



Пловдивски Университет “Паисий Хилендарски”

Биологически факултет

Катедра ”Физиология на растенията и молекулярна биология”



Милена Мазаловска

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за придобиване на
образователна и научна степен „доктор”

ТЕМА:

**„Разработване на мултифункционални ваксини - транзитна експресия
на имуногенни белтъци в тютюн”**

Област на висше образование: 4. Природни науки, математика
и информатика

Професионално направление: 4.3. Биологически науки

Докторска програма: Молекулярна биология

Научен ръководител:

Гл. ас. д-р Гергана Захманова

Проф. д.б.н. Иван Никифоров Минков

Пловдив, 2017

Дисертантът е редовен докторант към катедра „Физиология на растенията и молекулярна биология“, ПУ „Паисий Хилендарски“.

Дисертационният труд е обсъден и предложен за защита на заседание на катедра „Физиология на растенията и молекулярна биология“ при Биологически факултет на Пловдивски университет „П. Хилендарски“ проведен на 17.03 2017г.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 23.06 2017 г. От 10:00 часа в гр. Пловдив на открито заседание на научното жури.

Увод

Идеята за този дисертационен труд бе продиктувана от общото ни желание да живеем в един по-безопасен свят, в който мултифункционалните ваксини ще доведат до по-успешен контрол върху разпространението на инфекциозни болести.

Инфекциозните заболявания са главна причина за смъртността сред деца и юноши в световен мащаб, както и една от основните причини за смъртност при възрастните, особено в развиващите се страни.

Ваксинацията се счита за една от най-големите медицински постижения на съвременната цивилизация. От времето на първата ваксина срещу вариола до днес, ваксините се развиват постоянно по отношение на ефективността на производството им, степента на пречистеност и безопасност.

Напредъкът в рекомбинантните ДНК технологии и генното инженерство доведе до развитие на субединични ваксини (SUVs). Те се базират на специфични патогенни компоненти, намиращи се на повърхността им. Поради тази причина субединичните ваксини се смятат за по-безопасни от инактивираните или атенюирани ваксини. Проблемът при SUVs е по-ниската имуногенност, поради което са нужни по-големи дози ваксина, адюванти и допълнителни имунизации. Вирусоподобните частици (VLPs) представляват голям напредък в разработката на субединични ваксини, поради тяхната силна имуногенност. Освен фокуса към използването им като ваксини, вирусоподобните частици намират приложение в генната терапия, имуноterapia и целенасочена употреба на лекарства.

В световен мащаб растат нуждите от евтини, лесно прилагащи се и безопасни ваксини. Учените са отговорили на тези нарастващи нужди с разработването на алтернативи при производството на ваксини. Една такава алтернатива е използването на растенията, още известни като „молекулни ферми” за продукцията на фармацевтично важни и комерсиално ценни белтъци. Нашият колектив в сътрудничество с английски учени разработва ваксина, използвайки антигенните свойства на хепатит Е капсидния белтък.

Растенията осигуряват няколко предимства като система за експресия на рекомбинантни белтъци. Такива са ниската цена на производство, правилното нагъване и пост-транслационните модификации на експресирани белтъци, както и безопасна платформа за експресия, тъй като растителните клетки не са носители на човешки

патогени или приони, онкогени ДНК секвенции и ендотоксини. Днес растенията се използват за експресия на чужди гени при продукцията на белтъци с терапевтични свойства за човека. Основната цел при създаването на ваксини в растителни експресионни системи е да се намали производствената им цена и по този начин да станат по-широко достъпни и лесно приложими.

Темата на тази дисертация е експресия на имуногенни белтъци в растения с цел разработка на мултивалентни ваксини и антигени за серологична диагностика. По-специално продукцията на антигенни белтъци и вирусоподобни частици на хепатит Е вируса (HEV) чрез използването на транзитна експресионна система, базирана на мозаичния вирус по дребния боб *Vigna unguiculata* (CPMV).

Цел и задачи

Целта на настоящата дисертация е:

Транзитна експресия на хепатит Е капсидни и химерни белтъци в *N. benthamiana*, използването им за серологична диагностика и възможна разработка на ваксина срещу хепатит Е.

За постигането на тази цел ние планирахме следните основни задачи:

1. Получаване на вариращи по дължина HEV ORF2 гени
2. Създаване на гени с цел получаване на химерни вирусоподобни частици за разработване на мултуфункционални ваксини
3. Транзитна експресия на HEV ORF2 гени и химерните гени в *N. benthamiana*
4. Пречистване на експресираните рекомбинантни белтъци чрез градиентно центрофугиране
5. Молекулярен анализ на рекомбинантните белтъци и оценка на способността им да се самосъбират и формират вирусоподобни частици.
6. Използване на рекомбинантния HEV ORF2 за серологична диагностика на хепатит Е инфекция при хора и прасета.
- ✓ Разработка на in-house ELISA с растително продуцирания белтък за серологична диагностика на хепатит Е инфекция.

Материали и методи

Материали

Бактериални щамове

- *Escherichia coli* XL1-Blue
- *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404

Използван плазмид

- pEAQ-HT (предоставен от Института John Innes, Англия)

Конструкции

- HEV 1-660 в pEAQ-HT вектор, получен в *A. tumefaciens*
- HEV 33-660 в pEAQ-HT вектор, получен в *A. tumefaciens*
- HEV 110-660 в pEAQ-HT вектор, получен в *A. tumefaciens*
- HEV 110-610 в pEAQ-HT вектор, получен в *A. tumefaciens*
- HEV 110-610 в pEAQ-HT вектор, включващ M2e пептида от Инфлуенца А вируса получен в *A. tumefaciens*
- HEV 1-610 в pEAQ-HT вектор, получен в *A. tumefaciens*
- HEV 1-610 в pEAQ-HT вектор, включващ M2e пептида от Инфлуенца А вируса, получен в *A. tumefaciens*
- HEV 33-610 в pEAQ-HT вектор, получен в *A. tumefaciens*
- HEV 110-610 с His Tag в N- или C-терминалния край в pEAQ-HT вектор, получен в *A. tumefaciens*
- mHBc-HEV в pEAQ-HT вектор, получен в *A. tumefaciens*
- tHBc-HEV в pEAQ-HT вектор, получен в *A. tumefaciens*

Растителен материал

За експериментите включващи трансформация бяха използвани растения от вида *Nicotiana benthamiana*. Тези растения бяха отглеждани в оранжерии при постоянна температура от 25°C и ежедневно поливани с вода. За агроинфилтрирането бяха използвани 5-6 седмични растения.

Серуми от пациенти и прасета

Кръвни серуми от пациенти предоставени от Националния център по заразни и паразитни заболявания – 5 отрицателни контроли и 36 серуми позитивни при тестване за наличие на анти-HEV IgG чрез комерсиален кит. Допълнително 45 къвни серума от 6 месечни прасета бяха събрани от ветеринар от 3 различни свинеферми в южна България.

Методи

ДНК конструкции

Генът за капсидния белтък на HEV е синтезиран от GeneArt (Life Technologies) за получаване на материал за последващото клониране и гenna експресия. Плазмидната ДНК беше изолирана посредством QIAprep Spin MiniPrep Kit (Qiagen) съгласно инструкциите на производителя.

Полимеразна верижна реакция (PCR)

Амплификацията на ДНК беше проведена с помощта на GoTaq Green Master Mix (Promega) и анализирана с агарозна гел електрофореза по стандартен протокол от Института John Innes, Англия.

Секвениране на ДНК

Секвенирането на плазмидната ДНК е направено чрез използването на Eurofins SmartSeq kits и извършено от Eurofins Genomics (UK).

Бактериални щамове и условия на растеж

Компетентни клетки на *E.coli* бяха получени по метода на Inoue (Inoue, Nojima et al. 1990), докато компетентни клетки на *Agrobacterium tumefaciens* по метода на (McCormac, Elliott et al. 1998). Агробактериална суспензия беше изготвена по стандартен протокол от Института John Innes, Англия.

Анализ на белтъците (тотален и пречистен белтък)

За екстракция на тотален белтък листната тъкан беше хомогенизирана с използване на керамично мънисто (MP Biomedicals) в съотношение 3:1 (три обема екстрахиращ буфер към 100 mg свежо тегло) в Omni Bead Ruptor 24 хомогенизатор (Camlab) за 30 сек. Белтъците бяха анализирани чрез полиакриламидна гел електрофореза – SDS-PAGE и Western blot по стандартен протокол от Института John Innes, Англия. Електронната микроскопия (TEM) и масспектралните анализи бяха направени по стандартни протоколи от Института John Innes, Англия. Разработен беше ензимно-свързан имуносорбентен анализ (ELISA) по метода на Baechlein (Baechlein, Meemken et al. 2013).

Използвани методи за пречистване на рекомбинантните белтъци

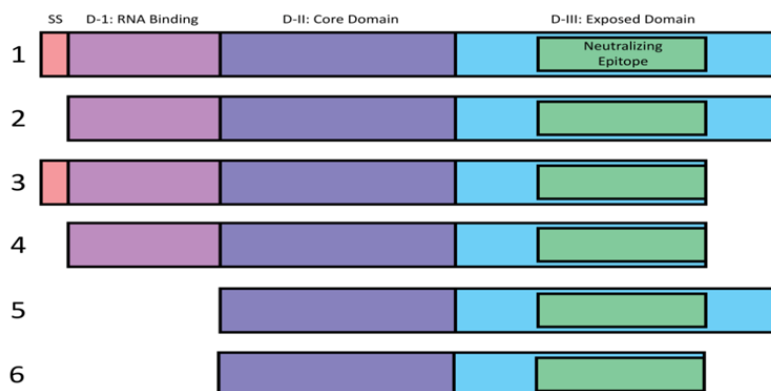
Диференциалното градиентно ултрацентрифугиране беше направено по протокол на Peyret (Peyret 2015). Пречистването на рекомбинантни белтъци чрез His-tag афинитетна хроматография с използване на Ni-NTA Agarose (Qiagen) беше извършено съгласно инструкциите на производителя.

Резултати и обсъждане

1. Получаване и пречистване на вариращи по дължината HEV ORF2 гени

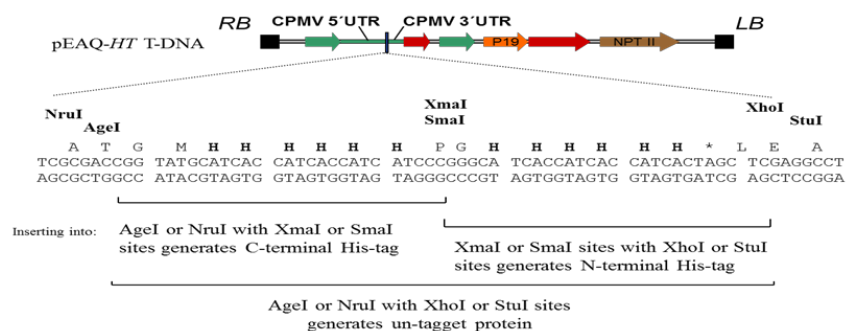
1.1 Клониране на вариращи по дължина HEV ORF2 гени

Нуклеотидната последователност на целия HEV ORF2 (1-660 АК) капсиден белтък генотип 3 (GenBank номер за достъп DQ079627.1) и капсидният белтък с липсващи 50 АК в С-края (1-610 АК) са синтезирани от фирмата Life technologies. Тъй като използваме растенията като експресионна система, гените за капсидния белтък са кодирани оптимизирани съгласно нуклеотидната последователност на растението гостоприемник *N.benthamiana*. Кодон оптимизирането позволява максимална експресия на хетероложните гени в самото растение и е извършено чрез софтуерна програма на фирмата Life technologies (Love, Chapman et al. 2012). За създаването на различните конструкции, ние се ръководихме от литературни данни, които показват, че формирането на вирусоподобни частици зависи най-много от нуклеотидната последователност на HEV ORF2 т.е използвания щам, дължината на капсидния белтък, както и системата за експресия на рекомбинантния белтък. За да установим дали растенията са подходяща експресионна система за формиране на вирусоподобни частици, създадохме конструкции с варираща дължина на белтъка, с цел анализ на ефекта при отстраняването на N- и/или С-терминалния край на капсидния белтък, като запазахме минималния регион, отговорен за самосъбиране и образуване на вирусоподобни частици (126-601 АК) (Li, Zhang et al. 2005) (Фигура 1).



