan go ratuje, panie Pasteur...

...

Owej nocy 6 czerwca 1885 roku po raz pierwszy istota ludzka otrzymała zastrzyk z osłabionych zarasków wścieklizny.... Potem chłopiec otrzymał kolejno czternaście zastrzyków, za każdym razem proste ukłucie igłą pod skórę. Po upływie dwu tygodni chłopiec wrócił uleczony do swej alzackiej ojczyzny, bez żadnego objawu okropnej choroby.

„Wiedza to potęga.”

Francis Bacon

Panu Profesorowi Bogusławowi Szewczykowi

za okazaną wszechstronną pomoc,
poświęcony czas, uwagę oraz cenne sugestie,
które w istotny sposób wpłynęły na ostateczną wersję tej pracy

dr hab. Andrzejowi Fitznerowi

dr hab. Krzysztofowi Śmietance

za życzliwą współpracę

Pracownikom, Koleżankom i Kolegom z Zakładu Szczepionek Rekombinowanych oraz

Zakładu Biologii molekularnej Wirusów

za wsparcie

Rodzicom

za cierpliwość i wiarę w moje możliwości

Synowi Aleksandrowi

Za wyrozumiałość oraz czas na pisanie niniejszej pracy

Mojemu Synowi.....

Wykaz publikacji i patentów wchodzących w skład niniejszej rozprawy doktorskiej

Publikacje

1. **Gromadzka B.**, Chraniuk M., Hovhannisyany L., Uranowska K., Szewczyk B., Narajczyk M., Panasiuk M., "Characterization of immune response towards generation of universal anti-HA-stalk antibodies after immunization of broiler hens with triple H5N1/NA-HA-M1 VLPs", 2022, *Viruses*, 30;14(4):730.
2. Szatraj K., Szczepankowska K. A., Sączyńska V., Florys K., **Gromadzka B.**, Łeppek K., Płucienniczak G., Szewczyk B., Zagórski-Ostojka W., Bardowski J., "Expression of avian influenza haemagglutinin (H5) and chicken interleukin 2 (chIL-2) under control of the *ptcB* promoter in *Lactococcus lactis*", 2014, *Acta Biochimica Polonica*, 61(3):609-614.
3. Uranowska K., Tyborowska J., Jurek A., Szewczyk B., **Gromadzka B.**, "Hemagglutinin stalk domain from H5N1 strain – as a potentially universal antigen", 2014, *Acta Biochim Pol.*, 61(3):541-550.
4. Rychłowska M., **Gromadzka B.**, Bieńkowska – Szewczyk K., Szewczyk B., "Application of baculovirus – insect cell expression system for human therapy", 2011, *Curr. Pharm. Biotech.*, 12:1840-1849.
5. **Gromadzka B.**, Nidzworski D., "Szczepionki – problem naukowo-gospodarczy", 2009, *Nauka i gospodarka* 1(1), s. 43-50.
6. **Gromadzka B.**, Szewczyk B., "Ocena możliwości komercjalizacji wyników prac badawczych rozwojowych z zakresu szczepionek rekombinowanych" 2008, Ekspertyza pisana na wniosek Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego.
7. **Gromadzka B.**, Śmietanka K., Dragun J., Minta Z., Góra – Sochacka A., Szewczyk B., "Detection of changes in avian influenza genome fragments by multitemperature single strand conformational polymorphism", 2008, *Mol. Cell. Probes.*, 22:301-304.
8. Fitzner A., **Gromadzka B.**, "Usefulness of recombinant RHDV antigen and VLPs based hyperimmune sera in ELISA for RHD diagnosis", 2007, *Bulletin of Veterinary Institute in Pulawy*, 51(4).
9. **Gromadzka B.**, Szewczyk B., Konopa G., Fitzner A., "Recombinant VP60 in the form of virus-like particles as the potential vaccine against RHDV.", 2006, *Acta Biochimica Polonica*, 53(2).
10. Fitzner A., **Gromadzka B.**, Kęsy A., Brycka E., Szewczyk B., "Zastosowanie rekombinowanego białka VP60 wirusa RHD do immunizacji królików", 2005, *Med. Wet.*, 61(6).
11. Szewczyk B., **Gromadzka B.**, Bieńkowska – Szewczyk K., "Budowa i molekularne mechanizmy patogenności wirusa grypy", 2005, *Influenza ptaków-zagrożenie dla ptaków i ludzi*, Red. E. Samorek-Salamonowicz, W. Kozdruń, H. Czekaj, PIW, Puławy.

Patenty

1. DNA vaccine, method of inducing the immune response, method of immunization, antibodies specifically recognizing the H5 haemagglutinin of an influenza. Application number: PCT/PI 2012/000095. Współtwórcy UG: Szewczyk B., **Gromadzka B.**, Ogłoszenie patentu z 28.03.2013 nr WO/2013/043067
2. Gen kodujący białko heterologiczne hemaglutyniny wirusa grypy ptaków, gen kodujący białko heterologiczne interleukiny kurzej drugiej (chIL-2), sposób otrzymywania tych genów, szczep bakterii mlekowych zawierający ten gen/geny, jego zastosowanie, kompozycja immunogenna, szczepionka przeciw ptasiej grypie oraz sekwencja nukleotydowa regionu promotorowego genu *ptcB*. Zgłoszenie P-391994 Współtwórcy z UG: Szewczyk B., **Gromadzka B.**, Ogłoszenie patentu z 29.08.2014 nr WUP/08/2014
3. Szczepionka DNA, sposób indukowania odpowiedzi immunologicznej, przeciwciała specyficznie rozpoznające białko hemaglutyniny H5 wirusa grypy i zastosowanie szczepionki DNA. Zgłoszenie P.396415 z 23.09.2011. Współtwórcy z UG: **Gromadzka B.**, Szewczyk B.
4. Means of constructing lactic acid bacteria strains containing genes encoding heterologous avian influenza virus haemagglutinin and chicken interleukin-2 (chIL-2) proteins and their production, lactic acid bacteria strain(s) carrying these genes (or gene), their application to induce an effective immune response against the avian influenza virus and application of the *ptcB* gene promoter region to optimize the production of heterologous proteins. Application number: PCT/EP 2012/050097, submission no.: 1458215. Współtwórcy UG: Szewczyk B., **Gromadzka B.**
5. Sposób wytwarzania rekombinowanej szczepionki przeciwko krwotocznej chorobie królików, szczepionka oraz zastosowanie antygeny rekombinowanego białka do wytwarzania szczepionki. – zgłoszenie nr P.376122 z 2005-07-08, ogłoszenie o udzieleniu patentu 2009-09-10. Twórcy: Szewczyk B., **Gromadzka B.**, Kęsy A., Fitzner A.
6. Zestaw diagnostyczny do badania surowic zwierząt na obecność przeciwciał RHD oraz zestaw diagnostyczny do wykrywania wirusa RHD – zgłoszenie nr P.376121 z 2005-07-08, ogłoszenie o udzieleniu patentu 2009-09-10. Twórcy: Szewczyk B., **Gromadzka B.**, Kęsy A., Fitzner A.

Szkolenia i staże związane z wykonaniem przedstawianej pracy doktorskiej

The Sixth Brazil School for Single Particle Cryo-EM – Socorro, Brazylia; 14-26.08.2014

Novel SF9 cell line for stable production of proteins – Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica, Lisboa; 29 -31.05.2014

Test Hemaglutynacji i zahamowania Hemaglutynacji jako podstawowa technika serologiczna do oznaczania wirusa grypy – Państwowy Instytut Weterynarii w Puławach, Puławy; 12-16.10.2009

Zastosowanie mikroskopii elektronowej do obrazowania wirusów oraz cząstek wirusopodobnych – Zakład Mikroskopii Elektronowej Uniwersytet Gdański, Gdańsk; 12 miesięcy, 2003

Namnażanie wirusa grypy w zarodkach kurzych - Państwowy Instytut Weterynarii w Puławach, Puławy; 10-17.10.2003

Spis treści

1. Wykaz stosowanych skrótów.....	7
2. Streszczenie	11
2.1. Streszczenie w języku polskim	11
2.2. Streszczenie w języku angielskim (Abstract).....	14
3. Wstęp	17
3.1 Szczepionki	17
3.2. Cząsteczki wirusopodobne.....	21
3.2.1. Typy cząsteczek wirusopodobnych	21
3.3. Bioinżynieria cząstek wirusopodobnych	23
3.4. Odpowiedź immunologiczna a cząstki wirusopodobne.....	25
3.5. Komercyjne preparaty szczepionkowe zawierające cząstki wirusopodobne.....	27
3.6. Systemy do produkcji cząstek wirusopodobnych.....	27
3.6.1. System bakteryjny jako platforma do produkcji cząstek wirusopodobnych.....	29
3.6.2. System drożdżowy jako platforma do produkcji cząstek wirusopodobnych	29
3.6.3. System oparty na produkcji białek w komórkach owadzych jako platforma do produkcji cząstek wirusopodobnych	29
3.6.4. System do produkcji białek w komórkach ssaczych jako platforma do produkcji cząstek wirusopodobnych	32
3.6.5. System produkcji cząstek wirusopodobnych w roślinach	32
3.7. Zastosowanie VLPs	33
3.8. Modele badawcze cząsteczek wirusopodobnych.....	33
3.8.1. Wirus grypy typu A; pierwszy model badawczy	34
3.8.2. Wirus gorączki krwotocznej królików; drugi model badawczy	46
4. Cel pracy.....	55
5. Materiały	57
5.1. Rekombinanty bakulowirusowe.....	57
5.2. Szczepy wirusów RNA	57
5.2.1 Wirus grypy typu A	57
5.2.2 Wirus gorączki krwotocznej królików	57
5.3. Szczepy bakteryjne.....	58
5.4. Linie komórkowe.....	58
5.5. Wektory.....	58
5.6. Pożywki	58
5.7. Odczynniki do pracy z DNA i RNA	59
5.8. Odczynniki do pracy z bakteriami	60

5.9. Roztwory antybiotyków	60
5.10. Bufory i roztwory do pracy z białkami i cząstkami wirusopodobnymi.....	60
5.11. Przeciwciała	63
5.12. Aparatura	65
6. Metody	67
6.1. Metody namnażania wirusa grypy	67
6.1.1. Namnażanie wirusa grypy na zarodkach kurzych	67
6.1.2. Namnażanie wirusa grypy w komórkach MDCK	67
6.2. Metody pracy z RNA	67
6.2.1. Izolacja RNA wirusowego.....	67
6.2.2. Reakcja odwrotnej transkrypcji pełnej długości genów wirusa grypy typu A szczepu H5N1 A/swan/Poland 305/ 2006 HPAIV (ang. Reverse Transcription)	68
6.3. Metody pracy z DNA.....	69
6.3.1. Reakcja PCR pełnej długości genów HA, NA, M1 wirusa grypy typu A szczepu H5N1 A/swan/Poland 305-135V08-2006 HPAIV (ang. highly pathogenic avian influenza virus)	69
6.3.2. Projektowanie oraz konstrukcja plazmidów do produkcji cząstek wirusopodobnych wirusa grypy typu A	69
6.3.3. Projektowanie i konstrukcja uniwersalnego antygeny w formie nóżki HA	70
6.3.4. Izolacja DNA plazmidowego z bakterii	70
6.3.5. Elektroforeza agarozowa	72
6.3.6. Izolacja DNA z żelu agarozowego	72
6.3.7. Oczyszczanie DNA po reakcjach enzymatycznych.....	72
6.3.8. Trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi	72
6.3.9. Ligacja	73
6.4. Systemy do ekspresji heterologicznych białek.....	73
6.4.1. Bakulowirusowy system ekspresji genów Bac-to-Bac™	73
6.4.2. Owadzi system ekspresji genów	76
6.4.3. Bakteryjny system ekspresji genów	76
6.4.4. Ssaczy system ekspresji genów.....	77
6.5. Techniki pracy z białkami	77
6.5.1. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w obecności SDS (SDS-PAGE)	77
6.5.2. Elektrotransfer białek z żelu poliakrylamidowego na membranę PVDF	78
6.5.3. Immunodetekcja białek na membranie PVDF metodą Western Blotting	78
6.5.4. Oczyszczanie białek z błony typu PVDF	78
6.5.5. Badanie aktywności rekombinowanych białek oraz cząstek wirusopodobnych	79
6.6. Techniki mikroskopowe	80
6.6.1. Transmisyjna mikroskopia elektronowa i barwienie negatywowe	80
6.7. Techniki pracy z cząstkami wirusopodobnymi.....	80
6.7.1. Produkcja bezosłonkowych VLPs-RHDV w komórkach owadzych	80
6.7.2. Produkcja osłonkowych VLPs wirusa grypy w komórkach owadzych	81
6.7.3. Przygotowanie antygenów do szczepień.....	81
6.8. Techniki immunologiczne	81
6.8.1. Test immunoperoksydazowy w hodowlach jednowarstwowych.....	81
6.8.2. Produkcja monospecyficznej surowicy poliklonalnej	82
6.8.3. Test zahamowania hemaglutynacji	82
6.8.4. Charakterystyka cząsteczek wirusopodobnych w teście ELISA	82

6.9. <i>Badania na modelu zwierzęcym</i>	83
Szczepienia królików	83
Szczepienia kur	84
6.10. <i>Analiza odpowiedzi immunologicznej po szczepieniu preparatami o potencjale ochronnym</i> 84	
6.10.1 Ocena ilościowa dynamiki narastania przeciwciał w odpowiedzi immunologicznej na szczepienie H5N1-HA VLP, H5N1-HA/M1 VLP i H5N1-HA/NA/M1 VLP u kur za pomocą testu ELISA	84
6.10.2 Charakterystyka odpowiedzi immunologicznej na szczepienie kur preparatem H5N1-HA/NA/ M1 VLP w formułacji z pełnym i z niekompletnym adjuwantem testem ELISA	85
6.10.3. Ocena dynamiki narastania przeciwciał w czasie w odpowiedzi immunologicznej na szczepienie H5N1-HA/NA/M1 VLP u kur za pomocą testu ELISA.....	85
6.10.4. Miareczkowanie do punktu końcowego surowic od kurcząt immunizowanych H5N1-HA/NA /M1 VLP w teście ELISA.....	86
6.10.5. Ekspresja i charakterystyka uniwersalnego antygeny hemaglutyniny w formie HA stalk w komórkach owadzych za pomocą testu typu IPMA z monoklonalnymi przeciwciałami anti-H1N1 lub uniwersalnymi przeciwciałami Fi6.....	86
6.10.6. Analiza reaktywności krzyżowej puli uniwersalnych przeciwciał powstałych w wyniku szczepienia kur preparatami zawierającymi H5N1-HA/NA/M1 VLP; detekcja homologicznego i heterologicznych antygenów w formie HA stalk w komórkach ssaczy za pomocą testu IPMA	86
6.10.7. Analiza reaktywności krzyżowej heteropodtypowej domeny LAH z ludzkiego szczepu H3N2 w obrębie HA2 domeny z surowicami kurzymi po szczepieniu potrójnymi VLP H5N1/NA-HA-M1 ; Test peptydowy ELISA.....	87
6.11. <i>Ocena skuteczności prototypu szczepionki nowej generacji przeciwko RHDV, eksperyment typu „challenge”</i>	88
6.12. <i>Analiza statystyczna</i>	88
6.13. <i>Analiza porównawcza sekwencji aminokwasowych obejmujących wysoce konserwowany rejon długiej alfa helisy (LAH) w obrębie badanych antygenów w postaci HA stalk</i>	89
6.14. <i>Analiza pełnej długości sekwencji aminokwasowej kodującej strukturalne białka</i>	89
7. Wyniki	91
7.1. <i>Pierwszy model badawczy - osłonkowe cząstki wirusopodobne wirusa grypy typu A</i>	91
7.1.1. Amplifikacja i charakterystyka genów kodujących białka HA, NA, M1 krajowego izolatu wirusa grypy typu A H5N1.....	91
7.1.2. Cząstki wirusopodobne grypy szczepu H5N1	93
7.1.2.1. Produkcja i oczyszczanie cząstek wirusopodobnych zawierających na swojej powierzchni glikoproteinę HA (H5N1-HA VLPs)	95
7.1.2.2. Produkcja i oczyszczanie cząsteczek wirusopodobnych zawierających glikoproteinę HA oraz białko rdzenia M1 (H5N1-HA/M1 VLPs)	97
7.1.2.3. Produkcja i oczyszczanie cząsteczek wirusopodobnych zawierających glikoproteiny HA, NA oraz białko rdzenia	100
7.1.2.4. Produkcja i oczyszczanie cząsteczek wirusopodobnych zawierających glikoproteiny HA, NA oraz białko rdzenia	100
7.1.3. Badanie właściwości immunogennych otrzymanych VLPs	102
7.2. <i>Drugi model badawczy bezosłonkowych ikozaedralnych cząstek wirusopodobnych - VLPs wirusa krwotocznej choroby królików</i>	115
7.2.1. Charakterystyka molekularna białka VP60 wirusa RHD polskiego izolatu SGM jako białka samoformującego cząstki wirusopodobne wirusa RHD	115
7.2.2. Określenie budowy oraz identyfikacja procesu tworzenia VLPs wirusa gorączki krwotocznej królików polskiego izolatu SGM o właściwościach hemaglutynujących	116

7.2.3. Ocena skuteczności preparatów szczepionkowych zawierających antygen w formie cząstek wirusopodobnych - eksperyment typu „challenge”	121
7.2.4. Wykorzystanie antygenów w postaci VLPs oraz surowic odpornościowych do opracowania testów diagnostycznych.....	122
8. Dyskusja.....	129
8.1. Wirus grypy typu A H5N1	130
8.2. Wirus gorączki krwotocznej królików - RHDV	138
8.3. Podsumowanie	142
9. Bibliografia	143

1. Wykaz stosowanych skrótów

- AcNPV** –wirus poliedrozy jądrowej (ang. *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus)
- ADCC** - cytotoksyczność komórkowa zależna od przeciwciał (ang. antibody dependent cellular cytotoxicity)
- AEC** – 3-amino-9-etylo-karbazol
- AIV** – wirus ptasiej grypy (ang. avian influenza virus)
- APC** – grupa komórek prezentujących antygeny podczas odpowiedzi immunologicznej (ang. antigen presenting cells)
- RT-AMV**- odwrotna transkryptaza retrowirusa ptasiego (ang. reverse transcriptase from avian myeloblastosis virus)
- AP** –alkaliczna fosfataza (ang. alkaline phosphatase)
- APS** – nadsiarczan amonu (ang. ammonium persulfate)
- BAC** – rekombinowany bakulowirus (ang. baculovirus)
- BCIP** – 5-bromo-4-chloro-3-indolilofosforan
- BPiP** – 5-[(4-bromofenyl)metylo]-2-fenyl-5H-imidazo[4,5-c]pirydyna
- BSA** – albumina bydlęca (ang. bovine serum albumin)
- CD4+** - koreceptor receptora limfocytów T pomocniczych (Th) (ang. cluster of differentiation 4)
- CD8+** - koreceptor receptora limfocytów T cytotoksycznych (LTc) (ang. cluster of differentiation 8)
- CT** – ogonek cytoplazmatyczny białek (ang. cytosolic tail)
- D-MEM** – pożywka do hodowli komórek ssaczych (ang. Dulbecco's modified Eagle's medium)
- DMF** – dimetyloformamid
- DMSO** – dimetylosulfotlenek
- DTP** - szczepionka błoniczo-tężcowo-krztuścowa, adsorbowana
- DTT** – ditiotreitol
- ECL** – wzmacniona chemiluminescencja (ang. enhanced chemiluminescence)
- EDTA** – etanolodiamina (ang. ethylenediaminetetraacetic acid)
- EPs** – zewnątrzkomórkowe nanostruktury (ang. extracellular particles)
- ER** – retikulum endoplazmatyczne, siateczka śródplazmatyczna (ang. endoplasmic reticulum)
- FBS** – bydlęca surowica płodowa (ang. fetal bovine serum)
- GlcNAc** – N-acetyloglukozamina
- H5N1** – wysokopatogeny szczep wirusa grypy typu A
- HA** – hemaglutynina, główna glikoproteina wirusa grypy typu A
- HAa** – test hemaglutynacji (ang. hemagglutination assay)
- HA0** – prekursor hemaglutyniny
- HA1** – podjednostka pierwsza hemaglutyniny
- HA2** - podjednostka druga hemaglutyniny
- HBGA** - antygeny grup krwi (ang. histo-blood group antigens)
- HBV** – wirus zapalenia wątroby typu B (ang. hepatitis B virus)
- HCV** – wirus zapalenia wątroby typu C (ang. hepatitis C virus)
- HEPES** – kwas hydroksyetylodietylenodiaminoetanolosulfonowy
- HEV** – wirus zapalenia wątroby typu E (ang. hepatitis E virus)
- HI** – test zahamowania hemaglutynacji (ang. hemagglutination inhibition assay)
- Hib** - *Haemophilus influenzae* typu b
- HIV** – ludzki wirus niedoboru odporności (ang. human immunodeficiency virus)
- HPAI** – wysokopatogeny szczep wirusa ptasiej grypy (ang. high pathogenic avian influenza)
- HPV** – wirus brodawczaka ludzkiego (ang. human papilloma virus)

HRP - peroksydaza chrzanowa (ang. horseradish peroxidase)
IL – interleukiny
IPMA – test immunoperoksydazowy w hodowlach jednowarstwowych (ang. immunoperoxidase monolayer assay)
IPTG – izopropylotiogalaktozyd
LAIV – żywa atenuowana szczepionka przeciwko grypie dla ludzi (ang. live attenuated influenza vaccine)
LPAI – niskopatogeny szczep wirusa ptasiej grypy (ang. low pathogenic avian influenza)
LTc – limfocyty T cytotoksyczne
M1 – główne białko strukturalne rdzenia wirusa grypy typu A
M2 – białko strukturalne, tworzące kanał jonowy wirusa grypy typu A
MDCK – linia komórek psiej nerki (ang. Madin-Darby canine kidney cells)
MHC – główny układ zgodności tkankowej (ang. major histocompatibility complex)
MLV – wirus białaczki mysiej (ang. murine leukemia virus)
MPAI – średnio patogeny szczep wirusa ptasiej grypy (ang. mildly pathogenic avian influenza)
MOI – liczba cząsteczek wirusowych przypadających na jedną komórkę (ang. multiplicity of infection)
M-MLV – wirus mysiej białaczki Moloney'a (ang. Moloney murine leukaemia virus)
NA – neuraminidaza, glikoproteina wirusa grypy typu A
NBT – błękit nitrotetrazoliowy (ang. nitroblue tetrazolium)
NeuAc – kwas N-acetyloneuraminowy
NEP – NS2, białko niestrukturalne wirusa grypy typu A (ang. nuclear export protein)
NES – sygnał eksportu jądrowego (ang. nuclear export signal)
NK – komórki układu odpornościowego (ang. natural killers)
NP – nukleoproteina, białko strukturalne wirusa grypy typu A
NS – białka niestrukturalne (ang. non-structural proteins)
NS1 – białko niestrukturalne wirusa grypy typu A (ang. non-structural protein 1)
NSL – sygnał lokalizacji jądrowej (ang. nuclear localization signals)
NTA – N - terminalna część białka (ang. N - terminal arm)
ntc – próba bez obecności matrycy (ang. no template control)
OPD - orto-fenylo-diamina
ORF – otwarta ramka odczytu (ang. open reading frame)
p10 – promotor bakulowirusowy p10
PA – białko funkcjonalne wchodzące w skład kompleksu polimerazy RNA wirusa grypy typu A
PAMP - wzorce molekularne związane z patogenami (ang. pathogen associated molecular patterns)
PB1- białko funkcjonalne wchodzące w skład kompleksu polimerazy RNA wirusa grypy typu A
PB2 - białko funkcjonalne wchodzące w skład kompleksu polimerazy RNA wirusa grypy typu A
PBS – buforowana fosforanem sól fizjologiczna (ang. phosphate buffered saline)
PBST - buforowana fosforanem sól fizjologiczna z dodatkiem detergentu niejonowego (ang. phosphate buffered saline with Tween)
PBT - bufor fosforanowy z dodatkiem detergentu niejonowego i BSA (ang. phosphate buffered saline with Tween and BSA)
pFB1 - pFastBac1 – plazmid transferowy systemu bakulowirusowego
Pfu – jednostka formująca łysinkę (ang. plaque forming units)
pPol – promotor polihedryny w systemie bakulowirusowym
PRP - receptory rozpoznające wzorce molekularne patogenów (ang. pattern recognition receptors)
PRV – wirus pseudowścieklizny (ang. pseudorabies virus)
PVDF – polifluorek winylidenu
RCV - niepatogenne szczepy wirusa gorączki krwotocznej królików (ang. rabbit calicivirus)

rER – szorstka siateczka śródplazmatyczna (ang. rough endoplasmic reticulum)

RHD – choroba krwotoczna królików (ang. rabbit haemorrhagic disease)

RHDV – wirus gorączki krwotocznej królików (ang. Rabbit Haemorrhagic Disease Virus)

RHDVa – wirus gorączki krwotocznej królików wariant antygenowy (ang. antigenic variant of Rabbit Haemorrhagic Disease Virus)

Sa α 2,6Gal – receptor dla ludzkich szczepów wirusa grypy typu A; kwas sialowy połączony z galaktozą wiązaniem α 2,6

Sa α 2,3Gal – receptor dla ptasich szczepów wirusa grypy typu A; kwas sialowy połączony z galaktozą wiązaniem α 2,3

SARS - zespół ostrej ciężkiej niewydolności oddechowej (ang. severe acute respiratory syndrome)

SDS – dodecylsulfat sodu (ang. sodium dodecyl sulfate)

SDS-PAGE – elektroforeza poliakrylamidowa w warunkach denaturujących (ang. sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)

Sf9 – komórki owadzie *Spodoptera frugiperda*

SGM – izolat wirusa gorączki krwotocznej królików

SPF – wolne od patogenów (ang. specific pathogen free)

TAE – bufor Tris-octan-EDTA (ang. Tris-acetate-EDTA buffer)

TBE – bufor Tris-boran-EDTA (ang. Tris-borate-EDTA)

TBS – sól fizjologiczna buforowana Trisem (ang. Tris-buffered saline)

TBST - sól fizjologiczna buforowana Trisem z dodatkiem detergentu niejonowego (ang. Tris-buffered saline with Tween 20)

TCA – kwas trójchlorooctowy (ang. trichloroacetic acid)

TCID₅₀ – dawka wirusa, która powoduje zakażenie 50% hodowli komórek (ang. Tissue Culture Infective Dose 50)

TE – bufor Tris-EDTA

TEMED – N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina

Thr – treonina

TIV – inaktywowana trójwalentna szczepionka przeciwko grypie (ang. trivalent inactivated vaccine)

TM – bufor Tris z siarczanem magnezu do mikroskopii elektronowej (ang. Tris-magnesium sulphate buffer)

TMB – 3,3',5,5'-tetrametylobenzydyna

TMD – rejon transbłonowy w obrębie białka (ang. trans membrane domain)

TPCK - **modyfikowana trypsyna** – modyfikowana chlorometyloketonem tosylofenyloalaniny trypsyna uzyskana z trzustki bydła

TREM – receptory rozpoznające molekularne wzorce patogenów, stanowiące podrodzinę w obrębie PRP (ang. triggering receptor expressed on myeloid cells-TREM)

Tris – Tris (hydroksyetyloamino) metan

UTR – rejon nieulegający translacji (ang. untranslated region)

VHD – wirusowa choroba krwotoczna (ang. viral haemorrhagic disease)

VLPs – cząstki wirusopodobne (ang. virus-like particles)

eVLPs – cząstki wirusopodobne zawierające osłonkę lipidową (ang. enveloped VLPs)

cVLPs – chimeryczne cząstki wirusopodobne (ang. chimeric VLPs)

VP10 – strukturalne białko wirusa gorączki krwotocznej królików

VP60 – strukturalne białko wirusa gorączki krwotocznej królików

VR – rejon zmienny (ang. variable region)

vRNA – wirusowy kwas rybonuleinowy (ang. viral RNA)

vRNP – wirusowa rybonukleoproteina (ang. viral ribonucleoprotein)

WIV – inaktywowana szczepionka przeciwko grypie oparta na całym inaktywowanym wirusie grypy
(ang. whole inactivated virus)

WZW A – wirus zapalenia wątroby typu A

WZW B - wirus zapalenia wątroby typu B

2. Streszczenie

2.1. Streszczenie w języku polskim

Intensyfikacja badań w dziedzinie wirusologii doprowadziła w ciągu ostatnich lat do identyfikacji ponad 30 nowych patogenów odpowiadających za choroby zakaźne. Dużą część nowo opisanych czynników etiologicznych stanowią wirusy RNA, takie jak: wirus zapalenia wątroby typu C – HCV (ang. hepatitis C virus), wirus zespołu nabytego braku odporności – HIV (ang. human immunodeficiency virus), wirus powodujący ostre zapalenie żołądka i jelit – hNoV (ang. human norovirus), odzwierzęce szczepy wirusa grypy (szczepy H5N1, H7N9) oraz nowy szczep koronawirusa - SARS-CoV-2. Rozwój biologii molekularnej, inżynierii genetycznej, bioinformatyki i nanotechnologii umożliwił opracowanie alternatywnych metod badania groźnych patogenów. Nowoczesne preparaty profilaktyczne mające na celu zapobieganie infekcjom wirusowym często jako antygen zawierają cząstki wirusopodobne VLPs (ang. virus-like particles). Prace nad uzyskaniem cząstek wirusopodobnych, które imitują natywne wirusy stały się ważnym nurtem badań podstawowych. Uzyskanie cząstek wirusopodobnych dla wirusów RNA umożliwia poznanie biologii molekularnej tych patogenów oraz ich cyklu replikacyjnego, co w konsekwencji przyczynia się do opracowania lepszych, bezpiecznych preparatów szczepionkowych oraz nowych technik diagnostycznych. Preparaty ochronne jak również czułe testy diagnostyczne są podstawą w zapobieganiu i monitorowaniu chorób nie tylko u ludzi, ale również u zwierząt. W Polsce opisano olbrzymie straty ekonomiczne związane z epidemiami wywołanymi przez takie wirusy RNA jak, wirus ptasiej grypy czy też króliczy kaliciwirus. Monitorowanie oraz zapobieganie infekcjom wywołanym przez te czynniki etiologiczne w znaczny sposób wpłynęłoby na ograniczenie strat ekonomicznych związanych z hodowlą drobiu oraz królików.

Rozprawa doktorska przedstawia opracowanie metod do monitorowania i zapobiegania infekcjom wywołanym przez wybrane wirusy RNA powodujące duże straty ekonomiczne w Polsce. W ramach prowadzonych badań głównym celem była konstrukcja i charakterystyka cząstek wirusopodobnych (VLPs) uzyskanych dla polskich szczepów terenowych wirusów RNA i wykorzystanie ich do opracowania preparatów szczepionkowych oraz testów diagnostycznych.

W niniejszej pracy wykorzystano dwa modele cząstek wirusopodobnych: ortomyksowirusa - wirusa grypy typu A H5N1 – IVA/H5N1 oraz kaliciwirusa – wirusa gorączki krwotocznej królików (ang. rabbit haemorrhagic disease virus - RHDV). Wybrane modele badawcze są przykładem dwóch typów cząstek wirusopodobnych: ikozaedralnych nanostruktur

biologicznych zbudowanych z jednego białka kapsydu dla wirusa gorączki krwotocznej królików oraz złożonych cząstek wirusopodobnych składających się z osłonki lipidowej i z wielu białek strukturalnych dla wirusa grypy typu A. Prezentowane modele badawcze wybrano w oparciu o realne problemy epidemiologiczne związane z wybuchem epidemii wirusa grypy typu H5N1 na terenie Polski oraz szerzącym się problemem pomoru królików spowodowanym infekcją króliczym kaliciwirusem (RHDV.1) w Europie. Polskie szczepy wirusowe obu patogenów posłużyły do skonstruowania oraz scharakteryzowania cząstek wirusopodobnych w celu opracowania zarówno testów diagnostycznych, jak i preparatów profilaktycznych.

Pierwszym modelem badawczym był ortomyksowirus – IVA/H5N1. Badania prowadzone w ramach rozprawy doktorskiej miały na celu charakterystykę polskiego izolatu terenowego wysokopatogennego szczepu wirusa grypy typu A H5N1 oraz konstrukcję i opracowanie testów diagnostycznych, jak również preparatów ochronnych dla ptactwa hodowlanego. Do badań użyto krajowe szczepy wirusa grypy H5N1 wyizolowane w 2006 roku. Materiał genetyczny wirusa grypy uzyskano w postaci RNA z Państwowego Instytutu Weterynaryjnego w Puławach. Poszczególne sekwencje genów (*ha*, *na*, *m1*) zsekwencjonowano, a następnie wykonano charakterystykę polskiego izolatu na podstawie analiz *in silico*. W ramach niniejszej pracy uzyskano: (i) antygeny wirusa grypy typu A H5N1 wyprodukowane w systemie bakulowirusowym (hemaglutyninę - HA, neuraminidazę - NA, białko rdzenia - M1 oraz skróconą formę nóżki hemaglutyniny - HA stalk); (ii) surowice poliklonalne uzyskane w wyniku szczepienia królików oczyszczonymi glikoproteinami powierzchniowymi NA i HA. Ponadto badania dowiodły, że ekspresja genów kodujących białka strukturalne (HA, NA, M1) w komórkach owadzych prowadzi do tworzenia się biologicznych nanostruktur określanych jako cząstki wirusopodobne. Uzyskano trzy typy cząstek wirusopodobnych wirusa grypy H5N1 w komórkach owadzych: H5N1-HA VLPs zawierające główną glikoproteinę powierzchniową HA, H5N1-HA/M1 VLPs zawierające glikoproteinę HA oraz białko rdzenia M1 oraz H5N1-NA/HA/M1 VLPs cząstki zawierające obie glikoproteiny HA, NA oraz białko rdzenia M1. Ocena właściwości immunogennych uzyskanych nanostruktur wykazała, że szczepienie kur oczyszczonymi cząstkami wirusopodobnymi H5N1-HA VLPs, H5N1-HA/M1 VLPs, H5N1-HA/NA/M1 VLPs stymulowało układ immunologiczny oraz prowadziło do powstania przeciwciał neutralizujących. Oczyszczone cząstki wirusopodobne mogą stanowić antygeny referencyjne do testów serologicznych takich jak zahamowanie hemaglutynacji (HI) oraz do testów ELISA. Dodatkowo uzyskane surowice oraz antygeny w formie VLPs stanowią cenne narzędzia wykorzystywane do testów diagnostycznych.

Ponadto w ramach niniejszej pracy uzyskano wysoce konserwowane uniwersalne antygeny wirusa grypy w formie białka hemaglutyniny pozbawionej części zmiennej „główki”. Ekspresja skróconej formy genu kodującego hemaglutyninę w formie nóżki HA (ang. HA stalk) zawierającej silnie konserwowany rejon LAH (ang. long alfa helix) potwierdziła uniwersalny charakter produkowanego białka. Uzyskane wyniki sugerują, iż w wyniku szczepienia kur cząstkami H5N1-HA/NA/M1 VLPs powstaje pula uniwersalnych przeciwciał rozpoznających konserwowane epitopy zlokalizowane w obrębie rejonu nóżki różnych hemaglutynin w formie HA stalk.

Prace wykonane w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej stanowiły część projektu wdrożeniowego pn. „Centrum biotechnologii produktów leczniczych. Pakiet innowacyjnych biofarmaceutyków dla terapii i profilaktyki ludzi i zwierząt” (nr umowy POIG.01.01.02-14-007/08-00), który miał na celu **opracowanie szczepionki przeciwko wysoce zjadliwej grypie ptaków**.

Drugim modelem badawczym był króliczy kaliciwirus. W ramach niniejszej pracy doktorskiej przeanalizowano oraz scharakteryzowano polski szczep terenowy wirusa RHD (szczep SGM). Charakterystyka molekularna szczepu wirusa wykazała, że produkcja głównego białka kapsydu (białka VP60) w komórkach owadzych prowadzi do samoformowania się cząstek wirusopodobnych (VLPs-RHDV), które swoją morfologią imitują natywnego wirusa. Wykazano zasadność wykorzystania VLPs-RHDV jako potencjalnej szczepionki profilaktycznej dla królików oraz opracowano testy diagnostyczne do monitorowania zakażeń wirusem RHD w oparciu o uzyskane cząstki wirusopodobne. Dodatkowo w ramach niniejszej pracy zbadano i wykazano wieloletnią stabilność cząstek wirusopodobnych VLPs-RHDV. Prace wykonane w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej były również częścią projektu KBN o nr 3P04B01923 zatytuowanego „**Ekspresja cząstek wirusopodobnych króliczego kaliciwirusa i konstrukcja potencjalnej szczepionki podjednostkowej przeciwko wirusowej chorobie krwotocznej królików**”.

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy doktorskiej wskazują na możliwość wykorzystania cząsteczek wirusopodobnych jako antygenów do opracowywania szczepionek nowej generacji dla zwierząt. Dodatkowo uzyskane narzędzia do badań w postaci surowic i antygenów mogą mieć zastosowanie komercyjne. Opisane wyniki dostarczyły nowych i cennych informacji, mogących przyczynić się do zaprojektowania efektywnych preparatów ochronnych, zarówno przeciwko wirusowi grypy typu A, jak i wirusowi RHD.

2.2. Streszczenie w języku angielskim (Abstract)

In recent years, the intensification of virology research has led to the discovery of over thirty new pathogens responsible for infectious diseases. The majority of newly described etiological agents are RNA viruses, such as hepatitis C virus (HCV), human immunodeficiency virus (HIV), acute gastroenteritis virus (hNoV) (human norovirus), zoonotic influenza virus strains (H5N1, H7N9 strains), and SARS-CoV-2.

The development of molecular biology, genetic engineering, bioinformatics, and nanotechnology has allowed for the creation of alternative methods for studying dangerous pathogens. Virus-like particles (VLPs) are commonly employed as antigens in contemporary prophylactic preparations designed to prevent viral infections. Developing virus-like particles that mimic native viruses has become a crucial area of fundamental research. Obtaining virus-like particles for RNA viruses makes it possible to comprehend the molecular biology and replication cycle of these pathogens, which contributes to the development of safer, more effective vaccines and novel diagnostic tools. The basis for the prevention and surveillance of diseases not only in humans, but also in animals, is the use of protective agents and sensitive diagnostic tests.

In Poland, epidemics generated by RNA viruses, such as the avian influenza virus and the rabbit calicivirus, have been linked to high economic losses. Monitoring and preventing infections caused by these etiological agents would substantially decrease the economic losses associated with poultry and rabbit farming. The doctoral thesis describes the development of methods for monitoring and preventing infections induced by certain RNA viruses in Poland that cause significant economic losses. The primary objective of the research was the construction and characterization of virus-like particles (VLPs) obtained for Polish environmental strains of RNA viruses and their application in the development of vaccines and diagnostic tests. Two models of virus-like particles were tested in this study: orthomyxovirus (influenza A virus H5N1) (IVA/H5N1) and calicivirus (rabbit haemorrhagic disease virus) (RHDV). The selected research models represent two types of virus-like particles: icosahedral biological nanostructures composed of a single capsid protein for rabbit haemorrhagic fever virus and complex virus-like particles with a lipid envelope and several structural proteins for influenza type A virus. Real epidemiological concerns associated with the outbreak of H5N1 influenza virus in Poland and the spread of rabbit fever due to infection with rabbit calicivirus (RHDV.1) in Europe served as the basis for the selection of the presented research models. Polish viral

strains of both pathogens were used to construct and characterize virus-like particles in order to develop diagnostic and preventative treatments.

The first model for scientific research was the orthomyxovirus IVA/H5N1. The purpose of the doctoral dissertation research was to characterize a Polish wild isolate of a highly pathogenic strain of influenza A H5N1 virus, as well as construct and develop diagnostic assays and protective treatments for poultry. In this research, domestic H5N1 influenza virus strains isolated in 2006 were utilized. The influenza virus genetic material was obtained from the National Veterinary Institute in Pulawy in the form of RNA. Individual gene sequences (ha, na, and m1) were sequenced, and the Polish isolate was then characterized using *in silico* analyses. The following were obtained as part of this project: (i) influenza A virus H5N1 antigens produced in a baculovirus system (haemagglutinin - HA, neuraminidase - NA, core protein - M1 and a shortened form of hemagglutinin stem - HA stalk); (ii) rabbit polyclonal sera obtained by immunization of rabbits with purified NA and HA surface glycoproteins. In addition, research has demonstrated that the expression of genes encoding structural proteins (HA, NA, and M1) in insect cells results in the formation of biological nanostructures known as virus-like particles. Insect cells were used to produce three types of virus-like particles derived from the H5N1 influenza virus: H5N1-HA VLPs containing the major surface glycoprotein HA, H5N1-HA/M1 VLPs containing the HA glycoprotein and the M1 core protein, and H5N1-NA/HA/M1 VLPs containing the HA glycoprotein, NA, and the M1 core protein. Evaluation of the immunogenic properties of the obtained nanostructures revealed that vaccination of chickens with H5N1-HA VLPs, H5N1-HA/M1 VLPs, and H5N1-NA/HA/M1 VLPs stimulated the immune system and led to the formation of neutralizing antibodies. The purified virus-like particles can serve as reference antigens for serological tests, including hemagglutination inhibition (HI) and ELISA assays. Furthermore, the obtained sera and antigens in the form of VLPs are valuable tools for diagnosis.

In addition, the objective of this research was to generate highly conserved universal influenza virus antigens in the form of hemagglutinin protein without the variable head region. The expression of a truncated form of the hemagglutinin gene in the form of a HA stalk containing a highly conserved LAH region (long alpha helix) confirmed the universal nature of the produced protein. The obtained results suggest that vaccination of hens with H5N1-HA/NA/M1 VLPs results in the formation of a pool of universal antibodies that recognize conserved epitopes located in the stalk region of various hemagglutinins in the form of a HA stalk.

The work performed for this doctoral dissertation was an integral part of the implementation project designated "Centre for the Biotechnology of Medicinal Products." The POIG.01.01.02-14-007/08-00 contract was for the development of a vaccine against highly pathogenic avian influenza.

Rabbit calicivirus was the second research model. In the present research, the Polish strain (SGM strain) of the RHD virus was analyzed. Molecular characterization of the virus strain revealed that the production of the main capsid protein (VP60 protein) in insect cells leads to the self-assembly of virus-like particles (VLPs-RHDV) that are morphologically similar to the native virus. The effectiveness and practicability of using VLPs-RHDV as a potential prophylactic vaccine for rabbits have been demonstrated, and diagnostic assays for monitoring RHD virus infections based on the virus-like particles have been developed. In addition, the long-term stability of VLPs-RHDV virus-like particles was examined and demonstrated in this study. This doctoral dissertation also contributed to KBN project 3P04B01923 entitled "Expression of virus-like particles of rabbit calicivirus and construction of a potential subunit vaccine against viral haemorrhagic disease of rabbits."

Using virus-like particles as antigens in the development of animal vaccines of the next generation is reasonable, according to the findings of this dissertation. In addition, the obtained research tools, such as serums and antigens, can be implemented commercially. The findings that were described provided new and valuable information that could contribute to the design of effective protective preparations against both influenza A virus and RHD virus.

3. Wstęp

Monitorowanie i zapobieganie chorobom wywoływanym przez wirusy RNA jest jednym z fundamentalnych ogniw wielokierunkowej polityki zdrowotnej, mającym na celu zminimalizowanie zagrożeń wynikających z wywoływanych przez nie chorób. Jednym z głównych rozwiązań wspomagających tę strategię są szczepienia profilaktyczne oraz odpowiednio prowadzona diagnostyka w celu monitorowania rozprzestrzeniania się danego czynnika etiologicznego. Najlepszym przykładem tej polityki jest ogólnoswiatowa strategia przeciwdziałania pandemii SARS-CoV-2 zapoczątkowanej w 2019 roku (1). Od wielu lat preparaty szczepionkowe są podstawą zapobiegania oraz wyciszenia epidemii i pandemii. Powstała w XIX wieku nowa dziedzina nauki – wakcynologia (2) rozwija się wraz z postępowaniem nauki w obszarach, takich jak biologia molekularna, inżynieria genetyczna oraz szeroko rozumiana biotechnologia i bioinżynieria. Większość dostępnych preparatów szczepionkowych zawiera inaktywowane patogeny. Ogólnoswiatowe epidemie i pandemie chorób zakaźnych ujawniły potrzebę opracowania nowych technologii produkcji szczepionek nowej generacji, co umożliwiłoby przezwyciężenie ograniczeń związanych z tradycyjną metodą wytwarzania preparatów opartych na inaktywowanych patogenach (3). Obecnie głównym wyzwaniem jest praca nad nowymi podejściami technologicznymi, które umożliwią produkcję skutecznych, bezpiecznych oraz tanich w otrzymywaniu preparatów ochronnych. Przełom technologiczny w dziedzinie wakcynologii stanowią preparaty szczepionkowe oparte na DNA, mRNA i rekombinowanych wektorach wirusowych (4) (5). Fakt, iż tego typu preparaty, zaliczane do grupy szczepionek podjednostkowych, nie imitują naturalnych cząstek wirusowych jest ich największą wadą. Kolejna przełomowa technologia wytwarzania szczepionek dotyczy produkcji cząstek wirusopodobnych (VLPs), stanowiących alternatywną platformę do opracowywania skutecznych preparatów do zwalczania chorób zakaźnych powodujących poważne zagrożenie (6). Fraenkel-Conrat i Williams po raz pierwszy opisali termin cząstki wirusopodobnej na przykładzie wirusa mozaiki tytoniowej (tobacco mosaic virus - TMV) w 1955 roku (7). Zdolności VLPs do indukowania silnej odpowiedzi immunologicznej otworzyły nowe możliwości do opracowywania szczepionek nowej generacji. Wytwarzanie VLPs jako potencjalnych preparatów ochronnych przysparza znacznie mniej problemów technologicznych, niż w przypadku procesów związanych z uzyskaniem tradycyjnych inaktywowanych, czy atenuowanych szczepionek (8)(Rys. 1.). Jednym z przykładów problemu z technologią produkcji preparatów ochronnych może być dostępna komercyjnie inaktywowana szczepionka przeciwko wirusowi krwotocznej choroby królików (ang. rabbit haemorrhagic disease - RHD), która jako źródło antygeny w formie inaktywowanego wirusa wykorzystuje narządy wewnętrzne zakażonych zwierząt (9). Należy podkreślić, iż ze względu na możliwość odzyskania właściwości chorobotwórczych, odchodzi się od stosowania szczepionek zawierających osłabione wirusy, zastępując je innymi bardziej bezpiecznymi preparatami ochronnymi.

3.1 Szczepionki

Szczepionka to preparat stosowany w celu uodparniania czynnego, zawierający określony antygen lub antygeny, które po wprowadzeniu do organizmu uodparniają go na

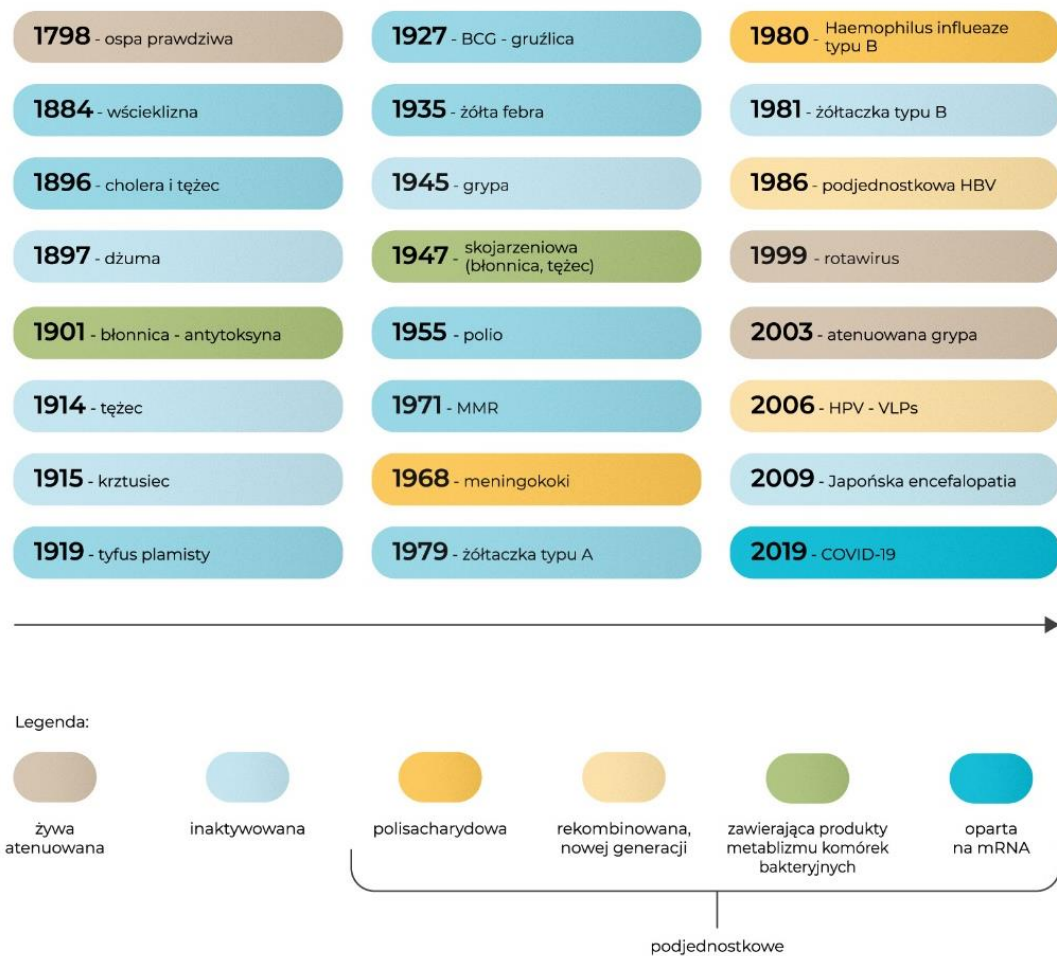
zakażenie jednym lub wieloma czynnikami chorobotwórczymi. Możemy wyróżnić wiele rodzajów szczepionek, które powstały na przestrzeni ostatnich 225 lat (Rys.1.).

Szczepienia profilaktyczne stanowią najskuteczniejszą formę zapobiegania chorobom zakaźnym. Obecnie stosuje się je przeciw błonicy, cholercy, durowi brzuszemu, gruźlicy, grypie, Hib, wirusowi brodawczaka ludzkiego, japońskiemu zapaleniu mózgu, kleszczowemu zapaleniu mózgu, krztuścowi, meningokokom, odrze, ospie wietrznej, pneumokokom, polio, rotawirusom, różyczce, śwince, tężcowi, wściekliczynie, WZW A, WZW B oraz COVID-19. Obok szczepionek profilaktycznych możemy wyróżnić również szczepionki terapeutyczne, które są preparatami stosowanymi w terapii celowanej przeciwko określonej chorobie, w tym nowotworowej (10). Obok preparatów mających na celu ochronę zdrowia ludzkiego istnieje szereg szczepionek profilaktycznych stosowanych w weterynarii (4).

Szczepionki profilaktyczne można podzielić na preparaty zawierające różne formy antygeny (Rys.1). Najpopularniejsze na rynku to preparaty zawierające inaktywowane czynniki chorobotwórcze, jak np.: szczepionka przeciwko wściekliczynie, szczepionka przeciw polio oraz szczepionka przeciwko wirusowi grypy WIV (ang. whole inactivated virus) dla ludzi (11), które były pierwszymi preparatami zawierającymi inaktywowane wirusy. Obecnie na rynku dostępnych jest wiele szczepionek inaktywowanych chroniących przed takimi chorobami jak: poliomyelitis, wirusowe zapalenie wątroby typu A, grypa, kleszczowe zapalenie mózgu, japońskie zapalenie mózgu.

Inną formą antygeny zawartego w preparatach ochronnych są szczepy czynników chorobotwórczych o osłabionej zjadliwości określane jako szczepionki atenuowane. Atenuowane patogeny zachowują właściwości antygenowe, a szczepionka tego typu wykazuje dobre właściwości ochronne. Przykładem żywej szczepionki antywirusowej może być szczepionka przeciwko wirusowi grypy LAIV (ang. live attenuated influenza virus), która została wprowadzona na rynek w 2002 roku i charakteryzuje się obniżoną zdolnością replikacji wirusa w temp. 37°C (12). Należy pamiętać, iż tzw. „żywe szczepionki” stwarzają ryzyko powrotu formy atenuowanej drobnoustroju do formy wysoce patogennej, co jest dużą wadą tych preparatów. Na rynku wciąż dostępne są preparaty zawierające atenuowane czynniki chorobotwórcze. Przykładem tego typu preparatów są szczepionki: BCG (Bacillus Calmette-Guerin) przeciwko gruźlicy; szczepionka MMR zawierająca osłabione wirusy odry, świnki i różyczki (MMR - ang. measles, mumps, rubella); szczepionka przeciwko ospie wietrznej, rotawirusowemu nieżytowi żołądkowo-jelitowemu, donosowa atenuowana szczepionka przeciwko grypie, szczepionka przeciwko durowi brzuszemu oraz szczepionka przeciwko żółtej gorączce.

Preparaty szczepionkowe mogą również zawierać metabolity bakteryjne, nazwane toksoidami (anatoksynami), które charakteryzują się dobrymi właściwościami immunogennymi oraz wzbudzają długotrwałą odporność. Przykładem tego typu szczepionki jest toksoid tężcowy będący składnikiem szczepionki skojarzonej DTP (szczepionka błoniczo-tężcowo-krztuścowa, adsorbowana) (13). Szczepionki polisacharydowe również są przykładem szczepionek podjednostkowych. Polisacharydowa otoczka niektórych bakterii może być używana jako antygen podjednostkowy. Przeciwciała wytworzone w odpowiedzi immunologicznej na polisacharydy zewnętrzne spełniają rolę ochronną przed zakażeniem bakteryjnym. Najczęściej stosowane tego typu preparaty to te zapobiegające chorobom wywołanym przez *Neisseria meningitidis* i *Streptococcus pneumoniae* (14).



Rysunek 1. **Oś czasu prezentująca chronologię rozwoju szczepionek wraz z podziałem na rodzaje.** Kolor brązowy: szczepionki atenuowane zawierające osłabione szczepy wirusów: ospa prawdziwa, rotawirusów oraz wirus grypy. Kolor jasnoniebieski: szczepionki inaktywowane zawierające zabite drobnoustroje: szczepionki przeciwko dżumie, tężcowi, krztuścowi, grypie, żółtaczkę typu B oraz japońskiej encefalopatii. Kolor pomarańczowy: szczepionki polisacharydowe zawierające oczyszczone polisacharydy otoczkowe; preparaty stosowane w walce przeciwko zakażeniom meningokokowym z grupy B, z grupy C, z grupy A, C, W, Y, zakażeniom *Haemophilus influenzae* typu B (Hib). Kolor zielony: szczepionki podjednostkowe zawierające metabolity bakteryjne zwane toksoidami: szczepionki przeciwko tężcowi i błonicy wciąż obecne na rynku. Kolor jasnożółty: szczepionki podjednostkowe zawierające rekombinowane białka, jak np. szczepionka przeciwko grypie (Flu block) lub cząski wirusopodobne jak preparat szczepionkowy przeciwko żółtaczkę wątroby typu B czy też wirusowi brodawczaka ludzkiego (HPV). Kolor lazurowy: szczepionki podjednostkowe oparte na mRNA. Przykładem jest wprowadzona w 2020 roku szczepionka przeciwko COVID-19. MMR – nazwa szczepionki atenuowanej przeciwko odrze, śwince i różyczce (ang. measles, mumps, and rubella); HBV – szczepionka przeciwko żółtaczkę wątroby typu B (ang. hepatitis B virus); HPV – szczepionka przeciwko wirusowi brodawczaka ludzkiego (ang. human papillomavirus); COVID-19 szczepionka przeciwko ludzkiemu koronawirusowi powodującemu COVID-19 oparta na terapeutycznym mRNA.

Obecnie na rynku dostępnych jest wiele szczepionek polisacharydowych chroniących przed takimi chorobami jak: zakażenia pneumokokowe, zakażenia meningokokowe grupy B, zakażenia meningokokowe grupy C, zakażenia meningokokowe grupy A, C, W, Y, dur brzuszny czy też przed zakażeniami *Haemophilus influenzae* typu b (Hib).

Wraz z rozwojem takiej dziedziny nauki jak biologia molekularna powstał kolejny rodzaj szczepionek podjednostkowych, które zawierają elementy czynników chorobotwórczych. Preparaty te zawierają rozbite (ang. „split”) wirusy lub ich fragmenty, oczyszczone za pomocą technik chromatografii (15). Przykładem tego typu szczepionek są szczepionki przeciwko grypie, w skład których wchodzi: rozbite cząstki wirusa grypy lub oczyszczone białkowe antygeny powierzchniowe wirusa grypy (15). Stosunkowo niedawno rozpoczęto badania nad zastosowaniem nowego typu preparatów ochronnych, tzw. rekombinowanych szczepionek podjednostkowych (16). Biopreparaty te gwarantują bezpieczeństwo, jednakże niektóre wykazują stosunkowo słabe właściwości immunogenne.



Rysunek 2. **Zalety szczepionek opartych na cząstkach wirusopodobnych.** Porównanie najważniejszych właściwości tradycyjnych preparatów szczepionkowych opartych na inaktywowanych lub atenuowanych wirusach i preparatów zawierających cząstki wirusopodobne.

Większość dostępnych szczepionek rekombinowanych można zaliczyć do grupy szczepionek podjednostkowych. Ze względu na znaczne różnice w procesie metod otrzymywania klasycznych szczepionek podjednostkowych, stanowią one odrębną grupę (15), w której można wyróżnić:

- szczepionki rekombinowane podjednostkowe oparte o techniki ekspresji obcych genów (17), szczepionki DNA, mRNA (18),
- szczepionki oparte na technologii produkcji pseudocząsteczek wirusowych (19),
- szczepionki podjednostkowe oparte na technologii produkcji cząstek wirusopodobnych (VLPs) (20) (3) (15).

Proces otrzymywania VLPs metodami inżynierii genetycznej umożliwia opracowanie szybkich w procesie produkcji i stosunkowo tanich, a przede wszystkim bezpiecznych szczepionek rekombinowanych (20). Dodatkowo cząstki wirusopodobne wykazują silne właściwości immunostymulujące, co nie jest powszechne dla rekombinowanych antygenów podjednostkowych, w szczególności tych zawierających silnie konserwowane rejony białek.

Wraz z rozwojem technologii produkcji rekombinowanych szczepionek podjednostkowych, rozwinął się nowy nurt badań mający na celu wzmocnienie odpowiedzi immunologicznej poprzez zastosowanie czynników aktywujących układ immunologiczny powszechnie nazywanych adjuwantami.

3.2. Cząsteczki wirusopodobne

Cząstki wirusopodobne (ang. virus like particles) to nanostruktury zbudowane z wielu podjednostek białkowych, które swoją budową imitują natywnego wirusa lub w znacznym stopniu go przypominają (21). Określenie VLPs odnosi się do:

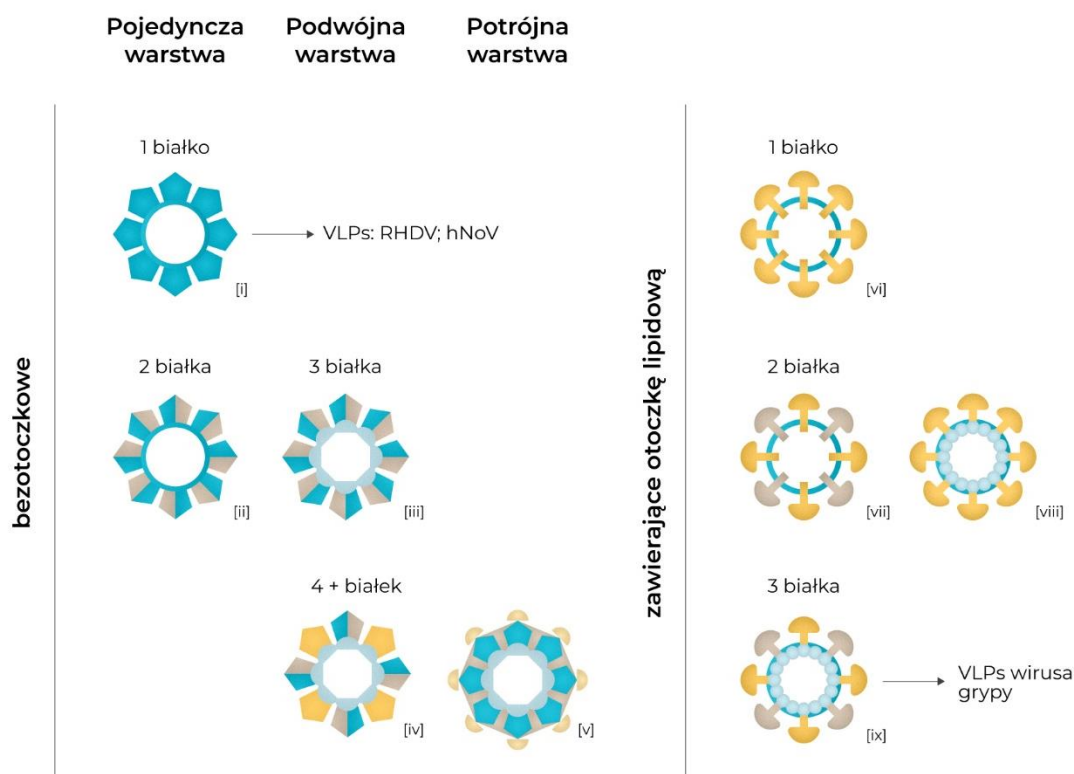
- niescharakteryzowanych struktur przypominających swoją morfologią cząsteczki wirusowe, które znajdują się w próbkach biologicznych,
- nanocząsteczki pochodzenia wirusowego, które nie posiadają materiału genetycznego,
- chemicznie lub genetycznie zmodyfikowane cząsteczki wirusowe infekcyjne lub nieinfekcyjne,
- samoskładających się produktów otrzymanych w wyniku ekspresji sekwencji kodujących strukturalne białka wirusowe produkowane w prokariotycznych i eukariotycznych systemach do ekspresji heterologicznych genów (22).

Cząstki wirusopodobne są potencjalnie idealnymi kandydatami na skuteczne preparaty szczepionkowe. Jako silne immunostymulujące nanostruktury zbudowane z białek wirusowych posiadających prawidłową konformację stanowią wzorce molekularne związane z patogenami (ang. pathogen associated molecular patterns – PAMPs). Tego typu wzorce stymulują silną odpowiedź immunologiczną zarówno humoralną, jak i komórkową (23). VLPs są biokompatybilne i bezpieczne, ponieważ brakuje im wirusowego materiału genetycznego, a zatem nie mogą się replikować jak konwencjonalne szczepionki atenuowane (24). Cząstki wirusopodobne są nanostrukturami o wielkości od 20 do 100 nm. Zakres ich wielkości jest optymalny, aby swobodnie przedostawać się do węzłów chłonnych, a następnie do komórek prezentujących antygen (ang. antigen presenting cell - APC), w szczególności wnikać do komórek dendrytycznych (ang. dendritic cell - DC) (25). Te biologiczne nanostruktury o złożonej budowie mogą przybierać różne kształty; od wysoce zorganizowanej ikozaedralnej poprzez uporządkowaną cylindryczną (helikalną), aż do struktury kulistej zawierającej osłonkę lipidową (26). Proces produkcji VLPs umożliwia rozwiązanie wielu technologicznych problemów związanych z produkcją szczepionek (Rys. 2.). Najważniejsze z nich to otrzymanie preparatów niestanowiących zagrożenia biologicznego oraz wolnych od alergenów. Proces produkcji preparatów opartych na biologicznych nanostrukturach zajmuje 12-14 tygodni, podczas gdy dla konwencjonalnego preparatu zawierającego inaktywowany lub atenuowany patogen wynosi 24-32 tygodnie (27).

3.2.1. Typy cząsteczek wirusopodobnych

Ze względu na różnorodność wirusów możemy wymienić szereg VLPs: posiadające lub nieposiadające osłonki lipidowej, charakteryzujące się różną symetrią i strukturą oraz różniące się ilością komponentów białkowych wchodzących w skład VLPs (28) (29).

Wirusy oraz VLPs, mogą posiadać symetrię: kubiczną – na kształt bryły foremnej, tak zwaną icozaedralną, symetrię helikalną lub symetrię złożoną - obserwowaną często u wirusów posiadających osłonkę. Dodatkowo w obrębie danej symetrii możemy wyróżnić VLPs, które zbudowane są z jednego, dwóch lub więcej białek strukturalnych (28). Poniższy rysunek przedstawia podstawowy podział cząsteczek wirusopodobnych (Rys. 3.).



Rysunek 3. Rodzaje cząstek wirusopodobnych. (i) VLPs zbudowane z jednego białka strukturalnego (Norowirus, króliczy kaliciwirus, HBV), (ii) VLPs zbudowane z dwóch białek wirusowych, które oddziałują wzajemnie (Rice Dwarf Virus (RDV)), (iii) VLPs zbudowane z trzech białek strukturalnych, z czego jedno białko tworzy wewnętrzny rdzeń, a pozostałe dwa eksponowane są na zewnątrz (Bluetongue Virus), (iv) VLPs zbudowane z 4 białek, z czego jedno tworzy wewnętrzny rdzeń (rotawirusy, enterowirusy), (v) VLPs zbudowane z 5 i więcej białek, które formują bardzo złożone nanostruktury nie zawierające błony lipidowej, (vi) VLPs zawierające błonę lipidową składające się z jednego białka powierzchniowego, (vii) VLPs składające się z dwóch białek powierzchniowych oraz błony lipidowej (koronawirusy), (viii) VLPs składające się z błony lipidowej, białka strukturalnego tworzącego wewnętrzny rdzeń oraz białka powierzchniowego (wirus grypy M1-VLPs-HA, Sars-CoV-2) (ix) VLPs składające się z błony lipidowej białka rdzenia oraz wielu glikoprotein i białek strukturalnych, które eksponowane są na powierzchni (herpeswirusy). W nawiasie podano przykłady wirusów dla których opracowano/otrzymano VLPs

3.2.1.1. Bezosłonkowe cząstki wirusopodobne

Bezosłonkowe cząstki wirusopodobne zbudowane są z jednego lub wielu białek kapsydowych. Białka strukturalne produkowane w systemie ekspresyjnym w sposób spontaniczny formują biologiczne struktury, które są idealnymi wzorcami molekularnymi, ze względu na wielokrotnie powtarzające się motywy. Są to nanocząstki o wysoce zorganizowanej

strukturze przestrzennej. Tego typu VLPs są idealnymi kandydatami na preparaty ochronne między innymi ze względu na wydajność ich produkcji (30).

Dodatkowo bezosłonkowe cząstki wirusopodobne są mniejsze od osłonkowych VLPs, co ułatwia im pokonanie bariery tkankowej oraz wnikięcie do węzłów chłonnych, a w efekcie lepszą stymulację układu immunologicznego (31). Najłatwiejsze w otrzymaniu cząstki wirusopodobne to te, które zbudowane są z jednego białka. Takie nanostruktury otrzymano dla kaliciwirusów, papilomawirusów czy też parwowirusów (32). Cząstki wirusopodobne zbudowane z kilku białek są trudniejsze w produkcji, gdyż potrzebna jest równoległa produkcja 2 lub 3 białek, które następnie uformują biologiczną nanostrukturę (20).

3.2.1.2. Osłonkowe cząstki wirusopodobne

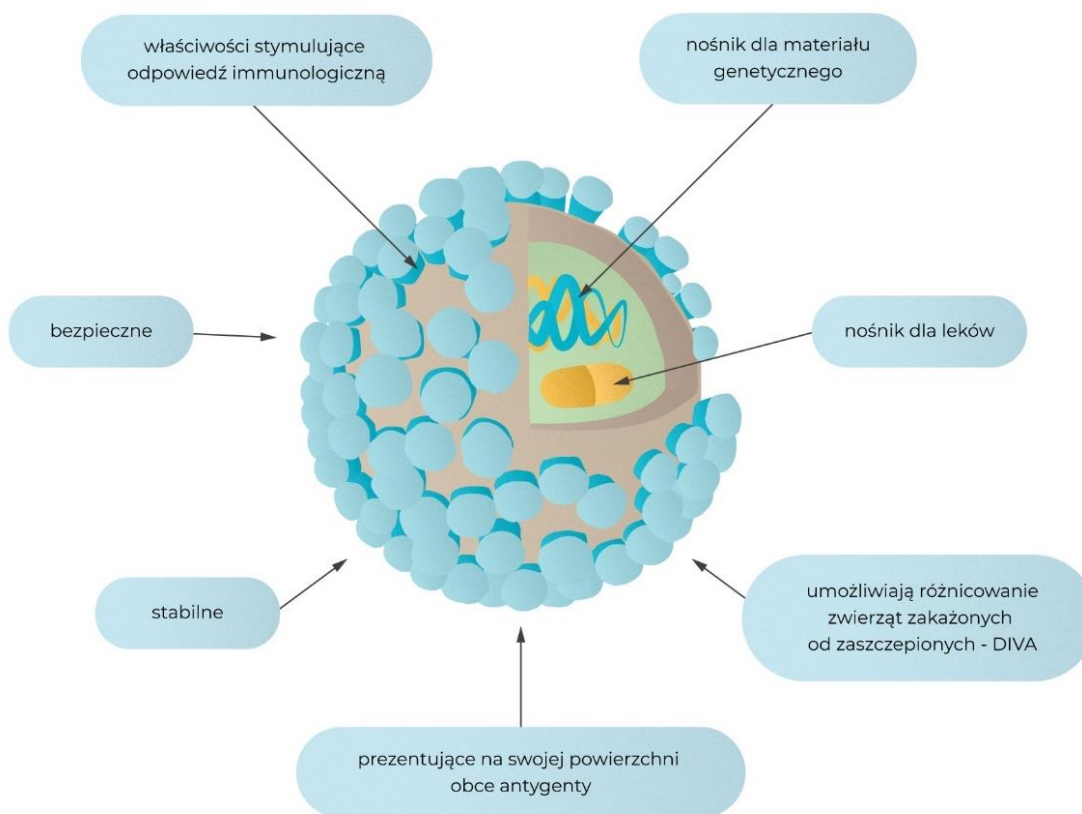
W porównaniu do VLPs bez osłonki, VLPs z osłonką (ang. enveloped VLP, eVLP) mają znacznie bardziej skomplikowany skład i budowę. Nanostruktury te składają się z lipidowej błony komórkowej pobranej od komórki gospodarza zwanej osłonką oraz glikoprotein wirusowych obecnych na zewnętrznej powierzchni (33). Powierzchniowe glikoproteiny wirusowe zakotwiczone w osłonce lipidowej VLPs zawierają epitopy neutralizujące, które są kluczowe w aspekcie przyszłej neutralizacji wirusa. Konstruując preparaty ochronne zawierające eVLPs ważnym jest, aby wybrać te glikoproteiny, które zawierają epitopy neutralizujące, co warunkuje efektywność preparatów ochronnych. Osłonkowe VLPs obok glikoprotein powierzchniowych mogą być zbudowane z białek kapsydowych czy też białek rdzenia, które mają wpływ na morfologię tych nanostruktur oraz na efektywność procesu ich tworzenia. eVLPs zostały użyte do opracowania preparatów ochronnych przeciw chorobom wywoływanym przez m.in. reowirusy, wirus Hanta, wirus żółtaczkowy wątroby typu C czy wirus grypy (34) (30). Te stosunkowo duże struktury biologiczne, wykazujące ponad 100 nm, mogą agregować w miejscu podania szczepionki i nie być w stanie przeniknąć do węzłów chłonnych, co może wpłynąć na immunostymulację układu odpornościowego (31). Warto nadmienić, iż produkowane obecnie nanocząsteczki lipidowe, które są nośnikami dla terapeutycznego mRNA, mają wielkość 100 nm lub mniej, dzięki czemu wykazują wysoką wydajność w dostarczaniu szczepionki do docelowego miejsca (35).

3.3. Bioinżynieria cząstek wirusopodobnych

Cząstki wirusopodobne stanowią nowy nurt badań oraz innowacyjne podejście w konstruowaniu szczepionek terapeutycznych i profilaktycznych (29). Jednym z przykładów szczepionek nowej generacji będących w fazie badań klinicznych są chimericzne VLPs (ang. chimeric VLPs - cVLPs) prezentujące na swojej powierzchni fragmenty białek indukujących odporność przeciwzakaźną różnych czynników chorobotwórczych (20). Obce antygeny umieszczane są na powierzchni VLPs przy użyciu metod inżynierii genetycznej lub poprzez chemiczną koniugację (32).

Intensyfikacja badań nad produkcją VLPs otworzyła nowe możliwości wykorzystania tych nanostruktur zarówno jako szczepionek profilaktycznych, jak i terapeutycznych. Wyniki wielu prac badawczych potwierdzają, że:

- VLPs są najbardziej efektywnymi immunogenami wykorzystywanymi do opracowania i produkcji szczepionek.
- Niektóre cząsteczki wirusopodobne tworzą się w sposób spontaniczny z pojedynczego strukturalnego białka wirusowego, umożliwiając tym samym opracowanie stosunkowo łatwej, szybkiej i taniej technologii produkcji.
- Właściwości niektórych białek strukturalnych formujących VLPs umożliwiają pobieranie obcego materiału genetycznego, jak również innych cząsteczek. Takie struktury działają jak nośnik do konkretnych komórek, tkanek lub organów z wykorzystaniem w tym celu specyficznych przeciwciał VLPs przenoszące DNA wykorzystywane są w terapii genowej (Rys. 4.).



Rysunek 4. Zalety oraz różnorodność zastosowania cząstek wirusopodobnych w przemyśle farmaceutycznym i weterynaryjnym. Schematyczna prezentacja możliwości wykorzystania cząstek wirusopodobnych do produkcji szczepionek nowej generacji oraz jako nośników do terapii. Na rysunku przedstawiono możliwość upakowania wewnątrz cząsteczki VLPs zarówno leków jak i materiału genetycznego.

