

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Chemijos ir geomokslų fakultetas



Biochemijos studijų programos IV kurso studentas

Enriko Rafaelis Kebedys

Bakalaurinis darbas

**PARV4 viruso kapsidės baltymo VP2, kaip svetimų
epitopų nešiklio, konstravimas**

Darbo vadovė:

dokt. Arūnė Verbickaitė

Vilnius, 2021

**PARV4 viruso kapsidės baltymo VP2, kaip svetimų epitopų nešiklio,
konstravimas**

Darbas atliktas Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro
Biotechnologijos instituto Eukariotų genų inžinerijos skyriuje

Enriko Rafaelis Kebedys

Darbo vadovė:

dokt. Arūnė Verbickaitė

(parašas)

(parašas)

TURINYS

SANTRUMPOS	6
ĮVADAS	7
1. LITERATŪROS APŽVALGA	8
1.1 Parvoviridae šeimos virusai	8
1.2 Žmogaus parvovirusas 4	8
1.2.1 Žmogaus parvoviruso 4 genomas	8
1.2.2 Žmogaus parvoviruso 4 kapsidės struktūra	9
1.2.3 PARV4 VP2 baltymo struktūra	10
1.3 Parvovirusų patekimas į ląstelę ir replikacija	11
1.4 Į virusus panašių dalelių sintezė ir pritaikymas	12
1.4.1 VLP savybės	13
1.4.2 VLP vakcinos	13
1.4.3 Chimerinės VLP	14
1.4.4 VLP sintezė mielėse	15
1.4.5 Kitas VLP pritaikymas	16
2. MEDŽIAGOS IR TYRIMO METODAI	18
2.1 Medžiagos, plazmidės ir mikroorganizmai	18
2.1.1 Medžiagos ir tirpalai	18
2.1.2 Mitybinės terpės	20
2.1.3 Bakterijų ir mielių kamienai	20
2.1.4 Plazmidės	20
2.1.5 Molekulinės masės standartai	20
2.1.6 Antikūnai	21
2.2 Metodai	21
2.2.1 Plazmidinės DNR skyrimas	21
2.2.2 DNR elektroforezė	21
2.2.3 Polimerazės grandininė reakcija	21
2.2.4 Suliejimo PGR	22

2.2.5	DNR hidrolizė restrikcijos endonukleazėmis	23
2.2.6	Galinių fosfato grupių pašalinimas.....	23
2.2.7	DNR gryninimas po fermentinių reakcijų ir iš agarozės gelio	23
2.2.8	DNR fragmentų ligavimo reakcija	23
2.2.9	Kompetentinių <i>E. coli</i> ląstelių paruošimas šaldymui	23
2.2.10	Kompetentinių <i>E. coli</i> ląstelių transformacija	24
2.2.11	Teigiamų <i>E. coli</i> klonų atranka ir plazmidinės DNR patikra	24
2.2.12	Mielių <i>S. cerevisiae</i> transformacija	24
2.2.13	Rekombinantinių baltymų sintezė mieles auginant mažame tūryje	25
2.2.14	Rekombinantinių baltymų sintezė mieles auginant dideliame tūryje.....	25
2.2.15	Mielių ląstelių ardymas	25
2.2.16	Mielėse susintetintų, į virusus panašių dalelių gryninimas	25
2.2.17	NDS-PAGE baltymų elektroforezė	26
2.2.18	Poliakrilamidinio gelio dažymas	27
2.2.19	Baltymų koncentracijos nustatymas	27
2.2.20	Imunobloto analizė	27
2.2.21	Taškinio imunobloto analizė	27
2.2.22	Netiesioginė imunofermentinė analizė	27
2.2.23	Virusinių dalelių stebėjimas elektroniniu mikroskopu.....	28
3.	EKSPERIMENTŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	29
3.1	Mielių raiškos vektorių, turinčių chimerinius PARV4 VP2 genus, konstravimas	29
3.2	Chimerinių VP2 baltymų sintezė mielėse ir jų gryninimas	31
3.3	Mielėse susintetintų chimerinių VP2 baltymų antigeninių savybių analizė	36
3.3.1	Imunobloto analizė nustatant linijinių epitopų reakciją su antikūnais nukreiptais prieš PARV4 VP2 ir HBsAg.....	36
3.3.2	Netiesioginė imunofermentinė analizė nustatant konformacinių epitopų reakciją su antikūnais nukreiptais prieš PARV4 VP2 ir HBsAg.....	38
3.3.3	Taškinio imunobloto analizė su antikūnais nukreiptais prieš PARV4 VP2 ir HBsAg	39
3.4	Į virusus panašių dalelių stebėjimas elektroniniu mikroskopu	40

3.5 Rezultatų aptarimas.....	41
4. IŠVADOS.....	43
SANTRAUKA	44
SUMMARY	45
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	46

SANTRUMPOS

ASR – atvirojo skaitymo rėmelis
GAL1 – galaktokinazės genas
GAL10 – UDP gliukozės 4 epimerazės genas
HBcAg – hepatito B branduolio antigenas
HBsAg – hepatito B paviršiaus antigenas
HBV – hepatito B virusas
L1 – gaususis žmogaus papilomos viruso kapsidės baltymas
NS1 – nestruktūrinis baltymas 1
ORF – atvirojo skaitymo rėmelis (angl. *open reading frame*)
PAA - poliakrilamidas
PARV4 – žmogaus parvovirusas 4
PGK3 – fosfoglicerato kinazės 3 genas
PYK1 – piruvato kinazės 1 genas
PLA₂ – fosfolipazė A2
PSR – papildomas skaitymo rėmelis
VLP – į virusus panašios dalelės (angl. *virus-like particle*)
VP – struktūrinis kapsidės baltymas (angl. *viral protein*)
ŽPV – žmogaus papilomos virusas

IVADAS

Pačios pirmosios vakcinos dažniausiai buvo kuriamos inaktyvuotų arba susilpnintų virusų pagrindu. Šios vakcinos efektyviai sužadina imuninę sistemą, tačiau jų produkcijos proceso keblumai bei padidėjusi rizika imuniteto sutrikimus turintiems pacientams paskatino ieškoti kitokių pagrindu kuriamų vakcinų (Mohsen et al. 2017). Šios problemos sprendžiamos naudojant į virusus panašias daleles (VLP). VLP yra struktūros, išoriškai panašios arba identiškos viruso kapsidėms, tačiau neturinčios genetinės medžiagos, todėl negebančios savarankiškai daugintis. Šios dalelės geba iššaukti įgimtąjį ir įgytąjį imuninius atsakus. Jos taip pat gali būti gaunamos gana dideliais kiekiais pasitelkiant rekombinantinės DNR technologijas. Dėl šių priežasčių jos yra itin patrauklios kaip kandidatės vakcinų kūrimui. Šiuo metu yra nemažai komerciškai prieinamų į virusus panašiomis dalelėmis besiremiančių vakcinų ir dar daugiau vakcinų kandidačių prieš įvairius virusus jau yra sukurtos ir išbandomos klinikiniuose tyrimuose. Šio tipo vakcinos taip pat gan plačiai naudojamos gyvulininkystėje. Be to, klinikiniai tyrimai parodė, jog tokios VLP vakcinos taip pat galėtų būti panaudotos gydant vėžines bei autoimunines ligas (Lei et al. 2020).

Pasitelkiant genų inžinerijos metodus atsiranda galimybė pagaminti chimerines į virusus panašias daleles, turinčias įvestus svetimų virusų epitopus. Tai suteikia galimybę kurti vakcinas prieš kelių virusų sukeltas infekcijas arba panaudoti VLP kaip svetimų epitopų nešiklį. Šios dalelės taip pat gali būti pasitelktos tam tikrų molekulių pernašai, todėl tyrimai su šiomis į virusus panašiomis dalelėmis padėtų kurti naujas technologijas skirtas ligų gydymui, jų prevencijai ir diagnostikai.

Šiame tyrime kaip objektas buvo pasirinktas žmogaus parvoviruso 4 (PARV4) kapsidės baltymas VP2, gebantis formuoti į virusus panašias struktūras. Šio darbo tikslas – sukonstruoti tris skirtingus chimerinius PARV4 VP2 rekombinantinius baltymus, turinčius įvestą hepatito B paviršiaus antigeno epitopo seką, kuri įvesta į atitinkamai vieną iš trijų VP2 baltymo imunogeniškų kilpų sričių. Atsižvelgiant į tikslą yra iškelti šie uždaviniai:

1. Sukonstruoti mielių raiškos vektorius su PARV4 VP2 baltymo geno pakeistomis kilpų sekomis įvedant HBsAg epitopo geno seką.
2. Sukurti rekombinantinių chimerinių VP2 baltymų sintezės sistemą mielėse *Saccharomyces cerevisiae*.
3. Išgryninti mielėse susintetintus baltymus.
4. Patikrinti šių baltymų gebėjimą formuoti į virusus panašias daleles bei įvertinti jų, kaip antigenus pateikiančių molekulių, antigenines savybes.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Parvoviridae šeimos virusai

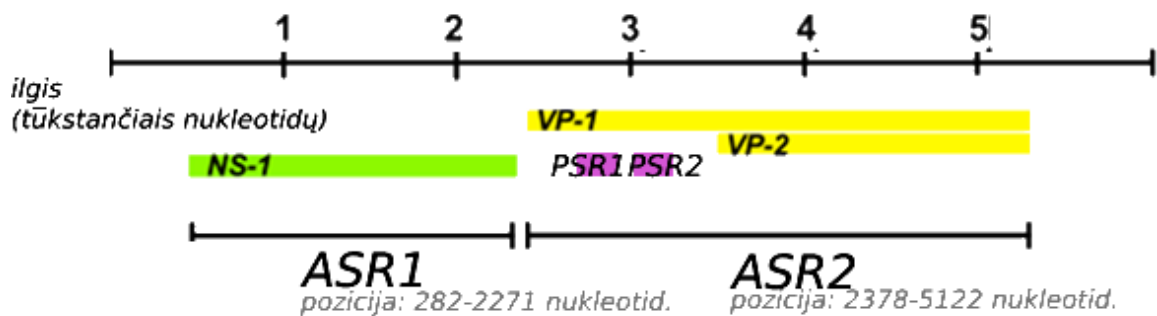
Parvovirusai yra maži (~25 nm ilgio), apvalkalo neturintys virusai, priklausantys *Parvoviridae* šeimai. *Parvoviridae* šeima skirstoma į dvi pošeimes: *Parvovirinae* ir *Densovirinae*. *Parvovirinae* pošeimės atstovai infekuoja stuburinius, o *Densovirinae* - bestuburius. Parvovirusai turi linijinę viengrandinę genominę DNR, kurios ilgis svyruoja nuo 5 iki 6 tūkstančių nukleotidų ilgio. Genomo galai pažymėti dvejomis terminalinėmis plaukų segtuko struktūromis (Berns 2013; Parrish 2005). Visi parvovirusai skirstomi į tam tikras gentis ir rūšis pagal nestruktūrinio baltymo NS1 aminorūgščių panašumą lyginant su kitais parvovirusais. Šiuo principu *Parvovirinae* pošeimis skirstomas į 8 gentis: *Protoparvovirus*, *Amdoparvovirus*, *Aveparvovirus*, *Bocaparvovirus*, *Dependoparvovirus*, *Erythroparvovirus*, *Copiparvovirus* ir *Tetraparvovirus*. Iš jų tik 4 gali sukelti infekcijas žmonėms: *Erythroparvovirus*, *Bocaparvovirus*, *Protoparvovirus* ir *Tetraparvovirus* (Qiu et al. 2017).

1.2 Žmogaus parvovirusas 4

Žmogaus parvovirusas 4 (PARV4) yra *Tetraparvovirus* genčiai priklausantis virusas, pirmą kartą rastas 2005 metais hepatitu B užsikrėtusio intraveninių narkotikų vartotojo organizme (Jones et al. 2005). Manoma, kad tarp šios rizikos grupės žmonių PARV4 plinta gausiausiai. Šio viruso infekcija smarkiai susijusi su hepatito C bei ŽIV infekcijomis: iki 95 % šiuos virusus turintys asmenys taip pat turi IgG tipo antikūnus prieš PARV4 (Simmons et al. 2012). PARV4 taip pat yra siejamas su lėtine hepatito B infekcija (Yu et al. 2012). PARV4 klinikinė įtaka nėra gerai žinoma, todėl negalima pasakyti, ar virusas gali sukelti kokius nors simptomus, tačiau yra pastebimas ryšys tarp PARV4 infekcijos ir sunkios ūminės kvėpavimo takų infekcijos (Prakash et al. 2020).

1.2.1 Žmogaus parvoviruso 4 genomas

PARV4 genomas yra apytiksliai 5 kb ilgio ir sudarytas iš 2 atvirojo skaitymo rėmelių, koduojančių 3 genus. Koduojančios sekos yra apsuptos trumpomis palindrominėmis sekomis, galinčiomis formuoti plaukų segtuko motyvus (Berns, Parrish 2013). Pirmasis atvirojo skaitymo rėmelis koduoja nestruktūrinį baltymą NS1, atsakingą už viruso replikaciją. Antrasis koduoja du tame pačiame atvirojo skaitymo rėmelyje persidengiančius struktūrinius baltymus VP1 ir VP2 (1.1 pav.) (Matthews et al. 2014). VP2 baltymas yra pagrindinis struktūrinis baltymas ir formuoja PARV4 ikosaedrinės struktūros kapsidę. VP1 taip pat yra struktūrinis baltymas, įeinantis į kapsidės struktūrą ir numanomai turintis fosfolipazinį A₂ (PLA₂) aktyvumą. Šis fermentinis aktyvumas greičiausiai reikalingas sėkmingam virionų perėjimui per lipidinę ląstelės membraną.

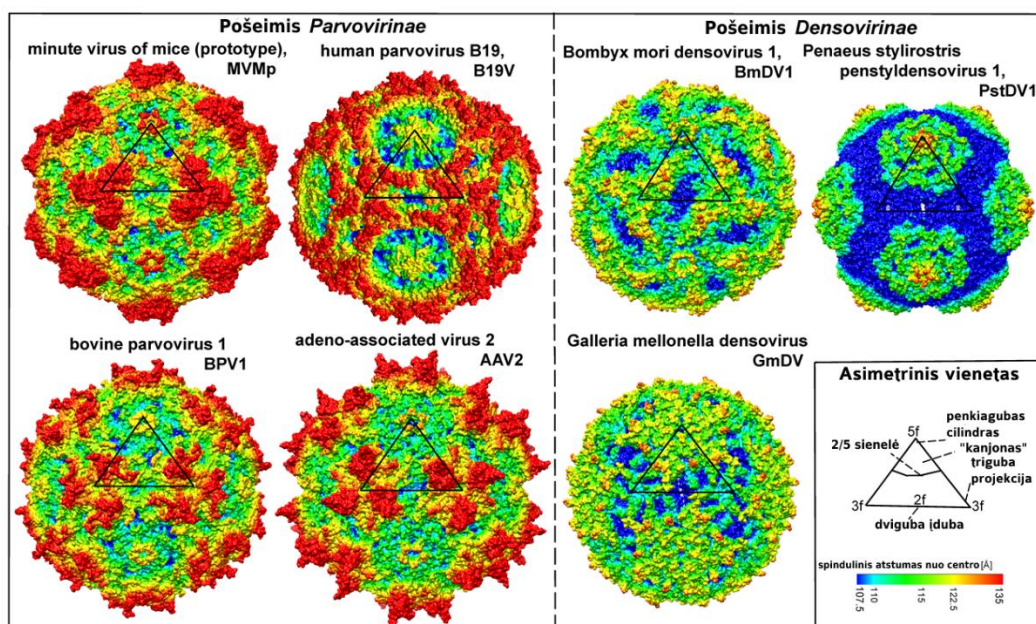


1.1 pav. Scheminis PARV4 atvirojo skaitymo rėmelių ir genų atvaizdavimas. ASR yra žymimi atvirojo skaitymo rėmeliai. NS-1, VP-1 ir VP-2 yra baltymus koduojantys genai. PSR1 ir PSR2 – papildomi skaitymo rėmeliai. PSR1 koduoja 67 aminorūgščių ilgio alternatyvų baltymą, o PSR2 – 86 aminorūgščių ilgio alternatyvų baltymą. PSR1 koduojamas baltymas savo seka ir pozicija yra panašus į mažąjį alternatyviai transkribuojamą baltymą, randamą kituose parvovirusuose. PSR2 baltymas nebuvo identifikuotas kaip joks atitikmuo kitiems baltymams. Pagal Matthews et al. (2014).