Фигура 1 Схема на шестте HEV конструкции; ss—сигнална секвенция, D-I РНК свързващ домен, D-II кор домен, D-III домена съдържаща неутрализиращите епитопи; 1. HEV 1-660; 2. HEV 33-660; 3. HEV 1-610; 4. HEV 33-610; 5. HEV 110-660; 6. HEV 110-610.

С използването на ген специфични праймери създадохме HEV 33-660 и HEV 33-610 конструктори с липсваща сигналната секвенция (1-32 АК) и HEV 110-660 с липсващ N-терминален край, който е необходим за свързването на вирусната геномна РНК. Най-късият вариант на капсидния белтък, HEV 110-610, при който липсват 109 АК в N-терминалния край и 50 АК в С-терминалния край, е получен от конструктор HEV 1-610 чрез използване на рестрикционни ензими – *NruI* и *XhoI*. Синтетичните гени бяха клонирани в pEAQ-*HT*, вектор за транзитна експресия чрез използване на *AgeI* и *XhoI* или *NruI* и *XhoI* рестрикционните ензими (Фигура 2). Последва трансформация на бактериални клетки *E.coli* с цел размножаване на новополучените ДНК секвенции и въвеждането им в агробактериални клетки. След потвърждаване на положителните колонии от бактериални клетки *E.coli* и *Agrobacterium tumefaciens*, чрез Colony PCR и секвениране, бяха изготвени глицеролови стокове и/или агробактериална суспензия със съответния буфер за инфилтриране на листа от *Nicotiana benthamiana*.

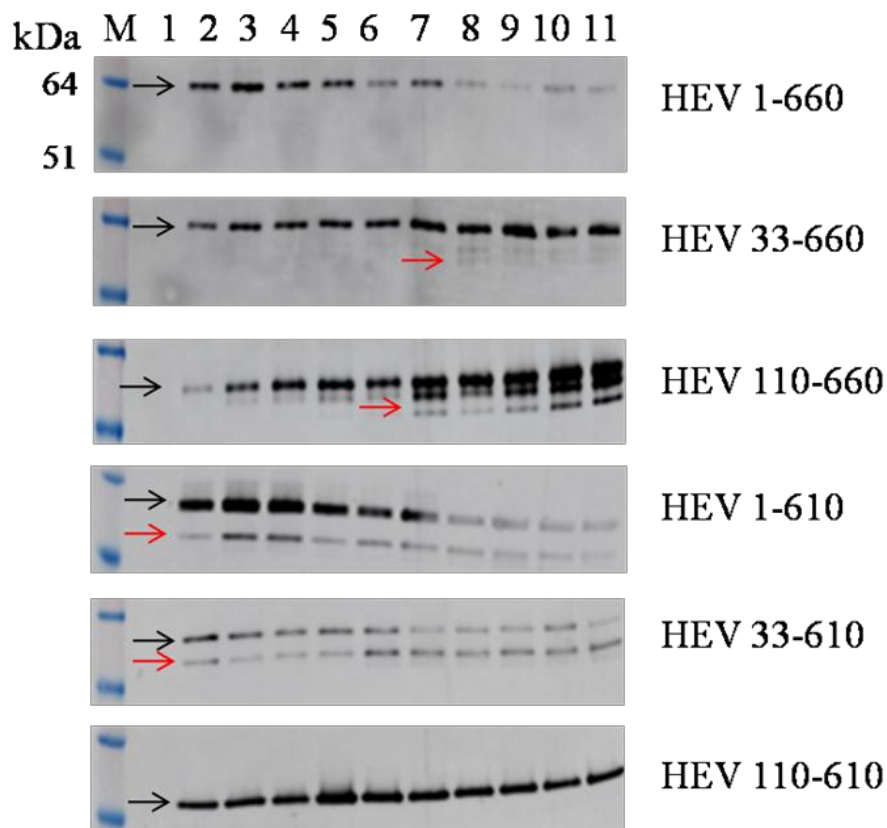


Фигура 2. pEAQ-*HT* вектор за транзитна експресия в растения (Sainsbury et al., 2009).

1.2 Транзитна експресия на вариращите по дължина HEV ORF2 гени

За проследяване на транзитната експресия на 6-те конструктора, 5-6 седмични растения бяха инфилтрирани с агробактериална суспензия. За определяне на оптималната експресия на белтъците след инфилтрация, беше проведен “time-course” в продължение на 10 дни. За негативна контрола бяха използвани растения инфилтрирани с „празен” вектор pEAQ-*HT*. Инфилтрираният листен материал (100 mg) беше събран и обработван ежедневно с 3 обема буфер за екстракция, след което беше добавян буфер за нанасяне и проведено нагряване за 5 мин. при 100°C. Така получените проби бяха съхранявани при 4°C и последователно анализирани с полиакриламид гел електрофореза и western blotting. Western blotting анализът позволява определяне на специфичен белтък в смес от такива при използване на специфично антитяло (mAb). С помощта на този

анализ, получаваме информация за транзитната експресия, както и молекулното тегло на търсените от нас HEV капсидни белтъци. Проведения western blot анализ потвърди, че растенията успешно синтезират HEV белтъците с размери съответстващи на предварително теоретично определеното им молекулно тегло (Фигура 3). Анализът показва също, че експресията на белтъците се увеличава постепенно, като при някои от конструктите с нарастването на експресията на белтъка се наблюдават и повече деградиращи продукти. При пробата от растение инфилтрирано само с „празен” вектор – pEAQ-*HT*, не се наблюдават ивици, което потвърждава специфичността на анализа.



Фигура 3 Western blot анализ на транзитната експресия на вариращите по дължина HEV ORF2 гени. М-протеинов маркер; 1. Негативна контрола; 2-11 Проби събирани в продължение на 10 дни след инфилтрация и анализирани чрез western blotting с използване на анти-HEVORF2 антияло. Черна стрелка: експресирани белтъци; червена стрелка: продукти на деградация.

От този анализ заключаваме следното:

- Вариращите по дължина HEV ORF2 гени са успешно експресирани в растения.
- При експресията на хепатит Е капсидния белтък не се наблюдава некроза в инфилтрираните растения (Фигура 15). Известно е, че много свърхекспресирани рекомбинанти белтъци задействат растителния свърхчувствителен отговор, който

води до програмирана клетъчна смърт или некроза на листната тъкан (Namorsky, Kouokam et al. 2015).

- Белтъците започват да се експресират най-рано 2 dpi, като е постигната добра експресия при всички конструкти.
- Малките разлики в експресията на различните конструкти може да се дължи на отстраняването на сигналната секвенция и/или N/C-терминалния край на ORF2 белтъка. При голяма част от конструктите се забелязват продукти на деградация.

1.3 Пречистване и анализ на експресираните рекомбинантни белтъци

За пречистване на по-голямо количество белтък, пет 5-6 седмични растения бяха инфилтрирани отделно с шестте конструкта и листният материал (приблизително 10g) беше събран на 6 dpi (Фигура 4).



Фигура 4 Растения инфилтрирани с агробактериални култури съдържащи гени на хепатит Е капсидния белтък. Некроза на листната тъкан не се наблюдава дори след 10-я ден при инфилтрирането на растенията със съответните конструкти.

Western blot анализът на пробите, взети от отделните конструкти на 6 dpi, показва различни нива на експресия на вариращите по дължина HEV гени. За теоретичното определяне на молекулните тегла на отделните белтъци беше използвана онлайн биоинформатичната програма-Expasy (Таблица 1) (www.expasy.com). HEV вирусният капсиден ген съдържа 660 АК с молекулно тегло от ~72 kDa, като след модификациите за отстраняването на сигналната секвенция и/или N/C- терминалния край, получените белтъци са с различно молекулно тегло като следва:

Таблица 1 Молекулно тегло и брой аминокиселини на вариращите по дължина HEV ORF2 конструктори

| Конструктор | Брой аминокиселини | Молекулно тегло (kDa) |
|-------------|--------------------|-----------------------|
| HEV 1-660 | 660 | 72 |
| HEV 33-660 | 627 | 67.4 |
| HEV 110-660 | 550 | 59.3 |
| HEV 1-610 | 610 | 65.4 |
| HEV 33-610 | 577 | 61.8 |
| HEV 110-610 | 500 | 53.8 |

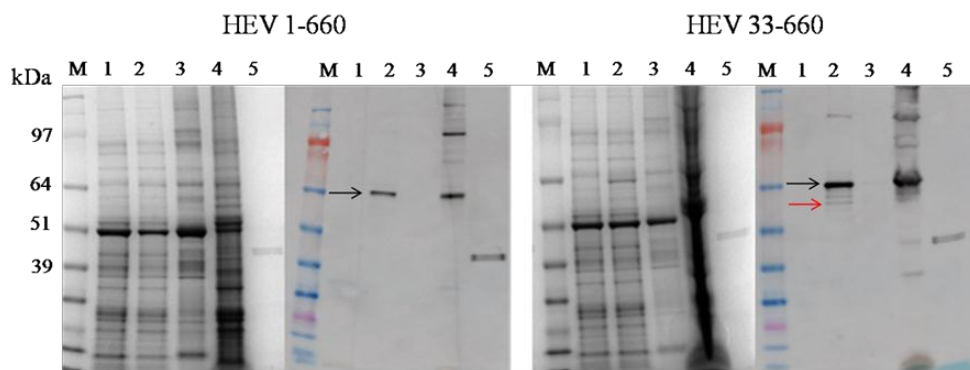
Размерите на HEV рекомбинантните белтъци допълнително бяха уточнени чрез денатурираща полиакриламидна гел-електрофореза.