Chimeryczne cząstki wirusopodobne obecnie stanowią nowy nurt badań nad opracowywaniem uniwersalnych preparatów ochronnych oraz szczepionek terapeutycznych. (34) (36). Te skomplikowane multibiałkowe nanostruktury zawierają elementy pochodzące z różnych wirusów, bądź eksponowane na powierzchni obce epitopy (37). cVLPs można otrzymać poprzez chemiczną koniugację lub inżynierię genetyczną (38). cVLPs są obecnie w fazie badań klinicznych, a jednym z przykładów chimerycznej cząsteczki jest nanostruktura M2–HBcAg, jako uniwersalna szczepionka przeciwko grypie (30). Chimeryczne cząstki są alternatywną metodą uzyskiwania humoralnej oraz komórkowej odpowiedzi immunologicznej na nisko immunogenne antygeny (39). Takie chimeryczne cząsteczki są stosowane nie tylko do

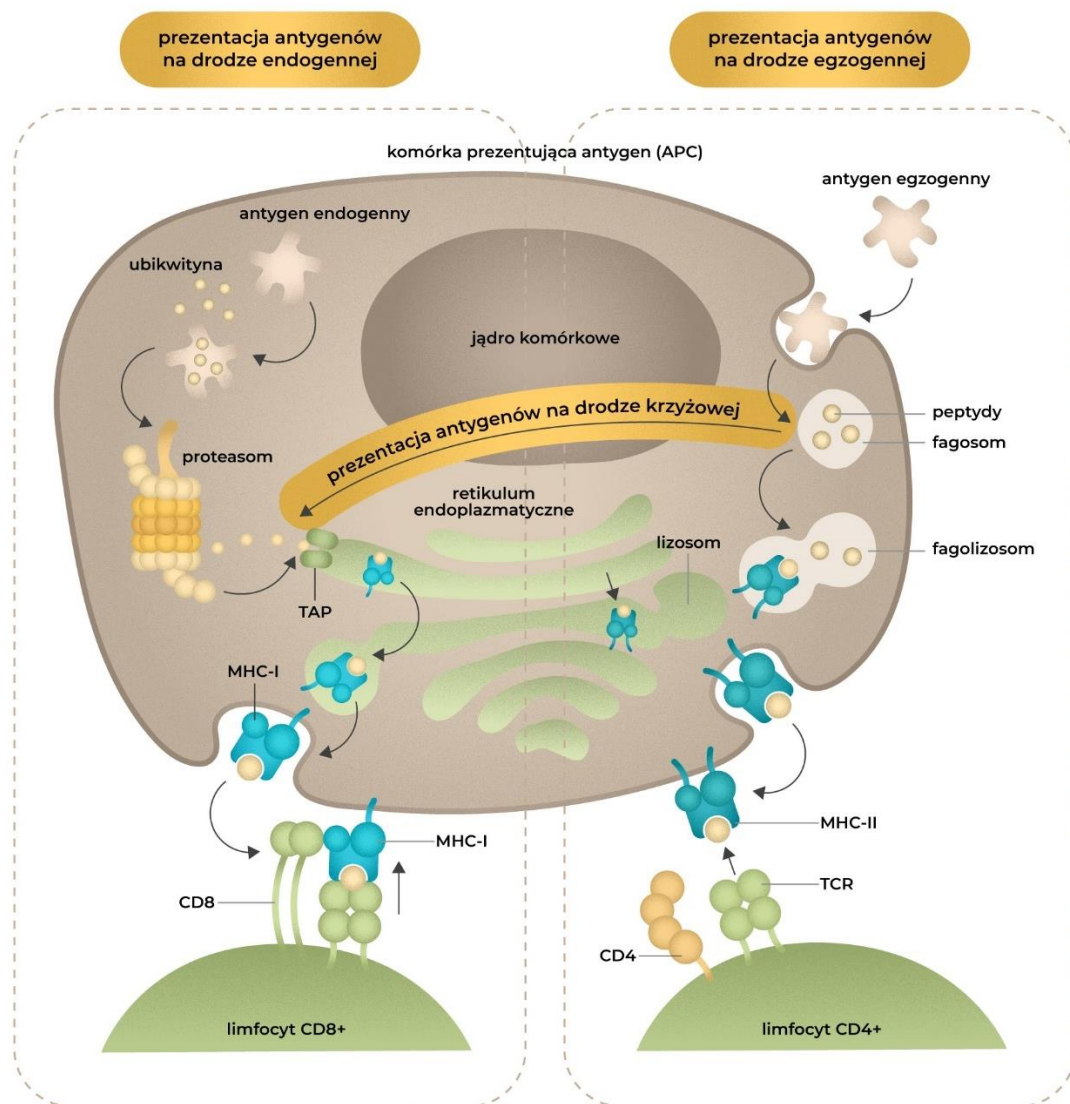
opracowywania szczepionek przeciwko chorobom zakaźnym, ale również przeciwko nieinfekcyjnym chorobom, jak: nadciśnienie, alergie, cukrzyca, nowotwory, czy choroba Alzheimera (40) (41).

3.4. Odpowiedź immunologiczna a cząstki wirusopodobne

Uzyskanie nabytej odporności immunologicznej prowadzi do produkcji komórek pamięci immunologicznej. Komórki te są nieaktywne w organizmie gospodarza, dopóki nie nastąpi kolejna ekspozycja na dany czynnik, w wyniku której inicjują one szybszą i silniejszą odpowiedź na dostarczony patogen przy jednoczesnej obecności jedynie niewielkiej liczby swoistych limfocytów. Typ odpowiedzi immunologicznej uzyskanej wobec ekspozycji na antygen zależy od jego charakteru. Cząstki wirusopodobne mają zdolność indukowania humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej (32). VLPs prezentowane są zarówno na drodze endo-, jak i egzogennej. Prezentacja antygenów drogą endogenną jest preferencyjna dla szczepionek przeciwko wirusom oraz chorobom nowotworowym. Niektóre egzogenne antygeny takie jak VLPs pobierane są przez komórki prezentujące antygeny APC, aby następnie zostać prezentowane przez cząsteczki MHC klasy I poprzez drogę endogenną, dzięki tak zwanej prezentacji krzyżowej. Z punktu widzenia szczepień, prezentacja krzyżowa pozwala na dostarczenie antygeny na drodze egzogennej generując jednocześnie odpowiedź komórkową, CTL cytotoksyczną (42) (Rys. 5).

Jedną z głównych cech cząstek wirusopodobnych jest ich charakterystyczna struktura składająca się z wielu powtórzeń jednego białka. Stanowią one swoiste wzorce molekularne PAMPs, które rozpoznawane są przez specyficzne receptory TLR (ang. toll-like receptors). Powyżej opisana cecha powodują, iż są one w stanie skutecznie pobudzić układ immunologiczny do produkcji przeciwciał neutralizujących. Opisano wiele typów VLPs, które są w stanie indukować produkcję przeciwciał neutralizujących, powodując tym samym ochronę przed patogenem.

Cząstki te ze względu na swoją wielkość potrafią efektywnie przedostawać się do węzłów chłonnych z miejsca iniekcji, co powoduje, że mogą one przechodzić wtórnie do narządów limfatycznych i oddziaływać bezpośrednio z komórkami B, stymulując tym samym produkcję przeciwciał (odpowiedź humoralna). VLPs nie wymagają dodatkowej obecności czynników aktywujących układ immunologiczny (adjuwantów). Wykazano, iż samostymulujące właściwości są nieodłączną cechą tych nanostruktur. Wykazano również, pobieranie cząsteczek wirusopodobnych przez komórki dendrytyczne (DCs), które następnie prezentowały je jako antygeny z udziałem MHC klasy II oraz dodatkowo wspomagały proces dojrzewania i migracji komórek dendrytycznych, który jest kluczowy do stymulacji wrodzonej odpowiedzi immunologicznej (32) (43). Umiejętność VLPs do oddziaływania z komórkami dendrytycznymi jest bardzo ważną zaletą, która według obecnego stanu wiedzy aktywuje odpowiedź wrodzoną i nabytą. Dodatkowo, niektóre z VLPs, mają zdolność do imitowania nie tylko wirusa, ale również procesu infekcji. Poprzez związanie się z receptorem komórkowym VLPs mogą być pobierane przez komórkę, w tym przez komórki prezentujące antygen APC jako egzogenne antygeny prezentowane przez MHC klasy I (44) (31) (Rys. 5).



Rysunek 5. Schemat przedstawiający prezentację antygenów na drodze endo i egzogennej przez komórki prezentujące antygen (APC). Antygeny prezentowane są przez komórki APC poprzez dwa szlaki: A) szlak molekularny klasy MHC I – prezentacja VLPs jako antygenów endogennych, B) szlak molekularny klasy MHC II – prezentacja VLPs jako antygenów egzogennych, A) Szlak molekularny klasy MHC I jest endogennym szlakiem prezentującym antygen. Endogenne antygeny ulegają ubikwitynacji a następnie transportowane są do proteasomu, gdzie ulegają degradacji. Powstałe peptydy antygenowe o długości 8-12 reszt aminokwasowych wiążą się z białkiem TAP będącym transporterem związanym z przetwarzaniem antygeny (TAP - transporter associated with antigen processing). TAP selektywnie transportuje peptydy do światła retikulum endoplazmatycznego (ER). Następnie polipeptyd antygeny wiąże się z rowkiem peptydowym wiążącym antygen cząsteczki klasy MHC I w retikulum endoplazmatycznym tworząc kompleks cząsteczkowy. Kompleks transportowany jest do błony komórkowej poprzez sieć aparatów Golgiego w celu rozpoznania przez limfocyty T CD8+, kończąc w ten sposób proces prezentacji antygeny; B) szlak molekularny MHC klasy II jest egzogennym szlakiem prezentującym antygen. Egzogenne antygeny jest rozpoznawany i pobierany na drodze endocytozy przez komórki APC. Następnie powstaje endosom lub lizosom fagocytykujący, który łączy się z lizosomem, tworząc w rezultacie fagolizosom. Dzięki dostarczeniu enzymów trawiennych przez lizosom, antygen jest stopniowo degradowany i przekształcany w odpowiedniej długości peptydy. W ten sposób antygen zostaje przygotowany do połączenia się z cząsteczką MHC klasy II. Następnie w wyniku ekspresji genów dla białek MHC klasy II i syntezy białek na powierzchni szorstkiego retikulum endoplazmatycznego dochodzi do umiejscowienia łańcuchów białkowych tworzących cząsteczkę MHC w obrębie siateczki śródplazmatycznej. Jeszcze w retikulum dochodzi do przyłączenia się w rowku cząsteczki MHC tzw. łańcucha niezmiennego, którego główne zadanie polega na zablokowaniu rowka przed przyłączeniem jakiegoś innego,

przypadkowego peptydu obecnego w siateczce śródplazmatycznej. Częsteczka MHC przechodzi następnie przez aparat Golgiego, gdzie następuje jej glikozylacja oraz przycięcie łańcucha niezmiennego do peptydu określanego nazwą CLIP (żółta gwiazdka na schemacie). Uwolnione w pęcherzyku pochodzącym z aparatu Golgiego cząsteczki MHC klasy II docierają do endosomu zawierającego fragmenty antygeny w formie peptydów przygotowanych do prezentacji. Następuje wymiana peptydu CLIP z rowka cząsteczki MHC klasy II na peptyd pochodzący z antygeny. Powstały stabilny kompleks molekularny- peptyd-MHC klasy II jest transportowany na powierzchnię błony komórki APC, w celu rozpoznania przez limfocyty T CD4⁺, kończąc w ten sposób proces prezentacji antygeny. Alternatywnie, egzogenny antygen może być prezentowany szlakiem molekularnym MHC klasy I poprzez prezentację krzyżową. Po endocytozie eksportowane zdegradowane antygeny mogą być transportowane do retikulum endoplazmatycznego za pośrednictwem białka TAP, wchodząc jednocześnie na szlak molekularny charakterystyczny dla antygenów endogennych. Następnie epitop jest dokowany do kieszeni MHC klasy I, co powoduje rozpoznanie i aktywację limfocytów T CD8⁺.

3.5. Komercyjne preparaty szczepionkowe zawierające cząstki wirusopodobne

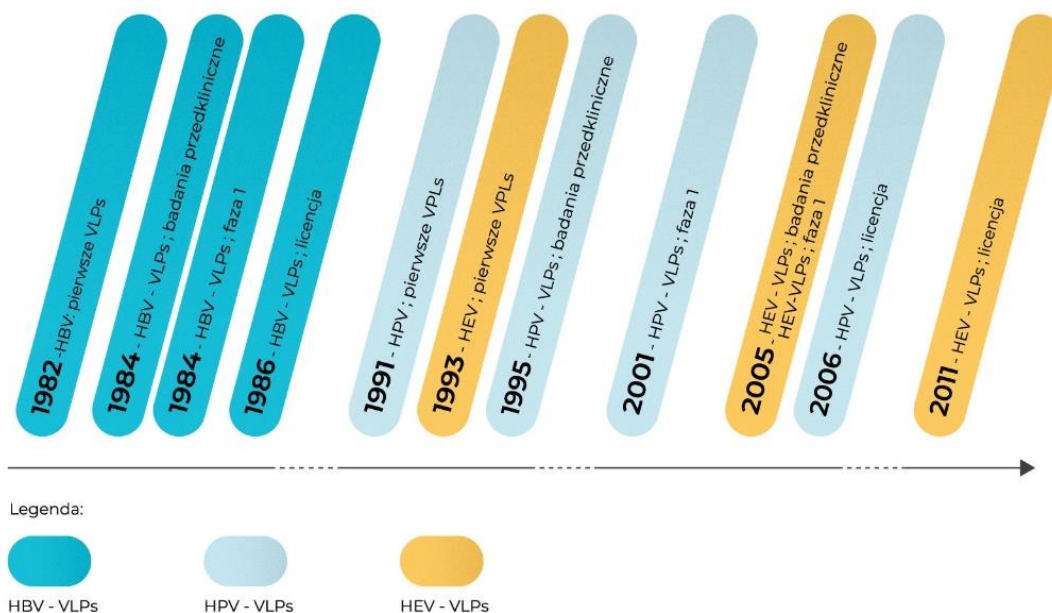
Pierwsze preparaty szczepionkowe zawierające cząstki wirusopodobne zawierały rekombinowane VLPs uformowane z białek otoczki (HBsAg i HBcAg) wirusa zapalenia wątroby typu B (HBV) oraz wirusa mozaiki tytoniu (TMV) (45). Natomiast pierwsza komercyjna szczepionka zawierająca VLPs, wyprodukowana w heterologicznym systemie ekspresji genów, została zatwierdzona przez amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (FDA) w 1986 roku (Rys. 6.). Szczepionka zawierająca antygen HBsAg produkowana przez drożdże, została nazwana Recombivax HB (46). W 2006 roku zarejestrowano drugą szczepionkę opartą na VLPs, Gardasil R przeciwko wirusowi brodawczaka ludzkiego (HPV) (47). Następnie zatwierdzono szczepionki zawierające VLPs przeciwko HPV i HBV, z których część wykazała skuteczność w badaniach klinicznych i przedklinicznych. Jak wskazują dane literaturowe co najmniej 110 różnych VLPs zostało wyprodukowanych dla 35 rodzin różnych wirusów (39). Potencjalne szczepionki oparte na VLPs skierowane przeciwko różnym wirusom, w tym wirusowi Norwalk, HIV, wirusowi Ebola, wirusowi SARS-CoV-2, wirusowi grypy są nadal na różnych etapach badań klinicznych (30).

Obecna intensyfikacja badań zarówno w dziedzinie wirusologii, wakcynologii, biologii molekularnej, mikrobiologii oraz biotechnologii skupia się na różnych aspektach technologicznych związanych z procesami otrzymywania VLPs. Tak duże zainteresowanie tymi nanostrukturami zainspirowane zostało w dużej mierze sukcesami związanymi z opracowaniem VLPs dla antygeny powierzchniowego wirusa zapalenia wątroby typu B (HBV) oraz dla białka L1 wirusa ludzkiego brodawczaka (HPV) (20) (Rys. 6.). Bardzo duża część badań klinicznych dotyczy zastosowania różnych form cząstek wirusowych jako aktywnych antygenów zawartych w preparatach szczepionkowych przeciwko grypie, wirusowi Noro, wirusowi Chikungunya, encefalopatii wywołanej infekcjami wirusowymi, wirusowi brodawczaka ludzkiego, malarii, wirusowi zespołu nabytego braku odporności, wirusowi syncytialnego schorzenia układu oddechowego, koronawirusowi SARS-CoV-2 oraz wirusowi Zika.

3.6. Systemy do produkcji cząstek wirusopodobnych

Jednym z kluczowych etapów produkcji wybranych VLPs jest wybór systemu ekspresji genów. Dane literaturowe wskazują, że aż ¼ produkowanych cząsteczek wirusopodobnych imitujących wirusy bakteryjne czy też roślinne produkowanych jest

w systemach bakteryjnych. VLPs niezawierające otoczki i zbudowane tylko z jednego lub dwóch białek produkowane są głównie w wydajnych systemach opartych na komórkach bakteryjnych czy drożdżowych. Ze względu na fakt, iż złożone cząstki wirusopodobne zawierają bardzo często błonę lipidową, wybór systemu ogranicza się do komórek owadzych lub ssaczych. Pobieranie błony komórkowej od komórki gospodarza jest elementem krytycznym, dlatego też nie można produkować tego typu VLPs w komórkach drożdży czy bakterii.



Rysunek 6. Kamienie milowe w opracowaniu zatwierdzonych i obecnych na rynku szczepionek opartych na cząstkach wirusopodobnych. Pierwsze dane literaturowe opisujące HBV-VLPs (1982 r.), HPV-VLPs (1991 r.), HEV-VLPs (2005 r.). HBV – wirus żółtaczki wątroby typu B (ang. hepatitis B virus); HPV - ludzki wirus brodawczaka (ang. human papillomavirus); HEV – wirus żółtaczki wątroby typu E (ang. hepatitis E virus).

W ostatnich latach opisano także możliwość produkowania VLPs w roślinach i w pierwotniakach (48). Wykorzystanie komórek ssaczych do produkcji VLPs stanowi mały procent, głównie ze względu na wysoki koszt, który bezpośrednio związany jest z wydajnością produkcji. Innowacyjną technologią wprowadzoną na rynek w ostatnich latach są systemy pozakomórkowe (49), które nie będą wykorzystywane do produkcji VLPs jako antygenów szczepionkowych ze względu na ograniczenia związane z wydajnością produkcji (50). Bardzo ważne przy wyborze systemu do produkcji VLPs są modyfikacje potranslacyjne wirusowych białek strukturalnych. Jedną z najważniejszych modyfikacji potranslacyjnych jest glikozylacja kluczowych białek wirusowych. Glikoproteiny wirusowe są odpowiedzialne za pierwsze etapy cyklu replikacyjnego wirusa, w tym za wiązanie do receptora. Zahamowanie tego procesu poprzez zablokowanie miejsc wiążących receptor to główne zadanie przeciwciał neutralizujących (51). Ważnym jest uzyskanie w wyniku szczepienia przeciwciał, które będą wiązały glikozylowane białka wirusowe. Dlatego też wybór systemu do produkcji cząstek wirusopodobnych jako aktywnego czynnika preparatu ochronnego jest tak istotna (Rys. 7.).

3.6.1. System bakteryjny jako platforma do produkcji cząstek wirusopodobnych

System bakteryjny oparty jest na komercyjnie dostępnych, dobrze scharakteryzowanych komórkach *Escherichia coli* oraz wektorach DNA, które często stosowane są do produkcji cząstek wirusopodobnych składających się z jednego białka (45) (52) (53). Jedną z dodatkowych zalet, obok krótkiego czasu hodowli oraz niskiego kosztu, jest możliwość jednoczesnej produkcji białek strukturalnych oraz specyficznych struktur RNA. Niestety system opierający się na komórkach bakteryjnych ma również dużo wad: brak wielu enzymów odpowiedzialnych za obróbkę potranslacyjną, brak enzymów związanych z tworzeniem mostków dwusiarczkowych, problemy z zachowaniem rozpuszczalnego charakteru produkowanych białek ze względu na szybkie tempo produkcji i niewłaściwe fałdowanie, prowadzące do powstania ciałek inkluzyjnych, obecność endotoksyn w otrzymanych rekombinowanych białkach oraz obecność ściany komórkowej, która uniemożliwia odpączkowanie struktur VLPs zawierających osłonkę (Rys.7.). Z tego względu bardzo dużo prac badawczych skupiło się na możliwości wykorzystania innych systemów ekspresyjnych do produkcji biologicznych nanostruktur w formie VLPs (54) (55).

3.6.2. System drożdżowy jako platforma do produkcji cząstek wirusopodobnych

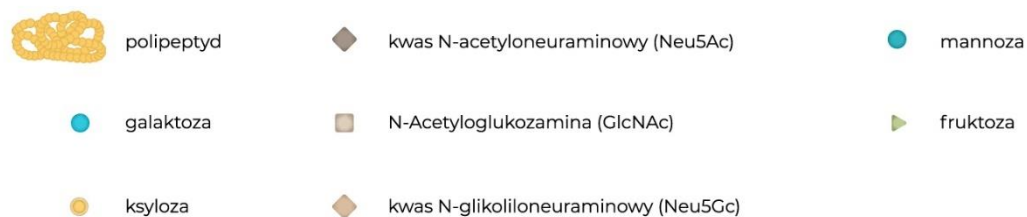
Intensyfikacja badań związana z otrzymaniem różnych cząstek wirusopodobnych w komórkach drożdży związana była z wprowadzeniem na rynek dwóch licencjonowanych szczepionek opartych na VLPs otrzymanych właśnie w tym systemie (56) (30). Zaletami tego eukariotycznego systemu są: (i) możliwość jednoczesnej produkcji białka oraz mRNA, co w niektórych przypadkach warunkuje proces samotworzenia się VLPs, (ii) obecność maszynerii komórkowej odpowiedzialnej za modyfikacje potranslacyjne takie jak glikozylacja czy fosforylacja, co może mieć wpływ na jakość uzyskanych nanocząstek (iii) możliwość jednoczesnej produkcji kilku białek strukturalnych, które następnie formują się w VLPs, jak np. VLPs rotawirusa, które składają się z trzech warstw białek strukturalnych (52). Jedną z kluczowych wad tego systemu jest obecność bardzo grubej ściany komórkowej uniemożliwiającej pobieranie błony lipidowej, która w przypadku VLPs zawierających błonę jest warunkiem powstania nanostruktur. Dlatego też dla cząstek wirusopodobnych zawierających otoczkę lipidową (eVLPs) konieczny jest wybór innego systemu do produkcji. Dodatkowo wysoce mannozowy proces glikozylacji zachodzący w komórkach drożdży, może mieć znamienny wpływ na odpowiedź immunologiczną. Wykazano, iż wysoce mannozowe struktury cukrowe mają właściwości immunostymulujące (57). Dodatkowo, ważnym aspektem w kontekście produkcji preparatów ochronnych jest możliwość produkcji VLPs w fermentorach, co znacząco obniża koszty i czas (58).

3.6.3. System oparty na produkcji białek w komórkach owadźnich jako platforma do produkcji cząstek wirusopodobnych

System oparty na produkcji białek w komórkach owadźnich jest obecnie jedną z najczęściej wykorzystywanych platform do produkcji różnego rodzaju cząstek wirusopodobnych zarówno w badaniach podstawowych, rozwojowych jak i przemysłowych na

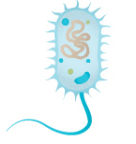




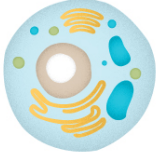
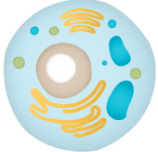
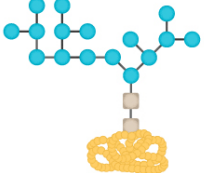
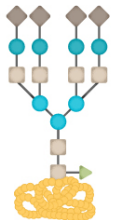
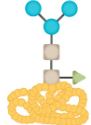
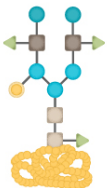
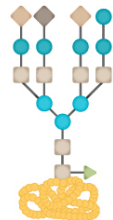
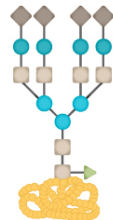
dużą skalę (15). System ten ma bardzo dużo zalet związanych z ekspresją heterologicznych genów w komórkach owadzi: (i) szybkie tempo wzrostu komórek w pożywkach syntetycznych, (ii) możliwość przeniesienia warunków hodowli do skali ponad-laboratoryjnej, (iii) obecność enzymów odpowiedzialnych za modyfikacje potranslacyjne, takie jak glikozylacja, fosforylacja, acetylacja, cięcie endoproteolityczne. Wykazano, iż w komórkach owadzi dojrzewanie białek zachodzi podobnie jak w komórkach ssaczych z zachowaniem transportu pomiędzy retikulum endoplazmatycznym, a aparatem Golgiego. Jedną z niewielu wad tego systemu jest brak enzymów odpowiedzialnych za dołączanie kwasu sialowego (sialylotransferaz) w ostatnich etapach N – glikozylacji. Obecnie w większości przypadków produkcja białek w komórkach owadzi oparta jest na wykorzystaniu zmodyfikowanych bakulowirusów jako platformy do produkcji białek heterologicznych. System Bac-to-Bac oparty na rekombinowanym bakulowirusie umożliwia wprowadzenie sekwencji obcego genu pod kontrolę silnego promotora, jednego z późnych białek bakulowirusa – polihedryny. Bakulowirusowy system ekspresji ma wiele zalet, jest przede wszystkim stosunkowo łatwym narzędziem, które daje możliwość nadprodukcji białek, zbadania ich struktury oraz właściwości (59). Wadą produkcji VLPs w komórkach owadzi jest obecność cząsteczek rekombinowanego bakulowirusa obok powstających cząsteczek wirusopodobnych (60).

W ostatnich latach opisano genetycznie modyfikowane komórki owadzie, do genomu których wprowadzono obce geny, eliminując w ten sposób użycie bakulowirusa. Jednakże, możliwe jest wprowadzenie tylko jednej sekwencji genu kodującego strukturalne białko wirusowe do komórek owadzi (61). Podczas gdy tradycyjny system ekspresji z wykorzystaniem bakulowirusów umożliwia nadekspresję nawet 6 genów jednocześnie (62)(63).



*Rysunek 7. Zalety i wady różnych systemów do produkcji cząstek wirusopodobnych. Schematyczne zestawienie najpopularniejszych wad oraz zalet przy wyborze systemu do produkcji cząstek wirusopodobnych; Porównanie profilu glikozylacji rekombinowanych glikoprotein produkowanych w drożdżach, komórkach owadzi, pierwotniaku *L. tarentolae*, komórkach ssaczych oraz w roślinach*

Systemy do produkcji cząstek wirusopodobnych

	Bakterie	Drożdże	Pierwotniaki	Owady	Rośliny	Ssaki	Ludzie
Systemy ekspresyjne							
Zalety	niski koszt produkcji skalowalny bardzo szybki wzrost komórek bakteryjnych łatwy technologicznie system ekspresja na wysokim poziomie stabilność genetyczna	niski koszt produkcji skalowalny brak zanieczyszczenia endotoksynami łatwy technologicznie system: duża gęstość hodowli ekspresja na wysokim poziomie po procesie optymalizacji białka rekombinowane podlegają PTM obecność mostków disiarczkowych	niski koszt produkcji łatwy do wprowadzenia produkcji w skali półtechnicznej oraz technicznej wykazuje stabilność genetyczną poprawne fałdowanie białek poprawne modyfikacje potranslacyjne	brak zanieczyszczenia endotoksynami ekspresja na wysokim poziomie po procesie optymalizacji możliwość ekspresji do 6 białek jednocześnie efektywność produkcji VIP bezostonkowych porównywalna lub wyższa niż E. coli modyfikacje potranslacyjne podobne do profilu ssaczego możliwość produkcji eVLPs	niski koszt produkcji skalowalny brak zanieczyszczenia endotoksynami łatwy technologicznie system produkcji białka rekombinowane podlegają PTM obecność mostków disiarczkowych możliwość produkcji eVLPs	prawidłowe składanie białek brak zanieczyszczenia endotoksynami łatwy technologicznie system produkcji białka rekombinowane podlegają PTM możliwość produkcji eVLPs brak kontaminacji ludzkimi patogenami	prawidłowe składanie białek brak zanieczyszczenia endotoksynami łatwy technologicznie system produkcji białka rekombinowane podlegają PTM możliwość produkcji eVLPs
Wady	słaba immunogenność białka rekombinowane nie posiadają PTM (modyfikacji potranslacyjnych) problemy z rozpuszczalnością białek zanieczyszczenie przez endotoksyny bakteryjne brak mostków disiarczkowych brak możliwości produkcji eVLPs	efektywność produkcji VIP niższa niż w E. coli wysoka zawartość reszt mannozowych modyfikacje potranslacyjne (PTM) o odmiennym do ssaczego profilu brak możliwości produkcji eVLPs	mniejsza ekspresja niż w komórkach bakteryjnych i drożdżowych wydłużony czas selekcji klonów	trudne do skalowania wysoki koszt produkcji zanieczyszczenia bakulowirusami prostsza N-glikozylacja niż w komórkach ssących niekompletna modyfikacja białka	niższa wydajność niż w systemie ssaczym trudności technologiczne – uprawa	bardzo wysokie koszty produkcji wymagają skomplikowanych zakładów produkcyjnych długi czas optymalizacji procesu produkcji niska wydajność zanieczyszczenie przez patogeny ssaków	bardzo wysokie koszty produkcji wymagają skomplikowanych zakładów produkcyjnych długi czas optymalizacji procesu produkcji niska wydajność zanieczyszczenie przez patogeny ludzkie
Glikozylacja	brak						

3.6.4. System do produkcji białek w komórkach ssaczyc jako platforma do produkcji cząstek wirusopodobnych

Od ponad dwóch dekad opisuje się wykorzystanie komórek ssaczyc jako źródła komercyjnie dostępnych farmaceutyków, w tym szczepionek (64) (65). Biorąc pod uwagę obecność złożonej maszyneryi komórkowej mamy pewność, że uzyskane cząstki są identyczne pod wieloma względami z natywnymi wirusami (profil cukrowy glikoprotein, cięcie proteolityczne, obróbki potranslacyjne związane z dojrzewaniem poszczególnych białek wirusowych) (37). Komórki ssacze produkują w pełni funkcjonalne oraz w pełni glikozylowane białka. Ssaczy system używany jest do wytwarzania złożonych VLPs otoczkowych składających się z wielu białek strukturalnych, w tym glikoprotein. Profil cukrowy głównych białek wirusowych ma kluczowy wpływ na odpowiedź immunologiczną (66) (57).

Coraz częściej opisywane są tak zwane linie stabilnie produkujące cząstki wirusopodobne (67). Zaletą tego rozwiązania technologicznego jest stała produkcja białka przez komórki ssacze. Obecnie produkcja rekombinowanych białek oraz cząstek wirusopodobnych wykorzystuje linie komórkowe przystosowane do wzrostu w zawieszynie przy użyciu chemicznie zdefiniowanych pożywek wolnych od surowicy (68). Od kilku lat do produkcji rekombinowanych białek w tym przeciwciał terapeutycznych oraz VLPs wykorzystywana jest linia komórkowa jajnika chomika chińskiego (CHO; ang. chinese hamster ovary). Zaletą jest to, iż linia CHO nie pochodzi od człowieka, a zatem stwarza mniejsze ryzyko kontaminacji ludzkimi wirusami. Komórki CHO były wykorzystywane do produkcji VLPs hantawirusów (69). Kolejną powszechnie wykorzystywaną linią komórkową do produkcji białek rekombinowanych oraz nanostruktur biologicznych jest linia komórek HEK293, w której uzyskano różne typy VLP: wścieklizny (70), HIV (71) czy VLPs grypy (72).

Istnieją obecnie dwie metody produkcji VLP w hodowlach komórek ssaczyc. Klasyczna metoda polega na wytworzeniu stabilnej linii komórkowej, która produkuje VLPs w sposób ciągły (70). Znacznie szybszym podejściem jest klasyczna transfekcja komórek, aby po 48 godzinach uzyskać cząstki wirusopodobne.

Wadami związanym z wykorzystaniem ssaczego systemu jest cena oraz stosunkowo niska wydajność. Należy jednak brać pod uwagę na ile ilość w stosunku do jakości będzie warunkować sukces przyszłego preparatu szczepionkowego.

3.6.5. System produkcji cząstek wirusopodobnych w roślinach

Rozwój inżynierii genetycznej pozwala na opracowywanie z roku na rok nowych technologii produkowania cząstek wirusopodobnych. Jednym z nich było wykorzystanie roślin jako platformy do produkcji VLPs (73). Ponad 20 lat temu opisano po raz pierwszy produkcję rekombinowanych białek w roślinach. Uzyskanie ekspresji heterologicznego genu w roślinach związane jest z wykorzystaniem wektorów, które umieszczane są w komórce roślinnej poprzez agroinfekcje czy też bombardowanie biolistyczne. Wykorzystanie techniki agroinfiltracji pozwala na uzyskanie ekspresji transgenu w bardzo krótkim czasie, bo zaledwie w ciągu kilku dni od infekcji bakteriami *Agrobacterium*. Metoda ta jest szeroko stosowana na całym świecie, gdyż pozwala na szybką ocenę poziomu ekspresji wprowadzonego transgenu poprzez oszacowanie efektywności produkcji kodowanego przez ten transgen białka. Wykorzystując tą metodę białka i VLPs produkowane są w sposób ciągły, dlatego też taką roślinę można uznać za bioreaktor. Najczęściej wykorzystywanymi roślinami do produkcji rekombinowanych białek są tytoń, kukurydza, ryż oraz pomidor. Firma

Medicago prowadzi obecnie badania kliniczne, mające na celu wprowadzenie na rynek szczepionek opartych na VLPs, które produkowane są w roślinach, głównie w liściach tytoniu. Opracowywane preparaty ochronne zawierają VLPs np. wirusa grypy czy rotawirusa. Ważnym jest fakt, iż roślinne enzymy prowadzą do powstania w pełni glikozylowanych białek, które mogą ulegać wszystkim modyfikacjom potranslacyjnym (74). Opisano szereg VLPs uzyskanych w roślinach (75), w tym również VLPs SAR-CoV-2 (76) (77).

3.7. Zastosowanie VLPs

Cząstki wirusopodobne imitują natywne wirusy dlatego też są idealnymi kandydatami do opracowywania preparatów diagnostycznych oraz profilaktycznych. Zastosowanie cząstek wirusopodobnych jako antygenów referencyjnych zastępuje tradycyjne metody pozyskiwania inaktywowanych wirusów do badań. Wykorzystanie cząstek wirusopodobnych do terapii oraz jako antygenów do szczepień jest obecnym trendem w opracowywaniu preparatów terapeutycznych nowej generacji. Ponadto cząsteczki wirusopodobne mają coraz szersze spektrum zastosowań, takich jak terapia genowa, nanotechnologia, wakcynologia oraz szeroko pojęta diagnostyka (54). Oto kilka przykładów wykorzystania VLPs:

1. VLPs jako podjednostkowe szczepionki rekombinowane przeciwwirusowe,
2. VLPs jako terapeutyczne podjednostkowe szczepionki rekombinowane,
3. VLPs jako nośniki:
 - a. obcych epitopów umieszczonych na powierzchni poprzez chemiczną koniugację, inżynierię genetyczną,
 - b. peptydów o różnych właściwościach,
 - c. ligandów o różnych właściwościach w tym immunostymulujących pełniących rolę adjuwantów,
 - d. DNA,
 - e. mRNA,
 - f. siRNA,
 - g. leków,
4. VLPs do biowizualizacji,
5. VLPs jako antygeny do testów diagnostycznych w tym immunosensorów.

3.8. Modele badawcze cząsteczek wirusopodobnych

W niniejszej pracy postanowiono wykorzystać dwa modele badawcze VLP. Wybór modeli badawczych związany był z istniejącym zagrożeniem epidemiologicznym na terenie Polski. Pierwszy model badawczy dotyczył epidemii ptasiej grypy. Postanowiono użyć do badań wirusa ptasiej grypy typu H5N1. Wirus ptasiej grypy jest wirusem posiadającym osłonkę, a zatem stanowi przykład osłonkowych cząstek wirusopodobnych. Drugim czynnikiem etiologicznym powodującym znaczne straty ekonomiczne w sektorze chowu królików jest króliczy kaliciwirus RHDV. Wirus ten posiada symetrię ikozaedralną i nie posiada osłonki jest zatem modelem bezosłonkowych VLPs zbudowanych z jednego białka. Aby w pełni zrozumieć mechanizmy tworzenia się cząstek wirusopodobnych kluczowa jest znajomość biologii obu wirusów.

3.8.1. Wirus grypy typu A; pierwszy model badawczy

3.8.1.1. Biologia oraz molekularne mechanizmy zmienności wirusa grypy typu A

Wirusy grypy typu A należą do rodziny ortomyksowirusów, których genom stanowi segmentowany jednoniciowy RNA o polarności ujemnej. Głównym rezerwuarem wirusa grypy jest dzikie ptactwo wodne i wodno-błotne należące do przedstawicieli rzędów *Charadriiformes* oraz *Anseriformes* (78) (79) (80). Możliwość rozprzestrzeniania się wirusów grypy poprzez wędrówki ptaków powoduje, że wirus ten jest jednym z najgroźniejszych czynników chorobotwórczych. Jako przykład można wymienić nowy szczep wirusa grypy typu A H5N8 wyizolowany na terenie Chin, który krążył wśród ptactwa hodowlanego na terenie Niemiec, Holandii oraz USA w 2014 (81), by w następstwie powstał nowy szczep H5N2, który występuje obecnie na terenie USA (82). Postęp cywilizacyjny oraz intensyfikacja badań doprowadziły w ostatnich latach do wyizolowania szczepów wirusa grypy od nietoperzy. (83). Olbrzymie zróżnicowanie wirusów grypy typu A ma związek z różnorodnością dwóch głównych glikoprotein powierzchniowych: hemaglutyniny (HA) i neuraminidazy (NA), które tworzą różne podtypy wirusa np. H1N1, H3N3. Jak do tej pory, opisano 18 podtypów hemaglutyniny oraz 11 podtypów neuraminidazy (84) (85) (83) (Rys. 8.). Należy zwrócić uwagę, iż podtypy H17 oraz H18 zostały opisane tylko u nietoperzy, podczas gdy od dzikiego ptactwa wyizolowano wszystkie 16 hemaglutynin oraz 9 typów neuraminidaz (83). Dominujący charakter w populacji ptaków mają obecnie podtypy H9, H5, H7, H10, co ma bezpośrednie przełożenie na sytuację epidemiologiczną na całym świecie. Na dzień 24 czerwca 2019 r. odnotowano co najmniej 861 przypadków zakażeń ptasią wirusem H5N1 u ludzi na całym świecie (aktualne dane WHO). Szczepy wirusa ptasiej grypy (ang. avian influenza virus, AIV) typu H5N1 uważane były za bardzo groźne wirusy, które mogły dać początek pandemii. Ostatnie badania epidemiologiczne sugerują, że szczepy typu H9 charakteryzują się wyższą zakaźnością dla ludzi niż inne AIV. W konsekwencji może to powodować przejściowe infekcje u ludzi oraz doprowadzić do adaptacji tego odzwierzęcego szczepu w populacji ludzkiej. Niepokojący jest również fakt, że wiele nowych podtypów, takich jak H7N9, H6N1, H10N8, H5N6 i H7N4 przekroczyło barierę gatunkową (86).

Jednym z głównych problemów ogólnoświatowej gospodarki są epidemie ptactwa hodowlanego wywołane przez wirusy ptasiej grypy. Tempo ewolucji oraz proces selektywnej adaptacji jest nieporównywalnie wyższy w przypadku infekcji ptactwa hodowlanego, co w efekcie zwiększa prawdopodobieństwo powstania wysokopatogennych szczepów, które mogą dać początek nowym epidemiom wśród ludzi (87) (88) (86). W zależności od objawów chorobowych oraz współczynnika śmiertelności możemy wyróżnić trzy charakterystyczne wzory patogenności wirusa ptasiej grypy: niski – LPAI (ang. low pathogenic avian influenza), średni - MPAI (ang. mildly pathogenic avian influenza) oraz wysoki-HPAI (ang. high pathogenic avian influenza). W przypadku tego ostatniego dochodzić może do zakażenia systemowego, a śmiertelność może wynosić nawet do 100%. Należy również dodać, że tylko podtypy H5 i H7 charakteryzują się fenotypem HPAI (89).

Wirus grypy wykorzystuje kwas sialowy dla przyłączenia się do powierzchni komórek gospodarza, umożliwiając tym samym wniknięcie do wnętrza komórki (90). Wirusy ludzkiej grypy preferencyjnie wiążą kwas sialowy połączony z galaktozą wiązaniem α 2,6, podczas gdy szczepy ptasiej grypy w większości przypadków wiążą kwas sialowy połączony z galaktozą wiązaniem α 2,3, będący głównym receptorem na powierzchni komórek u ptaków. Różnice te mają ogromny wpływ

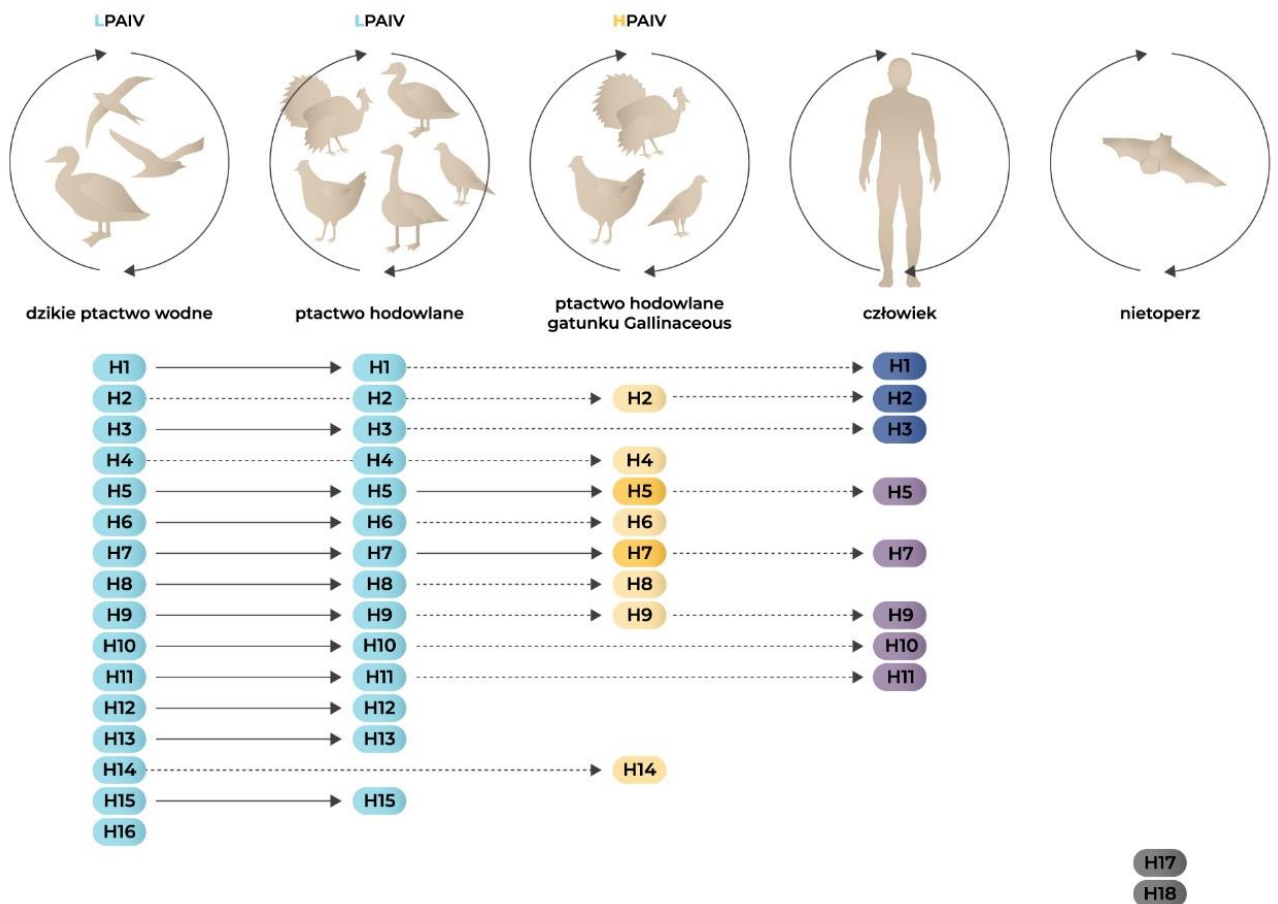
na przekroczenie bariery gatunkowej przez wirusy grypy. Z badań wynika, iż u ludzi anatomiczna dystrybucja wyżej opisanych receptorów w poszczególnych częściach nabłonka wyściełającego drogi oddechowe wykazuje dominujące rozmieszczenie receptorów typu SA α 2,6Gal na powierzchni komórek nabłonkowych błony nosowej, zatok przynosowych, gardła, tchawicy, oskrzeli i w oskrzelikach końcowych. Receptory SA α 2,3Gal występują jedynie sporadycznie w obrębie górnych partii układu oddechowego, ich obecność potwierdzono w miejscu połączenia oskrzeli i płuc oraz na pneumocytach typu II pęcherzyków płucnych, czyli w dolnych partiach układu oddechowego (91). Niektóre zwierzęta, jak np. świnie, uważane są od wielu lat jako ważne źródło nowych podtypów wirusów grypy, które mogą dać początek potencjalnie pandemicznym szczepom, czego przykładem jest pandemia H1N1 z 2009 roku. Świnie posiadają na powierzchni komórek receptory, z którymi wiążą się liczne podtypy wirusów grypy ptaków i ssaków (zarówno SA α 2,3Gal, jak i SA α 2,6Gal), co stwarza sprzyjające warunki do ko-infekcji i mieszania się poszczególnych segmentów wirusowego RNA (vRNA). W ten sposób generują się nowe podtypy wirusowe, określane mianem reasortantów (92) (93).

Panująca na świecie sytuacja epidemiologiczna związana z ewolucją wirusa grypy typu A budzi strach przed kolejną pandemią. Wprowadzenie nowego podtypu wirusa grypy do ludzkiej populacji zostało odnotowane wielokrotnie w ciągu ostatnich 20 lat (dane WHO). Przekroczenie bariery gatunkowej wirusa ptasiej grypy nie doprowadziło jednak do powstania szczepu ptasiego zaadaptowanego do nowego gospodarza jakim jest człowiek. Dane epidemiologiczne oraz szczegółowe analizy filogenetyczne potwierdzają jednak ewolucję tych groźnych patogenów w kierunku akumulacji zmian mających na celu adaptację tego odzwierzęcego czynnika etiologicznego do nowych gospodarzy, w tym człowieka.

Molekularne mechanizmy zmienności wirusa grypy wydają się zależeć od trzech mechanizmów: akumulacji mutacji adaptacyjnych, skoku antygenowego (reasortacja) oraz rekombinacji (78) (94). Mutacje punktowe oraz ich kumulacja prowadzi do stopniowych zmian w immunogenności białek wirusowych (78) (95). Ta zmiana własności antygenowych białek nosi nazwę przesunięcia antygenowego lub dryfu antygenowego i zwykle nie powoduje wielkich epidemii, a tylko ograniczone zachorowania. Największa presja układu immunologicznego skierowana jest na białka zewnętrzne, czyli HA i NA, i tutaj też obserwuje się największe zmiany sekwencji aminokwasów wynikające z dryfu antygenowego (96). Drastyczny wpływ na genom wirusa ma proces wymiany segmentów pomiędzy różnymi szczepami grypy przy zakażeniach mieszanych nazwane zjawiskiem reasortacji czyli skoku antygenowego. Te nagłe zmiany mogą powodować przewagę selekcyjną nad wirusami rodzicielskimi, a następnie być przyczyną epidemii lub nawet pandemii. Reasortacji ulegają wszystkie segmenty wirusowego materiału genetycznego, ale szczególną rolę odgrywa wymieszanie segmentów kodujących glikoproteiny powierzchniowe HA i NA. Wydaje się, iż takie białka jak nukleoproteina czy podjednostki polimerazy (PB1, PB2, PA) odgrywają znaczącą rolę w patogenności (97) i dopiero wymiana kilku segmentów całkowicie zmienia wirusa i czyni go szczególnie niebezpiecznym (98)(99). Poprzez reasortację wirusów ptasich i ludzkich w organizmach świń oraz na drodze ich późniejszej adaptacji, zostały wprowadzone do populacji ludzkiej wirusy H2N2 (1953 rok pandemia "grypa azjatycka") oraz H3N2 (1968 rok pandemia "grypa Hong-Kong"). Do niedawna wydawało się, że udział świń w generowaniu pandemicznych odmian wirusów grypy typu A jest warunkiem koniecznym. Obecnie wydaje się, że możliwa jest bezpośrednia transmisja wirusów ptasich na człowieka bez udziału gospodarza pośredniego; poprzez szybkie gromadzenie mutacji adaptacyjnych (100).



Międzykontynentalny transport wirusa ptasiej grypy - migracje ptaków

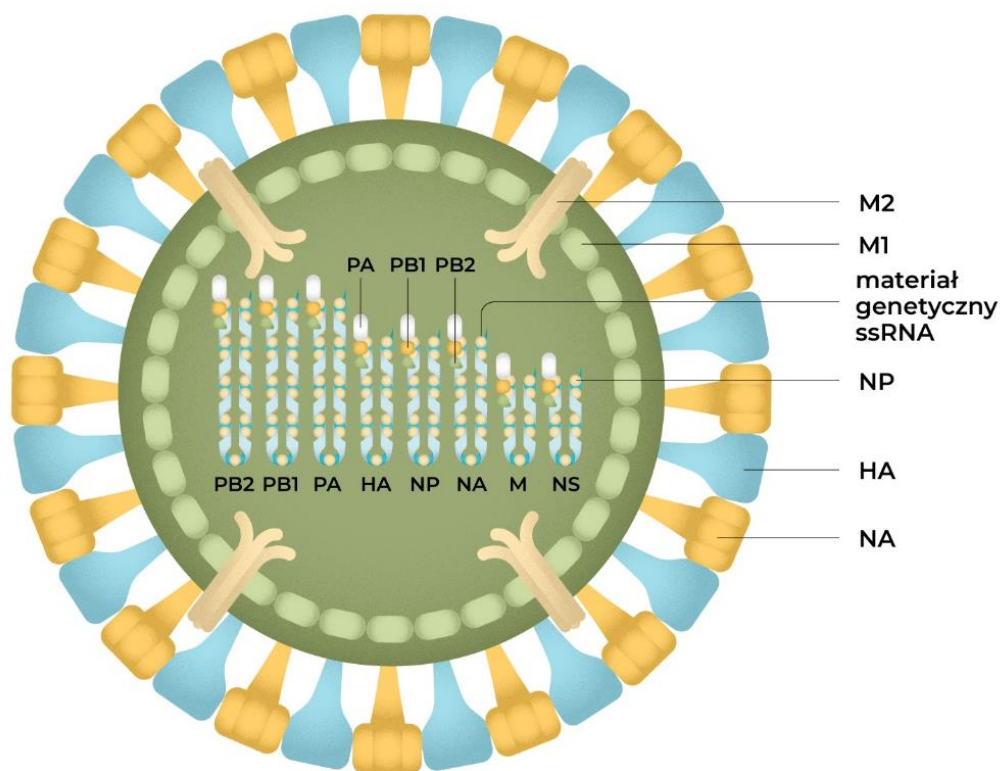


Rysunek 8. Schematyczna prezentacja występowania serotypów hemaglutyniny wirusa grypy przenieszonego przez dzikie ptactwo. Kolor niebieski: niskopatogenne szczepy wirusa grypy – LPAIV (ang. low pathogenic avian influenza); serotypy hemaglutyniny (HA) H1–H16 są obecne u dzikiego ptactwa wodnego (lewy panel) i drobiu domowego (środkowy panel). Kolor ciemno pomarańczowy - wysocepatogenne szczepy wirusa ptasiej grypy – HPAIV (ang. highly pathogenic avian influenza) infekujące ptactwo z rzędu Anseriformes i Galliformes. Naturalne HPAIV (prawy panel) stwierdzono głównie u kurowatych ptaków domowych, ze względu na bardzo szybkie tempo ewolucji związane z epidemiami w sektorze chowu drobiu; szczepy HPAIV pochodzą z prekursorów o niskiej patogenności LPAIV i są ograniczone do serotypów

hemaglutyniny (HA) H5 i H7. Kolor granatowy: serotypy hemaglutyniny (HA) naturalnie występujące u ludzi H1-H3 w podtypach H1N1, H3N2 oraz H2N2. Kolor fioletowy: serotypy hemaglutyniny (HA) H3, H5, H7, H9, H10, H11; wykryte zakażenia odzwierzcące u ludzi szczepami AIV (dane na dzień 08.02.2023; WHO); Kolor czarny: serotypy hemaglutyniny (HA) naturalnie występujące u nietoperzy H17 i H18.

3.8.1.2. Morfologia i organizacja genomu wirusa grypy typu A

Wirusy grypy typu A charakteryzują się zróżnicowaną morfologią (pleomorficzną, sferyczną lub filamentarną), co w znacznym stopniu związane jest z obecnością osłonki lipidowej w wirionie pochodzącej od gospodarza. Osłonka lipidowa wirusa swoim specyficznym składem chemicznym odpowiada rejonom tratw lipidowych znajdujących się w błonie komórkowej gospodarza (101). Przyjmuje się, iż głównymi czynnikami decydującymi o morfologii wirionu są: zmienność genetyczna białka M1 i stan polaryzacji komórek nabłonka układu oddechowego (102) (103). Na powierzchni cząstki wirusowej znajdują się dwie główne glikoproteiny powierzchniowe hemaglutynina oraz neuraminidaza w stosunku ilościowym ok. 5:1, w małej ilości występują również białko M2 tworzące kanały jonowe i warunkujące infekcyjność cząstek wirusa grypy.



Rysunek 9. Model budowy cząsteczki wirusa grypy typu A. Schematyczny diagram prezentujący budowę cząsteczki wirusa grypy A przedstawiający powierzchniowe glikoproteiny HA i NA, białko M2, białko tworzące wewnętrzną osłonkę M1. Wewnątrz cząsteczki wirusowej upakowane jest 8 segmentów wirusowego RNA (vRNA) związanych z białkiem NP i heterotrimeryczną polimerazą wirusową tworząc osiem kompleksów rybonukleoproteinowych (ang. ribonucleoprotein complex, RNP). Każdy kompleks RNP składa się z jednego segmentu RNA o polarności ujemnej związanej z białkiem NP oraz białkami PB1, PB2 i PA, które tworzą multimeryczną polimerazę RNA zależną od RNA.

Wewnętrzna strona cząstki wirusowej wyścielona jest białkiem M1, które oddziałuje zarówno z domenami cytoplazmatycznymi hemaglutyniny, jak i neuraminidazy a dodatkowo ma za zadanie kotwiczyć cząstki wirusowych rybonukleoprotein (104) (101). Budowa wirionu wirusa grypy typu A przedstawiona jest na powyższym rysunku (Rys. 9.).

Genom wirusów grypy typu A składa się z 8 segmentów kwasu rybonukleinowego o ujemnej polarności, które łącznie mają długość ok 14 000 nt (105) (106) (107). Każda cząsteczka wirusowego RNA (vRNA) składa się z odcinka kodującego oraz 5' i 3' odcinków niekodujących UTR (ang. untranslated region), w obrębie których można wyróżnić ok. 7 nt odcinki konserwowane dla wszystkich segmentów vRNA wszystkich podtypów wirusa grypy typu A. Obecność sekwencji UTR umożliwia powstanie drugorzędowej struktury RNA, która warunkuje w kolejnych etapach: powstanie kompleksów wirusowych podjednostek polimerazy przyłączonych następnie do niekodujących rejonów, inicjację procesów replikacji i transkrypcji oraz poprawną morfogenezę, (obecność tzw. sygnałów pakujących warunkujących umieszczenie wszystkich 8 segmentów w potomnej cząsteczce wirusowej) (108) (109). Wirusowe cząstki RNA występują w postaci kompleksu rybonukleoproteinowego RNP (ang. ribonucleoprotein) zarówno w cząstce wirusowej, jak i w zakażonej komórce gospodarza. Każda cząsteczka RNP składa się z wirusowego RNA związanego przez silnie zasadowe białko nukleoproteinę, oraz z heterotrimerycznego kompleksu RNA-zależnej polimerazy RNA (PB1, PB2, PA). Zarówno proces transkrypcji, jak i proces replikacji wirusowego RNA zachodzi w jądrze komórki gospodarza (110) (105).

Replikacja wirusowego materiału genetycznego jest niezależną od startera syntezą komplementarnego produktu przejściowego (c-ssRNA+), który następnie służy jako matryca do syntezy potomnego materiału genetycznego (v-ssRNA-). Ze względu na obecność w/w rejonów UTR, w sposób spontaniczny dochodzi do powstania RNP zawierających zarówno wirusowy, jak i komplementarny przejściowy RNA. Według przyjętego ostatnio modelu replikacji, czynnikiem decydującym o procesie powielania materiału genetycznego jest dostępność białka NP, co oznacza opóźnienie procesu replikacji do fazy późnej zakażenia komórki względem procesu transkrypcji, który odbywa się jako pierwszy, w celu produkcji odpowiedniej ilości białek wirusowych. W wyniku transkrypcji wirusowego RNA dochodzi do powstania na 5' końcu charakterystycznej struktury czapeczki, a następnie do poliadenylacji końca 3' nowo powstałego wirusowego mRNA. Powstałe v-mRNA jest następnie transportowane z jądra do cytoplazmy, gdzie ulega translacji (111) (112).

3.8.1.3. Cykl replikacyjny wirusa grypy typu A

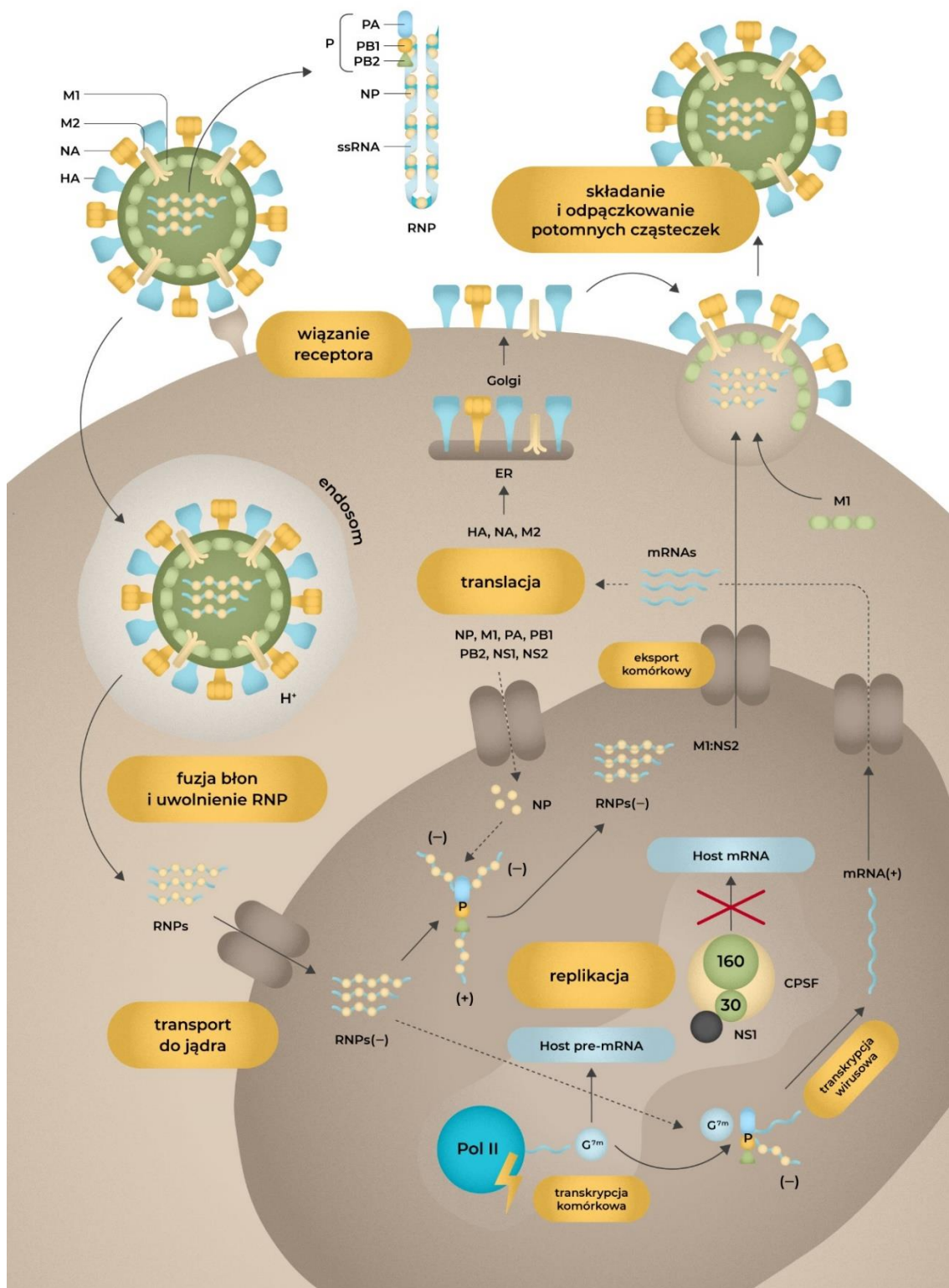
Wirusy grypy przenoszą się drogą kropelkową, co oznacza, że to właśnie w górnych drogach oddechowych rozpoczyna się cykl replikacyjny tego patogenu. Mucyny stanowią komponent surfaktantu nabłonka układu oddechowego. Zawierają one bardzo dużo reszt siałowych na swojej powierzchni, stanowiąc tym samym „kotwicę” dla wirusa grypy na pierwszym etapie zakażenia (113). Jedną z podstawowych funkcji głównego białka neuraminidazy (NA) jest zapobieganie sekwestracji cząstek wirusowych na powierzchni mucyn, a tym samym ograniczanie usuwania wirusa grypy wraz z wydzieliną oddechową już na początku infekcji (36) (114). Pierwszy etap cyklu replikacyjnego wirusa grypy to związanie receptora na powierzchni komórki, w którym kluczową rolę odgrywa hemaglutynina oraz neuraminidaza. Przyjęty obecnie model zakłada, iż wirus grypy wiąże się z receptorem na powierzchni komórki gospodarza w obrębie rejonów endocytotycznych (ang. endocytic sites) (115). Proces endocytozy w przypadku wirionów

o morfologii sferycznej i pleomorficznej jest mechanizmem zależnym od klatryny lub kaweoliny (116). W kolejnych etapach uformowany endosom dojrzewa przechodząc przez wszystkie etapy (ang. „early endosom, late endosom, very late endosom”), które warunkują uwolnienie wirusowego materiału genetycznego do jądra komórki gospodarza. Etapy dojrzewania endosomu polegają na stałym spadku pH w jego wnętrzu co prowadzi do:

- zmiany konformacji białka hemaglutyniny i ekspozycji peptydów fuzyjnych, które w konsekwencji odpowiadają za fuzję błony endosomu z osłonką wirusową;
- aktywacji białka M2, które w formie homotetrameru tworzy wysoce selektywny kanał jonowy odpowiadający za obniżenie pH wewnątrz wirionu;
- niskie pH endosomu oraz wewnątrz cząsteczki wirusowej odpowiada następnie za powolną dysocjację oligomerów białka M1 od powierzchni osłonki wirusowej oraz białka M1 związanego z vRNP;
- w wyniku fuzji błon endosomu z osłonką wirusową następuje uwolnienie vRNP do cytoplazmy, skąd prawdopodobnie jako jeden duży kompleks, transportowany jest do jądra komórkowego; jest to transport zależny od sekwencji sygnałowej NLS (ang. nuclear localization signal) znajdującej się w obrębie nukleoproteiny.

W jądrze komórkowym wirusowe rybonukleoproteiny wiążą się ze strukturami chromatyny poprzez oddziaływania białka NP z histonami nukleosomów. Kolejne etapy cyklu polegają na procesie transkrypcji oraz replikacji, a powstający wirusowy mRNA transportowany jest do cytoplazmy, gdzie rozpoczyna się proces translacji. Wirusowe białka takie jak M1, NP, NEP, NS1, PB1, PB2 oraz PA ulegają translokacji do jądra, aby następnie formować potomne wirusowe kompleksy rybonukleoproteinowe. Eksport dojrzałych vRNP do cytoplazmy odbywa się z udziałem białka NEP, które zawiera sekwencję sygnałową NES (ang. nuclear export signal) i oddziałuje z kompleksem M1-vRNP (116). Istotna jest rola białka M1, które poprzez oddziaływanie z kompleksem wirusowej RNA-zależnej polimerazy RNA wpływa na oddysocjowanie kompleksów vRNP od struktur chromatyny, a dodatkowo hamuje proces transkrypcji na bardzo późnym poziomie infekcji komórki gospodarza (111) (112) (105).

Wirusowe białka strukturalne takie jak HA, NA czy M2 są białkami syntetyzowanymi w rybosomach przylegających do szorstkiej siateczki endoplazmatycznej rER (ang. rough endoplasmic reticulum) i już podczas syntezy kierowane są do światła rER. Białka te przechodzą następnie przez wszystkie struktury aparatu Golgiego (ang. Golgi network; cis, mid, trans), gdzie ulegają różnym modyfikacjom potranslacyjnym (Rys. 9.). W świetle struktur aparatu Golgiego typu trans hemaglutynina ulega aktywacji proteolitycznej poprzez cięcie poliargininowej sekwencji („ERRRKKR”) przez proteazy z rodziny subtylizyn w przypadku szczepów HPAI lub cięcie proteolityczne z udziałem innych komórkowych proteaz w przypadku pozostałych podtypów (117). Istotne jest, że przed przedwczesną aktywacją związaną ze zmianą konformacji białka hemaglutyniny, zapobiega aktywne w TGN (ang. trans Golgi network) białko M2. Istotne jest również, iż sekwencje odpowiedzialne za kierowanie dwóch glikoprotein NA i HA do części apikalnej spolaryzowanych komórek gospodarza znajdują się w obrębie domen cytoplazmatycznej i transbłonowej tych białek. Transport HA i NA do mikro-domen tratw lipidowych wyżej opisanych rejonów odbywa się za pomocą pęcherzyków egzocytotycznych odpączkowujących od TGN (118).



Rysunek 10. Cykl replikacyjny wirusa grypy typu A. Schematyczny model cyklu replikacyjnego wirusa grypy prezentujący etap: wiązania receptora na powierzchni komórki gospodarza; zmiany konformacyjne w obrębie hemaglutyniny oraz fuzję błon endosomu z cząsteczką wirusową; uwolnienie RNP oraz transport materiału genetycznego wirusa grypy do jądra komórkowego; proces replikacji wirusowego RNA; proces transkrypcji wirusowego mRNA; proces translacji w cytoplazmie oraz odpączkowania potomnych cząstek wirusowych. P – heterotrimeryczna polimeraza RNA wirusa grypy; PB1, PB2, PA – podjednostki wirusowej polimerazy; NP – białko wiążące wirusowe RNA (vRNA); ssRNA – jednoniciowe RNA wirusa grypy o polarności ujemnej; RNP- kompleks rybonukleoproteiny; HA – hemaglutynina, główna

powierzchniowa glikoproteina wirus grypy; NA – neuraminidaza, glikoproteina wirusowa; M2 – białko tworzące kanał jonowy; M1 – białko tworzące wewnętrzną osłonkę wirusową tzw. rdzeń; H+ - kwaśne środowisko wewnątrz endosomu; CPSF – czynnik odpowiadający za modyfikację mRNA (ang. cleavage and polyadenylation specificity factor); NS1 – niestrukturalne białko wirusa grypy (ang. nonstructural protein 1), NS2- niestrukturalne białko wirusa grypy (ang. nonstructural protein 2) zwane również NEP (ang. nuclear export protein) pośredniczy w jądrowym eksporcie genomowych RNA w formie rybonukleoprotein.

Glikoproteiny HA i NA rozpoznawane są i wiązane przez białko M1 będące w kompleksie z wirusowymi RNP. Takie heteromultimeryczne kompleksy są następnie dostarczane do zewnętrznej błony komórkowej w odpowiednie rejony bogate w cholesterol i sfingolipidy w formie jednej struktury. Multimeryczny charakter białka M1 odpowiada za proces odpączkowania nowopowstałych cząstek wirusowych. Nie wiadomo jak dochodzi do selektywnego pakowania potomnych segmentów vRNA do wnętrza wirionu, prawdopodobnie kluczową rolę odgrywają rejony UTR, a wszystkie 8 segmentów tworzy superkompleks, który następnie transportowany jest do błony komórkowej (110). Tak powstałe potomne cząsteczki wirusa grypy są zdolne do dalszych infekcji.

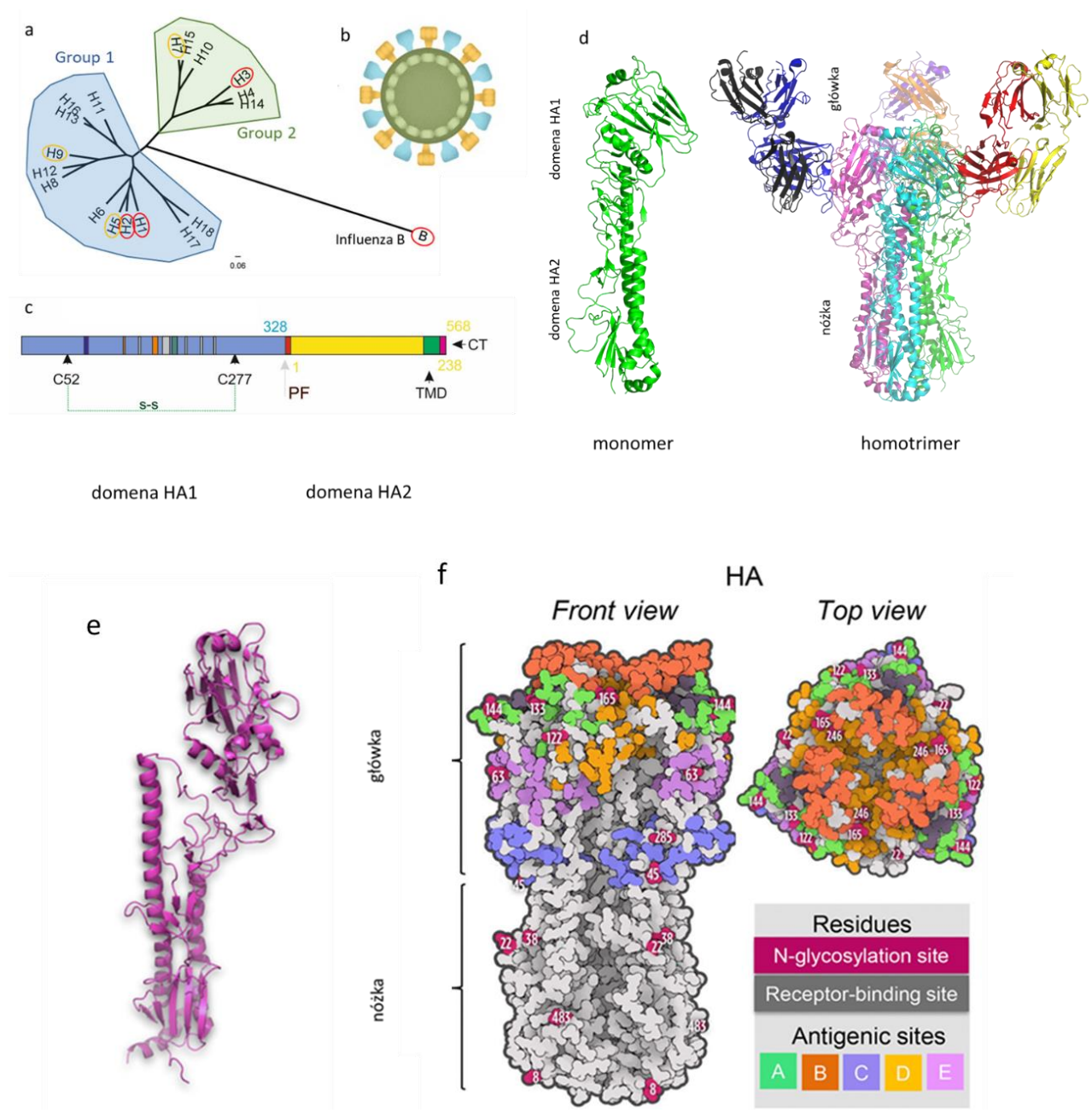
3.8.1.4. Główne strukturalne białka wirusowe

3.8.1.4.1. Hemaglutynina

Głównym białkiem powierzchniowym wirusa grypy typu A jest hemaglutynina (HA), która stanowi 80% wszystkich białek powierzchniowych. Glikoproteina ta, należąca do białek transbłonowych typu I, występuje w postaci homotrimeru (Rys. 11.) i warunkuje infekcyjność wirusa poprzez pełnienie wielu funkcji na wczesnych etapach infekcji. HA determinuje tropizm tkankowy poprzez wiązanie do odpowiedniego receptora na powierzchni komórki, odpowiada więc za specyficzność gatunkową. W kolejnym etapie cyklu replikacyjnego HA warunkuje fuzję błon otoczki wirusowej z błoną komórkową gospodarza, a poprzez oddziaływania swoją domeną cytoplazmatyczną z kompleksem M1-vRNA w sposób pośredni może wpływać na proces odpączkowania wirionów (119). HA jako monomer ma ok 60 kDa i składa się z dwóch podjednostek: HA1 oraz HA2, przy czym na N-terminalnym końcu znajduje się sekwencja sygnałowa, natomiast na C-terminalnym końcu domena transbłonowa (TMD) oraz „ogon” cytoplazmatyczny (CT). Hemaglutynina przechodzi zmiany konformacyjne, polegające na cięciu proteolitycznym formy prekursorowej HA0 do dwóch podjednostek HA1 oraz HA2, które połączone są mostkiem dwusiarczkowym. W strukturze przestrzennej homotrimeru można wyróżnić rejon tzw. główki oraz rejon nóżki (120) (Rys. 11.). W obrębie główki znajdują się główne determinanty antygenowe, które otaczają miejsce wiązania receptora, podczas gdy w obrębie nóżki możemy wyróżnić: (i) charakterystyczny rejon alfa helisy, który poprzez wzajemne oddziaływania stabilizuje strukturę trimeryczną oraz (ii) peptyd fuzyjny, odgrywający kluczową rolę na etapie fuzji osłonki wirusowej oraz błony komórkowej gospodarza (121).

Hemaglutynina podlega różnym modyfikacjom potranslacyjnym, z których glikozylacja wydaje się być najistotniejsza. W zależności od typu HA możemy wyróżnić wiele miejsc glikozylacji w obrębie monomeru (51). Wydaje się, iż reszty cukrowe w obrębie rejonu nóżki są bardziej konserwowane niż te w obrębie główki, co może mieć bezpośrednie przełożenie na modulowanie powinowactwa do receptora oraz, poprzez maskowanie determinant antygenowych, umożliwia unikanie odpowiedzi immunologicznej (Rys. 11.). Kluczowym, obok

glikozylacji, wydaje się być proces palmitylacji w obrębie domeny cytoplazmatycznej i transbłonowej, który wpływa na oddziaływania z rejonami tratw lipidowych (118).



Rysunek 11. **Charakterystyka głównej glikoproteiny HA wirusa grypy typu A.** a) Prawy górny panel pokazuje drzewo filogenetyczne HA, z podziałem na grupę 1 (w kolorze niebieskim) i grupę 2 (w kolorze zielonym). Serotypy HA, które zostały potwierdzone u ludzi, zaznaczone są w ramkach. Zapożyczono z Bullard, B.L.; Weaver, E.A. Strategies Targeting Hemagglutinin as a Universal Influenza Vaccine. *Vaccines* 2021, 9, 257. <https://doi.org/10.3390/vaccines9030257>; b) Model cząsteczki wirusa grypy z niebieską glikoproteiną HA w formie homotrimeru; c) Liniowy schemat białka hemaglutyniny z zaznaczonymi podjednostkami HA1 i HA2 oraz peptydem fuzyjnym – PF, rejonem transbłonowym (TMD, ang. transmembrane domain) i ogonkiem cytoplazmatycznym CT (ang. cytoplasmatic tail); d) Struktura hemaglutyniny w formie monomeru oraz trimeru z opisem rejonu główki HA1 i nóżki HA2 hemaglutyniny. Struktura wygenerowana w programie PayMol na podstawie PDB: 6PDX; e) Struktura hemaglutyniny w formie monomeru prezentująca wyraźnie rejon zmiennej głowy oraz nóżki. Struktura wygenerowana w programie PayMol na podstawie PDB: 6PDX; f) Struktura trimeru HA w formie płaskiej powierzchni z zaznaczonymi miejscami glikozylacji oraz determinantami antygenowymi. Rysunek zapożyczono z (122).

Hemaglutynina będąc główną glikoproteiną powierzchniową stanowi najważniejszy cel większości szczepionek, co z kolei wpływa na dominującą, zależną od HA odpowiedź immunologiczną zarówno w przypadku infekcji, jak i szczepienia (104). Przeciwciała skierowane przeciwko główce hemaglutyniny są zdolne do neutralizacji wirusa. Jak dotąd opisano 5 głównych determinant antygenowych w obrębie główki HA (123) (124) (Rys. 11c).