PARV4 genomas turi du promotorius: P6, atsakingą už NS1 baltymo transkripciją, ir P38, indukuojantį VP baltymų transkripciją. Teorinis NS1 baltymo dydis yra ~66 kDa, tuo tarpu struktūrinio baltymo VP1 dydis yra ~101 kDa, o VP2 ~60 kDa (Lou et al. 2012). Panašiai kaip ir kituose *Parvoviridae* atstovuose, abu VP baltymai yra užkoduoti tame pačiame transkripte ir transliuojami į VP1 ir VP2 baltymus dėka alternatyvių pradžios kodonų. Todėl šie du baltymai skiriasi tik N-galiniu domenu (Spitzer et al. 1997).

1.2.2 Žmogaus parvoviruso 4 kapsidės struktūra

PARV4, kaip ir kitų parvovirusų, kapsidė yra sudaryta iš 60 VP baltymų vienetų. VP baltymų santykis turėtų būti panašus į kitų pavovirusų, turinčių du struktūrinius kapsidės baltymus, ir sudaryti kapsidę santykiu 1:10, kur vienam VP1 baltymui tenka dešimt VP2 baltymų (Mietzsch et al. 2019). Šiems baltymams susirenkant yra formuojama T=1 ikosaedrinės simetrijos kapsidė (Agbandje-McKenna, Kleinschmidt 2011). Suformuotos kapsidės paviršius turi atsikartojančius asimetrinius vienetus, kurie turi dviguboje ašyje esantį įdubimą, trigubus iškilimus ir penkiagubas viršūnes, kurios formuoja cilindro formos struktūrą. Šios kapsidės formos yra panašios tarp įvairių parvovirusų, tačiau santykinis tam tikrų paviršiaus struktūrų aukštis gali skirtis tarp pošeimių ir genčių (1.2 pav.) (Cotmore, Tattersall 2014; Meng et al. 2013).



1.2 pav. Įvairių parvovirusų kapsidžių topologija. Mėlyna spalva pažymėtas mažiausias spindulinis atstumas nuo viruso dalelės centro, raudona – didžiausias. Juodu trikampių pažymėtas kapsidės baltymų formuojamas asimetrisinis vienetas. Paimta iš tarptautinės virusų taksonomijos komiteto (ICTV) puslapio: <https://ictv.global/taxonomy/>.

1.2.3 PARV4 VP2 baltymo struktūra

Pagrindinio struktūrinio kapsidės baltymo VP2 grandinė formuoja β statinės struktūrą, susidedančią iš mažiausiai 8 grandinių, kurios susidedant dvejoms grandinėms sudaro po vieną β klostę. Atskiros β klostės yra sujungiamos su kaimyninėmis per baltymo kilpų sritis, kurių ilgis, aminorūgščių seka bei konformacija gali skirtis kiekvienoje kilpoje. Dauguma šių kilpų yra nukreiptos į viruso kapsidės išorę ir būtent dėl jų sekų skirtumų yra pastebimos virusų kapsidžių topologijos variacijos tarp skirtingų parvovirusų. Šių kilpų viršūnės taip pat yra išskiriamos kaip variabilūs regionai, nes šiose srityse aptinkama didelė aminorūgščių sekų įvairovė (Ilyas et al. 2018). Tyrimais buvo identifikuoti 3 linijiniai PARV4 epitopai, esantys šių kilpų vietoje, prieš kuriuos vykdant imunizaciją pelėse, susidaro monokloniniai antikūnai. Dėl savo imunogeniškumo šios kilpos yra pasirinktos kaip svetimų epitopų įterpimo sritys (1.3 pav., 1.1 lentelė). Taip pat parodyta, jog PARV4 VP2 baltymai *S. cerevisiae* ląstelėse geba savarankiškai formuoti VLP (Tamošiūnas, 2017).



1.3 pav. PARV4 VP2 erdvinė struktūra. Spalvomis pažymėtos skirtingose kilpose nustatytos epitopų sekos. Vaizdas sukurtas naudojant The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.4.1, Schrödinger, LLC.

1.1 lentelė. Nustatytų VP2 epitopų lokalizacija bei aminorūgščių sekos. Pagal Tamošiūnas (2017).

Kilpos srities epitopų sutrumpintas pavadinimas	Lokalizacija aminorūgščių sekoje (aminorūgščių numeriai)	Epitopo seka
Lp2	146-155	NQDTLPGHLP
Lp3	248-257	NDGTAIWKRP
Lp4	507-513	EKPAPFP

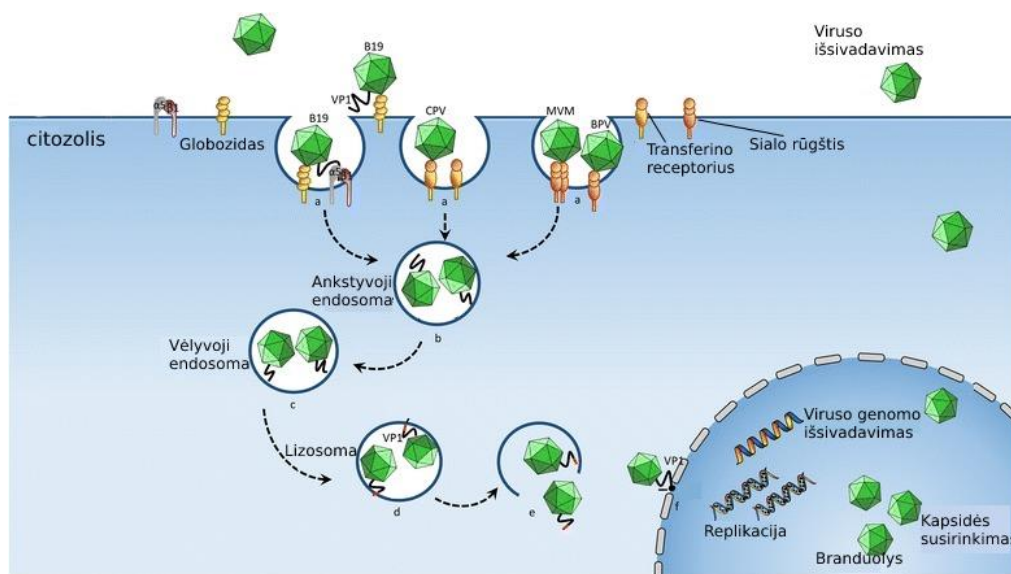
1.3 Parvovirusų patekimas į ląstelę ir replikacija

Manoma, kad infekcijos metu parvovirusų virionai patenka į ląstelės branduolį nepakitę (Sonntag et al. 2006). Ar virusų genomai išlieka supakuoti kapsidėse visos priešreplikatyvinės fazės metu, yra neaišku, tačiau tai galėtų paaiškinti, kodėl ląstelės DNR pažeidimų taisymo mechanizmai išlieka neįjungti (Cotmore, Tattersall 2014). Parvovirusai neturi gebėjimo nesidalijančių ląstelių priversti pereiti į S fazę – savybės, kurią turi dauguma DNR virusų. Dėl šios priežasties parvovirusai laukia, kol ląstelė pati pereis į S fazę ir todėl jų infekcija yra apribota tik ląstelėse, kuriose vyksta aktyvi ląstelės ciklo kaita (Cotmore, Tattersall 2013). Informacijos, nusakančios tikslias ląsteles, kurias infekuoja PARV4, nėra, tačiau tyrimai rodo, kad PARV4 genomai buvo rasti įvairiuose audiniuose, tokiuose kaip kepenys, kaulų čiulpai bei cerebrospinalinis skystis (Qiu et al. 2017).

Prasidėjus ląstelės DNR replikacijai virusinis genomas pereina į replikacinę formą, kurios metu taip pat vyksta virusinių genų raiška. Virusų genomas yra padauginamas besivyniojančio plaukų segtuko replikacijos mechanizmu (Tattersall, Ward 1976). Šio mechanizmo metu kartu vyksta vienkryptis grandinės perkėlimas ir genomo galuose esančių plaukų segtuko motyvų išsilankstymas ir susilankstymas, kuris reikalingas dvigubos replikacinės formos DNR grandinės sintezei. Sintezė susideda iš kelių etapų. Pradžioje komplementariai virusinės DNR grandinei yra susintetinama antroji

grandinė. Kitame etape dvigubos DNR grandinės genomą yra iškerpamas, paliekant vėl viengrandį DNR genomą. Už DNR grandinės įkirpimą yra atsakingas replikacijos iniciacijos baltymas NS1, kuris turi endonukleazinį ir helikazinį aktyvumą (Zádori et al. 2005). Viengrandis viruso genomą toliau yra naudojamas kaip pagrindas komplementarios grandinės sintezei. Galiausiai formuojantis viruso dalelėms šios genominės DNR grandinės yra perkeltamos į kapsidės vidų. (Cotmore, Tattersall 2013; Cotmore, Tattersall 2005; Cotmore, Tattersall 2006).

Parvovirusai prie ląstelės šeimininkės prisijungia per įvairius plazminės membranos receptorių (Allison et al. 2014; Huang et al. 2014; Pillay et al. 2017) ir į jos vidų patenka endocitozės būdu (1.4 pav.). Virionams sėkmingai ištrūkti iš endosomos padeda VP1 baltymo N gale esantis PLA₂ aktyvumas (Canaan et al. 2004). Virusų dalelėms patekus į branduolį ir sulaukus S fazės yra pradedama genominės DNR replikacija ir genų transkripcija. Virusų paviršiaus baltymai VP1 ir VP2 homotrimerinėje būsenoje (susidedant iš trijų VP2 baltymų) arba rečiau heterotrimerinėje būsenoje (susidedant iš dviejų VP2 baltymų ir vieno VP1 baltymo) yra transportuojami į branduolį, kur yra baigiamas kapsidės surinkimas (Lombardo et al. 2000; Rioloobos et al. 2006). Susidarę nauji virionai iš ląstelės gali būti eksportuojami į išorę arba ištrūkti lizės metu (Bär et al. 2013; Maroto et al. 2004).



1.4 pav. Įvairių parvovirusų infekcijos schema. Virusai pakliūna į ląstelę endocitozės būdu pasitelkiant skirtingus receptorių. Parvovirusas B19 pasitelkia globozido receptorių, CPV (šunų parvovirusas) nusitaiko į transferino receptorių, o MVM (minutės pelių virusas) ir BPV (galvijų parvovirusas) – į sialo rūgštį. Šie virusai pakliūna į endosomas, paskui virstant į lizosomas aktyvuojamas fosfolipazinis (PLA₂) aktyvumas, padedantis virusams ištrūkti iš endosomos. Galiausiai viruso dalelės pakliūna į branduolį, kur vyksta viruso genomo replikacija ir viruso dalelių susirinkimas. Pagal Tu et al. (2015).

1.4 Į virusus panašių dalelių sintezė ir pritaikymas

Į virusus panašių dalelių praktinis pritaikymas yra daugiausiai siejamas su naujų vakcinų bei diagnostinių įrankių kūrimu. VLP technologijos pradžioje šioms dalelėms kurti buvo naudojami ikosaedrinės simetrijos apvalkalo neturinčios virusinės dalelės, kurios gali sėkmingai pateikti epitopus savo paviršiuje. Vienos iš pirmųjų VLP, pasižyminčių tokiomis savybėmis buvo kuriamos hepatito B branduolio antigeno (HBcAg) pagrindu, kurios formuoja tvarkingas ikosaedrinės

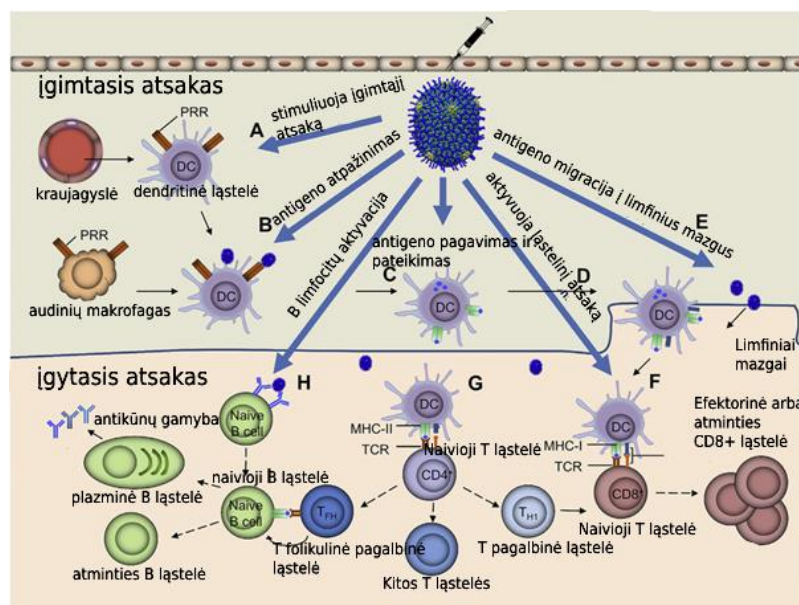
struktūros daleles. Šios technologijos taip pat jau yra naudojamos įvairių svetimų epitopų pateikimui ant ląstelės paviršiaus, taip sukuriant chimerines VLP (Pushko et al. 2013).

1.4.1 VLP savybės

Rekombinantinės VLP yra nanoskalės dydžio struktūros, kurios sudarytos iš virusinės kilmės rekombinantinių kapsidės baltymų ir yra sintetinės pasirinkto organizmo raiškos sistemoje, pvz.: bakterijose, mielėse, augaluose ar kitose ląstelėse (Jennings, Bachmann 2008). VLP atkartoja natūralią virusų kapsidės formą, savarankiškai susirenkant iš atsikartojančių paviršiaus baltymų ir dėl to tai yra lanksti ir tolerantiška modifikacijoms struktūra. Kai VLP yra naudojama svetimų epitopų pateikimui, dažniausiai tai yra daroma modifikuojant VLP genų sekas įvedant naują epitopą ir vykdant šių chimerinių genų raišką. Tais atvejais, kai antigenas yra per didelis, jis gali trukdyti VLP susirinkimui, todėl dažnai norint išvengti trikdžių antigenai yra prijungiami prie VLP dalelių cheminės konjugacijos būdu (Chroboczek et al. 2014).

1.4.2 VLP vakcinos

Iki šiol dažniausia VLP panaudojimo sritis yra vakcinos. Dėl jų itin didelio panašumo į virusus, VLP geba iššaukti stiprų imuninį atsaką, kurį lemia tanki ir atsikartojanti šių dalelių struktūra (Bachmann, Zinkernagel 1997). Dėl jų dydžio jos yra sėkmingai pagaunamos dendritinių ląstelių ir transportuojamos į limfinius mazgus, kur vyksta antigeno pateikimas limfocitams. Pasikartojančios struktūros ant VLP paviršiaus aktyvuoja B limfocitus, paskatinant antikūnų sintezę prieš pateiktą antigeną. Tuo tarpu baltyminė VLP sandara padeda aktyvuoti T limfocitus jiems pateikiant VLP peptidus MHC molekulėse (1.5 pav.). Tad VLP gali aktyvuoti įgimtąjį ir įgytąjį imunitetą (Jennings, Bachmann 2008).



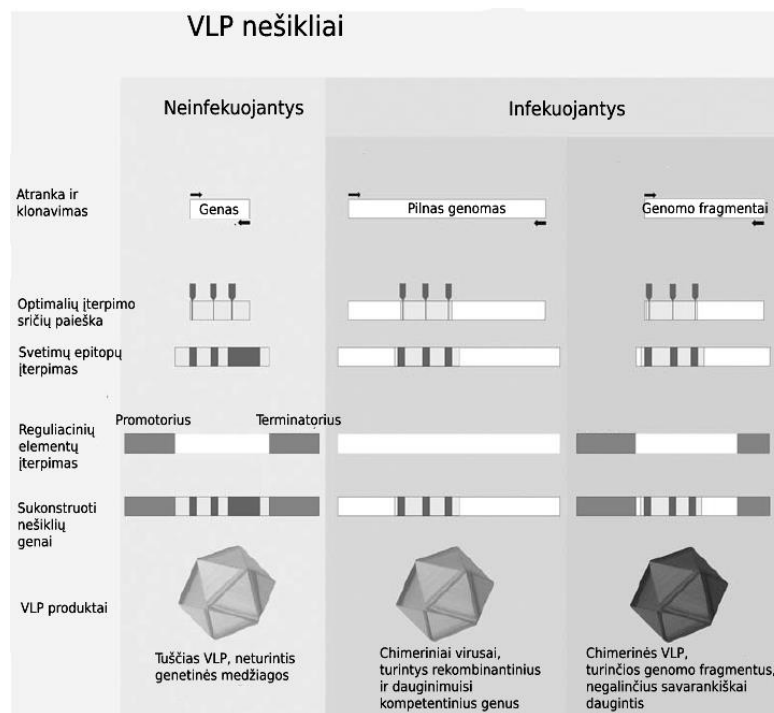
1.5 pav. Scheminis atvaizdavimas, kaip VLP galėtų potencialiai iššaukti įvairaus tipo imuninius atsakus. Pagal Tao et al. (2019).