1.3.1 Пречистване на HEV 1-660 и HEV 33-660

Капсидният белтък на хепатит Е вируса започва със сигнална секвенция, богата на полярни и заредени АК, за която се смята, че го насочва към секреторната мрежа на клетката. HEV вирионът е изграден от 180 копия на капсидния белтък, но до момента няма данни дали целият или скъсеният варианти на този протеин участват в самосъбирането на вирусния капсид. За да определим дали HEV белтъкът може да се самосъбира при експресия в растителни клетки, създадохме конструктори с различни модификации които включват: целия белтък, целия белтък без сигнална секвенция и белтъци с модификации в N и/или C-терминалния край. След като установихме, че всички конструктори се експресират в растения, избрахме буфера за хомогенизиране на листната тъкан (PBS pH 7.4) и метода на пречистване по литературни данни (Li, Yamakawa et al. 1997, Li, Takeda et al. 2001). Накратко, след хомогенизиране със съответния буфер, екстрактът се подлага на центрофугиране за отстраняване на грубия листен материал. Получената утайка и супернатанта допълнително се анализират за да се определи разтворимостта на експресирания белтък. След това получената супернатанта се подлага на диференциално и зонално ултрацентрифугиране. Най-често използваните среди при ултрацентрифугирането са захароза, цезиев хлорид, или нейонна среда като Никоденз. Градиентът се постига чрез наслояване на различни концентрации

на съответната среда (20-30-40-50-60%). Вирусоподобните частици ще мигрират в зона с определена плътност и по този начин се пречистват от останалите молекули в разтвора. След ултрацентрифугирането епруветките се продупчват на дъното и се събират фракции от 1 ml до края на изтичането. Тези фракции след това се анализират чрез western blot, докато визуализацията на VLPs става с електронна микроскопия.

След хомогенизацията на лисната тъкан анализирахме разтворимостта на целия белтък и целия белтък без сигнална секвенция. За целта, в първото гнездо на гела нанесохме проба, изолирана от растения инфилтрирани с “празен” вектор – рЕАQ-*HT*, като отрицателна контрола. Добавихме рекомбинантен HEV ORF2 452-617 АК белтък в гнездо 5 като положителна контрола. На фигура 5 се наблюдава сигнал в гнездо 2, което показва тоталния белтък експресиран в растенията, докато сигналът в гнездо 4 показва, че част от експресирания белтък се намира в неразтворимата част т.е белтъкът пада в утайката при първото центрофугиране. Фактът, че не наблюдаваме сигнал в супернатантата (гнездо 3) не означава, че белтъкът е изцяло неразтворим. Липсата на сигнал може да се дължи на това че протеинът е разтворен в голям обем и съответно не може да се детектира (Фигура 5).



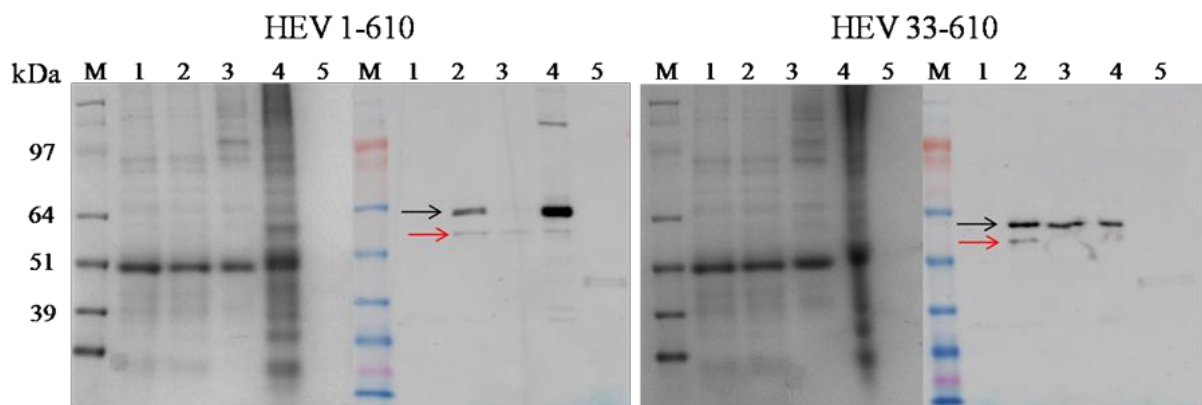
Фигура 5 SDS-PAGE и western blot анализ на HEV 1-660 и HEV 33-660 белтъци. М. Протеинов маркер; 1. рЕАQ-*HT*; 2. Тотален белтък ;3. Супернатантата; 4. Утайка; 5. HEV ORF2 452-617 АК. Черна стрелка: експресирани белтъци; червена стрелка: продукти на деградация.

Получената супернатантата след това беше подложена на диференциално центрофугиране за утаяване на вирусоподобните частици и разтворената утайка нанесена на 20-60% захарозен градиент за частично пречистване и концентриране на пробата. Western blot анализът на отделните фракции от зоналното центрофугиране не успя да демонстрира наличие на белтък (данните не се показани). Полученият резултат при експресия на целия капсиден белтък (HEV 1-660) в растенията е в съгласие с резултати, публикувани при експресия на този белтък в клетки от насекоми (Li, Yamakawa et al. 1997). При експресията на целия капсиден белтък в две различни клетъчни линии, Tn5 и Sf9,

протеинът остава в неразтворимата част в процеса на пречистване. Подобно на целия капсиден белтък, при експресия на HEV 33-660 без сигнална секвенция в растенията получаваме в голяма част неразтворим белтък, който не се самосъбира във вирусоподобни частици, въпреки че се подлага на допълнително рязане, видимо при western blot анализа (повече ивици).

1.3.2 Пречистване на HEV 1-610 и HEV 33-610

За да определим дали липсата на С-терминалния край ще има влияние върху експресията както и върху самосъбирането, създадохме конструктор с липсващ С-терминален край (HEV 1-610). След като установихме, че отстраняването на сигнална секвенция увеличава разтворимостта на белтъка използвахме HEV 1-610 конструктора като матрица за създаване на конструктор без сигнална секвенция (HEV 33-610). При анализ на пробите получени от експресия на тези конструктори получаваме отново сигнал в неразтворимата част от материала. Освен това, се наблюдава ивица с по-ниско молекулно тегло, което показва че белтъкът с липсващ С-терминален край също се подлага на деградация. Отстраняването на сигналната секвенция (32 АК) при HEV 33-610 видимо подобрява разтворимостта на белтъка за разлика от целия белтък без сигнална секвенция (HEV 33-660) (Фигура 6).

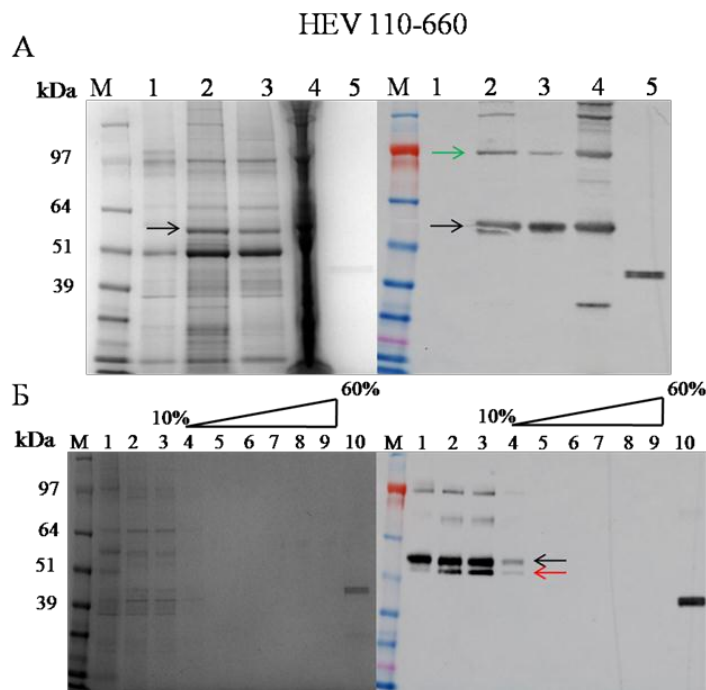


Фигура 6 SDS-PAGE и Western blot анализ на HEV 1-610 и HEV 33-610 белтъци. М. Протеинов маркер; 1. рEAQ-*HT*; 2. Тотален белтък; 3. Супернатанта; 4. Утайка; 5. HEV ORF2 452-617 АК. Черна стрелка: експресиран белтък, червена стрелка: продукти на деградация.

Въпреки, че се отчита наличие на белтък в разтворимата част, анализът на фракциите от градиентното центрофугиране не показват сигнал на western blot мембраната след 10% захарозен разтвор, което навежда на мисълта че белтъците не са достатъчно плътни за да преминават през различните % захарозни разтвори (данните не се показани). За сравнение, пречистените вирусоподобни частици в клетки от насекоми обикновено са намират в 25-30% разтвор на захароза или CsCl (Li, Kataoka et al. 2015).

1.3.3 Пречистване на HEV 110-660 и HEV 110-610

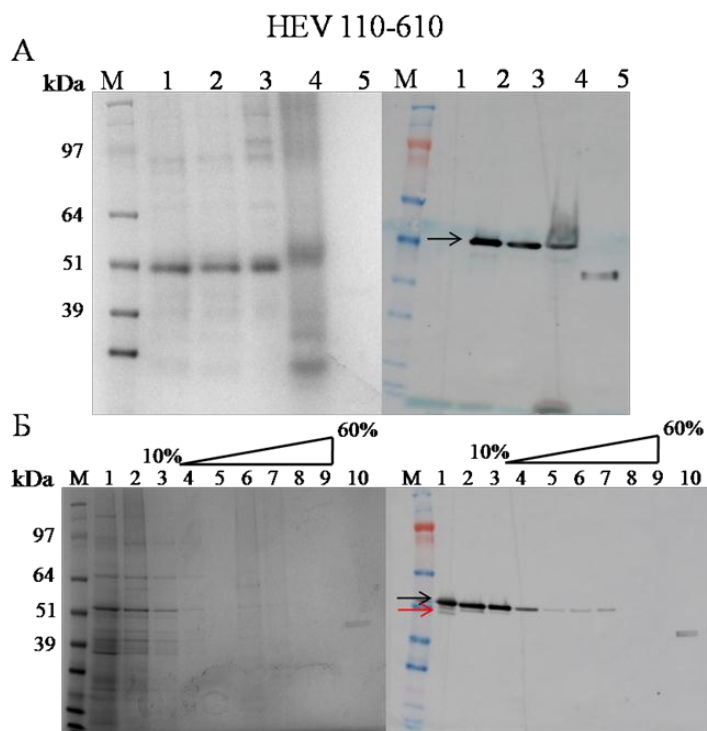
Последните два изследвани конструкта имат най-висока експресия, видима още при SDS-PAGE гела, в сравнение с останалите. При HEV 110-660 белтъка липсва само N-терминалният край, докато при HEV 110-610 липсват и двата N-/С-терминални краища. Изглежда, че отстраняването на РНК свързващия домен подобрява разтворимостта при двата HEV белтъка (Фигура 7А и 8А). Установено е, че експресията на N-терминално скъсен белтък в клетки от насекоми, чрез допълнително рязане на С-терминалният край, формира вирусоподобни частици (Li и сътр., 1997). Обаче, Shiota и сътр. предполагат, че скъсяването в С-терминалният край става след формирането на VLPs, тъй като този регион е високо консервативен и е важен за жизнения цикъл на вируса (Shiota, Li et al. 2013). Тъй като е възможно да е необходим интактен С-терминален край при експресията на белтъка в растения за правилното нагъване и самосъбиране във вирусоподобни частици, експресирахме и двата варианта и анализирахме способността им за самосъбиране.