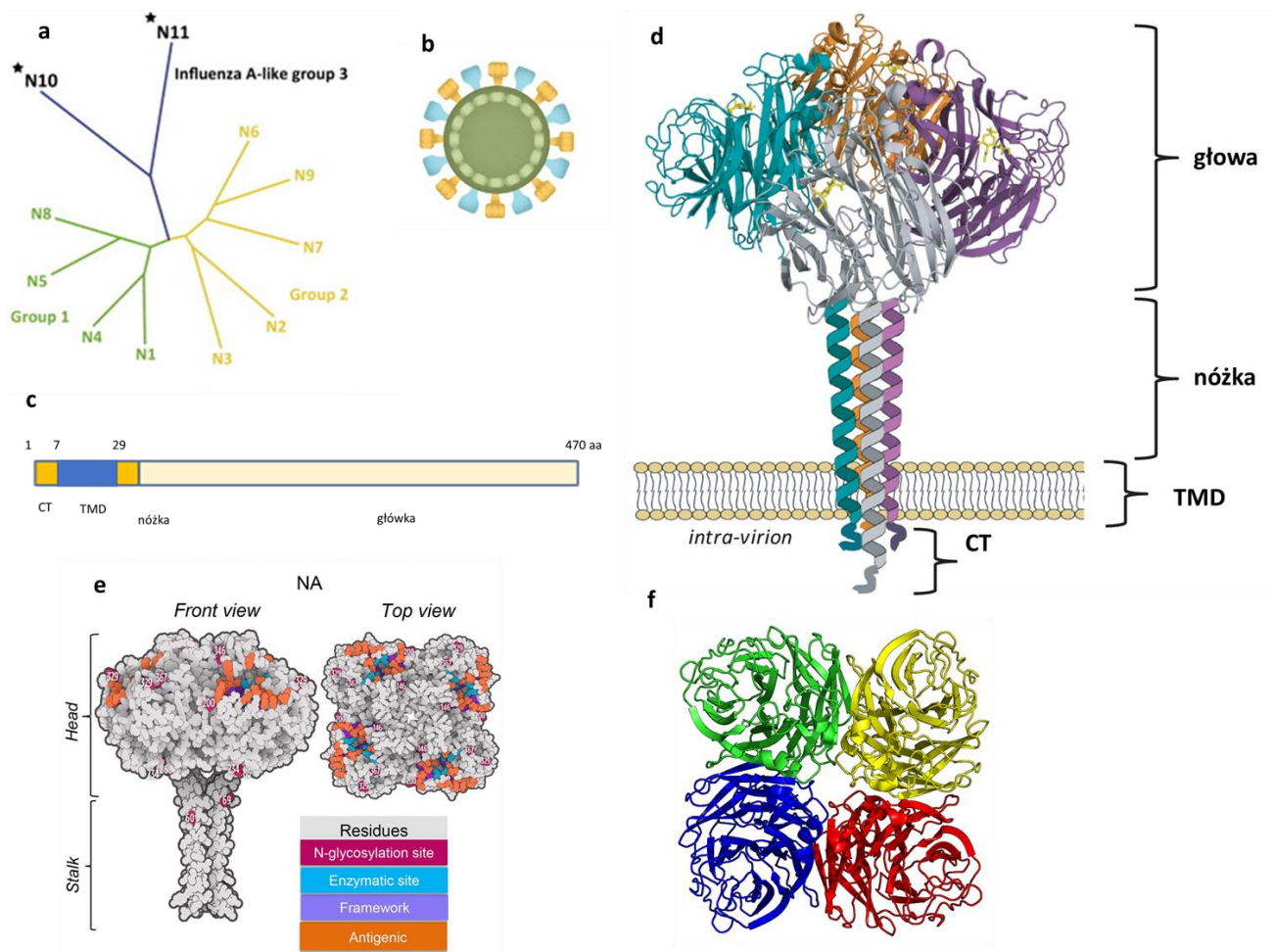
Intensyfikacja badań związanych z odpowiedzią immunologiczną na pandemiczny szczep H1N1 umożliwiła wyizolowanie nowej klasy przeciwciał uniwersalnych przeciwciał neutralizujących, które wiążą się do rejonu nóżki HA (125) (126). To rewolucyjne odkrycie zaowocowało wieloma badaniami, które potwierdziły obecność determinant antygenowych w rejonie podjednostki HA2 tworzącej nóżkę podtypu H1. Na podstawie porównania o wiele bardziej konserwowanego rejonu tworzącego nóżkę, zaproponowano podział filogenetyczny w obrębie HA na dwie grupy: pierwsza do której należą H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13, H16, H17 oraz druga: H3, H4, H7, H10, H14, H15 (125) (127) (Rys. 11.).

3.8.1.4.2. Neuraminidaza

Neuraminidaza (NA) jest drugą główną glikoproteiną powierzchniową wirusa grypy typu A. Białko to należące do II klasy białek transbłonowych posiada funkcje egzosialidazy, katalizującej proces odcięcia kwasu sialowego związanego przez HA. Monomer neuraminidazy składa się z N-terminalnej domeny cytoplazmatycznej, rejonu transbłonowego oraz dużej ektodomeny C-terminalnej eksponowanej na zewnątrz cząstki wirusowej (128) (127). Białko to funkcjonuje jako homotetramer, pełniąc kilka istotnych funkcji:

- odcina związane przez hemaglutyninę reszty kwasy sialowego w nieodpowiednich miejscach komórki na etapie pierwszych etapów infekcji;
- warunkuje przemieszczanie się cząstki wirusowej w docelowe miejsca w układzie oddechowym;
- zapobiega agregacji nowo powstających cząstek wirusowych na powierzchni komórki gospodarza.

Struktura neuraminidazy, podobnie jak w przypadku hemaglutyniny, wykazuje obecność główki, w której zlokalizowane jest miejsce katalityczne, oraz bardzo krótkiej nóżki (129) (130) (128). Neuraminidaza, która nie charakteryzuje się tak szybkim tempem ewolucji została podzielona na dwie grupy filogenetyczne, do pierwszej zaliczamy N1, N4, N5 oraz N8, druga zaś zawiera podtypy: N2, N3, N6, N7, i N9 (127) (122) (Rys. 12.).

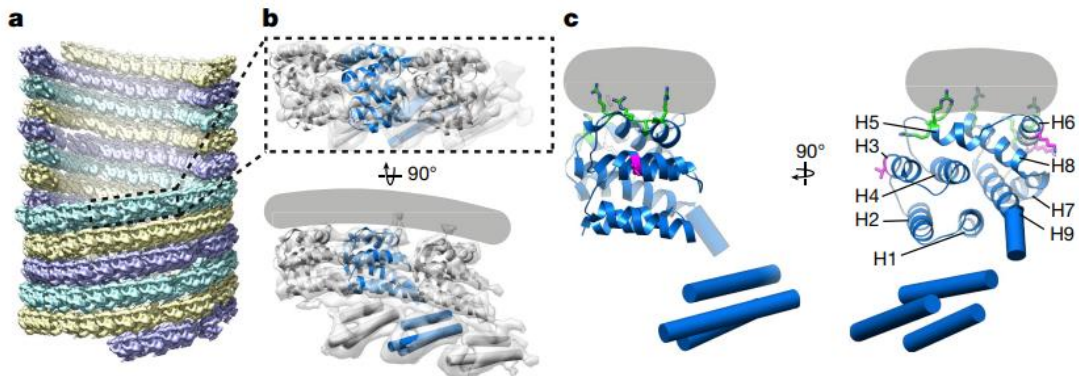


Rysunek 12. **Charakterystyka neuraminidazy wirusa grypy typu A.** a) Prawy górny panel pokazuje drzewo filogenetyczne NA, z podziałem na grupę 1 (w kolorze zielonym) i grupę 2 (w kolorze żółtym). b) Model cząsteczki wirusa grypy z żółtą glikoproteiną NA w formie homotetrameru; c) Liniowy schemat białka neuraminidazy z zaznaczonymi podjednostkami NA1 i NA2 oraz rejonem transbłonowym (TMD, ang. transmembrane domain) i ogonkiem cytoplazmatycznym CT (ang. cytoplasmatic tail); d) Struktura neuraminidazy w formie tetrameru z opisem rejonu główki NA1 i nóżki NA2. Rysunek zapożyczony z Mc Auley i wsp.2019. e) Struktura NA w formie tetrameru z zaznaczonymi miejscami glikozylacji oraz determinantami antygenowymi; f) Struktura główki homotetrameru wygenerowana w programie PyMol na podstawie PDB: 3TIC;

3.8.1.4.3. Białko rdzenia M1

Białko M1 kodowane przez 7 segment wirusowego materiału genetycznego występuje w największej ilości w wirionie, od 1100 do 3000 kopi, w zależności od kształtu wirusa. Białko to przyjmuje lekko wydłużoną formę, a swoim węższym końcem oddziałuje z błoną komórkową tworząc warstwę złożoną z połączonych dimerów. Interakcje towarzyszące formowaniu dimeru umożliwiają dalszą oligomeryzację M1 oraz prowadzą do powstania kompletnej otoczki białkowej wirionu. Białko M1 składa się z domeny N- i C-terminalnej oraz łącznika z konserwowanym rejonem CCHH, który prawdopodobnie tworzy strukturę palca cynkowego, a dodatkowo ulega cięciu proteolitycznemu w rejonie Glu164 - Met 165 (131) (Rys. 13.). Główne białko rdzenia (M1) pełni funkcję: (132) (133)

- łączy się z ogonami cytoplazmatycznymi białek błonowych HA, NA i M2, uczestnicząc zarazem w procesie pączkowania potomnych cząsteczek wirusowych;
- wraz z białkiem NS1/NEP bierze czynny udział w transporcie RNP z jądra komórkowego (134);
- poprzez oddziaływania z wirusowymi białkami łączy cały kompleks RNP z błoną komórkową kontrolując upakowanie wirionu;
- jako główne białko strukturalne nadaje kształt potomnym cząstkom wirusowym.



Rysunek 13. **Struktura i organizacja białka M1 wirusa grypy typu A.** a) Rozmieszczenie białka M1 w VLPs grypy typu A szczepu HK68 zawierających białka HA – NA – M1 – M2, wizualizowane przez umieszczenie struktury monomeru M1 w orientacjach i pozycjach określonych przez uśrednienie subtomogramu. Pokazane są trzy równoległe pasma, z których każdy ma inny kolor. Niektóre monomery zostały usunięte, aby odsłonić wnętrze włókna. b, Struktura trzech sąsiednich monomerów białka M1 w nici określona przez uśrednianie subtomogramu (szara powierzchnia), wyposażona w strukturę krystaliczną M1 NTD (kod PDB 1EA313) i model struktury drugorzędowej dla M1 CTD. Szara linia wskazuje położenie membrany. c, Model pojedynczego monomeru M1. Wskazano numery helisy (H). Dodatkowo naładowane reszty, które powodują interakcje błonowe, są pokazane na zielono (reszty 76–78 w H5, 101 i 104 w H6 oraz 134 w H8). Reszty na styku międzyciowym, których mutacja zmienia morfologię wirionu, są pokazane w kolorze magenta (reszta 41 w H3 i reszty 95 i 102 w H6). Rysunek zapożyczony z Peukes et al, 2020.(131)

3.8.2. Wirus gorączki krwotocznej królików; drugi model badawczy

Drugim modelem badawczym zaprezentowanym w tej pracy był mały bezosłonkowy kaliciwirus – wirus gorączki krwotocznej królików, który jest czynnikiem zakaźnym wywołującym jedną z najgroźniejszych epidemii wśród królików. W ciągu ostatnich 20 lat odnotowano wiele ognisk choroby na terytorium Polski tego niegdyś niepatogennego czynnika zakaźnego zwierząt. We współpracy z dr hab. A. Fitznerem z Państwowego Instytutu Badawczego, Zakładu Pruszczycy w Zduńskiej Woli (PIWet-PIB ZPr) podjęto próby charakterystyki krajowych izolatów oraz opracowania metod zapobiegania i monitorowania choroby wywoływanej przez ten czynnik etiologiczny.

3.8.2.1. Taksonomia

Wirus choroby krwotocznej królików, początkowo zaliczany do rodziny pikornawirusów (135), parwowirusów (136) czy parwo-podobnych wirusów (137), w 1990 roku został zaklasyfikowany do rodziny Caliciviridae. Międzynarodowy komitet taksonomii wirusów (ICTV – „International Committee on Taxonomy of Viruses”), w wyniku analizy filogenetycznej sekwencji genu kodującej główne białko strukturalne, wyodrębnił cztery rodzaje w obrębie kaliciwirusów: Lagovirus, Vesivirus, Norovirus, Sapovirus. Obecnie zaproponowano powiększenie tej rodziny o kolejne rodzaje: Nabovirus, Becovirus (138), Recovirus (139) oraz Valovirus (140).

3.8.2.2. Biologia RHDV

Pomór królików jest bardzo zakaźną i śmiertelną wirusową chorobą królików z gatunku *Oryctolagus cuniculus*. Krwotoczna choroba królików może mieć przebieg ostry lub nadostry z objawami ogólnoustrojowej skazy krwotocznej. Wirus w przeciągu 24 - 72 godzin od zakażenia może wywołać śmierć zwierząt (141). Brak możliwości namnażania wirusa RHD w systemach hodowli komórkowych spowodował, iż jako jego źródło wykorzystuje się narządy wewnętrzne (wątroba, śledziona, w mniejszym stopniu nerki i grasica) zakażonych królików, co w znacznym stopniu uniemożliwia zbadanie zarówno cyklu replikacyjnego, jak i niektórych właściwości oraz funkcji poszczególnych białek wirusowych. Opracowanie testów diagnostycznych oraz inaktywowanych szczepionek budzi wątpliwości natury etycznej.

Diagnostyka wirusa RHD opiera się głównie na:

- odczynie hemaglutynacji (HA), w którym wykorzystuje się zdolność wirusa do aglutynacji erytrocytów człowieka grupy O;
- teście ELISA
- mikroskopii elektronowej;
- reakcji odwrotnej transkrypcji (RT) i łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) oraz reakcji PCR w czasie rzeczywistym (135).

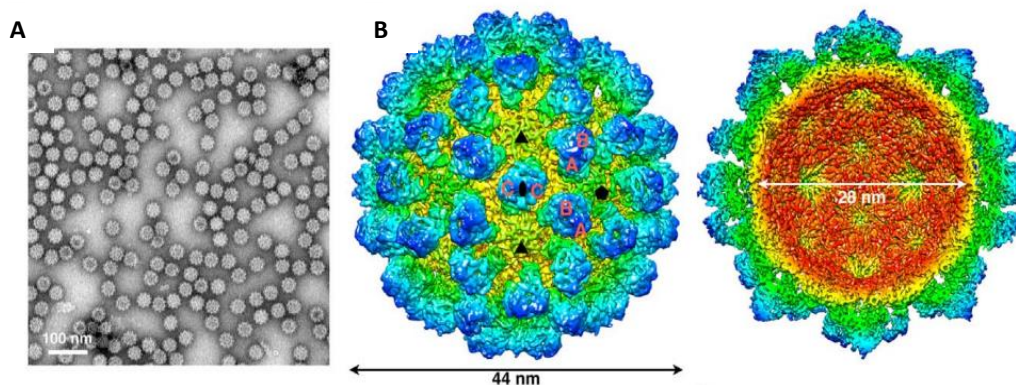
3.8.2.3. Epidemiologia

W latach 80 ubiegłego wieku populacja królika europejskiego została wyniszczona przez nowy typ wirusa, określanego jako wysoce śmiertelny i zakaźny czynnik etiologiczny zarówno wobec królików domowych, jak i dzikich z gatunku *O. cuniculus*. Po raz pierwszy opisu tego nowego patogenu, określanego mianem wirusa krwotocznej choroby królików dokonał Liu w 1984 roku. Opisana epidemia miała miejsce w południowej prowincji Chin. Zachorowania objęły populacje importowanych z Niemiec królików hodowlanych. W okresie kolejnych 12 miesięcy choroba RHD pochłonęła ok. 140 milionów królików domowych na terenie Chin i rozprzestrzeniła się na obszarze ponad 50 000 km². Geograficzne rozprzestrzenianie się tego czynnika etiologicznego objęło w latach 80 Koreę, a następnie Indie. W 1986 roku po raz pierwszy opisano występowanie choroby RHD (ang. rabbit haemorrhagic disease) na terenie Włoch, skąd rozprzestrzeniła się na obszar całej Europy, a w obrębie kilku krajów stała się chorobą endemiczną. Na terenach Półwyspu Iberyjskiego, gdzie dziki królik jest naturalnym składnikiem fauny, epidemie wywołane przez RHDV opisano w 1988 roku w Hiszpanii, a w 1989 roku w Portugalii. W Ameryce Południowej wirus ten po raz pierwszy pojawił się w Meksyku w 1988 roku i w tym samym czasie rozprzestrzenił się na terytorium północnej Afryki. Meksyk jest obecnie jedynym krajem Ameryki, w którym udało się eradykować RHD. W Ameryce Północnej wirus występuje od 2000 roku i co kilka lat powoduje epidemie wśród zwierząt. Co jakiś czas dane literaturowe opisują występowanie choroby na terenach odległych geograficznie, jak np. Kuba, Urugwaj czy wyspa Reunion należąca do archipelagu Maskarenów. Co ciekawe, w latach 1989-1990 wirus RHD postąpił jako czynnik eradykacji królików na terenie Australii, gdzie nadmierny przyrost populacji królików powodował bardzo duże straty w endemicznej florze i faunie (141). Filogenetycznie zidentyfikowano cztery genotypy RHDV GI.1, często przywoływany do postaci klasycznej jedyny patogenny genotyp krążący od ponad 20 lat. Rozpoznano cztery warianty w obrębie genotypu GI.1, GI.1a-d. Nowy genotyp GI.2 pojawił się we Francji w 2010 roku i był odpowiedzialny za masowe spadki populacji królików w Europie. Genotypy GI.3 i GI.4 odpowiadają niepatogennym postaciom RHDV (135). Obecnie epidemie wywołane wirusem gorączki krwotocznej królików występują na całym świecie powodując duże straty ekonomiczne. Skuteczną metodą zapobiegania chorobie jest odpowiednio prowadzona immunoprofilaktyka, w której zasadniczą rolę odgrywają szczepienia.

3.8.2.4. Morfologia

Wirus gorączki krwotocznej królików wykazuje charakterystyczną dla kaliciwirusów morfologię oraz właściwości fizyko-chemiczne. Ten 27 - 40nm bezosłonkowy wirus posiada kapsyd o symetrii ikozaedralnej (Rys. 14.) wewnątrz którego upakowany jest materiał genetyczny w postaci: genomowego jednoniciowego kwasu rybonukleinowego o polarności dodatniej (ssRNA+) oraz subgenomowego, krótszego RNA kodującego dodatkowe ilości głównego białka strukturalnego. Ikozaedralny kapsyd jest dwudziestościanem wykazującym, w większości przypadków, symetrię T=3. Obok symetrii T=3, wykazano obecność mniejszych lub większych form morfologicznych wirusa RHD, które opisano jako symetria T=1 oraz T=4. Kapsyd formowany jest z pojedynczego białka strukturalnego (VP60), które może tworzyć samoformujące się wirusopodobne cząsteczki (VLPs) (142) (143).

Kapsyd o symetrii T=3 składa się z 90 dimerów pojedynczego białka strukturalnego VP60, które formuje zewnętrzną i wewnętrzną powłokę połączoną ze sobą rejonem zawiasowym. Powłoki te zbudowane są z 90 kapsomerów (dimery białka VP60), które tworzą charakterystyczne 32 zagłębienia (ang. calix). Powłoka zewnętrzna tworzy wypustki sterzące na zewnątrz kapsydu, podczas gdy powłoka wewnętrzna zawiera oraz chroni wirusowy materiał genetyczny (144).

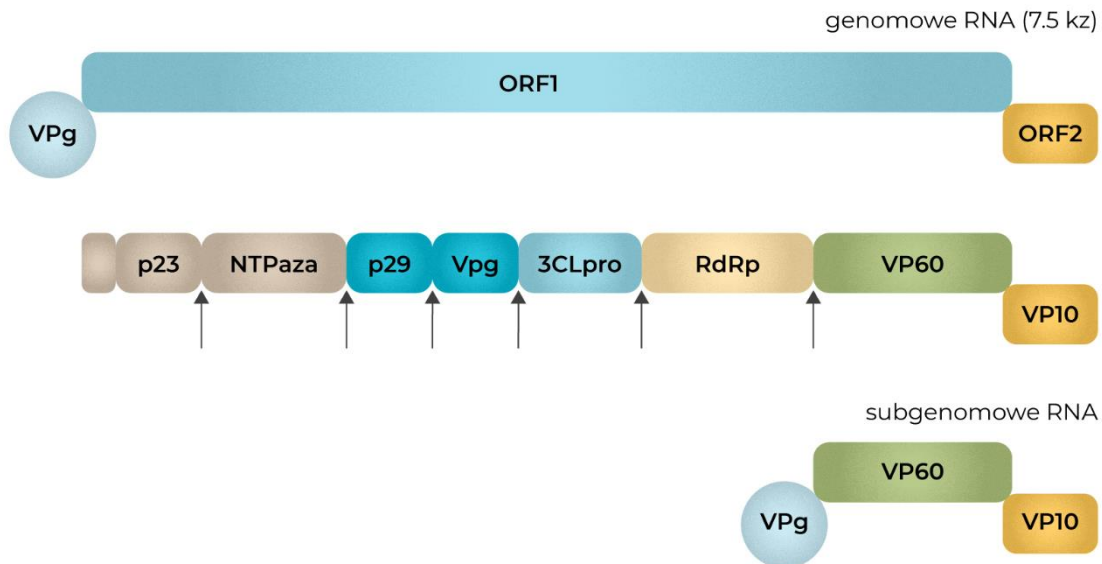


Rysunek 14. **Morfologia wirusa RHD.** A) Oczyszczone i barwione negatywnie octanem uranylu cząstki wirusa RHD; zdjęcie z transmisyjnej mikroskopii elektronowej, B) schemat cząsteczki wirusa RHD przy użyciu metod kriomikroskopii z rekonstrukcją 3D. Niebieskie sklepienia prezentują charakterystyczne wypustki, żółte wgłębienia prezentują charakterystyczne wgłębienia (calix), czerwone wnętrze przedstawia wewnętrzną powłokę. Zdjęcia pochodzące z publikacji Wang X. i wsp. 142 Atomic model of rabbit hemorrhagic disease virus by cryo-electron microscopy and crystallography. *PLoS Pathogens* 9 (1)

3.8.2.5. Struktura genomu i molekularne mechanizmy zmienności

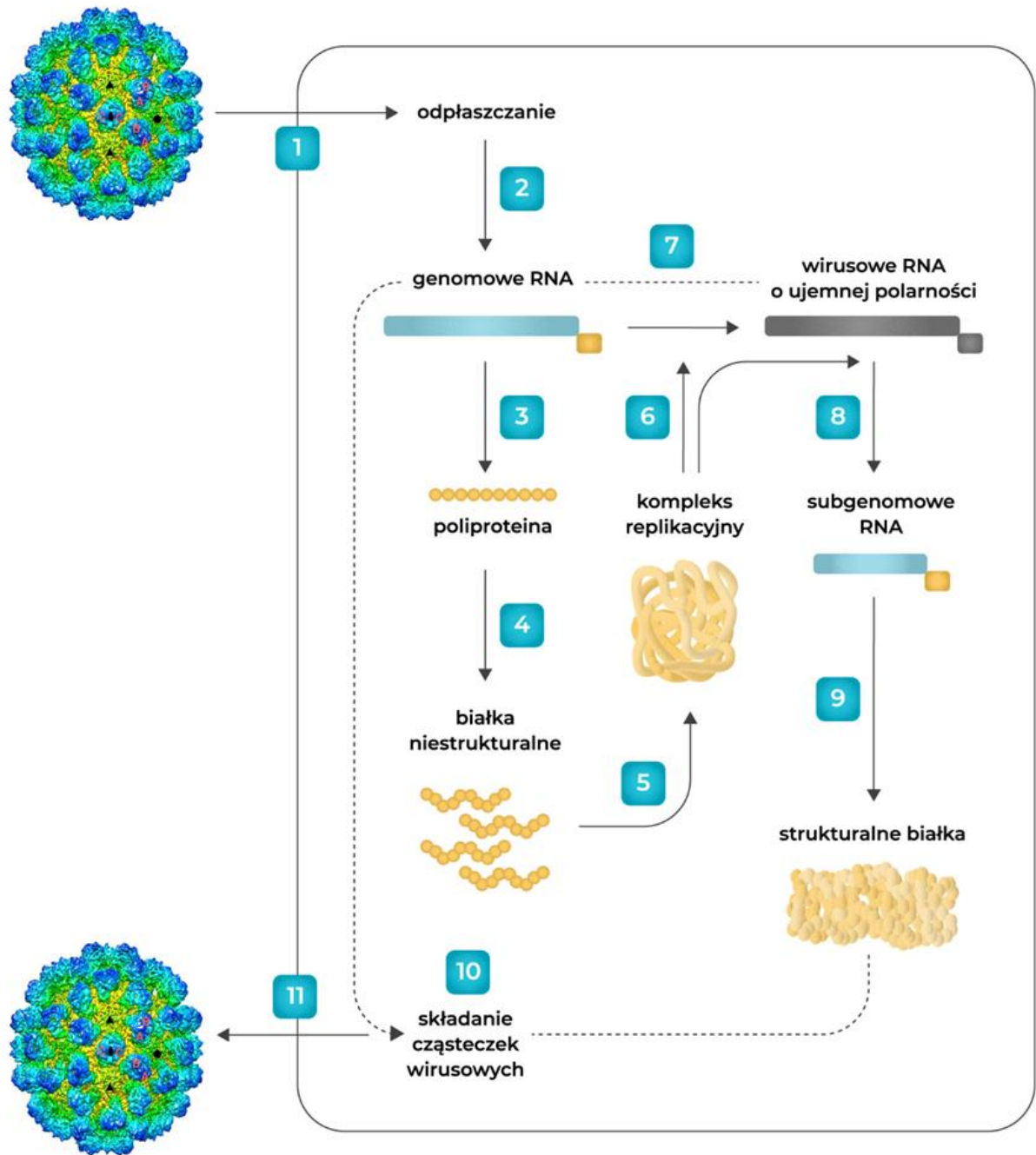
Genom wirusa gorączki krwotocznej królików zbudowany jest z liniowego, jednoniciowego RNA o polarności dodatniej, zakończonego końcem poli-A na 3' końcu oraz kowalencyjnie związanego z wirusowym białkiem VPg na końcu 5' w pozycji Tyr-21 (145). Obok genomowego wirusowego RNA (gRNA) o długości ok. 7,4 tys. zasad możemy wyróżnić również subgenomowy RNA (sgRNA) o długości 2,2-2,4 tys. zasad, który koduje główne białko strukturalne VP60 (Rys. 15.). Białko to tworzy kapsyd i prawdopodobnie moduluje oraz reguluje proces formowania wirionów potomnych. Dodatkowo sgRNA koduje, nie do końca poznane, małe strukturalne białko VP10, które odgrywa rolę w replikacji i uwalnianiu potomnych wirionów z zainfekowanych komórek gospodarza (146). W obrębie sekwencji genomowego RNA można wyróżnić dwie ramki odczytu (ORF). Ramka odczytu ORF1 stanowi większość genomu wirusowego i koduje poliproteinę o wielkości 257 kDa. N-terminalna część pierwszej ramki odczytu zawiera konserwowane sekwencje charakterystyczne dla rodziny pikornawirusów, które kodują 7 białek niestrukturalnych, wśród których możemy wyróżnić takie białka enzymatyczne jak: trypsynopodobną proteazę cysteinową, RNA-zależną polimerazę RNA oraz helikazę. W części 3' genomowego RNA kodowane jest główne białko strukturalne VP60. Obie formy wirusowego RNA są w sposób kowalencyjny związane z białkiem VPg, które prawdopodobnie bierze udział w cyklu replikacyjnym wirusa poprzez modulowanie infekcji oraz procesu translacji (147) (145). W drugiej, mniejszej ramce odczytu ORF2, która zlokalizowana jest na 3' końcu genomowego oraz subgenomowego kwasu rybonukleinowego kodowane jest białko strukturalne VP10 o masie 12,5 kDa. Białko to może oddziaływać z genomowym RNA wpływając tym samym na proces replikacji,

regulować produkcję białka VP60 oraz brać udział w procesie pakowania RNA do cząstek wirusowych, a dodatkowo może wpływać na apoptozę zakażonych komórek (Rys. 15.). Warto nadmienić, iż nie do końca poznano mechanizm, który reguluje ekspresję głównego komponentu kapsydu wirusa RHD.



Rysunek 15. **Struktura genomu wirusa RHD.** *Struktura genomu wirusa RHD.* VP60 – główne białko kapsydu samoformujące VLPs; VP10 – białko strukturalne odgrywa rolę w replikacji i uwolnieniu potomnych kapsydów z zainfekowanych komórek gospodarza; VPg – białko odpowiadające za inicjację translacji wirusowego mRNA; RdRp – polimeraza RNA zależna od RNA; 3CLpro - trypsyno-podobną proteazę cysteinową; p16, p23, p29 – białka niestrukturalne; NTPaza – helikaza; ORF – ramka odczytu; Genomowe RNA wirusowe obejmuje dwie ramki odczytu (ORF). Ramka odczytu ORF1 koduje poliproteinę, która w wyniku cięcia proteolitycznego oraz modyfikacji potranslacyjnych prowadzi do powstania pojedynczych białek wirusowych. Część 3' genomowego RNA koduje główne białko strukturalne VP60. Ramka odczytu ORF2 zlokalizowana na 3' końcu genomowego oraz subgenomowego RNA koduje białko strukturalne VP10. Obok genomowego RNA występuje subgenomowe RNA kodujące białka strukturalne: VP10, VP60 i VPg.

W wyniku procesu translacji genomowego vRNA powstaje jedna długa poliproteina, która jest następnie cięta przez proteinazę cysteinowo-trypsynową na mniejsze białka o wielkościach: 13, 60, 41 i 72 kDa. W wyniku dalszych modyfikacji potranslacyjnych, związanych głównie z cięciem proteolitycznym, powstają wszystkie dojrzałe białka wirusowe (Rys. 15.) (141). Ze względu na ograniczone możliwości namnażania wirusa RHD w hodowlach tkankowych poznanie jego dokładnej struktury oraz mechanizmów warunkujących patogenność jest bardzo trudne (147). Uważa się, iż jedynymi modyfikacjami potranslacyjnymi zaobserwowanymi dla tego wirusa jest cięcie proteolityczne. Badania sekwencji nukleotydowej wykazały kilka miejsc, które prawdopodobnie mogą podlegać N-glikozylacji (146). Profil cukrowy na powierzchni białek wirusowych może w znacznym stopniu wpływać na patogenność wirusów oraz modulować odpowiedź immunologiczną.



Rysunek 16. **Cykl replikacyjny wirusa RHD.** Poszczególne etapy cyklu replikacyjnego: 1- internalizacja wirusa, 2 - proces odplaszczania, 3 - synteza poliproteiny, 4 - modyfikacje potranslacyjne, w wyniku których powstają białka strukturalne i funkcjonalne, 5 - powstaje kompleks replikacyjny zawierający wirusowe białka funkcjonalne, 6 - synteza potomnej nici RNA niekodującej, 7 - synteza potomnych kodujących nici RNA. Powstałe potomne nici RNA mogą być bezpośrednio pakowane do potomnych cząsteczek wirusowych 10, które następnie uwalniane są z komórki gospodarza 11. Niekodujące RNA jest również matrycą dla subgenomowego RNA - 8, z którego powstają białka strukturalne VP60 i VP10 - 9.

3.8.2.6. Cykl replikacyjny

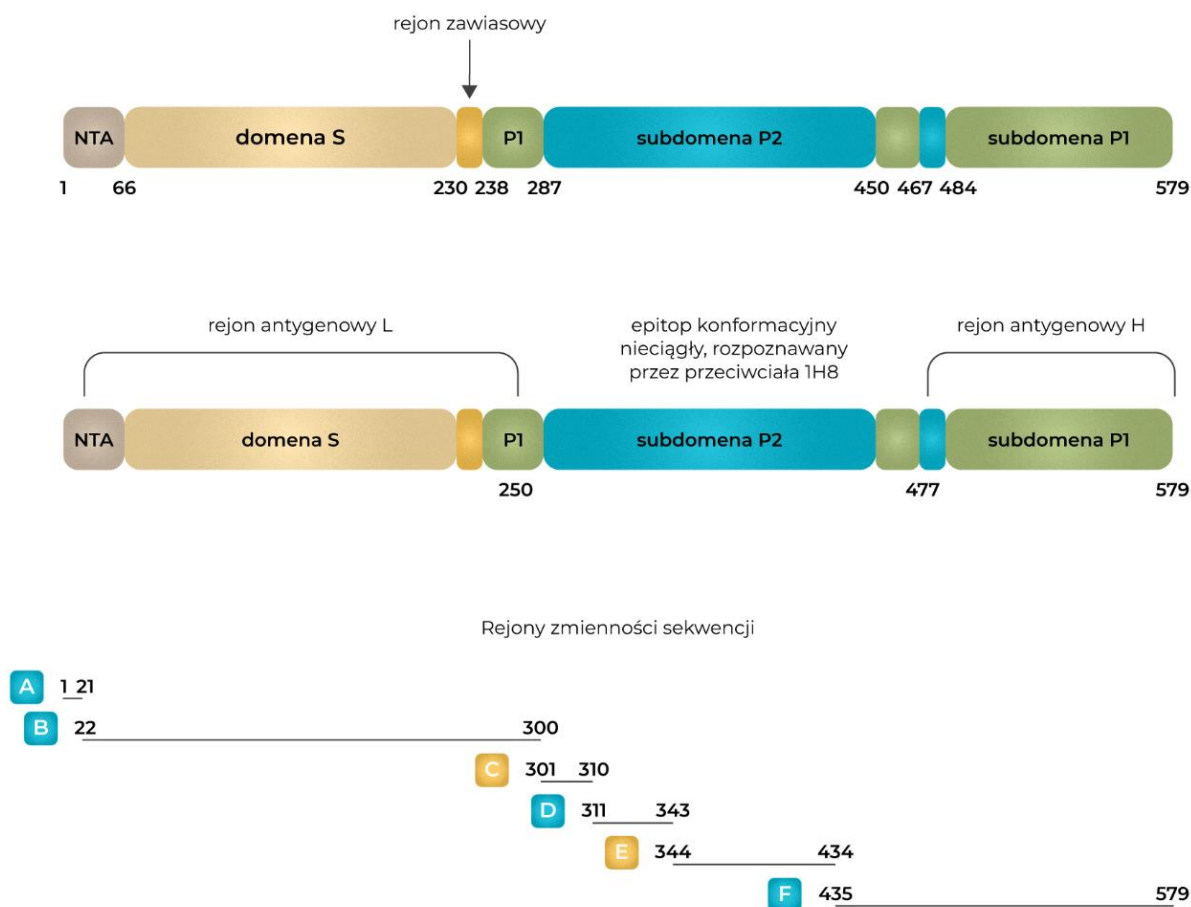
Wirus RHD wnika do górnych dróg oddechowych, gdzie wiąże się z receptorami HBGA H, A i B typu 2 (ang. histo-blood group antigen). Po związaniu receptora na powierzchni komórki następuje proces internalizacji (148). Proces odpłaszczania prowadzi do uwolnienia wirusowego materiału genetycznego do cytoplazmy, gdzie rozpoczyna się proces translacji, w wyniku którego powstaje jedno białko prekursorowe w formie poliproteiny kodowane przez pierwszą ramkę odczytu. Następnie poliproteina podlega modyfikacjom potranslacyjnym polegającym głównie na cięciu proteolitycznym, w wyniku którego powstają wszystkie dojrzałe białka. Białka niestrukturalne, takie jak helikaza i RNA-zależna polimeraza RNA tworzą następnie kompleks replikacyjny, który wiąże się z genomowym RNA (gRNA) i syntetyzuje komplementarne nici RNA o polarności ujemnej (c-ssRNA-). Komplementarny RNA służy następnie do syntezy wirusowego genomowego i subgenomowego RNA (sgRNA) o polarności dodatniej. Powstałe potomne nici gRNA i sgRNA mogą posłużyć jako matryca do syntezy białek lub być bezpośrednio pakowane do nowo powstających wirionów (Rys. 16.). Translacja drugiej ramki odczytu ORF2 zachodzi według unikalnego mechanizmu polegającego na reinicjacji translacji po skończonym procesie dla ORF1. Mechanizm ten nie jest w pełni poznany, ale wiadomo, iż zależy od sekwencji RNA zlokalizowanej powyżej miejsca start/stop, która została nazwana TURBS (ang. termination upstream ribosomal binding site). Ze względu na niewielkie możliwości przeprowadzenia badań na modelu komórkowym w hodowlach tkankowych, wiele etapów cyklu replikacyjnego tego wirusa nie jest jeszcze do końca poznana. Nie wiadomo jak, kiedy i gdzie dochodzi do składania i uwalniania potomnych cząstek wirusa RHD (149).

3.8.2.7. Główne białko kapsydu

Głównym komponentem kapsydu wirusa RHD jest białko VP60, które kodowane jest zarówno przez genomowy, jak i subgenomowy RNA wirusowy. Białko to ma wielkość ok. 60 kDa, na które składa się 579 reszt aminokwasowych. W obrębie monomeru tego białka możemy wyróżnić trzy domeny: domenę S, rejon zawiasowy oraz domenę P, która dalej została podzielona na dwie subdomeny P1 i P2 (146) (150).

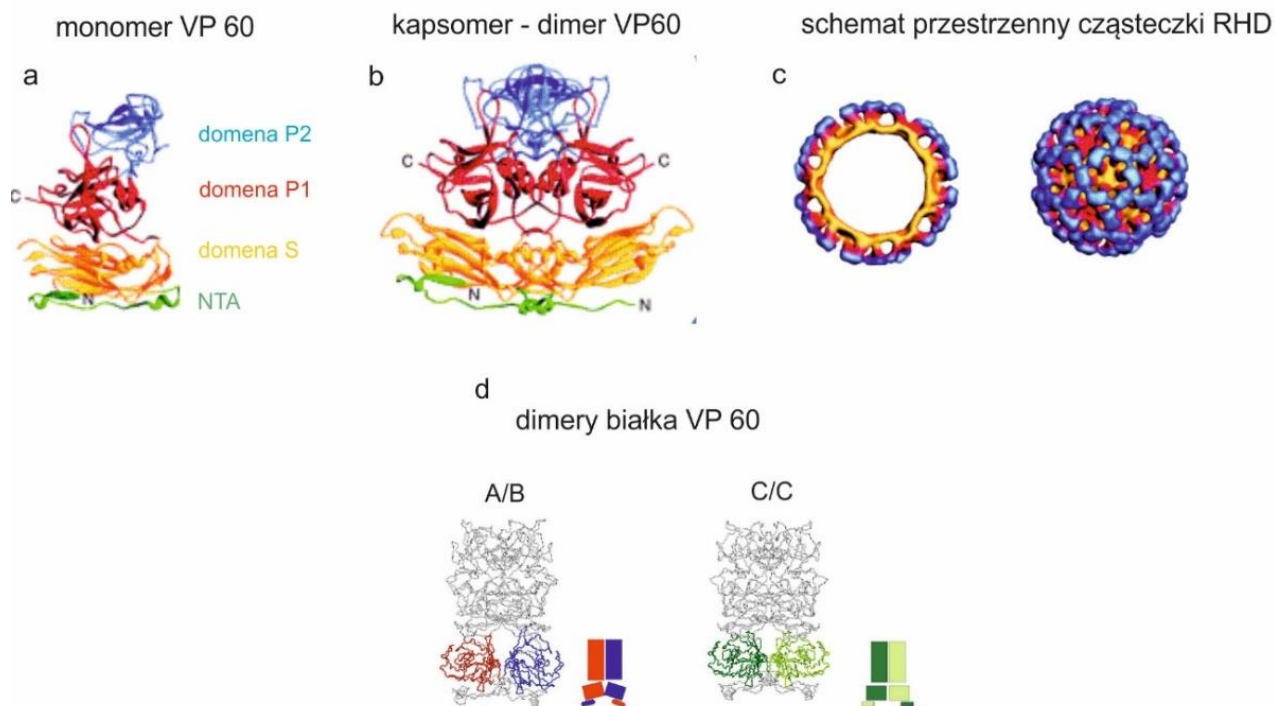
Domena S zlokalizowana jest na N-terminalnym ramieniu białka VP60 i składa się z części wewnętrznej (od 10 - 49 aa) formującej płaszczyznę wewnętrzną kapsydu; uważaną obecnie za odrębną domenę NTA (ang. N - terminal arm), oraz części zewnętrznej (50 - 225 aa), która tworzy charakterystyczne β -harmonijki. Interesującym jest fakt, iż w obrębie wszystkich przedstawicieli kaliciwirusów domena S jest silnie konserwowana (Rys. 17.).

Domena P białka VP60 zlokalizowana jest na końcu C-terminalnym, tworząc płaszczyznę zewnętrzną kapsydu, posiadający najbardziej immunogenne właściwości. Ze względu na presję selekcyjną rejon kodujący tą część białka jest najbardziej zmienny. W obrębie tej części możemy wyróżnić dwie subdomeny: P1 i P2. Subdomena P1 jest nieciągła i, jak przedstawiono na rysunku nr 17, rozciąga się od reszty aminokwasowej- 226 - 278 oraz 406 - 520 tworząc charakterystyczne boczne sklepienia kapsomerów, podczas gdy górne sklepienie uformowane jest przez subdomenę P2.



Rysunek 17. Lokalizacja rejonów zmiennych w obrębie sekwencji aminokwasowej białka VP60 wirusa RHD oraz lokalizacja głównych determinant antygenowych. Schemat liniowy białka VP60 obrazujący główne domeny S oraz P wraz z podziałem na subdomeny P1 i P2. Rejony antygenowe prezentuje górny panel. Rejony zmienności nukleotydowej sekwencji prezentuje dolny panel; rejony antygenowe zaznaczono od A do F.

W obrębie P2 możemy wyróżnić 7 charakterystycznych pętli łączących ze sobą struktury beta kartek, które dominują w obrębie tej części białka. Najbardziej hydrofilowy region w obrębie całej domeny P stanowi pętla pierwsza L1, która jest najbardziej eksponowaną częścią całego kapsydu wirusa RHD (Rys. 18.). Przeciwciała neutralizujące skierowane przeciwko cząsteczce wirusowej łączą się bezpośrednio z tym rejonem, który prawdopodobnie odpowiada również za wiązanie receptora na powierzchni komórki gospodarza. Rejon zawiasowy jest pętlą łączącą ze sobą opisywane domeny i jak opisano, może być przyczyną powstawania charakterystycznych defektywnych form wirusa RHD (144) .



Rysunek 18. **Schemat przestrzenny cząsteczki RHDV oraz białka VP60.** a) monomer białka VP60, b) dimer białka VP60, c) schemat przestrzenny cząsteczki wirusowej, d) konformacje dimerów białka VP60. Zdjęcia zaadoptowane z Hutson, Anne M., Robert L. Atmar, and Mary K. Estes. "Norovirus disease: changing epidemiology and host susceptibility factors." *Trends in microbiology* 12.6 (2004): 279-287. Kolor niebieski – zewnętrzna część białka VP60; Kolor czerwony – wewnętrzna część białka VP60 obejmująca rejon subdomeny P1; Kolor żółty – wewnętrzna część białka VP60 obejmująca subdomenę S; Kolor zielony – fragment białka VP60 odpowiedzialny za wiązanie RNA.

Białko VP60 występuje w postaci dimeru, który ze względu na swoją charakterystyczną budowę przestrzenną został nazwany kapsomerem. Białko to może występować w trzech konformacyjnych formach: A, B i C. Poszczególne konformacje tego białka tworzą dimery, które parują się w następujący sposób: A/B oraz C/C. 180 kopii białka VP60 tworzy 90 dimerów funkcjonujących jako kapsomery typu A/B oraz C/C. Kapsyd formowany jest z 30 kapsomerów typu C/C oraz 60 kapsomerów typu A/B, które razem tworzą 32 charakterystyczne zagłębienia w kształcie kielicha (Rys. 18.) (150) (142). Białko VP60 powstaje w wyniku translacji subgenomowego RNA, oraz w wyniku procesu proteolitycznego cięcia poliproteiny podczas cyklu replikacyjnego wirusa. Większe białko, stanowiące główny komponent kapsydu dojrzałych cząstek wirusowych, powstaje poprzez translację subgenomowego RNA. Po wielu latach potwierdzono, że białko to podlega dodatkowym modyfikacjom potranslacyjnym takim jak glikozylacja (146). Analiza białka VP60 wykazała obecność dwóch głównych regionów zawierających determinanty antygenowe. Pierwsza nieciągła domena antygenowa nazwana domeną L, stanowi prawdopodobnie epitop konformacyjny. Druga domena antygenowa H zlokalizowana jest w C-terminalnej części białka i wykazuje o wiele słabszą reaktywność z przeciwciałami monoklonalnymi (Rys. 17.) (151). Pomimo wieloletnich badań, wiele hipotez dotyczących wirusa RHDV nie zostało jeszcze potwierdzonych.

4. Cel pracy

Celem niniejszej pracy doktorskiej była konstrukcja potencjalnych szczepionek rekombinowanych opartych na cząsteczkach wirusopodobnych jako nowych i bezpiecznych preparatów ochronnych. Dodatkowym celem pracy było wykorzystanie cząstek wirusopodobnych jako antygenów referencyjnych do opracowania czułych testów diagnostycznych mających na celu wykrywanie i monitorowanie epidemii wywołanych przez wirusy RNA takie jak wirus grypy typu A oraz wirus gorączki krwotocznej królików.

Modele badawcze użyte w niniejszej rozprawie doktorskiej wybrane zostały ze względu na powtarzające się epidemie wirusa ptasiej grypy oraz choroby pomoru królików na terenie Polski.

Etapy pracy dla każdego modelu badawczego obejmowały:

- projektowanie i konstrukcję rekombinowanych bakulowirusów niosących geny warunkujące powstawanie cząstek wirusopodobnych w komórkach owadzych;
- produkcję, oczyszczanie i charakterystykę cząstek wirusopodobnych;
- przygotowanie potencjalnych preparatów ochronnych zawierających cząstki wirusopodobne i przeprowadzenie immunizacji zwierząt;
- analiza odpowiedzi immunologicznej na podany preparat szczepionkowy;
- projektowanie i konstrukcja testów diagnostycznych w oparciu o cząstki wirusopodobne oraz uzyskanie surowic poliklonalnych stanowiących cenne narzędzia diagnostyczne.

5. Materiały

5.1. Rekombinanty bakulowirusowe

Bac-VP60/SGM

Rekombinowany bakulowirus poliedrozy jądrowej *Autographa californica* zawierający gen kodujący strukturalne białko VP60 wirusa gorączki krwotocznej królików (rekombinant pochodzi z kolekcji Katedry Wirusologii Molekularnej MWB UG i GUMed i jest konstruktem własnym wykonanym podczas pracy magisterskiej)

Bac-WT

Bakulowirus poliedrozy jądrowej *Autographa californica* (AcNPV) typu dzikiego (kolekcja Katedry Wirusologii Molekularnej MWB UG-GUMed)

5.2. Szczepy wirusów RNA

5.2.1 Wirus grypy typu A

Referencyjne szczepy wirusa ptasiej grypy typu A

- Szczep A/ostrich/Denmark/725/96 (H5N2) (Państwowy Instytut Weterynarii w Puławach (PIWet))
- Szczep A/turkey/Poland/95/1995 (H7N2) (Państwowy Instytut Weterynarii w Puławach (PIWet))

Referencyjne inaktywowane szczepy wirusa ptasiej grypy typu A

- Inaktywowany szczep wirusa H5N1 A/Ck/Scot/59 (Animal Health and Veterinary Laboratories (VLA, Weybridge, Wielka Brytania))
- Inaktywowany szczep wirusa H5N2 A/Ost/Den/72420/96 (Animal Health and Veterinary Laboratories (VLA, Weybridge, Wielka Brytania))

Referencyjny szczep wirusa ludzkiej grypy typu A

- Pandemiczny szczep wirusa ludzkiej grypy typu A A/Virginia/ATCC3/2009/H1N1 (ATCC nr VR-1738) (American Type Culture Collection, USA)

Materiał genetyczny szczepu H5N1 wirusa ptasiej grypy typu A

- RNA wyizolowane z wysokopatogennego szczepu H5N1 A/swan/Poland 305-135V08-2006 (PIWet); HPAIV EpiFlu Database Acc.No. EPI156789

5.2.2 Wirus gorączki krwotocznej królików

Referencyjny szczep wirusa gorączki krwotocznej królików

- Szczep KGM (Państwowy Instytut Weterynarii w Puławach (PIWet))

5.3. Szczepy bakteryjne

***Escherichia coli* TOP10** – mcrA, Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC), ϕ 80 Δ lacZDM15, Δ lacX74, deoR, recA1, ara Δ 139, Δ (ara, leu)7697, galU, galK, Γ , rpsL, endA1, nupG (Invitrogen, Life Technologies, USA)

***Escherichia coli* MACH1** - Δ recA1398 endA1 tonA Φ 80 Δ lacM15 Δ lacX74 hsdR($r_k^- m_k^+$) (Invitrogen Life Technologies, USA)

***Escherichia coli* DH10Bac**

F-, mcrA, Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC), F80 Δ lacZDM15, Δ lacX74, endA1, deoR, recA1, Δ (ara, leu)7697, ara Δ 139, galU, galK, rpsL, , nupG, KanR, TetR, LacZ α + (Invitrogen, Life Technologies, USA)

5.4. Linie komórkowe

Sf9 – linia ciągła komórek owadzych pochodząca z tkanki jajnika motyla nocnego *Spodoptera frugiperda* (kolekcja Katedry Wirusologii Molekularnej MWB UG-GUMed)

MDCK – linia ciągła komórek psiej nerki Madin-Darby'ego (ang. Madin-Darby canine kidney) (kolekcja Katedry Wirusologii Molekularnej MWB UG-GUMed)

HEK293T – ludzka linia ciągła pochodząca z komórek embrionalnej nerki transdukowana retrowirusem, produkująca duży antygen T wirusa SV40 (kolekcja Katedry Wirusologii Molekularnej MWB UG-GUMed)

5.5. Wektory

pFastBac1 – wektor transferowy bakulowirusowego systemu ekspresji genów „Bac-to-Bac™”, Amp^R, Gent^R (Invitrogen, Life Technologies, USA)

pGEM-T easy – wektor służący do klonowania produktów PCR otrzymanych po zastosowaniu polimeraz dodających reszty poliA na 3'końcu amplifikowanej sekwencji, Amp^R (Promega, USA)

pcDNA3.1 – wektor ekspresyjny umożliwiający produkcję białek w komórkach ssaczych, Amp^R (Invitrogen, Life Technologies, USA)

5.6. Pożywki

5.6.1. Pożywki do hodowli bakteryjnych

Pożywka płynna LB (Lurii-Bertaniego)

Bacto-trypton	10 g
Ekstrakt drożdżowy	5 g
NaCl	10 g

Składniki rozpuszczono w 1 l wody destylowanej i jałowiono w autoklawie (30 min, 0,7 atm, 121°C)

Pożywka stała LA

Bacto-trypton	10 g
Ekstrakt drożdżowy	5 g
NaCl	10 g
Bacto-agar	15 g

Składniki rozpuszczono w 1 l wody destylowanej i jałowiono w autoklawie (30 min, 0,7 atm, 121°C)

5.6.2. Pożywki do hodowli komórek ssaczyc

Pożywka DMEM (ang. Dulbecco's modified Eagle's medium) (Gibco, USA) uzupełniona 2 mM L-glutaminą, 0,2% BSA, 10% FBS oraz 25 mM HEPES'u z dodatkiem antybiotyków: 100 U/ml penicyliny i 1 µg/ml streptomycyny.

5.6.3. Pożywki do hodowli komórek owadzie

Podłoże wzrostowe HYQ SFX (Thermo Scientific, USA)

Podłoże wzrostowe Grace's Insect Medium (Sigma, USA)

Podłoże wzrostowe TC-100 (Invitrogen, USA)

5.7. Odczynniki do pracy z DNA i RNA

Bufor TAE - bufor elektrodowy do elektroforezy agarozowej

40 mM Tris-octan sodu, 1 mM EDTA, pH 8,5

Bufor TE o pH 8,0

10 mM TRIS pH 7,4, 1 mM EDTA

Roztwór bromku etydyny:

10 mg/ml w H₂O

Bufor obciążający do DNA 6x stężony:

40% sacharoza, 0,25% błękit bromofenolowy, 200 mM EDTA pH 8,0

„Enhancer” 5x do reakcji PCR

3 M betaina, 5% DMSO

Bufory do oczyszczania DNA

Sol I:

50 mM glukoza, 10 mM EDTA pH 8,0, 25 mM Tris-HCl pH 8,0

Sol II:

1% SDS, 0,2 N NaOH

Sol III:

3 M octanu potasu, 11,5% kwas octowy

Bufory do oczyszczania DNA bakmidowego**Sol I:**

15 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA pH 8,0, 100 µg/ml RNaza A

Sol II:

1% SDS, 0,2 N NaOH

Sol III:

3 M octan potasu pH 5,5

RNaza A:

100 mg/ml w buforze: 15 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,5

Proteinaza K

20 mg/ml w buforze TE

Mieszanina chloroform : alkohol izoamyłowy

24 objętości chloroformu z 1 objętością alkoholu izoamyłowego.

5.8. Odczynniki do pracy z bakteriami**IPTG:**

40 mg/ml w H₂O

X-Gal:

50 mg/ml w N,N – dimetyloformamidzie (DMF)

5.9. Roztwory antybiotyków

Ampicylina – roztwór 200 mg/ml w wodzie

Gentamycyna – roztwór 10 mg/ml w wodzie

Kanamycyna – roztwór 50 mg/ml w wodzie

Tetracyklina – roztwór 10 mg/ml w alkoholu etylowym

Roztwór Penicyliny/Streptomycyny – roztwór wodny zawierający 5000 U/ml penicyliny oraz 5000 ug/ml streptomycyny

5.10. Bufory i roztwory do pracy z białkami i cząstki wirusopodobnymi**PBS:**

1,37 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,47 mM KH₂PO₄, 4,3 mM Na₂HPO₄, pH 7,4

PBST:

PBS + 0,05% Tween 20

TBS:

50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4

TBST:

TBS + 0,05% (Tween 20)

TBST/T:

TBS + 0,05% (Tween 20) + 0,2% Triton X-100

30% roztwór akrylamidów:

29,2% akrylamid, 0,8% N, N-metyleno-bisakryloamid

10% żel poliakrylamidowy rozdzielający (dolny) do elektroforezy SDS-PAGE (składniki na 20 ml):

7,9 ml H₂O, 6,7 ml 30% mieszaniny akrylamidów, 5 ml 1,5M Tris-HCl pH 8,8, 200 µl 10% SDS, 200 µl 10% APS, 8 µl TEMED

5% żel poliakrylamidowy zagęszczający (górny) do elektroforezy SDS-PAGE**(składniki na 10 ml):**

6,8 ml H₂O, 1,7 ml 30% mieszaniny akrylamidów, 1,25 ml 1 M Tris-HCl pH 6,8, 100 µl 10% SDS, 100 µl 10% APS, 10 µl TEMED

Bufor elektrodowy do SDS-PAGE 10 x stężony:

25 mM Tris, 192 mM glicyna, 1% SDS, pH 8,3

Roztwór lizujący do komórek owadzi 1:

20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 20 mM jodoacetamid, pH 7,4

Roztwór lizujący do frakcjonowania komórek owadzi 2 :

0,03 M Tris-HCl pH 7,5, 0,01 M Mg(OAc)₂, 1% Nonidet NP40

Roztwór 100% (w/v) kwasu trójchlorooctowego.

500 g kwasu trójchlorooctowego rozpuszczono w 227 ml wody.

Bufor lizująco-obciążający do SDS-PAGE 4 x stężony:

25 mM Tris-HCl pH 6,8, 6% SDS, 40% glicerol, 0,04% błękit bromofenolowy, 20% β-merkaptioetanol (tylko do buforu redukującego)

Roztwór barwiący Coomassie (składniki na 150 ml)

25 ml 80% kwasu octowego, 125 ml metanolu, 2,5 g błękitu Coomassie Brilliant Blue R-250

Roztwór odbarwiający Coomassie (składniki na 500 ml)

50 ml 80% kwasu octowego, 100 ml metanolu, 350 ml wody

Bufor to transferu mokrego białek z żelu poliakrylamidowego na membranę:

25 mM Tris, 192 mM glicyna

Bufor to transferu półsuchego białek z żelu poliakrylamidowego na membranę:

25 mM Tris, 250 mM glicyna, 15% metanol

Bufor blokujący do immunoblottingu

TBS 1x, 3% BSA

Bufor płuczący do immunoblottingu

TBS 1x, 0,05% Tween 20, 0,2% Triton X-100

Roztwór czerni amidowej

0,5% czerń amidowa, 20% CH₃COOH

Roztwór do odwracalnego wybarwienia błon typu PVDF

0,2% roztwór Ponceu S w 1% TCA

Bufor elucyjny I do oczyszczania białek z błony PVDF

50 mM Tris-HCl pH 9,5, 2% SDS, 1% Triton X-100, 0,1% DTT

Bufor elucyjny II do oczyszczania białek z błony PVDF

25 mM Tris pH 8,5, 1% Triton X-100, 2% SDS

Inhibitor proteaz serynowych PMSF (ang. phenylmethanesulfonyl fluoride)

10 mM roztwór w izopropanolu

Roztwór do reakcji z alkaliczną fosfatazą:

100 mM Tris-HCl pH 9,5, 50 mM MgCl₂, 100 mM NaCl

Roztwór NBT (błękitu nitrotetrazoliowego) – substratu dla alkalicznej fosfatazy:

50 mg/ml w 70% N,N – dimetyloformamidzie (DMF)

Roztwór BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolilofosforan) – substratu dla alkalicznej fosfatazy:

50 mg/ml w 100% N,N – dimetyloformamidzie (DMF)

Roztwór AEC (3-amino-9-etylokarbozol):

4 mg/ml w 100% N,N – dimetyloformamidzie (DMF)

Roztwór wywołujący do reakcji z peroksydazą chrzanową w teście IPMA:

250 μl roztworu AEC o stężeniu 4 mg/ml, 5 ml 0,5 M roztworu octanu sodu pH 5,0 , 5 μl 30% H₂O₂

Roztwór wywołujący do reakcji z peroksydazą chrzanową w teście Western Blotting:

30 mg 4-chloro 1-naftolu, 10 ml zimnego 96% etanolu, 50 µl TBS, 10 µl 30% H₂O₂

Roztwór podstawowy czerwieni obojętnej (Neutral Red Stock; NR Stock):

0,04 % roztwór czerwieni obojętnej

Bufor TM

10 mM Tris-HCl pH 7,4, 10 mM MgCl₂

Roztwory sacharozy do ultrawierowania

20%, 30%, 40%, 50%, 60% w wodzie lub w buforze TM

Scharoza do zagęszczania bakulowirusowych lizatów

25% sacharoza w (w/w) 5 mM NaCl, 10 mM EDTA

Bufor węglanowy do opłaszczania płytek antygenem

0,1 M Na₂CO₃, pH 9,6, pH buforu ustalono za pomocą 0,1 M NaHCO₃

Bufor PBT

1% (w/v) BSA z 0,01% Tween 20 w PBS

Bufor płuczący do testu ELISA

PBS z 0,05% (v/v) Tween 20 oraz 0,1 % BSA

Bufor cytrynianowy

25 mM cytrynian sodu, 25 mM kwas octowy

Roztwór OPD (orto-fenylodiamina) – substratu dla peroksydazy chrzanowej (ELISA):

0,4 mg OPD / 1 ml buforu cytrynianowego

Roztwór TMB (3,3',5,5'–tetrametylobenzzydina) – substratu dla peroksydazy chrzanowej (ELISA):

10 mg/ml w N,N – dimetyloformamidzie

Roztwór substratu do testu ELISA:

5 ml 0,1 M NaAc – octan sodu, 50 µl TMB, 2,5 µl H₂O₂

Płyn Alsevera

2% glukozy, 0,8% dwuwodnego cytrynianu trójsodowego, 0,42% chlorku sodu, 0,05% jednowodnego kwasu cytrynowego

5.11. Przeciwciała

- ❖ Koniugaty przeciwciał anty-mysich, anty-króliczych, anty-kurzych sprzężonych z alkaliczną fosfatazą lub peroksydazą chrzanową (Santa Cruz Biotechnology, USA)
- ❖ Poliklonalna surowica królicza anty-NA –AIV (Abcam, USA)

- ❖ Mysie monoklonalne przeciwciała anty-M1 IV (Abcam, USA)
- ❖ Poliklonalna surowica królicza anty-VP60 - RHDV (otrzymana od A. Fitznera z Państwowego Instytutu Weterynaryjnego w Zduńskiej Woli)
- ❖ Mysie monoklonalne przeciwciała 1H8-anty VP60 – RHDV (otrzymana od A. Fitznera z Państwowego Instytutu Weterynaryjnego w Zduńskiej Woli)
- ❖ Mysie monoklonalne przeciwciała anty 6xHis-tag (Qiagen, USA)
- ❖ Mysie monoklonalne przeciwciała anty-HA(H1H1), (Sino Biological Inc., 11048-MM08, Chiny)
- ❖ Mysie monoklonalne przeciwciała anty-HA(H1H1), (Santa Cruz Biotechnology, sc-52025, Chiny)
- ❖ Poliklonalna surowica królicza anty-HA(H1N1), kolekcja Zakładu Szczepionek Rekombinowanych
- ❖ Kurze poliklonalne przeciwciała anty-H5N1, RAA7002 (Animal Health and Veterinary Laboratories Agency, Wielka Brytania)
- ❖ Mysie monoklonalne przeciwciała anty-HA(H5N1), (Sino Biological Inc., 11048-MM01, Chiny)
- ❖ Mysie monoklonalne przeciwciała anty-HA(H5N1), (Sino Biological Inc., 11048-MM06, Chiny)
- ❖ Mysie monoklonalne przeciwciała anty-HA(H5N1), (Sino Biological Inc., 11048-MM10, Chiny)
- ❖ Kurze poliklonalne przeciwciała anty-H5N2(A/Ost/Den/72420/96, RAA7003 (Animal Health and Veterinary Laboratories Agency, Wielka Brytania)
- ❖ Kurze poliklonalne przeciwciała anty-H5N2, Państwowy Instytut Weterynarii w Puławach
- ❖ Kurze przeciwciała poliklonalne anty-H5NX, Państwowy Instytut Weterynarii w Puławach
- ❖ Mysie monoklonalne przeciwciała anty-HA(H3N2), (Sino Biological Inc., 11056-MM03, Chiny)
- ❖ Królicze poliklonalne przeciwciała anty-HA(H4N6), (Sino Biological Inc., 11714-RP01, Chiny)
- ❖ Królicze poliklonalne przeciwciała anty-HA(H7N9), (Sino Biological Inc., 40104-RP02, Chiny)
- ❖ Kurze poliklonalne przeciwciała anty-HA(H7NX), Państwowy Instytut Weterynarii w Puławach
- ❖ Syntetyczne wysokospecyficzne humanizowane przeciwciało F16, Okairos

Odczynniki chemiczne:

Enzymy restrykcyjne (BamHI, SpeI, EcoRI, XhoI, HindIII, NotI), bufony do enzymów restrykcyjnych, wzorzec do elektroforezy agarozowej GeneRuler DNA Ladder Mix, wzorzec do elektroforezy poliakrylamidowej 100 pz DNA Ladder, zestaw do klonowania produktów po reakcji PCR pJetClon, polimeraza Taq, dNTP, enzym alkaliczna fosfataza, masowe wzorce białkowe do elektroforezy poliakrylamidowej, NBT, BCIP, (Fermentas, Life Technologies, USA)

Agaroza, akrylamid, bromek etydyny, błękit bromofenolowy, Tris, glicyna, surowicza albumina wołowa (BSA), TEMED, Triton X-100, Tween 20, dimetyloformamid, AEC, APS, β -merkaptioetanol, SDS, TMB, EDTA, KCl, NaCl, $MgCl_2$, octan sodu, czerwień obojętna, czerni amidowa, złożo niklowe, białko A, PMSF, kompletny adjuwant Freund'a (CF), niekompletny adjuwant Freund'a (ICF), trypsyna, roztwór antybiotyków Antibiotic-Antimycotic, TPC-modyfikowana trypsyna, ampicylina,

kanamycyna, tetracyklina, gentamycyna, lizozym, RNaza, Bluo-gal, IPTG, Proteinaza K, MgCl₂ (Sigma, USA)

Lipofektyna, bydlęca surowica płodowa (ang. fetal bovine serum – FBS), zestaw do reakcji odwrotnej transkrypcji ThermoScript™ RT-PCR (Invitrogen, Life Technologies, USA)

Peptydy: Peptyd LAH reprezentujący długą alfa helisę w rejonie HA stalk: biotynylowany-RIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTLDSEMNKLFKTRRQLRENA (JPT PeptideTechnologies, Niemcy)

Ligaza faga T4, bufor do ligacji, zestawy do izolacji DNA plazmidowego: „Plazmid Miniprep Plus” i „Plazmid Midi AX”, zestaw do izolacji DNA z żelu agarozowego „DNA gel-out”, zestaw do izolacji RNA z komórek „Total RNA Mini”, zestaw do oczyszczania DNA po reakcjach enzymatycznych „Clean-up”, polimeraza Maraton, polimeraza Taq, Ekstrakt drożdżowy, Bacto-trypton, Bacto-agar (A&A Biotechnology s.c., Polska)

Zestaw do reakcji odwrotnej transkrypcji - Improm-II Reverse Transcription System (Promega, USA)

Odczynniki do ECL - SuperSignal West Pico lub SuperSignal West Dura (Thermo Scientific, USA)

Substrat dla enzymu alkalicznej fosfatazy w teście typu IPMA - Vector NovaRed Substrate Kit (Vector Laboratories, USA)

Dimetylosulfotlenek (DMSO), jodoacetamid (Fluka, Szwajcaria)

Roztwory wywoływacza i utrwalacza RTG, Klisze RTG (Kodak, USA)

Błona PVDF (Carl Roth, Niemcy)

Bibuła Whatman 3 MM (Whatman, Wielka Brytania)

Probówki do ultrawiwowania (Beckman, USA)

Agaroz (Prona, USA)

Pozostałe odczynniki pochodziły z firmy Polskie Odczynniki Chemiczne (POCh, Polska)

5.12. Aparatura

- Aparat do elektroforezy agarozowej – Sigma, USA
- Aparat do elektroforezy poliakrylamidowej – Sigma, USA
- Aparat do elektrotransferu – Kucharczyk TE, Polska
- Chłodziarka 4°C – Bosch, USA
- Cieplarka 37°C – Heraeus, Niemcy
- Czytnik płytek Nanoquant, Infinite M200 – Tecan, Szwajcaria
- Hemocytometr (komora Thoma do zliczania komórek) – Marienfeld, Niemcy
- Inkubator 37°C – Heraeus, Niemc
- Inkubator 27°C – Heraeus, Niemc
- Kołyska laboratoryjna – Unitwist, Południowa Afryka
- Komora laminarna Hera Safe – Heraeus, Niemcy

- Komora laminarna Mini-V/PCR – Telstar, USA
- Łaźnia wodna – Bioblock Scientific, USA
- Mieszadło magnetyczne KMO2 basic – IKA Werke, Niemcy
- Mieszadło typu Vortex MS2 Minishaker – IKA Werke, Niemcy
- Mikroskop świetlny – TMS-F – Nikon, Japonia
- Mikroskop fluorescencyjny TE300 z trójkanałowym systemem konfokalnym PCM2000 - Nikon, Japonia
- Mikroskop elektronowy – Philips CM100, Holandia
- pH-metr PHM210 – MeterLab, USA
- Pojemnik Dewara z ciekłym azotem Bio Cane™ 34 – Thermolyne, USA
- Rotor do ultrawirówki SW41Ti – Beckman, USA
- Rotor do ultrawirówki SW28 – Beckman, USA
- Spektrofotometr Novaspec II – Pharmacia Biotech, Szwecja
- Spektrofotometr UV typu Gene Quant – Pharmacia Biotech, Wielka Brytania
- System do fotointerpretacji żeli GelDoc 2000 – BioRad, USA
- Termoblok DRI-BLOCK DB-2A – Techne, Wielka Brytania
- Termocykler LightCycler 2.0™ – Roche Diagnostic, Szwajcaria
- Termocykler Personal – Biometra, Niemcy
- Transiluminator UV – UVP Upland CA, USA
- Ultrawirówka L7-55 Ultracentrifuge – Beckman, USA
- Waga analityczna BP2215 – Sartorius, Francja
- Waga WTB200 – Radwag, Wielka Brytania
- Wirówka Biofuge Fresco – Heraeus, Niemcy
- Wirówka Biofuge Pico – Heraeus, Niemcy
- Wirówka Biofuge Primo R – Heraeus, Niemcy
- Wytrząsarka orbitalna Multi RS-60 – Biosan, Łotwa
- Wytrząsarka powietrzna 37°C – New Brunswick Scientific, USA
- Wytrząsarka wodna 37°C – New Brunswick Scientific, USA
- Zamrażarka -20°C – Gorenje, Słowenia
- Zamrażarka do głębokiego mrożenia -70°C – REVCO, USA
- Zasilacz Power Pac 300 – BioRad, USA

6. Metody

6.1. Metody namnażania wirusa grypy

6.1.1. Namnażanie wirusa grypy na zarodkach kurzych

Próbkę środowiskową (wymaz z kloaki) zawierającą wirusa rozcieńczono 10-cio krotnie w jałowym buforze PBS z dodatkiem 10000 U/ml penicyliny. Zawiesinę dokładnie wymieszano i inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Następnie wirowano 5 minut przy 2000 rpm w 4°C. Supernatant zebrano i przefiltrowano przez filtr 0,40 µm. 9-12 dniowe jaja w standardzie SPF (ang. specific pathogen-free) oświetlano i zaznaczono miejsce wkucia (ok. 5 mm od początku komory powietrznej). Odkażono zaznaczone miejsce jodyną i delikatnie wykonano wkłucie. Wprowadzono do jamy omoczniowej 200 µl przygotowanej próby środowiskowej lub próby referencyjnej A/H5N2, a następnie uszczelniono parafiną otwór po wkłuciu. Jaja inkubowano 6 dni w 37°C. Po 6 dniach zbierano płyn omocznioowo-owodniowy i przechowywano do dalszych analiz w temperaturze 4°C lub porcjowano i przechowywano w -70°C. Opisana metoda namnażania wirusa grypy typu A wykonana została przeze mnie w referencyjnym laboratorium w Państwowym Instytucie Weterynarii w Puławach w Zakładzie Chorób Drobiu, w którym odbyłam szkolenie z metody namnażania wirusa grypy na zarodkach kurzych.

6.1.2. Namnażanie wirusa grypy w komórkach MDCK

Komórki MDCK hodowane były w pożywce DMEM z L-glutaminą, HEPESem, BSA, 10% FBS z dodatkiem antybiotyków: 100 U/ml penicyliny i 1 µg/ml streptomycyny. Hodowlę komórek w butelce T75 przepłukano dwukrotnie 10 ml pożywki DMEM bez FBS. W kolejnym etapie komórki przepłukano 10 ml pożywki DMEM z dodatkiem TPCK-modyfikowanej trypsyny w rozcieńczeniu 1:500. Pożywkę zebrano znad komórek i dodano 20 µl wirusa grypy o mianie 128 na podstawie testu HA, inkubację prowadzono 30 minut w 37°C. Dodano następnie 15 ml pożywki DMEM z TPCK-modyfikowaną trypsyną i prowadzono hodowlę do momentu wystąpienia efektu cytopatycznego (2-3 dni). Pożywkę znad komórek zawierającą wirusa przechowywano w -70 °C lub wykorzystano do optymalizacji procesu oczyszczania wirusa grypy.

6.2. Metody pracy z RNA

6.2.1. Izolacja RNA wirusowego

Do izolacji RNA z prób środowiskowych lub z płynu omocznioowo-owodniowego wykorzystano zestaw Total RNA Kit firmy A&A Biotechnology s.c.. Izolacja RNA oparta jest na zmodyfikowanej metodzie Chomczyńskiego (152) opisanej przez Gromadzka i wsp. (153). W pierwszym etapie komórki poddawane były lizie, a endogenne RNA-zy były inaktywowane przez działanie mieszanki soli chaotropowych i fenolu. W następnym etapie dodawany był chloroform w celu ekstrakcji RNA, a całość poddano wirowaniu. Fazę górną zawierającą RNA zbierano i po dodaniu izopropanolu nanoszono na mini kolumnę ze złożem krzemionkowym. W tych warunkach RNA zostało zatrzymane na złożu. W ostatnim etapie oczyszczone RNA wymyło z mini kolumny wodą wolną od RNAz. Oczyszczone RNA poddawano reakcji odwrotnej transkrypcji.

6.2.2. Reakcja odwrotnej transkrypcji pełnej długości genów wirusa grypy typu A szczepu H5N1 A/swan/Poland 305/ 2006 HPAIV (ang. Reverse Transcription)

Informację genetyczną zapisaną na RNA przepisywano na cDNA przy pomocy reakcji odwrotnej transkrypcji RT-PCR z zastosowaniem komercyjnie dostępnego zestawu Improm-II Reverse Transcription System (Promega, USA). Proces przepisania informacji zawartej w RNA na cDNA oparty jest na zmodyfikowanej metodzie opisanej przez E. Hoffmann i wsp. z 2001 r z wykorzystaniem odwrotnej transkryptazy AMV (RT-AMV) zgodnie z opisem Gromadzka i wsp. 2008. Mieszanki reakcyjne przygotowano według poniższej tabeli:

Tab. 1. Skład mieszaniny reakcyjnej zastosowanej w procedurze RT-PCR podczas wstępnej denaturacji.

Składnik	Objętość [μl]
Startery uniwersalne (10 μM)	2,0
dNTP (10 mM)	2,0
RNA (50 ng)	8,0
RAZEM	12,0

Po dokładnym wymieszaniu wszystkich składników, próbki umieszczono w termocyklerze i przeprowadzono wstępną denaturację przez 5 minut w 65°C. Następnie próbkę umieszczono w lodzie i dodawano składniki według tabeli 2:

Tab. 2. Skład mieszaniny reakcyjnej zastosowanej w procedurze RT-PCR.

Składnik	Objętość [μl]
Bufor 5x	4,0
H ₂ O	1,0
DTT (100 mM)	1,0
Inhibitor RNazy (20 u/μl)	1,0
Odwrotna transkryptaza (40 u/μl)	1,0
RAZEM	8,0

Przygotowane mieszaniny umieszczano w termocyklerze i przeprowadzano reakcję RT-PCR w 42°C przez 45 minut. Otrzymane cDNA wykorzystywano następnie do procesu amplifikacji pełnej długości genów.

6.3. Metody pracy z DNA

6.3.1. Reakcja PCR pełnej długości genów HA, NA, M1 wirusa grypy typu A szczepu H5N1 A/swan/Poland 305-135V08-2006 HPAIV (ang. highly pathogenic avian influenza virus)

W celu amplifikacji pełnej długości genów *ha*, *na*, *m1* zaprojektowano serie starterów w oparciu o analizy sekwencji nukleotydowych dostępnych w bazie danych National Center for Biotechnology Information – GenBank (Tab. 3). Amplifikację pełnej długości genów *ha*, *na*, *m1* wykonano przy użyciu polimerazy Maraton z firmy A&A Biotechnology s.c., która jest mieszaniną polimeraz Pwo i Taq oraz termostabilnej dUTP-azy. Taka kompozycja enzymów pozwoliła na syntezę bardzo długich fragmentów DNA (od 2 do 40 tys. pz). Łańcuchową reakcję polimerazy wykonywano w końcowej objętości 50 µl zgodnie z zaleceniami producenta. Uzyskane pełnej długości geny kodujące strukturalne białka wirusa grypy zostały zsekwencjonowane we współpracy z Panią prof. A. Sirko z Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN. Uzyskane sekwencje zostały umieszczone w bazie danych EpiFlu Database Accession No. EPI156789 oraz w patencie P220281 i US9505806 B2.