Nemažai VLP paremtų vakcinų jau yra komercializuotos ir naudojamos skiepijimui. Vienos iš jų yra hepatito B ir žmogaus papilomos viruso VLP paremtos vakcinos. Hepatito B vakcina yra paremta HBV paviršiaus antigenu HBsAg, kuris mielių ir žinduolių ląstelėse formuoja 22 nm dydžio sferinę VLP dalelę (Greiner et al. 2012). Vakcina prieš HBV yra pirmoji komercinė vakcina sukurta VLP pagrindu. Pasaulio sveikatos organizacijos teigimu kasmet nuo HBV sukeltų kepenų ligų miršta apie 1 mln. žmonių. Tai parodo šio skiepo svarbą vykdant HBV sukeltų ligų prevenciją (Roldão et al. 2010).

Žmogaus papilomos virusas (ŽPV) yra vienas didžiausių gimdos kaklelio vėžio sukėlėjų (Wei et al. 2018). Jau yra sukurtos ir komerciškai prieinamos kelios profilaktinės ŽPV vakcinos paremtos rekombinantinėmis technologijomis mielių ląstelėse gaunamomis VLP (Kondo 2009). Šios vakcinos paremtos vienu didžiausiu kapsidės baltymų L1, kuris savarankiškai formuoja VLP, kurios taip pat sugeba iššaukti stiprų imuninį atsaką (Chabeda et al. 2019). Ir nors šios vakcinos yra patvirtintos ŽPV infekcijos prevencijai, jos nėra efektyvios jau esamų infekcijų metu, todėl terapinės vakcinos paieška šios infekcijos gydymui vis dar vyksta (Wang, Roden 2013).

1.4.3 Chimerinės VLP

VLP yra laikomos puikiais struktūromis svetimų epitopų nešimui. Taip yra dėl jų tvarkingo, tankaus ir pasikartojančio išsidėstymo erdvėje, kas nėra būdinga paprasto monomerinio ar oligomerinio epitopo atveju. Konstruojant chimerines VLP yra išskiriami 3 skirtingi chimerinių VLP tipai pagal jų veikimo principą (1.6 pav.). Pirmasis arba „klasikinis“ VLP tipas yra paremtas vienu ar keliais viruso genais su įvestais svetimais epitopais. Tokios chimerinės VLP negali infekuoti ląstelių, nes neturi jokios genominės DNR. Antrasis tipas yra paremtas dalelėmis, turinčiomis infekcinių savybių ir gali būti išskiriamas į dvi kategorijas: replikacijai kompetentiškos ir nekompetentiškos VLP. Replikacijai kompetentiškos VLP turi pilną viruso genomą su hibridiniais genais ir geba savarankiškai daugintis. Replikacijai nekompetentiškos VLP turi tas pačias savybes kaip kompetentiškos, tačiau geba daugintis tik esant specialioms sąlygoms. Įvedant svetimus epitopus pasitelkiant cheminę sintezę arba PGR metodus, kiekvienai VLP šios insercijos sritys turi būti parinktos individualiai atsižvelgiant į pačios dalelės savybes (Khudyakov, Fields 2003).



1.6 pav. Skirtingų VLP tipai pagal jų skirtingą veikimo principą. Taip pat skirtingam VLP tipui pavaizduoti metodai, kuriais jos yra gaunamos. Pagal Khudyakov ir Fields (2003).

Chimerinės VLP su įvestais svetimais epitopais yra potencialios kandidatės vakcinų kūrimui. Rekombinantinės DNR inžinerijos metodų atsiradimas leido kurti chimerines VLP su įterptais svetimais epitopais. Šios dalelės gaunamos klonuojant linijinius arba konformacinius epitopus į genus, koduojančius savarankiškai susirenkančias polipeptidus (Jennings, Bachmann 2008).

Vienas gerai ištirtas antigenų nešiklis yra HBcAg, kuris sudaro VLP. Šios dalelės yra gerai ištirtos kaip svetimų epitopų nešiklis, gebantis iššaukti imuninį atsaką prieš įvairius įterptus epitopus (Pumpens, Grens 2001). Tačiau įterpiant naujas sekas į VLP struktūrą gali būti sutrikdytas dalelės stabilumas, o tai tik parodo, jog kuriant chimerines VLP būtina atsižvelgti į įterpiamo epitopo įtaką pačiai dalelės struktūrai (Lei et al. 2020).

Chimerinės VLP taip pat galėtų būti naudojamos kaip vakcinos, apsaugančios nuo kelių tos pačios rūšies viruso atmainų. Buvo parodyta, kad ŽPV chimerinės VLP, kurių L1 (gausiojo ŽPV kapsidės baltymo) kilpų regionuose yra įvestos kitos ŽPV viruso atmainos sekos, geba iššaukti imuninį atsaką prieš kelias virusų atmainas. Tokios dalelės, gebančios apsaugoti nuo kelių skirtingų epitopų, galėtų žymiai pagerinti ligų prevenciją ir padidinti atsparumo virusams tikimybę (Li et al. 2018).

1.4.4 VLP sintezė mielėse

Dažniausiai VLP gamybai naudojamos bakterijų arba mielių ląstelės (Roldão et al. 2010). Kuriant VLP vakcinas bakterijų, pvz.: *E. coli*, raiškos sistemose iškyla problemos dėl šių ląstelių negebėjimo vykdyti sudėtingų potransliacinių modifikacijų, tokių kaip glikozilinimas ar disulfidinių tiltelių susidarymas. Be to, bakterijų raiškos sistemos taip pat susiduria su tokiomis problemomis kaip

neteisingas baltymų susilankstymas, mažas baltymų tirpumas, bei pašaliniai toksiniai baltymai, kurių būtina atsikratyti tikslinio baltymo gryninimo metu (Baneyx, Mujacic 2004). Mielės, kurios yra eukariotinis vienaląstis organizmas (Dickinson 2005) ir turi panašumų su eukariotinėmis ir prokariotinėmis ląstelėmis, šiuo atveju yra pranašesnės už bakterijas. Mielių ląstelės gali sintetinti sudėtingesnes VLP nei bakterijos (Ding et al. 2018). Mielių raiškos sistemos yra pigios, saugios ir gebančios produkuoti patikimos kokybės VLP (Kim, Kim 2017). Mielių, tiksliau *Saccharomyces cerevisiae*, yra patrauklios raiškos sistemos, nes yra lengvai kultivuojamos, yra imlios genetinėms modifikacijoms bei turi GRAS (angl. *Generally Recognized as Safe*) statusą (Zhao 2017). Be to, mielių raiškos sistemos gali greitai pasiekti ir toleruoti didelį ląstelių tankį ir aukštą rekombinantinių baltymų išeigą (Çelik, Çalik 2012).

Vykdamas rekombinantinių baltymų sintezę mielėse svarbus etapas yra tinkamas raiškos vektoriaus pasirinkimas. Toks raiškos vektorius paprastai susideda iš promotoriaus sekos, multikloninio regiono (skirto tikslinių genų sekų įterpimui), terminatoriaus sekos, selektyviai atrankai skirto žymens ir replikacijos pradžios sekos (pvz.: 2 µm plazmidės autonominė replikacijos seka). Integracinių plazmidžių atveju taip pat turi būti homologinės DNR seka tam tikram lokusui, reikalinga įsiterpimui į genomą (Çelik, Çalik 2012). Gana svarbus elementas klonavimo vektoriuje taip pat yra genų promotoriai. Keli promotorių pavyzdžiai, kilę iš *S. cerevisiae* yra PYK1, PGK3, kurie yra konstitutyvūs bei GAL1 ir GAL10, kurie yra indukuojami galaktoze ir represuojami gliukoze (Partow et al. 2010).

Vykdyti mielių ląstelių transformaciją klonavimo vektoriumi galimi keli būdai: 1) sferoplastų paruošimo (pilnai fermentiškai suardant mielių ląstelių sienelės palengvinant DNR patekimą į jas); 2) ličio acetato metodu; 3) elektroporacija. Teigiamų transformantų atrankai gali būti naudojami auksotrofiniai žymenys arba genai suteikiantys atsparumą antibiotikui ar kitai medžiagai. Autonominės plazmidės taip pat turi riziką būti „pamestos“ jeigu aplinkoje nebėra selektyvaus spaudimo, tuo tarpu integracinės plazmidės išlieka genome ląstelėms besidalijant ir perduodamos dukterinėms ląstelėms (Mattanovich et al. 2012).

1.4.5 Kitas VLP pritaikymas

VLP yra ne tik patraukli platforma vakcinų kūrimui, bet taip pat ir vaistų, ir kitų molekulių transportui į ląsteles. VLP jau yra naudojami kaip chemoterapinių vaistų bei įvairių peptidų nešikliai (Shirbaghaee, Bolhassani 2016). Taip pat daug potencialo suteikia galimybė kovalentiškai modifikuoti šias daleles prijungiant norimas molekules pvz.: fluorescencinius dažus (Anderson et al. 2006). Didelis šių VLP transporto sistemų privalumas yra jų potencialas tikslingai pernešti molekules į pasirinktas ląsteles-taikines (Rohovie et al. 2017).

Mažų molekulių prijungimas prie VLP paviršiaus taip pat yra daug žadanti sritis. Prie VLP paviršiaus galima „prikabinti“ įvairias molekules, taip nedarant įtakos pačios VLP konformacijai ir

stabilumui. Todėl šias daleles galima panaudoti ne tik vaistų pernešimui, bet ir panaudoti VLP iššaukiant imuninį atsaką prieš molekules ant jų paviršiaus. Viena iš tokių dalelių buvo sukurta kaip vakcina prieš nikotiną. Panaudojant bakteriofago Q β paviršiaus baltymus buvo suformuota VLP prie kurios paviršiaus prijungtos nikotino molekulės. I ir II stadijos klinikiniai tyrimai su šiomis vakcinomis parodė, jog šių dalelių dėka organizme yra iššaukiama stipri IgM/IgG tipo antikūnų reakcija prieš nikotino molekules. Įprastai nikotinas nesukelia imuninės reakcijos, tačiau dėl konjugacijos su VLP imuninė sistema yra suaktyvinama. Individuose su susidariusiais antikūnais taip pat buvo pastebima abstinencija rūkymui dėl sumažėjusio pasitenkinimo, kurį sukelia nikotino suvartojimas (Cornuz et al. 2008; Maurer et al. 2005).

Kadangi VLP yra virusinės kilmės, jos turi savybę nespecifiškai juntis su DNR molekulėmis (Chang et al. 1993). Tyrimais su VLP buvo parodyta, kad šios dalelės sugeba „supakuoti“ virusinę DNR molekulę ir pernešti ją į ląsteles *in vitro* (Slilaty, Aposhian 1983). Taip pat VLP gali būti panaudojamos pernešti ir plazmidinę DNR. Tyrimai su žiurkėnų poliomaviruso VP1 baltymo dalelėmis, formuojančiomis VLP, patvirtino, kad *in vitro* išardymo ir susirinkimo sistemoje VLP gali „apgauti“ plazmidinę DNR ir ją sėkmingai pernešti į žinduolių ląsteles, ko pasekoje įvyksta sėkminga plazmidėje esančių genų raiška. Toks genų pernašos įrankis yra daug žadantis genų terapijos srityje (Voronkova et al. 2007). Svarbus VLP pritaikymas taip pat yra įvairių virusinių ligų diagnostika pasitelkiant imunofermentinę analizę. Tradiciškai naudojamos išaktyvuotos pilnos virusinės dalelės yra nesaugios, o jų produkcija gana sudėtinga (Ricks et al. 2019). Todėl anksčiau minėtos VLP yra tvari alternatyva kuriant imunodiagnostinius įrankius. VLP sėkmingai gali būti panaudotos tokiems diagnostiniams įrankiams kaip imunofermentinė analizė arba ELISA (angl. *enzyme-linked immunosorbent assay*). Pademonstruota, jog šios dalelės puikiai veikia kaip antigenai specifinių antikūnų paieškai, o gaunami šių analizių rezultatai yra aukšto specifiškumo, jautrumo ir atkartojamumo (Bai et al. 2021).

2. MEDŽIAGOS IR TYRIMO METODAI

2.1 Medžiagos, plazmidės ir mikroorganizmai

2.1.1 Medžiagos ir tirpalai

Tirpalai DNR elektroforezei:

Agarozė (1 %): 1 % agarozės ištirpintos TAE buferiniame tirpale;

TAE buferinis tirpalas (pH 8,3): 40 mM Tris, 20 mM acto rūgštis, 1 mM EDTA („Thermo Scientific“, Lietuva);

DNR dažas: Massruler DNA Loading Dye 6X („Thermo Scientific“, Lietuva).

Etidžio bromido tirpalas: 10 mg/ml etidžio bromido;

Buferiniai tirpalai ir fermentai fermentinėms reakcijoms:

Polimerazinei grandininei reakcijai naudoti tirpalai: 10 mM dNTP tirpalas, 50 mM MgCl₂, polimerazės Taq 10X buferinis tirpalas, DNR polimerazės Phusion HF 10X buferinis tirpalas, DNR polimerazė Taq 5U, DNR polimerazė Phusion High-Fidelity (HF) 2U.

DNR hidrolizei naudotas FastDigest (FD) 10X buferinis tirpalas, restrikcijos endonukleazės: EcoRI, BglII, XbaI, BamHI, BcuI.

Krevečių šarminė fosfatazė FastAP 1U.

DNR ligavimo reakcijai naudota: T4 DNR ligazė 5U, 10X DNR ligazės buferinis tirpalas.

Buferiniai tirpalai ir fermentai iš „Thermo Scientific“.

Kompetentinių *E. coli* ląstelių gamybai naudoti tirpalai:

CaCl₂ 100 mM tirpalas;

CaCl₂ ir glicerolio tirpalas santykiu 4:1.

Naudojami sterilūs tirpalai.

Kompetentinių mielių *S. cerevisiae* ląstelių gamybai naudoti tirpalai:

TE: 10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 1 mM EDTA;

TE-LiOAc: 100 mM LiOAc tirpalas TE;

TE-PEG: 50 % (m/v) PEG 4000 tirpalas TE;

Naudojami sterilūs tirpalai.

Tirpalai rekombinantiniams baltymams, susintetintiems *S. cerevisiae*, gryninti:

Ardymo buferinis tirpalas DB1000: 10 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 1 mM CaCl₂, 0,1 % TritonX-100, pH 7,2;

DB150: 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 0,01 % TritonX-100, pH 7,2;

DB150+Arg: 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 0,01 % TritonX-100, 0,25 M Arg, pH 7,2;

Naudojami sterilūs tirpalai.

Sacharozės 30 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 % tirpalai: reikiamas kiekis sacharozės tirpinamas DB150+Arg buferiniame tirpale (m/v), filtruojama naudojant 0,2 µm filtrą.

CsCl įvairaus tankio tirpalai (1,365 g/ml; 1,3677 g/ml; 1,3712 g/ml ir 1,375 g/ml) gaminami DB150 buferiniame tirpale (v/v), filtruojama naudojant 0,2 µm filtrą.

Proteazių inhibitoriaus PMSF 20 mM tirpalas metanolyje, naudojama galutinė koncentracija 2 mM.