Фигура 7 А) SDS-PAGE и western blot анализ на HEV 110-660. М-протеинов маркер; 1. рEAQ-*HT*; 2. Тотален белтък; 3. Супернатанга; 4. Утайка; Б) Захарозен градиент. М. Протеинов маркер; 1. Супернатанга след утаяване; 2. Утайка; Супернатанга от градиента; 3. 10% захарозен разтвор; 4. 20 %; 5. 30%; 6. 40% ; 7. 50%; 8. 60%; 9. HEV ORF2 452-617 АК. Зелена стрелка: ивици с високо молекулно тегло; черна стрелка: експресиран белтък; червена стрелка: продукти на деградация.

Въпреки, че експресираният HEV 110-660 АК в растителната тъкан е разтворим и се подлага на рязане, белтъкът остава в горните фракции на захарозния градиент, което

предполага, че той не се самосъбира във вирусоподобни частици (Фигура 7Б). Тъй като утаяването с ултрацентрифугиране може да повлияе на формираните вирусоподобни частици, част от супернатантата е поставена директно върху захарозен градиент. Както при утаяването така и при използването на супернатантата, анализираниите фракции не дадоха положителни резултати т.е белтъкът остава в началото на градиента. От тези резултати заключаваме, че експресията на този протеин в растения не формира вирусоподобни частици.



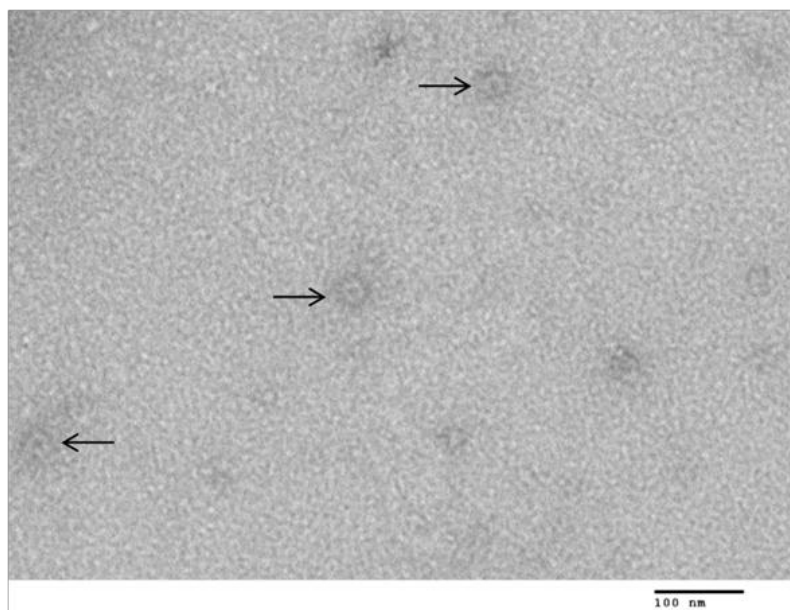
Фигура 8 А) SDS-PAGE и Western blot анализ на HEV 110-610. А) М. протеинов маркер; 1. рEAQ-*HT*; 2. Тотален белтък; 3. Супернатанга; 4. Утайка; Б) Захарозен градиент. М. протеинов маркер; супернатанга след утаяване; 2. Утайка; супернатанга от градиента; 3. 10% захарозен разтвор; 4. 20 %; 5. 30%; 6. 40% ; 7. 50%; 8. 60%; 9. Позитивна контрола HEV ORF2 452-617 АК. Черна стрелка: експесиран белтък; червена стрелка: продукти на деградация.

Въпреки, че HEV ORF2 с липсващ N-терминален край води до формиране на VLPs при Tn5 това не е случай при използването на Sf9 насекомни клетки. Секвенцията, която формира VLPs при Sf9 е N- и C-терминално скъсен белтък. За тази цел последният конструктор, който изследвахме за формиране на вирусоподобни частици в растения е HEV 110-610 АК (Фигура 8А). При експресията на най-късия белтък HEV 110-610, по-голямата част от белтъка е в разтворимата фаза. Изследването на отделните фракции от захарозния градиент дава малко по-различен модел от другите дължини на белтъка. От фигура 21Б се вижда, че по-голямо количество остава в супернатантата като част от него е с по-висока плътност и мигрира в 30-40% от захарозния градиент (Фигура 8Б).

Сигналят във фракции 6 и 7 в средата на градиента, показва възможност на формиране на VLPs.

1.4 Електронна микроскопия

Електронният микроскопски анализ е необходим като крайно доказателство за новосинтезирани вирусоподобни частици (Zeltins 2013). За целта, фракциите от 30-40% захароза са диализирани и концентрирани и в последствие анализирани чрез ТЕМ (Фигура 9). Въпреки, че пробата е концентрирана до 100-200 μ l, анализът показва наличие на малко на брой вирусоподобни частици с размери между 28-30 nm.



Фигура 9 Електронна микроскопия на HEV 110-610.

1.5 Дискусия

Тази глава от дисертацията представя експресия на вариращи по дължина гени на капсидния белтък на хепатит Е вируса и тяхната оценка за способността им да се самосъбират във вирусоподобни частици. При това изследване, вирусният капсиден белтък 1-660 АК на HEV с молекулно тегло от 72 kDa както и различните му модификации бяха успешно експресирани в растения. При експресия на цялата дължина на HEV ORF2 в растения, белтъкът се наблюдава изключително в неразтворимата част т.е утайката. Този резултат не е изненадващ като се има предвид, че подобни резултати се получени при експресия на целия белтък и в клетки от насекоми. Фактът, че HEV

ORF2 има сигнална секвенция и не се открива в извънклетъчната среда при клетки от насекоми, показва, че той остава тясно свързан към клетката (Li, Yamakawa et al. 1997). Формирането на вирусоподобни частици при експресия в Sf9 клетки и растения не се наблюдава. Въпреки, че целият както и различните модификации на HEV ORF2 се успешно експресирани в растения, изглежда че белтъкът не се самосъбира ефективно във вирусоподобни частици.

1. Статус на гликозилиране на експресирания белтък

Капсидният белтък започва със сигнална секвенция за която се предполага, че го насочва през секреторния път на клетката и че при преминаването му се подлага на модификации. Предишни изследвания показват, че ORF2 белтъкът има три сайта на гликозилиране (Graff, Zhou et al. 2008). Добавянето на N-свързани олигозахариди става докато полипептидните вериги се транспортират през мембраната на ендоплазматичния ретикулум (ER) (Fiedler and Simons 1995). Моделът на гликозилиране показва къде белтъкът преминава по време на синтез и обработка. Предполага се, че ORF2 претърпява гликозилиране в ендоплазматичния ретикулум (Jameel, Zafrullah et al. 1996). Експресираните белтъци се транспортират до ER чрез сигнална секвенция, обикновено намираща се в N-края. Тази сигнална секвенция обикновено е къса (5-30 АК) пептидна верига, която е необходима за насочването на новосинтезираните белтъци през секреторния път в различните компартменти, за въвеждането им в клетъчната мембрана или секретирането им извън клетката. Обикновено се приема, че сигналните секвенции имат обща вторична структура или сходно разпределение на заредени и неполярни аминокиселинни остатъци (Schatz and Dobberstein 1996). Сигналният пептид се състои от три региона, полярна област от 2-40 АК, централна хидрофобна област от 7-20 АК и вариabilен регион, последван от пептидазен сайт за рязане (Schatz and Dobberstein 1996). Сигналната секвенция в ORF2 на HEV има подобни характеристики като отстраняването на 33-34 АК води до липса на гликозилиране, което означава че белтъкът не се транспортира в ER (Jameel, Zafrullah et al. 1996). В едно изследване на експресията на целия белтък в трансфектирани COS-1 клетки, изследователите установяват, че значителна част от него се намира в изолирани микростоми. Тези структури се формират от части на ендоплазматичния ретикулум и се получават при нарушаване на клетките в лабораторни условия. От друга страна, при експресия на белтъка без сигналната секвенция (2-34), той се локализира изцяло в цитозола (Zafrullah, Ozdener et al. 1999). Възможно е белтъкът със сигнална секвенция да се интегрира в ендоплазматичната

мембрана или да агрегира в ER. Това изследване съвпада с нашите резултати, че при експресията на конструктите със сигнална секвенция се в голяма част неразтворими и съответно голяма част от белтъка се отстранява при самото пречистване.

Освен неразтворимостта на белтъка същото изследване показва, че при промяна на сайтовете на гликозилиране този протеин става чувствителен на храносмилателния ензим трипсин при експресията му в COS-1 клетъчната линия (Zafullah, Ozdener et al. 1999). Анализ на аминокиселинното съдържание на ORF2 с ExPASy PeptideCutter биоинформатичната програма показва, че HEV секвенцията е богата на сайтове за ензимно рязане, което предполага че, при правилно нагъване на белтъка тези сайтове ще бъдат маскирани и обратно - при неправилното нагъване белтъкът ще е подложен на разграждане. Това показва същественото значение за правилното нагъване на белтъка върху способността за самосъбиране.

До момента, не е изцяло изяснена ролята на гликозилирането при взаимодействието вирус-гостоприемник или самосъбирането на капсида. Въпреки, че гликозилирането е необходимо за самосъбиране на вириона при обвитите вируси, има малко информация за ролята на гликозилирането при вирусите без обвивка. Например, гликозилирането на VP7 капсидния белтък на ротавирус подпомага формирането на дисулфидни връзки и правилното нагъване на белтъка. От друга страна, негликозилираният белтък не се нагъва правилно и агрегира (Mirazimi and Svensson 1998). Гликозилирането увеличава разтворимостта, правилното нагъване и е свързано с инфекциозността при вирусите, които се предават по фекално-орален път, какъвто е и HEV, и се смята, че въглехидратите подпомагат оцеляването на вируса в храносмилателния тракт (Mirazimi and Svensson 1998). В тази теза бяха използвани две дължини на ORF2, които съдържат сигналната секвенция. Както и при експресията в други системи, целият белтък, съдържащ сигнална секвенция, е неразтворим, вероятно дължащо се на неправилното му нагъване. От друга страна, част от белтъка с липващ C-терминален край е разтворим, но е допълнително подложен на деградация. Освен това, нямаме данни дали при експресията им в растения тези белтъци се гликозилират. Ако съдим от направените анализи винаги получаваме белтъци със съответното молекулно тегло. Ако бяха гликозилирани то тогава щяхме да наблюдаваме ивица с по-голямо молекулно тегло. Ако приемем, че тези белтъци не са гликозилирани, тогава остава въпросът дали сигналната секвенция изобщо се разпознава от транслационния механизъм на растението и дали белтъкът се насочва към ендоплазматичния ретикулум. Дали липсата на гликозилиране е причината белтъкът да не се нагъва правилно и да не

формира вирусopodobни частици не е ясно. Друга възможност е белтъкът да се гликозилира и да се насочва в апопласта. Тъй като апопластът е богат на протеиназни ензими, възможно е белтъкът да се подлага на интензивно рязане там. Ако съдим от изследванията в други системи, белтъкът се натрупва в ендоплазматичния ретикулум, като част от него се ретроtransportира обратно в цитоплазмата (Surjit, Jameel et al. 2007). Все пак, трябва да се проведат допълнителни изследвания за да се установи къде точно се transportира HEV ORF2 при експресията му в растения.

