

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

Mgr Beata Marta Gromadzka

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), odzwierzcące 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 wysokopatogenicznego 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 owadzi prowadzi do tworzenia się biologicznych nanostruktur określanych jako cząstki wirusopodobne. Uzyskano trzy typy cząstek wirusopodobnych wirusa grypy H5N1 w komórkach owadzi: 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-NA/HA/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-NA/HA/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 owadzi 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.