Baltymų elektroforezei akrilamidiniame gelyje denatūruojančiomis sąlygomis reikalingi tirpalai:

Buferinis tirpalas koncentruojančiajam geliui: 4X Tris-HCl/NDS (pH 6,8): 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,4 % NDS;

Buferinis tirpalas skiriančiajam geliui: 4X Tris-HCl/NDS (pH 8,8): 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), 0,4 % NDS; 30 % akrilamido/bisakrilamido tirpalas: 29:1 akrilamido:N, N'-metilenbisakrilamido (Carl Roth);

Amonio persulfato 10 % tirpalas vandenyje (APS);

TEMED (N, N, N', N' - tetrametilendiamino) tirpalas (Sigma);

Koncentruojančio gelio tirpalas: 13 % akrilamido/bisakrilamido tirpalas, 25 % 4X Tris-HCl/NDS (pH 6,8), 0,5 % APS tirpalo, 0,1 % TEMED (N, N, N', N' - tetrametilendiamino);

Skiriamąjo gelio tirpalas (12 % akrilamido): 40 % akrilamido/bisakrilamido tirpalo, 25 % 4X Tris-HCl/NDS (pH 8,8), 0,33 % APS tirpalo, 0,066 % TEMED;

2X baltymų dažo buferinis tirpalas: 100 mM Tris-HCl (pH 6,8), 20 % glicerolio, 4 % NDS, 0,2 % bromfenolio mėlio, 10 % merkaptioetanolio;

Kumasi mėlio tirpalas: 40 % etanolio, 0,1 % Coomassie Brilliant Blue R-250, 10 % acto rūgšties;

Gelių plovimo tirpalas: 5 % acto rūgšties tirpalas;

Imunoblotui naudoti tirpalai:

Baltymų pernešimo buferinis tirpalas (PTB): 50 mM Tris-HCl (pH 7,2), 1,13 % glicino, 10 % metanolio;

Blokavimo tirpalas: 1X RotiBlock (Carl Roth);

PBS: 81 mM Na₂HPO₄, 24 mM NaH₂PO₄*H₂O, 99 mM NaCl, pH 7,5;

Plovimo tirpalas (PBS-T): 0,1 % Tween-20 PBS;

Buferinis tirpalas, naudotas skiesti antikūnams: 2 % BSA PBS-T.;

4-chloro-1-naftolio tirpalas: 30 mg 4-chloro-1-naftolio (Sigma) tirpinama 10 ml etanolio, laikoma -20 °C;

Tirpalas ryškinimui: 2 ml paruošto 4-chloro-1-naftolio tirpalo, 30 µl 35 % H₂O₂, 10 ml PBS.

Imunofermentinei analizei reikalingi tirpalai:

Karbonatinis buferinis tirpalas: 50 mM Na₂CO₃ tirpalas, pH 9,5;

PBS: 81 mM Na₂HPO₄, 24 mM NaH₂PO₄*H₂O, 99 mM NaCl, pH 7,5;

Buferinis tirpalas, reikalingas antikūnų skiedimui PBS-T: PBS su 0,05 % Tween-20;

Plovimo buferis PBS-T: PBS buferinis tirpalas su 0,05 % Tween-20;

TMB: 3,3',5,5'-tetrametilbenzidinas, naudojamas kaip peroksidazės substratas (Clinical Science Products);

Reakcijos stabdymui naudotas 10% H₂SO₄ tirpalas.

2.1.2 Mitybinės terpės

LB terpė *E. coli* auginimui: 2,5 % mišinio (Sigma-Aldrich, JAV, St. Louise);

Agarizuota LB terpė *E. coli* auginimui: 2,5 % mišinio (Sigma-Aldrich), 1,5 % agaro;

Terpė *S. cerevisiae* auginimui: YEPD (angl. *Yeast Extract Peptone Dextrose*): 1 % mielių ekstrakto, 2 % peptono, 2 % gliukozės;

Terpė *S. cerevisiae* indukcijai 2X YEP: 2 % mielių ekstrakto, 4 % peptono;

Galaktozės tirpalas rekombinantinių baltymų sintezės *S. cerevisiae* indukcijai: 12 % galaktozės;

Agarizuota YEPD terpė: 1 % mielių ekstrakto, 2 % peptono, 2 % gliukozės, 1,5 % agaro;

Terpės tirpalai autoklavuojami papildomame 0,8 atm slėgyje 30 min (terpės su angliavandeniais) arba papildomame 1 atm slėgyje 20 min.

Ampicilinui atsparios *E. coli* ląstelės auginamos 37 °C temperatūroje, terpėje, turinčioje 50 µg/ml ampicilino;

Formaldehidui atsparios *S. cerevisiae* ląstelės auginamos 30 °C temperatūroje, terpėje, turinčioje 0,3 – 0,6 µg/ml formaldehido.

2.1.3 Bakterijų ir mielių kamienai

Bakterijų transformacijai buvo naudoti *Escherichia coli* kamienai: DH5α (Dam⁻) ir GM119 (Dam⁺).

DH5α genotipas: F(φ80dlacZ ΔM15) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(rk- mk+) supE44 relA1 deoRA(lacZYA-argF) U169.

GM119 genotipas: dam-3 dcm-6 metB1 lacY1 galK2 galT22 tonA31 tsx-78 supE44 mtl-1 (thi-1).

Mielių transformacijai buvo naudotas *Saccharomyces cerevisiae* kamienas AH22-214.

AH22-214 genotipas: MATa/MATα his3/his3 leu2/leu2 cir+.

2.1.4 Plazmidės

Darbe naudotas pFX8 mielių raiškos vektorius, sukurtas EGIS laboratorijoje. Jis turi β-laktamazės geną, suteikiantį bakterijoms atsparumą ampicilinui. Atsparumą formaldehidui lemia FDH1 genas, koduojantis formaldehido dehidrogenazę ir suteikiantis galimybę mielėms augti mitybinėje terpėje su formaldehidu. Plazmidės replikaciją mielėse užtikrina 2µ plazmidės seka. Rekombinantinių genų transkripcijai reikalingas GAL10-PYK1 promotorius (susidedantis iš UDP-galaktozės epimerazės ir piruvatkinazės genų promotorių sekų). GAL10 promotorius yra indukuojamas galaktoze. Rekombinantinio geno transkripciją stabdo PGK1 (fosfoglicerokinazės geno) terminatoriaus seka.

2.1.5 Molekulinės masės standartai

DNR molekulinės masės standartas: GeneRuler 1 kb DNA Ladder #SM0311.

Dažytas baltymų molekulinės masės standartas imunobloto analizei – Prestained Protein Ladder #26619

Nedažytas baltymų molekulinio svorio standartas baltymų elektroforezei - Unstained Protein Molecular Weight Ladder #26614, #26630;

Molekulinės masės standartai iš „Thermo Scientific“, Lietuva.

2.1.6 Antikūnai

Polikloniniai antikūnai nukreipti prieš PARV4 VP2 (produkuoti VU GMC BTI Imunologijos ir ląstelės biologijos skyriuje);

Hibridomų terpė HB1 prieš HBsAg (produkuota VU GMC BTI Imunologijos ir ląstelės biologijos skyriuje);

Goat anti-mouse-IgG konjuguoti su peroksidaze HRP (Bio-rad, #172-1011).

2.2 Metodai

2.2.1 Plazmidinės DNR skyrimas

Plazmidinės DNR išskyrimui naudotas metodas, paremtas šarminė bakterijų ląstelių lize. Plazmidės skirtos naudojant „Thermo Scientific“ GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit. Mažame tūryje (3-4 ml) LB terpės užsėjamos bakterijos. Auginamos purtyklėje 16-18 val. 37 °C temperatūroje. Kultūra centrifuguojama 10 min. 3000 aps./min greičiu Eppendorf 5810R centrifugoje. Surinktų po centrifugavimo ląstelių lizė bei DNR išskyrimas vykdomas pagal gamintojo instrukcijas.

2.2.2 DNR elektroforezė

DNR elektroforezei naudoti 1 % agarozės geliai su 0,2 µg/ml etidžio bromido, reikalingo DNR vizualizacijai. Gelis leidžiamas TAE buferiniame tirpale naudojant 5 V/cm įtampa (120 V). Geliai stebimi po UV šviesos transiliumatoriumi „Herolab“ E.A.S.Y 442 K.

2.2.3 Polimerazės grandininė reakcija

Polimerazės grandininė reakcija padauginami geno fragmentai įterpiant restrikcijos endonukleazių kirpimo sritis bei svetimo epitopo seką į geno fragmentus.

Reakcijai vykdyti naudojami „Thermo scientific“ buferiniai tirpalai DNR polimerazėms, DNR polimerazės, dNTP mišinys, kaip substratas polimerazei, atitinkami pradmenys bei šabloninė DNR. Įvedama epitopo HBsAg seka: **GGCCCGTGCCGCACCTGCACC**.

Naudoti pradmenys (seka nurodyta 5'-3' kryptimi):

hp4_FW_pF8: CGGATCCACAATGTCCGTGGAACCAGCT (BamHI RE kirpimo srities įvedimui)

hp4_RV_pF8: GATCTAGATTATAGCAAATGAGAATAATTTTCGCGC (XbaI RE kirpimo srities įvedimui)

Lp2_HBsAg_FW: **GGCCCGTGCCGCACCTGCACC**GGAGAAAATTATGTATTGCCTCAGT

Lp2_HBsAg_RV: GGTGCAGGTGCGGCACGGGCCATGACCTAATACATATGGATAGTCAT
AG

LP3_HBsAg_FW: **GGCCCGTGCCGCACCTGCACCGAAGGCATGGATGTTGGC**

LP3_HBsAg_RV: GGTGCAGGTGCGGCACGGGCCATCAACACCTGTCATAATAGCTAAC

LP4_HBsAg_FW: **GGCCCGTGCCGCACCTGCACCTCTGGTGGTACTGATACAGTG**

LP4_HBsAg_RV: GGTGCAGGTGCGGCACGGGCCTCCAGGAACAAAAAACGTGT

BamHI ir XbaI restrikcijos endonukleazijų taikinių sritys pabrauktos. Įvedamo epitopo HBsAg seka paryškinta raudonai.

Reakcijos sąlygos atskirų VP2 geno fragmentų sintezei su Phusion HF polimeraze: 98 °C 30 sek., 30 kartų kartojamas ciklas: 98 °C 10 sek., 55 °C 15 sek., 72 °C 35 sek. Pasibaigiant 30 kartų pasikartojančiam ciklui palaikoma 72 °C 10 min. DNR grandinės sintezės užbaigimui. Po reakcijos mėginiai laikomi 4 °C.

Vykdamas teigiamų *E. coli* kolonijų atranką, vykdomas kolonijų PGR su Taq DNR polimeraze. Reakcijai naudojamos bakterijos kolonijos, įneštos į PGR reakcijos mėgintuvėlį. Reakcijai reikalingi pradmenys, kurie jungiasi prie pFX8 plazmidės (pradmenų seka pateikta 5'-3' kryptimi):

PGK3: TCCTTACCTTCCAATAATTCCAAAG

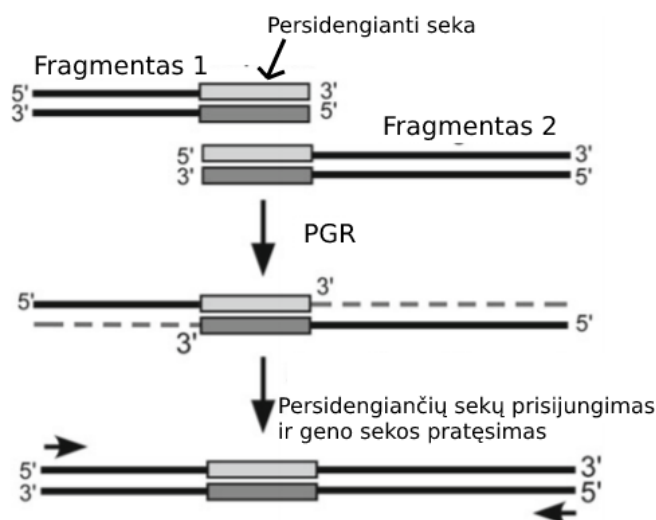
PYK5: TATTCATTCTTTTTCATCCTTTGG

PGR sąlygos vykdamas reakciją su Taq polimeraze: laikoma 95 °C 2 min., tuomet šis ciklas kartojamas 30 kartų: 95 °C 30 sek., 45 °C 30 sek., 72 °C 1 min. 50 sek. Pasibaigus ciklui DNR sintezės užbaigimas vyksta 72 °C 10 min. Po reakcijos mėginiai laikomi 4 °C.

2.2.4 Suliejimo PGR

Tyrimo metu konstruojant chimerinius VP2 baltymo genus buvo pasitelktas suliejimo (angl. *Fusion*) PGR metodas, besiremiantis identiškais sekomis skirtinguose genų fragmentuose, kuriomis vykstant hibridizacijai du geno fragmentai yra sujungiami į vieną fragmentą (2.1 pav.).

Iš pradžių, prieš vykdamas suliejimo PGR, reikia sukonstruoti geno fragmentus, kurio vieno 3' gale, o kito 5' gale yra persidengianti seka. Šie DNR fragmentai susintetinami PGR reakcijos metu naudojant atitinkamus pradmenis, turinčius įterpiamą seką, fragmentai po reakcijos gryninami iš agarozės gelio (2.2.7). Dvi persidengiančios sekos iš skirtingų fragmentų suliejimo PGR reakcijos metu yra sujungiamos, o pats genas yra susintetinamas pradedant nuo pradmenų, iš kurių vienas jungiasi prie pirmojo fragmento galo, o kitas – antrojo fragmento galo. Vykdamas suliejimo PGR naudojama Phusion HF polimerazė ir reakcija vykdoma šiomis sąlygomis: 98 °C 30 sek., tuomet 30 kartų kartojamas ciklas: 98 °C 10 sek., 67 °C 15 sek., 72 °C 35 sek. Pasibaigus ciklui palaikoma 72 °C temperatūra 10 min. Mėginiai laikomi 4 °C.



2.1 pav. Schema, vaizduojanti suliejimo PGR metodo veikimą. Pagal Cha-Aim et al. (2012).

2.2.5 DNR hidrolizė restrikcijos endonukleazėmis

DNR hidrolizė vykdoma 37 °C temperatūroje 15 min. naudojant „Thermo Scientific“ FastDigest restrikcijos endonukleazės ir FastDigest 10X buferinį tirpalą. 1 µg DNR hidrolizuoti naudojama 1 µl restrikcijos endonukleazės. Vykdoma pagal gamintojo rekomendacijas.

2.2.6 Galinių fosfato grupių pašalinimas

Išvengiant karpytos plazmidės susijungimo atgal į žiedinę formą, naudojama fosfatazė FastAP. Reakcija vyksta remiantis „Thermo Scientific“ nurodymais.

2.2.7 DNR gryninimas po fermentinių reakcijų ir iš agarozės gelio

DNR gryninimas po fermentinių reakcijų arba po paleidimo per agarozės gelį vykdomas naudojant „GeneJET PCR Purification Kit“ arba „Gel Extraction Kit“ iš „Thermo Scientific“. Gryninimas vykdomas pagal gamintojo instrukcijas.

2.2.8 DNR fragmentų ligavimo reakcija

DNR fragmentai po kirpimo su restrikcijos endonukleazėmis lieka išsikišusiais 3' arba 5' galais, kurie yra komplementarūs ir gali būti sujungti. Sujungimui pasitelkiama T4 DNR ligazė. Ligavimo reakcija vykdoma kambario temperatūroje 1 val. Ligavimo reakcijai (20 µl) naudojama 20 ng vektoriaus ir DNR fragmentų moliniais santykiais mišinyje 1:3 arba 1:5 bei 1 µl 1U T4 DNR ligazės. Po reakcijos mišinys naudojamas kompetentinių *E. coli* ląstelių transformacijai.

2.2.9 Kompetentinių *E. coli* ląstelių paruošimas šaldymui

25 ml skystoje LB terpėje yra užsėjama pasirinkto *E. coli* kamieno kolonija iš lėkštelės su agarizuota LB terpe, ląstelės yra auginamos purtyklėje palaikant 37 °C temperatūrą. Po augimo per naktį kultūra yra užsėjama į 500 ml skystos LB terpės 2 l tūrio kolboje. Bakterijos toliau auginamos 37 °C, purtyklėje, kol pasiekiamas reikiamas optinis tankis (matuojama 600 nm šviesa). Iš purtyklės kolba ištraukiama pasiekus 0,6-0,7 optinį tankį (įprastai po 1-3 val.). Ląstelės surenkamos

centrifuguojant 4 °C temperatūroje 10 min., 3000 aps./min greičiu (Eppendorf 5810R centrifuga). LB terpė nupilama, o ląstelės suspenduojamos 25 ml atšaldytame 100 mM CaCl₂ tirpale. Tirpalas su ląstelėmis vėl centrifuguojamas 4 °C temperatūroje 10 min., 3000 aps./min greičiu, ląstelės suspenduojamos 25 ml atšaldytame CaCl₂ tirpale ir inkubuojamos +4 °C per naktį. Galiausiai ląstelės centrifuguojamos identiškomis sąlygomis, supernatantas nupilamas, o ląstelės suspenduojamos 25 ml CaCl₂ ir glicerolio tirpale, išpilstomos mažais tūriais bei užšaldomos -70 °C ilgalaikiam saugojimui.