2. Неправилно процесирание в самите растителни клетки

Смята се, че експресията на капсидния белтък и процесирането му зависи изцяло от използваната система. От данните, получени при експресия в растения и Sf9 клетки, можем да заключим, че белтъкът не се процесира правилно в двете системи. Това твърдение се потвърждава при експресията на капсидния белтък в друга клетъчна линия – Tn5. Интересно е да се спомене, че цели HEV ORF2 секвенции експресирани в тази клетъчна линия не формират вирусopodobни частици, но някои ORF2 секвенции с липсващи 13 АК в N-терминалния край дават продукти с различно молекулно тегло, от които 64 kDa белтъкът, чрез допълнително рязане в С-края, може да образува вирусopodobни частици (Li, Kataoka et al. 2015). Експресията на HEV 13-660 без 13 АК в N-края е достатъчно протеинът да се подложи на различно процесирание, което да доведе до формиране на вирусopodobни частици. N-терминалното скъсяване на главния капсиден белтък при норовируса, вирус сходен на хепатит Е, също може да формира вирусopodobни частици (Ню, Wan et al. 2015). При експресията на нашата секвенция HEV с липсващи 32 АК (33-660) в N-терминалния край, както и HEV 33-610 с липсващ С-терминален край, не наблюдаваме разтворим белтък, който да формира вирусopodobни частици, въпреки че и двата се подлагат на допълнително процесирание, видимо при western blot анализа.

Показано е, че експресията на N-терминално скъсен белтък е единственият начин за формиране на HEV вирусopodobни частици в Tn5 клетъчната линия. При експресия на N111 скъсен белтък се получават два продукта (58 kDa и 50 kDa), от които 50 kDa формира вирусopodobни частици (Li, Yamakawa et al. 1997). Белтъкът, който формира вирусopodobни частици е продукт на 58 kDa варианта и се смята, че рязането става след формирането на вирусopodobни частици (Shiota, Li et al. 2013). При експресия на N-терминално скъсен белтък в растения ние получихме по-високо разтворим белтък спрямо другите дължини. В същото време, обаче, наблюдаваме и продукти на

деградация. В този момент не знаем дали рязането на белтъка става в С- или N-терминалния край на експресирания белтък. Молекулният анализ за определяне на способността за формиране на вирусоподобни частици не дава положителен резултат.

Скъсения белтък в N/C-терминалните краища е единственият, който може да формира вирусоподобни частици при експресията му в двете различни клетъчни линии. Като последна алтернатива, опитахме да експресираме този вариант на белтъка в растения. Формирането на VLPs от белтъка с липсващ N-и C-терминален край в клетки от насекоми сочи, че C-терминалния край не е от съществено значение за самосъбирането на белтъка (Li и др., 2005). Експресията на съксен белтък в двата края при растения дава високо разтворим продукт, който също е подложен на деградация. Предишно изследване на експресията на HEV в трангенни растения не навежда на мисълта, че това рязане на белтъка става в самата растителна клетка (Maloney, Takeda et al. 2005). Тъй като белтъкът се експресира във високи концентрации, успяхме да го анализираме чрез масспектометрия и да установим че рязането му става в C-терминалния край. Възможно е растителните протеазни ензими да разпознават определена секвенция в C-терминалния край на HEV белтъка или неправилното му нагъване да открива такива сайтове, което да предотвратява формирането на частици. От тези резултати можем да заключим че растенията не са оптималната система за формиране на вирусоподобни частици на хепатит Е капсидния белтък. Откриване на сайта на рязане в C-терминалния край на белтъка и неговата промяната, би могло да промени нагъването на белтъка. Възможно е рязането да става между аминокиселини, които участват в формирането на димерни структури, необходими за вирусното самосъбиране и по този начин да повлияят формирането на VLPs (Li, Tang et al. 2009).

Допълнително доказателство за това, че белтъкът не се нагъва правилно при експресията му в растения получаваме от масспектрометриалния анализ. Много протеини изискват помощта на чаперони за правилното им нагъване *in vivo*. В еукариотни клетки, ER е сайтът за пост-транслационни модификации и нагъване на новосинтезираните белтъци (He 2006). Много вируси използват този органел за техния репликативен цикъл. Известно е, че при експресия на ORF2 белтъка в хепатоцитни клетки определени чаперони като GRP78/bip от семейството HSP70 и GRP78 от семейството HSP90 са свръхекспресирани. Тази свръхекспресия е свързана със стрес в ER, тъй като голяма част от белтъците остават неправилно нагънати и свързани към чаперони, което ги задържа в този органел (John, Thomas et al. 2011). Zheng и сътр., показват че капсидният белтък се свързва с HSP90 и че HSP90 участва във вътреклетъчния транспорт на HEV ORF2

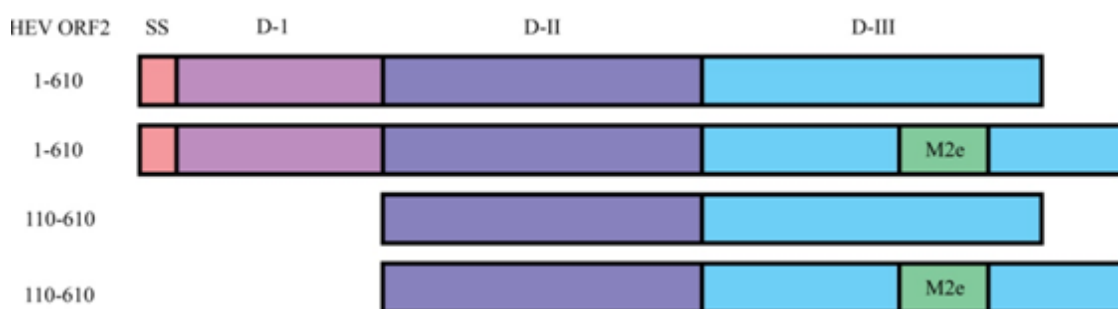
(Zheng, Miao et al. 2010). Смята се, че експресията на тези чаперони е механизъм на вируса да предотврати клетъчната апоптоза. При изследване на експресираните капсидни белтъци в растения чрез SDS-PAGE и western blot, забелязахме ивици с високо молекулно тегло, които реагират с анти-HEV антитяло. Масспектралният анализ потвърди, че тези ивици включват нашия белтък както и чаперони от семействата HSP70 и HSP90. Възможно е липсата на некроза при свърхекспресията на ORF2 в растения да се дължи на свързването на тези чаперони с капсидния белтък. Би било интересно да се изследва кои точно белтъци се активират/потискат, каква е тяхната роля и кои механизми участват в отговор на експресията на ORF2 в растителната тъкан.

2. Създаване на гени за получаване на химерни VLPs за продукцията на мултифункционални ваксини

2.1 Използване на HEV капсидният белтък като носител на чужди епитопи

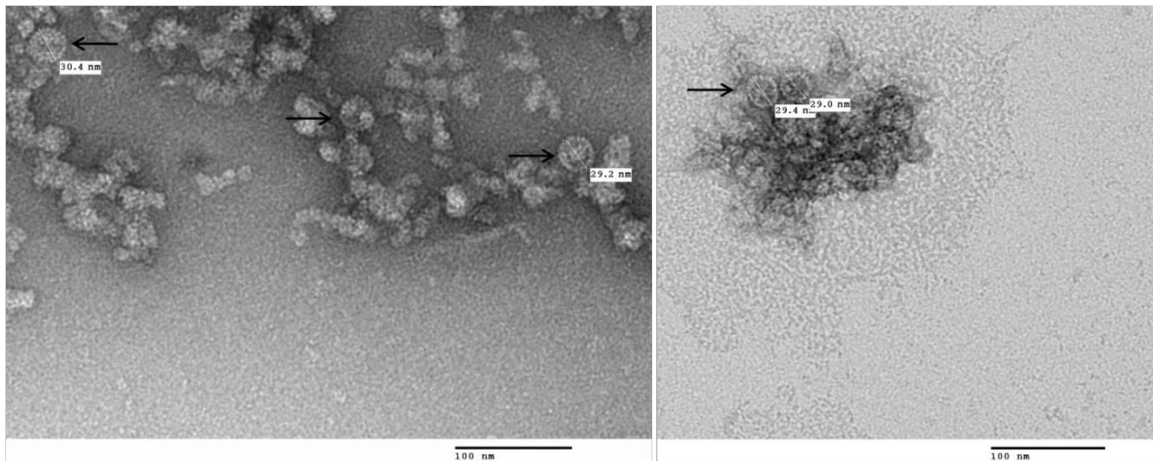
2.1.1 Клониране на химерни HEV-M2e конструкции

Химерните HEV-M2 конструкции бяха създадени чрез въвеждането на M2e пептида (SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD) от Инфлуенца вируса по птиците в големия имунодоминантен регион на HEV белтъка. При свързването на секвенцията на M2e към HEV, M2e може да бъде представен в много по-имуногенна форма. Мястото на въвеждане беше определено в позиция 558 АК от капсидния белтък, сайт който се намира на повърхността на VLPs и съответно ще се разпознава от имунната система. Две дължини на белтъка бяха използвани за създаването на химерните гени, а именно: HEV 110-610 и HEV 1-610. Получените фрагменти бяха клонирани отново във вектора за транзитна експресия – pEAQ-HT (Фигура 10).



Фигура 10 Схема на химерните HEV конструкции съдържащи M2e пептида; ss –сигнална секвенция, D-I РНК свързващ домен, D-II кор домен, D-III домена съдържащ неутрализиращите епитопи; HEV 1-610; HEV 1-610 M2e; HEV 110-610; HEV 110-610 M2e.

2.1.2 Електронна микроскопия



Фигура 11 Електронна микроскопия на HEV 110-610 M2e

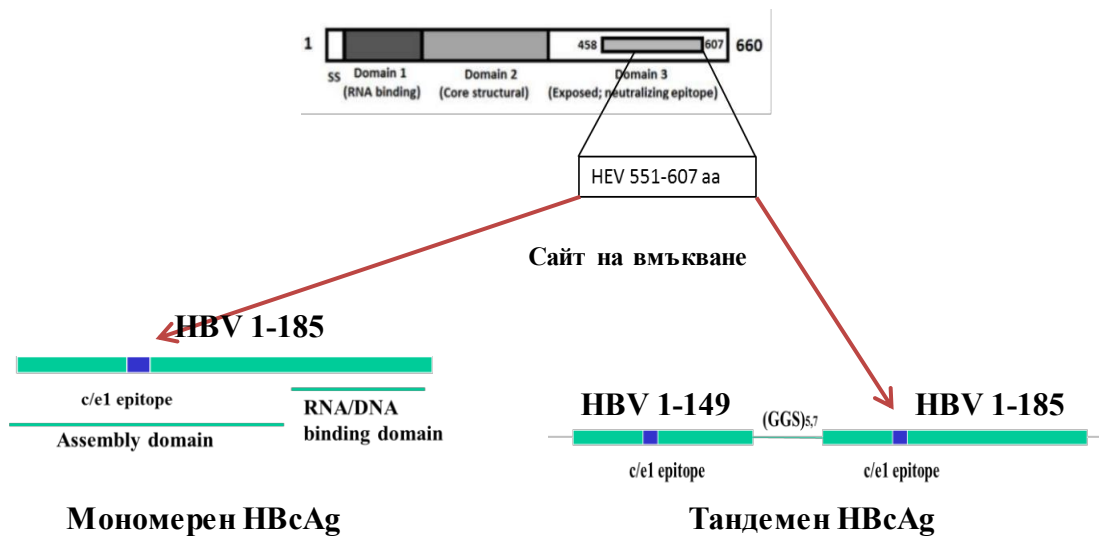
След доказване на транзитната експресия на химерните белтъци преминахме към тяхното пречистване. След допълнително утаяване на фракциите съдържащи химерния белтък HEV 110-610 M2e беше показано наличие на химерни вирусоподобни частици (сVLPs) с размери от 29-30 nm (Фигура 11). Въвеждането на M2e пептида в имунодоминантния регион на най-късия капсиден белтък не повлиява значително експресията, нито формирането на VLPs в растителната тъкан. Анализът за способността на самосъбиране на HEV 110-610 и HEV 110-610 M2e, обаче, демонстрира неефективно формиране на вирусоподобни частици в растителната тъкан.