6.3.2 Projektowanie oraz konstrukcja plazmidów do produkcji cząstek wirusopodobnych wirusa grypy typu A

Konstrukty monocistronowe

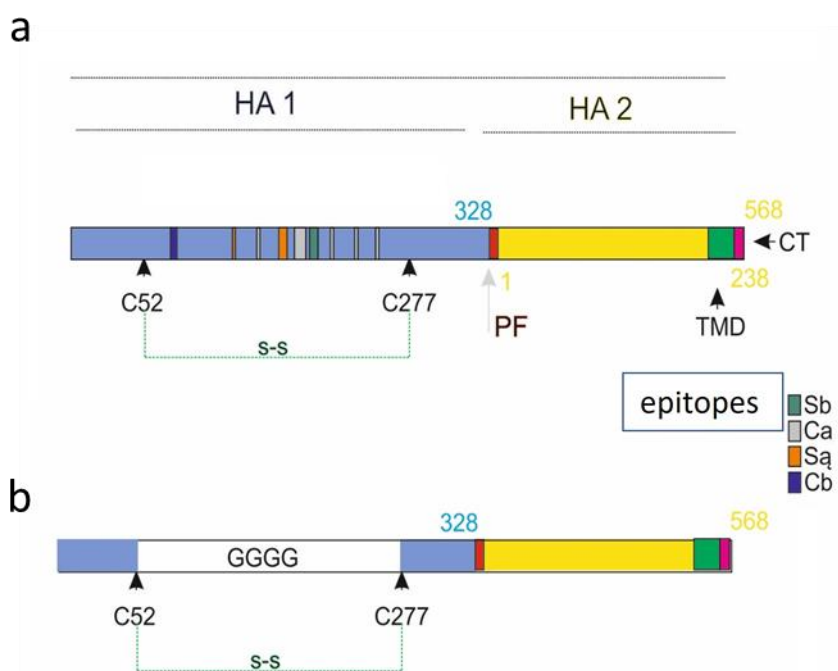
Produkty PCR opisane w punkcie 6.3.1 o wielkości 1700 pz (HA), 1400 pz (NA) i 1000 pz (M1) poddano ligacji do plazmidu pGem-T easy, a następnie zsekwencjonowano i subklonowano do wektora transferowego pFastBac1 poniżej promotora polihedryny AcNPV. Dla plazmidu transferowego pFastBac1 zawierającego pełnej długości gen *ha* (pHA) użyto enzymów restrykcyjnych BamHI i SpeI, dla plazmidu transferowego pFastBac1 zawierającego pełnej długości gen *na* (pNA) użyto enzymy XhoI i HindIII. Dla plazmidu transferowego pFastBac1 zawierającego pełnej długości gen *m1* (pM) użyto enzymu EcoRI (Tab. 3). Wszystkie enzymy zakupiono w firmie Thermo Scientific, USA.

Konstrukty bicistronowe

Bakmidowy wektor transferowy niosący geny *ha* i *m1* (pHA/M1) otrzymano przez subklonowanie fragmentu DNA plazmidu pM1 zawierającego M1 pod promotorem polihedryny przy użyciu enzymów restrykcyjnych SnaBI i HpaI i umieszczono w miejscu HpaI plazmidu pHA (Rys. 22.).

Konstrukt tricistronowy

Bakmidowy wektor transferowy zawierający wszystkie trzy sekwencje kodujące białka strukturalne wirusa grypy (pNA/HA/M1) został skonstruowany przez subklonowanie bicistronowej kasety zawierającej geny *ha* i *m1* z plazmidu pHA/M1 przy użyciu enzymów restrykcyjnych SnaBI i AvrII i umieszczono w miejsca HpaI i AvrII plazmidu pNA (Rys. 22).



Rysunek 19. Schemat budowy pełnej długości hemaglutyniny oraz skróconej formy nóżki hemaglutyniny a) Schemat przedstawiający pełnej długości białko HA z podziałem na domenę HA1 wraz z rejonem głowy hemaglutyniny z zaznaczonymi epitopami oraz domenę HA2. b) Schemat HA stalk, na którym przedstawiono delecję rejonu "głowy" pomiędzy cysteiną 52 a cysteiną 277 oraz linker glicynowy. S-S – mostek dwusiarczkowy stabilizujący strukturę hemaglutyniny; C52, C277 – cysteiny w pozycji 52 i 277; PF – peptyd fuzyjny; TMD – rejon transbłonowy; CT – ogonek cytoplazmatyczny; GGGG- linker glicynowy. Gromadzka i wsp. 2022 (154)

6.3.3. Projektowanie i konstrukcja uniwersalnego antygeny w formie nóżki HA

Wszystkie sekwencje kodujące uniwersalny antygen wirusa grypy typu A w postaci nóżki HA zaprojektowano jako bezgłową domenę HA1 hemaglutyniny i zsyntetyzowano (155) (GeneArt, USA) (Rys. 19.). Aby zachować odpowiednią konformację według Steela i wsp. (120) linker glicynowy oflankowany cysteinami zastąpił region głowy domeny HA1. Syntetyczną sekwencję kodującą bezgłową HA ze szczepu H5N1 wklonowano do wektora transferowego pFastBac1 w miejsca restrykcyjne EcoRI i NotI. Dodatkowo syntetyczne sekwencje kodujące nóżki HA ze szczepu H5N1, pandemicznego ludzkiego szczepu H1N1 oraz szczepu H7N9 wklonowano do wektora pcDNA3.1 w miejsca restrykcyjne BamHI i EcoRV.

6.3.4. Izolacja DNA plazmidowego z bakterii

Do izolacji plazmidowego DNA używano zestawów „Plasmid Miniprep Plus” lub „Plasmid Midi AX” firmy A&A Biotechnology s.c. opartego na zdolności wiązania się DNA do ziół krzemionkowych w wysokich stężeniach soli chaotropowych. Procedurę oczyszczania przeprowadzano zgodnie z załączonym protokołem od producenta.

Tab. 3. Startery użyte w celu amplifikacji genów kodujących strukturalne białka HA, NA i M1 wirusa ptasiej grypy polskiego szczepu H5N1

numer segmentu	nazwa białka	nazwa konstruktu	nazwa startera	sekwencja startera 5'-3'	enzym restrykcyjny użyty do klonowania	sekwencja rozpoznawana przez enzym restrykcyjny dodana do startera
segment 4	hemaglutynina	p GEM T-easy HA	For (FHSs)	CAATCTGTCAAAATGGAGAAWATAGTRC	brak	
			Rev (RHSs)	GACTCTGAACTCACAAATTTAAATGCA	brak	
segment 4	hemaglutynina	BAC-HA	For (FHS)	ATAGGATCCAAAATAGTGCTTCTTTTGC	BamH I	ATA GGA
			Rev (RHS)	AATACTAGTGACTCTGAACTCACAAATTT	Spe I	AAA TTT
segment 6	nuraminidaza	BAC-NA	For (FNS)	CTCGAGAGCAAAAGCAGGAGTTCAAA ATG	Xho I	CTC GAG
			Rev (RNS)	AAGCTTCTACTTGCAATGGTGAATGG	Hind III	CCA TTC
segment 7	białko rdzenia M1	BAC-M1	For (FMS)	GAATTC AGCAAAAGCAGGTAGATGTTG	EcoR I	GAA TTC
			Rev (RMS)	GGAGTAAAAAACTACCTTGTCTACTGAATTC	EcoR I	GAATTC

6.3.5. Elektroforeza agarozowa

Rozdzielanie fragmentów DNA prowadzono w żelach agarozowych o stężeniu: 0,7% dla fragmentów DNA do 1800 pz oraz 1% dla fragmentów DNA o wielkości poniżej 800 pz. Agarozę rozpuszczano w buforze TAE z dodatkiem bromku etydyny (0,5 µg/ml). Przed naniesieniem na żel próbki mieszano z buforem obciążającym w stosunku objętościowym 6:1. Rozdzielanie prowadzono w aparacie poziomym w buforze TAE przy stałym napięciu 5V/cm żelu. Po skończonym rozdzielaniu żele analizowano w świetle ultrafioletowym o długości fali również 306 nm i dokumentowano z użyciem aparatu Geldoc firmy BioRad.

6.3.6. Izolacja DNA z żelu agarozowego

W celu wyizolowania z żelu fragmentów DNA po rozdzielaniu elektroforetycznym, z żelu agarozowego wycinane były kawałki agarozy zawierające odpowiedni fragment DNA, a następnie oczyszczane zgodnie z protokołem dołączonym do zestawu „DNA Gel-Out” z firmy A&A Biotechnology s.c..

6.3.7. Oczyszczanie DNA po reakcjach enzymatycznych

W celu oczyszczenia DNA po reakcjach enzymatycznych zastosowano zestaw „Clean-up” z firmy A&A Biotechnology s.c.. Oczyszczanie prowadzono zgodnie z instrukcją dołączoną do zestawu.

6.3.8. Trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi

W celu przygotowania wstawek i plazmidów do klonowania bądź przeprowadzenia analizy restrykcyjnej produktu ligacji przeprowadzono trawienie enzymami restrykcyjnymi takimi jak: BamHI, SpeI, EcoRI, XhoI, HindIII, NotI, HpaI, AvrII, SnaBI. Reakcja prowadzona była w temperaturze 37°C przez 1 godzinę. Trawienia enzymami restrykcyjnymi przeprowadzono zgodnie z powszechnie przyjętymi zaleceniami według Sambrook i Russell.

Tab. 4. Mieszanina reakcyjna do przeprowadzenia trawienia enzymami restrykcyjnymi

Trawienie prób DNA prowadzono w mieszaninie o składzie:

Odczynnik	Objętość (µl)
DNA (2 µg)	x
Bufor 10x stężony	2
Enzym restrykcyjny (zwykle 1-2 U/µg DNA)	x
H ₂ O	Do objętości 20 µl

x- zmienna ilość składnika użyta do reakcji

6.3.9. Ligacja

Ligację przeprowadzano przy użyciu ligazy DNA faga T4. Reakcję przeprowadzano w całkowitej objętości 20 µl. Ilość DNA użytego do ligacji ustalano indywidualnie dla każdej reakcji, tak aby stosunek molarny ilości wstawki do wektora wynosił 3:1. Reakcje ligacji prowadzono przez noc w temperaturze 16°C. Skład mieszaniny reakcyjnej został przedstawiony w tabeli poniżej.

Tab. 5. Skład mieszaniny reakcyjnej do ligacji

Odczynnik	Objętość (µl)
Ligaza faga T4	1
Bufor dla ligazy 2x stężony	2
Wektor (plazmid)	x
Wstawka	x
H2O	Do objętości 20 µl

x- zmienna ilość składnika użyta do reakcji

6.4. Systemy do ekspresji heterologicznych białek

6.4.1. Bakulowirusowy system ekspresji genów Bac-to-Bac™

Bakulowirusowy system ekspresyjny Bac-to-Bac™ (Invitrogen, USA) oparty jest na miejscowo-specyficznej transpozycji, która zachodzi w komórkach bakterii *Escherichia coli*. Bakterie *E. coli* szczepu DH10Bac zawierają genom bakulowirusowy wbudowany w wektor wahadłowy zwany bakmidem, który posiada gen oporności na kanamycynę (KanR) i fragment DNA kodujący peptyd lacZα. Na 5' końcu genu lacZα wprowadzono fragment DNA zawierający miejsce włączania się bakteryjnego transpozonu Tn7 (mini-att Tn7). Bakterie szczepu DH10Bac posiadają również plazmid pomocniczy kodujący białka potrzebne do procesu transpozycji (m.in. transpozazę) i gen oporności na tetracyklinę (TetR). W kolejnym plazmidzie należącym do opisywanego systemu, tzn. plazmidach transferowym pFastBac występują dwa promotory bakulowirusowe (polihedryny i p10) umożliwiające ekspresję genów w komórkach owadów. Plazmidy te zawierają również gen oporności na gentamycynę (GenR), a rejon który ulega transpozycji oflankowany jest ramionami transpozonu Tn7. Wszystkie procedury (Rys. 20.) wykonano zgodnie z instrukcją producenta „Bac-to-Bac™ Baculovirus Expression System User Guide (Invitrogen, USA).

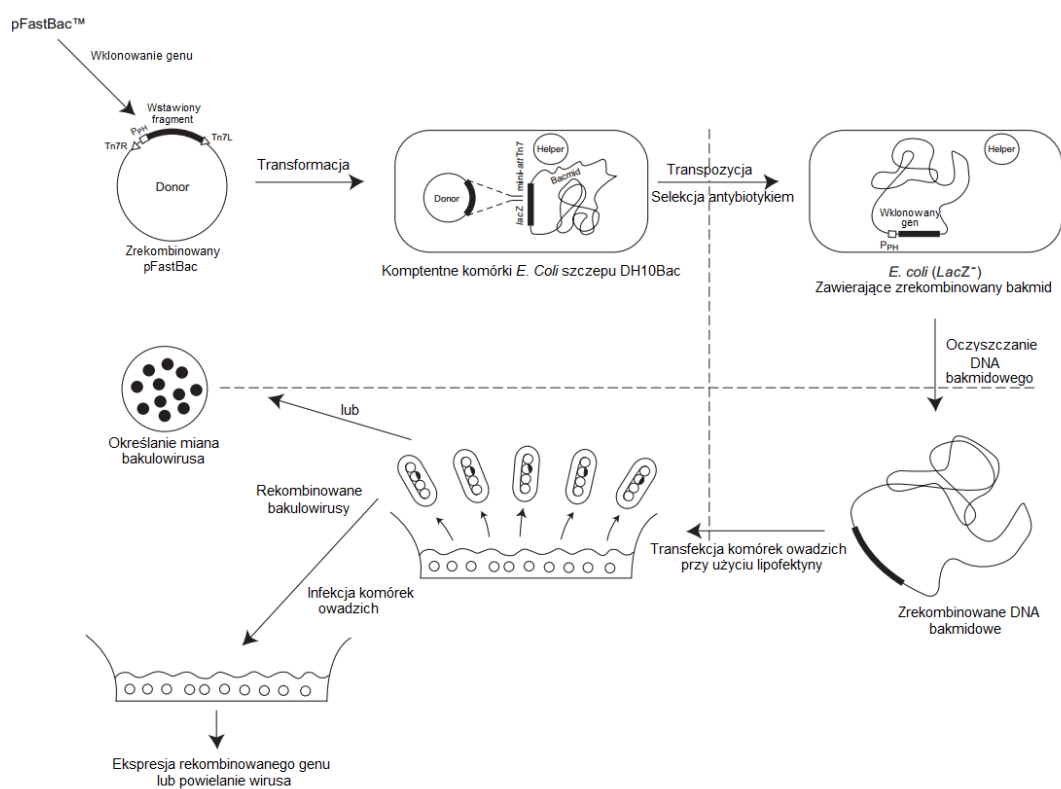
6.4.1.1. Transpozycja w oparciu o system Bac-to-Bac™

Do 200 µl rozmrożonych komórek kompetentnych DH10Bac dodano 2 - 100 ng rekombinowanego plazmidu transferowego pFastBac1. Po 30 minutach inkubacji w lodzie przeprowadzono szok temperaturowy (1,5 minuty 42°C). Następnie dodano 900 µl pożywki LB,

bakterie hodowano 4 godziny z wytrząsaniem 180 rpm w 37°C. Po transpozycji 10 µl hodowli wysiano na płytkę z podłożem LA z następującymi związkami selekcyjnymi o stężeniu końcowym:

- gentamycyna 7 µg/ml
- kanamycyna 50 µg/ml
- tetracyklina 10 µg/ml
- IPTG 40 µg/ml
- X-gal 150 µg/ml

Płytki inkubowano 48 godzin w 37°C do momentu pojawienia się wyraźnie rozróżnialnych białych i niebieskich kolonii. Pojedyncze białe kolonie posiadające zrekombinowany bakmid przeniesiono do 4 ml pożywki LB z kanamycyną i gentamycyną i hodowano przez noc z wytrząsaniem w 37°C, a następnie oczyszczano zrekombinowane wysokocząsteczkowe DNA bakmidowe.



Rysunek 20. Schemat uzyskiwania rekombinowanych bakulowirusów przy użyciu systemu Bac-to-Bac™. Bakulowirusowy system ekspresyjny oparty jest na miejscowo-specyficznej transpozycji, która zachodzi w komórkach bakterii *E. coli*. Wektor transferowy z wprowadzonym obcym genem na drodze transformacji wprowadzany jest do komórek bakteryjnych, gdzie zachodzi rekombinacja miejscowo-specyficzna do bakmidu. Rekombinowane bakmidy służą następnie do transfekcji komórek owadzych i uzyskania rekombinowanych bakulowirusów niosących obce geny pod kontrolą promotora polihedryny. Schemat na podstawie „Bac-to-Bac™ Baculovirus Expression System User Guide” (Invitrogen, USA). Tłumaczenie własne. Tn7R, Tn7L – sekwencje bakteryjnego transpozonu Tn7 (mini-att Tn7); PpH – późny promotor polihedryny; LacZ - fragment DNA kodujący peptyd lacZa stosowany w procesie alfa komplementacji.

6.4.1.2. Transfekcja komórek owadzych

Rekombinowane DNA bakmidowe oczyszczano metodą lizy alkalicznej i użyto do transfekcji komórek owadzych linii Sf9 za pomocą lipofektyny według instrukcji producenta (Invitrogen, USA). Do transfekcji komórek rosnących na płytce M-6 stosowano 5 µg DNA bakmidowego zmieszanego z 5 µl lipofektyny w 2 ml pożywki HyQ. Taką mieszaninę nakraplano na komórki owadzie. Komórki inkubowano przez 4 godziny w 27°C, a następnie mieszaninę transfekcyjną wymieniano na świeżą pożywkę HyQ. Komórki hodowano przez 72 - 96 godzin, a uzyskany lizat wirusowy wykorzystywano do namnożenia rekombinowanych bakulowirusów w hodowlach stacjonarnych.

6.4.1.3. Namnażanie bakulowirusa w hodowli komórek owadzych

Rekombinowane bakulowirusy namnażano w hodowli stacjonarnej, jednowarstwowej. W tym celu komórki Sf9 hodowano w butelkach T-25, T-75, T-175/T-225. Po usunięciu pożywki znad komórek dodawano lizat wirusowy w objętości stanowiącej m.o.i. (ang. „multiplicity of infection”) 0,1 - 0,05 oraz pożywkę w takiej ilości, aby przykryła komórki rosnące na dnie butelki. Inkubowano 1 godzinę w celu adsorpcji wirusa, a po tym czasie uzupełniano pożywką do 5 ml (butelka T-25), 15 ml (T-75) lub 35 ml (T-175/T-225). Komórki zakażone bakulowirusem hodowano do momentu wystąpienia efektu cytopatycznego, zwykle 5 - 6 dni. Lizaty wirusowe przechowywano w +4°C z dodatkiem 4% surowicy bydlęcej (FBS) bez dostępu światła.

6.4.1.4. Określanie miana namnożonego bakulowirusa

Przygotowano seryjne dziesiętne rozcieńczenia namnożonego bakulowirusa w pożywce HyQ. Następnie usunięto pożywkę znad wysianych na płytkę M-6 komórek Sf9 i zastąpiono ją przygotowanymi kolejnymi seryjnymi rozcieńczeniami bakulowirusa w dwóch powtórzeniach. Inkubację z bakulowirusem prowadzono 1 godzinę w 27°C. Po inkubacji zbierano pożywkę z rekombinowanym bakulowirusem, a komórki Sf9 zalewano pożywką zawierającą 1% agarozą. Po zastygnięciu agarozy nakraplano 0,2 ml pożywki zawierającej FBS i antybiotyki. Hodowlę prowadzono 7 dni w temperaturze 27°C. Następnie zbierano pożywkę, a agarozę pokrywano 1 ml 0,05% roztworu czerwieni obojętnej w PBS w celu wybarwienia powstałych łysinek. Inkubację prowadzono przez 2 godziny w 27°C bez dostępu światła. Miano wirusa określano korzystając ze wzoru gdzie:

Miano (ilość pfu/ml) = liczba łysinek x 1/współczynnik rozcieńczenia

Miano wirusa to ilość jednostek formujących łysinkę w mililitrze przy określonym rozcieńczeniu.

6.4.2. Owadzi system ekspresji genów

6.4.2.1. Hodowla komórek owadzych

Hodowlę komórek owadzych linii Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) prowadzono w pożywce HyQ-SFX (HyClone, USA) z dodatkiem antybiotyków (streptomycyna, penicylina) i środka grzybobójczego Fungizon w ilości 5 $\mu\text{l/ml}$ pożywki. Prowadzono hodowle płynne lub stacjonarne w zależności od potrzeb. Hodowle płynne prowadzono w kolbach szklanych o objętości 50, 100 lub 250 ml w 20 - 100 ml pożywki z wytrząsaniem 125 rpm w temperaturze 27°C. Co 3 - 4 dni hodowlę rozcieńczano w stosunku objętościowym 1:5 (5×10^5 kom./ml) w celu jej odmłodzenia. Hodowle jednowarstwowe prowadzono w inkubatorze w temperaturze 27°C na płytkach M-6 i M-12 oraz w butelkach T-25, T-75, T-175, T-225 w celu namnożenia zrekombinowanych bakulowirusów oraz nadprodukcji białek (Growth and maintenance of insect cell lines; Thermo Lifescience, USA).

6.4.2.2. Zakażenie komórek owadzych

Na płytce M-12 wsiewano komórki Sf9 w ilości 8×10^5 na jedną studzienkę i umieszczano w inkubatorze w temperaturze 27°C w celu przyłgnięcia komórek do płytki. Po 3 godzinach pożywkę z nad komórek zbierano i zastępowano świeżą pożywką zawierającą rekombinowanego bakulowirusa. Po godzinnej adsorpcji w temperaturze 27°C zbierano pożywkę i zastępowano świeżą. Infekcje prowadzono do uzyskania efektu cytopatycznego ok. 48 - 96 godzin.

6.4.2.3. Frakcjonowanie komórek

Zakażone rekombinowanymi bakulowirusami komórki owadzie linii Sf9 zbierano w różnych punktach czasowych, 24 - 96 godzin po infekcji do probówek typu Eppendorf i płukano trzykrotnie w buforze PBS. Następnie komórki lizowano w buforze lizującym. Lizę prowadzono w 4°C przez 1 godzinę w wytrząsarce orbitalnej. Zlizowane komórki przenoszono do probówek typu Eppendorf i wirowano 15 minut przy 15000 x g w celu oddzielenia frakcji rozpuszczalnej lizatu. Tak przygotowane próbki zawierające białka wirusowe przechowywano w -20°C do dalszych analiz.

Z pożywki wytrącono białka kwasem trójchlorooctowym (TCA). Do 1 ml pożywki dodawano TCA do końcowego stężenia 20%. Precypitację prowadzono w 4°C przez 15 minut na wytrząsarce orbitalnej a następnie wirowano 15 minut przy 10000 x g. Osad trzykrotnie przepłukano zimnym acetonem, a następnie pozostawiono próbki do wyschnięcia. Tak przygotowane próbki przechowywano do dalszych analiz.

6.4.3. Bakteryjny system ekspresji genów

6.4.3.1. Przygotowanie komórek kompetentnych *Escherichia coli* TOP10

Szczep *E. coli* TOP10 hodowano w 10 ml pożywki LB w temperaturze 37°C przez noc w wytrząsarce powietrznej 180 rpm. Następnego dnia hodowlę odmładzano 1:50 w 100 ml pożywki bez antybiotyków i hodowano z wytrząsaniem przez 3 - 4 godziny do $\text{OD}_{600} = 0,3 - 0,5$. Całość

hodowli przeniesiono do probówek o pojemności 50 ml. Po schłodzeniu w lodzie hodowlę wirowano 10 minut przy 4000 x g w temperaturze 4°C, a osad zawieszano w 10 ml zimnego 0,1 M CaCl₂. Po 1 godzinnej inkubacji w lodzie zawiesinę ponownie wirowano, a osad zawieszano w 2 ml zimnego CaCl₂ z 5% glicerolem. Tak przygotowaną zawiesinę komórek kompetentnych rozporcjowano po 200 µl do probówek typu Eppendorf i przechowywano w temperaturze -70°C.

6.4.3.2. Transformacja komórek bakteryjnych *E. coli*

Do 200 µl komórek kompetentnych *E. coli* rozmrożonych w lodzie dodawano 10-100 ng DNA plazmidowego. Po 30 minutach inkubacji w lodzie, przeprowadzano szok termiczny bakterii w 42°C przez 2 minuty, po czym próbkę schładzano ponownie w lodzie przez 2-3 minuty. Do zawiesiny dodawano 800 µl pożywki LB i inkubowano z wytrząsaniem 45 minut w 37°C. Transformowane komórki wysiewano na stałe podłoża LA zawierające odpowiedni antybiotyk selekcyjny. Inkubację bakterii na płytkach prowadzono przez noc w 37°C lub 48 godzin w przypadku szczepu DH10 Bac.

6.4.4. Ssaczy system ekspresji genów

6.4.4.1. Hodowla komórek ssaczyc

Komórki nabłonka nerki wywodzące się z ludzkiego embrionu linii HEK293T oraz komórki nerek psa MDCK hodowano w pożywce DMEM z dodatkiem 10% FBS, 1% L-glutaminy oraz antybiotyków w temperaturze 37°C i 5% stężeniu CO₂. W celu przepasażowania komórki płukano dwukrotnie 5 ml buforu PBS, a następnie dodawano 2 ml roztworu 0,25% trypsyny i inkubowano w 37°C przez 2-3 minuty. W celu neutralizacji trypsyny do zawiesiny dodawano 8 ml pożywki D-MEM z 6% FBS. Komórki liczone w komorze Thoma i w zależności od ich przeznaczenia wysiewano w odpowiedniej gęstości do butelki hodowlanej (butelki T-25 i T-75, płytki M-6 lub M-12).

6.4.4.2. Transfekcja komórek ssaczyc DNA plazmidowym

Komórki linii HEK293T transfekowano DNA plazmidowym zawierającym gen kodujący skróconą formę hemaglutyniny wirusa grypy typu A w formie nóżki (HA stalk). Transfekcję przeprowadzano z użyciem odczynnika Jet Prime, postępując zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta (Polyplus transfection, USA).

6.5. Techniki pracy z białkami

6.5.1. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w obecności SDS (SDS-PAGE)

Elektroforezę SDS-PAGE prowadzono w układzie nieciągłym w żelach o stężeniu poliakrylamidów 16,5%, 12%, 10%, 8% (żel rozdzielający) i 4,5% (żel zagęszczający). Przed naniesieniem na żel próbki mieszano z buforem lizująco-obciążającym zawierającym betamerkaptoetanol redukującym lub nieredukującym w stosunku 4:1. Próbki denaturowano we wrzącej łaźni wodnej przez 10 minut i wirowano 30 sekund 10 000 rpm. Rozdział elektroforetyczny

w żelu prowadzono w buforze elektrodowym przy stałym napięciu 120V (dla żeli o wymiarach 14 x 11 cm) i 80V (dla żeli o wymiarach 6 x 9 cm) w żelu zagęszczającym i odpowiednio 140V i 120V w żelu rozdzielającym. Mieszanki białek firmy Life Technologies o masach cząsteczkowych od 11 do 170 kDa stosowano jako wzorce masy cząsteczkowej.

6.5.2. Elektrotransfer białek z żelu poliakrylamidowego na membranę PVDF

Transfer białek rozdzielonych w żelach poliakrylamidowych na membranę typu PVDF prowadzono w aparacie do transferu mokrego. W tym celu żel po elektroforezie, membranę przepłukaną metanolem oraz arkusze bibuły Whatmann 3mm umieszczano na 2 minuty w buforze do transferu. Następnie układano w ramce aparatu do transferu kolejno trzy arkusze bibuły Whatmann 3mm, żel, membranę PVDF i kolejne arkusze bibuły. Całość umieszczano w aparacie do transferu mokrego wypełnionego buforem do transferu i prowadzono elektrotransfer przy stałym napięciu 25 V przez noc.

6.5.3. Immunodetekcja białek na membranie PVDF metodą Western Blotting

Po przeprowadzonym transferze, membranę typu PVDF inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej z łagodnym wytrząsaniem w buforze blokującym (3% odtłuszczone mleko w buforze TBS). Następnie membranę przenoszono do roztworu specyficznego dla analizowanego antygenu przeciwciał pierwszorzędowych w buforze blokującym z dodatkiem 0,1% Tweenu 20 (3% mleko odtłuszczone w buforze TBST) i kontynuowano inkubację przez 1 - 2 godziny. Nadmiar niespecyficznie związanych przeciwciał usuwano przez trzykrotne przemywanie błony buforem TBST przez 10 minut. Kolejną godzinną inkubację prowadzono w roztworze koniugatu przeciwciał drugorzędowych sprzężonych z alkaliczną fosfatazą lub peroksydazą chrzanową rozcieńczonych w 3% odtłuszczonego mleka w buforze TBST. Niezwiązany koniugat usuwano przez płukanie membrany w analogiczny sposób jak wyżej. Detekcję kompleksów białko-przeciwciało-koniugat przeprowadzano przy użyciu metody chromogenicznej z użyciem substratów dla alkalicznej fosfatazy - BCIP/NBT rozpuszczonych w buforze dla alkalicznej fosfatazy lub metody chemiluminescencji (ECL, ang. „enhanced chemiluminescence”) z użyciem substratu dla peroksydazy chrzanowej - roztworu luminolu. W przypadku stosowania metody chemiluminescencji membranę inkubowano przez 5 minut z roztworem substratów SuperSignal West Pico lub SuperSignal West Dura (ThermoScientific, USA), umieszczano między dwoma kawałkami przezroczystej folii i wkładano do kasety. W ciemni przykładano do błony kliszę fotograficzną i naświetlano w zależności od potrzeb 1-10 minut. Naświetloną kliszę umieszczano kolejno w roztworze wywoływacza, wodzie i roztworze utrwalacza.

6.5.4. Oczyszczanie białek z błony typu PVDF

W celu nadprodukcji rekombinowanych białek wykonano zakażenie komórek Sf9 w hodowli płynnej w ilości 2×10^6 kom./ml pożywki HYQ. Hodowlę o objętości 100 ml zakażano lizatami bakulowirusowymi przy m.o.i. 3 - 5. Następnie przeprowadzono frakcjonowanie komórek owadzych i tak przygotowane próbki poddano rozdziałowi w żelu poliakrylamidowym 8%. Kolejny etap polegał na transferze białek z żelu na membranę typu PVDF. W celu zlokalizowania białka na błonie PVDF wykonano test typu Western Blotting na odciętym kawałku błony. Następnie, błonę

przechowywaną w wodzie inkubowano w roztworze czerni amidowej przez 10 s i odbarwiano w wodzie redestylowanej. Po zaznaczeniu ołówkiem lokalizacji białka, pasek zawierający białko wycięto i pocięto na małe kawałeczki. Kawałki błony umieszczono w buforze do elucji białka z błony typu PVDF. Białko inkubowano przez noc z intensywnym wytrząsaniem. Fragmenty błony wirowano 5 minut 10000 x g. Supernatant zebrano przeniesiono do osobnej probówki typu Eppendorf. Elucję powtórzono zawieszając kawałki błony kolejno w 900 i 700 µl buforu elucyjnego. Eluaty o objętości 2 ml umieszczono w acetonie w celu precypitacji białka (4x objętości próby) i inkubowano przez noc w -20°C. Próbkę wirowano w 4°C przez 30 minut 10000 x g, przepłukano acetonem, inkubowano w temperaturze pokojowej przez 10 minut i wirowano 5 minut przy 10000 x g a następnie suszono. Wysuszone białko zawieszono w buforze TE i przechowywano w -20°C.

6.5.5. Badanie aktywności rekombinowanych białek oraz cząstek wirusopodobnych

6.5.5.1. Test badania aktywności neuraminidazy

Badanie aktywności rekombinowanej neuraminidazy przeprowadzono używając zestawu Amplex Red Catalase Assay Kit z firmy Life Technologies. Test wykonywano zgodnie z protokołem producenta. W pierwszej kolejności badane próbki zawieszono w referencyjnym buforze, a następnie wykonano seryjne rozcieńczenia. Przygotowane próbki naniesiono na 96 dołkowe U - denne czarne płytki, następnie naniesiono 50 µl roztworu roboczego zawierającego odczynnik Amplex Red oraz HRP, oksydazę galaktozową i fetuinę. Inkubacje prowadzono przez 30 minut w 37°C w ciemności, a następnie mierzono absorbancję przy długości fali 560 nm w spektrofotometrze Tecan. Przy standaryzacji testu kontrolę negatywną stanowił bufor referencyjny, a kontrolę pozytywną neuraminidaza z *Clostridium perfringens* dołączona do zestawu przez producenta.

6.5.5.2. Test hemaglutynacji

Test ten polega na zdolności aglutynowania krwinek przez wybrane patogeny jak i pojedyncze białka tych patogenów. Jest to test pozwalający potwierdzić funkcjonalność rekombinowanego białka. Doktorantka odbyła szkolenie w zakresie techniki wykonywana testów HA i HI w referencyjnym laboratorium w Puławach.

Przygotowanie krwinek

Pobraną przez weterynarza krew w ilości 5 ml z żyły danego zwierzęcia (kura, królik) przeniesiono do 15 ml płynu Elsevera. Następnie przesączono rozcieńczoną krew przez gazę w celu pozbycia się zanieczyszczeń. Całość dopełniono do 50 ml jałowym buforem PBS z dodatkiem jonów magnezu i wapnia (Biomed, Lublin), a następnie wirowano 2000 x g przez 10 minut. Usunięto osocze (górną fazę), a dolną fazę zawieszono w 50 ml jałowego buforu PBS i kolejny raz wirowano 2000 x g przez 10 minut. Następnie osad zawieszono w 50 ml jałowego PBS i wirowano 10 minut, 2000 x g, po czym zbierano 35 ml supernatantu. 3x stężone krwinki były gotowe do dalszego użycia przez okres 7 dni. W celu przygotowania roztworu roboczego 1x stężonego, pobierano 300 µl krwinek z wyjściowego 3x stężonego roztworu i rozpuszczano w 30 ml jałowego PBS z dodatkiem jonów magnezu i wapnia. Krwinki przechowywano w 4°C.

Wykonanie testu hemaglutynacji

Do testu hemaglutynacji wykorzystuje się płytki 96 dołkowe V-denne. Dodawano po 25 μ l jałowego buforu PBS z dodatkiem jonów magnezu i wapnia na każdą studzienkę. Następnie do ostatniej studzienki na płytce dodawano 25 μ l badanego antygeny w trzech powtórzeniach i wykonano dwukrotne seryjne rozcieńczenia. Kolejno dodano 25 μ l jałowego buforu PBS oraz 25 μ l 1x stężonych krwinek. Inkubację prowadzono 30 minut w temperaturze pokojowej i odczytywano wyniki. W przypadku gdy antygen jest zdolny do aglutynacji nie obserwuje się charakterystycznego opadania krwinek na dno V - dennej płytki.

6.6. Techniki mikroskopowe

6.6.1. Transmisyjna mikroskopia elektronowa i barwienie negatywowe

Przygotowane preparaty cząstek wirusopodobnych rozcieńczano w stosunku objętościowym 1:4 w buforze zawierającym dwuwartościowe jony magnezu zgodnie z opisem Gromadzka i wsp. 2006. Na formwarowaną siatkę niklową, bądź miedzianą zawierającą błonę węglanową, nakrapiano preparat i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 3 minuty. Za pomocą bibuły ściągano preparat i nakładano 25 μ l 2% octan uranylu lub 2% kwas fosfowolframowy. Po 30 sekundach ściągano barwnik za pomocą bibuły, a preparat umieszczano w szalce Petriego na bibule i przechowywano w temperaturze pokojowej do dalszych analiz. Doktorantka odbyła wielomiesięczne szkolenie w zakresie technik mikroskopii elektronowej prowadzone przez Dr Grażynę Konopę w Zakładzie Mikroskopii Elektronowej Uniwersytetu Gdańskiego i opanowała samodzielne wykonywanie preparatów jak również obserwacje mikroskopowe.

6.7. Techniki pracy z cząstkami wirusopodobnymi

6.7.1. Produkcja bezosłonkowych VLPs-RHDV w komórkach owadzych

W celu produkcji bezosłonkowych cząstek wirusopodobnych wykonywano zakażenie komórek Sf9 w hodowli płynnej w ilości 2×10^6 /ml pożywki lub w hodowli stacjonarnej zgodnie z opisem Gromadzka i wsp. 2006 (156). Hodowlę o różnej objętości zakażano lizatami bakulowirusowymi przy m.o.i. 5. Po 60 godzinach zbierano pożywkę wraz z komórkami i wirowano przez 30 minut przy 8500 x g. Następnie w celu zagęszczenia cząstek wirusopodobnych obecnych w pożywce, uzyskany supernatant ultrawirowano przez 3 godziny przy 82000 x g w 4°C. Osad zawieszono w 0,5 ml pożywki i inkubowano przez noc w 4°C w celu całkowitego rozpuszczenia zagęszczonych cząstek wirusopodobnych. Na przygotowany wcześniej skokowy gradient sacharozowy 20-60% nakładano przygotowaną próbkę. Aby rozdzielić cząstki wirusopodobne od bakulowirusów wykonano ultrawirowanie w gradiencie sacharozy przez 16 godzin przy 90000 x g w 4°C. Zebrane frakcje zawierające VLPs przechowywano do dalszych analiz, jak np. mikroskopia elektronowa, badanie stabilności czy też immunodetekcja.

6.7.2. Produkcja osłonkowych VLPs wirusa grypy w komórkach owadzych

Produkcję osłonkowych VLPs wykonano wykorzystując system bakulowirusowy (154). Komórki Sf9 wysiano do 5 butelek T225 w ilości 6×10^7 . Po 4 godzinach wykonano zakażenie komórek owadzych przy m.o.i. równym 3 wybranymi lizatami bakulowirusowymi niosącymi jeden, dwa lub trzy geny kodujące strukturalne białka wirusa grypy. Hodowle prowadzono przez 60 godzin. Po tym czasie zebrano komórki i pożywkę i poddano wirowaniu 8500 x g przez 30 minut w celu oddzielenia komórek od pożywki. Pożywkę w ilości 100 ml ultrawirovano przez 2 godziny w 4°C przy 82 000 x g w celu zagęszczenia cząstek wirusopodobnych. Następnie osad rozpuszczono w 2 ml buforu NTE przez noc w 4°C. Rozpuszczone i zagęszczone VLPs nakładano na gradient sacharozowy skokowy i ultrawirovano 16 godzin w 4°C przy 82000 x g. Frakcje zbierano po 1 ml od góry i analizowano w żelu poliakrylamidowym. Dodatkowo wykonano immunodetekcję poszczególnych białek. Wybrane frakcje zbierano i zagęszczano poprzez ultrawirowanie przez 2 godziny w 4°C przy 82000 x g. Osad następnie rozpuszczano w buforze NTE. Tak przygotowane próbki zawierające poszczególne VLPs przechowywano do dalszych analiz.

6.7.3. Przygotowanie antygenów do szczepień

W celu przygotowania antygeny do szczepień w postaci VLPs wykonano zakażenie komórek owadzych w hodowli stacjonarnej na większą skalę zmiareczkowanym lizatem bakulowirusowym. Po 60 godzinach wykonano cykl ultrawirowań i zebrano poszczególne frakcje gradientu. Frakcje te analizowano poprzez rozdzielanie w żelu poliakrylamidowym gradientowym 4 - 16%. Żel poliakrylamidowy barwiono błękitem kumazyny. Poszczególne frakcje połączono i zagęszczono poprzez ultrawirowanie, a następnie rozpuszczono w buforze PBS.

6.8. Techniki immunologiczne

6.8.1. Test immunoperoksydazowy w hodowlach jednowarstwowych

Test typu IPMA (ang. immunoperoxidase monolayer assay) przeprowadzono na płytce M-6, po 48 godzinach od zakażenia komórek owadzych rekombinowanym bakulowirusem niosącym geny strukturalnych białek wirusa ptasiej grypy lub wirusa RHD. Eksperyment przeprowadzono z zastosowaniem zaprezentowanej przez Gromadzka i wsp. (156) (154) metody. Po 48 godzinach zbierano pożywkę, a komórki przemywano buforem PBS, a następnie utrwalano poprzez dodanie 70% zimnego metanolu (1 ml, 20 minut). Następnie, utrwalone komórki Sf9 płukano 2 razy 1 ml buforu PBS i inkubowano 1 godzinę w temperaturze pokojowej z roztworem pierwszorzędowych przeciwciał, w rozcieńczeniu 1:500 w PBST. Następnie komórki płukano buforem PBS+Tween 80% w celu usunięcia niezwiązanych przeciwciał i dodawano roztwór przeciwciał drugorzędowych sprzężonych z peroksydazą chrzanową w rozcieńczeniu 1:1000 w buforze PBST. Po godzinnej inkubacji ponownie odpłukano niezwiązane przeciwciała. W celu detekcji kompleksów stosowano bufor 0,05 M octan sodu o pH 5,0 zawierający 200 µg/ml 3-amino-9-etylo-karbazol i nadtlenek wodoru lub komercyjnie dostępny substrat - Vector NovaRed Substrate Kit (Vector). Komórki oglądano pod mikroskopem świetlnym.

6.8.2. Produkcja monospecyficznego surowicy poliklonalnej

Króliki zaszczepiono podskórną. Do immunizacji użyto rekombinowane antygeny HA i NA wirusa grypy oraz VP60 wirusa RHD w ilości 200 µg rekombinowanego białka w 0,5 ml PBS z dodatkiem kompletnego adjuwantu Freund'a w stosunku objętościowym 1:1 zgodnie z opisem Fitzner i Gromadzka 2007 (157). Po 21 dniach zwierzęta szczepiono po raz drugi śródskórną antygenem w ilości 100 -200 µg w 0,5 ml buforu PBS w obecności niepełnego adjuwantu Freund'a w stosunku objętościowym 1:1. Surowice pobierano 14 dni po drugim szczepieniu. Krew tłoczono do jałowej probówki polistyrenowej lub polietylenowej tak by strumień pobranej krwi spływał skośnie po ścianie, co zapobiegało hemolizie krwinek. Pobraną próbkę krwi pozostawiono w temperaturze pokojowej (2 - 3 godziny) lub w temperaturze 37°C do czasu powstania skrzepu (30 - 45 minut). Krew umieszczono w lodówce w temperaturze 4°C na okres kilku do kilkunastu godzin do całkowitego utworzenia skrzepu. Surowicę oddzielono od skrzepu zlewając ją ostrożnie do jałowej probówki i wirowano przez 20 minut przy 3000 x g. Tak zebraną surowicę przechowywano w -20°C.

6.8.3. Test zahamowania hemaglutynacji

Test ten wykonywany był na 96-dołkowych V - dennych płytkach. W celu przeprowadzenia analizy badanych surowic, uprzednio zmiareczkowanym antygenem HA zgodnie z opisem w sekcji 6.5.5.2., użyto 4 jednostek antygeny HA. Następnie dodano po 70 µl jałowego buforu PBS z dodatkiem jonów magnezu i wapnia oraz 10 µl badanej surowicy do pierwszej studzienki. Do trzeciej studzienki dodano 25 µl PBS. Do drugiej studzienki przeniesiono 25 µl z pierwszej studzienki. Od 3 studzienki na płytce wykonano seryjne rozcieńczenia. Kolejno dodano 25 µl PBS oraz 25 µl uprzednio przygotowanego antygeny (4 jednostki antygeny) i inkubowano przez 25 minut w temperaturze pokojowej. Następnie dodano 25 µl zawiesiny krwinek. Inkubowano 30 minut w temperaturze pokojowej i odczytywano wyniki. W przypadku reakcji antygen - krwinka jest możliwa do zaobserwowania charakterystyczna zawiesina, gdy antygen nie zwiąże się z krwinką obserwujemy tzw. guziczek. W przypadku gdy przeciwciała są zdolne do opłaszczenia i związania antygeny, nie dochodzi do hemaglutynacji i krwinki opadają na dno płytki.

6.8.4. Charakterystyka cząsteczek wirusopodobnych w teście ELISA

6.8.4.1. Detekcja VLP-RHDV w teście ELISA

Na płytkę 96 dołkową dodano 100 µl rozcieńczonego w PBS antygeny w postaci cząstek wirusopodobnych wirusa RHD i inkubowano przez noc w 4°C. Płytkę płukano pięciokrotnie buforem PBST. Dodano roztwór PBS z 3% BSA i 0,05% Tween 20 w celu zablokowania niespecyficznego miejsc wiązania. Płytkę inkubowano przez 30 minut w 37°C. Następnie płukano pięciokrotnie buforem PBST, po czym dodawano roztwór przeciwciał poliklonalnych skierowanych przeciwko wybranemu białku w rozcieńczeniu objętościowym 1:2000 w buforze PBT w ilości 100 µl/studzienkę i inkubowano 2 godziny w temperaturze 37°C. Niezwiązane przeciwciała odmywano przez 5-krotne płukanie buforem PBST, a następnie inkubowano z koniugatem przeciwciał drugorzędowych sprzężonych z peroksydazą chrzanową w rozcieńczeniu 1:2000 w buforze PBT w ilości 100 µl/studzienkę. Po 5-krotnym płukaniu buforem PBST prowadzono reakcję enzymatyczną przez 15

minut z zastosowaniem substratu TMB. Reakcje zatrzymano poprzez dodanie 100 μ l/studzienkę 2 M H_2SO_4 . Absorbancję mierzono przy długości fali 450 nm z zastosowaniem czytnika płytek Nanoquant, Infinite M200.

6.8.4.2. Detekcja VLP-RHDV w teście podwójnego wiązania ELISA

Płytki 96 dołkowe zostały opłaszczone specyficzną surowicą króliczą – rozcieńczoną w buforze PBS (inkubacja 24 godziny w temperaturze pokojowej). Płytki przepłukano 3 razy buforem PBS. 50 μ l kontroli pozytywnej – (referencyjnego antygeny wirusowego rozcieńczonego w buforze PBS zawierającym 3% BSA) dodano na studzienki i inkubowano przez 1 godzinę w 37°C. Po przepłukaniu, 50 μ l specyficznych przeciwciał pochodzących ze świnki morskiej anty-RHDV rozcieńczonych w odpowiedni sposób w PBS z 3% BSA zostało dodane do każdej studzienki i inkubowano przez 1 godzinę w 37°C. Płytki przepłukano, a następnie dodano 50 μ l przeciwciał drugorzędowych sprzężonych z HRP i inkubowano jak wyżej. Po 4-krotnym płukaniu buforem PBST prowadzono reakcję enzymatyczną przez 15 minut z zastosowaniem substratu OPD (z ang. o-phenylenediamine) zawierającym 0,05% H_2O_2 . Reakcje zatrzymano poprzez dodanie 100 μ l/studzienkę 1,25 M H_2SO_4 . Absorbancję mierzono przy długości fali 492 nm z zastosowaniem czytnika płytek Nanoquant, Infinite M200. Ten typ testów ELISA wykonywany był w referencyjnym laboratorium w Zduńskiej Woli przez dr hab Andrzeja Fitznera.

6.8.4.3. Detekcja konformacyjnych epitopów VLP-RHDV w teście podwójnego wiązania ELISA z wykorzystaniem monoklonalnych przeciwciał 1H8 sprzężonych z peroksydazą chrzanową

Płytki 96 dołkowe zostały opłaszczone monospecyficzną surowicą króliczą rozcieńczoną w buforze PBS w ciągu 24 godzin. Po zakończeniu opłaszczania płytki przepłukano 3 razy buforem PBS. 50 μ l kontroli pozytywnej stanowiącej referencyjny antygen wirusowy dodano na studzienki i inkubowano przez 1 godzinę w 37°C. Po przepłukaniu płytek, 50 μ l specyficznych przeciwciał monoklonalnych sprzężonych z HRP rozcieńczonych objętościowo 1:1000 w PBS z 3% BSA dodano do każdej studzienki i inkubowano przez 1 godzinę w 37°C. Po 4-krotnym płukaniu buforem PBST prowadzono reakcję enzymatyczną przez 15 minut z zastosowaniem substratu OPD zawierającym 0,05% H_2O_2 . Reakcje zatrzymano poprzez dodanie 100 μ l/studzienkę 1,25 M H_2SO_4 . Absorbancję mierzono przy długości fali 492 nm z zastosowaniem czytnika płytek Nanoquant, Infinite M200. Ten typ testów ELISA wykonywany był w referencyjnym laboratorium w Zduńskiej Woli przez dr hab Andrzeja Fitznera.

6.9. Badania na modelu zwierzęcym

Szczepienia królików

Cząsteczki wirusopodobne RHD uzyskane w komórkach owadzych użyte były do immunizacji królików w celu uzyskania surowic poliklonalnych. Zaszczepiono 4 króliki śródskórną 200 μ g VLPs-RHDV w formulacji z kompletnym adjuwantem Freund'a. Po 21 dniach króliki zostały doszczepione 100 μ g VLPs w formulacji z niekompletnym adjuwantem Freund'a. 14 dni później od królików została pobrana krew. Jeden niezaszczepiony królik stanowił kontrolę negatywną eksperymentu. W celu oznaczenia dynamiki narastania przeciwciał

w wyznaczonych terminach pobierano od zaszczepionych zwierząt krew (w dniu: 0, 12, 22, 37, 41, 42, 51, 54). Pobraną krew inkubowano w 37°C przez 2 godziny, a następnie przez noc w 4°C. Następnie wirowano przez 30 minut przy 2500 x g. Wyodrębnioną surowicę porcjowano i przechowywano w -20°C.

Szczepienia kawii domowych

Cząsteczki wirusopodobne RHD uzyskane w komórkach owadzych były użyte do immunizacji kawii domowych w celu uzyskania surowic poliklonalnych. Zaszczepiono 3 kawie domowe podskórnie 200 µg VLPs w formulacji z kompletnym adjuwantem Freund'a. Po 21 dniach świnki zostały doszczepione 100 µg VLPs w formulacji z niekompletnym adjuwantem Freund'a. 14 dni później pobierano od zaszczepionych zwierząt krew. Jedna niezaszczepiona kawia domowa stanowiła kontrolę negatywną eksperymentu. Pobraną krew inkubowano w 37°C przez 2 godziny, a następnie przez noc w 4°C. Następnie wirowano przez 30 minut przy 2500 x g. Wyodrębnioną surowicę porcjowano i przechowywano w -20°C.

Szczepienia kur

Cząstki wirusopodobne wirusa ptasiej grypy szczepu H5N1 uzyskane w systemie bakulowirusowym w komórkach owadzych użyto do immunizacji kur. Grupa 41 kur brojlerów 3 tygodniowych została zaszczepiona domięśniowo do mięśnia piersiowego dawką 200 µl preparatu szczepionkowego zawierającego 10-25 µg VLPs-grypy. Druga grupa 9 kur stanowiła kontrolę. Cztery z nich zostały zaszczepione PBS z dodatkiem adjuwantu a pozostałe 5 były nieszczepione. Po 27 dniach wykonano kolejne szczepienie taką samą dawką szczepionki w taki sam sposób domięśniowo do mięśnia piersiowego. Krew do analizy pobierano w 22, 49, 56 oraz 63 dniu życia kur. Odpowiedź immunologiczną kur badano testami pośrednimi ELISA oraz HI.

6.10. Analiza odpowiedzi immunologicznej po szczepieniu preparatami o potencjale ochronnym

6.10.1 Ocena ilościowa dynamiki narastania przeciwciał w odpowiedzi immunologicznej na szczepienie H5N1-HA VLP, H5N1-HA/M1 VLP i H5N1-HA/NA/M1 VLP u kur za pomocą testu ELISA

Test ELISA został użyty do wykrycia i ilościowego określenia odpowiedzi immunologicznej na szczepienie kur różnego rodzaju H5N1-VLPs. 96-dołkową płytkę z płaskim dnem pokryto 50 ng/dołek w 100 µl inaktywowanego referencyjnego wirusa H5N1, zakupionego w laboratorium referencyjnym Animal Health and Veterinary Laboratories Agency (AHVLA, Weybridge, Wielka Brytania). Płytkę opłaszczono przez noc w 4°C. Następnie płytkę płukano 4x 5 minut 200 µl/studzienkę buforu do płukania (PBS/0,05% Tween20). Płytkę blokowano przez 1 godzinę w 37°C 250 µl/studzienkę buforu blokującego (3% BSA/PBS/0,05% Tween 20), a następnie płukano jak poprzednio. Dodano 100 µl/studzienkę rozcieńczonych 1:300 surowic kurcząt z immunizowanych kur zebranych w 34 dniu po pierwszej immunizacji i inkubowano przez 1 godzinę w 37°C. Płytkę przemyto jak poprzednio. Następnie dodano 100 µl/dołek skoniugowanych z AP drugorzędowych przeciwciał anty-kurzych (anty-IgY) (1:2000 w 3% BSA/PBS/0,05% Tween 20) i inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Po ostatnim etapie płukania płytek (6 x 5 minut z 200

μl/studzienkę buforu płuczącego) dodano 100 μl/studzienkę roztworu substratu NPP. Intensywność sygnału zmierzono przy 450 nm za pomocą czytnika płytek.

6.10.2 Charakterystyka odpowiedzi immunologicznej na szczepienie kur preparatem H5N1-HA/NA/ M1 VLP w formułacji z pełnym i z niekompletnym adjuwantem testem ELISA

Test ELISA został użyty do wykrycia i ilościowego określenia odpowiedzi immunologicznej na szczepienie kur preparatem zawierającym H5N1-HA/NA/M1 VLPs. 96 - dołkową płytkę z płaskim dnem pokryto 100 μl o stężeniu 50 ng/dołek inaktywowanego referencyjnego antygeny wirusa H5N1, zakupionego w laboratorium referencyjnym Animal Health and Veterinary Laboratories Agency (AHVLA, Weybridge, Wielka Brytania). Płytkę opłaszczano przez noc w 4°C. Następnie płytkę płukano 4x 5 minut 200 μl/studzienkę buforu do płukania (PBS/0,05% Tween20). Płytkę blokowano przez 1 godzinę w 37°C 250 μl/studzienkę buforu blokującego (3% BSA/PBS/0,05 %Tween 20) a następnie płukano jak poprzednio. Dodano 100 μl/studzienkę rozcieńczonych 1:300 surowic kurcząt z immunizowanych kur zebranych w 34 dniu po pierwszej immunizacji i inkubowano przez 1 godzinę w 37°C. Płytkę przemyto jak poprzednio. Następnie dodano 100 μl/dołek skoniugowancth z AP drugorzędowych przeciwciał anty-kurzych (anty-IgY) (1:2000 w 3% BSA/PBS/0,05 %Tween 20) i inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Po ostatnim etapie płukania płytek (6 x 5 minut z 200 μl/studzienkę buforu płuczącego) dodano 100 μl/studzienkę roztworu substratu NPP. Intensywność sygnału zmierzono przy 450 nm za pomocą czytnika płytek TECAN.

6.10.3. Ocena dynamiki narastania przeciwciał w czasie w odpowiedzi immunologicznej na szczepienie H5N1-HA/NA/M1 VLP u kur za pomocą testu ELISA

Test ELISA został użyty do miareczkowania uzyskanych surowic i ilościowego określenia odpowiedzi immunologicznej na szczepienie kur H5N1-HA/NA/M1VLPs. 96-dołkową płytkę z płaskim dnem pokryto referencyjnym antygenem w formie inaktywowanego wirusa H5N1 50 ng/dołek w objętości 100 μl, zakupionego w laboratorium referencyjnym Animal Health and Veterinary Laboratories Agency. Płytkę opłaszczano przez noc w 4°C. Płytkę płukano 4 x 5 minut 200 μl/studzienkę buforu do płukania (PBS/0,05% Tween 20), a następnie blokowano przez 1 godzinę w 37°C 250 μl/studzienkę buforu blokującego (3% BSA/PBS/0,05% Tween 20). Płytkę następnie płukano jak poprzednio. W celu określenia dynamiki narastania specyficznych przeciwciał dodano po 100 μl/studzienkę rozcieńczonych 1:300 surowic kurcząt z immunizowanych kur zebranych w dniach 0, 17, 34, 41 po pierwszej immunizacji i inkubowano przez 1 godzinę w 37°C. Po tym czasie płytkę przemyto jak uprzednio. Następnie dodano drugorzędowe przeciwciała anty IgY skoniugowane z AP w ilości 100 μl/dołek (1:2000 w 3% BSA /PBS/0,05% Tween 20) i inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Po ostatnim etapie płukania płytek (6 x 5 minut z 200 μl/studzienkę) dodano 100 μl/studzienkę roztworu substrat fosforanu p-nitrofenylu. Intensywność sygnału zmierzono przy 450 nm za pomocą czytnik płytek TECAN.

6.10.4. Miareczkowanie do punktu końcowego surowic od kurcząt immunizowanych H5N1-HA/NA /M1 VLP w teście ELISA

Surowice uzyskane w 41 dniu po szczepieniu od immunizowanych brojlerów zebrano i połączono. 96-dołkowa płytkę ELISA (Greiner Microlon High-Binding, bezbarwna) została opłaszczona referencyjnym antygenem w postaci inaktywowanego wirusa H5N1 (Animal Health and Veterinary Laboratories Agency w ilości 50 ng/dołek w objętości 100 μ l. Opłaszczano płytkę przez noc w 4°C. Następnie płytkę płukano 4 x 5 minut 200 μ l/studzienkę buforu do płukania (PBS/0,05% Tween 20), blokowano przez 1 godzinę w 37°C 250 μ l/studzienkę buforu blokującego (3% BSA/PBS/0,05% Tween 20). Płytkę przepłukano jak opisano poprzednio i do studzienek dodano seryjne rozcieńczenia zebranych surowic kurzych (w 3% BSA/PBS/0,05% Tween 20), a następnie inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Seryjne rozcieńczenia referencyjnych kurzych przeciwciał A/H5N1/HPAI (Veterinary Laboratories Agency, Wielka Brytania; w 3% BSA/PBS/0,05% Tween 20) posłużyły jako kontrola pozytywna. Po inkubacji płytkę przemyto jak poprzednio i dodano przeciwciała drugorzędowe anty IgY (kozie anty-kurcze sprzężone z AP; w 3% BSA/PBS/0,05% Tween 20). Po ostatnim etapie płukania (6 x 5 minut z 200 μ l/studzienkę buforu płuczającego) dodano 100 μ l/studzienkę roztworu substratu NPP. Intensywność sygnału mierzono przy 450 nm za pomocą czytnika płytek TECAN.

6.10.5. Ekspresja i charakterystyka uniwersalnego antygeny hemaglutyniny w formie HA stalk w komórkach owadziej za pomocą testu typu IPMA z monoklonalnymi przeciwciałami anty-H1N1 lub uniwersalnymi przeciwciałami Fi6

Komórki Sf9 (8×10^5) wysiano na 2,5 - cm szalce hodowlanej w syntetycznej pożywce SFX, a następnie zakażono bakulowirusem kodującym białko HA stalk szczepu H5N1 przy wielokrotności zakażenia jednej komórki owadziej (m.o.i) wynoszącym 5. Czterdzieści osiem godzin po infekcji komórki przemyto buforem PBS i utrwalono 70% zimnym metanolem przez 20 minut. Następnie utrwalone komórki Sf9 przemyto 2 razy buforem PBS i inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej z 500 μ l/studzienkę przeciwciał anty-H1N1 Mab rozcieńczonych 1:1000 lub z przeciwciałami Fi6 hMab rozcieńczonymi 1:1000 z 1% Tween 80 w PBS. Następnie zastosowano 500 μ l/studzienkę przeciwciał drugorzędowych rozcieńczonych 1:2000 w PBS i 1% Tween 80. Płytkę inkubowano przez 1 godzinę i płukano 3 razy 1 ml buforu do płukania (sól fizjologiczna buforowana Tris pH 7,2/0,1% BSA/0,05% Tween 80). Reakcja została uwidoczniła za pomocą zestawu substratów NovaRED. Komórki obserwowano za pomocą mikroskopu konfokalnego Nikon PCM2000.

6.10.6. Analiza reaktywności krzyżowej puli uniwersalnych przeciwciał powstałych w wyniku szczepienia kur preparatami zawierającymi H5N1-HA/NA/M1 VLP; detekcja homologicznego i heterologicznych antygenów w formie HA stalk w komórkach ssaczych za pomocą testu IPMA

Komórki HEK293 w ilości 8×10^5 wysiano na 2,5 - cm szalki hodowlanej w kompletnej pożywce DMEM. Następnie wykonano transfekcje przy użyciu plazmidów pcDNA3.1 zawierających homologiczny konstrukt HA stalk H5N1, heterologiczny konstrukt HA stalk szczepu pandemicznego H1N1 oraz heterologiczny konstrukt pcDNA3.1 HA stalk ze szczepu H7N9. Do transfekcji użyto odczynnika Jet Prime zgodnie z protokołem producenta (PolyPlus, USA). 48 godzin po transfekcji komórki przemyto buforem PBS, zamrożono w -70°C przez 15 minut i utrwalono 4%

formaldehydem. Następnie komórki inkubowano z rozcieńczonymi 1:300 w PBS z 1% Tween 80 surowicami kurcząt uzyskanymi w 41 dniu po szczepieniu (500 µl/studzienkę na płytce M6). Płytkę inkubowano przez 1 godzinę i płukano 3 razy po 1 ml buforu do płukania (sól fizjologiczna buforowana Tris o pH 7,2/0,1% BSA/0,05% Tween 80). Następnie zastosowano drugorzędowe przeciwciała anty IgY 500 µl/studzienkę (kozy anty-kurze rozcieńczone 1:2000 w PBS i 1% Tween 80). Płytkę inkubowano przez 1 godzinę i płukano 3 razy 1 ml buforu do płukania (sól fizjologiczna buforowana Tris pH 7,2/0,1% BSA/0,05% Tween 80). Reakcja została uwidoczniiona za pomocą zestawu substratów NovaRED. Komórki obserwowano za pomocą mikroskopu konfokalnego Nikon PCM2000.

6.10.7. Analiza reaktywności krzyżowej heteropodtypowej domeny LAH z ludzkiego szczepu H3N2 w obrębie HA2 domeny z surowicami kurzymi po szczepieniu potrójnymi VLP H5N1/NA-HA-M1 ; Test peptydowy ELISA

96 - studzienkową płytkę ELISA (Pierce Streptavidin High Binding Capacity, Clear) pokryto 100 µl/studzienkę w stężeniu 10 µg/ml biotynylowanego peptydu RIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELL VALENQHTIDLTSEMKNLF EK TRRQLRENA LAH (syntetyzowanego przez JPT Peptide Technologies, Niemcy). Opłaszczano płytkę przez 2 godziny z wytrząsaniem w temperaturze pokojowej. Następnie płytkę płukano czterokrotnie przez 5 minut 200 µl/studzienkę buforu do płukania (sól fizjologiczna buforowana Tris pH 7,2/0,1% BSA/0,05% Tween 20). Na płytkę dodano 100 µl/studzienkę rozcieńczonych objętościowo 1:300 surowic kurcząt z zaszczepionych kur. Płytkę inkubowano przez 2 godziny z wytrząsaniem w temperaturze pokojowej. Następnie płytkę płukano jak poprzednio i dodano 100 µl/studzienkę drugorzędowych przeciwciał anty IgY rozcieńczonych 1:1000. Po 1 godzinnej inkubacji w temperaturze pokojowej płytkę płukano (6 x 5 minut z 200 µl/studzienkę buforu do płukania), następnie dodano 100 µl/studzienkę roztworu substratu NPP (SigmaFast; Sigma, USA). Intensywność sygnału mierzono przy 450 nm za pomocą czytnika płytek TECAN.

6.10.8. Oznaczanie miana przeciwciał w surowicach króliczych po szczepieniu VLP-RHDV z wykorzystaniem testu ELISA - Test kompetycyjny ELISA

Płytkę 96 -dołkową płaskodenną opłaszczono swoistą króliczą surowicą odpornościową. Następnie na płytkę naniesiono mieszaninę badanej surowicy i stałej dawki antygenu referencyjnego wirusa RHDV. W następnym etapie zastosowano przeciwciała monoklonalne CR, związane z peroksydazą chrzanową. Obecność przeciwciał w badanej surowicy wykrywano spektrofotometrycznie na podstawie reakcji barwnej po dodaniu substratu OPD.

W cELISA o nazwie LPBE ELISA wykorzystano przeciwciała poliklonalne oraz polskie wirusy referencyjne szczepu SGM. LBPE ELISA jest testem kompetycyjnym, wielowarswowym z etapem seroneutralizacji w fazie płynnej, stąd nazwa Liquid-Phase-Blocking ELISA. Jeśli w badanej surowicy są obecne przeciwciała przeciwko wirusowi RHD, to wiążą one referencyjny antygen blokując w ten sposób jego wolne determinanty antygenowe, co z kolei uniemożliwia w dalszym etapie przyłączenie się przeciwciał zawartych w poliklonalnej surowicy służącej do detekcji antygenu. Reakcja wiązania badanych przeciwciał z antygenem zachodzi w fazie płynnej na płytce U - dennej, stąd nazwa tego testu. W wyniku testów kompetycyjnych wynik dodatni, czyli reakcję badanej surowicy z antygenem, oznacza brak reakcji barwnej. Natomiast w przypadku kontroli negatywnej

obserwujemy barwną reakcję, gdyż antygen nie związał się z przeciwciałem badanym tylko z przeciwciałem komercyjnym, które mogło być dalej rozpoznane przez II-rzędowe przeciwciała sprzężone z HRP, które w wyniku dodania substratu dało wynik dodatni. Ten typ testów ELISA wykonywany był w referencyjnym laboratorium w Zduńskiej Woli przez Pana dr hab Andrzeja Fitznera.

6.11. Ocena skuteczności prototypu szczepionki nowej generacji przeciwko RHDV, eksperyment typu „challenge”

Cząsteczki wirusopodobne wirusa RHD uzyskane w komórkach owadziach były użyte do immunizacji królików. Grupa 7 seronegatywnych dorosłych królików (3 miesięcznych) została zaszczepiona podskórnie dawką 1 ml preparatu szczepionkowego zawierającej 200 µg VP60-VLPs. Druga grupa 4 królików stanowiła kontrolę negatywną. Dwa z nich były nieszczepione, a dwa zostały zaszczepione pożywką z nadkomórek niezakażonych Sf9. Odpowiedź immunologiczną królików badano testem HI oraz testem ELISA po 12 dniach od szczepienia. W tym samym dniu wszystkie zwierzęta zostały zainfekowane poprzez podskórną inokulację wirusem RHD o mianie HI=1/10240, które stanowiło stukrotnie wyższą dawkę niż dawka śmiertelna czyli LD50 (ang. lethal dose 50). W celu oceny właściwości immunogennych jednodawkowej eksperymentalnej szczepionki nowej generacji w dniach 0, 8, 12 po szczepieniu oraz 8 dni po eksperymentalnym zakażeniu pobrano próbki krwi w celu oznaczenia miana przeciwciał w testach HI oraz ELISA. Eksperyment został wykonany w referencyjnym laboratorium Zakładu Pryszczycy w Zduńskiej Woli.

6.12. Analiza statystyczna

Zebrane dane analizowano i wizualizowano przy użyciu oprogramowania GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) i Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA). Analizę przeprowadzono za pomocą testów nieparametrycznych ze względu na ograniczoną liczbę próbek, które nie wystarczały do potwierdzenia normalnego rozkładu otrzymanych wyników.

Analiza statystyczna do oceny ilościowej dynamiki narastania przeciwciał w odpowiedzi immunologicznej na szczepienie H5N1-HA VLP, H5N1-HA/M1 VLP i H5N1-HA/NA/M1 VLP u kur za pomocą testu ELISA

Dane wykorzystano w analizie Two-way RM ANOVA oraz następnie w analizie mieszanych efektów wraz z dwuetapową liniową procedurą step-up Benjaminiego, Kriegera i Yekutieli'ego ($p = 0,05$). Analizę wykonano dla grup danych H5N1 HA VLPs, H5N1 HA/M1 VLPs oraz H5N1 HA/M1/NA VLPs + CF pomiędzy odpowiedzią zaobserwowaną w poszczególnych dniach po szczepieniu. W kolejnym kroku także porównano odpowiedzi dla poszczególnych dni po szczepieniu różnymi preparatami: H5N1 HA VLPs, H5N1 HA/M1 VLPs oraz H5N1 HA/M1/NA VLPs + CF.

Analiza statystyczna do charakterystyki odpowiedzi immunologicznej na szczepienie kur preparatem H5N1-HA/NA/M1 VLP w formułacji z pełnym i z niekompletnym adjuwantem testem ELISA

Dane wykorzystano w analizie Two-way RM ANOVA oraz następnie w analizie mieszanych efektów wraz z dwuetapową liniową procedurą step-up Benjaminiego, Kriegera i Yekutieli'ego ($p = 0,05$). Dane porównywano w grupie H5N1 HA/M1/NA VLPs + CF lub H5N1 HA/M1/NA VLPs + ICF

między odpowiedzią zaobserwowaną w poszczególnych dniach po szczepieniu. Następnie dane dla poszczególnych dni porównano między H5N1 HA/M1/NA VLPs + CF oraz H5N1 HA/M1/NA VLPs + ICF.

Analiza statystyczna do oceny ilościowej odpowiedzi immunologicznej na szczepienie potrójnymi VLP H5N1/NA-HA-M1 u kur

Analizę statystyczną miana przeciwciał w surowicach pobranych w różnych punktach czasowych przeprowadzono w programie GraphPad Prism przy użyciu nieparametrycznego testu Kruskala–Wallisa ($p = 0,05$). W kolejnym kroku, w celu kontroli fałszywie wykrytych różnic istotnych statystycznie, przeprowadzono test porównań wielokrotnych Benjaminiiego, Kriegera i Yekutieliiego ($p = 0,05$). Każdą surowicę badano w dwóch powtórzeniach, a do analizy statystycznej wykorzystano uśrednione pomiary absorbancji z obu powtórzeń.

Analiza statystyczna reaktywności krzyżowej heteropodtypowej domeny LAH ludzkiej H3N2 HA2 z surowicami kurzymi po szczepieniu potrójnymi VLP H5N1/NA-HA-M1

Porównanie miana przeciwciał dla surowic pobranych przed i po szczepieniu przeprowadzono przy użyciu nieparametryczny test Wilcoxon ($p = 0,05$) dla sparowanych grup. Analizy statystyczne przeprowadzono dla surowic pobranych od każdej kury, a także pomiędzy grupami zwierząt nieszczepionych i zaszczepionych. Każdą surowicę testowano w dwóch powtórzeniach technicznych.

6.13. Analiza porównawcza sekwencji aminokwasowych obejmujących wysoce konserwowany rejon długiej alfa helisy (LAH) w obrębie badanych antygenów w postaci HA stalk

Porównanie wysoce konserwowanych rejonów długiej alfa helisy (LAH) różnych szczepów wirusa grypy, w tym: H5N1, H1N1, H7N9 i H3N2. Sekwencje aminokwasowe pełnej długości hemaglutynin pobrano z The National Center for Biotechnology Information, Influenza Virus database, o numerach dostępu: ADA83041 A/Abakan/02/2009/ (H1N1), AGL44438 A/Shanghai/02/2013 (H7N9), ABU50579 A/Texas/01/2007 (H3N2), baza danych EpiFlu, numer dostępu: EPI156789 A/swan/Poland 305-135V08-2006 (H5N1)). Porównanie sekwencji wykonano z wykorzystaniem oprogramowania Geneious Prime przy użyciu algorytmu dopasowania Geneious.

6.14. Analiza pełnej długości sekwencji aminokwasowej kodującej strukturalne białka

Uzyskane sekwencje nukleotydowe dla hemaglutyniny polskiego szczepu wirusa grypy typu H5N1 oraz białka VP60 wirusa RHD poddano analizom *in silico*. Jako pierwszą wykonano translacje przy użyciu programu ExPasy Translate Tool. Następnie w celu potwierdzenia serotypu sekwencji *ha* wykonano analizę porównawczą przy użyciu algorytmu BLAST (ang. basic local alignment search tool).

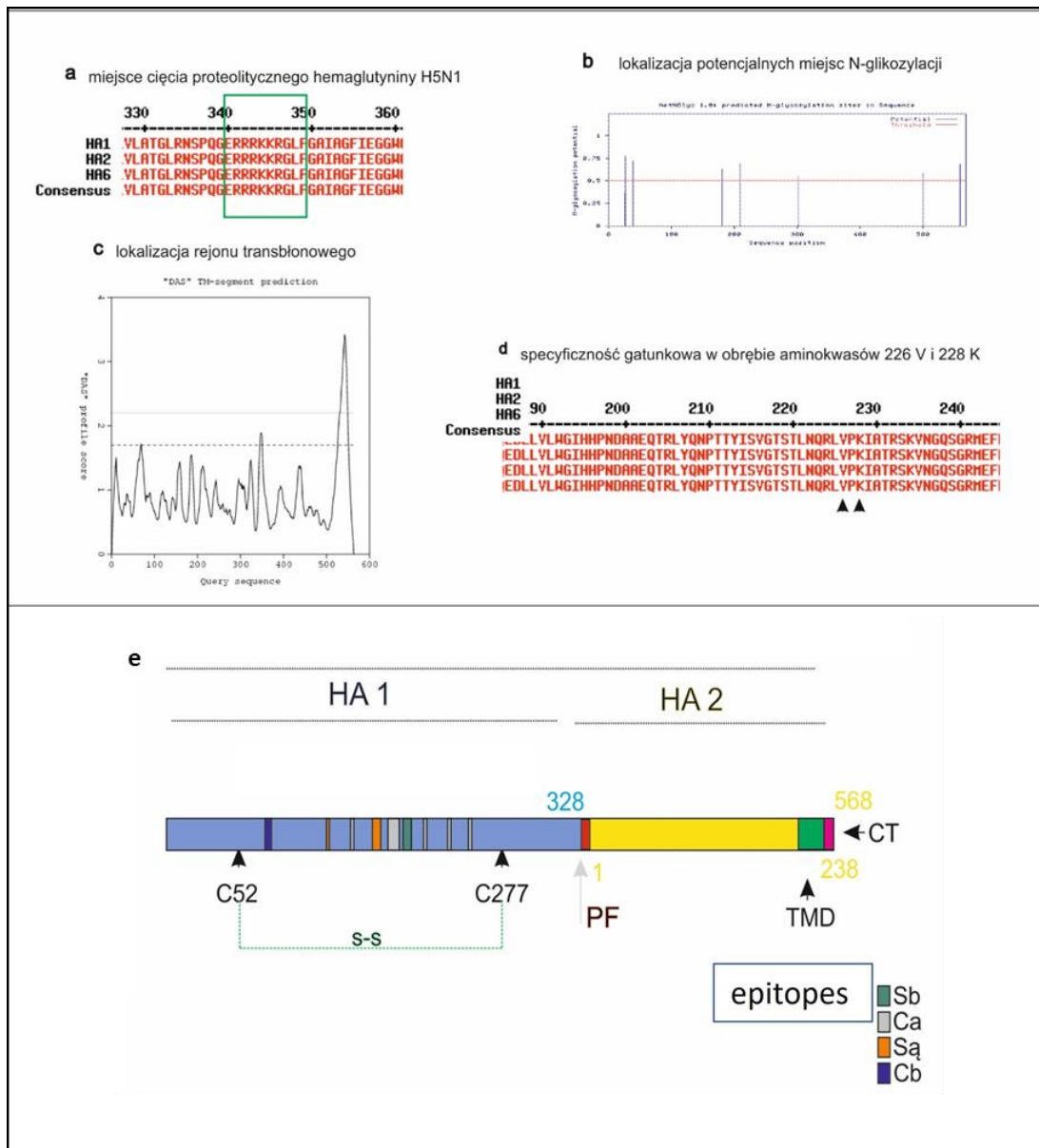
7. Wyniki

7.1. Pierwszy model badawczy - oślonkowe cząstki wirusopodobne wirusa grypy typu A

7.1.1. Amplifikacja i charakterystyka genów kodujących białka HA, NA, M1 krajowego izolatu wirusa grypy typu A H5N1

Pierwszym modelem badawczym był wysocepatogenny szczep H5N1 wirusa grypy typu A. W 2006 roku podczas epidemii wirusa ptasiej grypy referencyjne laboratorium Państwowego Instytutu Weterynaryjnego w Puławach wyizolowało kilka szczepów w/w wysoce patogenego wirusa. Otrzymany od dr Krzysztofa Śmietanki RNA wirusowy stanowił podstawę do dalszych badań mających na celu charakterystykę tego zakaźnego czynnika chorobotwórczego.

W celu przepisania materiału genetycznego z RNA na cDNA wykonano reakcje odwrotnej transkrypcji z wykorzystaniem uniwersalnych sekwencji 7 nukleotydowych znajdujących się w obrębie rejonów niekodujących (UTR) genomu wirusa grypy. Uzyskano cDNA wszystkich 8 segmentów genomu wirusa grypy, które posłużyło następnie do amplifikacji poszczególnych genów kodujących strukturalne białka wirusa grypy typu H5N1: hemaglutyninę (HA), neuraminidazę (NA) oraz białko rdzenia M1. Jako pierwszy powielono gen kodujący główną glikoproteinę powierzchniową hemaglutyninę. Reakcję amplifikacji przeprowadzono z wykorzystaniem DNA polimerazy Maraton, która jest mieszanką polimerazy Pwo i Taq oraz termostabilnej UTPazy. Użycie tych polimeraz pozwoliło na syntezę bogatych w pary GC oraz długich fragmentów DNA kodujących wyżej wymienione geny. Zaprojektowano ponad 20 par zdegenerowanych starterów, które umożliwiły amplifikację segmentu 4 kodującego hemaglutyninę. Startery zaprojektowane w oparciu o sekwencję kodującą HA szczepów mongolskich ptasiej grypy typu H5N1 pozwoliły na amplifikację pełnej długości genu *ha* (Tab. 3.). Produkty reakcji PCR wklonowano następnie do DNA wektora pGEM-T Easy, który zawiera końce TTTT pozwalające na klonowanie DNA bezpośrednio po reakcji amplifikacji. Uzyskana sekwencja kodująca białko HA została zsekwencjonowana w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie. Uzyskane sekwencje porównano następnie za pomocą programu MultiAlign w celu ustalenia ewentualnych mutacji punktowych będących wynikiem błędnie wstawionych zasad podczas procesu amplifikacji lub/oraz ewentualnych rozbieżności będących efektem błędów wynikających z procesu samego sekwencjonowania. W wyniku porównania wyodrębniono sekwencję, o długości 1704 pz. Sekwencję aminokwasową HA uzyskano w wyniku procesu konwersji *in silico* z użyciem programu ExPasy Translate Tool, która kodowała białko długości 568 reszt aminokwasowych.