2.2.10 Kompetentinių *E. coli* ląstelių transformacija

Vykdam transformaciją ligavimo mišiniu, 5 µl ligavimo mišinio maišoma su 50 µl kompetentinių ląstelių (ligavimo mišinio ir ląstelių tūrio santykis turi būti 1:10). Jeigu vykdoma transformacija natyvia plazmide, naudojama 0,1 µg/ml plazmidinės DNR transformacijos tirpale. Ląstelių tirpalas su DNR inkubuojamas 15 min. leduose, tuomet vykdomas termošokas inkubuojant 1,5 min. 42 °C ir ląstelės grąžinamos į ledą. Tuomet DNR ir ląstelių mišinys praskiedžiamas skysta LB terpe santykiu 1:5-1:10 ir inkubuojamas 0,5-1 val. 37 °C temperatūroje. Praėjus laikui, centrifuguojama 5 min. 3000 aps./sek. greičiu norint nusodinti ląsteles į mėgintuvėlio dugną. Terpė nupilama ir ląstelės išsėjamos ant agarizuotos LB terpės lėkštelėse su antibiotiku. Lėkštelės inkubuojamos 37 °C termostate.

2.2.11 Teigiamų *E. coli* klonų atranka ir plazmidinės DNR patikra

Ant agarizuotos LB terpės lėkštelėse po transformacijos susidariusios bakterijų kolonijos turi būti patikrintos. Bakterijų biomasė nuo kiekvienos kolonijos yra perkeliama į mėgintuvėlius, o dalis likusios biomasės yra perkeliama ant naujų lėkštelių su LB terpe, turinčia antibiotiko. Vykdoma kolonijų PGR su „Thermo Scientific“ reagentais ir *Taq* DNR polimeraze. PGR vykdomas su vektoriumi pFX8 specifiniais pradmenimis PYK5 ir PGK3.

Teigiamų kolonijų atveju, nuo naujos lėkštelės kolonijų biomasė yra perkeliama į skystą LB terpę su antibiotiku ir auginama naktinė kultūra, iš kurios bus išskiriama plazmidinė DNR. Išskyrus plazmides, yra vykdoma jų restrikcinė analizė. Restrikcijos endonukleazės parenkamos, kad viena jų hidrolizuotų sritį klonuoto geno sekoje, o kita – pačiame vektoriuje. Hidrolizės produktai turėtų būti pakankamo dydžio, jog matytusi vizualiai po UV šviesa, tačiau ne vienodo dydžio, tam, kad galima būtų juos atskirti.

2.2.12 Mielių *S. cerevisiae* transformacija

Transformacijai pasirinktas mielių kamienas (AH22-214) yra užsėjamas į 3 ml skystos YEPD terpės ir auginama per naktį 30 °C temperatūroje, purtyklėje. Į naujus mėgintuvėlius su 3 ml YEPD terpės, 10 kartų praskiedžiama naktinė kultūra, auginama purtyklėje iki optinio tankio 0,5-1,0 matuojant ties 600 nm bangos ilgiu. Pasiekus reikiamą optinį tankį, ląstelės centrifuguojamos 5 min. 2000 aps./min. greičiu (Eppendorf 5810R centrifuga). Skystis nupilamas, o ląstelės praplaunamos

1 ml distiliuoto vandens ir centrifuguojama identiškomis sąlygomis. Nupylus vandenį, ląstelės užpilamos 1 ml 100 mM TE-LiAc tirpalo ir inkubuojamos 1 val. 30 °C termostate. Praėjus laikui, ląstelės centrifuguojamos 3000 aps./sek. greičiu 5 min. ir suspenduojamos 100 µl TE-LiAc tirpalo. 80 µl suspensijos su ląstelėmis sumaišoma su 10 µl 96 % etanolio ir 10 µl plazmidinės DNR, koncentracija ne mažesnė nei 0,2 mg/ml, ir inkubuojama 30 min. kambario temperatūroje. Įpilama 300 µl 50 % TE-PEG ir 30 µl 1 M LiAc tirpalų, suspenduojama ir inkubuojama 30-40 min. 30 °C temperatūroje. Ląstelės 20 min., perkliamos į 42 °C temperatūrą. Centrifuguojama 2000 aps./min. greičiu 5 min. ir suspenduojama skystoje YEPD terpėje, vėl centrifuguojama ir vėl suspenduojama 1 ml skystoje YEPD terpėje. Paliekama 30 °C termostate per naktį. Kitą dieną ląstelės užsėjamos ant agarizuotos YEPD terpės, turinčios formaldehido.

2.2.13 Rekombinantinių baltymų sintezė mieles auginant mažame tūryje

Siekiant patikrinti, ar vyksta tikslinio baltymo raiška mielių ląstelėse, jos auginamos 3 ml skystoje YEPD terpėje su formaldehidu 24 val. Mielės nucentrifuguojamos 2000 aps./min. greičiu 5 min. , terpė nupilama ir ląstelės suspenduojamos 3 ml YEPG (YEP terpė su 3 % galaktozės) terpe su formaldehidu, vykdant tikslinio baltymo sintezės indukciją. Po 20 val. auginimo vėl nucentrifuguojama tomis pačiomis sąlygomis, o terpė nupilama. Ląstelės toliau ardamos.

2.2.14 Rekombinantinių baltymų sintezė mieles auginant dideliame tūryje

Transformuotos mielių ląstelės auginamos skystoje YEPD terpėje 24 val. Paskui vykdoma rekombinantinio baltymo sintezės indukcija pridėjus pusę esamo tirpalo tūrio 2xYEP terpės ir pusę tūrio 12% galaktozės tirpalo. Auginimo ir indukcijos terpės yra papildomos su 0,3 – 0,4 µg/ml koncentracijos formaldehidu. Indukcija galaktoze vyksta 16-20 val.

2.2.15 Mielių ląstelių ardymas

Po auginimo mielių ląstelės centrifuguojamos 10 min. 3000 aps./min. greičiu (Beckman J2-21 centrifuga, rotorius JA-20 arba JA-14). Ląstelių biomasę praplaunama 15 ml distiliuoto vandens ir vėl centrifuguojama. Svarstyklėmis pasveriami mielių biomasė ir įpilamas dvigubas tūris ardymo buferio DB1000 su PMSF bei pusė viso tirpalo tūrio stiklo rutuliukų (skersmuo: 212-300 µm). Ląstelės mechaniškai ardamos 5 min. smarkiai purtant su 30 sek. pertraukomis grąžinant mėgintuvėlius į ledus. Centrifuguojama 10 min. 2000 aps./sek greičiu, 4 °C temperatūroje, supernatantas nusiurbiamas į naujus mėgintuvėlius.

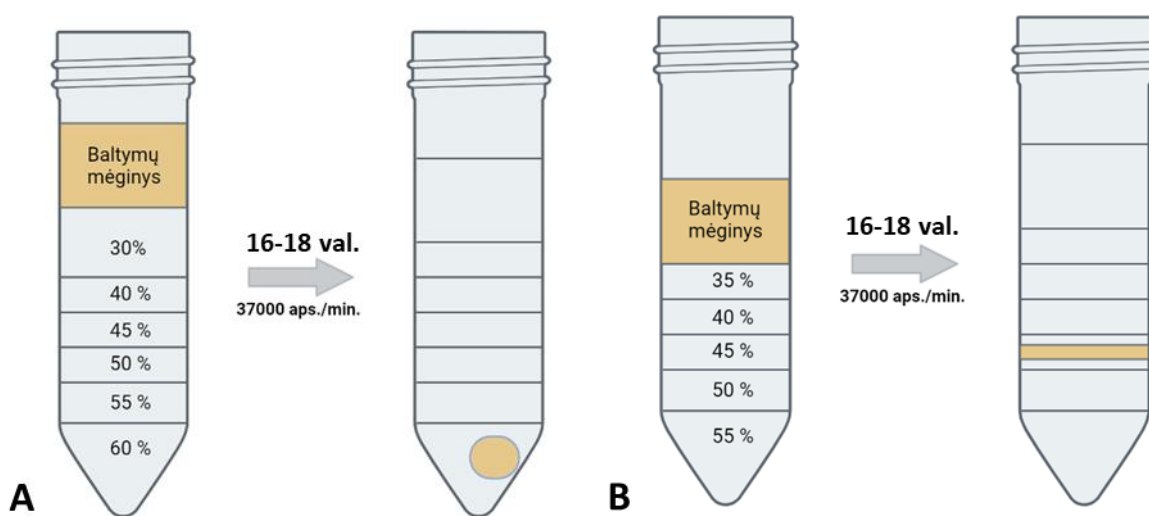
2.2.16 Mielėse susintetintų, į virusus panašių dalelių gryninimas

Suardžius mielių ląsteles, gautas lizatas yra laikomas šaltai leduose. Lizatas centrifuguojamas 2 val. 10000 aps./min. greičiu (Beckman Coulter, modelis J-26 XPI) palaikant 4 °C temperatūrą. Centrifuguojant atskiriama tirpi frakcija, kuri nusiurbiamą kaip supernatantas, o netirpi frakcija,

iškritusi į nuosėdas, yra tirpinama ardymo buferiniame tirpale. Baltymų elektroforezės metodu nustatoma frakcija, kurioje yra baltymas, toliau gryninant baltymą yra naudojama pasirinkta frakcija.

Toliau baltymai yra gryninami per sacharozės gradientą. Ant sacharozės gradiento, turinčio kelis skirtingos koncentracijos sacharozės tirpalų sluoksnius, yra pilama frakcija (tirpi arba netirpi), kurioje koncentruojasi baltymas. Tirpalas su gradientu centrifuguojamas 37000 aps./sek. greičiu, 4 °C temperatūroje per naktį (Beckman L8-70 70.1 Ti rotoriuje) (2.2 pav.). Žemiau 30 % sacharozės tirpalo ribos frakcijos yra renkamos po 1-2 ml. Surinktos frakcijos leidžiamos per baltymų elektroforezės gelį ir identifikuojamos frakcijos, turinčios daugiausiai tikslinio baltymo.

Po sacharozės gradiento, atrinktos frakcijos yra gryninamos per CsCl gradientą. Pasirinktos frakcijos yra skiedžiamos DB150 buferiniu tirpalu 3 kartus ir tirpalas centrifuguojamas 37000 aps./sek. greičiu, 4 °C temperatūroje 3 val. Supernatantas nupilamas, o gautos nuosėdos yra tirpinamos DB150 buferiniame tirpale. Gautas tirpalas yra pilamas ant CsCl skirtingo tankio tirpalų gradiento, centrifuguojama identiškomis sąlygomis per naktį (2.2 pav.). Frakcijos nuimamos po 1-2 ml ir leidžiamos per baltymų elektroforezės gelį, norint nustatyti, kuriose frakcijose yra tikslinis baltymas.



2.2 pav. Schema, vaizduojanti baltymų mėginių ultracentrifugavimo procesą A) sacharozės gradientu ir B) cezio chlorido gradientu. Procentais pažymėti skirtingos koncentracijos tirpalai gradiente. Po centrifugavimo gelsva spalva pažymėtos tikslinių baltymų koncentravimosi vietos sacharozės arba cezio chlorido tirpalų gradientuose.

2.2.17 NDS-PAGE baltymų elektroforezė

Baltymų elektroforezei yra gaminamas 12 % poliakrilamido gelis. Gelį sudaro koncentruojamasis gelis, esantis viršuje ir skiriamasis, esantis po juo. Gelis leidžiamas vertikaliai naudojant 40 mA srovės stiprį ir 150 V įtampą. Mėginiai į gelį leidžiami ir paruošiami taip, kaip nurodyta 2.1 lentelėje. Gelis dažomas kaip nurodyta 2.2.18.

2.1 lentelė. Mėginių paruošimas leidimui per NDS-PAGE elektroforezę.

	Mėginio sudėtis	Įnešimo į gelį tūris
Mielių lizatas	10 µl mėginio, 10 µl H ₂ O, 20 µl 2X baltymų dažo	5 µl
Tirpi frakcija	10 µl mėg., 10 µl H ₂ O, 20 µl 2X dažo	10 µl
Netirpi frakcija	10 µl mėg., 10 µl H ₂ O, 20 µl 2X dažo	10 µl
Sacharozės gradiento mėginiai	10 µl mėg., 10 µl H ₂ O, 20 µl 2X dažo	10 µl
CsCl gradiento mėginiai	15 µl mėg., 3 µl 6X dažo	10 µl

2.2.18 Poliakrilamidinio gelio dažymas

Po elektroforezės baltymų gelis laikomas Kumasi brilantinio mėlio dažo ir švelniai vartoma 20 min. Praėjus laikui iš dažo gelis perkeliamas į 5 % acto rūgšties tirpalą ir plaunama 0,5-2 val.

2.2.19 Baltymų koncentracijos nustatymas

Baltymų koncentracijos yra nustatomos vykdant baltymų elektroforezę ir analizuojant gautas gelių nuotraukas su ImageJ programa. Kalibracinei kreivei nubrėžti naudojami žinomų koncentracijų jaučio serumo albumino (BSA) tirpalai. ImageJ programa nustatomi baltymų gelio juostelių ryškumo intensyvumai pažymint juosteles vienodo ploto stačiakampiais. Gauti intensyvumai atvaizduojami kalibracinėmis kreivėmis, kurių plotas ir santykinis tankis yra nustatomas pagal kontrolinę juostelę. Išvedama kalibracinės kreivės lygtis pagal kurią apskaičiuojama tikslinio baltymo koncentracija (lygties tiesės R^2 reikšmė turi būti didesnė nei 0,9).

2.2.20 Imunobloto analizė

Po baltymų elektroforezės denatūruoti baltymai pusiau sauso pernešimo būdu pernešami ant PVDF (poliviniliden-difluorido) membranos. Pernešus baltymus, membrana blokuojama RotiBlock tirpalu 1 val. Po blokavimo membrana perkeliama į cilindrą ir inkubuojama su 2 % BSA PBS-T (0,1%) skiestais antikūnais. Polikloniniai antikūnai prieš PARV4 VP2 skiedžiami 1000 kartų, hibridomų terpė HB1 prieš HBsAg, skiedžiama 5 kartus. Cilindras sukamas rotoriumi ir paliekamas suktis per naktį. Membrana keturis kartus praplaunama PBS-T tirpalu ir inkubuojama 1 val. su antrinais antikūnais anti-mouse-IgG, žymėtais peroksidaze ir skiestais 3000 kartų 2 % BSA PBS-T (0,1 %). Membrana praplaunama keturis kartus PBS-T buferiniu tirpalu ir tuomet du kartus distiliuotu vandeniu. Ryškinama su 4-chlornaftolio tirpalu tamsoje 10 min.

2.2.21 Taškinio imunobloto analizė

Ant nitroceliuliozinės membranos užlašinama po 3 µl baltymo tirpalo ir laukiama kol lašas išdžius. Kartojama tol, kol bendras užnešto baltymo kiekis yra 3 µg. Tuomet membrana blokuojama 1 val. inkubuoiant su RotiBlock tirpalu. Toliau vykdoma inkubacija su antikūnais ir ryškinimas kaip nurodyta 2.2.20.

2.2.22 Netiesioginė imunofermentinė analizė

Mielėse susintetintais ir išgrynintais baltymais yra padengiama 96 šulinėlių plokštelė. Pilama 50 µl 3 µg/ml koncentracijos baltymo, skiesto karbonatiniu buferiniu tirpalu. Plokštelė inkubuojama

4 °C nakčiai. Plokštelė plaunama PBS-T buferiniu tirpalu tris kartus ir blokuojama 250 µl RotiBlock tirpalu 1 val. 25 °C temperatūroje. Tris kartus vėl praplaunama plovimo buferiniu tirpalu. Plokštelė 1 val. 25 °C temperatūroje inkubuojama su reikiamo skiedimo polikloniniais antikūnais prieš PARV4 VP2 (skiedimas 1:200) arba HBI hibridomų terpe prieš HBsAg (skiedimas 1:10), skiedžiama PBS-T, purtoma 300 aps./min. greičiu. Plokštelė praplaunama keturis kartus ir inkubuojama su antriniais antikūnais anti-mouse IgG žymėtais peroksidaze (skiedimas 1:3000), skiedžiama PBS-T. Inkubuojama 1 val. 25 °C temperatūroje purtant 300 aps./min. greičiu. Praplaunama 5 kartus, į kiekvieną šulinėlį pilama 100 µl peroksidazės substrato TMB ir plokštelė laikoma 10 min. tamsoje. Reakcija stabdoma įpilus 100 µl 10 % sieros rūgšties. Matuojamas optinis tankis ties 450 nm bangos ilgiu, lyginant su 620 nm.