2.2 Използване на хепатит В капсидния белтък като носител на неутрализиращия епитоп на хепатит Е

2.2.1 Клониране на химерни HBV-HEV конструкции

Гените за тандемния и мономерния хепатит В капсиден белтък (tHBcAg и mHBcAg), предварително клонирани в pEAQ-HT вектора за транзитна експресия чрез използване на рестрикционни ензими – *AgeI* и *XhoI*, бяха предоставени от prof. Lomonosoff, John Innes Center, Англия. Използвани бяха праймерната двойка HBc-HEV F и HBc-HEV R за намножаване на неутрализиращия регион, включващ 551-607 аминокиселина (56 АК), който се намира в С-терминалния край на капсидния белтък на хепатит Е вируса (Schofield, Glamann et al. 2000, Meng, Dai et al. 2001, Zhou, Purcell et al. 2004). Допълнително беше добавен (глицин-глицин-серин)₄ линкер за правилно нагъване на въведената секвенция. За да се подсигурием, че въведеният регион няма да повлияе

самосъбирането на мономерния хепатит В белтък, неутрализиращият регион беше въведен и в тандемния HBcAg конструктор (Фигура 12).

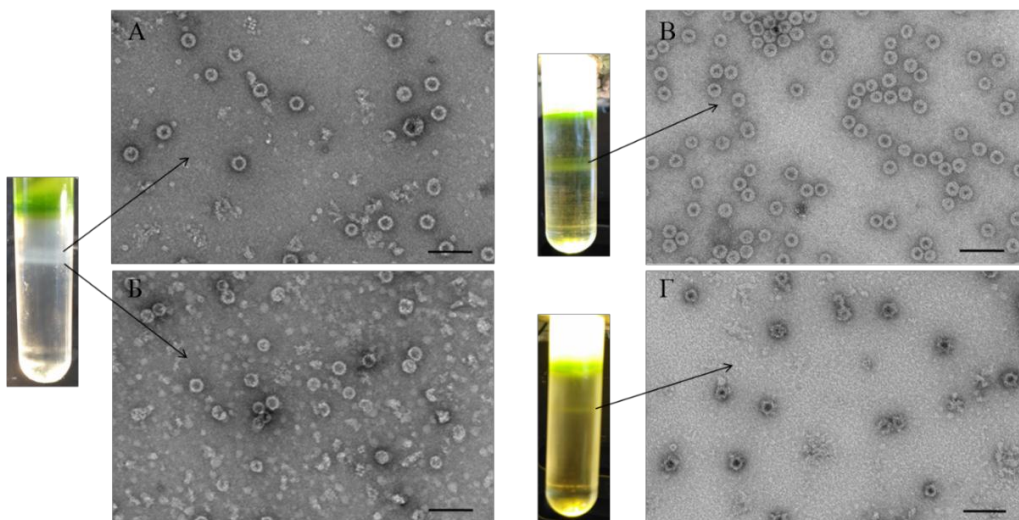


Фигура 12 Схема на клониране на неутрализиращия регион в мономерния и тандемен HBcAg белтък.

След клонирането беше потвърдена транзитната експресия на химерните белтъци и по-голям брой на растения бяха инфилтрирани с цел пречистване на VLPs.

2.2.2 Електронна микроскопи

След пречистването на белтъците пробите бяха визуализирани с ЕМ. Видими бяха многобройни химерни частици, хомогенни по морфология и подобни на тези без въведен епитоп с характерните повърхностни шипове на естествените HBcAg частици (Фигура 13).



Фигура 13 Електронна микроскопия на фракции от Никоденз градиента. А) tHBcAg-HEV горен бенд; Б) tHBcAg-HEV долен бенд; В) mHBcAg; Г) mHBcAg-HEV

2.3 Дискусия

В тази работа искахме да проучим дали хепатит Е каспидния белтък би могъл да се използва като платформа за експресията на M2e пептида на повърхността на белтъка и дали експресирани в растения VLPs съдържащи M2e белтъка, биха могли да се използват като кандидат „универсална” ваксина срещу грипа. В това изследване създадохме два конструкта съдържащи ектодомена на мембрияния белтък M2e в сайт, намиращ се на повърхността на вирусоподобната частица. От проведените анализи забелязахме, че въвеждането на M2e не повлиява нивото на експресия на хепатит Е белтъка. Както при HEV 110-610 без M2e, така и при HEV 110-610 M2e наблюдавахме малко на брой VLPs с размер и морфология сходна на естествените вириони. Въпреки че не са в голям брой, способността на HEV 110-610 и химерният белтък да формират вирусоподобни частици е обещаваща за бъдещи изследвания. Оптимизация на протокола за пречистване и подбора на подходяща среда за тяхното формиране може да подпомогнат за увеличен добив с цел изследване на имуногенността им.

Втората стратегия, която приложихме с цел разработка на възможна ваксина срещу HEV, беше ползване на друг носител за въвеждане на неутрализиращия регион на хепатит Е. За тази цел избрахме капсидния белтък на хепатит В вируса, тъй като при експресия в растения се самосъбира във VLPs. С помощта на праймери клонирахме неутрализиращия регион (551-617 АК) в имунодоминантния регион на капсидния белтък на хепатит В. За да се уверим, че въведеният регион няма да повлияе самосъбирането на белтъка, използвахме мономерния и тандемен варианти. Тандемният белтък се експресира в димерната си форма, като по този начин позволява въвеждането на по-дълги епитопи, които могат да се клонират без да повлияят самосъбирането му. Успяхме да установим формирането на химерни VLPs както при mHBsAg-HEV така и при tHBsAg-HEV. При визуализация с електронна микроскопия химерните частици бяха с морфология и размери подобни на частиците получени без въведения регион. Тези химерни частици бяха тествани с човешки серуми положителни на анти-HEV антитела, за да установим дали те ще реагират с неутрализиращия регион на HEV. От проведената ELISA, резултатите показаха малък брой положителни серуми. Причините за неефективното разпознаване може да се дължи на няколко фактора. Възможно е секвенцията на HEV, клонирана в имунодоминантния регион на HBsAg, да не се нагъва в правилната конформация. Възможно е също при самоасемблирането на белтъка във VLPs, въведената секвенция да не се намира на повърхността, въпреки че при клонирането се използвани линкери богати на полярни аминокиселини, които

подпомагат гъвкавостта му. Тези причини са достатъчни за анти-HEV антителата от човешкия серум да не разпознават химерните частици. В идеалния случай, би било интересно да се проследи имунния отговор при инжектиране на мишки с химерните частици. Тестването на серум от мишки с нашите химерни частици ще покаже дали участъка от HEV е имуногенен т.е дали химерните частици ще индуцират имунен отговор към този регион. Освен това, може да се изследва и имунния отговор към самия носител и това да предостави информация за ползата от НВсAg като основа при създаването на ваксина срещу HEV.

3. Използване на рекомбинантния HEV ORF2 за серологична диагностика

3.1 Клониране на HEV 110-610 белтък с His tag

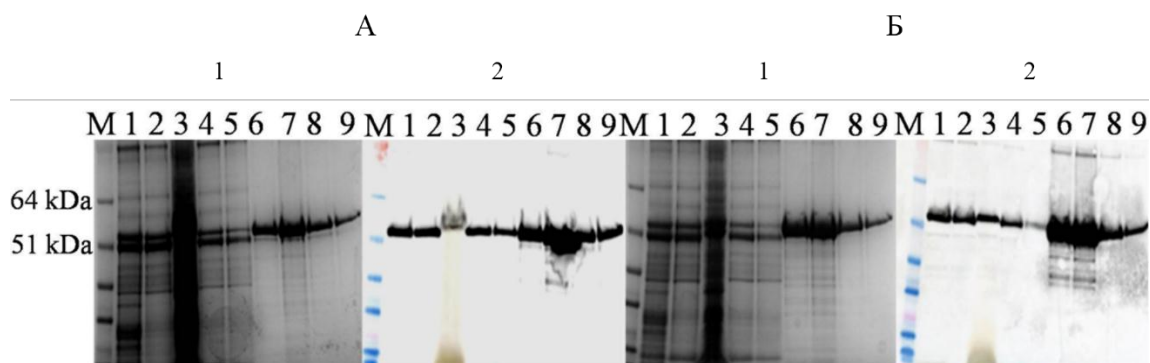
Нуклеотидната последователност на HEV капсидния белтък (GenBank номер за достъп DQ079627.1) с липсващи 109 АК от N-терминалния край и 50 АК от C-терминалния край (или HEV 110-610) беше използван като матрица за клониране на 6 His остатъци в N- или C-терминалния край (Фигура 14).



Фигура 14 Схема на HEV 110-610 белтък и HEV 110-610 белтък с полихистиридинов таг в N- или C-терминалния край.

3.2 Транзитна експресия и пречистване на HEV 110-610 белтък с His tag

Пет 5-6 седмични растения бяха инфилтрирани с *Agrobacterium tumefaciens* носещи гена за HEV 110-610 N-His tag или HEV 110-610 C-His Tag. Растителният материал беше събран ден 6 след инфилтрация. Беше изолиран тотален белтък и анализиран чрез SDS PAGE и western blotting. Western blot анализът с използването на анти-HEV mAb показва, че растенията успешно произвеждат и двата белтъка. Молекулната маса на ивицата съответстваше на очакваната големина на белтъка от 54.6kDa (Фигура 15).

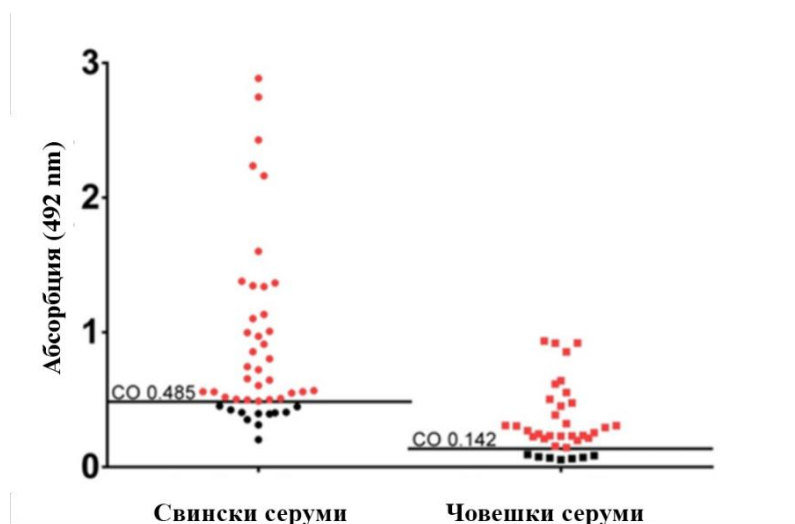


Фигура 15 А1) SDS-PAGE анализ на HEV 110-610 C-His tag белтък. А2) Western blot с използване на анти-HEV ORF2 антитяло; Б1) SDS-PAGE анализ на HEV 110-610 N-край His tag; Б2) Western blot с използване на анти-HEV ORF2 антитяло;. М. Протеинов маркер 2; 1. Тотален белтък; 2. Супернатанга; 3. утайка; 4. Фракция след преминаване на тоталния белтък през колонката; 5. Измиваща стъпка; 6 – 9. Елюати на 54.6 kDa белтъка.