Rysunek 21. Analiza bioinformatyczna sekwencji aminokwasowej pełnej długości hemaglutyniny z polskiego izolatu H5N1 a) Analiza porównawcza sekwencji aminokwasowych rejonu cięcia proteolitycznego sekwencji poliargininowej w obrębie hemaglutyniny. Porównanie sekwencji wykonano z wykorzystaniem oprogramowania Geneious Prime przy użyciu algorytmu dopasowania Geneious. b) Analiza potencjalnych miejsc N-glikozylacji w obrębie sekwencji aminokwasowej białka hemaglutyniny. Analizę wykonano przy wykorzystaniu algorytmu NetGlyc 1.0 służącego do określania prawdopodobnych miejsc N-glikozylacji. c) Analiza rejonów hydrofobowych i rejonu transbłonowego w obrębie sekwencji aminokwasowej białka HA. Analizę wykonano przy wykorzystaniu algorytmu TopPred służącego do określania i wyznaczania rejonów hydrofobowych. d) Analiza porównawcza w rejonie odpowiadającym za specyficzność gatunkową w obrębie głowy hemaglutyniny. Porównanie sekwencji wykonano z wykorzystaniem oprogramowania Geneious Prime przy użyciu algorytmu dopasowania Geneious. e) schemat budowy białka hemaglutyniny; HA1 – domena pierwsza HA zawierająca główne determinanty antygenowe (epitopy); HA2 – domena druga HA zawierająca rejon transbłonowy, ogonek cytoplazmatyczny oraz rejon nóżki HA; S-S – mostek dwusiarczkowy stabilizujący strukturę hemaglutyniny; C52, C277 – cysteiny w pozycji 52 i 277; PF – peptyd fuzyjny; TMD – rejon transbłonowy; CT – ogonek cytoplazmatyczny; HA1 - A/swan/Poland 305-135V08-2006 ; HA2 – A/Cygnus/ Astrakhan/AST 05-2-1/2005(H5N1); HA6 – A/Great Black-Headed Gull/Quinghai/2/05 (H5N1)

Analiza porównawcza BLAST potwierdziła, iż uzyskana sekwencja obejmuje gen kodujący hemaglutyninę serotypu H5 wirusa ptasiej grypy A/H5N1. W wyniku analiz *in silico* (Rys. 21.). Określono lokalizację regionu transbłonowego w obrębie sekwencji aminokwasowej hemaglutyniny, która obejmuje reszty aminokwasów 533-555. Pierwszych 16 reszt aminokwasowych dotyczy sekwencji sygnałowej kierującej niedojrzałe białko do wnętrza retikulum endoplazmatycznego. „Ogonek” cytoplazmatyczny tworzony jest przez reszty aminokwasowe od 556 do 568, a całe białko wykazuje lokalizację zewnątrzkomórkową. Dodatkowo ustalono prawdopodobną ilość miejsc N-glikozylacji (Rys. 21.b). W wyniku porównania różnych izolatów podtypu H5N1 wykazano, iż izolat polski jest najbliższym spokrewnionym z izolatem rosyjskim Astrakhan i należy do kładu 2.2.2 II. Analiza miejsca cięcia proteolitycznego wykazała obecność sekwencji poliargininowej, co potwierdza, iż jest to szczep wysocepatogenny (HPAI). Dodatkowo obecność reszt aminokwasowych w pozycji 238 (Q) i 240 (G) wskazuje na preferencyjne wiązanie z kwasem sialowym połączonym wiązaniem α 2-3, co jest charakterystyczne dla szczepów ptasich. Analogiczne analizy wykonano dla sekwencji aminokwasowych kodujących białka NA i M1.

Ze względu na wysoką wydajność produkcji białek oraz obecność enzymów niezbędnych do przeprowadzenia modyfikacji potranslacyjnych, takich jak glikozylacja, postanowiono produkować strukturalne białka wirusa grypy w komórkach owadzych używając do tego celu systemu bakulowirusowego. Kolejne etapy pracy polegały na ekspresji genów kodujących główne białka strukturalne polskiego izolatu wirusa grypy ptasiej H5N1 w celu uzyskania niezbędnych narzędzi do dalszych prac w postaci antygenów i surowic. Uzyskane narzędzia posłużyły do konstrukcji różnych form cząstek wirusopodobnych.

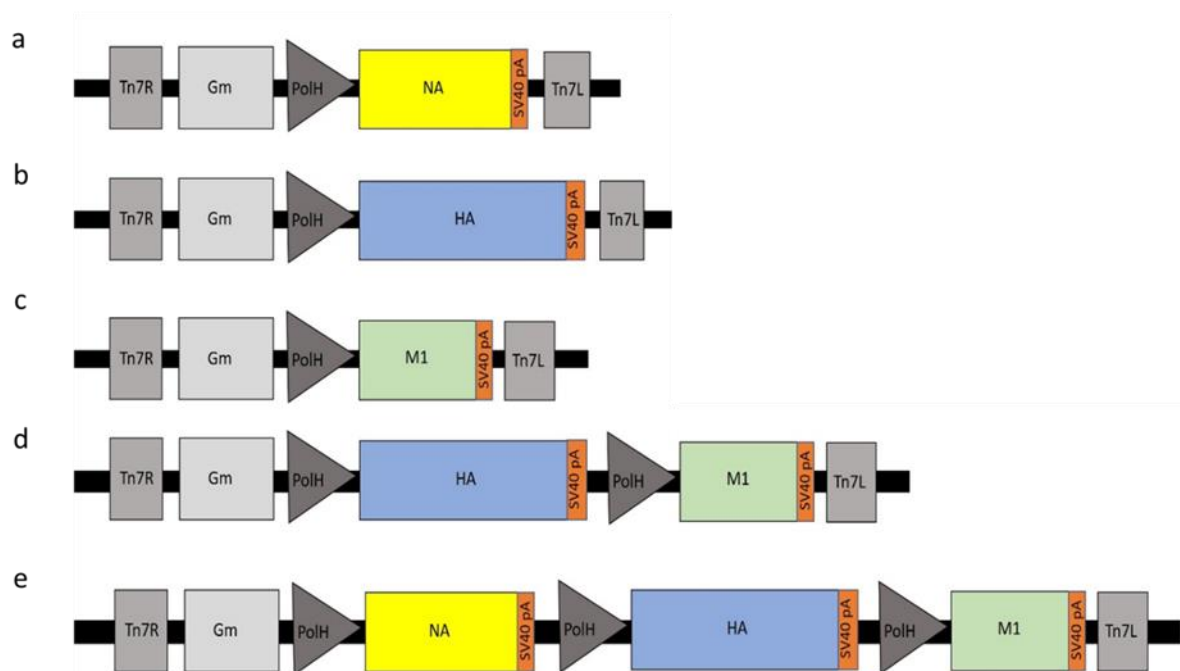
7.1.2. Cząstki wirusopodobne grypy szczepu H5N1

W celu konstrukcji i charakterystyki cząstek wirusopodobnych opracowano procedurę produkcji i oczyszczania VLPs wirusa ptasiej grypy polskiego izolatu H5N1. Konstrukty bakulowirusowe zawierające sekwencje kodujące białka HA, NA oraz M1 stanowiły konstrukty monocistronowe, co oznacza, iż każdy plazmid transferowy zawierał jeden gen kodujący strukturalne białko wirusa grypy. Podczas optymalizacji procesu produkcji zauważono, iż VLPs H5N1 tworzą się wydajniej w wyniku ko-ekspresji niż w wyniku ko-infekcji komórek owadzych. W pierwszym etapie prac postanowiono skonstruować plazmidy transferowe pFastBac1 zawierające więcej niż jeden gen pod kontrolą promotora polihedryny zgodnie z opisem Gromadzka i wsp. 2022 (154). Następnie w wyniku rekombinacji miejscowo-specyficznej otrzymano rekombinowane DNA bakmidowe BAC^{HA/M1 H5N1}, BAC^{HA/NA/M1 H5N1}, które posłużyły do uzyskania lizatów bakulowirusowych (Rys. 22.). Po zmiareczkowaniu poszczególnych lizatów bakulowirusowych wykonano zakażenie komórek owadzych w celu produkcji cząsteczek wirusopodobnych wirusa grypy typu H5N1.

7.1.2.1. Optymalizacja metodologii - oczyszczanie wirusa grypy

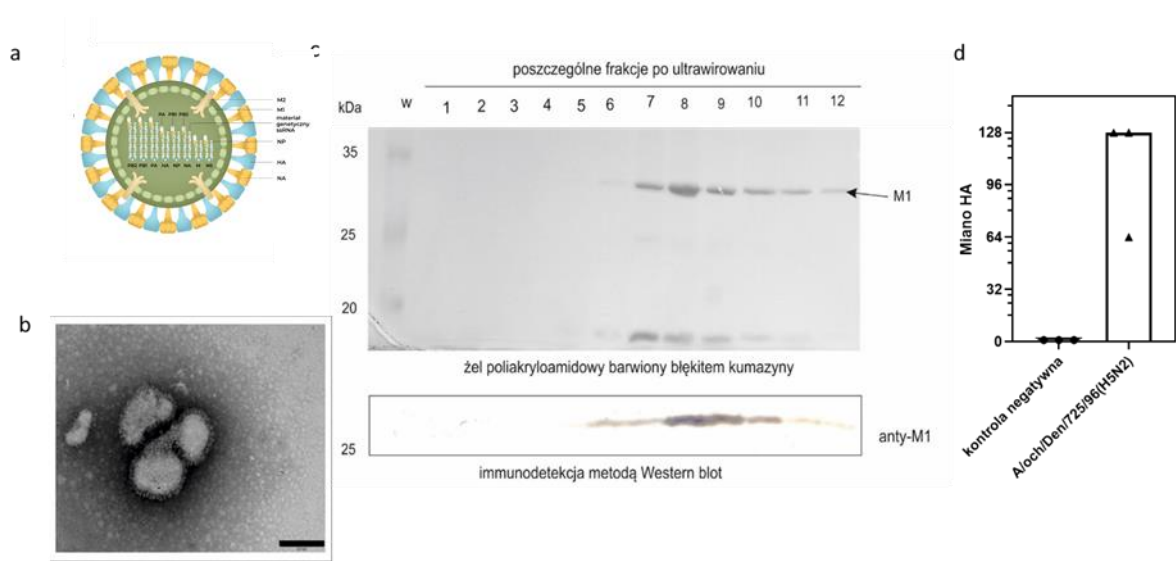
Optymalizację metodologii oczyszczania cząstek wirusopodobnych wirusa grypy typu A, rozpoczęto od oczyszczenia oraz uwidocznienia cząstek wirusa grypy referencyjnego szczepu H5N2. Wirus grypy ptasiej H5N2 został namnożony przez doktorantkę w referencyjnym laboratorium w zarodkach kurzych podczas pobytu w Państwowym Instytucie Weterynarii w Puławach w Zakładzie Chorób Drobiu, a następnie wykorzystany do optymalizacji technik oczyszczania oraz

mikroskopii elektronowej. Płyn omocniowo-owodniowy zawierający wirusa ptasiej grypy nałożono na gradient skokowy sacharozowy, a następnie ultrawirovano. Wykonano rozdział poszczególnych frakcji po ultrawirowaniu w żelu poliakrylamidowym 12% w warunkach redukujących, a następnie żel barwiono błękitem kumazyny.



Rysunek 22. **Schemat kaset ekspresyjnych wprowadzanych do bakmidowych wektorów transferowych.** Schematyczne rysunki przedstawiające kasety mono-, bi- i tricistronowe wprowadzane na wektorach transferowych pFastBac1. Gromadzka i wsp. 2022. a) monocistronowa kasetka zawierająca gen kodujący neuraminidazę pod kontrolą promotora polihedryny b) monocistronowa kasetka zawierająca gen kodujący hemaglutyninę pod kontrolą promotora polihedryny c) monocistronowa kasetka zawierająca gen kodujący białko rdzenia M1 pod kontrolą promotora polihedryny d) bicistronowa kasetka zawierająca geny kodujące białko hemaglutyniny i białko rdzenia w jednej orientacji pod kontrolą promotorów polihedryny e) tricistronowa kasetka zawierająca geny kodujące białko neuraminidazy, hemaglutyniny i białko rdzenia w jednej orientacji pod kontrolą promotorów polihedryny; Tn7R, Tn7L – sekwencje bakteryjnego transpozonu Tn7 (mini-att Tn7); PolH – późny promotor polihedryny; Gm – gen oporności na gentamycynę; SV40pA – Sygnał poliadenylacji z wirusa małpiego 40; HA – gen kodujący hemaglutyninę; NA – gen kodujący neuraminidazę; M1 – gen kodujący białko rdzenia wirusa grypy.

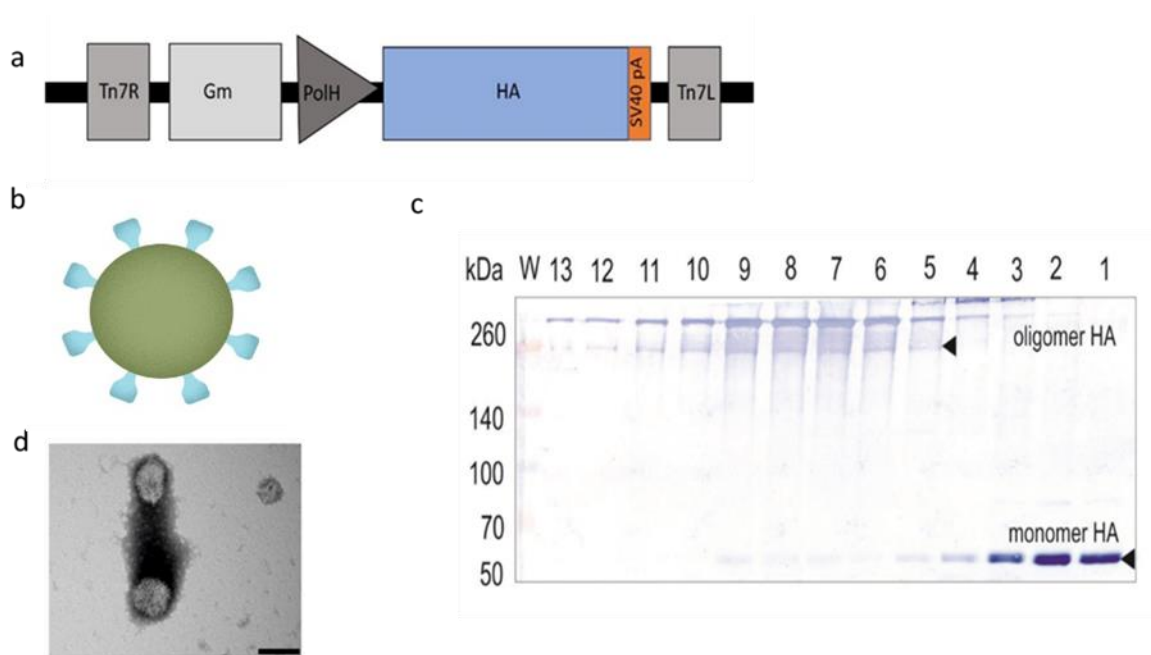
Rysunek 23 przedstawia cząstki wirusa grypy H5N2 obecne we frakcji 7, 8, 9 oraz 10. Największe stężenie cząstek wirusowych można zaobserwować we frakcji 8, w której ilość białka rdzenia M1 była podwyższona. Przeprowadzono immunodetekcję białek przy zastosowaniu techniki Western Blotting z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych anti-M1 (Rys. 23b.) oraz referencyjnej surowicy kurzej anti-H5N2. Wyniki potwierdziły, iż białka wybarwione błękitem kumazyny to między innymi M1 oraz HA (wynik nieprzedstawiony). W kolejnym etapie oczyszczony wirus H5N2 z frakcji 8 posłużył do optymalizacji techniki barwienia negatywowego w mikroskopii elektronowej. Przetestowano różne rodzaje siatek oraz różne rodzaje barwników. W przypadku cząstek wirusa grypy najlepsze wyniki uzyskano stosując miedziane siatki napyłane węglem. Oczyszczone cząstki wirusowe zagęszczono poprzez ultrawirowanie i rozpuszczono w buforze NTA. Cząstki mieszano w stosunku objętościowym ¼ z buforem TM i inkubowano przez noc z 2% aldehydem glutarowym. Barwienie negatywowe wykonywano z użyciem 2% kwasu fosfowolfrامowego.



Rysunek 23. Wynik oczyszczania i charakterystyka wirusa grypy typu A. a) Schemat cząstki wirusa grypy typu A. Kolory: żółty - białko neuraminidazy, pomarańczowy - białko M2, niebieski białko hemaglutyniny, zielony białko rdzenia M1, granatowy - osłonka lipidowa, wewnątrz materiał genetyczny wirusa w postaci segmentowanego RNA. b) Wirus grypy typu A H5N2 oczyszczony z płynu omocznioowo-owodniowego w gradiencie cukrowym, rozpuszczony w buforze NTE, a następnie naniesiony na siatkę miedzianą napylaną węglem. Preparat barwiono negatywnowo 2% kwasem fosfowolfrامowym. Powiększenie 39 000 x. c) Oczyszczanie wirusa grypy typu A H5N2 w gradiencie cukrowym; Płyn omocznioowo-owodniowy zawierający wirusa grypy typu H5N2 nałożono na skokowy gradient sacharozowy i ultrawirovano w 4°C przez 16 godzin (82 000 x g). Zebrano poszczególne frakcje i rozdzielono w żelu poliakrylamidowym w warunkach redukujących, następnie barwiono błękitem kumazyny oraz wykonano immunodetekcję metodą Western Blotting przy użyciu przeciwciał monoklonalnych anty-M1; d) Analiza aktywności hemaglutyniny oczyszczonego wirusa H5N2 testem HA. Określono miano HA dla oczyszczonych cząstek wirusa H5N2 w teście hemaglutynacji, kontrolę negatywną stanowiły frakcja 2 po oczyszczeniu w gradiencie gęstości cukru.; kDa – wzorzec białkowy (Life Technologies, USA); A/och/Den/725/96 (H5N2) – szczep wirusa ptasiej grypy użyty do optymalizacji metodologii oczyszczania w gradiencie gęstości cukru oraz optymalizacji preparatyki w celu wizualizacji techniką mikroskopii elektronowej.

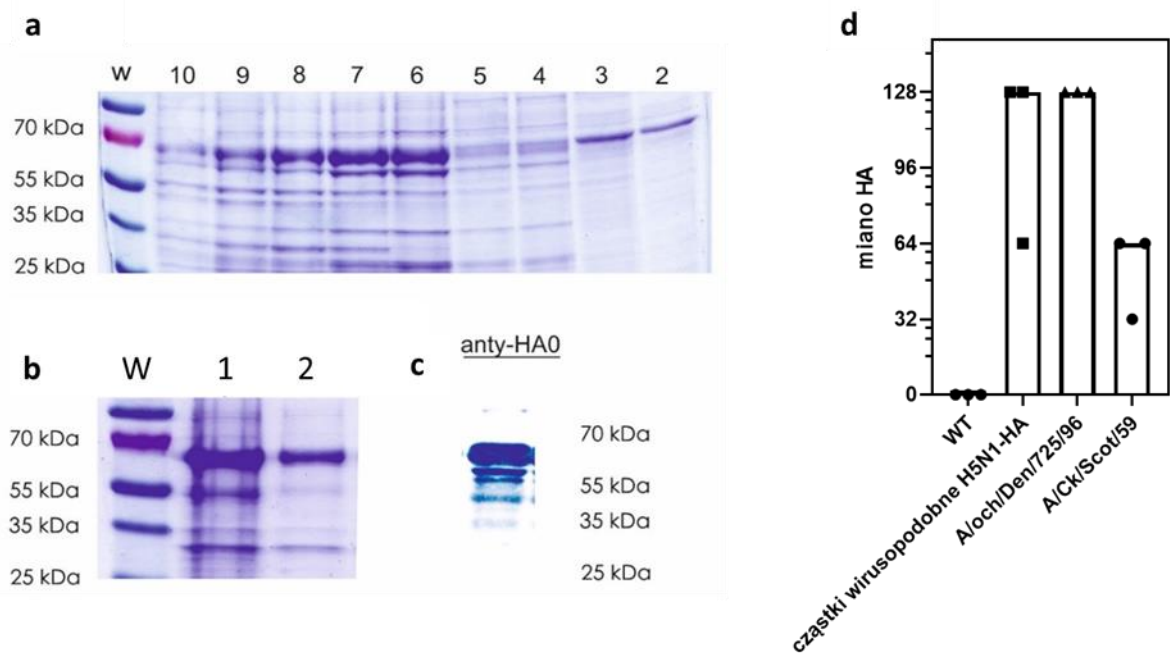
7.1.2.2. Produkcja i oczyszczanie cząstek wirusopodobnych zawierających na swojej powierzchni glikoproteinę HA (H5N1-HA VLPs)

Konstrukty bakulowirusowe zawierające sekwencje kodujące białka HA, NA oraz M1 stanowiły konstrukty monocistronowe, co oznacza iż każdy plazmid transferowy zawierał jeden gen kodujący strukturalne białko wirusa grypy. Procedura klonowania przedstawiona została w pkt 6.3.2 w sekcji Metody. Sekwencja kodująca białko HA została wklonowana do plazmidu transferowego pFastBac1 przy użyciu enzymów BamHI i SpeI. Następnie uzyskano rekombinowane DNA bakmidowe i wykonano transfekcję komórek owadzych. W celu określenia czy w wyniku ekspresji genu kodującego glikoproteinę HA powstawać będą zewnątrzkomórkowe pęcherzyki zawierające na swojej powierzchni hemaglutyninę wykonano zakażenie komórek owadzych lizatem bakulowirusowym BAC^{HA}H5N1. Po 60 godzinach wykonano cykl ultrawirowań i zebrano poszczególne frakcje gradientu. Frakcje te analizowano następnie w żelu poliakrylamidowym gradientowym 4-16%. Żel poliakrylamidowy barwiono błękitem kumazyny. Immunodetekcja białka HA w żelu poliakrylamidowym w warunkach redukujących oraz nieredukujących z wykorzystaniem przeciwciał anty-HA0 wykazała obecność hemaglutyniny w różnych frakcjach. Frakcje 7, 8 i 9, które odpowiadały sacharozie o stężeniu ok. 30% zawierały białka HA, co może wskazywać na obecność cząstek H5N1-HA VLPs (Rys. 24.).



Rysunek 24. Wynik oczyszczania i charakterystyka cząstek wirusopodobnych wirusa grypy H5N1-HA. a) Schemat kasety monocistronowej zawierającej gen kodujący białko hemaglutyniny pod kontrolą promotorów polihedryny; Tn7R, Tn7L – sekwencje bakteryjnego transpozonu Tn7 (mini-att Tn7); PolH – późny promotor polihedryny; Gm – gen oporności na gentamycynę; SV40pA – sygnał poliadenylacji z wirusa małpiego 40; HA – gen kodujący hemaglutyninę; M1 – gen kodujący białko rdzenia wirusa grypy. b) Schemat cząstki wirusopodobnej wirusa grypy typu A H5N1-HA, kolory: niebieski - białko hemaglutyniny, granatowy - osłonka lipidowa. c) Cząstki wirusopodobne wirusa grypy typu A H5N1-HA oczyszczone na gradiencie cukrowym. Preparat barwiono negatywnie 2% kwasem fosfowolframowym, skala 100 nm. d) Immunodetekcja H5N1-HA VLPs w gradiencie gęstości sacharozowy przy użyciu techniki Western Blotting w warunkach nieredukujących. Zagęszczone cząstki wirusopodobne wirusa grypy typu H5N1 nałożono na skokowy gradient sacharozowy i ultrawirowano w 4°C przez 16 godzin (82 000 x g). Zebrano poszczególne frakcje (1-13) i rozdzielono w żelu poliakrylamidowym w warunkach nieredukujących, a następnie wykonano immunodetekcję metodą Western Blotting przy użyciu przeciwciał anti-HA0; W – wzorzec masowy to PageRuler Pre-Stained Protein Ladder (10 - 170 kDa) (LifeTechnologies, USA)

W celu zbadania czy obecność białka HA w poszczególnych frakcjach oznacza obecność nanostruktur typu VLPs wykonano barwienie negatywowe przy użyciu 2% kwasu fosfowolframowego, a następnie preparaty oglądano w mikroskopie elektronowym (Rys. 24d). Zaobserwowano obecność struktur o wielkości ok. 100 nm, które swoją morfologią przypominały cząstki wirusa grypy. Na podstawie analizy densytometrycznej obliczono efektywność procesu produkcji i oczyszczania H5N1-HA VLPs. Z 50 ml hodowli co stanowiło $1,4 \times 10^8$ komórek owadzych uzyskano 62,5 μg HA zawartych w cząstkach subwirusowych co w skali 1 litra daje ok. 1,2 mg. Antygeny H5N1-HA VLPs zostały poporcjowane i zamrożone z dodatkiem glicerolu 1% w -80°C . Dodatkowo określono właściwości hemaglutynacyjne uzyskanych cząstek wirusopodobnych, które korelowały z wynikami uzyskanymi dla natywnych cząstek wirusowych (Rys.25)

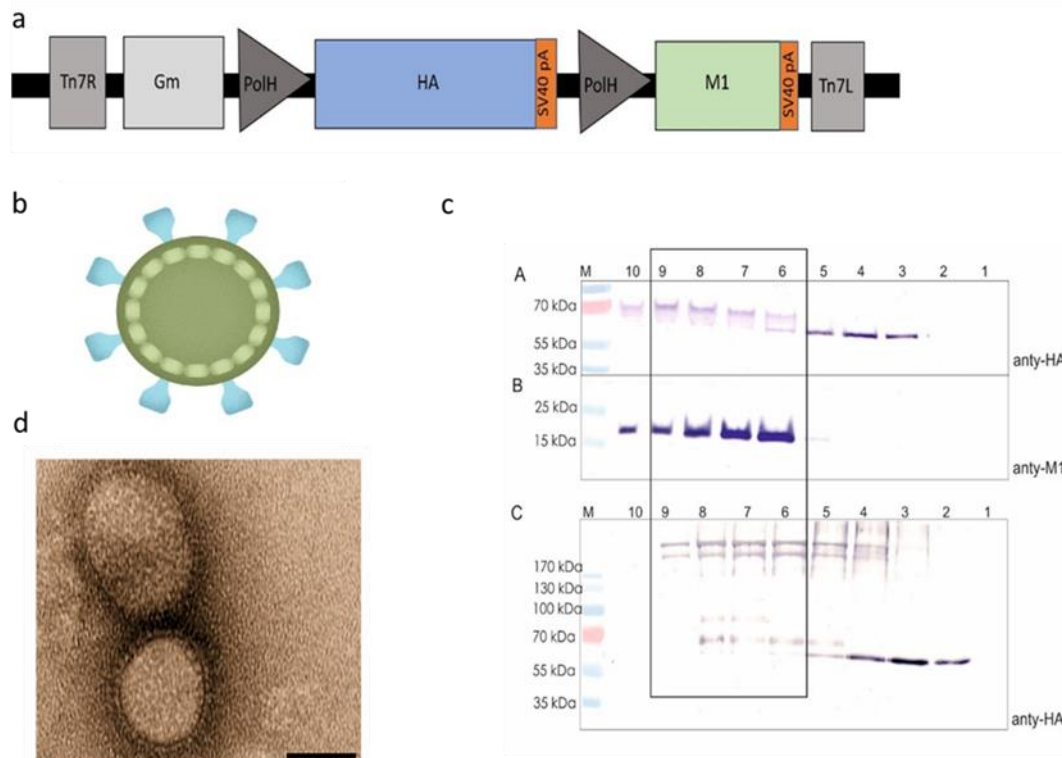


Rysunek 25. Wynik produkcji i charakterystyka cząstek wirusopodobnych wirusa grypy H5N1-HA do szczepień. a) Cząstki wirusopodobne H5N1-HA VLPs produkowane w komórkach owadzych naniesione na skokowy gradient sacharozy (20-60%) i ultrawiirowane. Poszczególne frakcje zebrane z gradientu poddano rozdzielowi w żelu poliakrylamidowym gradientowym, następnie barwiono błękitem kumazyny. W – wzorzec masowy to PageRuler Pre-Stained Protein Ladder (10 - 170 kDa) (LifeTechnologies, USA); 2-10 poszczególne frakcje zebrane z gradientu. b) Zagęszczone cząstki wirusopodobne H5N1-HA. Wybrane frakcje połączono i zagęszczono przy użyciu ultrawiirowania; W – wzorzec masowy to PageRuler Pre-Stained Protein Ladder (10 - 170 kDa) (LifeTechnologies, USA); 1 – zagęszczone i częściowo oczyszczone cząstki wirusopodobne H5N1-HA; 2 – cząstki wirusopodobne H5N1-HA doczyszczone poprzez trzykrotne ultrawiirowanie. c) Immunodetekcja białka HA metodą Western Blotting przy użyciu przeciwciał anty-HA0; masa molekularna hemaglutyniny ok 70 kDa. d) Analiza aktywności hemaglutyniny w oczyszczonych cząstkach wirusopodobnych wirusa grypy H5N1-HA testem HA. Określono miano HA dla oczyszczonych cząstek wirusopodobnych H5N1-HA w teście hemaglutynacji, kontrolę negatywną stanowiła pożywka znad zakażonych dzikim bakulowirusem komórek owadzych (WT); kontrolę pozytywną stanowił oczyszczony wirus grypy A/och/Den/725/96 (H5N2) oraz inaktywowany wirus A/Ck/Scot/59 (H5N1) (Animal Health and Veterinary Laboratories).

7.1.2.3. Produkcja i oczyszczanie cząsteczek wirusopodobnych zawierających glikoproteinę HA oraz białko rdzenia M1 (H5N1-HA/M1 VLPs)

W celu określenia z jaką wydajnością będą się tworzyć cząstki wirusopodobne zawierające białko rdzenia M1 oraz glikoproteinę HA postanowiono skonstruować bicystronowy plazmid transferowy niosący oba wyżej wymienione geny. Skonstruowano plazmid transferowy „podwójny” niosący w tej samej orientacji gen hemaglutyniny pod promotorem poliهدryny, a następnie gen białka rdzenia M1 pod kolejnym promotorem poliهدryny. Uzyskany we wcześniejszym etapie pracy monocystronowy plazmid pFastBac HA trawiono enzymami HpaI oraz SnaBI w celu wycięcia kasety kodującej zarówno promotor poliهدryny, gen hemaglutyniny oraz sekwencję sygnałową dla ogona poli A. Następnie plazmid pFastBac M1 trawiono enzymem HpaI. Przeprowadzono ligację uzyskanego fragmentu DNA z liniowym plazmidem pFastBacM1 (Rys. 26). Uzyskany bicystronowy plazmid transferowy posłużył do uzyskania DNA bakmidowego, a następnie

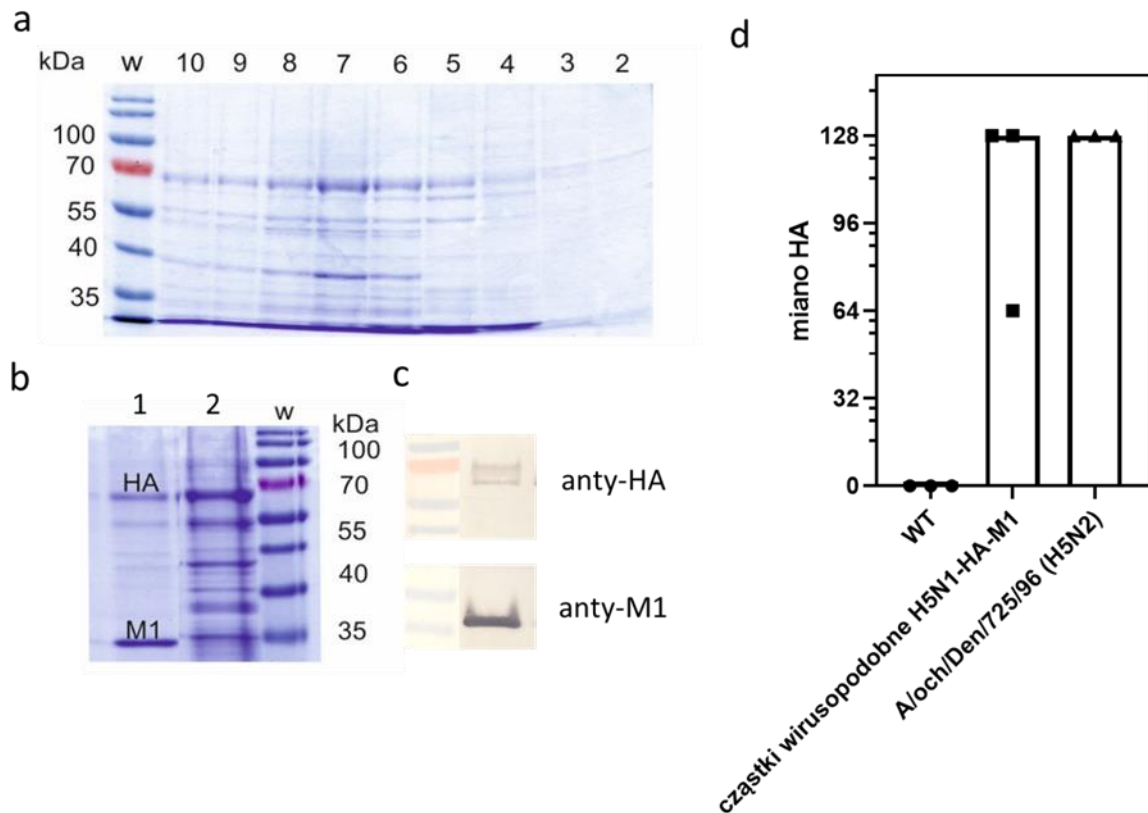
rekombinowanych lizatów bakulowirusowych. W celu określenia, czy w wyniku ekspresji genów kodujących białko rdzenia oraz glikoproteinę HA powstawać będą zewnątrzkomórkowe pęcherzyki w formie cząstek wirusopodobnych, wykonano zakażenie komórek owadzych lizatem bakulowirusowym BAC^{HA/M1H5N1}. Po 60 godzinach wykonano cykl ultrawirowań i zebrano frakcje gradientu. Frakcje te analizowano następnie na żelu poliakrylamidowym gradientowym 4-16%. Immunodetekcja białka M1 oraz glikoproteiny HA (Rys. 26.) rozdzielonych w żelu poliakrylamidowym w warunkach redukujących oraz nieredukujących z wykorzystaniem przeciwciał anty-M1 oraz anty-HA0 potwierdziła obecność tych białek w we frakcjach 6, 7 i 8, co odpowiadało ok. 30% stężenia sacharozy.



Rysunek 26. Wynik oczyszczania i charakterystyka cząstek wirusopodobnych wirusa grypy H5N1-HA/M1. a) Schemat kasety bicistronowej zawierającej geny kodujące białko hemaglutyniny i białko rdzenia w jednej orientacji pod kontrolą promotorów polihedryny; Tn7R, Tn7L – sekwencje bakteryjnego transpozonu Tn7 (mini-att Tn7); PolH – późny promotor polihedryny; Gm – gen oporności na gentamycynę; SV40pA – Sygnał poliadenylacji z wirusa małpiego 40; HA – gen kodujący hemaglutyninę; M1 – gen kodujący białko rdzenia wirusa grypy. b) Schemat cząstki wirusopodobnej wirusa grypy typu A H5N1-HA/M1, kolory: niebieski - białko hemaglutyniny, granatowy - osłonka lipidowa, zielony - białko rdzenia M1. c) Immunodetekcja H5N1-HA/M1 w gradiencie cukrowym przy użyciu metody Western Blotting. Zagęszczone cząstki wirusopodobne wirusa grypy typu H5N1-HA/M1 nałożono na skokowy gradient sacharozowy i ultrawirowano w 4°C przez 16 godzin (82 000 x g). Zebrano poszczególne frakcje (1-10) i rozdzielono w żelu poliakrylamidowym w warunkach redukujących, a następnie wykonano immunodetekcję A) przy użyciu przeciwciał anty-HA0; B) przy użyciu przeciwciał anty-M1; C) immunodetekcja rozdzielonych w żelu poliakrylamidowym w warunkach nieredukujących VLPs przy użyciu surowicy anty-HA0; M – wzorzec masowy to PageRuler Pre-Stained Protein Ladder (10 - 170 kDa). d) Transmisyjna mikroskopia elektronowa cząstek wirusopodobnych wirusa grypy typu A H5N1-HA/M1 oczyszczonych w gradiencie cukrowym. Preparat barwiono negatywowo 2% kwasem fosfowolfranowym. Skala – 100nm.

Obecność cząsteczek wirusopodobnych uwidoczniono przy użyciu transmisyjnej mikroskopii elektronowej. W tym celu wybraną frakcję (7) wybarwiano negatywowo 2% kwasem fosfowolfranowym. Widoczne w obrazie cząstki wirusopodobne miały wielkość ok. 100 nm oraz

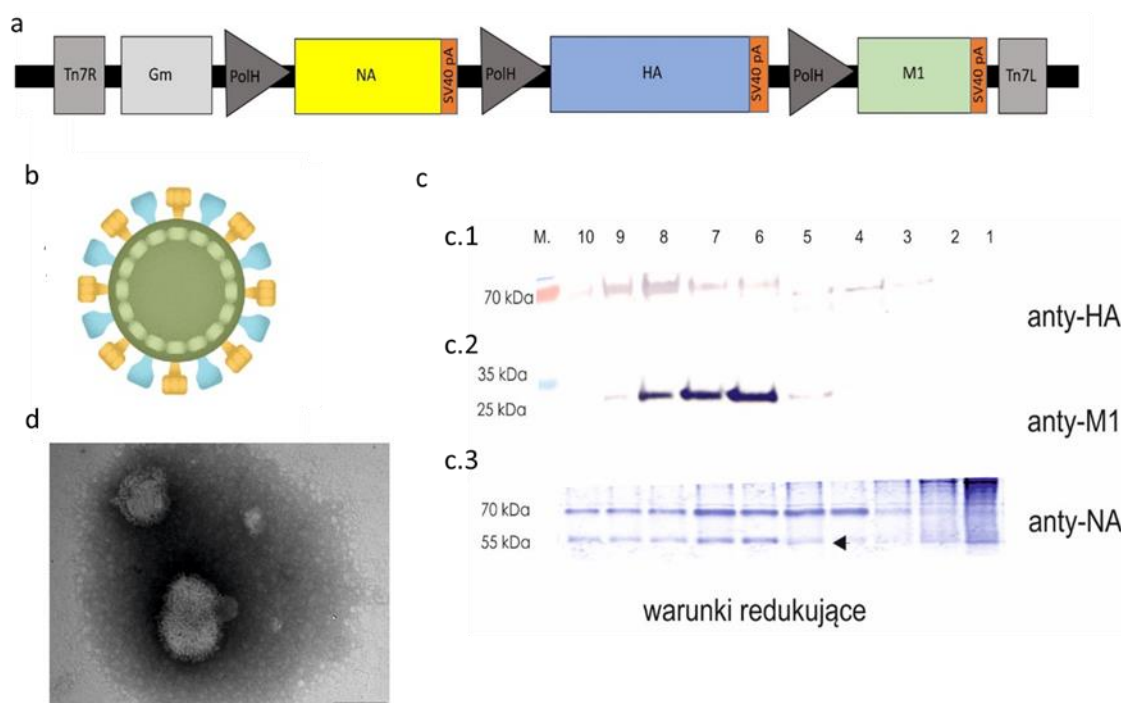
posiadały charakterystyczną strukturę wirusa grypy (Rys. 26). Obecność homotrimeru hemaglutyniny na powierzchni VLPs potwierdzono za pomocą testu hemaglutynacji. Na podstawie analizy densytometrycznej obliczono efektywność procesu produkcji i oczyszczania H5N1-HA/M1 VLPs. Z 50 ml hodowli ($1,4 \times 10^8$ komórek owadzych) uzyskano ok. 35 μg HA zawartych w cząstkach wirusopodobnych, co w skali 1 litra daje ok. 700 μg HA (Rys. 27.).



Rysunek 27. Wynik produkcji i charakterystyka cząstek wirusopodobnych wirusa grypy H5N1-HA/M1 VLPs do szczepień. a) Cząstki wirusopodobne H5N1-HA/M1 VLPs produkowane w komórkach owadzych naniesione na skokowy gradient sacharozy (20-60%) i ultrawiirowane. Poszczególne frakcje zebrane z gradientu poddano rozdzielowi w żelu poliakrylamidowym gradientowym, następnie barwiono błękitem kumazyny. W – wzorzec masowy to PageRuler Pre-Stained Protein Ladder (10 - 170 kDa) (LifeTechnologies, USA); 2-10 poszczególne frakcje zebrane z gradientu. b) Zagęszczone cząstki wirusopodobne H5N1-HA/M1 VLPs. Wybrane frakcje połączono i zagęszczono przy użyciu ultrawiirowania; W – wzorzec masowy to PageRuler Pre-Stained Protein Ladder (10 - 170 kDa) (LifeTechnologies, USA); 1 – zagęzczony i częściowo oczyszczony cząstki wirusopodobne H5N1-HA; 2 – cząstki wirusopodobne H5N1-HA doczyszczony przez trzykrotne ultrawiirowanie. c) Immunodetekcja białka HA przy użyciu przeciwciał anty-HA0 oraz białka M1 przy użyciu przeciwciał anty-M1 metodą Western Blotting; masa molekularna hemaglutyniny ok. 70 kDa; masa molekularna M1 to ok. 30 kDa. d) Analiza aktywności hemaglutyniny w oczyszczonych cząstkach wirusopodobnych wirusa grypy H5N1-HA/M1 VLPs testem HA. Określono miano HA dla oczyszczonych cząstek wirusopodobnych H5N1-HA VLPs w teście hemaglutynacji, kontrolę negatywną stanowiła pożywka z nad zakażonych dzikim bakulowirusem komórek owadzych (WT); kontrolę pozytywną stanowił oczyszczony wirus grypy A/och/Den/725/96 (H5N2). Każda kropka reprezentuje miano HA uzyskane w każdym eksperymencie. Słupki przedstawiają mediany uzyskanych mian HA.

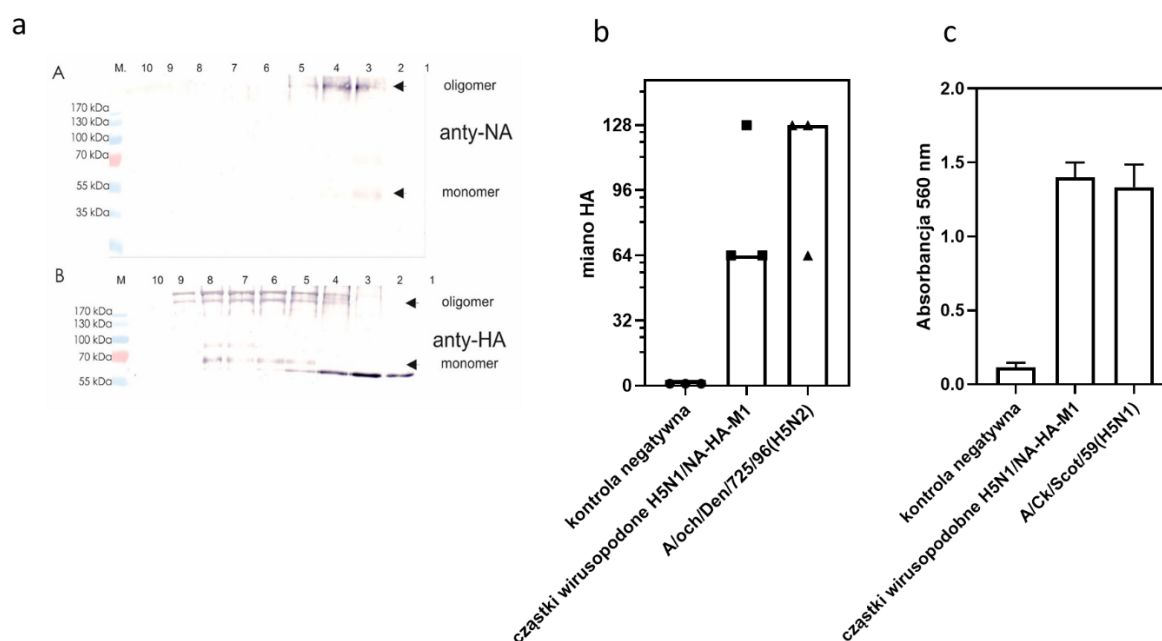
7.1.2.4 Produkcja i oczyszczanie cząsteczek wirusopodobnych zawierających glikoproteiny HA, NA oraz białko rdzenia M1 (H5N1-HA/NA/M1 VLPs)

W celu określenia jak efektywnie tworzyć się będą cząstki wirusopodobne zawierające białko rdzenia M1 oraz glikoproteiny HA i NA postanowiono skonstruować plazmid transferowy niosący wszystkie trzy wymienione geny (Rys. 28.). Uzyskany podczas pracy plazmid pFastBac HA/M1 trawiono enzymami AvrII oraz SnaBI w celu wycięcia kasety kodującej zarówno promotor poliheдрыny, gen hemaglutyniny oraz sekwencję sygnałową dla ogona poliA oraz gen białka rdzenia pod promotorem poliheдрыny. Następnie plazmid pFastBac NA trawiono enzymami HpaI i AvrII. Przeprowadzono ligację uzyskanego fragmentu DNA z liniowym plazmidem pFastBacNA. Uzyskany „potrójny” plazmid transferowy posłużył do uzyskania DNA bakmidowego oraz lizatów bakulowirusowych.



Rysunek 28. Wynik oczyszczania i charakterystyka cząstek wirusopodobnych wirusa grypy H5N1-HA/NA/M1 VLPs. a) Schemat tricistronowej kasety zawierającej geny kodujące białko neuraminidazy, hemaglutyniny i białko rdzenia w jednej orientacji pod kontrolą promotorów poliheдрыny; Tn7R, Tn7L – sekwencje bakteryjnego transpozonu Tn7 (mini-att Tn7); PolH – późny promotor poliheдрыny; Gm – gen oporności na gentamycynę; SV40pA – sygnał poliadenylacji z wirusa małpiego 40; HA – gen kodujący hemaglutyninę; NA – gen kodujący neuraminidazę; M1 – gen kodujący białko rdzenia wirusa grypy. b) Schemat cząstki wirusopodobnej wirusa grypy typu A H5N1-NA/HA/M1 VLPs, kolory: niebieski - białko hemaglutyniny, granatowy - osłonka lipidowa, zielony - białko rdzenia M1, żółty - neuraminidaza. c) Immunodetekcja białek-HA/NA/M1 w gradiencie sacharozowym przy użyciu metody Western Blotting. Zagęszczone frakcje zawierające cząstki wirusopodobne wirusa grypy typu H5N1-NA/HA/M1 VLPa nalożono na skokowy gradient sacharozowy i ultrawirowano. Zebrano poszczególne frakcje (1-10) i rozdzielono w żelu poliakrylamidowym w warunkach redukujących, a następnie wykonano immunodetekcję c.A.) przy użyciu przeciwciał anti-HA0; c.B) przy użyciu przeciwciał anti-M1; c.C) przy użyciu przeciwciał anti-NA; 1-10 poszczególne frakcje zebrane po gradiencie sacharozowym; M – wzorzec masowy to PageRuler Pre-Stained Protein Ladder (10 - 170 kDa) Life Technologies. d) Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM) oczyszczonych H5N1-NA/HA/M1 VLPs. Preparat barwiono negatywowo 2% kwasem fosfowolfranowym. Skala - 100nm.

W celu określenia czy w wyniku ekspresji genów kodujących białko rdzenia oraz glikoprotein HA i NA powstawać będą cząstki wirusopodobne wykonano zgodnie z opisaną procedurą zakażenie komórek owadzych lizatem bakulowirusowym BAC^{HA/M1/NA} H5N1. Po 60 godzinach wykonano cykl ultrawirowań i zebrano poszczególne frakcje gradientu. Frakcje analizowano następnie w żelu poliakrylamidowym gradientowym 4-16%. Żel poliakrylamidowy barwiono błękitem kumazyny. Immunodetekcja białka M1 oraz glikoproteiny HA rozdzielonych w żelu poliakrylamidowym w warunkach redukujących oraz nieredukujących z wykorzystaniem przeciwciał anty-M1 oraz anty-HA0 potwierdziła obecność tych białek, co może sugerować obecność cząstek wirusopodobnych. Frakcje 4, 5 i 6, 7, które usytuowane były w gradiencie odpowiadającym stężeniu sacharozы ok. 30%, prawdopodobnie zawierają nanostruktury (Rys. 29.).



Rysunek 29. Charakterystyka cząstek wirusopodobnych wirusa grypy H5N1-HA/NA/M1 VLPs. a) Immunodetekcja białek-HA, NA w gradiencie sacharozowym przy użyciu metody Western Blotting w warunkach nieredukujących. Zagęszczone frakcje zawierające cząstki wirusopodobne wirusa grypy typu H5N1-NA/HA/M1 VLPs nałożono na skokowy gradient sacharozowy i ultrawirovano w 4°C przez 16 godzin. Zebrano poszczególne frakcje (1-10) i rozdzielono w żelu poliakrylamidowym w warunkach nieredukujących, a następnie wykonano immunodetekcję a.A) przy użyciu przeciwciał anty-NA; a.B) przy użyciu przeciwciał anty-HA; M – wzorec masowy to PageRuler Pre-Stained Protein Ladder (10 - 170 kDa) Life Technologies. b) Test hemaglutynacji. Jako kontrolę pozytywną zastosowano AIVA/ostrich/Denmark/725/96 (H5N2). Miano HA określono jako odwrotność najwyższego rozcieńczenia z aktywnością HA. Każda kropka reprezentuje miano HA uzyskane w każdym eksperymencie. Słupki przedstawiają mediany uzyskanych mian HA. c) Test aktywności neuraminidazy. Jako kontrolę pozytywną zastosowano AIV A/Ck/Scot/59 (H5N1). Dla każdego testu przedstawiono średnią wartość z trzech niezależnych przeprowadzonych eksperymentów. Średnie wartości A560 i odchylenia standardowe przedstawiono na osi y.

W celu potwierdzenia obecności cząsteczek wirusopodobnych wykonano barwienie negatywowe przy użyciu transmisyjnej mikroskopii elektronowej. Oczyszczone VLPs z frakcji 6 wybarwiono negatywno 2% kwasem fosfowolframowym. Widoczne w obrazie cząstki wirusopodobne miały wielkość ok. 100 nm oraz posiadały charakterystyczną strukturę wirusa grypy (Rys. 28.). W celu scharakteryzowania oczyszczonych VLPs grypy wykonano test hemaglutynacji

oraz test aktywności neuraminidazy (Rys. 29). Na podstawie analizy densytometrycznej obliczono efektywności procesu produkcji i oczyszczania H5N1-HA/M1/NA VLPs. Z 100 ml hodowli ($2,8 \times 10^8$ komórek owadzych) uzyskano ok. 60 μg HA zawartych w cząstkach wirusopodobnych co w skali 1 litra daje ok. 600 μg HA.

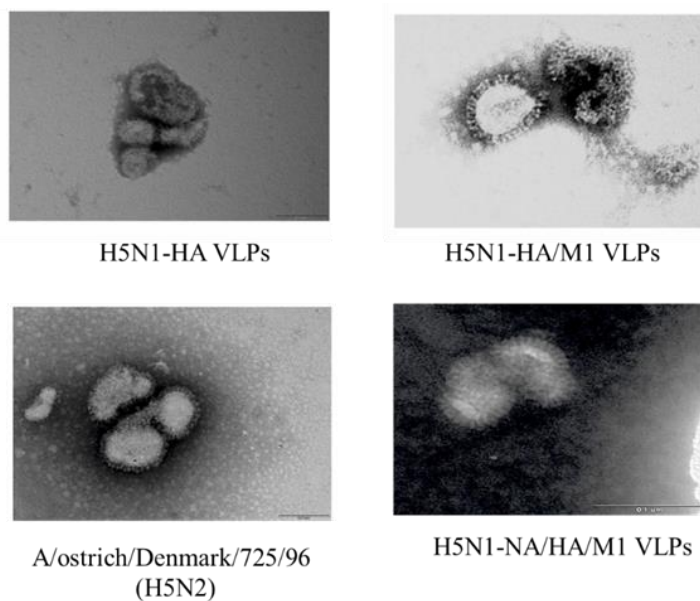
7.1.3. Badanie właściwości immunogennych otrzymanych VLPs

Możliwości wykorzystania cząstek wirusopodobnych polskiego izolatu wirusa grypy typu H5N1 jako potencjalnej szczepionki profilaktycznej zbadano *in vivo* na zwierzętach. Jako model badawczy wykorzystano kury brojlery, a szczepienia przeprowadzono w kurniku eksperymentalnym w Lewądzie Wielkim.

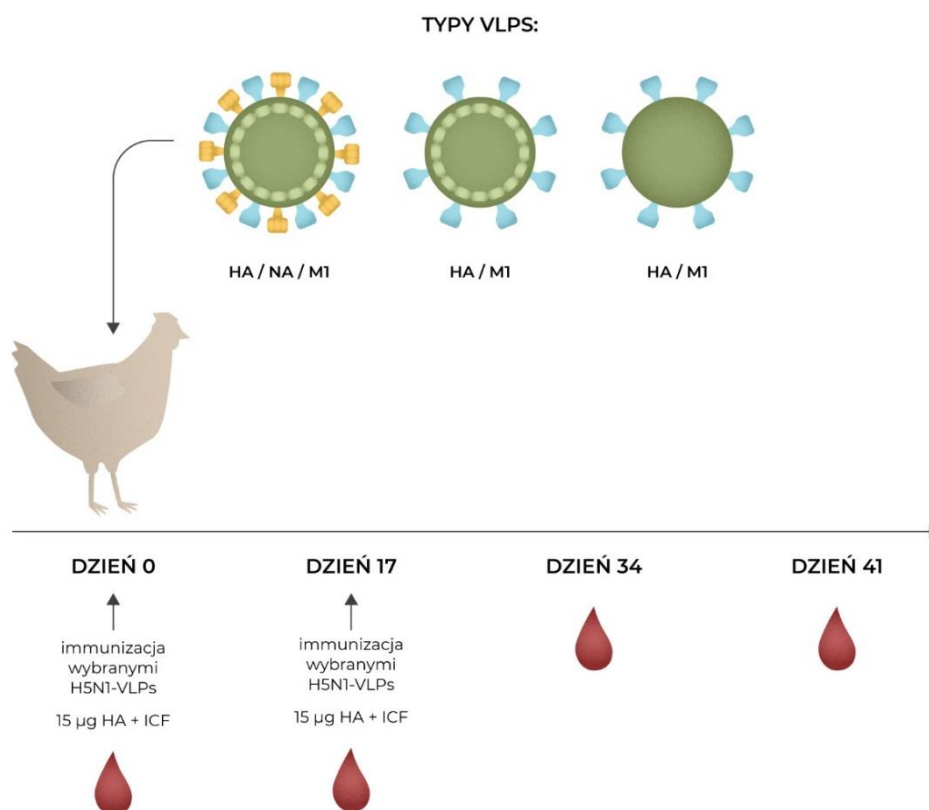
Kurom podawano preparat szczepionkowy w 22 dniu życia. Wybór ten pokierowany był dwoma czynnikami: wielkością pisklaka (prawie niemożliwe jest pobranie krwi od piskląt w wieku do 14 dni) oraz obecnością na wczesnym etapie życia przeciwciał matczynych kurzych, które mogą dawać fałszywie pozytywne wyniki, co potwierdzono w wyniku wcześniejszych rund szczepień. Kury, którym podana została eksperymentalna szczepionka, nie otrzymały wcześniej szczepień kontrolnych np. na chorobę Newcastle'a (NDV). Wcześniejsze wyniki dowiodły, iż w wyniku podania szczepionki na NDV obserwuje się fałszywie pozytywne wyniki w testach ELISA mających na celu ustalić dynamikę narastania przeciwciał po szczepieniu kolejnym preparatem. Kury podzielone zostały na 4 grupy tak, aby możliwe było porównanie odpowiedzi immunologicznej na 3 różne rodzaje VLPs (Rys. 30 i 31.).

Pierwsza grupa kur szczepiona była preparatem szczepionkowym zawierającym cząstki wirusopodobne niosące na swojej powierzchni glikoproteinę HA w ilości 15 μg na jedną dawkę szczepionki połączoną z niepełnym adjuwantem Freund. Druga grupa kur zaszczepiona została preparatem szczepionkowym zawierającym cząstki wirusopodobne niosące na swojej powierzchni glikoproteinę HA oraz białko rdzenia M1 w ilości 15 μg HA na jedną dawkę szczepionki połączoną z niepełnym adjuwantem Freund. Grupa trzecia kur zaszczepiona została preparatem szczepionkowym zawierającym cząstki wirusopodobne niosące na swojej powierzchni glikoproteiny HA oraz NA i białko rdzenia M1 w ilości 15 μg HA na jedną dawkę szczepionki połączoną z niepełnym adjuwantem Freund. W celu zbadania różnic w stymulacji układu immunologicznego po zastosowaniu potrójnych VLPs w formulacji z różnymi adjuwantami zaszczepiono kury preparatem szczepionkowym zawierającym cząstki wirusopodobne niosące na swojej powierzchni glikoproteiny HA, NA i białko rdzenia M1 w ilości 15 μg na jedną dawkę szczepionki połączoną z kompletnym adjuwantem Freund. Grupa kontrolna to 5 kur nieszczepionych. Kury z grup 1, 2, 3, 4 szczepione były po raz pierwszy w 22 dniu życia domięśniowo do mięśnia piersiowego. Następnie po 17 dniach od pierwszego szczepienia kury szczepiono po raz drugi w 39 dniu życia takimi samymi preparatami szczepionkowymi. Krew od kur pobierano z żyły łokciowej kolejno w dniach 22, 39, 56 i 63. Pobrana krew była następnie inkubowana w 37°C przez 1 godzinę, a następnie inkubowana w 4°C przez noc. Po tym czasie krew wirowano przez 20 minut przy 4000 x g w celu wyodrębnienia surowicy. Uzyskane surowice przechowywano w -20°C do dalszych badań (Rys. 31.). Surowica pobrana przed szczepieniem stanowiła surowicę 0, która była jednocześnie kontrolą negatywną w wykonywanych testach mających na celu określić dynamikę przyrostu przeciwciał w czasie po szczepieniu poszczególnymi preparatami. Surowica pobrana w 49 dniu była surowicą po 17 dniach od pierwszego szczepienia. Kolejne z dnia 56 i 63 były

surowicami po drugiej ekspozycji antygenu wobec układu immunologicznego i zostały określone jako surowice po 34 i 41 dniach od pierwszego szczepienia (Rys. 31.).



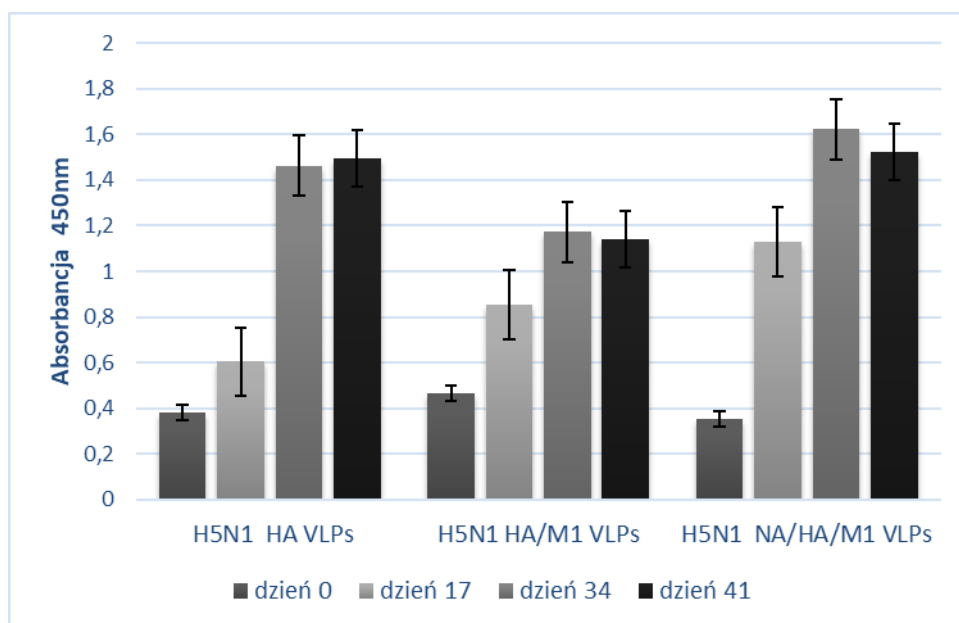
Rysunek 30. *Transmisyjna mikroskopia elektronowa preparatów zawierających oczyszczone cząstki wirusopodobne wirusa grypy typu A. Preparaty barwiono 2% kwasem fosfowolframowym. Skala - 100nm. Kontrolę pozytywną zastosowano A/ostrich/Denmark/725/96 (H5N2).*



Rysunek 31. *Schemat szczepień cząstkami wirusopodobnymi wirusa grypy typu A/H5N1. Kury zaszczepiono dwoma dawkami preparatów zawierających różne formy cząstek wirusopodobnych wirusa grypy H5N1. Do szczepień użyto 15 µg białka hemaglutyniny zawartej w cząstkach wirusopodobnych. Krew od immunizowanych kur pobierano w dniach 0, 17, 34 oraz 41. HA- hemaglutynina; NA – neuraminidaza; M1 – białko wewnętrznego rdzenia cząstki VLPs; CF – kompletny adjuwant Freund; ICF – niekompletny adjuwant Freund.*

7.1.3.1. Ocena ilościowa dynamiki wzrostu poziomu przeciwciał w odpowiedzi immunologicznej na szczepienie H5N1-HA VLP, H5N1-HA/M1 VLP i H5N1-HA/NA/M1 VLP u kur za pomocą testu ELISA

Wykonano analizę dynamiki narastania przeciwciał anty-HA u kur szczepionych różnymi formami VLPs. W tym celu przeprowadzono test ELISA z rozcieńczonymi 1:300 surowicami kurcząt immunizowanych kur zebranych w 34 dniu po pierwszej immunizacji (Rys. 32.).



Rysunek 32. Analiza porównawcza wzrostu poziomu przeciwciał w odpowiedzi immunologicznej po szczepieniu różnymi formami VLPs. Kury zaszczipiono dwoma dawkami preparatu zawierającego: H5N1-HA VLPs, H5N1-HA/M1 VLPs lub H5N1-NA/HA/M1 VLPs. Krew pobraną w dniach 0, 17, 34, 41 analizowano przy użyciu testu ELISA. Płytkę opłaszczoną referencyjnym antygenem w postaci inaktywowanego wirusa H5N1. Rozcieńczone surowice kurze (1:300) posłużyły do wyznaczenia kinetyki wzrostu poziomu przeciwciał po szczepieniu. Surowica kurcząt z dnia 0 służyła jako tło. Dla każdego testu ELISA przedstawiono średnią wartość z trzech niezależnych przeprowadzonych eksperymentów. Średnie wartości A450 i odchylenia standardowe są pokazane na osi y.

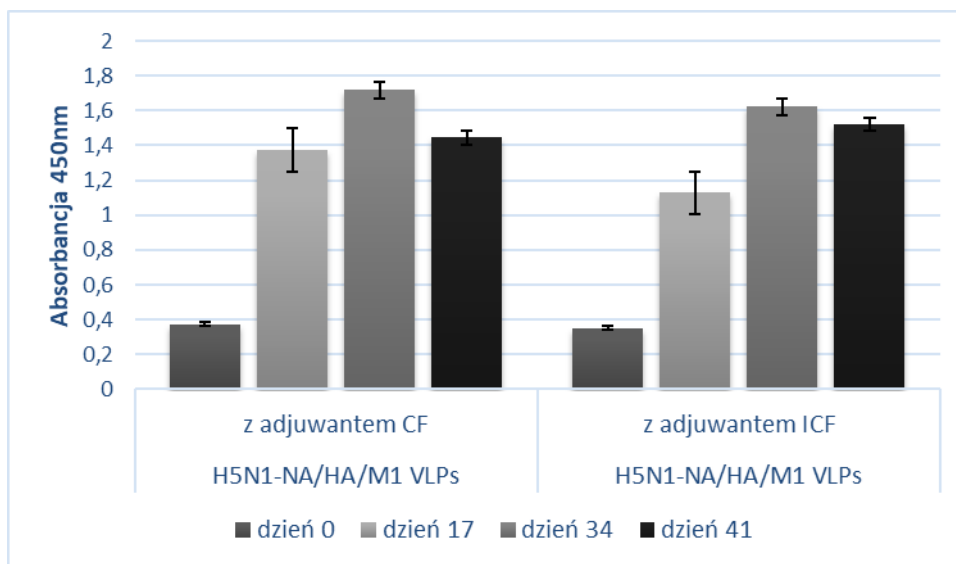
Uzyskane dane wykorzystano w analizie Two-way RM ANOVA oraz następnie w analizie mieszanych efektów wraz z dwuetapową liniową procedurą step-up Benjaminiego, Kriegera i Yekutieli'ego ($p = 0,05$). Analizę wykonano dla grup danych H5N1 HA VLPs, H5N1 HA/M1 VLPs oraz H5N1 HA/M1/NA VLPs + CF. Analiza statystyczna wykazała, iż w wyniku szczepienia konstruktem H5N1 HA VLPs oraz H5N1 HA/M1 VLPs nastąpiła stymulacja odpowiedzi immunologicznej na podany antygen (dane liczbowe uzyskane dla dni 0, 17, 34 wykazywały istotne różnice statystyczne dla danego rodzaju VLPs). Dodatkowo nie wykazano różnic istotnych statystycznie dla wyników uzyskanych w dniach 34 i 41, co może sugerować stały i utrzymujący się poziom przeciwciał po szczepieniu drugą dawką w dniu 14. Wyniki analizy statystycznej dla H5N1 HA/M1/NA VLPs wykazały z kolei istotne statystycznie różnice w wynikach liczbowych uzyskanych dla każdego analizowanego dnia (0, 17, 34, 41). Następnie porównano poziom przeciwciał w każdym dniu (0, 17, 34, 41) pomiędzy poszczególnymi dniami po szczepieniu różnymi preparatami: H5N1 HA VLPs, H5N1 HA/M1 VLPs oraz H5N1 HA/M1/NA VLPs + CF. Analiza nie wykazała różnic istotnych statystycznie dla wszystkich rodzajów jedynie w dniu 0. Wyniki uzyskane dla poszczególnych rodzajów VLPs wykazały istotne statystycznie różnice zarówno po pierwszej

dawce preparatu, jak i po drugiej dawce potencjalnych preparatów ochronnych. Na podstawie uzyskanych wyników do dalszych badań postanowiono wybrać cząstki H5N1 NA/HA/M1 VLPs.

7.1.3.2. Charakterystyka odpowiedzi immunologicznej na szczepienie kur preparatem H5N1-HA/NA/M1 VLP w formulacji z pełnym i z niekompletnym adjuwantem testem ELISA

Cząstki wirusopodobne określane są jako antygeny silnie immunogenne, dlatego też postanowiono scharakteryzować właściwości immunogenne cząsteczek wirusopodobnych H5N1-HA/NA/M1 VLPs. W tym celu zaszczepiono dwie grupy kur broilerów. Pierwszą grupę zaszczepiono preparatem H5N1-HA/NA/M1 VLPs w formulacji z kompletnym adjuwantem Freund'a, który wykazuje silne właściwości immunomodulacyjne, a drugą grupę zaszczepiono preparatem H5N1-HA/NA/M1 VLPs w formulacji z niekompletnym adjuwantem Freund'a.

Kury zaszczepiono dwoma dawkami preparatu, a krew pobierano w odstępach czasowych 0, 17, 34 i 41 dzień po pierwszej immunizacji. Następnie przebadano uzyskane surowice w celu analizy odpowiedzi immunologicznej na podany antygen w formulacji z kompletnym i niekompletnym adjuwantem. Ze względu na fakt, iż badane surowice w rozcieńczeniu 1/100 mogą dawać fałszywie pozytywne wyniki, poniższa rycina prezentuje uśrednione wyniki uzyskane dla poszczególnych grup kur przy rozcieńczeniu 1:300. Analizę wykonano testem ELISA z zastosowaniem referencyjnych antygenów H5N1 (Rys. 33.). Jako kontrolę pozytywną użyto referencyjnej surowicy kurzej uzyskanej po szczepieniu inaktywowanym wirusem H5N1. Kontrolę ujemną stanowią surowice zerowe pobrane od kur przed szczepieniem.

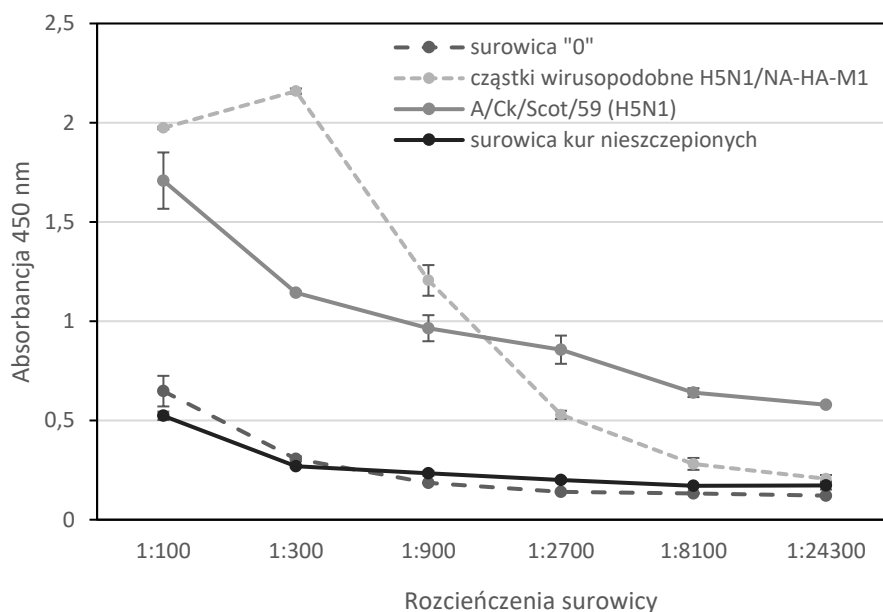


Rysunek 33. **Charakterystyka odpowiedzi immunologicznej na szczepienie kur preparatem H5N1-HA/NA/M1 VLP w formulacji z pełnym i z niekompletnym adjuwantem testem ELISA.** Kury zaszczepiono dwoma dawkami preparatu zawierającego: H5N1-NA/HA/M1 VLPs w mieszaninie w stosunku objętościowym 1:1 z kompletnym adjuwantem Freund'a (CF), bądź z niekompletnym adjuwantem Freund'a (ICF). Krew pobraną w dniach 0, 17, 34, 41 analizowano przy użyciu testu ELISA. Płytkę opłaszczoną referencyjnym antygenem w postaci inaktywowanego wirusa H5N1. Rozcieńczone surowice kurze (1:300) posłużyły do wyznaczenia kinetyki narastania przeciwciał po szczepieniu. Surowica kurczą z dnia 0 służyła jako tło. Dla każdego testu ELISA przedstawiono średnią wartość z trzech niezależnych przeprowadzonych eksperymentów. Średnie wartości A450 i odchylenia standardowe są pokazane na osi y.

Podobnie jak dla pierwszych wyników wykonano analizę Two-way RM ANOVA oraz następnie analizę mieszanych efektów wraz z dwuetapową liniową procedurą step-up Benjaminiego, Kriegera i Yekutieli'ego ($p = 0,05$). Analizę wykonano dla grup H5N1 HA/M1/NA VLPs + CF oraz H5N1 HA/M1/NA VLPs + ICF. Analiza statystyczna wykazała, iż w wyniku szczepienia konstruktami H5N1 HA/M1/NA VLPs w formulacji z kompletnym i niekompletnym adjuwantem stymulacja odpowiedzi immunologicznej nastąpiła na oba typy preparatów (dane liczbowe uzyskane dla dni 0, 17, 34, 41 wykazywały istotne różnice statystyczne zarówno dla formulacji zawierającej CF, jak i ICF). Co sugeruje a zarazem potwierdza, zasadność wykorzystania VLPs jako preparatów ochronnych bez konieczności zastosowania dodatkowych czynników immunostymulujących (adjuwantów). Następnie porównano poziom przeciwciał w każdym dniu (0, 17, 34, 41) pomiędzy poszczególnymi wynikami uzyskanymi dla preparatu zawierającego i niezawierającego adjuwant. Analiza nie wykazała różnic istotnych statystycznie. Zastosowanie kompletnego adjuwantu Freund'a nie wpłynęło zatem znacznie na poziom produkcji przeciwciał anty H5N1. Uzyskane wyniki wskazują, iż cząstki wirusopodobne są idealnymi kandydatami na preparaty szczepionkowe i same w sobie zawierają właściwości silnie immunomodulacyjne.

7.1.3.3. Analiza odpowiedzi humoralnej po immunizacji kur brojlerów preparatem H5N1-HA/NA/M1 VLP w formulacji z niekompletnym adjuwantem Freund'a

Ocenę odpowiedzi immunologicznej na potencjalną szczepionkę u kur brojlerów, przeprowadzono wykonując miareczkowanie surowic do punktu końcowego za pomocą testu ELISA (Rys. 34.).



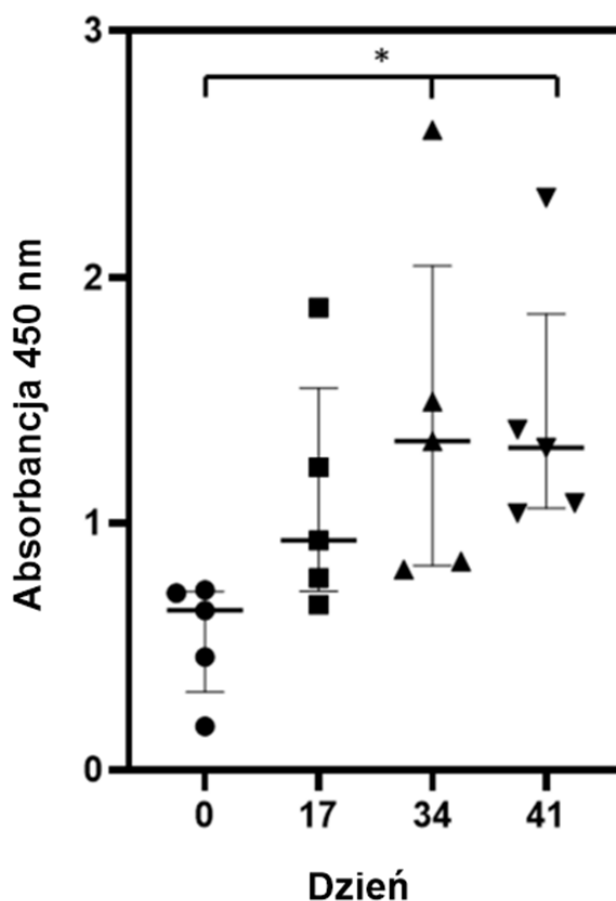
Rysunek 34. Miareczkowanie do punktu końcowego surowic kurcząt po immunizacji H5N1-NA/HA/M1 VLP. Płytki do testów ELISA pokryto referencyjnym antygenem w postaci inaktywowanego wirusa H5N1. Seryjne rozcieńczenia referencyjnych kurcząt przeciwciał poliklonalnych A/H5N1/HPAI posłużyły jako kontrola pozytywna. Surowica kurcząt z dnia 0 i kontrolna surowica od kurcząt nieszczepionych służyły jako tło. Współczynnik rozcieńczenia zebranych surowic pokazano na osi x. Dla każdego testu ELISA przedstawiono średnią wartość z trzech niezależnych przeprowadzonych eksperymentów. Średnie wartości A450 i odchylenia standardowe są pokazane na osi y.