2.2.23 Virusinių dalelių stebėjimas elektroniniu mikroskopu

CsCl gradientu išgryninti baltymų mėginiai bei PBS buferiniame tirpale esantys mėginiai užlašinami ant anglimi padengto vario tinklelio, turinčio 200 nm dydžio akutes. Mėginiai dažomi 2 % vandeniniu uranilacetato tirpalu ir stebimi elektroniniu mikroskopu JEM 100C. Nuotraukos išsaugomos.

3. EKSPERIMENTŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1 Mielių raiškos vektorių, turinčių chimerinius PARV4 VP2 genus, konstravimas

Ankstesnių tyrimų, atliktų EGIS laboratorijoje, metu buvo nustatyta, jog žmogaus ketvirto parvoviruso kapsidę sudarantis baltymas VP2 savaime susirenka į virusus panašias daleles bei turi į išorę nukreiptas tris imunogeniškas kilpas (Tamošiūnas, 2017). Remiantis šiais rezultatais, buvo nuspręsta pabandyti įterpti svetimų antigenų epitopų genų sekas į imunogeniškų kilpų genų sritis ir stebėti tokio chimerinio VP2 baltymo sintezę mielėse, galimybę formuoti į virusus panašias daleles bei įvertinti tokio baltymo antigenines savybes. Į imunogeniškų kilpų genų sritis nuspręsta įterpti hepatito B viruso HBsAg antigeno epitopo geno seką, kuri yra 21 nt ilgio GGCCCGTGCCGCACCTGCACC ir atitinkamai yra transliuojama į septynių aminorūgščių seką GPCRTCT.

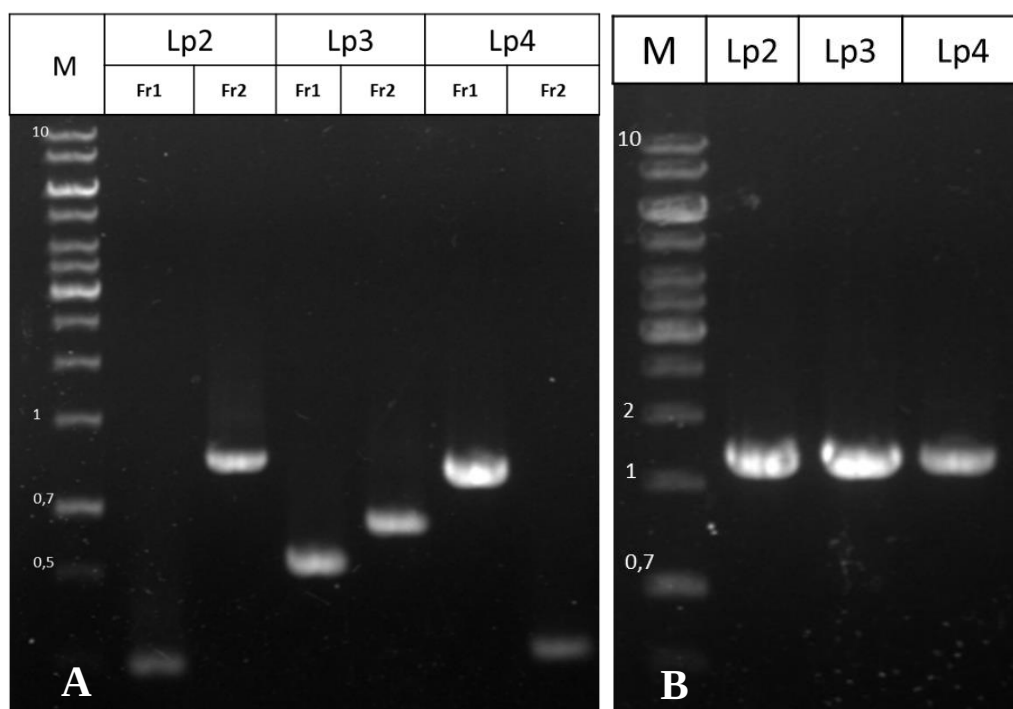
Siekiant įterpti HBsAg antigeno epitopo aminorūgščių seką į žmogaus parvoviruso 4 kapsidės baltymą VP2, reikėjo sukonstruoti geno variantus, turinčius įterptą HBsAg epitopo geno seką į baltymo imunogeniškų kilpų, kurios toliau bus vadinamos Lp2, Lp3 ir Lp4, genų sritis. Šiems chimeriniams genams sukonstruoti buvo pasitelktas suliejimo (angl. *Fusion*) PGR metodas (2.2.4) (Cha-Aim et al. 2012). Polimerazinės grandininės reakcijos metu HBsAg epitopo geno seka buvo įvedama pasinaudojant pradmenimis, kurie turi specifines nukleotidų sekas kilpų sekų regionams ir nespecifinę HBsAg epitopo geno seką. Norint įvesti reikiamų restrikcijos endonukleazių atpažinimo ir kirpimo nukleotidų sekas (BamHI bei XbaI), buvo naudojami pradmenys specifiniai VP2 baltymo genui su įterpta papildoma reikiama restrikcijos endonukleazės atpažinimo bei kirpimo seka 5' arba 3' galuose. Naudoti pradmenys, kuriais buvo sukurti, kiekvienos kilpos pakeitimo atveju, po du chimerinius fragmentus (3.1 pav. pažymėta Fr1 ir Fr2), aprašyti 3.1 lentelėje, o jų sekos yra aptartos 2.2.3 skyrelyje. Chimerinių genų fragmentų gamybai vykdoma PGR reakcija nuo PARV4 VP2 geno (ilgis 1677 bp), esančio plazmidėje pUC57.

3.1 lentelė. Chimerinių genų fragmentų gamybai naudoti pradmenų pavadinimai.

	1 Fragmentas	2 Fragmentas
HBsAg sekos įvedimui į Lp2	hp4_FW_pF8 + Lp2_HBsAG_RV	Lp2_HBsAG_FW + hp4_RV_pF8
HBsAg sekos įvedimui į Lp3	hp4_FW_pF8 + Lp3_HBsAG_RV	Lp3_HBsAG_FW + hp4_RV_pF8
HBsAg sekos įvedimui į Lp4	hp4_FW_pF8 + Lp4_HBsAG_RV	Lp4_HBsAG_FW + hp4_RV_pF8

Gauti chimerinių genų fragmentai yra sujungiami suliejimo PGR metodu, aprašytu 2.2.4 skyrelyje. Suliejimas vyksta per persidengiančią įvestą HBsAg epitopo geno seką, kurią turi abu susintetinti geno fragmentai. Gaunami trys chimeriniai VP2 genai, turintys įvestą HBsAg epitopo

geno seką kiekvienoje iš trijų kilpų sekų bei restrikcijos endonukleazių (BamHI ir XbaI) kirpimo sritis genų galuose (3.1 pav.).

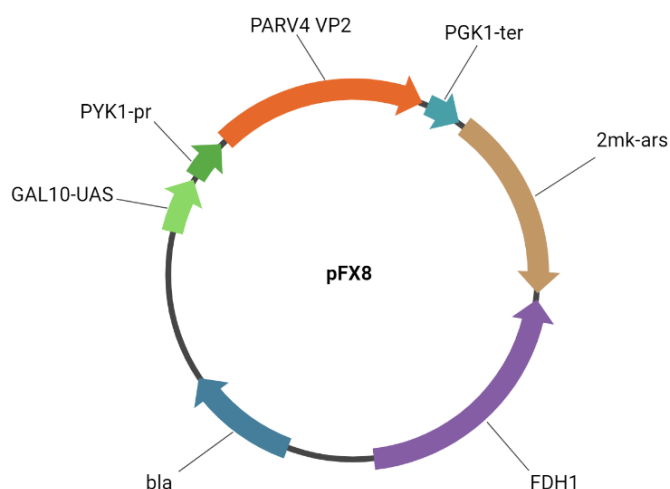


3.1 pav. DNR elektroforezės agaroziniame gelyje nuotraukos. A) Gauti VP2 chimerinių genų fragmentai įvedant restrikcijos endonukleazių taikinių sekas ir HBsAg epitopo geno seką. Fr1 – pirmasis geno fragmentas, Fr2 – antrasis geno fragmentas. B) Gauti pilni chimeriniai VP2 genai po suliejimo PGR. Molekulinės masės žymuo: Generuler 1 kb DNA ladder, SM0311, „Thermo Scientific“. Skaičiai šalia molekulinės masės žymens nurodo DNR fragmento ilgį kb.

PGR metodu susintetinti chimeriniai genai toliau yra hidrolizuojami BamHI ir XbaI restrikcijos endonukleazėmis. Mielų raiškos vektorius pFX8 hidrolizuojamas BamHI ir BcuI restrikcijos endonukleazėmis, taip sukuriant „lipnius“ galus, kurie yra komplementarūs hidrolizuotų chimerinių, ir norimų įstatyti į vektorių, genų fragmentų galams (2.2.5). Siekiant efektyvaus pakeisto VP2 geno įsistatymo į vektorių, vektorius defosforilinamas pasinaudojant šarmine fosfataze (2.2.6). Po hidrolizės tiek vektorius, tiek tiksliniai genai yra išgryninami (2.2.7).

Norint sukonstruoti mielių raiškos vektorių su įterptu tiksliniu genu, toliau vykdoma ligavimo reakcija naudojant T4 DNR ligazę. Dėl „lipnių“ galų, hidrolizuoti chimerinių genų fragmentai komplementariai jungiasi su hidrolizuotos plazmidės galais ir dėka ligazės jie yra sujungiami (2.2.8). Ligavimo reakcijos mišiniu cheminės transformacijos metodu transformuojamos *E. coli* bakterijų DH5α kamieno ląstelės (2.2.9, 2.2.10). Transformuotos ląstelės išsėjamos ant agarizuotos LB terpės su ampicilinu. Užaugti turėtų tik tos ląstelės, kurios buvo sėkmingai transformuotos plazmide, kadangi pFX8 mielių raiškos vektorius turi baltymo, suteikiančio atsparumą ampicilinui, geną. Užaugusios bakterijų kolonijos yra tikrinamos kolonijų PGR metodu su PYK5 ir PGK3 pradmenimis, specifiniais vektoriumi pFX8 bei atliekant išgrynintų plazmidžių restrikcinę analizę, taip, kaip nurodyta 2.2.3, 2.2.11 skyriuose. Analizuojant mėginius po PGR reakcijos, teigiama kolonija (su įstatytu genu) yra laikoma ta, kurios agarozės gelio nuotraukoje matomas ~1800 bp ilgio fragmentas. Biomasa nuo

teigiamų kolonijų yra užsėjama į skystą LB terpę su ampicilinu ir auginama kultūra iš kurios išskiriamas padaugintas vektorius su įstatytu tiksliniu genu. DNR išgryninama (2.2.1) ir atlikus restrikcinę analizę, visi trys sukonstruoti vektoriai, su trimis skirtingais chimeriniais VP2 geno variantais, buvo tikrinami Vilniaus universiteto Biotechnologijos instituto DNR sekoskaitos centre, nuskaitant įstatytų genų sekas. Gautos sekoskaitos reakcijos metu sekos lyginamos su *in silico* susintetinto chimerinio VP2 geno seka. Rezultatai analizuojami internetiniu įrankiu Benchling [Biology Software]. Pasitelkiant aptartus biocheminius bei biotechnologinius metodus, buvo sėkmingai sukonstruoti visi trys chimeriniai mielių raiškos vektoriai su pakeista viena iš trijų imunogeniškų VP2 baltymo kilpų įvedant HBsAg epitopo geno seką (3.2 pav.).

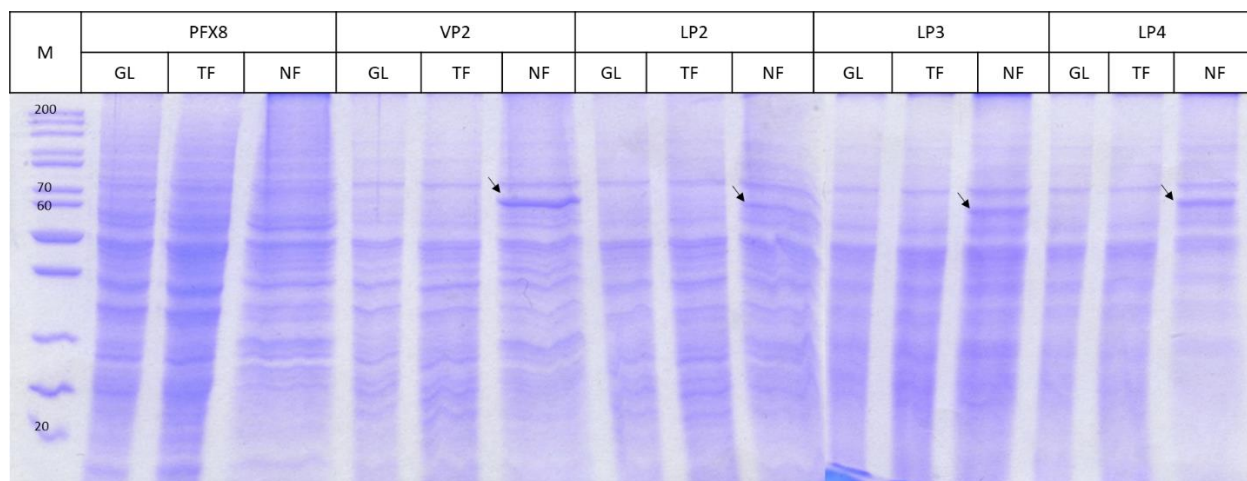


3.2 pav. pFX8 mielių raiškos vektoriaus su tiksliniu genu schema. bla - β laktamazę koduojantis genas, GAL10-UAS/PYK1-pr – hibridinis, galaktoze indukuojamas mielių promotorius; PGK1 – transkripcijos terminatorius; FDH1 – genas, koduojantis formaldehido dehidrogenazę, 2mk – mielių dvimikroninės plazmidės DNR seka, reikalinga replikacijai mielių ląstelėse, PARV4 VP2 – tyrimo metu įterptas susintetintas chimerinis VP2 genas.

3.2 Chimerinių VP2 baltymų sintezė mielėse ir jų gryninimas

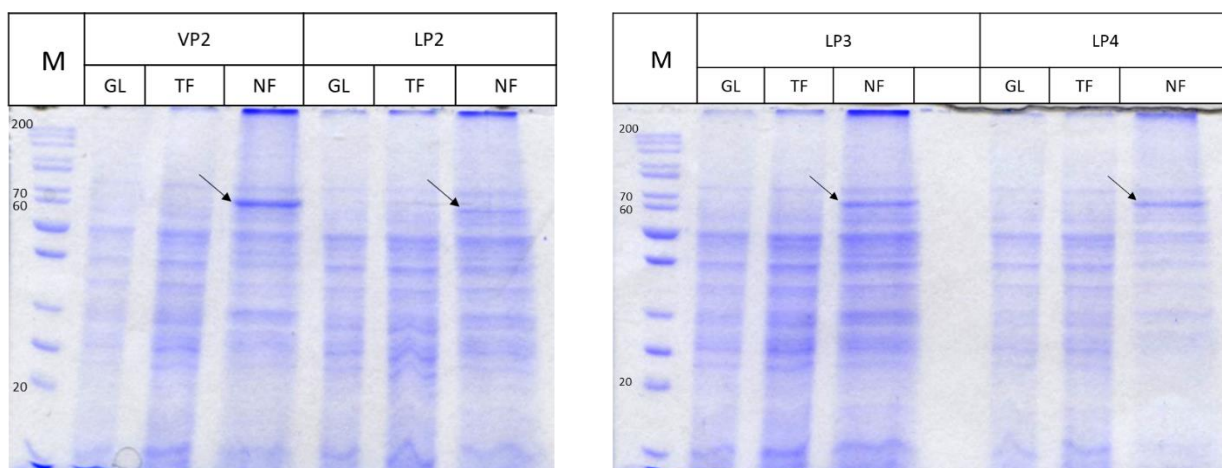
Sukonstruoti pFX8 mielių raiškos vektoriai su trimis skirtingais chimeriniais VP2 genais, turinčiais įvestą HBsAg epitopo geno seką Lp2, Lp3 ir Lp4 kilpų srityse, toliau yra naudojami mielių *S. cerevisiae* ląstelių kamieno AH22-214 transformacijai. Mielės taip pat transformuojamos nepakeistą VP2 geną turinčiu vektoriumi pFX7 (pFX7 - mielių raiškos vektorius, turintis tuos pačius genus, kaip ir pFX8, tačiau besiskiriantis restrikcijos endonukleazių taikinių sekomis), norint įvertinti pakeistų VP2 baltymų sintezės efektyvumą. Norint įvertinti tikslinių baltymų sintezę, mielės taip pat transformuojamos tuščiu, t.y. be jokio įstatyto tikslinio baltymo geno, mielių raiškos vektoriumi pFX8. Transformacija atliekama cheminiu būdu pasitelkiant ličio jonus (2.2.12). Transformuotos mielių ląstelės išsėjamos ant lėkštelių su YEPD terpe ir formaldehidu. Sėkmingai transformuotos ląstelės, turinčios vektorių, sudarys kolonijas, kurios toliau augs dėl įgyto atsparumo formaldehidui, kurį suteikia atsparumo formaldehidui baltymo genas, esantis vektoriuje.