3.3 Разработване на in-house ELISA с пречистения ORF2 белтък

3.3.1 Тестване на човешки и свински серуми

За тестване на растително продуцирания рекомбинантен белтък бяха използвани 36 положителни за HEV човешки серуми чрез използване на комерсиален кит от DIA.PRO.(Италия). Допълнително, 45 кръвни серума изолирани от здрави 6 месечни прасета от три различни свинеферми в южна България бяха тествани за анти-HEV IgG антитела. Стойностите на абсорбция се изразяват като P/N, изчислено като (стойност на абсорбцията на тестовата проба)/(стойност на абсорбцията на отрицателната контрола). Пробите с абсорбции над 2.5 се считат за положителни.



Фигура 16 In-house ELISA на серумни проби, базирани на HEV 110-610 C-His tag белтъка. Данните са показани като стойности на абсорбцията на изследваните серумни проби. Стойността на cut-off (OD) се обозначава с хоризонтална линия (0.485 за свински серуми и 0,142 за човешките серуми). Пробите се считат за позитивни, ако оптичната плътност е над граничната стойност (в червено).

Приемаме, че всички проби, при които оптичната плътност е по- висока от 0, 148, са позитивни при човешките и 0.485 при свинските. При използването растително продуцирания HEV 110-610 C-His tag белтък като диагностичен антиген в разработената от нас in-house ELISA, открихме анти-HEV IgG антитела в 29 от 36 предварително определени положителни човешки серуми. ELISA показва антитела в 34 прасета или 75.5% са положителни за анти-HEV IgG антитела (Фигура 16).

3.4 Дискусия

Хепатит Е вирусът е възникващо зооозно заболяване в света. Патогенът присъства в редица животински видове като прасета, диви свине, сърни, зайци и гризачи, но клинично заболяване не е свързано с този вирус при животните. Установено е, че зооозното предаване на HEV е свързано с консумация на свински месни продукти (Tei, Kitajima et al. 2003, Tamada, Yano et al. 2004). HEV генотип 3 щамове, открити при хора и прасета, принадлежат на една група и не могат да бъдат генетично различни (Takahashi, Kitajima et al. 2004). Наличието на подобни HEV щамове при животни и хора показват, че HEV е разпространен между домашните животни, диви животни и хора, което подчертава зооотичния потенциал на HEV. Установено е, че прасетата са главният резервоар на HEV вируса. Някои проучвания показват, че HEV е бил разпространен в домашни и диви прасета в продължение на десетилетия (Kaci, Nöckler et al. 2008). Ограниченията относно диагностициране и липсата на клинични и епидемиологични данни за HEV в различни животински популации правят трудна оценката за риска от разпространяване на заболяването сред човешкото население.

Диагностицирането на Хепатит Е инфекцията се основава главно на откриването на анти-HEV антитела или HEV РНК в серумни проби. Присъствието на анти-HEV IgG антитела обикновено се използва за определяне на серопозитивността в населението, обаче потенциално може да се приложи и при диагностицирането на инфекцията, тъй като и двата класа антитела – IgG и IgM са произвеждат при остра инфекция преди появата на клинични симптоми (Hoofnagle, Nelson et al. 2012). Въпреки че са налични няколко диагностични китове за тестване на анти-HEV антитела, те често предоставят противоречиви резултати и са доста скъпи (Bendall, Ellis et al. 2010). Нуждаем се обаче, от рентабилно производство на рекомбинантни белтъци като диагностични антигени, полезни за серологично диагностициране на HEV. Въпреки че добра експресия е постигната в бактериални клетки и животински клетъчни линии, процесът все пак е труден и доста скъп (Mett, Farrance et al. 2008). За разлика от клетъчните култури, които

изискват големи ферментационни камери и скъпи среди, производството на белтъци в растения се нуждае от значително по-малко първоначални инвестиции. Следователно, растенията могат да послужат като алтернативен източник за производство на рекомбинантни белтъци полезни за имунологични изследвания. Растенията са били използвани като платформи за производство на редица диагностични и терапевтични рекомбинантни белтъци, поради тяхната безопасност и способност да изпълняват еукариотни пост-транслационни модификации (Mett, Farrance et al. 2008, Lomonossoff and D'Aoust 2016). До момента, търговските китове за серологично тестване на HEV инфекцията се базират на капсидния белтък, произведен в клетъчни култури, обаче използването на диагностични антигени произведени в растения би могло да подобри общата цена на такъв кит и неговата наличност извън развитите страни.

Целите на това проучване бе експресия на HEV капсидния белтък генотип 3 в растения и използването му като диагностичен антиген за откриването на анти-HEV антитела при прасета в България, както и определяне ползата му за тестване на човешки серуми. Скъсеният капсиден HEV белтък 110-610 АК с His tag беше експресиран и използван за разработване на in-house ELISA за детекция на анти-HEV IgG антитела. За първи път беше постигната транзитна експресия на HEV 110-610 His tag белтъка в *N. benthamiana*. Тя беше потвърдена чрез western blot, използвайки добре охарактеризирано моноклонално анти-HEV антитяло, положителни човешки и свински серуми. Също така, този белтък беше успешно експресиран с полихистидинов таг в N- или C-терминалния край. При ползването на отрицателни на HEV серуми като контрола не бяха наблюдавани сигнали на мембраната.

При in-house ELISA беше определена оптималната концентрация на антигена и серум разреждането както за свинските така и за човешките серуми. Използването на скъсения капсиден белтък като диагностичен антиген при ELISA успя да детектира 29 от 36-те потвърдени чрез комерсиален кит човешки серуми. Показахме, че растително произведения HEV 110-610 белтък може да се използва като антиген при ELISA, тъй като има способността да детектира анти-HEV IgG антитела в човешки серуми с подобна точност в сравнение с търговски кит. Нещо повече, успяхме да потвърдим наличието на анти-HEV IgG антитела при прасета в България. Тъй като тези животни обикновено не са тестват за HEV инфекция, необходими са допълнителни изследвания за оценка на серопозитивността в българските ферми. Растенията инфилтрирани с pEAQ-HT HEV 110-610 с His tag в N- или C-терминалния край дадоха 54.6 kDa белтък с добив до 100 µg /g свежо тегло. Taherkhani и стр., установяват, че 1 µg ORF2 белтък може да бъде

произведен в литър от *E.coli* култура (Taherkhani, Makvandi et al. 2014), а също така сходно количество е било описано и при експресия в клетки от насекоми (He, Ching et al. 1995). Ако приемем че, един литър култура синтезира достатъчно белтък за тестване на 10,000 проби, то 1kg растителна тъкан може, при добива описан тук, да произвежда достатъчно белтък, за тестване на 1,000,000 проби. Това означава, че производителността на 100 L бактериална култура съответства на тази на само 1 кг растителна тъкан. Ако този капацитет се увеличи за комерсиална продукция на белтъци в растения (стотици килограми), тогава ще можем да наблюдаваме как цената на диагностичните китове бързо може да бъде намалена, подобрявайки достъпността им до тези, които трябва да прилагат тестовете.

Изводи

1. Създадени бяха различни по дължина, кодон оптимизирани HEV ORF2 генни конструкции с варираща дължина на N и/или C терминалния край на хепатит E капсидния белтък.
2. Всички генни конструкции бяха успешно експресирани в *N.benthamiana* чрез използването на CPMV-базираната транзитна експресионна система, като се натрупват белтъчни продукти с големина между 52 кДа до 72 кДа.
3. Наличието на сигнална секвенция и РНК-свързващ домен водят до намаляване на разтворимостта на белтъка при експресията им в растения.
4. Присъствие и отсъствие на С-терминалния край при HEV ORF2 белтъка не повлиява разтворимостта на белтъците, но ги прави уязвими на деградация.
5. Успешно създадохме и експресирахме химерни генни конструкции а именно: HEV 1-610 M2e, HEV 110-610 M2e, mHBcAg-HEV и tHBcAg-HEV.
6. Установихме наличие на VLPs при експресията на HEV 110-610 M2e, mHBcAg-HEV и tHBcAg-HEV.
7. Растенията са високо ефективна система за продукция на HEV ORF2 рекомбинантен белтък и растително продуцираният белтък може да се използва за серологична детекция на хепатит E инфекция.
8. 75.5% от изследваните свински серуми са позитивни за анти-HEV IgG, чрез използването на in-house ELISA с рекомбинантния белтък, което доказва разпространението на HEV при прасетата в българските свинеферми.

Използвана литература в автореферата

1. Baechlein, C., D. Meemken, G. Pezzoni, C. Engemann and B. Grummer (2013). "Expression of a truncated hepatitis E virus capsid protein in the protozoan organism *Leishmania tarentolae* and its application in a serological assay." Journal of virological methods **193**(1): 238-243.
2. Bendall, R., V. Ellis, S. Ijaz, R. Ali and H. Dalton (2010). "A comparison of two commercially available anti-HEV IgG kits and a re-evaluation of anti-HEV IgG seroprevalence data in developed countries." Journal of medical virology **82**(5): 799-805.
3. Fiedler, K. and K. Simons (1995). "The role of N-glycans in the secretory pathway." Cell **81**(3): 309-312.
4. Graff, J., Y.-H. Zhou, U. Torian, H. Nguyen, M. S. Claire, C. Yu, R. H. Purcell and S. U. Emerson (2008). "Mutations within potential glycosylation sites in the capsid protein of hepatitis E virus prevent the formation of infectious virus particles." Journal of virology **82**(3): 1185-1194.
5. Hamorsky, K. T., J. C. Kouokam, J. M. Jurkiewicz, B. Nelson, L. J. Moore, A. S. Husk, H. Kajiura, K. Fujiyama and N. Matoba (2015). "N-Glycosylation of cholera toxin B subunit in *Nicotiana benthamiana*: impacts on host stress response, production yield and vaccine potential." Scientific reports **5**.
6. He, B. (2006). "Viruses, endoplasmic reticulum stress, and interferon responses." Cell Death & Differentiation **13**(3): 393-403.
7. He, J., W.-M. Ching, P. Yarbough, H. Wang and M. Carl (1995). "Purification of a baculovirus-expressed hepatitis E virus structural protein and utility in an enzyme-linked immunosorbent assay." Journal of clinical microbiology **33**(12): 3308-3311.
8. Hoofnagle, J. H., K. E. Nelson and R. H. Purcell (2012). "Hepatitis E." New England Journal of Medicine **367**(13): 1237-1244.
9. Huo, Y., X. Wan, Z. Wang, S. Meng and S. Shen (2015). "Production of Norovirus VLPs to size homogeneity." Virus research **204**: 1-5.
10. Inoue, H., H. Nojima and H. Okayama (1990). "High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids." Gene **96**(1): 23-28.
11. Jameel, S., M. Zafrullah, M. H. Ozdener and S. K. Panda (1996). "Expression in animal cells and characterization of the hepatitis E virus structural proteins." Journal of virology **70**(1): 207-216.
12. John, L., S. Thomas, O. Herchenröder, B. M. Pützer and S. Schaefer (2011). "Hepatitis E virus ORF2 protein activates the pro-apoptotic gene CHOP and anti-apoptotic heat shock proteins." PLoS One **6**(9): e25378.
13. Kaci, S., K. Nöckler and R. Johne (2008). "Detection of hepatitis E virus in archived German wild boar serum samples." Veterinary microbiology **128**(3): 380-385.
14. Li, S., X. Tang, J. Seetharaman, C. Yang, Y. Gu, J. Zhang, H. Du, J. W. K. Shih, C.-L. Hew and J. Sivaraman (2009). "Dimerization of hepatitis E virus capsid protein E2s domain is essential for virus-host interaction." PLoS Pathog **5**(8): e1000537.
15. Li, S. W., J. Zhang, Y. M. Li, S. H. Ou, G. Y. Huang, Z. Q. He, X. G. Sheng, Y. L. Xian, S. Q. Pang and M. H. Ng (2005). "A bacterially expressed particulate hepatitis E vaccine: antigenicity, immunogenicity and protectivity on primates." Vaccine **23**(22): 2893-2901.
16. Li, T.-C., M. Kataoka, K. Takahashi, S. Yoshizaki, T. Kato, K. Ishii, N. Takeda, S. Mishihiro and T. Wakita (2015). "Generation of hepatitis E virus-like particles of two new genotypes G5 and G6 and comparison of antigenic properties with those of known genotypes." Veterinary microbiology **178**(1): 150-157.