Miareczkowanie surowicy w punkcie końcowym pokazuje, że końcowe miano przeciwciał uzyskane po immunizacji preparatem H5N1-HA/NA/M1 VLP w formulacji z niekompletnym

adjuwantem Freund'a osiągnęło 1:2700 (Rys. 34.). Miano przeciwciał oszacowano jako stężenie w surowicy, przy którym wiązanie było co najmniej dwukrotnie wyższe niż tło.

7.1.3.4. Ocena dynamiki narastania ilości przeciwciał w czasie w odpowiedzi immunologicznej na szczepienie H5N1-HA/NA/M1 VLP u kur za pomocą testu ELISA

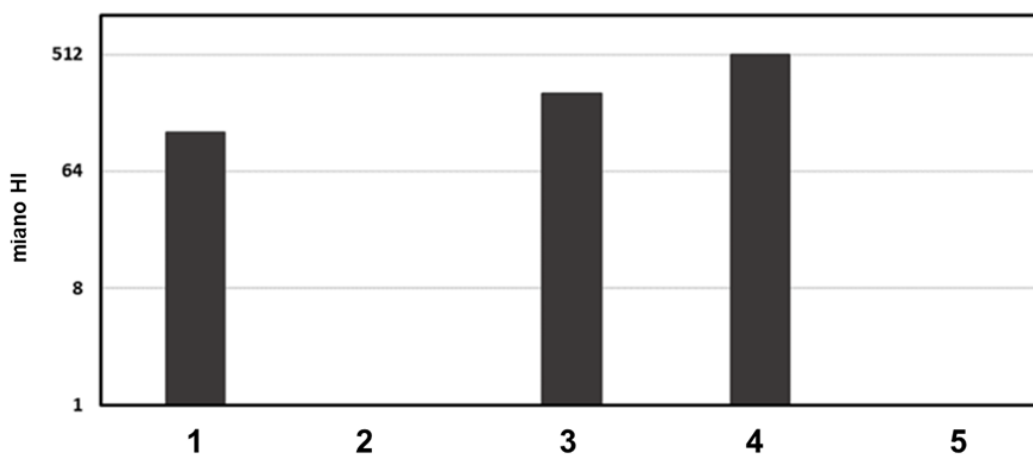
Odpowiedź humoralną u brojlerów na immunizację potrójnymi VLPs H5N1-HA/NA/M1 VLP oceniono wykonując badanie kinetyki produkcji przeciwciał. Analiza mian przeciwciał we krwi pobranej w 0, 17, 34 i 41 dniu po pierwszej dawce preparatu wykazała wzrost odpowiedzi humoralnej po immunizacji brojlerów potrójnymi VLPs H5N1-HA/NA/M1. Produkcję przeciwciał wykryto już po pierwszej dawce szczepionki. Druga dawka potrójnych cząsteczek VLP H5N1/NA-HA-M1 nie zwiększyła znacząco liczby wytwarzanych przeciwciał, co również wskazuje na wysoki potencjał immunostymulacyjny i zasadność stosowania cząstek wirusopodobnych jako szczepionek nowej generacji (Rys. 35.).



Rysunek 35. **Dynamika poziomu anty-H5N1 IgY w surowicach immunizowanych kurcząt** Kinetykę miana przeciwciał u kurcząt ($n = 5$) po szczepieniu podstawową i przypominającą dawką preparatu zawierającą potrójne VLP H5N1-NA/HA/M1 mierzono testem ELISA. Mediana (gruba linia) pokazana została w przedziale międzykwartylowym 25% i 75% (linie wąskie). Dzień pobrania surowicy pokazany jest na osi x. Wartości A450 pokazane są na osi y. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu Kruskala–Wallisa ($p = 0,05$) oraz testu wielokrotnych porównań Benjamini, Kriegera i Yekutieli ($p = 0,05$). Różnice statystyczne wykryto między dniami 0-41 i 0-34 ($p = 0,014$) i przedstawiono na wykresie jako symbol gwiazdy.

7.1.3.5. Analiza potencjalnej skuteczności preparatu szczepionkowego H5N1-HA/NA/M1 VLPs - charakterystyka odpowiedzi immunologicznej pod kątem powstawania przeciwciał neutralizujących u kur szczepionych cząstkami H5N1-HA/NA/M1 VLPs

Produkcja przeciwciał skierowanych przeciwko antygenowi zawartemu w preparacie szczepionkowym jest warunkiem koniecznym, aby preparat miał szansę być skuteczny. Niestety produkcja przeciwciał, które można wykryć np. testami ELISA nie świadczy, iż użyty do szczepienia antygen doprowadzi do powstania przeciwciał neutralizujących. Jednym z testów, które wskazują na obecność przeciwciał neutralizujących są testy zahamowania hemaglutynacji. W celu określenia czy w wyniku szczepienia powstała pula przeciwciał neutralizujących wykonano test zahamowania hemaglutynacji (HI). Wyniki testu (Rys. 36.) wskazują, iż w rezultacie szczepienia kur cząstkami wirusopodobnymi w puli powstałych przeciwciał znajdują się również przeciwciała zdolne do związania hemaglutyniny (przeciwciała neutralizujące). Miano HI zebranych połączonych surowic kur osiągnęło poziom 128 HI. W literaturze można odnaleźć informacje, że badane preparaty są skuteczne, gdy miano HI osiąga ≥ 16 . Jako kontrolę pozytywną zastosowano inaktywowane wirusy H5N1 A/Ck/Scot/59 i H5N2 i A/Ost/Den/72420/96. Kury szczepione PBS nie wykazywały żadnej aktywności HI.



Legenda:

- 1 – surowica uzyskana po szczepieniu kur H5N1 HA/M1/NA VLPs
- 2 – surowica uzyskana po szczepieniu kur 1:1 PBS/ICF
- 3 – surowica referencyjna A/Ck/Scot/59 (H5N1)
- 4 – surowica referencyjna A/Ost/Den/72420/96 (H5N2)
- 5 – kontrola negatywna testu (brak surowicy)

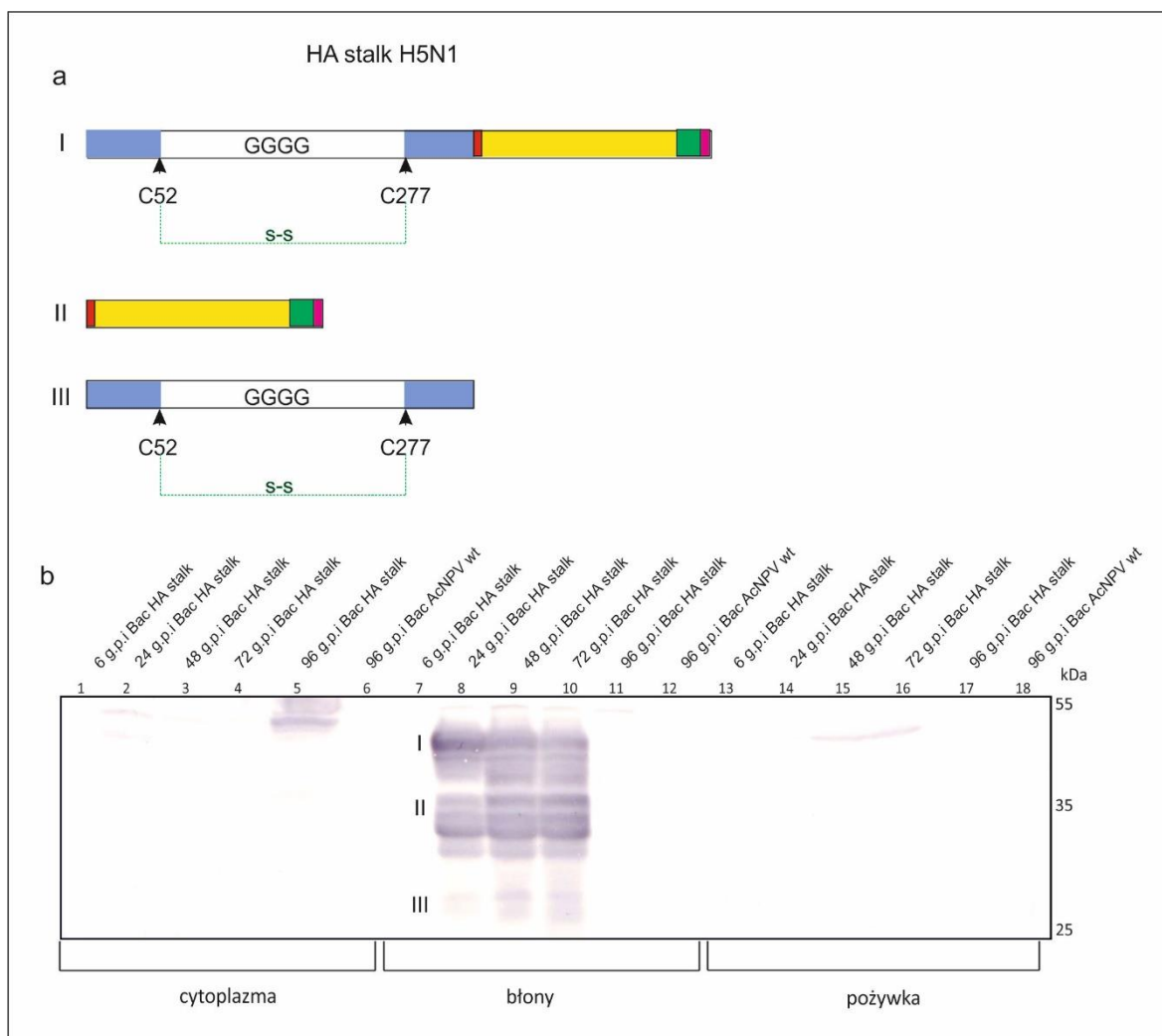
Rysunek 36. Miano HI połączonych surowic kurcząt zebranych po immunizacji potrójnymi VLP H5N1-NA/HA/M1 Jako kontrolę pozytywną zastosowano przeciwciała H5N1 A/Ck/Scot/59 i H5N2 A/Ost/Den/72420/96. Surowice od kurcząt szczepionych mieszaniną PBS/ICF służyły jako kontrola negatywna. Test HI przeprowadzono w trzech powtórzeniach.

7.1.3.6. Charakterystyka skróconej formy białka hemaglutyniny polskiego izolatu H5N1 jako potencjalnie uniwersalnego antygeny

7.1.3.6.1 Ekspresja skróconej formy genu kodującego hemaglutyninę w postaci nóżki HA w komórkach owadzych

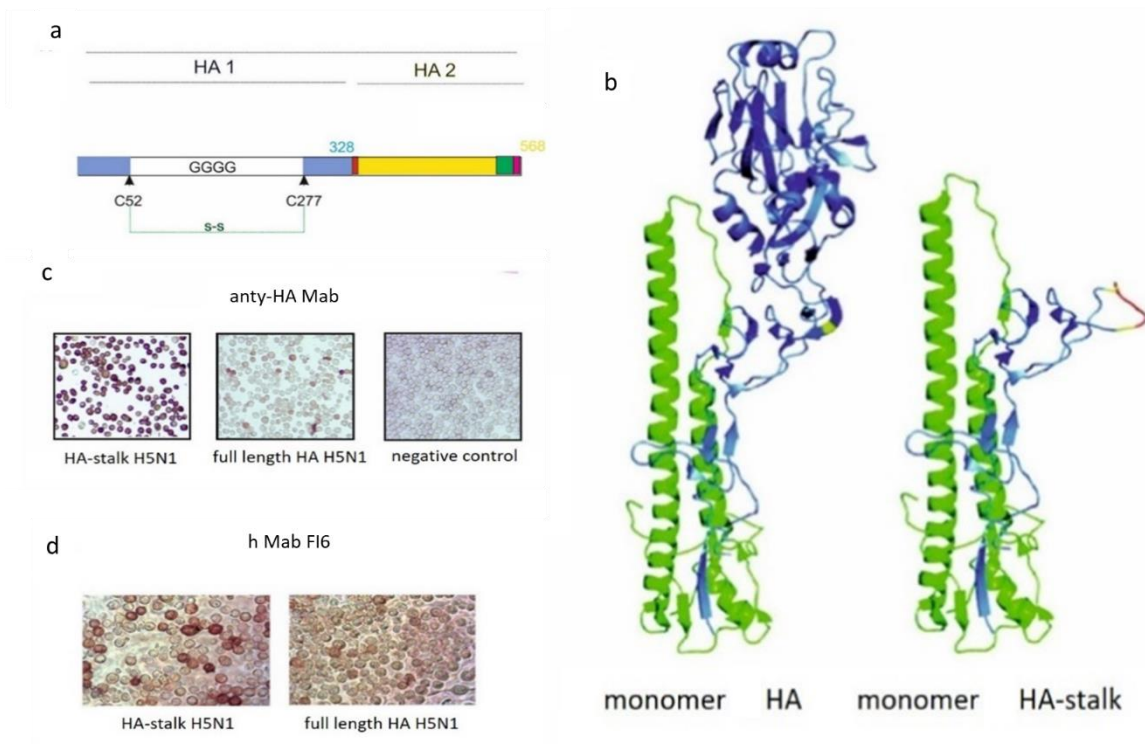
W celu uzyskania białka hemaglutyniny w formie potencjalnie uniwersalnego antygeny pozbawionego wysoce zmiennego rejonu główki zaprojektowano syntetyczny gen. Gen kodował sekwencje podjednostki drugiej HA2 hemaglutyniny oraz fragment C - i N - końca rejonu podjednostki HA1. Zaprojektowany gen posiadał delecję fragmentu pomiędzy dwiema konserwowanymi cysteinami C52 oraz C277, w obrębie którego znajdują się główne determinaty antygenowe (Rys. 37.). W rejonie pomiędzy C52 i C277 wstawiono łącznik kodujący cztery reszty glicyny. Dodatkowo syntetyczny gen zawierał miejsca restrykcyjne dla enzymów EcoRI oraz NotI, które zostały wykorzystane do procedury klonowania. Otrzymano lizaty bakulowirusowe niosące gen kodujący skróconą formę HA. W celu określenia kinetyki produkcji białka oraz lokalizacji białka w czasie w komórkach owadzych wykonano test typu „Time course”. Kontrolę negatywną stanowiły komórki zakażone dzikim bakulowirusem, które zbierane były w ten sam sposób. Następnie wszystkie próbki frakcjonowano w celu oddzielenia frakcji błon od cytoplazmy. Białka z pożywki wytrącone zostały kwasem trichlorooctowym. Tak przygotowane próbki rozdzielono w żelu poliakrylamidowym 10% w warunkach redukujących, a następnie wykonano immunodetekcję przy użyciu surowicy króliczej anti-H5N1 HA0/HA1. Skrócona forma białka HA stalk jest wydajnie produkowana już od 48 godziny po infekcji rekombinowanym bakulowirusem, jak można zaobserwować białko jest zlokalizowane głównie w błonach komórkowych (Rys. 37.). Ilość produkowanego białka w formie niezdegradowanej jest najbardziej efektywna przy m.o.i. równym 1. Przy zakażeniu m.o.i. równym 3 i 5 zaobserwowano spadek ilości pełnej formy produkowanego białka oraz wzmożoną degradację. W celu sprawdzenia czy produkowane białko tworzy formy homotrimeryczne wykonano zakażenie komórek owadzych BAC^{H5N1}, po 48 godzinach komórki zebrano i oddzielono frakcję błon od cytoplazmy. Następnie wykonano rozdział frakcji białka HA stalk w żelu poliakrylamidowym 10% w warunkach niereduujących. Immunodetekcja przy użyciu metody Western Blotting z wykorzystaniem przeciwciał referencyjnych anti-H5N1 VLA wykazała obecność prążków o masach ok. 75 kDa oraz większych ok. 120 kDa, co może wskazywać na tworzenie się form oligomerycznych odpowiadających swoją wielkością formie dimeru i trimeru.

W celu potwierdzenia prawidłowego fałdowania uniwersalnego antygeny nóżki HA, wykonano testy IPMA z monoklonalnymi przeciwciałami uzyskanymi dla hemaglutyniny fenotypu H1N1 oraz neutralizującymi uniwersalnymi ludzkimi przeciwciałami FI6 (Rys. 38.). Przeciwciała FI6 opisane są jako ludzkie przeciwciała syntetyczne zdolne do neutralizacji wielu podtypów wirusa grypy typu A i zostały wyizolowane z komórek plazmatycznych dawców podczas pandemii w 2009 roku. Ponadto scharakteryzowano je jako przeciwciała konformacyjne i liniowe, które wiążą konserwowany region nóżki HA.



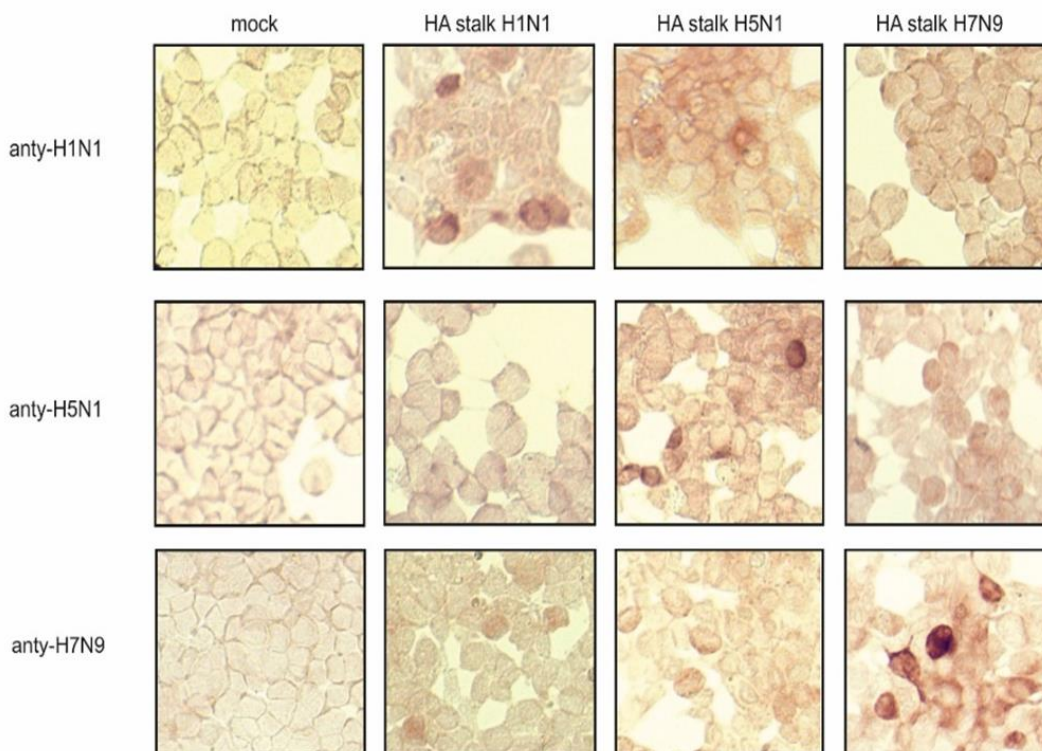
Rysunek 37. **Kinetyka produkcji oraz lokalizacja białka HA stalk w czasie w komórkach owadzych.** a) Schemat budowy białka HA stalk oraz prawdopodobnych jego form obecnych w komórkach, powstałych w wyniku proteolizy. b) Komórki Sf9 zakażono BAC^{VP60}, a następnie w różnych odstępach czasowych zbierano próbki. Komórki poddano frakcjonowaniu w celu wyodrębnienia frakcji błon oraz cytoplazmy, a białka z pożywki wytrącano kwasem trichlorooctowym. Poszczególne frakcje poddano elektroforezie SDS-PAGE w żelu 10%. Następnie wykonano immunodetekcję białek metodą Western Blotting z użyciem surowicy króliczej. Jako kontrolę negatywną wykorzystano szczep bakulowirusa typu dzikiego BAC^{WT}, zaprezentowana kontrola to frakcje zebrane w 120 godzinie po infekcji. Wzorec masowy to Prestained Protein Molecular Weight Marker z firmy Fermentas. G – glicyna; C52, C277 – pozycja cysteiny w dominie HA1 hemaglutyniny; S-S – mostek disiarczkowy; g.p.i. – godzin po infekcji.

Odpowiedź immunologiczna na większość preparatów szczepionkowych stosowanych w profilaktyce wirusa grypy jest określana jako hemaglutyninozależna. Określenie to odnosi się do rejonu głowy HA, w którym zlokalizowane są główne determinanty antygenowe, w tym epitopy odpowiedzialne za neutralizację wirusa. Jak wynika z danych literaturowych ludzki układ immunologiczny w wyniku ekspozycji na cząsteczkę wirusa grypy produkuje zarówno przeciwciała rozpoznające rejon zmienny głowy, jak i pulę uniwersalnych przeciwciał rozpoznających zakonserwowane rejonu hemaglutyniny w obrębie nóżki HA. Wykazano, że uniwersalne szeroko neutralizujące przeciwciała rozpoznają domenę HA2 w hemaglutynie bezgłowej (HA stalk).



Rysunek 38. **Schematyczna budowa i charakterystyka uniwersalnego antygeny w formie nóżki HA z homologicznego szczepu wirusa H5N1.** b) Schematyczne przedstawienie przewidywanej struktury monomeru HA i monomeru nóżki HA. Struktura wygenerowana w programie Chimera na podstawie struktury hemaglutyniny szczepu H5N1 (PDB: 1MQN). c) Ekspresja nóżki HA H5N1 w komórkach owadzych potwierdzono metodą IPMA z przeciwciałami monoklonalnymi anti-H5N1. Jako kontrolę pozytywną zastosowano HA pełnej długości ze szczepu H5N1. Komórki zakażone bakulowirusem typu dzikiego zastosowano jako kontrolę negatywną. Zdjęcia wykonano przy powiększeniu 10x. d) Reaktywność antygeny nóżki HA i pełnej długości HA z H5N1 w teście IPMA z neutralizującymi uniwersalnymi ludzkimi przeciwciałami F16. Nóżkę HA i HA pełnej długości ze szczepu H5N1 wykryto w transfekowanych komórkach owadzych. Zdjęcia wykonano przy powiększeniu 20x.

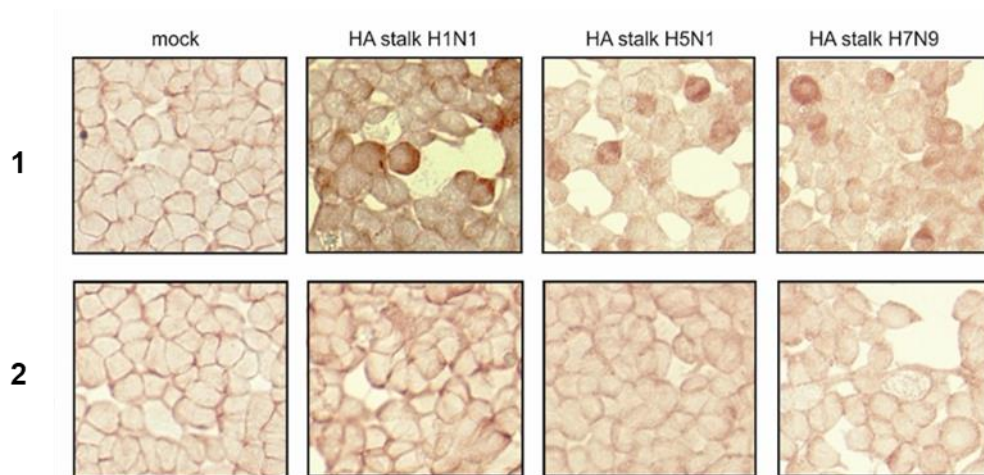
Jak dotąd nie scharakteryzowano odpowiedzi immunologicznej po szczepieniu kur preparatami szczepionkowymi pod kątem powstawania uniwersalnych przeciwciał rozpoznających konserwowane rejony nóżki HA w modelu kurzym. W niniejszej pracy postanowiono zbadać, czy po immunizacji kur preparatami ochronnymi w formie VLPs-H5N1 powstanie pula uniwersalnych przeciwciał rozpoznających konserwowany rejon nóżki HA. W tym celu zaprojektowano i wyprodukowano w komórkach ssaczych konstrukty nóżki HA zarówno z 1, jak i 2 grupy HA. Rekombinowane białko nóżki HA pochodzące z homologicznego szczepu H5N1, heterologicznego szczepu H7N9/Szanghaj, jak również z heterosubtypowego szczepu ludzkiej grypy pH1N1 zaprojektowano przy użyciu tej samej strategii, jak opisano powyżej (Rys. 38.). Syntetyczne sekwencje wklonowano do ssaczych wektorów ekspresyjnych (pcDNA3.1; Invitrogen, USA) i użyto do transfekcji komórek HEK293. W celu potwierdzenia ekspresji różnych antygenów nóżki HA, przeprowadzono test IPMA. Każdy konstrukt nóżki HA wykryto przy użyciu różnych przeciwciał monoklonalnych swoistych dla szczepów wirusa grypy H1N1, H5N1, H9N2 i H7N9 (Rys. 39.).



Rysunek 39. Wyniki ekspresji genu kodującego skróconą hemaglutyninę w formie nóżki HA różnych szczepów wirusa grypy w komórkach ssaczych. Produkcja antygenów nóżki HA z grupy 1 i 2 HA w komórkach HEK293. Komórki transfekowano konstrukcjami HA-stalk H1N1, H5N1 i H7N9. Ekspresję genu kodującego białko nóżki HA wykryto przy użyciu różnych przeciwciał monoklonalnych specyficznych dla szczepów wirusa grypy H1N1, H5N1, H3N2, H9N2 i H7N9. Jako kontrolę negatywną zastosowano komórki nietransfekowane. Zdjęcia wykonano przy powiększeniu 40x.

7.1.3.7. Analiza reaktywności puli uniwersalnych przeciwciał powstałych w wyniku szczepienia kur preparatami zawierającymi H5N1-HA/NA/M1 VLP - detekcja homologicznego, heterologicznego i heterosubtypowego antygeny w formie HA stalk w komórkach ssaczych za pomocą testu IPMA

Kurzą surowicę uzyskaną po szczepieniu potrójnymi H5N1-NA/HA/M1 VLPs wykorzystano do detekcji rekombinowanych form białka nóżki HA produkowanych w komórkach ssaczych HEK293. Wykazano reaktywność kurzych surowic pobranych w 41 dniu po szczepieniu z uniwersalnymi antygenami nóżki HA. Reaktywność uzyskanych surowic potwierdzono zarówno dla nóżki HA z homologicznego szczepu wirusa H5N1, jak i z heterologicznego szczepu AIV H7N9/Szanghaj. Dodatkowo wykazano reaktywność krzyżową dla antygeny nóżki HA zaprojektowanej w oparciu o heterosubtypowy ludzki szczep wirusa pH1N1. Uzyskane wyniki wskazują, że immunizacja potrójnymi VLPs H5N1-NA/HA/M1 doprowadziła do powstania puli uniwersalnych przeciwciał (Rys.40.).



Legenda:

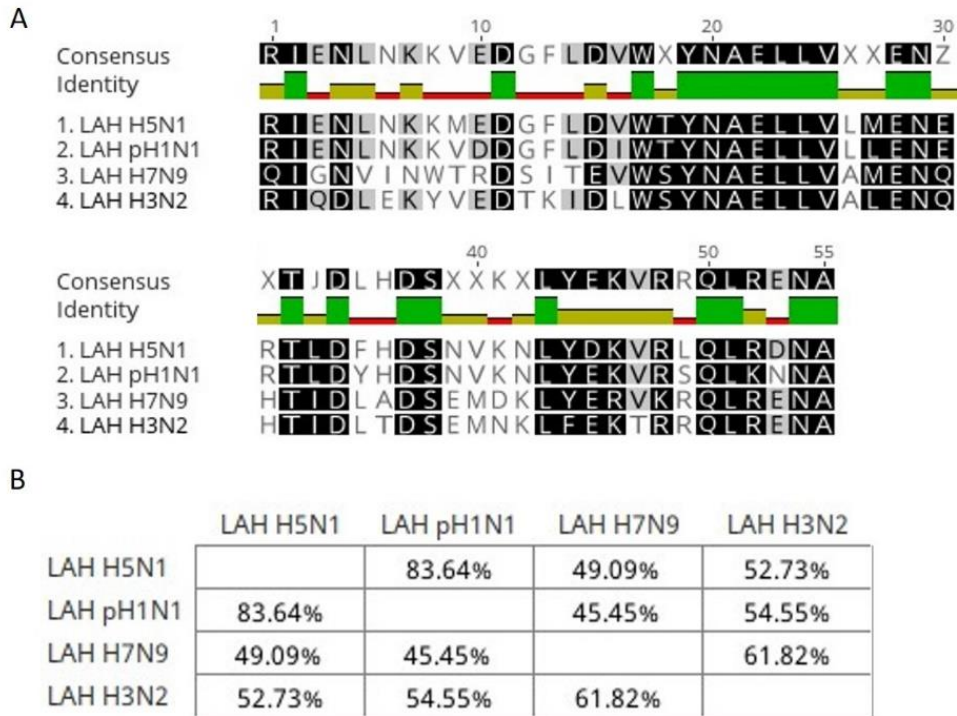
1 – surowica uzyskana po szczepieniu kur H5N1 HA/M1/NA VLPs

2 – surowica uzyskana po szczepieniu kur 1:1 PBS/ICF

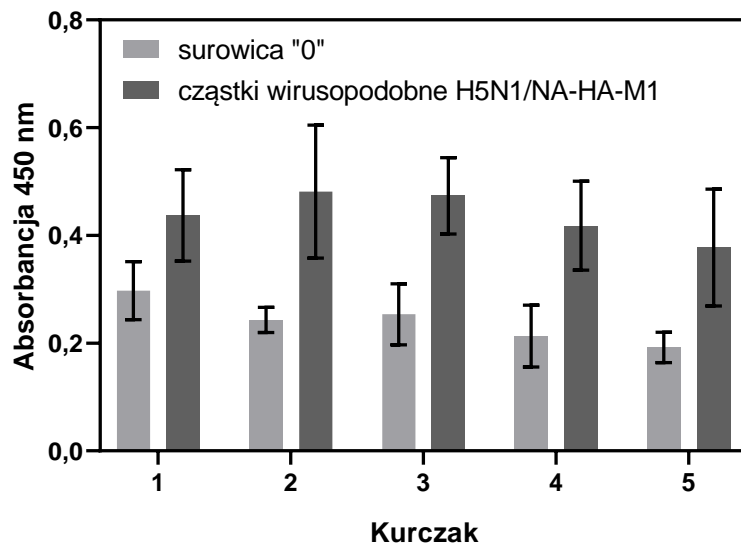
Rysunek 40. Analiza reaktywności krzyżowej surowic kurcząt otrzymanych po szczepieniu potrójnymi VLP H5N1/NA-HA-M1 z antygenami nóżki HA z grup 1 i 2 HA. Detekcję białka nóżki HA ze szczepów H1N1, H5N1 i H7N9 przeprowadzono na transfekowanych komórkach HEK293. Jako tło zastosowano surowice z kur szczepionych PBS. Jako kontrolę negatywną zastosowano komórki nietransfekowane. Zdjęcia wykonano przy powiększeniu 40x.

7.1.3.8. Analiza reaktywności krzyżowej uniwersalnych przeciwciał powstałych w wyniku szczepienia kur preparatami zawierającymi H5N1-HA/NA/M1 VLP z syntetycznym peptydem odpowiadającym rejonowi LAH z heterosubtypicznego szczepu H3N2 w teście ELISA

Najmniej zmiennym regionem w nóżce HA jest region długiej alfa helisy – LAH (ang. long alpha helix). Porównanie sekwencji aminokwasowych kodujących regiony LAH z białka HA podtypu H5N1, pH1N1, H7N9 i H3N2 wykazała ponad 45% identyczności sekwencji między nimi (Rys. 41.). W celu jednoznacznego zbadania, czy uniwersalne przeciwciała rozpoznające nóżkę HA powstałe po szczepieniu kurcząt potrójnymi VLP H5N1/NA-HA-M1 będą w stanie rozpoznać syntetyczny peptyd obejmujący rejon długiej alfa helisy z heterosubtypowego szczepu ludzkiego wirusa grypy typu H3N2 wykonano test ELISA, w którym płytka opłaszczona była peptydem LAH. Do analizy zdolności wiązania peptydów LAH użyto surowicę zerową oraz surowicę po drugiej immunizacji z dnia 41 od pięciu kur. Uzyskane wyniki sugerują, że surowice z dnia 41 zawierały większe ilości uniwersalnych przeciwciał IgY, specyficznie rozpoznających epitopy LAH (Rys. 42.). Analiza statystyczna przeprowadzona za pomocą testu nieparametrycznego nie wykazała statystycznie istotnych różnic między próbkami uzyskanymi przed i po szczepieniu od każdej kury, ani między danymi zgrupowanymi.



Rysunek 41. Analiza porównawcza sekwencji aminokwasowych kodujących regiony długiej alfa helisy LAH (ang. long alpha helix) z białka HA H5N1, pH1N1, H7N9 i H3N2 HA. (A) Analiza porównawcza sekwencji aminokwasowych z wyznaczeniem sekwencji konsensusowej, gdzie największe podobieństwo zostało oznaczone kolorem zielonym. (B) Macierz pokazująca procent identyczności sekwencji między sekwencjami. Analizy zostały przeprowadzone przy użyciu programu Geneious z użyciem algorytmu Geneious.



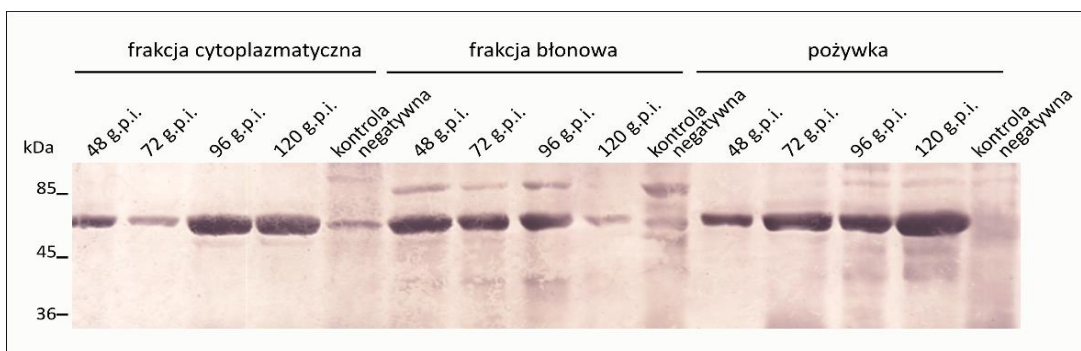
Rysunek 42. Reaktywność krzyżowa surowic kurcząt otrzymanych po szczepieniu potrójnymi VLP H5N1/NA-HA-M1 z peptydem LAH z H3 z grupy 2 HA. Miano przeciwciał u kurcząt ($n = 5$) przed (jasnoszary słupek) i po (ciemnoszary słupek) szczepieniu potrójnymi VLP H5N1/NA-HA-M1 mierzono za pomocą peptydowego testu ELISA. Średnie wartości OD i odchylenia standardowe przedstawiono na osi y. Badane kurczęta przedstawiono na osi x. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu nieparametrycznego testu Wilcoxon ($p = 0,05$) dla par.

7.2. Drugi model badawczy bezosłonkowych ikozaedralnych cząstek wirusopodobnych - VLPs wirusa krwotocznej choroby królików

7.2.1. Charakterystyka molekularna białka VP60 wirusa RHD polskiego izolatu SGM jako białka samoformującego cząstki wirusopodobne wirusa RHD

Przedmiotem badań był szczep wirusa krwotocznej choroby królików pochodzący z kolekcji dr. hab. Andrzeja Fitznera z Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego, Zakładu Pruszczycy w Zduńskiej Woli (PIWet-PIB ZPr). Szczep oznaczony symbolem SGM wyizolowany został w 1988 roku, wykazywał zdolność do aglutynacji erytrocytów ludzkich grupy 0. Materiałem do badań był plazmidy pGemT-easy z wklonowaną sekwencją genu *vp60*, uzyskaną przez doktorantkę podczas wykonywania pracy magisterskiej. Plazmid pGemT-easy^{vp60SGM} posłużył do sekwencjonowania genu *vp60* z zastosowaniem starterów środkowych beta1 i beta2. Uzyskane sekwencje genu *vp60* szczepu SGM zostały następnie poddane analizie bioinformatycznej. Jako pierwsze wykonano porównanie otrzymanych sekwencji z referencyjnym szczepem niemieckim FRG (nr akcesyjny GenBank M 67473). Analiza porównawcza wykazała, że w obrębie rejonu hiperzmiennego C (301-310 aa) można stwierdzić najwyższy współczynnik zmienności sekwencji zarówno nukleotydowej, jak i aminokwasowej. Pozostałe mutacje rozkładały się równomiernie w obrębie całego genu.

Głównym komponentem cząstki wirusa RHD jest strukturalne białko kapsydu VP60. Postanowiono uzyskać rekombinowane białko VP60 polskiego szczepu wirusa RHD w komórkach owadzych przy użyciu systemu bakulowirusowego. Wcześniejsze badania, przeprowadzone podczas pracy magisterskiej doktorantki, potwierdziły ekspresję genu kodującego białko VP60 w komórkach owadzych przy użyciu techniki IPMA. Kolejne etapy pracy doktorskiej polegały na analizie lokalizacji białka VP60, optymalizacji ekspresji genu kodującego to białko oraz charakterystyce cząstek wirusopodobnych zbudowanych z tego białka. W celu określenia dokładnej lokalizacji białka VP60 we frakcjach komórek owadzych oraz określenia kinetyki ekspresji genu *vp60* w czasie wykonano test typu „Time course”. Komórki owadzie zakażono bakulowirusem niosącym gen kodujący białko VP60, BAC^{VP60}, a jako kontrolę zastosowano dzikiego bakulowirusa BAC^{WT}. Następnie w odpowiednich odstępach czasowych zbierano próbki hodowli i poddawano frakcjonowaniu, tak aby oddzielić frakcję błon od cytoplazmy. Białka obecne w pożywce wytrącano przy użyciu kwasu trichlorooctowego. W celu jednoznacznego potwierdzenia lokalizacji białka VP60 oraz określenia kinetyki ekspresji przeprowadzono immunodetekcję metodą Western Blotting z użyciem króliczej surowicy anti-RHDV (Rys. 43.). Wykryty metodą immunodetekcji prążek odpowiada wielkości białka ok. 60 kDa, co odpowiada wielkości białka VP60. Intensywność prążka koreluje z ilością białka i wskazuje na transport białka z błon do cytoplazmy, a następnie do pożywki. Zaobserwowano, iż od 48 godziny po infekcji BAC^{VP60} białko kierowane jest do cytoplazmy, po czym jest wydzielanie do pożywki. Wraz z upływem czasu zaobserwowano spadek zawartości białka VP60 we frakcji błonowej, co prawdopodobnie ma związek z postępującą w czasie wzmożoną sekrecją białka do pożywki oraz postępującą lizą komórek w 120 godzinie po infekcji będącą efektem namnażania się bakulowirusa w hodowli.

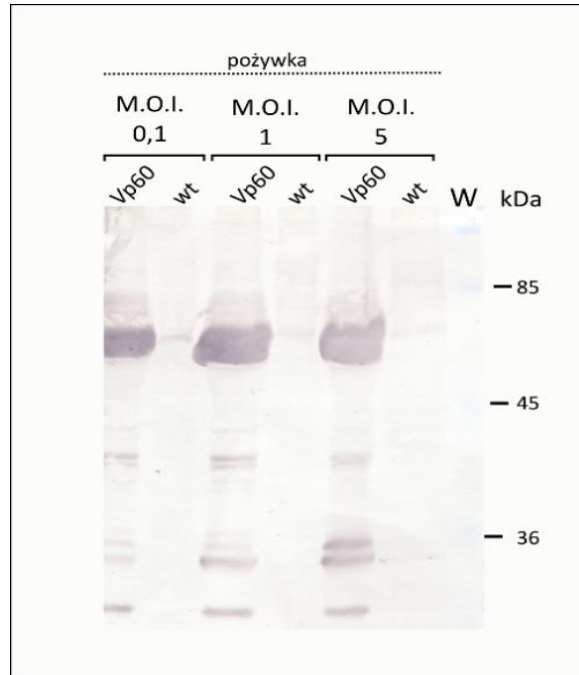


Rysunek 43. Wynik rozdziatu elektroforetycznego przedstawiający analizę lokalizacji komórkowej oraz kinetyki ekspresji genu kodującego strukturalne białko VP60 formujące kapsyd wirusa RHD w komórkach owadzie Sf9. Komórki Sf9 zakażono BAC^{VP60} , a następnie w różnych odstępach czasowych zbierano próbki do analizy. Komórki poddano frakcjonowaniu w celu wyodrębnienia frakcji błon oraz cytoplazmy, a białka z pożywki wytrącano kwasem trichlorooctowym. Poszczególne frakcje poddano elektroforezie typu SDS-PAGE w żelu 10%. Następnie wykonano immunodetekcję białek metodą Western Blotting z użyciem króliczej surowicy anti-RHDV. Jako kontrolę negatywną wykorzystano dziki bakulowirus BAC^{WT} zebranego w 120 godzinie po infekcji. G.p.i. – godziny po infekcji.

Przeprowadzono test mający na celu oznaczenie optymalnej wartości miana bakulowirusa użytego do zakażenia w komórkach Sf9. W tym celu komórki owadzie zakażono zmiareczkowanym lizatem bakulowirusowym BAC^{VP60} o różnych wartościach m.o.i.: 0,1; 1; 5. Hodowlę zakażonych komórek prowadzono przez 96 godzin. Białka z pożywki wytrącono kwasem trichlorooctowym. Tak przygotowane próbki poddano rozdzałowi w 10% żelu poliakrylamidowym, a następnie wykonano transfer białek z żelu na błonę PVDF. Przy użyciu techniki Western Blotting wykonano immunodetekcję rekombinowanego białka VP60 z zastosowaniem króliczej surowicy anti-RHDV. Stwierdzono, że zwiększenie ilości cząstek BAC^{VP60} przypadających na komórkę owadzie skutkowało jedynie niewielkim wzrostem ilości otrzymanego białka (Rys. 44.). Dlatego też w dalszych doświadczeniach wykonywano zakażenie rekombinowanym bakulowirusem przy m.o.i. równym 1, a hodowlę zakażonych komórek prowadzono przez 96 godzin, przy czym dalszym analizom poddawano białka obecne w pożywce.

7.2.2. Określenie budowy oraz identyfikacja procesu tworzenia VLPs wirusa gorączki krwotocznej królików polskiego izolatu SGM o właściwościach hemaglutynujących

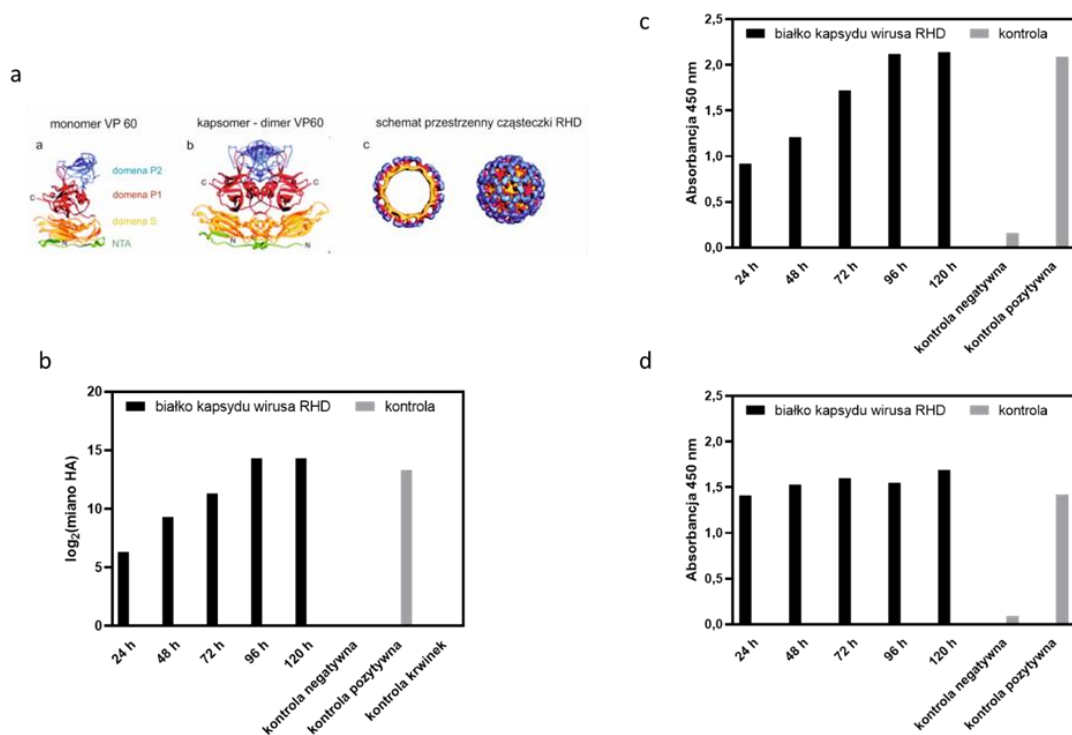
Pierwszy etap charakterystyki procesu tworzenia się cząstek wirusopodobnych RHDV polegał na wykonaniu w określonych warunkach czasowych testu kinetyki produkcji potencjalnych cząstek wirusopodobnych wydzielanych do pożywki przez zakażone komórki owadzie. Wykonano zakażenie 20 ml komórek owadzie w hodowli płynnej przy m.o.i. równym 1, a następnie w odstępach czasowych (24, 48, 72, 96, 120 godzin po infekcji) pobierano po 1 ml hodowli.



Rysunek 44. Wynik rozdziatu elektroforetycznego przedstawiający oznaczenie optymalnej wartości wielokrotności zakażenia dla rekombinowanego bakulowirusa BAC VP60 w komórkach Sf9. Komórki Sf9 zakażono rekombinowanym bakulowirusem BACVP60 oraz równolegle dzikim bakulowirusem stanowiącym kontrolę negatywną BACWT. Po 96 godzinach po infekcji przy pomocy 20% TCA wytrącono białka z pożywki, a następnie wykonano immunodetekcję białek przy użyciu metody Western Blotting z wykorzystaniem surowicy króliczej anty-RHDV. W - Prestained Protein Molecular Weight Marker (Life Technologies, USA).

Jako pierwszy wykonano test hemaglutynacji z pożywką pobraną w różnych odstępach czasu. Z rysunku 45b wynika, iż po 72 godzinie od zakażenia następuje wyraźny wzrost miana HA co odpowiada gwałtownemu wzrostowi wydzielanych do pożywki białek, które następnie formują cząstki wirusopodobne. Uzyskane VLPs-RHDV wykazują takie same właściwości hemaglutynujące jak referencyjny natywny wirus RHD. W 72 godzinie po zakażeniu miano HA wynosiło 2560 i stale wykazywało tendencję wzrostową, by w 96 godzinie po infekcji osiągnąć miano 20480, które utrzymywało się na tym poziomie w 120 godzinie po infekcji. Warto dodać, iż miano HA kontroli pozytywnej (natywny wirus RHD z homogenatu wątroby zainfekowanego królika) wynosiło 10240, co sugeruje, że rekombinowane białko VP60 prawdopodobnie efektywnie tworzy VLPs w pożywce syntetycznej w wyniku zakażenia komórek owadzych rekombinowanym bakulowirusem BAC^{VP60}.

W celu potwierdzenia obecności rekombinowanego antygenu RHDV w postaci VLPs-RHDV wykonano analizy testem ELISA w Państwowym Instytucie Weterynaryjnym w Zakładzie Pryszczycy w Zduńskiej Woli. Jako pierwszy wykonano test ELISA z wykorzystaniem przeciwciał poliklonalnych anty-RHDV. Płytkę opłaszczoną surowicą króliczą inkubowano z poszczególnymi frakcjami pożywki zebranej w różnym czasie od zakażenia. Następnie dodano referencyjną surowicę anty-RHDV pochodzącą od świnki morskiej. Wyniki potwierdziły swoistość wykrytego antygenu wskazując, iż największa ilość białka w pożywce występuje od 96 do 120 godziny po infekcji (Rys. 45c.). Analizy przeprowadzono w odniesieniu do prób kontrolnych, ujemnej i dodatniej, które stanowiły referencyjny antygen w postaci wirusa RHD wyizolowanego z wątroby zakażonych królików i homogenat wątroby zdrowego królika.

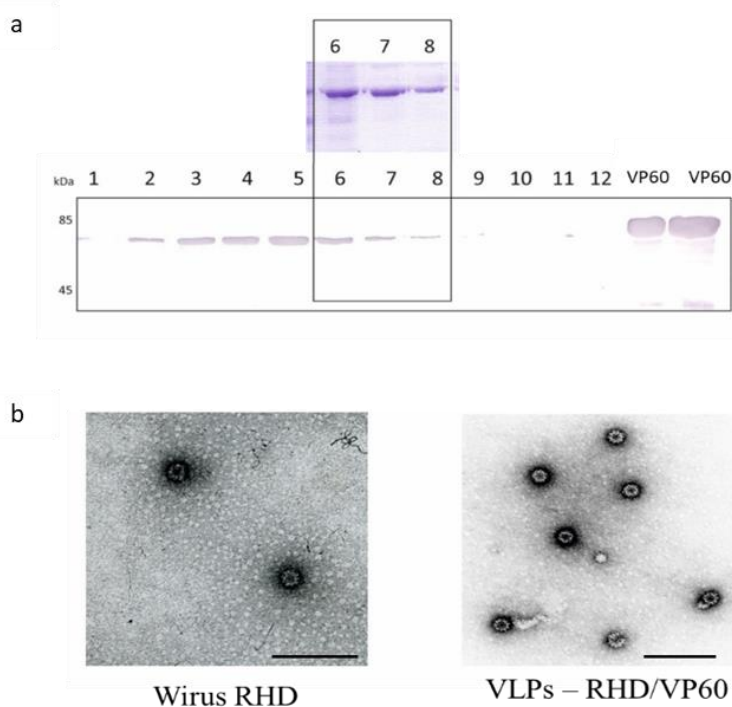


Rysunek 45. **Kinetyka formowania się cząsteczek wirusopodobnych w pożywce znad zakażonych komórek Sf9.** a) Schemat białka kapsydu (VP60) w formie monomeru, dimeru oraz cząstki wirusopodobnej. b) Formowanie cząsteczek wirusopodobnych (VLPs – RHDV/VP60) zbadano przy użyciu testu hemaglutynacji. Pożywkę znad zakażonych komórek owadzych zbierano w różnych czasach po infekcji i sprawdzano ich funkcjonalność zależną od konformacji testem HA. Kontrola pozytywna - referencyjny, natywny wirus RHDV szczepu SGM. Kontrolę negatywną stanowiła pożywka znad komórek owadzych zakażonych dzikim bakulowirusem BAC^{WT}. Krwinki stanowiły kontrolę negatywną eksperymentu. Na osi y przedstawiono zlogarytmowane wartości miano HA; h - godziny po infekcji. c) Detekcja białka kapsydu z użyciem przeciwciał rozpoznających epitopy liniowe i konformacyjne wirusa RHDV. Pożywka zawierająca VLPs-RHDV/VP60 została zebrana w różnych czasach po infekcji rekombinowanym bakulowirusem BAC^{VP60}. Następnie poszczególne próbki pożywki poddane zostały analizie przy użyciu testu ELISA. Do testu użyto króliczej surowicy anty-RHDV rozpoznającej epitopy liniowe i konformacyjne. Kontrolą negatywną była pożywka znad komórek owadzych zakażonych dzikim bakulowirusem BAC^{WT}. Kontrolą pozytywną był referencyjny wirus RHDV. d) Detekcja VLPs-RHDV/VP60 z użyciem przeciwciał monoklonalnych 1H8 rozpoznających epitop konformacyjny wirusa RHDV. Pożywka zawierająca VLPs-RHDV/VP60 została zebrana w różnych czasach po infekcji BAC^{VP60}. Następnie poszczególne próbki pożywki poddane zostały analizie przy użyciu testu ELISA. Do testu użyto monoklonalnych przeciwciał konformacyjnych 1H8 rozpoznających epitop konformacyjny w obrębie nieciągłej domeny P2. Kontrolą negatywną była pożywka znad komórek owadzych zakażonych dzikim bakulowirusem BAC^{WT}. Kontrolą pozytywną był referencyjny wirus RHDV szczep KGM.

W celu potwierdzenia, iż uzyskane wyniki odnoszą się nie tylko do monomeru białka VP60, ale również do cząstek VLPs-RHDV wykonano test ELISA z wykorzystaniem monoklonalnych przeciwciał konformacyjnych 1H8. Przeciwciała te reagują z epitopem konformacyjnym zlokalizowanym w warstwie zewnętrznej natywnych cząstek wirusowych. Test ELISA wykonywany był analogicznie z tą różnicą, iż przeciwciała monoklonalne sprzężone były z HRP. Wyniki potwierdziły, iż od 72 godziny można zaobserwować wydajną produkcję białka, które rozpoznawane jest przez przeciwciała rozpoznające epitopy konformacyjne, co sugeruje formowanie się cząstek wirusopodobnych (Rys. 45d.).

Otrzymane wyniki pozwoliły określić warunki hodowli, które były podstawą dalszych badań. W celu oczyszczenia cząstek wirusopodobnych VLPs-RHDV, komórki zakażono

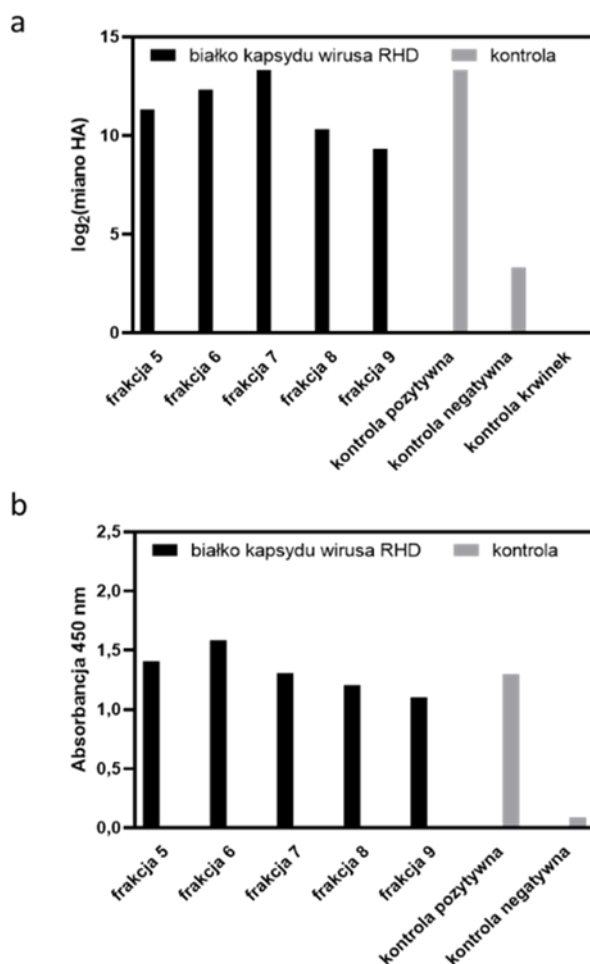
rekombinowanym bakulowirusem BAC^{VP60} przy m.o.i. równym 1, a hodowle prowadzono 96 godzin. 4 ml pożywki zawierającej rekombinowane białko VP60 w formie VLPs nałożono na skokowy gradient sacharozowy (60-20%) i ultrawirowano przez 90 minut przy 82000 x g w 4°C. Po tym czasie zbierano kolejne frakcje z gradientu. Każdą 600 µl frakcję poddano następnie rozdzielaniu w żelu poliakrylamidowym 10% w celu analizy jakościowej. Wybarwiony błękitem kumazyny żel poliakrylamidowy przedstawia rycina nr 46c. Masa cząsteczkowa białka ok. 60 kDa wyznaczona na podstawie szybkości migracji w żelu poliakrylamidowym w warunkach redukujących pozwala stwierdzić, iż we frakcjach odpowiadających ok. 35% stężeniu sacharozy znajduje się białko strukturalne wirusa RHD. W wyniku analizy wyodrębniono poszczególne frakcje zawierające białko VP60, a w celu potwierdzenia obecności VP60 wykonano immunodetekcję rozdzielonych białek techniką Western Blotting z użyciem poliklonalnej surowicy anti-VP60 (Rys. 46a). Badania potwierdziły, iż prążek na wysokości ok. 60 kDa zlokalizowany we frakcji 6, 7 i 8 zawiera białka VP60.



Rysunek 46. **Wynik oczyszczania i charakterystyka VLPs-RHDV/VP60.** a) Oczyszczanie poprzez ultrawirowanie w gradiencie gęstości sacharozy VLPs-RHDV/VP60. Komórki owadzie zakażono rekombinowanym bakulowirusem, hodowlę prowadzono 96 godzin po infekcji. Pożywkę naniesiono na gradient sacharozowy 60-20%, zebrano poszczególne frakcje i analizowano: górny panel - w żelu poliakrylamidowym 10% w warunkach redukujących barwiono błękitem kumazyny; dolny panel - wykonano immunodetekcję białka metodą Western Blotting z wykorzystaniem przeciwciał anti-VP60. b) Analiza porównawcza struktury oligomerycznej w formie VLPs białka VP60 przy użyciu techniki mikroskopii elektronowej. VLPs-VP60 oczyszczone w gradiencie gęstości sacharozy rozpuszczone w buforze TM, a następnie barwione negatywnie 2% octanem uranylu. Skala – 100 nm.

W celu potwierdzenia obecności cząsteczek wirusopodobnych, nanostruktury zostały uwidocznione przy użyciu mikroskopii elektronowej. W tym celu oczyszczone w gradiencie sacharozowym VLPs rozcieńczono w stosunku objętościowym 1:4 w buforze zawierającym dwuwartościowe jony wapnia (TM), a następnie przygotowano preparat na siatce niklowej opłaszczanej błoną węglową, który wybarwiano negatywnie 2% octanem uranylu. Dodatkowo

jako kontrolę pozytywną użyto natywnego wirusa RHD wyizolowanego z wątroby zakażonych królików, który oczyszczono w gradiencie gęstości sacharozy. Następnie przygotowano preparat do mikroskopii elektronowej analogicznie jak dla badanej próbki. Kontrolę negatywną stanowił bufor TM. Badanie metodą mikroskopii elektronowej (EM) potwierdziło obecność nanostruktur, które swoją budową przypominały natywnego wirusa. Widoczne w obrazie cząstki wirusopodobne były morfologicznie podobne do wirionów natywnego wirusa, miały identyczną wielkość (ok. 40 nm) oraz posiadały charakterystyczną strukturę (Rys. 46.).



Rysunek 47. **Wynik oczyszczania i charakterystyka VLPs-RHDV/VP60.** a) Analiza poszczególnych frakcji po ultrawirowaniu pod kątem zbadania właściwości funkcjonalnych VLPs-RHDV/VP60. Właściwości funkcjonalne potencjalnych nanostruktur badano testem hemaglutynacji. Kontrolę negatywną stanowiła pożywka z nad komórek owadzych zakażonych szczepem bakulowirusa typu dzikiego. Kontrolę pozytywną stanowił referencyjny wirus RHD szczep SGM. b) Analiza poszczególnych frakcji VLPs-RHDV/VP60 uzyskanych metodą ultrawirowania pod kątem ekspozycji epitopów konformacyjnych wirusa RHD. Wykonano pośredni test ELISA z wykorzystaniem referencyjnych monoklonalnych przeciwciał 1H8 wiążących epitopy konformacyjne RHDV. Kontrolę negatywną stanowiła pożywka z nad komórek owadzych zakażonych szczepem bakulowirusa typu dzikiego BAC^{WT}. Kontrolę pozytywną stanowił referencyjny wirus RHD szczep SGM.

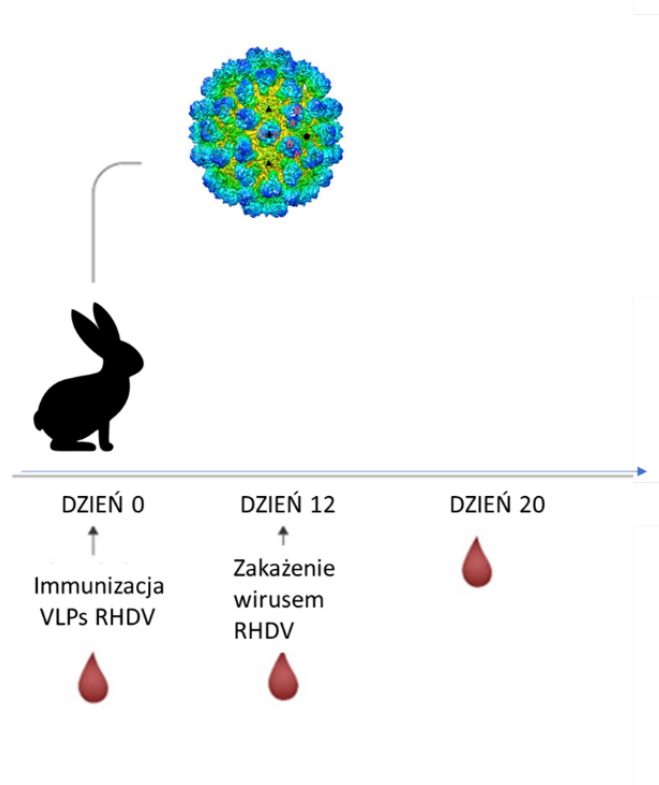
Istotnym była odpowiedź na pytanie czy wszystkie frakcje zawierają funkcjonalne białko oraz czy w każdej z tych frakcji białko to formuje cząstki wirusopodobne. Aby odpowiedzieć na to pytanie zostały wykonane przez dr hab. Andrzeja Fitznera testy ELISA z wykorzystaniem zarówno surowicy poliklonalnej anti-RHDV, jak również przeciwciał monoklonalnych CR. W celu potwierdzenia funkcjonalności tych nanostruktur wykonano dodatkowo badanie testem

hemaglutynacji (Rys. 47.), którego wynik jednoznacznie pokazuje, iż największą aktywność hemaglutynującą mają struktury znajdujące się we frakcji 7, usytuowanej w gradiencie odpowiadającym sacharozie w stężeniu 30-35%.

Wynik testu ELISA dowodzi, iż w wybranych do analizy frakcjach 5, 6 i 7 znajdują się nanostruktury białkowe, które rozpoznawane są przez przeciwciała rozpoznające epitopy zarówno konformacyjne, jak i liniowe. Proces otrzymywania oraz oczyszczania cząstek wirusopodobnych został zoptymalizowany i był podstawą dalszych badań.

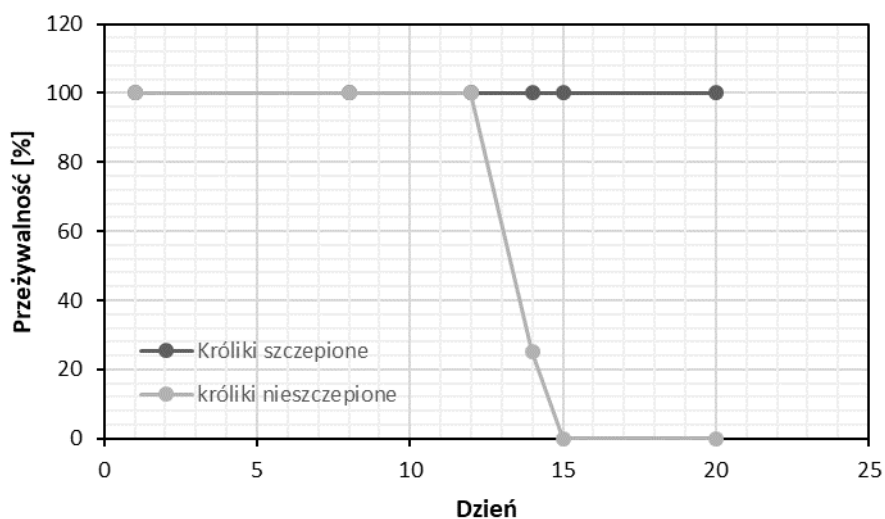
7.2.3. Ocena skuteczności preparatów szczepionkowych zawierających antygen w formie cząstek wirusopodobnych - eksperyment typu „challenge”

W celu oceny możliwości wykorzystania VLPs polskiego izolatu wirusa RHD jako potencjalnej szczepionki profilaktycznej wykonano badania na zwierzętach. Wszystkie badania z wykorzystaniem wirusa RHD przeprowadzone były w PIWet PIB ZPr w Zduńskiej Woli przez dr hab. Andrzeja Fitznera (Rys. 48.).



Rysunek 48. Schemat szczepienia królików oraz eksperymentalnego zakażenia wirusem RHD. Grupa 7 seronegatywnych dorosłych królików została zaszczepiona podskórnie dawką preparatu szczepionkowego zawierającego 200 μ g VP60-VLPs. Druga grupa 4 królików stanowiła kontrolę negatywną. W 12 dniu wszystkie zwierzęta zostały zainfekowane poprzez podskórną inokulację wirusem RHD o mianie HI = 1/10240, które stanowiło stukrotnie wyższą dawkę niż dawka śmiertelna czyli LD50 (ang. lethal dose 50). W celu oceny właściwości immunogennych jednodawkowej eksperymentalnej szczepionki nowej generacji w dniach 0, 12 po szczepieniu oraz 8 dni po eksperymentalnym zakażeniu pobrano próbki krwi w celu oznaczenia miana przeciwciał w testach HI oraz ELISA.

Spośród grupy królików szczepionych eksperymentalną szczepionką zawierającą VLPs RHDV wszystkie przeżyły próbę zakażenia i zostały skrwawione po upływie 10 dni. Spośród królików kontrolnych nr 8-11 trzy padły w okresie do 48 godziny po zakażeniu, a czwarty padł w trzeciej dobie przed 72 godziną. U królików immunizowanych stwierdzono wzrost poziomu przeciwciał w próbkach surowic pobranych w kolejnych dniach po szczepieniu i zakażeniu. Po zakażeniu u wszystkich królików nastąpił silny wzrost miana swoistych przeciwciał, co może sugerować stymulację układu odpornościowego w kierunku odpowiedzi humoralnej. Najwyższe miana swoistych przeciwciał w 12 dniu czyli przed zakażeniem natywnym wirusem RHD szczepu KGM miały króliki nr 3 i 4.



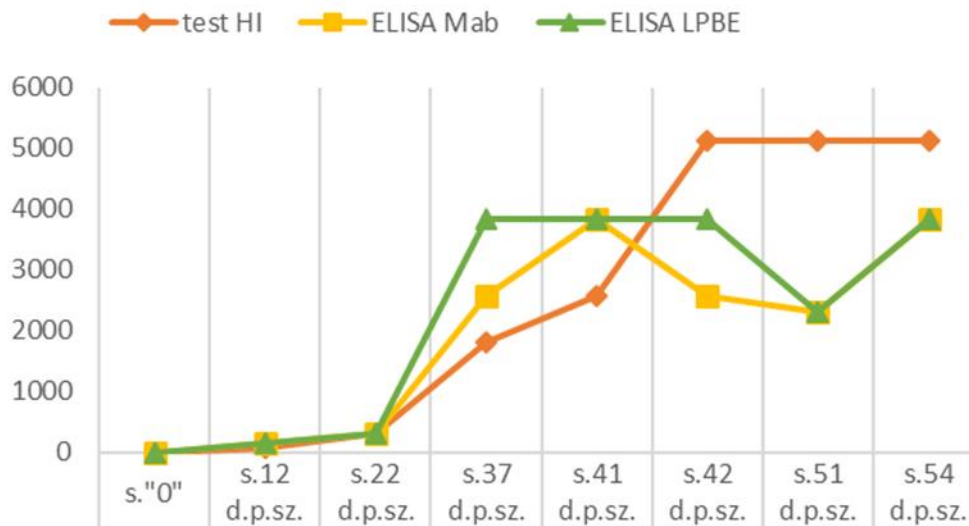
Rysunek 49. Krzywa przeżycia królików immunizowanych potencjalnym preparatem ochronnym VLPs-RHDV/VP60 poddanych zakażeniu wirusem RHD w warunkach eksperymentalnych. Grupa 7 królików została zaszczepiona eksperymentalną szczepionką opartą na VLPs-RHDV polskiego szczepu SGM. Grupa 4 seronegatywnych królików stanowiła kontrolę. Dwa z nich były nieszczepione, a dwa zostały zaszczepione pożywką z komórek Sf9. Po 12 dniach od szczepienia wszystkie zwierzęta zostały zainfekowane poprzez podskórną inokulację wirusem RHD o mianie HI = 1/10240, które stanowiło stukrotnie wyższą dawkę niż dawka śmiertelna czyli LD50 (ang. Lethal dose 50). Eksperyment był prowadzony 8 dni po eksperymentalnym zakażeniu.

7.2.4. Wykorzystanie antygenów w postaci VLPs oraz surowic odpornościowych do opracowania testów diagnostycznych

Produkcja specyficznych przeciwciał neutralizujących oraz antygenów, które wykazują właściwości zbliżone do natywnego wirusa umożliwia wykorzystanie tych cennych narzędzi do podjęcia próby opracowania testu diagnostycznego. Aby opracować test diagnostyczny w postaci testu ELISA należy dysponować przede wszystkim dużą pulą przeciwciał, które mogłyby być wykorzystane w tym teście. W tym celu w Zduńskiej Woli zaszczepiono króliki i kawy domowe zarówno oczyszczonym, jak również nieoczyszczonym antygenem w postaci VLPs-RHDV. Zaszczepiono w sumie 3 króliki oraz jedną świnkę morską nieoczyszczonym antygenem w formie VLPs w pożywce w obecności kompletnego adjuwantu Freund'a oraz 5 królików i 3 świnki morskie oczyszczonymi z pożywki VLPs-RHDV, również z dodatkiem kompletnego adjuwantu. W wyniku immunizacji zwierząt laboratoryjnych uzyskano silną odpowiedź immunologiczną, która prowadziła

do powstania wysoko dodatnich surowic poliklonalnych. Surowice odpornościowe uzyskane w wyniku szczepienia oczyszczonym preparatem wykazały wyższe miana, niż te szczepione preparatem zawierającym pożywkę z nadkażonych komórek.

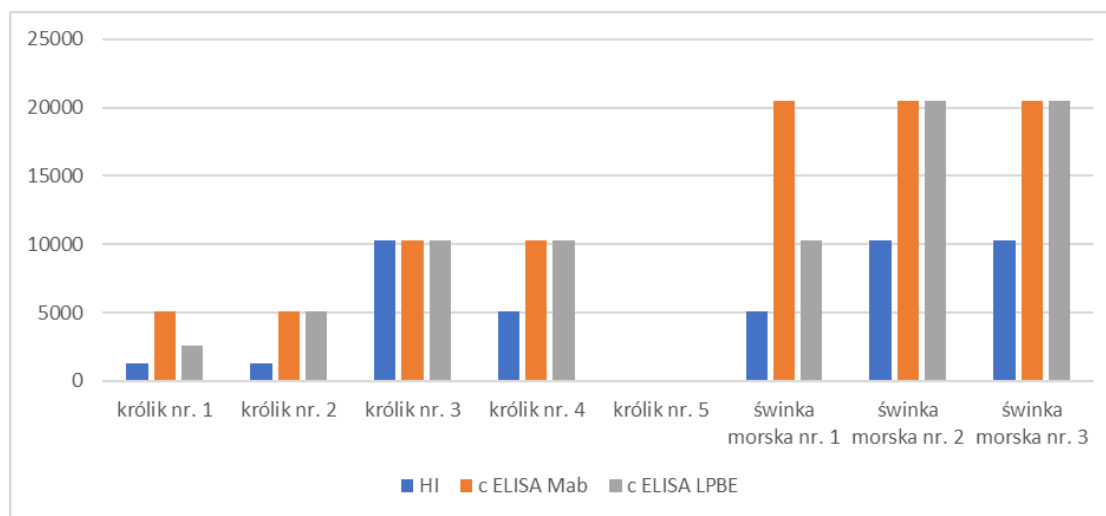
Do wykrywania oraz ilościowej oceny przeciwciał, w tym przeciwciał neutralizujących dr hab. Andrzej Fitzner opracował test kompetycyjny ELISA (ang. „competition ELISA”, cELISA). W metodzie tej płytkę 96 dołkową płaskodenną opłaszczono swoistą króliczą surowicą odpornościową. Następnie na płytkę naniesiono mieszaninę badanej surowicy i stałej dawki antygeny referencyjnego wirusa RHDV. W następnym etapie zastosowano przeciwciała monoklonalne CR, związane z enzymem peroksydazą chrzanową. Obecność przeciwciał w badanej surowicy wykryto spektrofotometrycznie na podstawie reakcji barwnej po dodaniu substratu OPD. Jak wskazują wyniki intensywny wzrost produkcji przeciwciał przypada na 41 dzień po pierwszym szczepieniu, a 19 dzień po drugim szczepieniu. Podanie drugiej dawki antygeny ma znaczący wpływ na poziom produkcji swoistych przeciwciał, co związane jest z kolejną ekspozycją antygeny wobec układu immunologicznego, który w wyniku pierwszego szczepienia/pierwszego kontaktu z antygenem wytworzył prawdopodobnie pulę komórek pamięci B (Rys. 50.).



Rysunek 50. *Dynamika narastania przeciwciał neutralizujących anty-VLPs w wyniku szczepienia królików określona przy użyciu testu zahamowania hemaglutynacji oraz kompetycyjnych testów ELISA. W testach ELISA wykorzystano referencyjne przeciwciała monoklonalne – ELISA Mab oraz poliklonalne przeciwciała królicze w teście LPBE (Liquid Phase Blocking ELISA). W teście zahamowania hemaglutynacji wykorzystano referencyjny antygen w postaci wirusa RHD.*

Postanowiono sprawdzić, czy swoiste przeciwciała uzyskane w wyniku szczepienia królików będą wykazywały zdolność do neutralizacji wirusa poprzez zahamowanie hemaglutynacji, a także oznaczyć dynamikę narastania przeciwciał w wyniku szczepienia królików VLPs RHDV z wykorzystaniem testu HI. W tym celu w Państwowym Instytucie Weterynarii w Zduńskiej Woli wykorzystując test HI oznaczono miana HI oraz wyznaczono krzywą wzrostu produkcji przeciwciał. Rysunek 50 prezentuje uzyskane wyniki, które wykazują, iż po 41 dniu po szczepieniu następuje gwałtowny wzrost ilości przeciwciał wiążących antygen (Rys. 50).

Następnie wykonano ocenę obecności przeciwciał anty-RHDV w surowicach odpornościowych królików i kawii domowych immunizowanych oczyszczonymi cząstkami VLPs. W tym celu przeprowadzono test zahamowania hemaglutynacji oraz testy cELISA z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych oraz poliklonalnych (Rys. 51.).



Rysunek 51. Ocena występowania przeciwciał anty-RHDV w surowicach zwierząt immunizowanych oczyszczonymi cząstkami VLPs-VP60. W teście zahamowania hemaglutynacji wykorzystano referencyjny antygen w postaci wirusa RHD. W testach ELISA wykorzystano referencyjne przeciwciała monoklonalne – ELISA Mab oraz poliklonalne przeciwciała królicze w teście LPBE (Liquide Phase Blocking ELISA).

W celu uzyskania reagentów - surowic odpornościowych do testów ELISA zaszczepiono 5 królików i 3 kawie domowe z użyciem antygeny RHDV w postaci cząstek VLPs. Najlepszą odpowiedź immunologiczną oraz największe stężenie przeciwciał zaobserwowano u królika nr 3 i 4 oraz u świnek morskich nr 2 i 3. Badanie surowic od wyżej opisanych zwierząt pobranych po ok. 2 tygodniach od podania dawki przypominającej wykazało obecność swoistych przeciwciał dla wirusa RHD o bardzo wysokich mianach (Rys. 51.).