Toliau vykdomas tikslinių baltymų sintezės patikrinimas mielėse. Mielės auginamos mažame tūryje ir ardamos (2.2.13, 2.2.15). Visų keturių mielių klonų variantų atveju tikslinių baltymų sintezė vyksta (3.3 pav.) - aptinkama reikiamo dydžio baltymo juostelė, kuri neaptinkama tuščio vektoriaus kontroliniame mėginyje. Toliau nuspręsta auginti didelį mielių biomasės kiekį baltymų gryninimui.



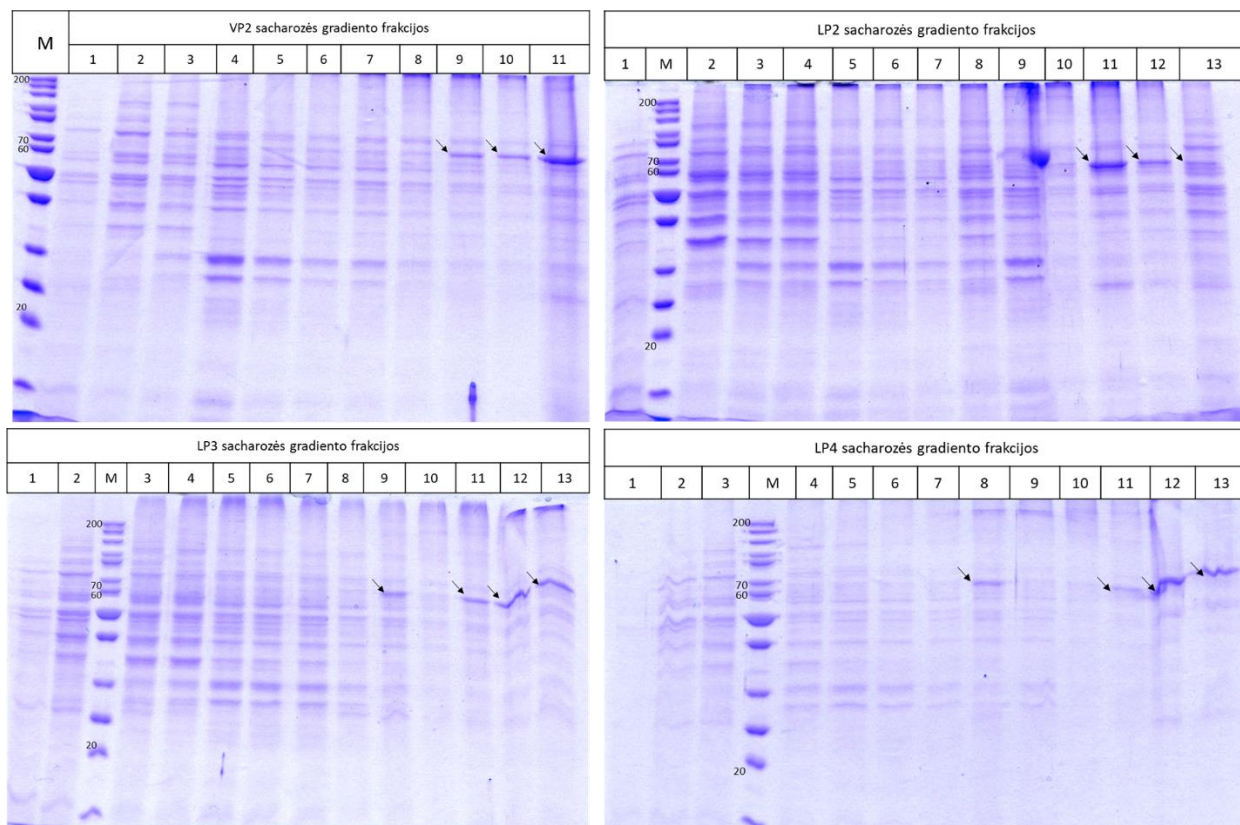
3.3 pav. PAA gelio nuotrauka, atvaizduojanti suardytų mielių ląstelių grubaus lizato, tirpios ir netirpios frakcijų mėginius denatūruojančiomis sąlygomis. GL – grubus lizatas, TF – tirpi frakcija, NF – netirpi frakcija. Rodykle pažymėtas tikslinis baltymas. Tikslinio baltymo masė ~61 kDa. PFX8 – vektoriaus kontrolė be VP2 baltymo geno. Molekulinės masės žymuo - Unstained Protein Molecular Weight Ladder #26614. Skaičiais vaizduojama molekulinės masės žymens juostos masė kDa.

Skirtingą geno variantą turinčios transformuotos mielės auginamos 2 L kolbose po 200 ml YEPD terpės (2.2.14). Vykdomas mechaninis mielių ląstelių ardymas su stiklo rutuliukais ir ardymo buferiniu tirpalu (2.2.15). Gautas grubus lizatas toliau centrifuguojant atskiriamas į tirpią ir netirpią baltymų frakcijas (2.2.16). Šios frakcijos analizuojamos baltymų elektroforezės gelyje denatūruojančiomis sąlygomis, įvertinant, kurioje frakcijoje koncentruojasi tiksliniai baltymai (3.4 pav.).



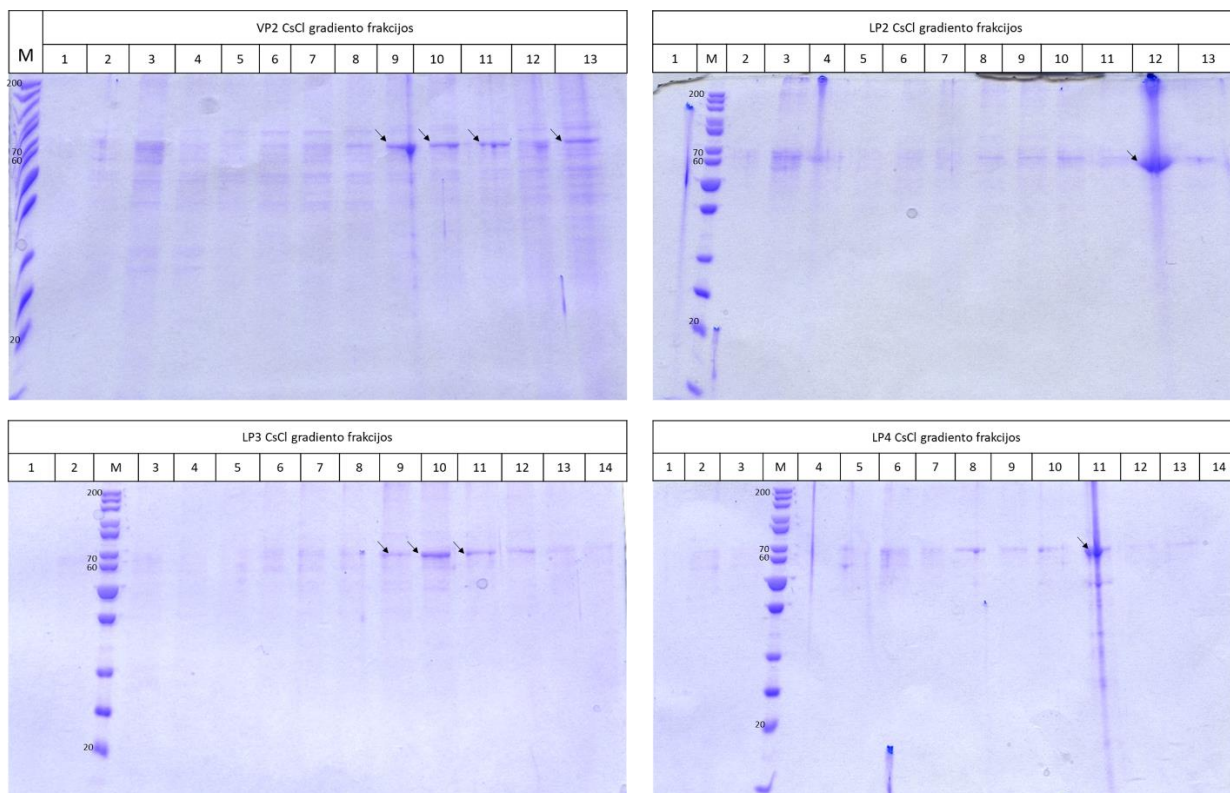
3.4 pav. PAA gelio nuotrauka, atvaizduojanti suardytų mielių ląstelių grubaus lizato, tirpios ir netirpios frakcijų mėginius denatūruojančiomis sąlygomis. GL – grubus lizatas, TF – tirpi frakcija, NF – netirpi frakcija. Rodykle pažymėtas tikslinis baltymas. Tikslinio baltymo masė ~61 kDa. Molekulinės masės žymuo - Unstained Protein Molecular Weight Ladder #26614. Skaičiais vaizduojama molekulinės masės žymens baltymo juostos masė kDa.

Tiksliniai baltymai identifikuojami baltymų gelio nuotraukoje ir atitinka teorinį dydį (~ 61 kDa). Įvertinus baltymo kiekius netirpioje frakcijoje lyginant su baltymų kiekiu tirpioje frakcijoje, tolimesniam baltymo gryninimui pasirenkama netirpi frakcija, kadangi joje koncentruojasi tiksliniai baltymai. Tiksliniai baltymai, esantys netirpioje frakcijoje toliau gryninami centrifuguojant per sacharozės tirpalų gradientą (šis ir tolesni baltymų gryninimo metodo žingsniai išsamiai aprašyti 2.2.16 skyriuje). Centrifugavimas per skirtingo tankio tirpalų gradientą paremtas skirtingu molekulių tankiu. Centrifuguojant molekulės mėgintuvėlyje juda žemyn tol, kol pasiekia tirpalą, kurio tankis atitinka pačios molekulės tankį. Taip galima atskirti skirtingos masės ir tūrio santykį turinčias molekules. Po centrifugavimo vizualiai matosi, jog baltymas koncentruojasi gradiento apačioje. Atsargiai nusiurbiamos gradiento frakcijos po 1-2 ml ir analizuojamos poliakrilamidiniame baltymų gelyje denatūruojančiomis sąlygomis (2.2.17) (3.5 pav.).



3.5 pav. PAA gelio nuotrauka, vaizduojanti tikslinių baltymų mėginių frakcijas po gryninimo per sacharozės tirpalų gradientą. Molekulinės masės žymuo - Unstained Protein Molecular Weight Ladder #26614. Rodyklėmis pažymėtos kelios ryškesnės tikslinio baltymo juostelės PAA gelio nuotraukoje. Skaičiais vaizduojama molekulinės masės žymens baltymo juostos masė kDa.

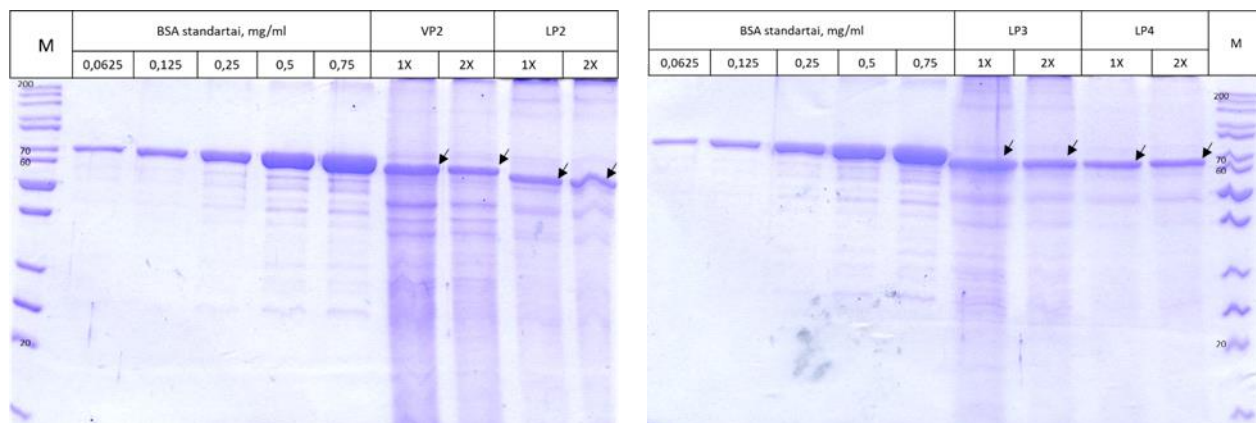
Įvertinus baltymo turinčias frakcijas, matyti, jog yra nemažai priemaišinių baltymų, tad tiksliniai baltymai gryninami toliau. Baltymą turinčios frakcijos apjungiamos ir gryninamos per CsCl skirtingo tankio tirpalų gradientą centrifuguojant. Vizualiai matyti, kad tiksliniai baltymai koncentruojasi gradiento apatiniuose sluoksniuose. Surenkamos 1-2 ml tūrio gradiento frakcijos ir analizuojamos baltymų elektroforezės gelyje norint išanalizuoti tikslinių baltymų turinčias frakcijas (3.6 pav.).



3.6 pav. PAA gelio nuotrauka, atvaizduojanti tikslinių baltymų mėginių frakcijas po gryninimo per cezio chlorido tirpalų gradientą. Molekulinės masės žymuo - Unstained Protein Molecular Weight Ladder #26614. Rodyklėmis pažymėtos kelios ryškesnės tikslinio baltymo juostelės PAA gelio nuotraukoje. Skaičiais vaizduojama molekulinės masės žymens baltymo juostos masė kDa.

Atlikus tikslinių baltymų frakcijų po gryninimo per CsCl gradientą analizę, pastebėta, jog pašalinių baltymų nėra daug, tačiau tikslinių baltymų kiekis yra sąlyginai nedidelis (lyginant su įprastai gaunamais kiekiais iš tokio kiekio mielių biomasės gryninant į virusus panašias daleles). Nors frakcijų mėginiuose vis dar matyti nedaug pašalinių baltymų, tačiau dėl bendros baltymo išeigos sumažėjimo įtraukus dar vieną gryninimo stadiją, buvo nuspręsta gryninimo nebetęsti. Tad buvo atrinktos daugiausiai baltymo turinčios frakcijos, praskiestos DB150 buferiniu tirpalu ir centrifuguojamos per naktį 37000 rpm 4 °C, norint sukcentruoti tikslinius baltymus. Tuomet supernatantas nupilamas, nuosėdos tirpinamos minimaliame kiekyje PBS 1X buferinio tirpalo. Mėginiai išpilstomi po nedidelį tūrį ir laikomi -20 °C temperatūroje.

Toliau vykdomas PBS tirpale tirpintų baltymų koncentracijos nustatymas programa ImageJ pagal baltymų PAA gelio nuotrauką. Kalibracinei kreivei nubrėžti yra paruošiami skirtingos koncentracijos BSA tirpalai (0,0625 mg/ml, 0,0125 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,75 mg/ml). Baltymų elektroforezės gelyje leidžiami kiekvieno baltymo PBS tirpinti baltymų neskiesti mėginiai ir 2 kartus skiesti mėginiai (2.2.19) (3.7 pav.).



3.7 pav. PAA gelio nuotrauka, atvaizduojanti baltymų mėginius po gryninimo bei BSA skirtingos koncentracijos tirpalų mėginius, skirtus nustatyti tikslinių baltymų koncentracijas. 1X – neskiesti mėginiai, 2X – 2 kartus skiesti mėginiai. Molekulinės masės žymuo - Unstained Protein Molecular Weight Ladder #26614. Skaičiais vaizduojama molekulinės masės žymens baltymo juostos masė kDa. Rodykle pažymėti tiksliniai baltymai.

Baltymų nuotraukos analizuojamos programa ImageJ. Nustatomi baltymų juostelių ryškumo intensyvumai, kurie atvaizduojami kreivių plotu. Naudojant skirtingos koncentracijos BSA tirpalus, nubrėžta kalibracinė tiesė ($R^2 > 0,9$), pagal kurios lygtį apskaičiuojamos tikslinių baltymų koncentracijos. Nustatytos koncentracijos pateikiamos lentelėje 5.1. Gautas baltymų kiekis svyruoja nuo 0,128 iki 0,307 mg.