17. Li, T.-C., N. Takeda and T. Miyamura (2001). "Oral administration of hepatitis E virus-like particles induces a systemic and mucosal immune response in mice." Vaccine **19**(25): 3476-3484.
18. Li, T.-C., Y. Yamakawa, K. Suzuki, M. Tatsumi, M. Razak, T. Uchida, N. Takeda and T. Miyamura (1997). "Expression and self-assembly of empty virus-like particles of hepatitis E virus." Journal of virology **71**(10): 7207-7213.
19. Lomonossoff, G. P. and M.-A. D'Aoust (2016). "Plant-produced biopharmaceuticals: A case of technical developments driving clinical deployment." Science **353**(6305): 1237-1240.
20. Love, A. J., S. N. Chapman, S. Matic, E. Noris, G. P. Lomonossoff and M. Talianky (2012). "In planta production of a candidate vaccine against bovine papillomavirus type 1." Planta **236**(4): 1305-1313.
21. Maloney, B. J., N. Takeda, Y. Suzuki, Y. Ami, T. C. Li, T. Miyamura, C. J. Arntzen and H. S. Mason (2005). "Challenges in creating a vaccine to prevent hepatitis E." Vaccine **23**(15): 1870-1874.
22. McCormac, A., M. Elliott and D. Chen (1998). "A simple method for the production of highly competent cells of *Agrobacterium* for transformation via electroporation." Molecular biotechnology **9**(2): 155-159.
23. Meng, J., X. Dai, J. C. Chang, E. Lopareva, J. Pillot, H. A. Fields and Y. E. Khudyakov (2001). "Identification and characterization of the neutralization epitope (s) of the hepatitis E virus." Virology **288**(2): 203-211.
24. Mett, V., C. E. Farrance, B. J. Green and V. Yusibov (2008). "Plants as biofactories." Biologicals **36**(6): 354-358.
25. Mirazimi, A. and L. Svensson (1998). "Carbohydrates facilitate correct disulfide bond formation and folding of rotavirus VP7." Journal of virology **72**(5): 3887-3892.
26. Peyret, H. (2015). "A protocol for the gentle purification of virus-like particles produced in plants." Journal of virological methods **225**: 59-63.
27. Schatz, G. and B. Dobberstein (1996). "Common principles of protein translocation across membranes." Science **271**(5255): 1519.
28. Schofield, D., J. Glamann, S. Emerson and R. Purcell (2000). "Identification by phage display and characterization of two neutralizing chimpanzee monoclonal antibodies to the hepatitis E virus capsid protein." Journal of virology **74**(12): 5548-5555.
29. Shiota, T., T.-C. Li, S. Yoshizaki, T. Kato, T. Wakita and K. Ishii (2013). "The hepatitis E virus capsid C-terminal region is essential for the viral life cycle: implication for viral genome encapsidation and particle stabilization." Journal of virology **87**(10): 6031-6036.
30. Surjit, M., S. Jameel and S. K. Lal (2007). "Cytoplasmic localization of the ORF2 protein of hepatitis E virus is dependent on its ability to undergo retrotranslocation from the endoplasmic reticulum." Journal of virology **81**(7): 3339-3345.
31. Taherkhani, R., M. Makvandi and F. Farshadpour (2014). "Development of enzyme-linked immunosorbent assays using 2 truncated ORF2 proteins for detection of IgG antibodies against hepatitis E virus." Annals of laboratory medicine **34**(2): 118-126.
32. Takahashi, K., N. Kitajima, N. Abe and S. Mishiro (2004). "Complete or near-complete nucleotide sequences of hepatitis E virus genome recovered from a wild boar, a deer, and four patients who ate the deer." Virology **330**(2): 501-505.
33. Tamada, Y., K. Yano, H. Yatsushashi, O. Inoue, F. Mawatari and H. Ishibashi (2004). "Consumption of wild boar linked to cases of hepatitis E." Journal of hepatology **40**(5): 869-870.
34. Tei, S., N. Kitajima, K. Takahashi and S. Mishiro (2003). "Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings." The Lancet **362**(9381): 371-373.

35. Zafrullah, M., M. H. Ozdener, R. Kumar, S. K. Panda and S. Jameel (1999). "Mutational analysis of glycosylation, membrane translocation, and cell surface expression of the hepatitis E virus ORF2 protein." Journal of virology **73**(5): 4074-4082.
36. Zeltins, A. (2013). "Construction and characterization of virus-like particles: a review." Molecular biotechnology **53**(1): 92-107.
37. Zheng, Z.-Z., J. Miao, M. Zhao, M. Tang, A. E. Yeo, H. Yu, J. Zhang and N.-S. Xia (2010). "Role of heat-shock protein 90 in hepatitis E virus capsid trafficking." Journal of General Virology **91**(7): 1728-1736.
38. Zhou, Y.-H., R. H. Purcell and S. U. Emerson (2004). "An ELISA for putative neutralizing antibodies to hepatitis E virus detects antibodies to genotypes 1, 2, 3, and 4." Vaccine **22**(20): 2578-2585.

Съкращения

| | |
|----------|---|
| AK | Аминокиселини |
| bp, нд | Нуклеотидна, базова двойка |
| COS-1 | Клетъчна линия от бъбречни клетки на маймун |
| CPMV | Мозаичен вирус по боба <i>Vigna unguiculata</i> |
| cVLPs | Химерни вирусоподобни частици |
| ELISA | Ензимно-свързан имуносорбентен анализ |
| ER | Ендоплазматичен ретикулум |
| Grp78 | Глюкозо-регулиран протеин |
| HBcAg | Капсиден белтък на вируса на Хепатит В |
| HBV | Хепатит В вирус |
| HEV | Хепатит Е вирус |
| HSP70/90 | Протеин на топлинния шок 70/90 |
| IgG | Имуноглобулин Г |
| IgM | Имуноглобулин М |
| mAb | Моноклонално антитяло |
| mHBcAg | Мономерен капсиден белтък на хепатит В |
| ORF | Отворена рамка на четене |
| PBS | Фосфатен буфер |
| PCR | Полимеразна верижна реакция |
| SDS | Na-додецил сулфат |
| SDS-PAGE | Полиакриламидна гелелектрофореза |
| S9 | Клетъчна линия от <i>Spodoptera frugiperda</i> |
| SUVs | Субединични ваксини |
| tHBcAg | Тандемен капсиден белтък на хепатит В |
| Tn5 | Клетъчна линия от <i>Trichoplusia ni</i> |
| VLPs | Вирусоподобни частици |

НАУЧНИ ПРИНОСИ

Оригинални научни приноси:

- За първи път е постигната транзитна експресия на вариращи по дължина гени на хепатит Е капсидния белтък генотип 3 в растения *N.benthamiana*.
- За първи път е установено формиране на вирусоподобни частици от химерните гени HEV M2e и HBcAg-HEV в растения.
- Установено е че растително-продуцираният HEV ORF2 е подходящ антиген за серологична диагностика на хепатит Е инфекцията.

Приноси с потвърдителен характер:

- Установено е наличие на анти-HEV IgG антитела при прасета в Южна България.

СПИСЪК НА НАУЧНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ, свързани с дисертационния труд

1. **Mazalovska M**, Varadinov N, Koynarski T, Minkov I, Teoharov P, Lomonosoff GP, Zahmanova G (2017). Detection of Serum Antibodies to Hepatitis E Virus Based on HEV Genotype 3 ORF2 Capsid Protein Expressed in *Nicotiana benthamiana*. *Ann Lab Med* (приета за публикуване)
2. Gergana G, Zahmanova Samir I, Naimov, **Milena Mazalovska**, Rumiana P, Valkova, Ivan N, Minkov (2014) Transient expression of modified Hepatitis B capsid protein in *Nicotiana benthamiana* plants for viral nanoparticles production. *J. BioSci. Biotech., SE/ONLINE*: 11-16
3. Gergana Zahmanova, **Milena Mazalovska**, Valentina Toneva, Ivan Minkov (2015). Production of chimeric virus-like particles bearing M2e influenza epitope in *Nicotiana benthamiana* plants. *Journal of biotechnology*, 208, (supplement issue European Biotechnology congress, 20 AUGUST):S10, abstract

УЧАСТИЯ В КОНФЕРЕНЦИИ И РАБОТНИ ГРУПИ

1. M.Mazalovska, M.Gozmanova, T.Vuchev, N.Varadinov, G.Zahmanova (2012). Vaccines, based on VLPs. Ninth scientific-technical conference Ecology and Health, 453-458 ISSN 1314-1880. Oral presentation on "Vaccines based on virus-like particles" 17 may 2012
2. International Conference on Bioinformatics and Computational Biology, 20-21 September, 2012, Varna, Bulgaria
3. Gergana Zahmanova, Milena Mazalovska, Ivan Minkov, George Lomonosoff, Core particles of Hepadnaviruses as a scaffold for M2e avian influenza peptide, Poland poster
4. Virus-like particles and nano-particle vaccines, France, 2012, Conference book, p110 poster
5. "Plant-based vaccines, antibodies and biologics" Conference, 5-7 June 2013, University of Verona, Italy poster 123 "Expression of hepadnavirus capsid proteins in *N. benthamiana* using transient expression system"
6. Annual Scientific Meeting, 16-18 Oct., 2013 and 15-17 Oct., 2014 John Innes Centre, Norwich, UK
7. "Plant-based vaccines, antibodies and biologics" Conference, 8-10 June 2015, CHUV, Lausanne, Switzerland, poster 128 "Expression of hepatitis E ORF2 capsid protein in *N. benthamiana* using transient expression system"