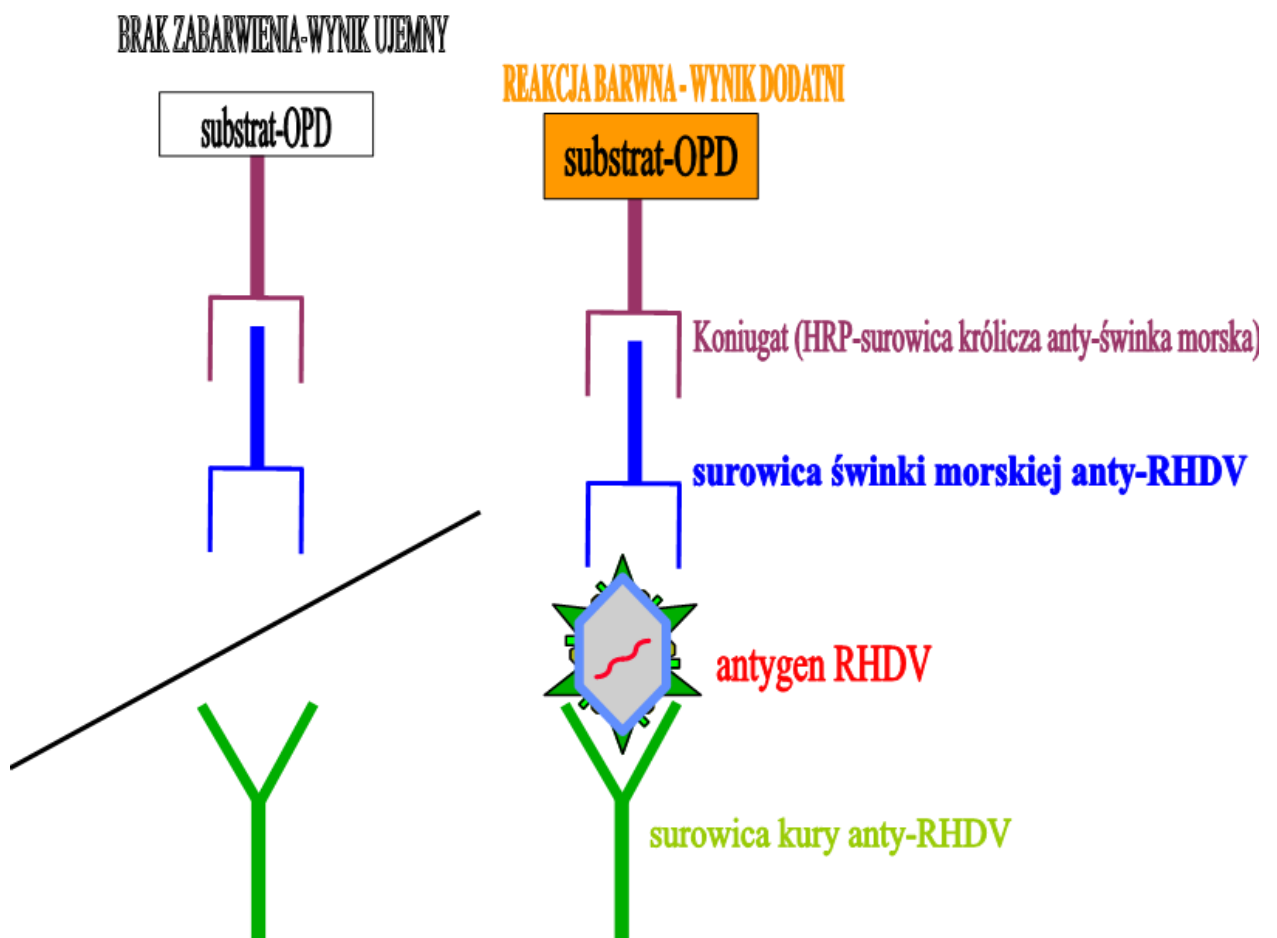
7.2.4.1. Opracowanie i walidacja testu diagnostycznego typu ELISA z wykorzystaniem VLPs-RHDV oraz surowic uzyskanych w wyniku immunizacji zwierząt

We współpracy z PIWet PIB ZPr w Zduńskiej Woli opracowano dwa testy diagnostyczne z wykorzystaniem uzyskanych antygenów oraz surowic.

Pośredni test ELISA do wykrywania antygeny wirusa krwotocznej choroby królików (RHDV) w materiale biologicznym

Do detekcji wirusa RHD w badanym materiale biologicznym (próbce), używa się poliklonalnych surowic odpornościowych króliczych i świnki morskiej zawierających swoiste przeciwciała, które wiążą się z determinantami antygenowymi wirusa. W pierwszym etapie badania stałe podłoże (płytko o właściwościach sorbcyjnych) opłaszczają się pierwszorzędowymi przeciwciałami (surowica poliklonalna kurza). Następnie antygen (badana próbka) wiąże się z podłożem, a w kolejnej fazie łączy z drugorzędowymi przeciwciałami obecnymi w surowicy świnki morskiej (Rys. 52.). W końcowym etapie zachodzi reakcja wiązania przeciwciał znakowanych

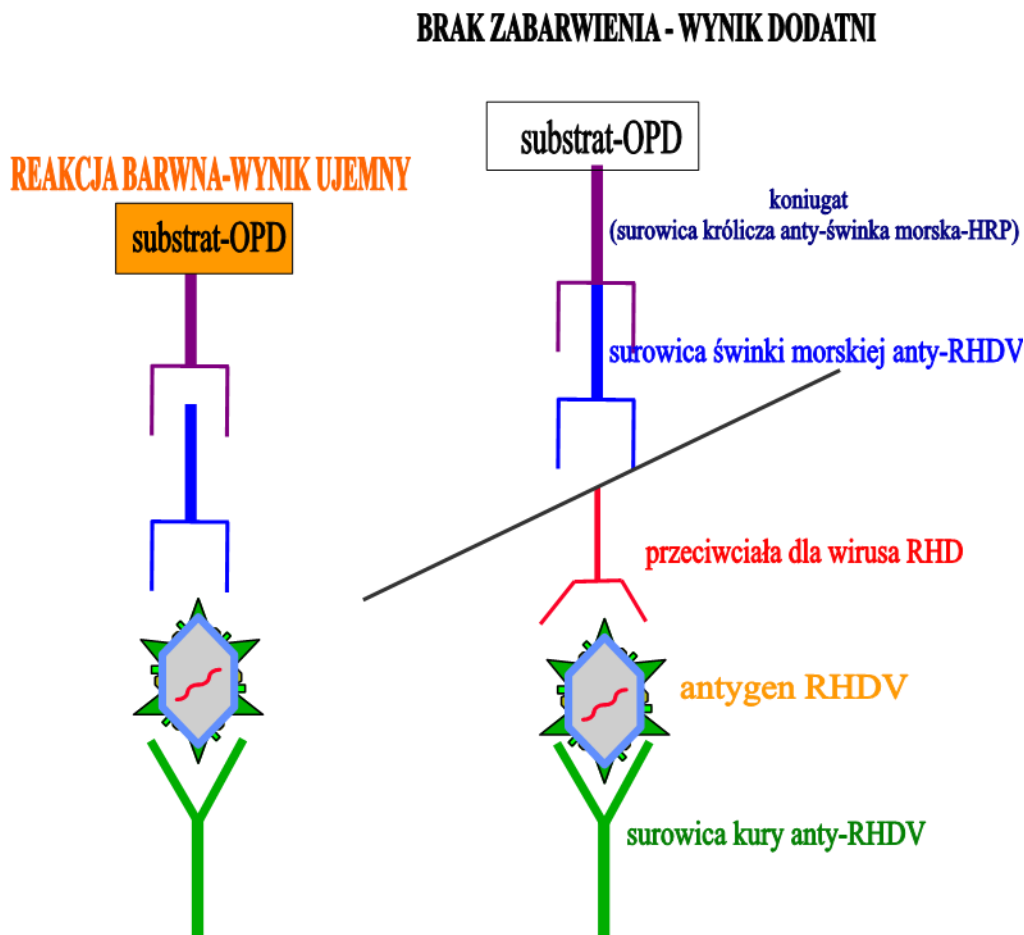
enzymem HRP z IgG surowicy świnki morskiej. Wizualnym wynikiem rozpadu substratu (OPD) pod wpływem enzymu obecnego w koniugacie jest reakcja barwna. Wynik dodatni czyli wykrycie antygeny wirusa RHD objawia się wystąpieniem silnej reakcji barwnej (kolor pomarańczowy). Intensywność zabarwienia mierzy się spektrofotometrycznie przy określonej długości fali, odpowiedniej dla substratu (492 nm). Metoda opracowana została w ZPr PIWet, z uwzględnieniem wytycznych przedstawionych w podręczniku „OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals” (5-ta edycja, 2004 r.) oraz w instrukcji „Instruction for RHD-EBHS virological kit” (RHD OIE Reference Laboratory, IZS Brescia, Włochy, 2004). Próbkę do badania przygotowuje się zgodnie z instrukcją nr I-01/ZPr/PB-08, 09, 10, 11 „Opracowanie i standaryzacja antygeny wirusa RHD” (1998).



Rysunek 52. Schemat pośredniego testu ELISA do wykrywania antygeny wirusa krwotocznej choroby królików (RHDV) w materiale biologicznym

Wykrywanie swoistych przeciwciał przeciwko wirusowi krwotocznej choroby królików (RHDV) w materiale biologicznym

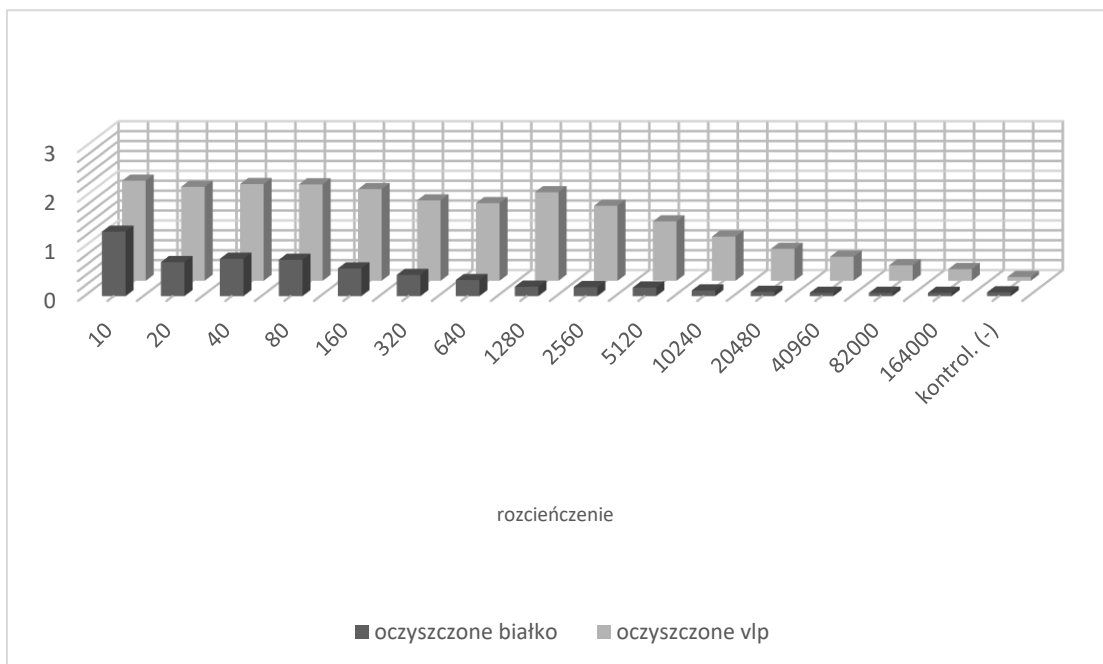
Przeciwciała przeciwko wirusowi RHD, jeśli są obecne w badanej surowicy wiążą się z antygenem RHDV i blokują jego wolne determinanty antygenowe uniemożliwiając przyłączenie się przeciwciał swoistych zawartych w poliklonalnej surowicy odpornościowej świnki morskiej. W wyniku tego nie dochodzi do reakcji z koniugatem i nie następuje degradacja substratu. Wizualnie nie stwierdza się reakcji barwnej (jasne pola) w studzienkach z surowicą kontrolną dodatnią i w badanych próbkach surowic, w których są obecne przeciwciała swoiste przeciwko wirusowi, natomiast w studzienkach z surowicą kontrolną ujemną, w kontroli antygenu i w badanych próbkach surowic, które nie zawierają swoistych przeciwciał występuje wyraźna reakcja barwna (intensywnie pomarańczowe pola) (Rys. 53.).



Rysunek 53. Schemat kompetycyjnego testu ELISA do wykrywania przeciwciał swoistych przeciwko wirusowi krwotocznej choroby królików (RHDV)

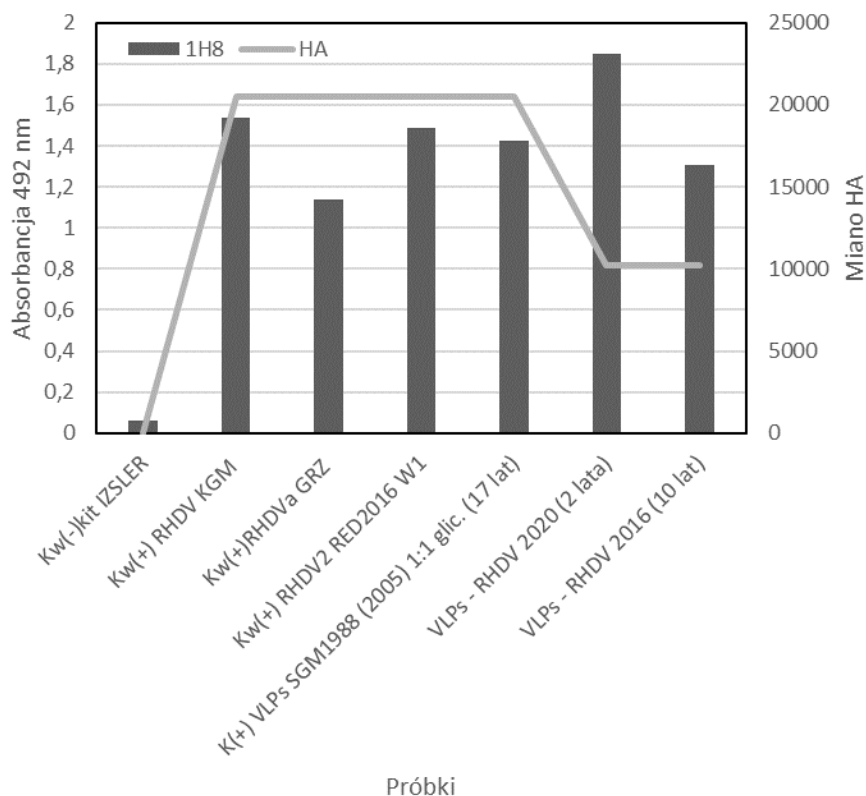
Cząstki wirusopodobne jako stabilne antygeny referencyjne wykorzystywane do opracowywania testów diagnostycznych

Ocena możliwości wykorzystania jako antygenów referencyjnych cząstek wirusopodobnych oraz analiza reaktywności antygeny w formie biologicznej nanostruktury z oczyszczonym białkiem VP60 w formie monomeru, wykazała niemal jednoznacznie zasadność stosowania VLPs jako antygenów referencyjnych do testów (Rys. 54.). Porównanie reaktywności oczyszczonego białka w formie liniowej oraz oczyszczonych VLPs wskazały jednoznacznie, iż do opracowywanego w ramach niniejszej pracy testu diagnostycznego o wiele bardziej zasadne będzie użycie jako antygeny referencyjnego VLPs. Antygen w postaci VLPs był reaktywny z przeciwciałami w rozcieńczeniu 1:82 000.



Rysunek 54. **Ocena możliwości wykorzystania jako antygenów referencyjnych cząstek wirusopodobnych.** Wykonano test ELISA LPBE z użyciem różnych rozcieńczeń antygenów w formie VLPs oraz w formie oczyszczonego białka. Na osi X przedstawiono rozcieńczenia surowic, na osi Y przedstawione zostały wyniki absorpcji.

Ostatnim etapem badań w ramach niniejszej pracy doktorskiej była ocena stabilności cząstek wirusopodobnych. Do badania użyto oczyszczone cząstki VLPs w gradiencie gęstości sacharozy. Następnie w stosunku objętościowym 1:1 dodano glicerol i przechowywano w -20°C przez wiele lat. Oczyszczone VLPs-RHDV przechowywano również bez dodatku glicerolu w temperaturze -20°C przez 2 i 10 lat. W celu sprawdzenia stabilności VLPs przeprowadzono test hemaglutynacji oraz test ELISA z wykorzystaniem przeciwciał skierowanych przeciwko epitomom konformacyjnym (Rys. 55.). Wykazano, iż antygen RHDV w postaci VLPs może być przechowywany z dodatkiem glicerolu w -20°C , nawet powyżej 15 lat nie tracąc właściwości hemaglutynujących oraz antygenowych (Rys. 55.).



Rysunek 55. **Analiza wyników stabilności VLPs-RHDV.** Stabilność VLPs RHDV zbadano w różnych odstępach czasu: 2, 10 i 17 lat. Przeprowadzono test hemaglutynacji oraz test ELISA z monoklonalnymi przeciwciałami 1H8. Kontrolę pozytywną stanowiły referencyjne szczepy wirusa RHD (KGM, GRZ oraz). RED2016

7.3. Podsumowanie

W ramach niniejszej pracy zoptymalizowano procedury prowadzące do produkcji dwóch typów cząstek wirusopodobnych. Złożone osłonkowe cząsteczki wirusopodobne uzyskano w trzech formach zarówno z jednym, dwoma, jak i trzema białkami strukturalnymi wirusa grypy typu H5N1. Szczepienie kur preparatami H5N1-VLPs doprowadziło do powstania przeciwciał neutralizujących. Dodatkowo wykazano, iż szczepienie kur brojlerów potrójnymi VLP HPAI H5N1 wyzwała wytwarzanie uniwersalnych przeciwciał anty-HA-stalk o szerokim spektrum. Te uniwersalne przeciwciała są zdolne do rozpoznawania antygenów w formie HA stalk zarówno z homologicznych szczepów wirusa ptasiej grypy H5N1, jak i heterologicznych szczepów H7N9, jak również z heterosubtypowych szczepów wirusa grypy ludzkiej H1N1 i H3N2.

Ikozaedralne cząstki wirusopodobne zbudowane z jednego białka kapsydu uzyskano dla polskiego szczepu SGM wirusa RHD. Szczepienie królików eksperymentalną szczepionką przeciwko pomorowi królików wykazało 100% ochrony. Uzyskane surowice poliklonalne oraz antygeny w formie VLP RHDV posłużyły do opracowania dwóch testów diagnostycznych wykorzystywanych obecnie do monitorowania występowania wirusa RHD w Polsce.

Uzyskane wyniki wnoszą nowe spojrzenie na konstrukcje preparatów szczepionkowych nowej generacji.

8. Dyskusja

Wirusy RNA stanowią obecnie jedno z największych zagrożeń zdrowia publicznego, którego istotnym problemem staje się ochrona przed nowymi zakażeniami. Rozwój nauki w ostatnich latach pozwolił na intensyfikację badań w dziedzinie szczepionek nowej generacji. Te ochronne preparaty składają się bardzo często z rekombinowanych antygenów uzyskanych w różnych systemach ekspresji. W ciągu ostatnich lat największą uwagę poświęca się możliwości wykorzystania biologicznych nanostruktur w postaci cząstek wirusopodobnych (VLPs) jako bezpiecznych i efektywnych preparatów ochronnych. Wykorzystanie tych biologicznych nanostruktur nie ogranicza się jednak do opracowania nowych szczepionek, są one również cennym narzędziem do badań diagnostycznych, szczególnie wówczas gdy ze względów bezpieczeństwa niemożliwe jest zastosowanie odpowiednich kontroli opartych o infekcyjne wirusy (26). Wykorzystanie VLPs jako referencyjnych kontroli pozytywnych rozwiązuje powyższy problem. Cząstki wirusopodobne wykorzystywane są również jako system zastępczy dla wirusów słabo lub nienamnażających się w hodowlach komórkowych *in vitro*. Przykładem jest wykorzystanie VLPs jako modelu zastępczego dla takich wirusów jak: norowirus, króliczy kaliciwirus, wirus brodawczaka ludzkiego czy wirus Marburg (158).

Wirusy odzwierzęce stanowią poważne zagrożenie epidemiologiczne zarówno w aspekcie zdrowia publicznego, jak i strat ekonomicznych związanych z hodowlą zwierząt (159). Wirusy ptasiej grypy oraz królicze kaliciwirusy stanowią zagrożenie epidemiologiczne na terenie Polski, Europy i świata. Oba z wymienionych wirusów RNA odpowiadają za znaczące straty w produkcji mięsa drobiowego i króliczego (160) (161).

Celem niniejszej pracy była konstrukcja i produkcja cząstek wirusopodobnych oraz ich zastosowanie do monitorowania i zapobiegania infekcjom wywoływanym przez wybrane wirusy RNA. Pierwszy model badawczy stanowiły osłonkowe helikalne ortomyksowirusowe cząsteczki wirusopodobne wirusa grypy typu A. Drugi model badawczy stanowiły bezosłonkowe ikozaedralne kaliciwirusowe cząstki wirusopodobne zbudowane z jednego białka kapsydu. W niniejszej pracy zastosowano polskie szczepy terenowe wirusów RNA: szczepy wirusa ptasiej grypy typu A H5N1 oraz wirusa gorączki krwotocznej królików szczepu SGM genotypu G1.1 genogrupy 2 (162). Wybrane wirusy zostały scharakteryzowane na podstawie uzyskanych sekwencji kodujących główne białka strukturalne. Dodatkowo wytworzone zostały specyficzne narzędzia do badań: antygeny w formie pełnej długości rekombinowanych białek wirusowych oraz surowice umożliwiające immunodetekcję. Otrzymane w niniejszej pracy narzędzia posłużyły następnie do konstrukcji i produkcji cząstek wirusopodobnych polskich szczepów terenowych wirusa grypy H5N1 oraz wirusa RHD.

Realizowane prace były częścią dwóch projektów badawczych i umożliwiły wprowadzenie do Zakładu Szczepionek Rekombinowanych na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii UG GUMed zoptymalizowanych procedur związanych z konstrukcją, produkcją oraz oczyszczaniem różnych cząstek wirusopodobnych, co przyczyniło się do uzyskania finansowania innych projektów typu B+R.

8.1. Wirus grypy typu A H5N1

Pierwszym modelem badawczym wykorzystanym w niniejszej pracy był wysokopatogeny szczep wirusa ptasiej grypy o fenotypie H5N1 wyizolowany w 2006 roku od padłych dzikich łabędzi (szczep wykorzystany w tej pracy A/swan/Poland/305-135v08-2006). W Polsce w latach 2006-2007 odnotowano trzy przypadki epidemii ptasiej grypy podtypu H5N1 (163). Z powodu wyżej opisanych epidemii zlikwidowano kilkaset tysięcy kurcząt, co w konsekwencji pociągnęło za sobą bardzo duże straty ekonomiczne szacowane na 10 milionów złotych z tytułu samych odszkodowań. Straty ekonomiczne wywołane przez wirusa ptasiej grypy na całym świecie liczy się w miliardach dolarów rocznie. RNA wirusa grypy H5N1 polskiego izolatu z 2006 roku został otrzymany od dr hab. Krzysztofa Śmietanki z Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach. Powielenie materiału genetycznego kodującego pełnej długości białka strukturalne (HA, NA, M1) wykonano za pomocą reakcji odwrotnej transkrypcji. Pierwsza otrzymana sekwencja nukleotydowa pełnej długości genu hemaglutyniny kodującego główne białko wirusowe posłużyła do analiz „*in silico*”. Analiza porównawcza z innymi szczepami wykazała, że badany gen wywodzi się od wirusa ptasiej grypy o fenotypie H5N1. Na podstawie analizy filogenetycznej wykazano, że szczep ten jest blisko spokrewniony z izolatami ptasiej grypy z okolic południowo-zachodniej Rosji - Astrakhanu. Dalsze analizy „*in silico*” sekwencji aminokwasowej rejonu miejsca cięcia hemaglutyniny wykazały rozbudowany motyw poliargininowy, który jest typowy dla hemaglutynin serotypu H5 pochodzących ze szczepów o fenotypie wysokopatogenym (HPAI). Zwiększona wrażliwość na komórkowe proteazy szczepów HPAI powoduje, iż tropizm tkankowy zostaje zachwiany (164). Szczepy HPAI H5 i H7 zawierające sekwencję poliargininową odpowiedzialne są za epidemie u ptactwa hodowlanego. Analizy filogenetyczne wykonane przez dr hab. Krzysztofa Śmietankę wykazały, że polski izolat H5N1 z 2006 roku można zaliczyć do kladu 2.2.2 (165). Analizy filogenetyczne wykonane na potrzeby tej pracy potwierdziły przynależność tego wirusa do kladu 2.2.2. W wyniku porównania poszczególnych sekwencji reprezentujących dane klady w obrębie podtypu H5N1 wyszczególniono istotne różnice w sekwencji aminokwasowej. Ze względu na różny wpływ poszczególnych mutacji, postanowiono omówić je tematycznie.

Hemaglutynina jest główną glikoproteiną wirusa grypy, która odpowiada za wiązanie receptora na powierzchni komórki gospodarza oraz późniejszą fuzję błon (51). Tropizm wirusa grypy uzależniony jest od wiązania specyficznych receptorów występujących na powierzchni komórki gospodarza. Jak wynika z danych literaturowych, reszty aminokwasowe zaangażowane w interakcje z receptorem komórkowym są wysoce konserwowane wśród wszystkich 18 podtypów hemaglutynin. Pojedyncze substytucje w obrębie tych reszt aminokwasowych mogą wpłynąć na specyficzność rozpoznawanych receptorów, co w konsekwencji może prowadzić do przełamania bariery gatunkowej skutkując powstaniem nowych szczepów odzwierzęcych (166) (167) (168). Ze względu na bardzo duże ryzyko powstania nowego pandemicznego szczepu, miejsce wiązania receptora (receptor binding site - RBS) było przedmiotem wielu badań. Określono, iż RBS składa się z poszczególnych reszt aminokwasowych: 98, 134-138, 153, 155, 183, 190, 194, 212 oraz ważnej sekwencji 222-228. (169) (170) (171). Analiza porównawcza sekwencji aminokwasowej polskiego szczepu H5N1 z sekwencjami przedstawicieli innych cladów (**2.1-A/Vietnam/05**; **1'-A/HongKong/213/03**; **3-A/HongKong/156/97**; **2.1-A/Indonesja/7/03**) wykazała kilka zmian. D94N jest substytucją występującą blisko miejsca RBS, jednakże reszta aminokwasowa w pozycji Y98 pozostała niezmienną. W obrębie rejonu 134-138 występują różnice pomiędzy szczepami

izolowanymi w latach 1997-2003 a pochodzącymi z lat 2004-2006, w pozycji L137Q. Ze względu na fakt, iż leucyna jest aminokwasem niepolarnym a obszary niepolarne ułatwiają przyłączaniu hydrofobowych makrocząsteczek, zmiana tego aminokwasu na glutaminę, która zawiera obszary polarne może prowadzić do zmiany właściwości i funkcji biologicznych. Kolejna zmiana może w konsekwencji prowadzić do utraty jednego miejsca N-glikozylacji w pozycji E212K. Polskie szczepy nie posiadały mutacji w miejscach 222-224. Jak wskazują dane literaturowe mutacje Q222L i G224S są kluczowe, gdyż rozszerzają zakres rozpoznawania receptorów ludzkich.

W 2012 roku grupa Wanga zidentyfikowała kolejne kluczowe reszty aminokwasowe, które biorą udział w procesie rozpoznawania receptora oraz w procesie dojrzewania hemaglutyniny podczas syntezy. Wykazano, że reszty aminokwasowe F147/F148, Y161, N170, R220, K307/K310 są bardzo ważne podczas infekcji wirusa grypy (172). Analiza sekwencji aminokwasowej hemaglutyniny polskiego szczepu z 2006 roku nie wykazała różnic w obrębie wyżej wymienionych pozycji. Polski izolat nie zawierał również substytucji H103Y, która została opisana dla izolatu A/Indonesia/5/05, a która prawdopodobnie wpływa na temperaturo - zależność hemaglutyniny oraz wrażliwość na pH (173). Wkazuje, że substytucje w pozycji T156A oraz N154D również mają wpływ na transmisję międzygatunkową reasortantów H5. Zmiana tych reszt aminokwasowych skutkuje zaburzeniem profilu cukrowego HA. Utrata miejsc glikozylacji może mieć wpływ na wirulencję wirusa. W wyniku analiz wykazano obecność mutacji T156A oraz N154D w obrębie HA. W obrębie sekwencji polskiego izolatu wykazano obecność jeszcze jednej mutacji T315I, która prawdopodobnie stabilizuje peptyd fuzyjny (173) (174).

Sekwencja aminokwasowa rejonu wiązania receptora, która odpowiada za specyficzność gatunkową jest charakterystyczna dla ptasich izolatów wirusa A/H5N1. Kolejne zmiany aminokwasów zlokalizowane były głównie w podjednostce HA1 tworzącą główkę, ze wskazaniem na rejon wiązania receptora, w którym to zlokalizowane są główne determinanty antygenowe. Możemy wymienić poszczególne mutacje wpływające na odmienny profil antygenowy: D94N, L175, T188, K189R, które z kolei mogą mieć wpływ na interakcję w obrębie monomeru HA z resztami aminokwasowymi Y91, H179, L190, co z kolei może modulować wiązanie receptora. Brak substytucji reszty seryny w pozycji 223 na resztę asparaginy nie ułatwia wiązania receptora typu alfa 2,6. Ponadto reszty aminokwasów V226 oraz L228 (w numeracji H5), istotne w determinacji specyficzności gatunkowej, są charakterystyczne dla ptasich szczepów A/H5N1 (WHO, 2005). Zlokalizowano 7 potencjalnych miejsc N-glikozylacji, z których 5 znajduje się w regionie podjednostki HA1, a 2 w obrębie podjednostki HA2. Duża liczba miejsc glikozylacji jest typowa dla izolatów o wysokiej dynamice ewolucyjnej. Wzrost liczby łańcuchów oligosacharydowych jest bowiem ściśle związany ze zjawiskiem maskowania epitopów. Dwa z przewidzianych miejsc N-glikozylacji występuje blisko sekwencji wchodzących w skład RBS, co może mieć wpływ na oddziaływanie hemaglutyniny z receptorem (modyfikacja powinowactwa lub/i specyficzności) (122). Miejsce cięcia hemaglutyniny zlokalizowano w odcinku sekwencji aminokwasowej w pozycji 340-350, która jest typowa dla wysokopatogennych szczepów wirusa ptasiej grypy. Miejsce cięcia posiada strukturę z rozbudowanym traktem poliargininowym, który rozpoznawany jest przez proteazy komórkowe subtylizynopodobne. W wyniku analiz „in silico” zlokalizowano pojedynczy region transbłonowy położony blisko C-końca łańcucha polipeptydowego, co jest charakterystyczne dla wszystkich hemaglutynin oraz innych białek błonowych klasy I.

Drugą otrzymaną sekwencją była sekwencja kodująca główną glikoproteiną powierzchniową neuraminidazę (NA). Sekwencję aminokwasową NA uzyskano w wyniku procesu

konwersji *in silico* z użyciem programu ExPasy Translate Tool, która kodowała białko o długości 449 reszt aminokwasowych.

Analiza porównawcza z sekwencjami zawartymi w biologicznych bazach danych z wykorzystaniem algorytmu BLAST potwierdziła, iż uzyskana sekwencja stanowi gen kodujący neuraminidazę serotypu N1 wirusa ptasiej grypy A/H5N1. W wyniku kolejnych analiz *in silico* określono lokalizację regionu transbłonowego, który obejmuje reszty aminokwasowe 7-33. Dodatkowo w obrębie 1-30 reszty aminokwasów znajduje się sekwencja sygnałna kierująca niedojrzałe białko do światła retikulum endoplazmatycznego. Ogonek cytoplazmatyczny tworzony jest przez pierwsze 6 reszt aminokwasów, a całe białko wykazuje lokalizację zewnątrzkomórkową. Dodatkowo ustalono potencjalne 4 miejsca N-glikozylacji zgodnie z danymi literaturowymi (128). W wyniku porównania różnych izolatów H5N1 ustalono, iż polski izolat jest najbliższym spokrewnionym z izolatem rosyjskim Astrakhan, tak jak w przypadku wyników uzyskanych dla segmentu 4 kodującego hemaglutyninę.

W 2013 roku Yongkiettrakul i wsp. opublikowali pracę na temat funkcji poszczególnych reszt aminokwasowych w obrębie sekwencji neuraminidazy. Reszty aminokwasowe warunkujące aktywność enzymatyczną to: 118, 151, 152, 224, 276, 293, 347, 371 i 406 (175). Analiza sekwencji aminokwasowej NA polskiego szczepu H5N1 wykazała, że w obrębie wymienionych reszt aminokwasowych występuje substytucja R152M. Mutacja ta może mieć wpływ na aktywność enzymatyczną neuraminidazy. Ponadto wiadomo, iż niektóre reszty aminokwasowe stabilizują strukturę i konformację neuraminidazy; możemy do nich zaliczyć poszczególne reszty aminokwasowe: 119, 136, 149, 156, 178, 179, 198, 222, 227, 252, 274, 277, 294 i 425. Izolat polski posiada mutację Y252I, która może wpływać na stabilność struktury homotetrameru oraz wpływać na zmniejszoną wrażliwość na Oseltamiwir (176) (177). Pozostałe mutacje to P340L, G336D, K432E, które mogą wpływać na antygenowość białka wirusowego. Stwierdzono również dwie delecje: pierwszą pojedynczą w miejscu G258 oraz drugą 9 aa w obrębie regionu 451-458 aa, które są typowe dla szczepów ludzkich oraz świńskich. Nie zaobserwowano jednak obecności mutacji, które zostały opisane jako kluczowe dla wirulencji wirusa czy też powodujących oporność na Oseltamivir (178) (176) (175) (174) (179).

Kolejnym etapem i jednym z głównych celów prezentowanej rozprawy doktorskiej była konstrukcja cząstek wirusopodobnych wirusa ptasiej grypy. W pierwszej kolejności opracowano metodykę związaną z oczyszczaniem i zobrazowaniem cząstek wirusa grypy jako modelu do późniejszych prac z cząstkami wirusopodobnymi. Uzyskane wyniki potwierdziły, możliwość oczyszczania cząstek wirusowych poprzez ultrawirowanie w skokowym gradiencie cukrowym. Wizualizacja wirusa grypy poprzez transmisyjną mikroskopię elektronową wymagała optymalizacji procedury barwienia negatywowego. Dane literaturowe opisują szereg metod barwienia negatywowego z wykorzystaniem octanu uranylu, kwasu wolfranowego, kwasu fosfowolfranowego, molibdenianu amonu. Najlepsze wyniki barwienia negatywowego uzyskano stosując kwas fosfowolfranowy.

W celu uzyskania cząstek wirusopodobnych skonstruowano szereg kaset ekspresyjnych mono, bi i tricistronowych wprowadzonych do wektorów transferowych pFastBac1. Monocistronowe kasety zawierały gen kodujący neuraminidazę, hemaglutyninę lub białko rdzenia M1 pod kontrolą promotora polihedryny. Bicistronowa kasetka zawierała geny kodujące białko hemaglutyniny i białko rdzenia w jednej orientacji pod kontrolą promotorów polihedryny. Tricistronowa kasetka zawierała geny kodujące białko neuraminidazy, hemaglutyniny i białko rdzenia w jednej orientacji pod kontrolą promotorów polihedryny.

Kolejny etap polegał na uzyskaniu wysokich mian lizatów bakulowirusowych niosących uzyskane mono-, bi- i tricistronowe kasety, które posłużyły do późniejszej produkcji VLPs. W tym celu porównano dostępne w literaturze techniki mające na celu uzyskanie wysokich mian wirusowych. Namnażanie bakulowirusów w hodowlach płynnych, a następnie oczyszczanie poprzez ultrawirowanie nie przyniosło zadowalających efektów, dlatego też postanowiono zmodyfikować przyjętą w Zakładzie Szczepionek Rekombinowanych procedurę namnażania bakulowirusów (180). Modyfikacja polegała na namnażaniu lizatów bakulowirusowych w większych objętościach w hodowli stacjonarnej przy minimalnej ilości pożywki znajdującej się nad zakażonymi komórkami. Do produkcji biologicznych nanostruktur wirusa grypy stosowano wczesny pasaż lizatów bakulowirusowych, o mianie od 7×10^7 do 10^9 .

Pierwszym typem otrzymanych cząstek wirusopodobnych była cząsteczka zawierająca białko hemaglutyniny. Komórki owadzie Sf9 zostały zakażone rekombinowanym bakulowirusem niosącym kasetę monocistronową z genem *ha*. Na wstępie określono dynamikę tworzenia się zewnątrzkomórkowych pęcherzyków zawierających białko HA. Najlepsze wyniki uzyskano w hodowli komórkowej prowadzonej przez 60 godzin po infekcji komórek linii Sf9. Dodatkowo wykazano, iż w hodowlach stacjonarnych proces produkcji VLPs jest bardziej wydajny w porównaniu do wyników uzyskanych w hodowli płynnej. Cząstki wirusopodobne H5N1-HA VLPs oczyszczono w gradiencie cukrowym i scharakteryzowano przy użyciu technik mikroskopii elektronowej.

Kolejny etap pracy polegał na otrzymaniu VLPs składających się z dwóch białek strukturalnych wirusa grypy H5N1-HA/M1 VLPs. Podczas tego etapu dokonano porównania efektywności tworzenia się VLPs wirusa grypy stosując procedury ko-infekcji oraz ko-ekspresji. W tym celu wykonano zakażenie komórek owadzych stosując bicistronowego rekombinanta bakulowirusowego, który zawierał strukturalne białka wirusa grypy oraz ko-infekcję dwoma rekombinantami bakulowirusowymi posiadającymi analogiczne geny kodujące białka wirusa grypy. Wyniki wskazały jednoznacznie, iż w wyniku ko-ekspresji VLPs powstają wydajniej niż w przypadku infekcji wieloma bakulowirusami naraz. Jest to prawdopodobnie związane z faktem, że podczas ko-ekspresji każda komórka produkuje jednocześnie wszystkie białka wirusowe (181) (182), które zostały wprowadzone do DNA bakulowirusowego. W przypadku ko-infekcji prawdopodobne jest, iż nie wszystkie komórki zostaną zakażone dwoma lub trzema rekombinantami bakulowirusowymi. Co ważniejsze, w skutek ko-infekcji dochodzi prawdopodobnie do tworzenia się różnych form cząstek zewnątrzkomórkowych, które mogą posiadać na swojej powierzchni różne kombinacje wirusowych glikoprotein. Kolejny etap pracy polegał na otrzymaniu VLPs składających się z trzech białek strukturalnych wirusa grypy H5N1-HA/M1/NA VLPs. W przypadku wirusa grypy prawdopodobne jest, iż w wyniku ko-infekcji konstruktami monocistronowymi tworzyć się będą różne rodzaje VLPs zawierające jedno, dwa lub wszystkie z trzech białek M1, HA oraz NA. Cząstki wirusopodobne H5N1 HA/M1 oraz H5N1 HA/M1/NA oczyszczano zgodnie ze zoptymalizowaną metodą wirowania w gradiencie gęstości sacharozy, a następnie analizowano w żelu poliakrylamidowym oraz wizualizowano przy użyciu techniki transmisyjnej mikroskopii elektronowej. Dane literaturowe opisują wiele rodzajów VLPs otrzymanych dla różnych typów wirusów grypy (H5N1, H1N1, H7N9, H3N2) przy zastosowaniu różnych strategii (75) (183) (184) (185) (186) (187) (188) (189). Uzyskane wyniki korelują z wynikami opisanymi przez inne grupy badawcze (126). Podsumowując, najbardziej efektywny sposób wytwarzania VLPs to ko-ekspresja genów wirusa grypy z jednej kasety ekspresyjnej, a nie ko-infekcja pojedynczymi wektorami (190) (191) (185) (192). Pierwszy sposób ma pewne zalety

w stosunku do drugiego. Po pierwsze nie ma konieczności generowania wielu rekombinantów bakulowirusowych kodujących pojedyncze białka wirusa grypy, co obniża koszty wytwarzania oraz skraca czas produkcji. Ponadto wielokrotność infekcji podczas ko-ekspresji powinna być stosunkowo duża (3), lecz nie aż tak (5-10), jak w przypadku ko-infekcji, co z kolei znacząco wpływa na nakłady finansowe związane z komercjalizacją. Innym aspektem jest dobór promotora (193).

W literaturze w zależności od obecności białek strukturalnych wirusa grypy użytych do produkcji biologicznych nanostruktur można wyróżnić różne rodzaje cząstek: pozakomórkowe cząstki sub-wirusowe składające się z hemaglutyniny, neuraminidazy i białka M2, ale pozbawione białka rdzenia M1 (194) (195) (196) (185); cząstki wirusopodobne zawierające białko M1 oraz glikoproteiny wirusa grypy lub/i białko strukturalne M2 (197) (198) (189) (199), cząsteczki kapsydopodobne zawierające tylko białko rdzenia M1 (200), i wreszcie cząstki pseudowirusowe grypy, których produkcja oparta jest na platformie wykorzystującej wektory lentiwirusowe oraz białko Gag (201) (202) (203).

Zoptymalizowane w tej pracy procedury pozwoliły zbadać, czy i z jaką wydajnością będą tworzyć się pozakomórkowe cząstki sub-wirusowe niosące na swojej powierzchni hemaglutyninę, cząstki wirusopodobne zawierające białko M1 oraz hemaglutyninę i cząstki wirusopodobne zawierające białko M1 oraz dwie glikoproteiny HA i NA. Uzyskane wyniki wskazują, że cząstki wirusopodobne produkowane są z wysoką wydajnością, natomiast cząsteczki najbardziej złożone zawierające obie glikoproteiny wirusa grypy tworzyły się z najmniejszą wydajnością. Uzyskana wydajność produkcji VLPs (H5N1-HA – 1,2 mg/L; H5N1-HA/M1-VLPs – 0,7 mg/L; H5N1-HA/NA/M1 VLPs – 0,6 mg/L) czyni uzyskane cząstki atrakcyjnymi antygenami, które mogą być wykorzystane do testów ELISA do monitorowania obecności przeciwciał u ptactwa i zwierząt. Uzyskana wydajność była zbliżona do wydajności opisywanej w literaturze (204). Dane literaturowe dotyczące porównania wydajności produkcji oraz jakości w dwóch liniach komórek owadzych tj. *Spodoptera frugiperda* (Sf9) i linia komórek *Trichoplusia ni* WIT-TN5B1-4 (High Five) wykazała dramatyczne różnice w wydajności i gęstości cząstek, jak również w poziomie zanieczyszczenia cząstkami bakulowirusowymi. Uważa się, że linia komórek owadzych WIT-TN5B1-4 powinna być linią rekomendowaną do produkcji VLPs grypy (204).

Charakterystyka cząsteczek wirusopodobnych H5N1-HA, H5N1-HA/M1 i H5N1-HA/M1/NA testem hemaglutynacji wykazała zdolność do hemaglutynacji na poziomie kontroli pozytywnej w postaci inaktywowanego wirusa H5N1 i H5N2. Wskazuje to na obecność poprawnie zwiniętej w postać trimery hemaglutyniny na powierzchni VLP.

Wyprodukowane i oczyszczone cząstki wirusopodobne posłużyły do szczepienia zwierząt w celu oceny właściwości immunogennych uzyskanych biologicznych nanostruktur (205). VLPs imitując cząstki wirusowe i zawierając funkcjonalne białka wirusowe są zdolne do wnikania do komórek. Ponadto te nanocząstki, zawierając wiele powtórzeń tych samych białek, w tym przypadku antygenów, stanowią prawdopodobnie swego rodzaju wzorce molekularne PAMP, co powoduje efektywne stymulowanie układu odpornościowego. Ważnym jest również fakt, że jako funkcjonalne nanostruktury rozpoznają receptory na danym typie komórek gospodarza (206). Wykazano również dla VLPs grypy otrzymanych w komórkach owadzych, doskonałe właściwości stymulujące układ odpornościowy charakterystyczny dla adiuwantów, są one zdolne do indukowania wrodzonej i nabytej odpowiedzi immunologicznej (126) i mogą stymulować produkcję komórek pamięci oraz prowadzić do powstania odporności krzyżowej, jak również i ochrony (207) (208).

W wyniku szczepienia cząstkami wirusopodobnymi istnieje mechanizm prowadzący do powstania przeciwciał neutralizujących, jak w przypadku infekcji. Gdy na powierzchni VLPs eksponowane jest białko HA jest to tak zwana odpowiedź HA dominująca. (189) (191). Aktualne badania wskazują, że zastosowanie VLPs wirusa grypy jest alternatywą dla opracowania szczepionek nowej generacji przeciwko grypie pandemicznej (209) (210). Najlepszym przykładem jest uzyskanie cząsteczek VLPs wirusa H7N9 w kilka tygodni po tym, jak ukazała się sekwencja nukleotydowa kodująca białka HA i NA (211).

Zaplanowane w niniejszej pracy doświadczenia miały na celu zbadanie odpowiedzi immunologicznej u kur po szczepieniu preparatami zawierającymi różne cząstki wirusopodobne. Jak opisano w niniejszej pracy uzyskano i oczyszczono trzy rodzaje VLPs. Zaszczepiono 4 grupy kurczaków: pierwszej grupie podano preparat zawierający H5N1-HA VLPs, drugiej grupie podano H5N1-HA/M1 VLPs, a trzeciej H5N1-HA/M1/NA VLPs. Czwarta grupa kurcząt nieszczepionych stanowiła kontrolę negatywną. Preparaty podane były w dawce 15 µg na kurczaka z dodatkiem niepełnego adiuwantu Freund. W obrębie grupy H5N1-HA/M1/NA VLPs zaszczepiono dodatkowo 5 kurczaków preparatem w dawce 15 µg z dodatkiem kompletnego adiuwantu Freund, w celu porównania odpowiedzi immunologicznej w stosunku do grupy kurcząt szczepionych preparatami zawierającymi niepełny adiuwant. Kury szczepione były w dwóch dawkach w dniu 0 oraz w dniu 17. W celu określenia dynamiki przyrostu przeciwciał krew pobierano w różnych odstępach czasu: 0, 17, 34 i 41 dniach trwania eksperymentu. Testy ELISA wykazały że, immunizacja kur wszystkimi trzema konstruktami biologicznych nanostruktur indukowała produkcję przeciwciał. Najwyższe miana swoistych przeciwciał w 34 dniu po szczepieniu miały kury zaszczepione VLPs HA/NA/M1. Surowice pobrane w 34 i 41 dniu po szczepieniu wykazują podobne wartości uśrednione dla poziomu przeciwciał. Dodatkowo charakterystyka odpowiedzi immunologicznej na szczepienie kur preparatem H5N1-HA/M1/NA VLPs w formulacji z pełnym i niekompletnym adiuwantem Freund przeprowadzona testem ELISA wykazała, iż szczepienie z użyciem kompletnego adiuwantu Freund nie wpłynęło drastycznie na poziom produkcji przeciwciał. Może to sugerować, iż VLPs jak donoszą dane literaturowe, wykazują bardzo dobre właściwości stymulujące odpowiedź układu immunologicznego, zarówno humoralną, jak i komórkową. W 2013 roku opublikowano wyniki immunizacji kur preparatami zawierającymi VLPs wirusa grypy H5N1 (212). Miareczkowanie do punktu końcowego surowic kurcząt po immunizacji H5N1-HA/M1/NA VLPs wykazało, że uzyskane surowice są wysoce reaktywne i działają w rozcieńczeniu do 1:2700 w porównaniu do kontroli negatywnych. Dynamika poziomu IgY anty-H5N1 w surowicach immunizowanych kurcząt wykazała wysoki potencjał immunostymulacyjny już po pierwszej dawce preparatu szczepionkowego opartego na cząstkach wirusopodobnych.

Większość danych literaturowych prezentuje wyniki uzyskane na modelu kur typu SPF lub na modelu mysim (185) (213) (214). Prowadzone w niniejszej pracy badania wykonane były na kurach brojlerach, jako naturalny model badawczy kurczaków hodowlanych, co jest wartością dodaną uzyskanych wyników, które potwierdzają wysoki poziom przeciwciał anty-HA w surowicach szczepionych ptaków. Doświadczenia wykonywane na kurach wolnych od patogenów (sterylnych) są o wiele prostsze zarówno do wykonania, jak i do interpretacji. Obecność poszczególnych glikoprotein oraz białka rdzenia ma prawdopodobnie o wiele większy wpływ na efektywność ochrony zwierząt, niż na stymulację układu immunologicznego do produkcji przeciwciał. Obecność wysoce konserwowanego białka M1 oraz neuraminidazy N1 może skutkować szerszą, w stosunku do konstruktu H5N1-HA VLPs, ochroną przed heterologicznymi podtypami. Należy pamiętać, iż odpowiedź immunologiczna skierowana jest głównie w kierunku białka HA. Uzyskane wyniki

sugerują zasadność wykorzystania VLPs jako antygenów szczepionkowych, należy jednak dodać iż konieczne jest wykonanie testów typu „challenge”, które ze względu na brak możliwości nie zostało wykonane w ramach niniejszej pracy. Aby potwierdzić właściwości ochronne preparatu szczepionkowego przeprowadzono test zahamowania hemaglutynacji, który wykazuje produkcję przeciwciał neutralizujących. Według danych literaturowych uzyskanie wyniku w teście HI na poziomie od 1/32-1/64 oznacza, iż preparat szczepionkowy będzie dawał ochronę przed zakażeniem (215). Miano HI uzyskanych surowic kurzych osiągnęło poziom 1:128 HI, co wskazuje na wysoki potencjał ochronny potencjalnych preparatów.

Wszystkie dotychczas opisane szczepionki pobudzają odpowiedź immunologiczną skierowaną na główny antygen, którym jest domena główki HA (HA-dominująca odpowiedź immunologiczna) (189). „Główka” hemaglutyniny to podjednostka HA1, która zawiera większość determinant antygenowych oraz wykazuje największą zmienność nukleotydową. Można zatem założyć, że specyficzna dla danego szczepu odpowiedź immunologiczna o bardzo wąskim zakresie ochrony związana jest z odpowiedzią układu immunologicznego na wysoce zmienną sekwencyjnie główkę HA (216) (217). Przez wiele lat nie przypuszczano, że domena nóżki HA może odgrywać rolę w indukowaniu odpowiedzi immunologicznej prowadzącej do powstania przeciwciał, które zdolne są do rozpoznania nie tylko homologicznych podtypów wirusa grypy, ale i heterologicznych podtypów. W 2009 roku naukowcy mieli niepowtarzalną szansę zbadania dużej liczby surowic pobranych od ludzi zainfekowanych pandemicznym szczepem świńskiej grypy H1N1. Badania doprowadziły do wyizolowania i zsekwencjonowania uniwersalnych przeciwciał neutralizujących, które rozpoznawały wszystkie typy hemaglutynin. Dalsze badania dowiodły, że epitop rozpoznawany przez te przeciwciała zlokalizowany jest w rejonie nóżki hemaglutyniny (125). Rejon nóżki hemaglutyniny wykazuje stabilność genetyczną (218). W konsekwencji wiele grup badawczych zadawało sobie pytanie: czy i w jaki sposób konserwowana domena nóżki HA będzie stymulować układ immunologiczny i czy powstałe w wyniku immunizacji przeciwciała zachowają swój uniwersalny charakter (125). Od 2010 roku toczą się badania mające na celu scharakteryzowanie uniwersalnego antygeny w postaci nóżki HA pochodzącej z pandemicznego szczepu H1N1. Ze względu na uniwersalny charakter antygeny w formie nóżki HA oraz ektodomena białka M2, czy też uniwersalny epitop w obrębie neuraminidazy, są obecnie podstawą wielu badań (219). Ostatnie badania opisują ekspresję i charakterystykę domeny nóżki HA z ludzkich szczepów wirusa grypy, które wytwarzane były w komórkach ssaczy (120) (220) (150) (221). Brak danych literaturowych na temat uniwersalnego antygeny w formie HA nóżki u ptasich szczepów wirusa grypy skłoniło do podjęcia próby uzyskania tego antygeny w komórkach owadzych. W celu konstrukcji homotrimerycznej hemaglutyniny pozbawionej struktury głowy postanowiono zaprojektować gen, który zawierał zakonserwowane reszty cysteiny w pozycji C52 i C277 (numeracja H3) oraz linker składający się z 4 reszt glicyny (120).

Zachowanie zakonserwowanych reszt cystein pozwoliło uzyskać rekombinowane białko hemaglutyniny H5N1 w formie nóżki w komórkach owadzych. Można stwierdzić, że zakonserwowane cysteiny w pozycji C52 oraz C277 pozwalają na otrzymanie rekombinowanych białek HA pozbawionych globularnej główki zarówno w przypadku ludzkich, jak i ptasich szczepów wirusa grypy. Ekspresja skróconego wariantu genu *ha* w formie nóżki w komórkach owadzych prowadziła do powstania funkcjonalnego białka. Produkcja skróconej formy białka w postaci nóżki w komórkach Sf9 prowadziła do powstania kilku form białka. Jest wielce prawdopodobne, że proteazy komórkowe takie jak furyna, rozpoznają charakterystyczny motyw poliargininowy, zlokalizowany w podjednostce HA2, a następnie w wyniku cięcia proteolitycznego powstają trzy

formy białka: krótki kawałek podjednostki HA1, podjednostka HA2 oraz pełny fragment kodujący hemaglutyninę w postaci nóżki. Zastosowanie konwertazy furynowej podczas produkcji białka w komórkach owadzych prowadziło do częściowego zahamowania cięcia proteolitycznego. W celu potwierdzenia formy homotrimerycznej postanowiłam przeprowadzić doświadczenie mające na celu wykrycie hemaglutyniny w formie nóżki na powierzchni zainfekowanych rekombinowanym bakulowirusem komórek Sf9. W tym celu wykonano cytometrię przepływową. Wyniki wskazują jednoznacznie, że pozbawione główki białko HA jest efektywnie transportowane do zewnętrznych błon komórkowych, co sugeruje, iż procesy fałdowania i dojrzewania białka przebiegają prawidłowo, w tym transport przez aparaty Golgiego oraz modyfikacje potranslacyjne. Obecność homotrimeru została potwierdzona dodatkowo za pomocą rozdziału rekombinowanych białek HA w formie nóżki w żelu poliakryloamidowym w warunkach nieredukujących oraz immunodetekcję z użyciem przeciwciał monoklonalnych anti-H1N1. Aby w pełni scharakteryzować potencjalnie uniwersalny antygen HA stalk postanowiono wykonać barwienie immunohistochemiczne zakażonych komórek owadzych z użyciem uniwersalnych przeciwciał F16. Monoklonalne przeciwciało F16 wiąże epitop używając zarówno lekkiego, jak i ciężkiego łańcucha (222). Wiadomo również, iż przeciwciało to rozpoznaje epitop konformacyjny (223). Można zatem przyjąć, że pozytywny wynik barwienia *in situ* potwierdza poprawną konformację białka HA w formie nóżki. Uniwersalne przeciwciała, które wytwarzane są w komórkach ssaczych, stosowane są obecnie w terapii (224) (225). Jednym z tych przeciwciał jest przeciwciało F16, które wiążąc domenę nóżki HA prowadzi do neutralizacji wirusa poprzez zahamowanie fuzji ostonki wirusowej z błoną endosomu. Wykazano, że F16 neutralizuje ludzkie szczepy wirusa grypy typu H1N1 i H3N2 oraz chroni myszy przed infekcją wirusami typu H1N1, H3N2 oraz H5N1(222). Uzyskane wyniki dowodzą, że usunięcie globularnej główki skutkuje zwiększoną reaktywnością z antygenami w postaci nóżki HA.

Wiele grup prowadzi obecnie badania mające na celu charakterystykę przeciwciał skierowanych przeciwko konserwowanej domenie nóżki HA (222). Analiza sekwencji wykazała podobieństwo ludzkich i ptasich sekwencji kodujących konserwowany epitop zlokalizowany w domenie nóżki HA (226). Dane literaturowe dotyczą charakterystyki uniwersalnego epitopu zlokalizowanego w obrębie hemaglutyniny ludzkiego szczepu H1N1p (120) (227). Brak wiedzy na temat ptasiego wariantu hemaglutyniny w formie nóżki skłonił mnie do wykonania analizy reaktywności uzyskanego antygeny z różnymi przeciwciałami rozpoznającymi cały panel różnych hemaglutynin, zarówno typu H5, jak i innych typów (H1, H4, H7, H3).

Istnieje pilna potrzeba opracowania preparatów, które zapewniłyby szerszą ochronę przed infekcjami wirusem grypy typu A. Opracowanie uniwersalnej szczepionki przeciw grypie jest obecnie podstawą wielu badań (228) (229) (219). Uzyskane przeze mnie wyniki wskazują, iż cząstki wirusopodobne niosące na swojej powierzchni funkcjonalne białka wirusowe są jedną z lepszych strategii opracowania szczepionek nowej generacji. Przyszły sukces uniwersalnej szczepionki zależeć będzie w dużym stopniu od bioinżynierii cząstek wirusopodobnych, które zawierać będą uniwersalne antygeny wirusa grypy. Jedno z niewielu doniesień literaturowych na temat efektywności szczepień kur antygenami w postaci VLPs potwierdza, zgodnie z uzyskanymi w niniejszej pracy doktorskiej wynikami, produkcję przeciwciał neutralizujących (122) (230) (231). W toku badań zadałam sobie pytanie: Czy szczepienie kur cząstkami wirusopodobnymi prowadzi do powstania puli „uniwersalnych” przeciwciał rozpoznających rejon nóżki HA?. Uzyskane wyniki potwierdzają, iż w wyniku szczepienia kur antygenem w postaci VLP-H5N1 powstaje pula przeciwciał, które rozpoznają skróconą formę HA w postaci „nóżki”. Powstałe przeciwciała

rozpoznały zarówno rekombinowane antygeny „nóżki” HA, uzyskane w komórkach ssaczy, zarówno dla grupy pierwszej, jak i grupy drugiej hemaglutynin w teście IPMA. Wynik ten potwierdził uniwersalny charakter powstałych w wyniku immunizacji przeciwciał. Najsilniej konserwowanym rejonem w obrębie HA nóżki jest rejon długiej alfa helisy (LAH). Analiza porównawcza sekwencji aminokwasowych rejonu LAH z różnych heterologicznych szczepów wirusa grypy wykazała ponad 45% podobieństwa sekwencji. Reaktywność krzyżowa surowic otrzymanych po szczepieniu potrójnym H5N1-HA/M1/NA z peptydem LAH w teście ELISA wykazała obecność puli uniwersalnych przeciwciał. Otrzymane wyniki wykazały wysoki potencjał ochronny preparatu szczepionkowego opartego na H5N1-HA/M1/NA VLPs. Dodatkowo po raz pierwszy dowiedziono, iż w wyniku szczepienia kur cząstkami wirusopodobnymi niosącymi na swojej powierzchni pełnej długości hemaglutynine powstaje pula uniwersalnych przeciwciał rozpoznających konserwowane rejony nóżki zarówno szczepów homologicznych, heterologicznych, jak i heterosubtypowych.

8.2. Wirus gorączki krwotocznej królików - RHDV

Drugim modelem badawczym użytym w tej pracy był bezotoczkowy kaliciwirus posiadający ikozaedralny kapsyd zbudowany z białka VP60. Wirus RHD powoduje epidemie na całym świecie wśród królików hodowlanych i dzikich. W niniejszej pracy użyto polskiego izolatu wirusa RHD: szczep SGM wyizolowany w 1988 roku na terenie Polski. Szczep terenowy pochodził z zasobów dr hab. Andrzeja Fitznera z Państwowego Instytutu Weterynarii w Zduńskiej Woli. Wstępna charakterystyka wyizolowanego wirusa wykazała właściwości hemaglutynujące oraz typową dla kaliciwirusów morfologię. Sekwencja nukleotydowa kodująca główne białko kapsydu VP60 została powielona z wykorzystaniem reakcji odwrotnej transkrypcji, a następnie zsekwencjonowana. Uzyskana sekwencja pełnej długości białka VP60 została poddana analizie porównawczej z sekwencjami innych szczepów RHDV. W 1991 roku grupa Meyersa opublikowała po raz pierwszy sekwencję genomu wirusa RHD (232). W kolejnych latach ukazały się sekwencje nukleotydowe różnych izolatów wirusa pochodzące z różnych rejonów geograficznych świata (233).

Na podstawie analiz porównawczych szczep SGM można zaliczyć do podstawowego wariantu wirusa. Na podstawie analizy sekwencji nukleotydowej kodującej białko VP60 szczepu SGM wraz z innymi dostępnymi w bazie danych, określono współczynnik zmian nukleotydowych na poziomie ok. 2%. Wynik ten koreluje z danymi literaturowymi (234) (235) (236) (108) (237). Wykazano, iż wariant RCV (tzw. niepatogeny), wykazuje o wiele wyższy współczynnik zmian (238). Mutacje punktowe występujące w sekwencji nukleotydowej kodującej główne strukturalne białko wirusa są rozmieszczone równomiernie z wyjątkiem rejonu C, który jest rejonem zmiennym (239) (240) (241) (242). Analiza filogenetyczna wykazała również podobieństwo szczepu SGM do referencyjnego szczepu FRG. Jak wynika z danych literaturowych nie określono jak dotąd w sposób jednoznaczny czy białko VP60 ulega glikozylacji. Analiza sekwencji aminokwasowej wykazała 6 potencjalnych miejsc N-glikozylacji w obrębie domeny P (243) (244). Jak opisuje Farnos uzyskane białko VP60 w komórkach drożdży miało masę ok. 90 kDa, co odpowiada glikozylowanej formie. Jak można zauważyć, największa kumulacja podobieństwa w sekwencji aminokwasowej dotyczy rejonu domeny P2 zlokalizowanej w obrębie od 250 do 450 reszty aminokwasowej. Rejon ten zawiera najbardziej zewnętrzne epitopy oraz obszar zmienny C i jest prawdopodobnie najbardziej narażony na presję selekcyjną (245). Może to tłumaczyć nagromadzenie podobnych zmian aminokwasowych w izolatach z danego regionu geograficznego

Po raz pierwszy próbę zlokalizowania epitopu warunkującego hemaglutynację zaproponował Capucci w 1998 roku. Określił on epitop nieciągły w rejonie C i F genu *vp60* (239). W sekwencji izolatu niehemaglutynującego rozpoznano między innymi 2 z 4 pozycji aminokwasowych podlegających mutacjom. Podobne mutacje zostały rozpoznane także w innych szczepach HA ujemnych (szczepach Pv97 i Bg97). Zmiany te dotyczą rejonu zmiennego C w pozycji 305 reszty - zamiana seryny na prolinę oraz w pozycji 481 - zamiana reszty asparaginy na serynę. (243). Jak wykazano dla innych przedstawicieli kaliciwirusów, obecność reszt cukrowych na powierzchni kapsydu warunkuje wiązanie specyficznych receptorów komórkowych (245).

Ze względu na zdolność wiązania czerwonych krwinek przez kaliciwirusy można założyć, iż w interakcje patogen – erytrocyt zaangażowane są swoiste receptory. Wykazano, iż receptory grup krwi HBGA wiążą się z cząstką innego kaliciwirusa - norowirusa. Do wiązania może dochodzić za pośrednictwem określonych grup cukrowych obecnych na powierzchni cząstki wirusowej. Badania te potwierdzają hipotezę, że strukturalne białka kapsydu kaliciwirusów prawdopodobnie ulegają glikozylacji, która w bezpośredni sposób może wpływać na oddziaływanie z receptorami HBGA, co w konsekwencji może dalej wpływać na właściwości fenotypowe całego wirusa. Zatem odmienny profil cukrowy może determinować właściwości hemaglutynujące.

Kolejnym etapem była konstrukcja cząstek wirusopodobnych polskiego szczepu wirusa RHD. Jako system do ekspresji genów heterologicznych wykorzystano system bakulowirusowy. Jak wskazywały dane literaturowe ekspresja białka VP60 w komórkach owadź (246) (247) (248) (150) oraz w drożdżach (249) (250) (251) (61) (252), czy roślinach (253) (254) (255) (256) oraz komórkach bakteryjnych (257) prowadziła do powstania nanostruktur w postaci VLPs. Uzyskano również ekspresję genu *vp60* w larwach owadów (258). Aby potwierdzić, iż możliwe będzie uzyskanie cząsteczek wirusopodobnych dla polskiego izolatu wykonano klonowanie genu kodującego białko VP60 do plazmidu transferowego pFastBac1. Następnie uzyskano rekombinowanego bakulowirusa niosącego pod kontrolą promotora polihedryny gen *vp60*. Zmiareczkowany lizat bakulowirusowy posłużył do syntezy białka VP60 w komórkach owadź. W celu charakterystyki rekombinowanego białka wykonano szereg doświadczeń immunochemicznych. Wyniki badań dowiodły, że powstaje białko o masie 60 kDa, które efektywnie kierowane jest do pożywki w miarę upływu czasu. Określono, iż najlepszą ekspresję genu kodującego w/ białko uzyskuje się przy m.o.i 1 w czasie 96 godzin po infekcji. Uzyskane wyniki korelowały z danymi literaturowymi (150). Charakterystyka rekombinowanego białka polskiego szczepu SGM polegała na potwierdzeniu właściwości hemaglutynujących uzyskanego preparatu białkowego oraz określenia reaktywności wybranych przeciwciał z rekombinowanym białkiem VP60. Doświadczenia pokazały, iż uzyskane w komórkach owadź białko było zdolne do aglutynacji ludzkich erytrocytów, a ponadto reagowało z przeciwciałami zarówno monoklonalnymi, jak i poliklonalnymi. Jak opisano w literaturze (233), zmienność antygenową danych szczepów wirusa RHD można zbadać na podstawie reaktywności z wybranymi przeciwciałami monoklonalnymi. Grupa Capucci wyselekcjonowała i opisała poszczególne przeciwciała, które rozpoznają określone rejony na powierzchni kapsydu wirusa RHD. Najbardziej znanym jest przeciwciało 1H8, które rozpoznaje epitop konformacyjny zlokalizowany w podjednostce P2 w rejonie C. Te przeciwciała neutralizujące wirusa rozpoznawały w testach ELISA rekombinowane białko VP60 uzyskane w komórkach owadź.

Kolejny etap pracy zakładał zbadanie czy uzyskane rekombinowane białko będzie formowało biologiczne nanostruktury w formie VLPs. Na wstępie określono poziom produkcji białka w pożywce znad zakażonych komórek. Najwydajniejszą produkcję białka odnotowano

w 96 godzinie po infekcji. Testy hemaglutynacji oraz testy ELISA z wykorzystaniem monoklonalnych przeciwciał rozpoznających epitopy konformacyjne są podstawowymi technikami umożliwiającymi charakterystykę VLPs. Wyniki testów hemaglutynacji oraz ELISA z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych wykazały, iż cząstki tworzą się z największą wydajnością w czasie 72-96 godzin od infekcji. Uzyskane wyniki pokrywały się z danymi literaturowymi. Dla cząstek wirusopodobnych otrzymanych w komórkach drożdży opisano procedury oczyszczania uzyskanych VLPs w oparciu o dwie techniki: na sitach molekularnych (SEC, ang. size-exclusion chromatography) oraz poprzez ultrawierowanie w gradiencie gęstości sacharozy (252) lub chlorku cezu (259). Opracowana w niniejszej pracy procedura oczyszczania dotyczyła wirowanie w gradiencie gęstości sacharozy. Uzyskane wyniki ELISA oraz hemaglutynacji wskazują, iż najwięcej cząstek wirusopodobnych znajduje się we frakcjach odpowiadających 35% stężeniu sacharozy. Obserwacje w mikroskopie elektronowym potwierdziły obecność morfologicznie podobnych do natywnych wirionów RHDV struktur o średnicy 36 nm. Struktury te wykazywały właściwości hemaglutynujące oraz reagowały z przeciwciałami zarówno poliklonalnymi, jak i monoklonalnymi. Potwierdzono również obecność VLPs w testach ELISA z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych rozpoznających epitopy konformacyjne wewnętrznego płaszcza oraz powierzchniowe podjednostki P2. Uzyskane wyniki są zbliżone do wyników uzyskanych przez inne grupy badawcze (246) (260) (248) (251) (253).

Szczepienia przeciwko krwotocznej chorobie królików stanowią najlepsze zabezpieczenie przed infekcją oraz rozwojem śmiertelnej i szybko szerzącej się choroby. Prace nad otrzymaniem pierwszych szczepionek podjęto zaraz po pierwszej diagnozie tego zakaźnego czynnika chorobotwórczego w 1984 roku. Pomimo, że wirus ten nie namnaża się w hodowlach tkankowych udało się opracować pierwszą inaktywowaną szczepionkę tkankową (261). W Europie podjęto prace nad opracowaniem podobnych preparatów ochronnych. Szczepionki te oparte są o inaktywowanego wirusa RHD namnożonego w zdrowych królikach. Następnie oczyszczone wirusy są inaktywowane chemicznie i termicznie. W Polsce prace nad inaktywowaną szczepionką podjęto w 1988 roku w Zakładzie Pryszczycy Państwowego Instytutu Weterynaryjnego. Podobne szczepionki tkankowe pojawiły się w wielu innych krajach Europy (w Niemczech, Francji, Włoszech, Hiszpanii czy Czechach) zapewniając tym samym ochronę królików hodowlanych. Od niedawna na rynku pojawił się drugi rodzaj szczepionek dwuskładnikowych przeznaczonych do ochrony królików przed wirusem RHD oraz drugą chorobą – myksomatozą (262) (263). Szczepionki dwuskładnikowe zawierają inaktywowany wirus RHD oraz atenuowany szczep myksomatozy. Ogromną wadą tych szczepionek jest jednak możliwość rewersji wirusa myksomatozy. Obserwacje terenowe oraz informacje od hodowców potwierdzają tę hipotezę. Głównym problemem jest jednak aspekt etyczny, gdyż do produkcji szczepionki wykorzystuje się zdrowe zwierzęta. Większość wirusów należących do rodziny kaliciwirusów nie może być namnażana w hodowlach komórkowych. Sytuacja ta w znacznym stopniu ogranicza poznanie samej biologii molekularnej danych wirusów oraz opracowywanie nowych udoskonalonych preparatów ochronnych. Obecnie wirusowe białka uzyskuje się w wielu systemach ekspresyjnych. Dzięki temu rozwiązaniu w wyniku ekspresji pełnej długości genu kodującego białko kapsydu możliwe jest otrzymanie cząstek wirusopodobnych, które są morfologicznie podobne do natywnego wirusa. Takie biologiczne nanostruktury w postaci VLP były testowane jako szczepionka oraz jako aktywny immunogen do produkcji surowic odpornościowych (250) (247) (263) (260). Obecnie kilka rodzajów szczepionek podjednostkowych jest w fazie badań klinicznych. Zastosowano różne podejścia; opracowano m.in. szczepionkę opartą o rekombinowanego wirusa ALVAC (*canarypoxvirus*) z insercją sekwencji kodującej gen *vp60* wirusa RHD (264). W fazie badań jest również szczepionka oparta o rekombinowanego wirusa waksinia

z wklonowanym genem *vp60* (265). Opracowano również szczepionkę opartą na transgenicznym ziemniaku produkującym rekombinowane białko VP60 (266). Prowadzono również badania nad opracowaniem szczepionki opartej na wektorach adenowirusowych (267). Szczepionka oparta o cząstki VLP produkowane w systemie bakulowirusowym oraz w komórkach drożdży również była przedmiotem równoległych badań różnych grup badawczych.

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki badań immunizacji zwierząt (królików i świnek morskich) cząstkami wirusopodobnymi wirusa gorączki krwotocznej królików wywołały silną swoistą odpowiedź immunologiczną prowadzącą do wytworzenia wysokododatnich monospecyficznych surowic poliklonalnych. Nieoczyszczone zawarte w pożywce VLPs podane w dawce 100 µg wraz z kompletnym adjuwantem stymulowały odpowiedź immunologiczną oraz prowadziły do uzyskania ochrony na zakażenie wykonane po 10 i 12 dniach po immunizacji. Poziom przeciwciał uzyskanych w wyniku szczepienia korelował z poziomem przeciwciał powstałych w wyniku immunizacji zwierząt inaktywowaną szczepionką dostępną na rynku. Ze względów ekonomicznych i etycznych zasadne jest opracowanie rodzimej szczepionki opartej o VLPs, która mogłaby być produkowana w komórkach owadzych. Uzyskane wyniki określające immunogenność preparatu szczepionkowego w postaci VLP RHDV są podobne do tych zaprezentowanych przez inne grupy badawcze. Zastosowana w kolejnych doświadczeniach na królikach ilość biologicznych nanostruktur (50 µg) oraz czas uodparniania zwierząt dały w stosunku do opisywanych badań bardzo dobre wyniki. Wykazano, że pojedyncza immunizacja królika preparatem zawierającym VLPs bez adjuwantu również prowadzi do uzyskania ochrony na zakażenie. Uzyskane przez inne grupy badawcze cząstki wirusopodobne np. w komórkach owadzych, roślinach oraz w drożdżach używane były do szczepień w dawce pojedynczej lub wielokrotnej w ilości od 100–400 µg stymulując ochronę w ciągu 10-12 dni (150) (252) (256). Uzyskane wyniki umożliwiają opracowanie nowoczesnej szczepionki przeciw chorobie krwotocznej królików. Można zatem wyciągnąć wnioski, iż preparat w postaci nieoczyszczonych cząsteczek wirusopodobnych wykazuje bardzo dobre właściwości immunogenne oraz powoduje powstanie przeciwciał neutralizujących, a tym samym wykazuje charakter ochronny (preparat jednodawkowy bez formulacji z adjuwantem). Bardzo dobre wyniki uzyskała również grupa Farnosa otrzymując rekombinowane białko VP60 w formie VLPs w drożdżach *Pichia pastoris*.(244) (244). W 2013 roku opisano ekspresję zoptymalizowanego genu kodującego białko VP60 w komórkach owadzych (150).

Główną przeszkodą utrudniającą badanie czynnika chorobotwórczego RHDV jest ograniczona możliwość namnażania wirusa w hodowlach tkankowych. Po raz pierwszy opisano wykorzystanie skonstruowanego klonu JX/CHA/97RHDV jako alternatywną drogę badań biologii molekularnej wirusa w 2006 (268). Zakażenie wrażliwych królików pozostaje w dalszym ciągu podstawowym sposobem jego pozyskiwania do badań i produkcji szczepionek narządowych. Pomimo bardzo dużej ilości wirionów w narządach trzewnych zakażonych zwierząt, wirus RHD należy poddać wielu złożonym procedurom w celu dalszego użycia. Stąd też w laboratoryjnej diagnostyce RHD w pierwszym rzędzie wykorzystuje się metody najprostsze, bez konieczności posiadania skomplikowanego warsztatu oraz opracowanych procedur. Powszechnie dostępnymi, względnie tanimi oraz łatwymi do wykonania technikami stosowanymi w rutynowej diagnostyce wirusologicznej RHD są odczyn hemaglutynacji oraz odczyn zahamowania hemaglutynacji. W obu metodach wykorzystuje się referencyjne surowice oraz kontrole pozytywne w postaci antygenów wirusowych. Testami znacznie bardziej zaawansowanymi są metody immunoenzymatyczne (ELISA), do wykonania których również konieczne są referencyjne surowice oraz antygeny.

W badaniach będących przedmiotem niniejszej pracy doktorskiej wykazano, iż uzyskane w wyniku immunizacji surowice poliklonalne charakteryzują się wysoką swoistością wiązania natywnych wirusów RHD. W dalszej części pracy opracowano i wystandaryzowano testy diagnostyczne ELISA służące do wykrywania zarówno wirusa RHD, jak i przeciwciał u zakażonych zwierząt. Uzyskane przeciwciała w wyniku immunizacji zwierząt neutralizują wirusa RHDV oraz mogą z powodzeniem być użyte jako referencyjne odczynniki do testu diagnostycznego. Uzyskane cząstki wirusopodobne stanowią cenne narzędzie do opracowania testów w postaci referencyjnych antygenów. Podczas wykonywania niniejszej pracy opracowano we współpracy z Zakładem Pryszczycy w Państwowym Instytucie Weterynarii zestawy diagnostyczne ELISA przeznaczone do wykrywania wirusa RHD oraz do wykrywania surowic (LPB ELISA), które zostały opatentowane i znajdują zastosowanie w serologicznych i wirusologicznych badaniach monitoringowych w kierunku RHD wykonywanych w Zakładzie Pryszczycy PIWet-PIB. Dodatkowo opracowane testy zostały wykorzystane w procesie produkcji i kontroli szczepionki narządowej przeciwko RHD Cunivac.

8.3. Podsumowanie

Podsumowując, w oparciu o uzyskane szczepy terenowe i białka wirusowe skonstruowano i scharakteryzowano szereg cząstek wirusopodobnych w oparciu o polski szczep wirusa RHD oraz wirusa grypy (VLPs-RHDV, H5N1-HA VLPs, H5N1 HA/M1 VLPs, H5N1 HA/M1/NA VLPs). Oceniono możliwość zastosowania uzyskanych VLPs jako potencjalnych immunogenów szczepionkowych oraz antygenów w testach diagnostycznych. Dodatkowo wytworzono szereg reagentów, takich jak surowice poliklonalne oraz preparaty białek rekombinowanych, które mogą znaleźć zastosowanie w innych projektach badawczych oraz posiadają silny potencjał komercjalizacyjny.

9. Bibliografia

1. Zhao Z, Niu Y, Luo L, Hu Q, Yang T, Chu M, Chen Q, Lei Z, Rui J, Song C long, et al. The optimal vaccination strategy to control COVID-19: a modeling study in Wuhan City, China. *Infect Dis Poverty* (2021) 10:1–26. doi: 10.1186/S40249-021-00922-4/FIGURES/23
2. Lombard M, Pastoret PP, Moulin AM. A brief history of vaccines and vaccination. *Rev Sci Tech* (2007) 26:29–48. doi: 10.20506/RST.26.1.1724
3. Nascimento IP, Leite LCC. Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies. *Brazilian J Med Biol Res* (2012) 45:1102–1111. doi: 10.1590/S0100-879X2012007500142
4. Layton S, Kyriakis CS, Aida V, Pliastas VC, Neasham PJ, Fletcher North J, McWhorter KL, Glover SR. Novel Vaccine Technologies in Veterinary Medicine: A Herald to Human Medicine Vaccines. *Front Vet Sci* (2021) Apr 15:654289. doi: 10.3389/fvets.2021.654289
5. Francis MJ. Recent Advances in Vaccine Technologies. *Vet Clin North Am - Small Anim Pract* (2018) 48:231–241. doi: 10.1016/J.CVSM.2017.10.002
6. Lampinen V, Heinimäki S, Laitinen OH, Pesu M, Hankaniemi MM, Blazevic V, Hytönen VP. Modular vaccine platform based on the norovirus-like particle. *J Nanobiotechnol* (2021) 19:25. doi: 10.1186/s12951-021-00772-0
7. Fraenkel-Conrat H, Williams RC. Reconstitution of Active Tobacco Mosaic Virus From Its Inactive Protein and Nucleic Acid Components. *Proc Natl Acad Sci* (1955) 41:690–698. doi: 10.1073/pnas.41.10.690
8. Mohsen MO, Gomes AC, Vogel M, Bachmann MF. Interaction of Viral Capsid-Derived Virus-Like Particles (VLPs) with the Innate Immune System. *Vaccines (Basel)* (2018) Jul 2;6(3):37. doi: 10.3390/vaccines6030037
9. Fitzner A. Characterisation and immunogenic properties of polish strains of RHD virus. *Bull Vet Inst Pulawy* (2009) 53:575–582.
10. Liu JKH. Anti-Cancer Vaccines-A One-Hit Wonder? *YALE J Biol Med* (2014) Dec 12;87:481–489.
11. Beyer WEP. Comparison of serology and reactogenicity between influenza subunit vaccines and whole virus or split vaccines: a review and meta-analysis of the literature. *Clin Drug Investig* (1998)15(1):1–12. doi: 10.2165/00044011-199815010-00001
12. Beyer WEP, Palache AM, De Jong JC, Osterhaus ADME. Cold-adapted live influenza vaccine versus inactivated vaccine: systemic vaccine reactions, local and systemic antibody response, and vaccine efficacy. A meta-analysis. *Vaccine* (2002) 20:1340–1353. doi: 10.1016/S0264-410X(01)00471-6
13. Redfield RR, Kent CK, Leahy MA, Martinroe JC, Spriggs SR, Yang T, Doan QM, King PH, Maitland PD, Starr TM, et al. Prevention of Pertussis, Tetanus, and Diphtheria with Vaccines in the United States: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) Morbidity and Mortality Weekly Report Recommendations and Reports Centers for Disease Control a. *MMWR Recomm Rep* (2018) Apr 27;67:1–4. doi: 10.15585/mmwr.rr6702a1
14. Kroger A, Bahta L et al. General Best Practice Guidelines for Immunization. *Centers Dis*

- Control Prev* (2023) www.cdc.gov/vaccines/hcp/acip-recs/general-recs/downloads/general-recs.pdf [Accessed June 28, 2022]
15. Cox MMJ. Recombinant protein vaccines produced in insect cells. *Vaccine* (2012) 30:1759–1766. doi: 10.1016/J.VACCINE.2012.01.016
 16. Dormitzer PR, Ulmer JB, Rappuoli R. Structure-based antigen design: a strategy for next generation vaccines. *Trends Biotechnol* (2008) 26:659–667. doi: 10.1016/J.TIBTECH.2008.08.002
 17. Cox MMJ, Hollister JR. FluBlok, a next generation influenza vaccine manufactured in insect cells. *Biologicals* (2009) 37:182–189. doi: 10.1016/J.BIOLOGICALS.2009.02.014
 18. Gurunathan S, Klinman DM, Seder RA. DNA Vaccines: Immunology, Application, and Optimization*. *Annu Rev Immunol* (2000) 18:92:927–974. doi: 10.1146/ANNUREV.IMMUNOL.18.1.927
 19. Schwartzman LM, Cathcart AL, Pujanauski LM, Qi L, Kash JC, Taubenberger JK. An intranasal virus-like particle vaccine broadly protects mice from multiple subtypes of influenza a virus. *MBio* (2015) 6: doi: 10.1128/MBIO.01044-15/FORMAT/EPUB
 20. Lua LHL, Connors NK, Sainsbury F, Chuan YP, Wibowo N, Middelberg APJ. Bioengineering virus-like particles as vaccines. *Biotechnol Bioeng* (2014) 111:425–440. doi: 10.1002/BIT.25159
 21. Zeltins A. Construction and Characterization of Virus-Like Particles: A Review. *Mol Biotechnol* (2013) Jan;53(1):92–107. doi: 10.1007/s12033-012-9598-4
 22. Palucha A, Loniewska A, Satheshkumar S, Boguszewska-Chachulska AM, Umashankar M, Milner M, Haenni AL, Savithri HS. Virus-Like Particles: Models for Assembly Studies and Foreign Epitope Carriers. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* (2005) 80:135–168. doi: 10.1016/S0079-6603(05)80004-2
 23. Sarkar B, Sajidul Islam S, Salma Zohora U, Asad Ullah M. Virus like particles-A recent advancement in vaccine development. *Korean J Microbiol* (2019) 55:327–343. doi: 10.7845/kjm.2019.9089
 24. Guo J, Zhou A, Sun X, Sha W, Ai K, Pan G, Zhou C, Zhou H, Cong H, He S. Immunogenicity of a virus-like-particle vaccine containing multiple antigenic epitopes of toxoplasma gondii against acute and chronic toxoplasmosis in mice. *Front Immunol* (2019) 10:592. doi: 10.3389/FIMMU.2019.00592/BIBTEX
 25. Syomin B, Ilyin Y. [Virus-Like Particles as an Instrument of Vaccine Production]. *Mol Biol (Mosk)* (2019) 53:367–379. doi: 10.1134/S0026898419030157
 26. Comas-Garcia M, Colunga-Saucedo M, Rosales-Mendoza S, Comas-Garcia M. The Role of Virus-Like Particles in Medical Biotechnology. *Mol Pharm* (2020) 17:4407–4420. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.0c00828
 27. López-Macías C, Ferat-Osorio E, Tenorio-Calvo A, Isibasi A, Talavera J, Arteaga-Ruiz O, Arriaga-Pizano L, Hickman SP, Allende M, Lenhard K, et al. Safety and immunogenicity of a virus-like particle pandemic influenza A (H1N1) 2009 vaccine in a blinded, randomized, placebo-controlled trial of adults in Mexico. *Vaccine* (2011) 29:7826–7834. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.07.099
 28. Roy P, Noad R. Virus-Like Particles as a Vaccine Delivery System: Myths and Facts. *Adv Exp Med Biol* (2009) 655:145–158. doi: 10.1007/978-1-4419-1132-2_11

29. Roldão A, Mellado MCM, Castilho LR, Carrondo MJT, Alves PM. Virus-like particles in vaccine development. *Expert Rev Vaccines* (2014) 9:1149–1176. doi: 10.1586/ERV.10.115
30. Nooraie S, Bahrololum H, Hoseini ZS, Katalani C, Hajizade A, Easton AJ, Ahmadian G. Virus-like particles: preparation, immunogenicity and their roles as nanovaccines and drug nanocarriers. *J Nanobiotechnology* 2021 191 (2021) 19:1–27. doi: 10.1186/S12951-021-00806-7
31. Keikha R, Daliri K, Jebali A. The Use of Nanobiotechnology in Immunology and Vaccination. *Vaccines* (2021) 9:1–8. doi: 10.3390/VACCINES9020074
32. Mohsen MO, Zha L, Cabral-Miranda G, Bachmann MF. Major findings and recent advances in virus-like particle (VLP)-based vaccines. *Semin Immunol* (2017) 34:123–132. doi: 10.1016/J.SMIM.2017.08.014
33. Dai S, Wang H, Deng F. Advances and challenges in enveloped virus-like particle (VLP)-based vaccines. *J Immunol Sci* (2018) 2:36–41.
34. Wetzel Id D, Chan J-A, Suckow M, Barbian A, Weniger M, Jenzelewski V, Reiling L, Richards Id JS, Anderson DA, Kouskousis B, et al. Display of malaria transmission-blocking antigens on chimeric duck hepatitis B virus-derived virus-like particles produced in *Hansenula polymorpha*. *PLoS One* (2019) Sep 4;14(9): doi: 10.1371/journal.pone.0221394
35. Zak MM, Zangi L, Kowalski P, Boros G, Karikó K. pharmaceutical Lipid Nanoparticles for Organ-Specific mRNA Therapeutic Delivery. *Pharmaceutics* (2021) Oct 13;13:1675. doi: 10.3390/pharmaceutics13101675
36. Hernandez-Garcia A, Kraft DJ, Janssen AFJ, Bomans PHH, Sommerdijk NAJM, Thies-Weesie DME, Favretto ME, Brock R, De Wolf FA, Werten MWT, et al. Design and self-assembly of simple coat proteins for artificial viruses. *Nat Nanotechnol* (2014) 9:698–702. doi: 10.1038/nnano.2014.169
37. Latham T, Galarza JM. Formation of Wild-Type and Chimeric Influenza Virus-Like Particles following Simultaneous Expression of Only Four Structural Proteins. *J Virol* (2001) 75:6154–6165. doi: 10.1128/JVI.75.13.6154-6165.2001
38. Caldeira JC, Perrine M, Pericle F, Cavallo F. Virus-Like Particles as an Immunogenic Platform for Cancer Vaccines. *Viruses* (2020) Apr 27;12:488. doi: 10.3390/v12050488
39. Qian C, Liu X, Xu Q, Wang Z, Chen J, Li T, Zheng Q, Yu H, Gu Y, Li S, et al. Recent Progress on the Versatility of Virus-Like Particles. *Vaccines (Basel)* (2020) Mar 20;8:139. doi: 10.3390/vaccines8010139
40. Huang X, Wang X, Zhang J, Xia N, Zhao Q. Escherichia coli-derived virus-like particles in vaccine development. *NPJ Vaccines* (2017) Feb 9;2:eCollection. doi: 10.1038/s41541-017-0006-8
41. Panasiuk M, Zimmer K, Czarnota A, Narajczyk M, Peszyńska-Sularz G, Chraniuk M, Hovhannisyan L, Żołądowska S, Nidzworski D, Żaczek AJ, et al. Chimeric virus-like particles presenting tumour-associated MUC1 epitope result in high titers of specific IgG antibodies in the presence of squalene oil-in-water adjuvant: towards safe cancer immunotherapy. *J Nanobiotechnology* (2022) 20:1–13. doi: 10.1186/S12951-022-01357-1/FIGURES/6
42. Grgacic EVL, Anderson DA. Virus-like particles: Passport to immune recognition. *Methods* (2006) Sep;40(1):60–65. doi: 10.1016/J.YMETH.2006.07.018
43. Mohsen MO, Gomes AC, Vogel M, Bachmann MF. Interaction of Viral Capsid-Derived Virus-

- Like Particles (VLPs) with the Innate Immune System. *Vaccines (Basel)* (2018) Jul 2;6(3):37. doi: 10.3390/VACCINES6030037
44. Martinez-Pomares L, Mantegazza A, Basta S, Vaca L, Zepeda-Cervantes J, Orlando Ramírez-Jarquín J. Interaction Between Virus-Like Particles (VLPs) and Pattern Recognition Receptors (PRRs) From Dendritic Cells (DCs): Toward Better Engineering of VLPs. *Front Immunol* (2020) 11:1100. doi: 10.3389/fimmu.2020.01100
 45. Zeltins A. Construction and Characterization of Virus-Like Particles: A Review. *Mol Biotechnol* (2013) Jan;53:92–107. doi: 10.1007/s12033-012-9598-4
 46. Lagoutte P, Mignon C, Donnat S, Stadthagen G, Mast J, Sodoyer R, Lugari A, Werle B. Scalable chromatography-based purification of virus-like particle carrier for epitope based influenza A vaccine produced in *Escherichia coli*. *J Virol Methods* (2016) 232:8–11. doi: 10.1016/j.jviromet.2016.02.011
 47. Koutsky L. The Epidemiology behind the HPV Vaccine Discovery. *Ann Epidemiol* (2009) 19:239–244. doi: 10.1016/j.annepidem.2009.01.023
 48. Panasiuk M, Zimmer K, Czarnota A, Grzyb K, Narajczyk M, Peszyńska-Sularz G, Żołędowska S, Nidzworski D, Hovhannisyan L, Gromadzka B. Immunization with *Leishmania tarentolae*-derived norovirus virus-like particles elicits high humoral response and stimulates the production of neutralizing antibodies. *Microb Cell Fact* (2021) 20:186. doi: 10.1186/s12934-021-01677-1
 49. Rodríguez-Limas WA, Sekar K, Tyo KEJ. Virus-like particles: The future of microbial factories and cell-free systems as platforms for vaccine development. *Curr Opin Biotechnol* (2013) 24:1089–1093. doi: 10.1016/j.copbio.2013.02.008
 50. Kushnir N, Streatfield SJ, Yusibov V. Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: Diversity of targets and production systems and advances in clinical development. *Vaccine* (2012) 31:58–83. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.10.083
 51. Tate MD, Job ER, Deng Y-M, Gunalan V, Maurer-Stroh S, Reading PC. Playing Hide and Seek: How Glycosylation of the Influenza Virus Hemagglutinin Can Modulate the Immune Response to Infection. *Viruses* (2014) 6:1294–1316. doi: 10.3390/v6031294
 52. Kim HJ, Kim HJ. Yeast as an expression system for producing virus-like particles: what factors do we need to consider? *Letts Appl Microbiol* (2017) 64:111–123. doi: 10.1111/lam.12695
 53. Yang J, Zhang L, Zhang C, Lu Y. Exploration on the expression and assembly of virus-like particles. *Biotechnol Notes* (2021) 2:51–58. doi: 10.1016/j.biotno.2021.08.003
 54. Shirbaghaee Z, Bolhassani A. Different Applications of Virus-Like Particles in Biology and Medicine: Vaccination and Delivery Systems. *Biopolymers* (2015) Mar;105(3):113–132. doi: 10.1002/bip.22759
 55. Mclean G, Kumar A, Gowans EJ, Masavuli MG, Wijesundara DK, Torresi J, Grubor-Bauk B. Preclinical Development and Production of Virus-Like Particles As Vaccine Candidates for Hepatitis C. *Front Microbiol* (2017) Dec 5:2413. doi: 10.3389/fmicb.2017.02413
 56. Sasnauskas K, Bulavaite A, Hale A, Jin L, Knowles WA, Gedvilaite A, Dargevičiute A, Bartkevičiute D, Žvirbliene A, Staniulis J, et al. Generation of Recombinant Virus-Like Particles of Human and Non-Human Polyomaviruses in Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Intervirology* (2002) 45:308–317. doi: 10.1159/000067922
 57. Lyons JJ, Milner JD, Rosenzweig SD. Glycans Instructing Immunity: The Emerging Role of

- Altered Glycosylation in Clinical Immunology. *Front Pediatr* (2015) Jun 11;3:54. doi: 10.3389/fped.2015.00054
58. Stephen SL, Beales L, Peyret H, Roe A, Stonehouse NJ, Rowlands DJ. Recombinant expression of tandem-HBc virus-like particles (VLPs). *Methods Mol Biol* (2018) 1776:97–123. doi: 10.1007/978-1-4939-7808-3_7
 59. Roy P, Noad R. Virus-Like Particles as a Vaccine Delivery System: Myths and Facts. *Adv Exp Med Biol* (2009) 655:145–58. doi: 10.1007/978-1-4419-1132-2_11
 60. Ono C, Hirano J, Okamoto T, Matsuura Y. Evaluation of viral contamination in a baculovirus expression system. *Microbiol Immunol* (2018) 62:200–204. doi: 10.1111/1348-0421.12572
 61. Fernandes F, Vidigal J, Dias MM, Prather KLJ, Coroadinha AS, Teixeira AP, Alves PM. Flipase-mediated cassette exchange in Sf9 insect cells for stable gene expression. *Biotechnol Bioeng* (2012) 109:2836–2844. doi: 10.1002/BIT.24542
 62. Schwartzman LM, Cathcart AL, Pujanauski LM, Qi L, Kash JC, Taubenberger JK. An intranasal virus-like particle vaccine broadly protects mice from multiple subtypes of influenza A virus. *MBio* (2015) Jul 21;6(4):e01044. doi: 10.1128/mBio.01044-15
 63. Bieniossek C, Imasaki T, Takagi Y, Berger I. MultiBac: Expanding the research toolbox for multiprotein complexes. *Trends Biochem Sci* (2012) 37:49–57. doi: 10.1016/J.TIBS.2011.10.005
 64. Shirbaghaee Z, Bolhassani A. Different applications of virus-like particles in biology and medicine: Vaccination and delivery systems. *Biopolymers* (2016) Mar;105(3): doi: 10.1002/bip.22759
 65. Dumont J, Ewart D, Mei B, Estes S, Kshirsagar R. Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. *Crit Rev Biotechnol* (2016) 36:1110–1122. doi: 10.3109/07388551.2015.1084266
 66. Tate MD, Job ER, Deng YM, Gunalan V, Maurer-Stroh S, Reading PC. Playing hide and seek: How glycosylation of the influenza virus hemagglutinin can modulate the immune response to infection. *Viruses* (2014) 6:1294–1316. doi: 10.3390/v6031294
 67. Buffin S, Peubez I, Barrière F, Nicolai MC, Tapia T, Dhir V, Forma E, Sève N, Legastelois I. Influenza A and B virus-like particles produced in mammalian cells are highly immunogenic and induce functional antibodies. *Vaccine* (2019) 37:6857–6867. doi: 10.1016/J.VACCINE.2019.09.057
 68. Wurm FM. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat Biotechnol* (2004) 22:1393–1398. doi: 10.1038/nbt1026
 69. Li C, Liu F, Liang M, Zhang Q, Wang X, Wang T, Li J, Li D. Hantavirus-like particles generated in CHO cells induce specific immune responses in C57BL / 6 mice. *Vaccine* (2010) 28:4294–4300. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.04.025
 70. Fontana D, Kratje R, Etcheverrigaray M, Prieto C. Immunogenic virus-like particles continuously expressed in mammalian cells as a veterinary rabies vaccine candidate. *Vaccine* (2015) Aug 20;33:4238–4246. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.03.088
 71. Cervera L, Gutiérrez-Granados S, Martínez M, Blanco J, Gòdia F, Segura MM. Generation of HIV-1 Gag VLPs by transient transfection of HEK 293 suspension cell cultures using an optimized animal-derived component free medium. *J Biotechnol* (2013) 166:152–165. doi: 10.1016/J.JBIOTEC.2013.05.001

72. Thompson CM, Petiot E, Lennaertz A, Henry O, Kamen AA. Analytical technologies for influenza virus-like particle candidate vaccines: challenges and emerging approaches. *Virology* (2013) May 4;10:141. doi: 10.1186/1743-422X-10-141
73. Santi L, Huang Z, Mason H. Virus-like particles production in green plants. *Methods* (2006) 40:66–76. doi: 10.1016/j.ymeth.2006.05.020
74. Chen Q, Lai H. Human Vaccines & Immunotherapeutics Plant-derived virus-like particles as vaccines. *Hum Vaccin Immunother* (2013) Jan;9(1):26–49. doi: 10.4161/hv.22218
75. Jung J, Grant T, Thomas DR, Diehnelt CW, Grigorieff N, Joshua-Tor L. High-resolution cryo-EM structures of outbreak strain human norovirus shells reveal size variations. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2019) 116:12828–12832. doi: 10.1073/pnas.1903562116
76. Jung J, Zahmanova G, Minkov I, Lomonosoff GP. Plant-based expression and characterization of SARS-CoV-2 virus-like particles presenting a native spike protein. *Plant Biotechnol J* (2022) Jul;20(7):1363–1372. doi: 10.1111/pbi.13813
77. Maharjan PM, Choe S. Plant-based COVID-19 vaccines: Current status, design, and development strategies of candidate vaccines. *Vaccines* (2021) 9:1–21. doi: 10.3390/vaccines9090992
78. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* (1992) 56:152–179. doi: 10.1128/MR.56.1.152-179.1992
79. Stallknecht DE, Brown JD. Ecology of Avian Influenza in Wild Birds. *Avian Influenza* (2009)43–58. doi: 10.1002/9780813818634.CH3
80. Vandegrift KJ, Sokolow SH, Daszak P, Kilpatrick AM. Ecology of avian influenza viruses in a changing world. *Ann N Y Acad Sci* (2010) 1195:113. doi: 10.1111/J.1749-6632.2010.05451.X
81. Ip HS, Torchetti MK, Crespo R, Kohrs P, Debruyne P, Mansfield KG, Baszler T, Badcoe L, Bodenstein B, Shearn-Bochsler V, et al. Novel Eurasian Highly Pathogenic Avian Influenza A H5 Viruses in Wild Birds, Washington, USA, 2014. *Emerg Infect Dis* (2015) 21:886. doi: 10.3201/EID2105.142020
82. Kaplan BS, Russier M, Jeevan T, Marathe B, Govorkova EA, Russell CJ, Kim-Torchetti M, Choi YK, Brown I, Saito T, et al. Novel Highly Pathogenic Avian A(H5N2) and A(H5N8) Influenza Viruses of Clade 2.3.4.4 from North America Have Limited Capacity for Replication and Transmission in Mammals. *mSphere* (2016) 1: doi: 10.1128/MSPHERE.00003-16
83. Yang W, Schountz T, Ma W. Bat Influenza Viruses : Current Status and Perspective. *Viruses* (2021) Apr;13(4):547. doi: 10.3390/v13040547
84. Tong S, Li Y, Rivaller P, Conrardy C, Alvarez Castillo DA, Chen LM, Recuenco S, Ellison JA, Davis CT, York IA, et al. A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2012) 109:4269–4274. doi: 10.1073/PNAS.1116200109/-/DCSUPPLEMENTAL
85. Tong S, Zhu X, Li Y, Shi M, Zhang J, Bourgeois M, Yang H, Chen X, Recuenco S, Gomez J, et al. New World Bats Harbor Diverse Influenza A Viruses. *PLOS Pathog* (2013) 9:e1003657. doi: 10.1371/JOURNAL.PPAT.1003657
86. Bi Y, Li J, Li S, Fu G, Jin T, Zhang C, Yang Y, Ma Z, Tian W, Li J, et al. Dominant subtype switch in avian influenza viruses during 2016–2019 in China. *Nat Commun* (2020) 11:1–12. doi: 10.1038/s41467-020-19671-3
87. Spackman E. The ecology of avian influenza virus in wild birds: What does this mean for poultry? *Poult Sci* (2009) 88:847–850. doi: 10.3382/PS.2008-00336

88. Wahlgren J. Influenza A viruses: an ecology review. *Infect Ecol Epidemiol* (2011) 1:6004. doi: 10.3402/iee.v1i0.6004
89. Monne I, Fusaro A, Nelson MI, Bonfanti L, Mulatti P, Hughes J, Murcia PR, Schivo A, Valastro V, Moreno A, et al. Emergence of a Highly Pathogenic Avian Influenza Virus from a Low-Pathogenic Progenitor. *J Virol* (2014) 88:4375–4388. doi: 10.1128/JVI.03181-13
90. Ayora-Talavera G. Sialic acid receptors: Focus on their role in influenza infection. *J Receptor Ligand Channel Res* (2018) 10:1–11. doi: 10.2147/JRLCR.S140624
91. Thompson CI, Barclay WS, Zambon MC, Pickles RJ. Infection of Human Airway Epithelium by Human and Avian Strains of Influenza A Virus. *J Virol* (2006) 80:8060–8068. doi: 10.1128/JVI.00384-06
92. Nelson MI, Vincent AL. Reverse zoonosis of influenza to swine: new perspectives on the human-animal interface. *Trends Microbiol* (2015) 23:142. doi: 10.1016/J.TIM.2014.12.002
93. Crisci E, Mussá T, Fraile L, Montoya M. Review: Influenza virus in pigs. *Mol Immunol* (2013) 55:200–211. doi: 10.1016/j.molimm.2013.02.008
94. He CQ, Han GZ, Wang D, Liu W, Li GR, Liu XP, Ding NZ. Homologous recombination evidence in human and swine influenza A viruses. *Virology* (2008) 380:12–20. doi: 10.1016/J.VIROL.2008.07.014
95. Carter RW, Sanford JC. A new look at an old virus: patterns of mutation accumulation in the human H1N1 influenza virus since 1918. *Theor Biol Med Model* (2012) Oct 12;9:42. doi: 10.1186/1742-4682-9-42
96. Kossyvakis A, Pogka V, Melidou A, Moutousi A, Gioula G, Kalliaropoulos A, Exindari M, Emmanouil M, Horefti E, Spala G, et al. Challenges in antigenic characterization of circulating influenza a(H3N2) viruses during the 2011-2012 influenza season: An ongoing problem? *J Clin Microbiol* (2015) 53:1493–1499. doi: 10.1128/JCM.03236-14
97. Hao W, Wang L, Li S. Roles of the Non-Structural Proteins of Influenza A Virus. *Pathogens* (2020) Oct 3;9:812. doi: 10.3390/pathogens9100812
98. Marshall N, Priyamvada L, Ende Z, Steel J, Lowen AC. Influenza Virus Reassortment Occurs with High Frequency in the Absence of Segment Mismatch. *PLoS Pathog* (2013) 9:1003421. doi: 10.1371/journal.ppat.1003421
99. Gao R, Cao B, Hu Y, Feng Z, Wang D, Hu W, Chen J, Jie Z, Qiu H, Xu K, et al. Human Infection with a Novel Avian-Origin Influenza A (H7N9) Virus. *N Engl J Med* (2013) May 16;368:1888–1897. doi: 10.1056/NEJMOA1304459
100. Freidl GS, Meijer A, de Bruin E, de Nardi M, Munoz O, Capua I, Breed AC, Harris K, Hill A, Kosmider R, et al. Influenza at the animal-human interface: A review of the literature for virological evidence of human infection with swine or avian influenza viruses other than A(H5N1). *Eurosurveillance* (2014) 19:8–26. doi: 10.2807/1560-7917.ES2014.19.18.20793
101. Sun X, Whittaker GR. Role for Influenza Virus Envelope Cholesterol in Virus Entry and Infection. *J Virol* (2003) 77:12543–12551. doi: 10.1128/JVI.77.23.12543-12551.2003
102. Noda T. Native morphology of influenza virions. *Front Microbiol* (2012) 2:1–5. doi: 10.3389/fmicb.2011.00269
103. Calder LJ, Wasilewski S, Berriman JA, Rosenthal PB. Structural organization of a filamentous influenza A virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2010) 107:10685–10690. doi: 10.1073/PNAS.1002123107

104. Kang S-M, Kim M-C, Compans RW. Virus-like particles as universal influenza vaccines. *Expert Rev Vaccines* (2012) Aug;11(8):995–1007. doi: 10.1586/erv.12.70
105. Zheng W, Tao YJ. Structure and assembly of the influenza A virus ribonucleoprotein complex. *FEBS Lett* (2013) Apr 17;587:1206–1214. doi: 10.1016/j.febslet.2013.02.048
106. Dubois J, Terrier O, Rosa-Calatrava M. Influenza viruses and mRNA splicing: Doing more with less. *MBio* (2014) 5:70–84. doi: 10.1128/MBIO.00070-14
107. Amorim MJ, Digard P. Influenza A virus and the cell nucleus. *Vaccine* (2006) 24:6651–6655. doi: 10.1016/J.VACCINE.2006.05.066
108. Moss WN, Priore SF, Turner DH. Identification of potential conserved RNA secondary structure throughout influenza A coding regions. *RNA* (2011) Jun;17(6):991–1011. doi: 10.1261/rna.2619511
109. Gog JR, Dos E, Afonso S, Dalton RM, Leclercq I, Tiley L, Elton D, Von Kirchbach JC, Naffakh N, Escriou N, et al. Codon conservation in the influenza A virus genome defines RNA packaging signals. *Nucleic Acids Res* (2007) 35:1897–1907. doi: 10.1093/nar/gkm087
110. Moeller A, Kirchdoerfer RN, Potter CS, Carragher B, Wilson IA. Organization of the Influenza Virus Replication Machinery. *Science* (2012) 338:1631. doi: 10.1126/SCIENCE.1227270
111. Jorba N, Coloma R, Ortín J. Genetic trans-complementation establishes a new model for influenza virus RNA transcription and replication. *PLoS Pathog* (2009) May;5(5):e: doi: 10.1371/journal.ppat.1000462
112. Digard P, Elton D, Bishop K, Medcalf E, Weeds A, Pope B. Modulation of Nuclear Localization of the Influenza Virus Nucleoprotein through Interaction with Actin Filaments. *J Virol* (1999) 73:2222–2231. doi: 10.1128/JVI.73.3.2222-2231.1999
113. Gaunitz S, Liu J, Nilsson A, Karlsson N, Holgersson J. Avian influenza H5 hemagglutinin binds with high avidity to sialic acid on different O-linked core structures on mucin-type fusion proteins. *Glycoconj J* (2014) Feb;31(2):145–159. doi: 10.1007/s10719-013-9503-9
114. Matrosovich MN, Matrosovich TY, Gray T, Roberts NA, Klenk H-D. NOTES Neuraminidase Is Important for the Initiation of Influenza Virus Infection in Human Airway Epithelium. *J Virol* (2004) 78:12665–12667. doi: 10.1128/JVI.78.22.12665
115. Chan CM, Chu H, Zhang AJ, Leung LH, Sze KH, Kao RYT, Chik KKH, To KKW, Chan JFW, Chen H, et al. Hemagglutinin of influenza A virus binds specifically to cell surface nucleolin and plays a role in virus internalization. *Virology* (2016) 494:78–88. doi: 10.1016/j.virol.2016.04.008
116. Edinger TO, Pohl MO, Stertz S. Entry of influenza A virus: Host factors and antiviral targets. *J Gen Virol* (2014) 95:263–277. doi: 10.1099/vir.0.059477-0
117. Arafa A, El-Masry I, Kholosy S, Hassan MK, Dauphin G, Lubroth J, Makonnen YJ. Phylodynamics of avian influenza clade 2.2.1 H5N1 viruses in Egypt. *Virol J* (2016) 13:1–11. doi: 10.1186/s12985-016-0477-7
118. Rossman JS, Lamb RA. Influenza virus assembly and budding. *Virology* (2011) 411:229–236. doi: 10.1016/J.VIROL.2010.12.003
119. Hamilton BS, Whittaker GR, Daniel S. Influenza Virus-Mediated Membrane Fusion: Determinants of Hemagglutinin Fusogenic Activity and Experimental Approaches for Assessing Virus Fusion. *Viruses* (2012) 4:1144–1168. doi: 10.3390/v4071144

120. Steel J, Lowen AC, Wang TT, Yondola M, Gao Q, Haye K, García-Sastre A, Palese P. Influenza virus vaccine based on the conserved hemagglutinin stalk domain. *MBio* (2010) 1: doi: 10.1128/MBIO.00018-10
121. Isin B, Doruker P, Bahar I. Functional motions of influenza virus hemagglutinin: A structure-based analytical approach. *Biophys J* (2002) 82:569–581. doi: 10.1016/S0006-3495(02)75422-2
122. Alymova I V., Cipollo JF, Parsons LM, Music N, Kamal RP, Tzeng WP, Goldsmith CS, Contessa JN, Hartshorn KL, Wilson JR, et al. Aberrant Cellular Glycosylation May Increase the Ability of Influenza Viruses to Escape Host Immune Responses through Modification of the Viral Glycome. *MBio* (2022) 13:1–19. doi: 10.1128/mbio.02983-21
123. Sun X, Jayaraman A, Maniprasad P, Raman R, Houser K V, Pappas C, Zeng H, Sasisekharan R, Katz JM, Tumpey TM. N-Linked Glycosylation of the Hemagglutinin Protein Influences Virulence and Antigenicity of the 1918 Pandemic and Seasonal H1N1 Influenza A Viruses. *J Virol* (2013) Aug;87(15):8756–8766. doi: 10.1128/JVI.00593-13
124. Gerhard W, Yewdell J, Frankel ME, Webster R. Antigenic structure of influenza virus haemagglutinin defined by hybridoma antibodies. *Nature* (1981) Apr 23;290:713–717. doi: 10.1038/290713a0
125. Corti D, Voss J, Gamblin SJ, Codoni G, Macagno A, Jarrossay D, Vachieri SG, Pinna D, Minola A, Vanzetta F, et al. A neutralizing antibody selected from plasma cells that binds to group 1 and group 2 influenza A hemagglutinins. *Science* (80-) (2011) Aug 12;333:850–856. doi: 10.1126/science.1205669
126. Margine I, Martinez-Gil L, Chou Y-Y, Krammer F. Residual Baculovirus in Insect Cell-Derived Influenza Virus-Like Particle Preparations Enhances Immunogenicity. *PLoS One* (2012) 7:51559. doi: 10.1371/journal.pone.0051559
127. Gamblin SJ, Skehel JJ. Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins. *J Biol Chem* (2010) 285:28403–28409. doi: 10.1074/JBC.R110.129809
128. Mcauley JL, Gilbertson BP, Trifkovic S, Brown LE, Mcauley JL. Influenza Virus Neuraminidase Structure and Functions. *Front Microbiol* (2019) Jan 29;10: doi: 10.3389/fmicb.2019.00039
129. Krammer F, Fouchier RAM, Eichelberger MC, Webby RJ, Shaw-Saliba K, Wan H, Wilson PC, Compans RW, Skountzou I, Monto AS. NAction! how can neuraminidase-based immunity contribute to better influenza virus vaccines? *MBio* (2018) Apr 3;9:e02332-17. doi: 10.1128/mBio.02332-17
130. Lia S. Autism. *World Heal Organ* (2022)2003–2005. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/autism-spectrum-disorders>
131. Peukes J, Xiong X, Erlendsson S, Qu K, Wan W, Calder LJ, Schraidt O, Kummer S, Freund SM V, Kräusslich H, et al. The native structure of the assembled matrix protein 1 of influenza A virus. *Nature* (2020) Nov;587:495–498. doi: 10.1038/s41586-020-2696-8
132. Noton SL, Medcalf E, Fisher D, Mullin AE, Elton D, Digard P. Identification of the domains of the influenza A virus M1 matrix protein required for NP binding, oligomerization and incorporation into virions. *J Gen Virol* (2007) Aug;88:2280–2290. doi: 10.1099/vir.0.82809-0
133. Ruigrok R, Baudin F, Petit I, Weissenhorn W. Role of influenza virus M1 protein in the viral budding process. *Int Congr Ser* (2001) 1219:397–404. doi: 10.1016/S0531-5131(01)00637-9

134. Bui M, Wills EG, Helenius A, Whittaker GR. Role of the Influenza Virus M1 Protein in Nuclear Export of Viral Ribonucleoproteins. *J Virol* (2000) 74:1781–1786. doi: 10.1128/jvi.74.4.1781-1786.2000
135. Abrantes J, Lopes AM. A Review on the Methods Used for the Detection and Diagnosis of Rabbit Hemorrhagic Disease Virus (RHDV). *Microorganisms* (2021) Apr 30;9:972. doi: 0.3390/microorganisms9050972
136. Gregg DA, House C, Meyer R, Berninger M. Viral haemorrhagic disease of rabbits in Mexico: epidemiology and viral characterization. *Rev Sci Tech* (1991) 10:435–451. doi: 10.20506/RST.10.2.556
137. Xu WY. Viral haemorrhagic disease of rabbits in the People’s Republic of China: epidemiology and virus characterisation. *Rev Sci Tech* (1991) 10:393–408. doi: 10.20506/RST.10.2.559
138. Oliver SL, Asobayire E, Dastjerdi AM, Bridger JC. Genomic characterization of the unclassified bovine enteric virus Newbury agent-1 (Newbury1) endorses a new genus in the family Caliciviridae. *Virology* (2006) 350:240–250. doi: 10.1016/J.VIROL.2006.02.027
139. Farkas T, Sestak K, Wei C, Jiang X. Characterization of a Rhesus Monkey Calicivirus Representing a New Genus of Caliciviridae. *J Virol* (2008) 82:5408. doi: 10.1128/JVI.00070-08
140. L’Homme Y, Sansregret R, Plante-Fortier É, Lamontagne AM, Ouwardani M, Lacroix G, Simard C. Genomic characterization of swine caliciviruses representing a new genus of Caliciviridae. *Virus Genes* (2009) Aug;39:66–75. doi: 10.1007/S11262-009-0360-3
141. Abrantes J, Van Der Loo W, Le Pendu J, Esteves PJ. Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): a review. *Vet Res* (2012) Feb 10:43. doi: 10.1186/1297-9716-43-12
142. Bárcena J, Verdaguer N, Roca R, Morales M, Angulo I, Risco C, Carrascosa JL, Torres JM, Castón JR. The coat protein of Rabbit hemorrhagic disease virus contains a molecular switch at the N-terminal region facing the inner surface of the capsid. *Virology* (2004) 322:118–134. doi: 10.1016/J.VIROL.2004.01.021
143. Moreno N, Mena I, Angulo I, Gómez Y, Crisci E. Rabbit hemorrhagic disease virus capsid , a versatile platform for foreign B-cell epitope display inducing protective humoral immune responses. *Nat Publ Gr* (2016) Aug 23;6:31844. doi: 10.1038/srep31844
144. Hu Z, Tian X, Zhai Y, Xu W, Zheng D. Cryo-electron microscopy reconstructions of two types of wild rabbit hemorrhagic disease viruses characterized the structural features of Lagovirus. *Protein Cell* (2010) Jan;1(1):48–58. doi: 10.1007/s13238-010-0007-0
145. Machín Á, Martín Alonso JM, Parra F. Identification of the Amino Acid Residue Involved in Rabbit Hemorrhagic Disease Virus VPg Uridylylation. *J Biol Chem* (2001) 276:27787–27792. doi: 10.1074/jbc.M100707200
146. Qi R, Zhu J, Miao Q, Tang A, Dong D, Wang X, Liu G. Bioinformatics analysis of capsid protein of different subtypes rabbit hemorrhagic disease virus. *BMC Vet Res* (2019) 15:1–10. doi: 10.1186/s12917-019-2161-9
147. Zhu J, Wang B, Miao Q, Tan Y, Li C, Chen Z, Guo H, Liu G. Viral genome-linked protein (VPg) is essential for translation initiation of rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV). *PLoS One* (2015) 10:1–13. doi: 10.1371/journal.pone.0143467

148. Zhu J, Miao Q, Guo H, Qi R, Tang A, Dong D. Nucleolin is essential for rabbit hemorrhagic disease virus replication by providing a physical link in replication complex formation. (2020) doi: <https://doi.org/10.1101/2020.05.13.094185>
149. Rohayem J, Bergmann M, Gebhardt J, Gould E, Tucker P, Mattevi A, Unge T, Hilgenfeld R, Neyts J. Antiviral strategies to control calicivirus infections. *Antiviral Res* (2010) 87:162–178. doi: 10.1016/j.antiviral.2010.05.002
150. Wang X, Xu F, Liu J, Gao B, Liu Y, Zhai Y, Ma J, Zhang K, Baker TS, Schulten K, et al. Atomic Model of Rabbit Hemorrhagic Disease Virus by Cryo-Electron Microscopy and Crystallography. *PLoS Pathog* (2013) 9:e1003132. doi: 10.1371/journal.ppat.1003132
151. Martínez-Torrecedrada JL, Cortés E, Vela C, Langeveld JPM, Meloen RH, Dalsgaard K, Hamilton WDO, Casal JI. Antigenic structure of the capsid protein of rabbit haemorrhagic disease virus. *J Gen Virol* (1998) 79:1901–1909. doi: 10.1099/0022-1317-79-8-1901
152. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* (1987) 162:156–159. doi: 10.1016/0003-2697(87)90021-2
153. Gromadzka B, Smietanka K, Dragun J, Minta Z, Gora-Sochacka A, Szewczyk B. Detection of changes in avian influenza genome fragments by multitemperature single-strand conformational polymorphism. *Mol Cell Probes* (2008) 22:301–304. doi: 10.1016/j.mcp.2008.09.003
154. Gromadzka B, Chraniuk M, Hovhannisyan L, Uranowska K, Szewczyk B, Narajczyk M, Panasiuk M. Characterization of Immune Response towards Generation of Universal Anti-HA-Stalk Antibodies after Immunization of Broiler Hens with Triple H5N1/NA-HA-M1 VLPs. *Viruses* (2022) 14:730. doi: 10.3390/v14040730
155. Uranowska K, Tyborowska J, Jurek A, Szewczyk B, Gromadzka B. Hemagglutinin stalk domain from H5N1 strain as a potentially universal antigen. *Acta Biochim Pol* (2014) 61:541–550. doi: 10.18388/abp.2014_1876
156. Gromadzka B, Szewczyk B, Konopa G, Fitzner A, Kęsy A. Recombinant VP60 in the form of virion-like particles as a potential vaccine against rabbit hemorrhagic disease virus. *Acta Biochim Pol* (2006) 53(2):371–376.
157. Fitzner A, Gromadzka B. Usefulness of recombinant RHDV antigen and VLPs based hyperimmune sera in ELISA for RHD diagnosis. *Bull Vet Inst Pulawy* (2007) 51:475–480.
158. Swenson DL, Warfield KL, Kuehl K, Larsen T, Hevey MC, Schmaljohn A, Bavari S, Aman MJ. Generation of Marburg virus-like particles by co-expression of glycoprotein and matrix protein. *FEMS Immunol Med Microbiol* (2004) 40:27–31. doi: 10.1016/S0928-8244(03)00273-6
159. Reddy BL, Saier MH. The Causal Relationship between Eating Animals and Viral Epidemics. *Microb Physiol* (2020) 30:2–8. doi: 10.1159/000511192
160. Oyewo M, Al-Mustapha AI, Richards BA, Abdulkareem L, Olasoju T, Babale SM, Khalid H, Meseko C, Balogun MS. Preliminary Outbreak Investigation and Spatial Epidemiology of Rabbit Hemorrhagic Disease Outbreak in Nigeria. *Front Vet Sci* (2022) 8:1–8. doi: 10.3389/fvets.2021.771599
161. Rcheulishvili N, Papukashvili D, Liu C, Ji Y, He Y, Wang PG. Promising strategy for developing mRNA-based universal influenza virus vaccine for human population, poultry, and pigs—focus on the bigger picture. *Front Immunol* (2022) 13:1–11. doi: 10.3389/fimm.2022.871599

10.3389/fimmu.2022.1025884

162. Fitzner A, Niedbalski W. Phylogenetic analysis of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) strains isolated in Poland. *Arch Virol* (2017) 162:3197–3203. doi: 10.1007/s00705-017-3476-0
163. Śmietanka K, Minta Z. Avian influenza in Poland. *Acta Biochim Pol* (2014) 61:453–457. doi: 10.18388/abp.2014_1863
164. Böttcher-Friebertshäuser E, Freuer C, Sielaff F, Schmidt S, Eickmann M, Uhlenhorff J, Steinmetzer T, Klenk H-D, Garten W. Cleavage of Influenza Virus Hemagglutinin by Airway Proteases TMPRSS2 and HAT Differs in Subcellular Localization and Susceptibility to Protease Inhibitors. *J Virol* (2010) 84:5605–5614. doi: 10.1128/JVI.00140-10
165. Smietanka K, Fusaro A, Domanska-Blicharz K, Salviato A, Monne I, Dundon WG, Cattoli G, Minta Z. Full-length genome sequencing of the polish HPAI H5N1 viruses suggests separate introductions in 2006 and 2007. *Avian Dis* (2010) 54:335–339. doi: 10.1637/8782-040109-ResNote.1
166. Janeiro R De, Jolla L, Angeles L. V irus sialyloligosaccharides on human respiratory. (1993) 29:155–165.
167. Glaser L, Stevens J, Zamarin D, Wilson IA, Garcı A, Tumpey TM, Basler CF, Taubenberger JK, Palese P. A Single Amino Acid Substitution in 1918 Influenza Virus Hemagglutinin Changes Receptor Binding Specificity. *J Virol* (2005) Sep;79(17):11533–11536. doi: 10.1128/JVI.79.17.11533
168. Kuiken T, Holmes EC, McCauley J, Rimmelzwaan GF, Williams CS, Grenfell BT. Host species barriers to influenza virus infections. *Science* (80-) (2006) Apr 21;312:394–397. doi: 10.1126/science.1122818
169. Skehel JJ, Wiley DC. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: The influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem* (2000) 69:531–69:
170. Gamblin SJ. The structure and receptor-binding properties of the 1918 influenza hemagglutinin. *Am Assoc Adv Sci* (2016) 303:1838–1842.
171. Winarski KL, Thornburg NJ, Yu Y, Sapparapu G, Crowe JE. Vaccine-elicited antibody that neutralizes H5N1 influenza and variants binds the receptor site and polymorphic sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2015) Jul 28;112:9346–9351. doi: 10.1073/pnas.1502762112
172. Wang M, Tscherne DM, Mccullough C, Caffrey M, García-sastre A, Rong L. Residue Y161 of Influenza Virus Hemagglutinin Is Involved in Viral Recognition of Sialylated Complexes from Different Hosts. *J Virol* (2012) Apr;86(8):4455–4462. doi: 10.1128/JVI.07187-11
173. Linster M, Boheemen S Van, Graaf M De, Schrauwen EJA, Lexmond P, Mänz B, Bestebroer TM, Baumann J, Riel D Van, Rimmelzwaan GF, et al. Identification, characterization, and natural selection of mutations driving airborne transmission of A/H5N1 virus. *Cell* (2014) Apr 10;157:329–339. doi: 10.1016/j.cell.2014.02.040.Identification
174. Imai M, Watanabe T, Hatta M, Das SC, Ozawa M, Shinya K, Zhong G, Hanson A, Katsura H, Watanabe S, et al. Experimental adaptation of an influenza H5 HA confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets. *Nature* (2012) May 2;486:420–428. doi: 10.1038/nature10831
175. Yongkiettrakul S, Nivitchanyong T, Pannengpetch S. Neuraminidase amino acids 149 and 347 determine the infectivity and oseltamivir sensitivity of pandemic influenza A / H1N1 (

- 2009) and avian influenza A / H5N1. *Virus Res* (2013) 175:128–133. doi: 10.1016/j.virusres.2013.04.011
176. Mckimm-breschkin JL, Barrett S, Azhar M, Wong FYK, Selleck P, Mohr PG, Mcgrane J, Kim M. I222 Neuraminidase Mutations Further Reduce Oseltamivir Susceptibility of Indonesian Clade 2 . 1 Highly Pathogenic Avian Influenza A (H5N1) Viruses. *PLoS One* (2013) Jun 11;8:e66105. doi: 10.1371/journal.pone.0066105
 177. Ilyushina NA, Seiler JP, Rehg JE, Webster RG, Govorkova EA. Effect of Neuraminidase Inhibitor – Resistant Mutations Influenza Virus in Ferrets. *PLoS Pathog* (2010) May 27;6:e1000933. doi: 10.1371/journal.ppat.1000933
 178. Karthick V, Ramanathan K. Insight into the Oseltamivir Resistance R292K Mutation in H5N1 Influenza Virus : A Molecular Docking and Molecular Dynamics Approach. *Cell Biochem Biophys* (2014) 2014 Mar;6:291–299. doi: 10.1007/s12013-013-9709-2
 179. Kiso M, Ozawa M, Le Q, Imai H, Takahashi K, Kakugawa S, Noda T, Horimoto T. Effect of an Asparagine-to-Serine Mutation at Position 294 in Neuraminidase on the Pathogenicity of Highly Pathogenic H5N1 Influenza A Virus. *J Virol* (2011) May;85(10):4667–4672. doi: 10.1128/JVI.00047-11
 180. Petricevich VL, Palomares LA, Gonza M, Ramı OT. Parameters that determine virus adsorption kinetics : toward the design of better infection strategies for the insect cell - baculovirus expression system. *Enzym Microb Technol* (2001) Jul 5;29:52–61. doi: 10.1016/s0141-0229(01)00323-4
 181. Vieira HLA, Estêvão C, Peixoto CC, Sousa MFQ, Cruz PE, Carrondo MJT, Alves PM. Triple layered rotavirus VLP production : Kinetics of vector replication , mRNA stability and recombinant protein production. *J Biotechnol* (2005) Oct 17;120:72–82. doi: 10.1016/j.jbiotec.2005.03.026
 182. Hu YC, Luo YL, Ji WT, Chulu JLC, Chang PC, Shieh H, Wang CY, Liu HJ. Dual expression of the HA protein of H5N2 avian influenza virus in a baculovirus system. *J Virol Methods* (2006) Jul;135(1):43–48. doi: 10.1016/j.jviromet.2006.01.023
 183. Correia R, Fernandes B, Alves PM, Carrondo MJT. Improving Influenza HA-Vlps Production in Insect High Five Cells via Adaptive Laboratory Evolution. *Vaccines (Basel)* (2020) Oct 7;8(4): doi: 10.3390/vaccines8040589
 184. Thompson CM, Petiot E, Mullick A, Aucoin MG, Henry O, Kamen AA. Critical assessment of influenza VLP production in Sf9 and HEK293 expression systems. *BMC Biotechnol* (2015) 15:1–12. doi: 10.1186/s12896-015-0152-x
 185. Pushko P, Tretyakova I. Influenza virus like particles (VLPs): Opportunities for H7N9 vaccine development. *Viruses* (2020) 12:518. doi: 10.3390/v12050518
 186. Bright RA, Carter DM, Crevar CJ, Toapanta FR, Steckbeck JD, Cole KS, Kumar NM, Pushko P, Smith G, Tumpey TM, et al. Cross-clade protective immune responses to influenza viruses with H5N1 HA and NA elicited by an influenza virus-like particle. *PLoS One* (2008) 3:e1501. doi: 10.1371/journal.pone.0001501
 187. Galarza JM, Latham T, Cupo A. Virus-Like Particle (VLP) Vaccine Conferred Complete Protection Against a Lethal Influenza Virus Challenge. *Viral Immunol* (2005) 18(1):244–251. doi: 10.1089/vim.2005.18.244.
 188. Latham T, Galarza JM. Formation of Wild-Type and Chimeric Influenza Virus-Like Particles following Simultaneous Expression of Only Four Structural Proteins. *J Virol* (2001) 75:6154–

6165. doi: 10.1128/jvi.75.13.6154-6165.2001
189. López-Macías C. Virus-like particle (VLP)-based vaccines for pandemic influenza. *Hum Vaccin Immunother* (2012)411–414. doi: 10.4161/hv.18757
 190. Pushko P, Tumpey TM, Van Hoeven N, Belser JA, Robinson R, Nathan M, Smith G, Wright DC, Bright RA. Evaluation of influenza virus-like particles and Novasome adjuvant as candidate vaccine for avian influenza. *Vaccine* (2007) 25:4283–4290. doi: 10.1016/j.vaccine.2007.02.059
 191. Pushko P, Tumpey TM, Bu F, Knell J, Robinson R, Smith G. Influenza virus-like particles comprised of the HA , NA , and M1 proteins of H9N2 influenza virus induce protective immune responses in BALB / c mice. *Vaccine* (2005) Dec 30;23:5751–5759. doi: 10.1016/j.vaccine.2005.07.098
 192. Li X, Ju H, Liu J, Yang D, Qi X, Yang X, Qiu Y, Zheng J, Ge F, Zhou J. Influenza virus-like particles harboring H9N2 HA and NA proteins induce a protective immune response in chicken. *Influenza Other Respi Viruses* (2017) 11:518–524. doi: 10.1111/irv.12472
 193. Liu F, Wu X, Li L, Liu Z, Wang Z. Use of baculovirus expression system for generation of virus-like particles : Successes and challenges. *Protein Expr Purif* (2013) 90;104–116: doi: 10.1016/j.pep.2013.05.009
 194. Chen BJ, Leser GP, Morita E, Lamb RA. Influenza Virus Hemagglutinin and Neuraminidase, but Not the Matrix Protein, Are Required for Assembly and Budding of Plasmid-Derived Virus-Like Particles. *J Virol* (2007) 81:7111–7123. doi: 10.1128/jvi.00361-07
 195. Song JM, Choi CW, Kwon SO, Compans RW, Kang SM and KS II. Proteomic characterization of influenza H5N1 virus-like particles and their protective immunogenicity. *J Proteome Res* (2011) Aug 5;10:3450–3459. doi: 10.1021/pr200086v
 196. Kim KH, Lee YT, Park S, Jung YJ, Lee Y, Ko EJ, Kim YJ, Li X, Kang SM. Neuraminidase expressing virus-like particle vaccine provides effective cross protection against influenza virus. *Virology* (2019) 535:179–188. doi: 10.1016/J.VIROL.2019.07.008
 197. Wu C, Yeh Y, Yang Y, Chou C, Liu M, Wu H, Hsiao P. Mammalian Expression of Virus-Like Particles for Advanced Mimicry of Authentic Influenza Virus. *PLoS One* (2010) Mar 22;5:e9784. doi: 10.1371/journal.pone.0009784
 198. Matassov D, Cupo A, Galarza JM. A novel intranasal virus-like particle (VLP) vaccine designed to protect against the pandemic 1918 influenza A virus (H1N1). *Viral Immunol* (2007) 20:441–452. doi: 10.1089/vim.2007.0027
 199. Pan Y, Wei H, Chang C, Lin C, Wei T, Wu S, Chang D. Construction and Characterization of Insect Cell-Derived Influenza VLP : Cell Binding , Fusion , and EGFP Incorporation. *J Biomed Biotechnol* (2010) 2010;2010:506363. doi: 10.1155/2010/506363
 200. Baniasadi V, Lal SK. Short communication A novel method to produce Influenza A virus matrix protein M1 Capsid Like Particles (CLPs). *J Virol Methods* (2014) 205:1–2. doi: 10.1016/j.jviromet.2014.03.027
 201. Haynes JR, Dokken L, Wiley JA, Cawthon AG, Bigger J, Harmsen AG, Richardson C. Influenza-pseudotyped Gag virus-like particle vaccines provide broad protection against highly pathogenic avian influenza challenge. *Vaccine* (2009) Jan 22;27:530–541. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.11.011
 202. Kang SM, Song JM, Quan FS and CR. Influenza vaccines based on virus-like particles. *Virus*

Res (2009) Aug;143(2):140–146. doi: 10.1016/j.virusres.2009.04.005

203. Alberini I, Del E, Fasolo A, Temperton NJ, Galli G, Gentile C, Montomoli E, Hilbert AK, Banzhoff A, Del G, et al. Pseudoparticle neutralization is a reliable assay to measure immunity and cross-reactivity to H5N1 influenza viruses. *Vaccine* (2009) Oct 9;27(4):5998–6003. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.07.079
204. Krammer F, Schinko T, Palmberger D, Tauer C. Trichoplusia ni cells (High Five) are highly efficient for the production of influenza A virus-like particles: a comparison of two insect cell lines as production platforms for influenza vaccines. *Mol Biotechnol* (2010) Jul;45(3):226–234. doi: 10.1007/s12033-010-9268-3
205. Cornelissen LAHM, Vries RP De, Boer-luijtz EA De, Rigter A, Peter JM, Haan CAM De. A Single Immunization with Soluble Recombinant Trimeric Hemagglutinin Protects Chickens against Highly Pathogenic Avian Influenza Virus H5N1. *PLoS One* (2010) May 14;5:5. doi: 10.1371/journal.pone.0010645
206. Hemann EA, Kang SM and LK. Protective CD8 T cell mediated immunity against influenza A virus infection following influenza virus-like particle vaccination. *J Immunol* (2013) Sep 1;191:2486–2494. doi: 10.4049/jimmunol.1300954
207. Quan F, Kim Y, Song J, Hwang S, Compans RW, Prausnitz MR, Kang S. Long-Term Protective Immunity from an Influenza Virus-Like Particle Vaccine Administered with a Microneedle Patch. *Clin Vaccine Immunol* (2013) 2013 Sep;2:1433–1439. doi: 10.1128/CVI.00251-13
208. Quan F, Huang C, Compans RW, Kang S. Virus-Like Particle Vaccine Induces Protective Immunity against Homologous and Heterologous Strains of Influenza Virus. *J Virol* (2007) 2007 Apr;81:3514–3524. doi: 10.1128/JVI.02052-06
209. Tang X, Lu H, Ross TM. Baculovirus-Produced Influenza Virus-like Particles in Mammalian Cells Protect Mice from Lethal. *Viral Immunol* (2011) Aug;24:311–319. doi: 10.1089/vim.2011.0016
210. Aoust MD, Lavoie P, Couture MM, Trépanier S, Guay J, Dargis M, Mongrand S, Landry N, Ward BJ, Vézina L. Influenza virus-like particles produced by transient expression in *Nicotiana benthamiana* induce a protective immune response against a lethal viral challenge in mice. *Plant Biotechnol J* (2008) Dec;6:930–940. doi: 10.1111/j.1467-7652.2008.00384.x
211. Smith GE, Flyer DC, Raghunandan R, Liu Y, Wei Z, Wu Y, Kpamegan E, Courbron D, Fries LF, Glenn GM. Development of influenza H7N9 virus like particle (VLP) vaccine: Homologous A/Anhui/1/2013 (H7N9) protection and heterologous A/chicken/Jalisco/CPA1/2012 (H7N3) cross-protection in vaccinated mice challenged with H7N9 virus. *Vaccine* (2013) 31:4305–4313. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.07.043
212. Park JK, Lee DH, Youn HN, Kim MS, Lee YN, Yuk SS, Lim TH, Jang JH, Kwon JH, Kim BY, et al. Protective efficacy of crude virus-like particle vaccine against HPAI H5N1 in chickens and its application on DIVA strategy. *Influenza Other Respi Viruses* (2013) 7:340–348. doi: 10.1111/j.1750-2659.2012.00396.x
213. Hu J, Peng P, Li J, Zhang Q, Li R, Wang X, Gu M, Hu Z, Hu S, Liu X, et al. Single Dose of Bivalent H5 and H7 Influenza Virus-Like Particle Protects Chickens Against Highly Pathogenic H5N1 and H7N9 Avian Influenza Viruses. *Front Vet Sci* (2021) 8:1–15. doi: 10.3389/fvets.2021.774630
214. Abolnik C, Smith T, Wandrag DBR, Murphy MA, Rautenbach M, Olibile O, O’Kennedy M.

- Dose immunogenicity study of a plant-produced influenza virus-like particle vaccine in layer hens. *Heliyon* (2022) 8:e09804. doi: 10.1016/j.heliyon.2022.e09804
215. Hirota Y, Kaji M, Ide S, Kajiwaru J, Kataoka K, Goto S, Oka T. Antibody efficacy as a keen index to evaluate influenza vaccine effectiveness. *Vaccine* (1997) 15:962–967. doi: 10.1016/S0264-410X(96)00302-7
 216. Laver WG, Gerhard W, Webster RG. Antigen drift in type A influenza virus: Peptide mapping and antigenic analysis of A/PR/8/34 (HON1) variants selected with monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1979) 76:1425–1429. doi: 10.1073/pnas.76.3.1425
 217. Laver WG, Air GM DT and WC. Amino acid sequence change in the haemagglutinin of A/Hong Kong (H3N2) influenza virus during the period 1968-77. *Nature* (1980) Jan 31;283:454–457. doi: 10.1038/283454a0
 218. Krystal M, Elliott RM, Benz EW, Young JF, Palese P. Evolution of influenza A and B viruses: conservation of structural features in the hemagglutinin genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1982) 79:4800–4804. doi: 10.1073/pnas.79.15.4800
 219. Pica N, Palese P. Toward a universal influenza virus vaccine: Prospects and challenges. *Annu Rev Med* (2013) 64:189–202. doi: 10.1146/annurev-med-120611-145115
 220. Krammer F, Pica N, Hai R, Tan GS, Palese P. Hemagglutinin Stalk-Reactive Antibodies Are Boosted following Sequential Infection with Seasonal and Pandemic H1N1 Influenza Virus in Mice. *J Virol* (2012) 86:10302–10307. doi: 10.1128/jvi.01336-12
 221. Klausberger M, Tscheliessnig R, Neff S, Nachbagauer R, Wohlbold TJ, Wilde M, Palmberger D, Krammer F, Jungbauer A, Grabherr R. Globular head-displayed conserved influenza H1 hemagglutinin stalk epitopes confer protection against heterologous H1N1 virus. *PLoS One* (2016) 11:1–21. doi: 10.1371/journal.pone.0153579
 222. Ekiert DC and Wilson IA. Broadly neutralizing antibodies against influenza virus and prospects for universal therapies. *Curr Opin Virol* (2012) Apr;2:134–141. doi: 10.1016/j.coviro.2012.02.005
 223. Lu Y, Welsh JP, Swartz JR. Production and stabilization of the trimeric influenza hemagglutinin stem domain for potentially broadly protective influenza vaccines. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2014) 111:125–130. doi: 10.1073/pnas.1308701110
 224. Corti D, Suguitan AL, Pinna D, Silacci C, Fernandez-Rodriguez BM, Vanzetta F, Santos C, Luke CJ, Torres-Velez FJ, Temperton NJ, et al. Heterosubtypic neutralizing antibodies are produced by individuals immunized with a seasonal influenza vaccine. *J Clin Invest* (2010) 120:1663–1673. doi: 10.1172/JCI41902
 225. Kalenik B, Sawicka R, Góra-Sochacka A, Sirko A. Influenza prevention and treatment by passive immunization. *Acta Biochim Pol* (2014) 61:573–587. doi: 10.18388/abp.2014_1879
 226. Pica N, Hai R, Krammer F, Wang TT, Maamary J, Eggink D, Tan GS, Krause JC, Moran T, Stein CR, et al. Hemagglutinin stalk antibodies elicited by the 2009 pandemic influenza virus as a mechanism for the extinction of seasonal H1N1 viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2012) 109:2573–2578. doi: 10.1073/pnas.1200039109
 227. Bommakanti G, Citron MP, Hepler RW, Callahan C, Heidecker GJ, Najjar TA, Lu X, Joyce JG, Shiver JW, Casimiro DR, et al. Design of an HA2-based escherichia coli expressed influenza immunogen that protects mice from pathogenic challenge. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2010) 107:13701–13706. doi: 10.1073/pnas.1007465107

228. Deviatkin AA, Simonov RA, Trutneva KA, Maznina AA, Khavina EM, Volchkov PY. Universal Flu mRNA Vaccine: Promises, Prospects, and Problems. *Vaccines* (2022) 10:709. doi: 10.3390/vaccines10050709
229. Feranmi F. Universal flu vaccine protects against influenza A and B. *The Lancet Microbe* (2022) 3:e902. doi: 10.1016/s2666-5247(22)00293-2
230. Masters PS. Coronavirus genomic RNA packaging. *Virology* (2019) 537:198–207. doi: 10.1016/j.virol.2019.08.031
231. El-Husseiny MH, Hagag NM, Pushko P, Tretyakova I, Naguib MM, Arafa AS. Evaluation of protective efficacy of influenza virus like particles prepared from h5n1 virus of clade 2.2.1.2 in chickens. *Vaccines* (2021) 9:1–7. doi: 10.3390/vaccines9070715
232. Meyers G, Wirblich C, Thiel HJ. Rabbit hemorrhagic disease virus-molecular cloning and nucleotide sequencing of a calicivirus genome. *Virology* (1991) 184:664–676. doi: 10.1016/0042-6822(91)90436-F
233. Capucci L, Frigoli G, Rønshold L, Lavazza A, Brocchi E, Rossi C. Antigenicity of the rabbit hemorrhagic disease virus studied by its reactivity with monoclonal antibodies. *Virus Res* (1995) 37:221–238. doi: 10.1016/0168-1702(95)00033-M
234. Asgari S, Hardy JRE, Cooke BD. Sequence analysis of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) in Australia: Alterations after its release. *Arch Virol* (1999) 144:135–145. doi: 10.1007/s007050050490
235. Le Gall G, Arnaud C, Boilletot E, Morisse JP, Rasschaert D. Molecular epidemiology of rabbit haemorrhagic disease virus outbreaks in France during 1988 to 1995. *J Gen Virol* (1998) 79:11–16. doi: 10.1099/0022-1317-79-1-11
236. Le Gall-Reculé G, Zwingelstein F, Fages MP, Bertagnoli S, Gelfi J, Aubineau J, Roobrouck A, Botti G, Lavazza A, Marchandeu S. Characterisation of a non-pathogenic and non-protective infectious rabbit lagovirus related to RHDV. *Virology* (2011) 410:395–402. doi: 10.1016/j.virol.2010.12.001
237. Fitzner A, Niedbalski W, Paprocka G, Kęsy A. Identification of Polish RHDVa subtype strains based on the analysis of a highly variable part of VP60 gene. *Pol J Vet Sci* (2012) 15:21–29. doi: 10.2478/v10181-011-0109-5
238. Capucci L, Fusi P, Lavazza A, Pacciarini ML, Rossi C. Detection and preliminary characterization of a new rabbit calicivirus related to rabbit hemorrhagic disease virus but nonpathogenic. *J Virol* (1996) 70:8614–8623. doi: 10.1128/jvi.70.12.8614-8623.1996
239. Capucci L, Fallacara F, Grazioli S, Lavazza A, Pacciarini ML, Brocchi E. A further step in the evolution of rabbit hemorrhagic disease virus: The appearance of the first consistent antigenic variant. *Virus Res* (1998) 58:115–126. doi: 10.1016/S0168-1702(98)00106-3
240. Neil JD. Nucleotide sequence of the capsid protein gene of two serotypes of San Miguel sea lion virus: Identification of conserved and non-conserved amino acid sequences among calicivirus capsid. *Virus Res* (1992) 24:211–222. doi: 10.1016/0168-1702(92)90008-w
241. Schirrmeier H, Reimann I, Köllner B, Granzow H. Pathogenic, antigenic and molecular properties of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) isolated from vaccinated rabbits: Detection and characterization of antigenic variants. *Arch Virol* (1999) 144:719–735. doi: 10.1007/s007050050538
242. Kinnear M, Linde CC. Capsid gene divergence in rabbit hemorrhagic disease virus. *J Gen Virol*

- (2010) 91:174–181. doi: 10.1099/vir.0.014076-0
243. Esteves PJ, Abrantes J, Carneiro M, Müller A, Thompson G, van der Loo W. Detection of positive selection in the major capsid protein VP60 of the rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV). *Virus Res* (2008) 137:253–256. doi: 10.1016/j.virusres.2008.07.025
 244. Farnós O, Fernández E, Chiong M, Joglar M, Rodríguez D, Rodríguez MP, Rodríguez E, González EM, Valdés O, Suárez M, et al. Virus-like particles of the Rabbit Hemorrhagic Disease Virus obtained in yeast are able to induce protective immunity against “classical” strains and a viral subtype circulating in Cuba. *Biotechnol Appl* (2009) 26:260–266.
 245. Nyström K, Le Gall-Reculé G, Grassi P, Abrantes J, Ruvoën-Clouet N, Le Moullac-Vaidye B, Lopes AM, Esteves PJ, Strive T, Marchandeanu S, et al. Histo-blood group antigens act as attachment factors of rabbit hemorrhagic disease virus infection in a virus strain-dependent manner. *PLoS Pathog* (2011) 7:e1002188. doi: 10.1371/journal.ppat.1002188
 246. Sibilía M, Boniotti MB, Angoscini P, Capucci L, Rossi C. Two independent pathways of expression lead to self-assembly of the rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein. *J Virol* (1995) 69:5812–5815. doi: 10.1128/jvi.69.9.5812-5815.1995
 247. Laurent S, Vautherot JC, Madelaine MO, Gall GLE, Rasschaertl D. Recombinant Rabbit Hemorrhagic Disease Virus Capsid Protein Expressed in Baculovirus Self-Assembles into Viruslike Particles and Induces Protection. *J Virol* (1994) Oct;68:6794–6798.
 248. Soledad Marín M, Martín Alonso JM, Pérez Ordoyo García LI, Antonio Boga J, Argüello-Villares JL, Casais R, Venugopal K, Jiang W, Gould EA, Parra F. Immunogenic properties of rabbit haemorrhagic disease virus structural protein VP60 expressed by a recombinant baculovirus: an efficient vaccine. *Virus Res* (1995) 39:119–128. doi: 10.1016/0168-1702(95)00074-7
 249. Farnós O, Fernández E, Chiong M, Parra F, Joglar M, Méndez L, Rodríguez E, Moya G, Rodríguez D, Lleonart R, et al. Biochemical and structural characterization of RHDV capsid protein variants produced in *Pichia pastoris*: Advantages for immunization strategies and vaccine implementation. *Antiviral Res* (2009) 81:25–36. doi: 10.1016/j.antiviral.2008.08.007
 250. Boga JA, Martí JM, Casais R, Parra F. A single dose immunization with rabbit haemorrhagic disease virus major capsid protein produced in *Saccharomyces cerevisiae* induces protection. *Short Commun* (1997) 476:2315–2318.
 251. Farnós O, Rodríguez M, Chiong M, Parra F, Boué O, Lorenzo N, Colás M, Lleonart R. The recombinant rabbit hemorrhagic disease virus VP60 protein obtained from *Pichia pastoris* induces a strong humoral and cell-mediated immune response following intranasal immunization in mice. *Vet Microbiol* (2005) 114:187–195. doi: 10.1016/j.vetmic.2005.11.062
 252. Fernández E, Toledo JR, Méndez L, González N, Parra F, Martín-Alonso JM, Limonta M, Sánchez K, Cabrales A, Estrada MP, et al. Conformational and Thermal Stability Improvements for the Large-Scale Production of Yeast-Derived Rabbit Hemorrhagic Disease Virus-Like Particles as Multipurpose Vaccine. *PLoS One* (2013) 8:e56417. doi: 10.1371/journal.pone.0056417
 253. Mikschofsky H, Schirrmeier H, Keil GM, Lange B, Polowick PL, Keller W, Broer I. Pea-derived vaccines demonstrate high immunogenicity and protection in rabbits against rabbit haemorrhagic disease virus. *Plant Biotechnol J* (2009) 7:537–549. doi: 10.1111/j.1467-7652.2009.00422.x

254. Castañón S, Marín MS, Martín-Alonso JM, Boga JA, Casais R, Humara JM, Ordás RJ, Parra F. Immunization with Potato Plants Expressing VP60 Protein Protects against Rabbit Hemorrhagic Disease Virus. *J Virol* (1999) 73:4452–4455. doi: 10.1128/jvi.73.5.4452-4455.1999
255. Fernandez-Fernandez MR, Mourino M, Rivera J, Rodriguez F, Plana-Duran J and GJ. Protection of Rabbits against Rabbit Hemorrhagic Disease Virus by Immunization with the VP60 Protein Expressed in Plants with a Potyvirus-Based Vector. *Virology* (2001) 291:283–291. doi: 10.1006/viro.2000.0762
256. Gil F, Titarenko E, Terrada E et al. Successful oral prime-immunization with VP60 from rabbit haemorrhagic disease virus produced in transgenic plants using different fusion strategies. *Plant Biotechnol J* (2006) Jan;4:135–143. doi: 10.1111/j.1467-7652.2005.00172.x
257. Boga JA, Casais R, Marin MS, Carmenes RS, Prieto M. Molecular cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of the capsid protein gene from rabbit haemorrhagic disease virus (Spanish isolate AST/89). *J Gen Virol* (1994) Sep;75:2409–2413.
258. Pérez-Filgueira DM, Resino-Talavan P, Cubillos C, Angulo I, Barderas MG, Barcena J EJ. Development of a low-cost , insect larvae-derived recombinant subunit vaccine against RHDV. *Virology* (2007) Aug 1;364:422–430. doi: 10.1016/j.virol.2007.03.016
259. Crisci E, Almanza H, Mena I, Córdoba L, Gómez-Casado E, Castón JR, Fraile L, Bárcena J, Montoya M. Chimeric calicivirus-like particles elicit protective anti-viral cytotoxic responses without adjuvant. *Virology* (2009) 387:303–312. doi: 10.1016/j.virol.2009.02.045
260. Nagesha HS, Wang LF, Hyatt AD, Morrissy CJ, Lenghaus C, Westbury HA. Self-assembly, antigenicity, and immunogenicity of the rabbit haemorrhagic disease virus (Czechoslovakian strain V-351) capsid protein expressed in baculovirus. *Virology* (1995) 140(6):1095–1108. doi: 10.1007/BF01315418
261. Huang EH. Vaccination against and immune response to viral haemorrhagic disease of rabbits : a review of research in the People ' s Republic of China. *Rev Sci Tech* (1991) Jun;10:481–498. doi: 10.20506/rst.10.2.553
262. Barcena J, Morales M, Vazquez B, Boga JA, Parra F, Lucientes J, Pages-Mante A, Sanchez-Vizcaino JM et al. Horizontal Transmissible Protection against Myxomatosis and Rabbit Hemorrhagic Disease by Using a Recombinant Myxoma Virus. *J Virol* (2000) Feb;74:1114–1123. doi: 10.1128/jvi.74.3.1114-1123.2000
263. Bertagnoli S, Gelfi J, Gall GLE, Boilletot E, Vautherot J, Rasschaert D, Laurent S, Petit F, Boucraut-baralon C. Protection against Myxomatosis and Rabbit Viral Hemorrhagic Disease with Recombinant Myxoma Viruses Expressing Rabbit Hemorrhagic Disease Virus Capsid Protein. *J Virol* (1996) Aug;70:5061–5066.
264. Fischer L, Gras-f L, Mason PW. A recombinant canarypox virus protects rabbits against a lethal rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) challenge. *Vaccine* (1997) Jan;15:90–96. doi: 10.1016/s0264-410x(96)00102-8
265. Bertagnoli S, Gelfi J, Petit F, Vautherot JF, Laurentt S, Gallf G Le, Boilletot E, Chantal J. Protection of rabbits against rabbit viral haemorrhagic disease with a vaccinia-RHDV recombinant virus. *Vaccine* (1996) Apr;14:506–510. doi: 10.1016/0264-410x(95)00232-p
266. Dalton KP, Alvarado C, Reytor E, Nuñez C, Podadera A, Mart D, Manuel J, Alonso M, Nicieza I, Silvia G, et al. Chimeric VLPs Bearing VP60 from Two Serotypes of Rabbit Haemorrhagic Disease Virus Are Protective against Both Viruses. *Vaccines (Basel)* (2021) Sep 9;9:1005. doi:

10.3390/vaccines9091005

267. Zhang J, Jex E, Feng T, Sivko GS, Baillie LW, Goldman S, Kampen KR Van. An Adenovirus-Vectored Nasal Vaccine Confers Rapid and Sustained Protection against Anthrax in a Single-Dose Regimen. *Clin Vaccine Immunol* (2013) 20:1–8. doi: 10.1128/CVI.00280-12
268. Liu G, Zhang Y, Ni Z, Yun T, Sheng Z, Liang H, Hua J, Li S, Du Q, Chen J. Recovery of Infectious Rabbit Hemorrhagic Disease Virus from Rabbits after Direct Inoculation with In Vitro-Transcribed RNA. *J Virol* (2006) 80:6597–6602. doi: 10.1128/JVI.02078-05