5.1 lentelė. Išgrynintų baltymų koncentracijos, nustatytos su programa ImageJ.

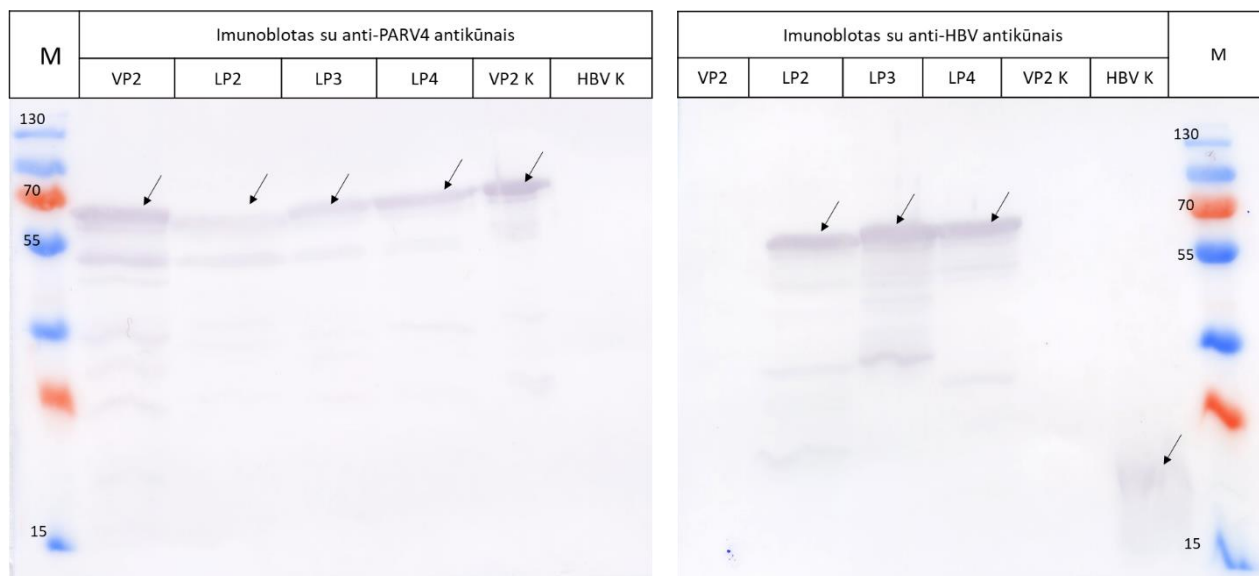
Koncentracijos (mg/ml)			
VP2	LP2	LP3	LP4
0,451	0,200	0,412	0,291

3.3 Mielėse susintetintų chimerinių VP2 baltymų antigeninių savybių analizė

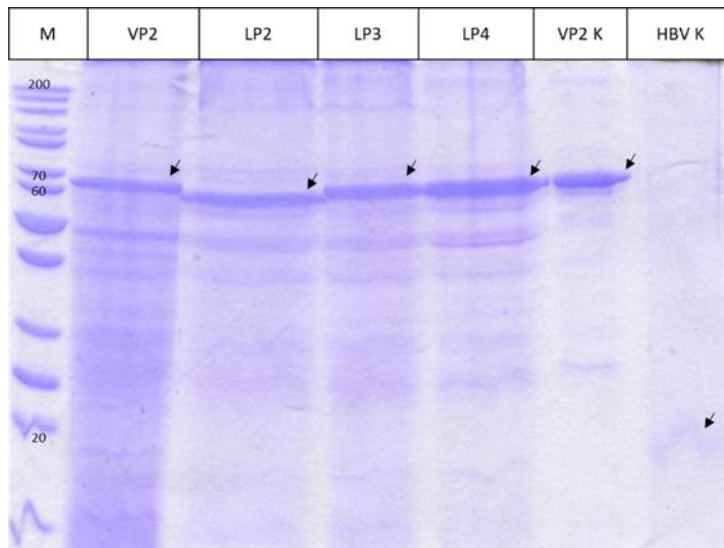
3.3.1 Imunobloto analizė nustatant linijinių epitopų reakciją su antikūnais nukreiptais prieš PARV4 VP2 ir HBsAg

Norint įvertinti mielėse susintetintų chimerinių VP2 baltymų, su kilpose įvesta HBsAg antigeno epitopo aminorūgščių seka, antigenines savybes, buvo atliktas imunoblotos. Į PAA gelio šulinėlį kiekvieno baltymo atveju yra įnešama po 3 µg baltymo (3.9 pav.) (2.2.17). Pusiau sauso pernešimo būdu baltymai pernešami ant PVDF membranos, kuri toliau blokuojama. Po blokavimo inkubuojama su pirminiais antikūnais, nukreiptais prieš PARV4 VP2 arba hibridomų terpe su antikūnais prieš HBsAg. Paskui membrana inkubuojama su antriniais antikūnais nukreiptais prieš pirminius ir konjuguotais su peroksidaze, kuriai pateikus substratą įvyksta reakcija ir atsiranda spalvos pokytis, kurį galima užfiksuoti vizualiai (2.2.20). Atlikus imunobloto analizę, įvertinta, jog visi mielėse susintetinti baltymai, tiek nepakeistas VP2 baltymas, tiek visi trys chimeriniai VP2 baltymai, reaguoja su polikloniniais antikūnais nukreiptais prieš PARV4 VP2 baltymą (3.8 pav.).

Hepatitis B viruso kapsidės baltymas, kuris buvo naudojamas, kaip neigiama kontrolė, su šiais antikūnais nereaguoja, o VP2 baltymas anksčiau sintetintas mielėse (parodyta, kad jis formuoja VLP, membranos ir gelio nuotraukoje pažymėtas VP2 K), reaguoja teigiamai.



3.8 pav. Imunobloto membranos nuotrauka po ryškinimo. VP2 K – VP2 baltymas, išgrynintas ankstesnių tyrimų metu, HBV K – hepatito B paviršiaus antigeno HBsAg kontrolinis baltymas, VP2, LP2, LP3, LP4 žymi tikslinius baltymus. M – molekulinės masės žymuo Prestained Protein Molecular Weight Ladder #26619. Skaičiais vaizduojama molekulinės masės žymens baltymo juostos masė kDa. Rodykle pažymėti reaguojantys baltymai.



3.9 pav. PAA gelio nuotrauka, vaizduojanti išgrynintų baltymų mėginius kartu su HBsAg ir VP2 kontrolėmis. VP2 K – VP2 baltymas, išgrynintas ankstesnių tyrimų metu, HBV K – hepatito B paviršiaus antigeno HBsAg kontrolinis baltymas, VP2, LP2, LP3, LP4 žymi tikslinius baltymus. M – molekulinės masės žymuo Unstained Protein Molecular Weight Ladder #26614. Skaičiais vaizduojama molekulinės masės žymens baltymo juostos masė kDa. Rodykle pažymėtos tikslinių baltymų ir kontrolinių baltymų juostelės.

Imunobloto membranos nuotraukos analizėje, vykdant inkubaciją su hibridomų terpe HB1, netaikytą prieš HBsAg, pastebima, jog antikūnai esantys hibridomų terpėje reaguoja tik su LP2, LP3, LP4 chimeriniais VP2 baltymais ir HBsAg kontroliniu baltymu HBV K. Šio darbo metu grynintas

VP2 baltymas ir VP2 baltymo kontrolė su hibridomų terpe nereaguoja. Šie rezultatai patvirtina, kad HBsAg epitopo seka yra sėkmingai įvesta į VP2 baltymų sekas, gaunant chimerinius baltymus. Abiejų imunoblotų membranų nuotraukose taip pat pastebimos papildomos juostelės, esančios žemiau tikslinių baltymų juostų. Kadangi jos taip pat reaguoja su polikloniniais antikūnais prieš VP2 bei hibridomų terpe prieš HBsAg, galima numanyti, jog šios juostelės yra dalis tikslinių baltymų, kurie yra degradavę.

3.3.2 Netiesioginė imunofermentinė analizė nustatant konformacinių epitopų reakciją su antikūnais nukreiptais prieš PARV4 VP2 ir HBsAg

Norint nustatyti konformacinių epitopų buvimą ir reakciją su antikūnais, nukreiptais prieš PARV4 VP2 ir HBsAg, vykdoma netiesioginė imunofermentinė analizė (2.2.22). F96 Polysorp NUNC-IMMUNO PLATE plokštelėje inkubuojami išgryninti chimeriniai baltymai Lp2, Lp3, Lp4, išgrynintas nepakeistas VP2 baltymas, VP2 baltymas, kuris žinoma, kad formuoja į virusus panašias daleles ir HBV kontrolinis baltymas. Antigenams, prikibusiems prie plokštelės dugno, pateikiami pirminiai antikūnai: polikloniniai antikūnai nukreipti prieš PARV4 VP2 arba hibridomų terpę nukreipta prieš HBsAg. Po inkubacijos su pirminiais antikūnais, kurie buvo susintetinti pelėse, naudojami antriniai antikūnai, nukreipti prieš pelių imunoglobulinus su sunkiąja γ grandine. Šie antriniai antikūnai konjuguoti su peroksidaze, kuriai pateikus substratą įvyksta spalvinis tirpalo pokytis, kurį galima užfiksuoti. Matuojamas optinis tankis šulinėliuose ties 450 nm bangos ilgiu lyginant su 620 nm. Atliekama kiekvienos reakcijos po du pakartojimus.

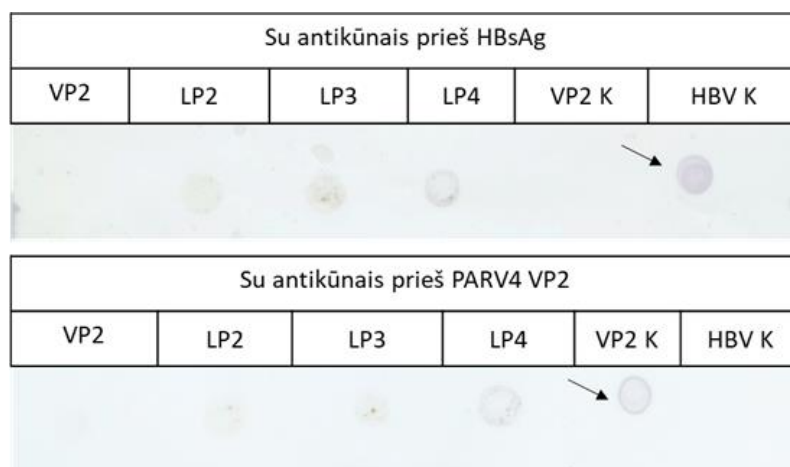
5.2 lentelė. Netiesioginės imunofermentinės analizės rezultatai. Nurodomas dviejų pakartojimų verčių vidurkis ($n = 2$). Optinis tankis matuojamas ties 450 nm bangos ilgiu lyginant su 620 nm bangos ilgiu. Naudojami antikūnai: polikloniniai antikūnai prieš PARV4 VP2 ir monokloniniai antikūnai prieš HBsAg.

Antigenas	OD ₄₅₀ vertės naudojant antikūnus prieš:	
	PARV4 VP2	HBsAg
VP2	0,108	0,051
LP2	0,118	0,088
LP3	0,108	0,092
LP4	0,068	0,100
VP2 K	0,393	0,030
HBsAg K	0,042	1,992
Na ₂ CO ₃ buf.	0,040	0,029
Milių lizatas	0,025	0,053

Įvertinus netiesioginės imunofermentinės analizės rezultatus, kurie pateikti 5.2 lentelėje, pastebima, jog polikloniniai antikūnai nukreipti prieš PARV4 VP2 reaguoja su kontroliniu VP2 baltymu (pažymėtas VP2 K), kuris žinoma, kad formuoja į virusus panašias daleles, vadinasi pasižymi erdviniais epitopais su kuriais reaguoja antikūnai. Tuo tarpu reakcija, kurią galima būtų laikyti teigiama, su išgrynintais baltymais nepastebima. Panaši situacija yra ir naudojant hibridomų terpę su antikūnais prieš HBsAg, kuomet teigiama vertė pastebima tik HBsAg kontrolėje (pažymėta HBsAg K), o teigiama reakcija su išgrynintais baltymais neužfiksuojama. Norint įvertinti, ar antikūnai specifiskai nereaguoja prieš mielėse susintetintus baltymus, buvo patikrinta antikūnų reakcija su *S. cerevisiae* AH22-214 kamieno mielių lizatu. Nustatyta, kad specifinės reakcijos nėra. Norint įvertinti “foninį triukšmą”, buvo atlikta antikūnų reakcija plokštelę inkubuojant su karbonatiniu buferiniu tirpalu (pažymėta Na₂CO₃ buf.). Reakcija neužfiksuota.

3.3.3 Taškinio imunobloto analizė su antikūnais nukreiptais prieš PARV4 VP2 ir HBsAg

Atlikus netiesioginę imunofermentinę analizę, nustatyta, kad tiksliniai baltymai nereaguoja su antikūnais nukreiptais prieš PARV4 VP2 ir HBsAg. Norint papildomai patikrinti prielaidą dėl erdvinų epitopų reakcijos su antikūnais nebuvimo, nuspręsta atlikti taškinį imunoblotę. Šis metodas nuo jau naudoto ir aprašyto 3.3.1 skyrelyje, skiriasi tuo, kad šiuo atveju yra naudojami natyvūs baltymai, t.y. nėra leidžiamas PAA gelis denatūruojančiomis sąlygomis. Baltymai lašelio pavidalu pateikiami ant nitroceliuliozinės membranos, membrana blokuojama, o toliau atliekama identiška imunoblotui reakcija: inkubacija su pirminiais antikūnais, su antriniais antikūnais bei membranos ryškinimas. Iš nuotraukų pateiktų 3.10 pav. matyti atsikartojantys netiesioginei imunofermentinei analizei rezultatai. Su antikūnais prieš PARV4 VP2 reaguoja tik VP2 K, o su hibridomų terpe prieš HBsAg reaguoja tik HbsAg K.

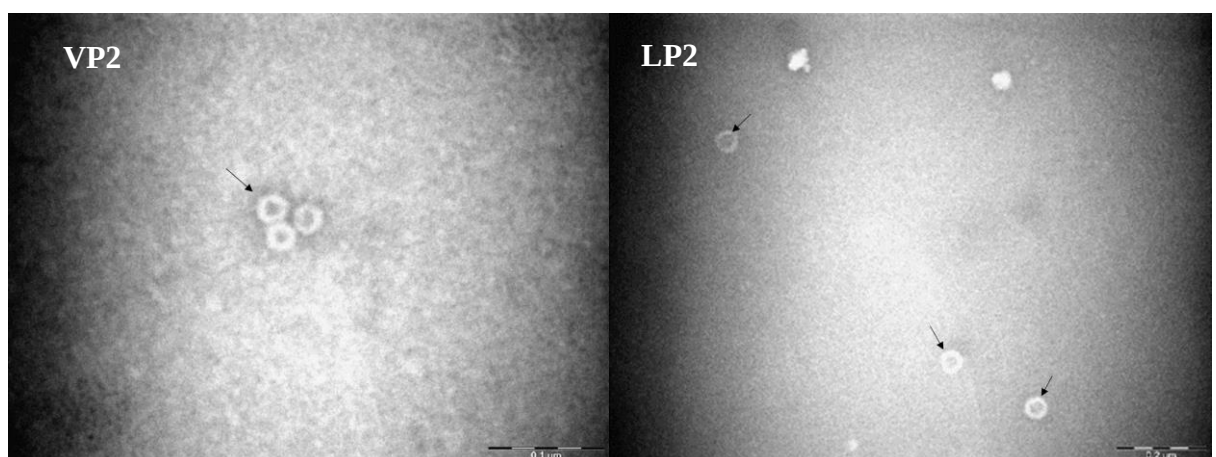


3.10 pav. Taškinio imunobloto membranos nuotrauka po ryškinimo. VP2 K – VP2 baltymas, išgrynintas ankstesnių tyrimų metu, HBV K – hepatito B paviršiaus antigeno HBsAg kontrolė. VP2, LP2, LP3, LP4 žymi tikslinius baltymus. Teigiama reakcija laikoma violetiniu taškeliu ant membranos paviršiaus (pažymėta rodykle). LP2, LP3 ir LP4 baltymų atveju pastebimi gelsvi taškeliai buvo matomi prieš ryškinimą. Greičiausiai jie yra dėl nuosėdų buvusių baltymo mėginyje.

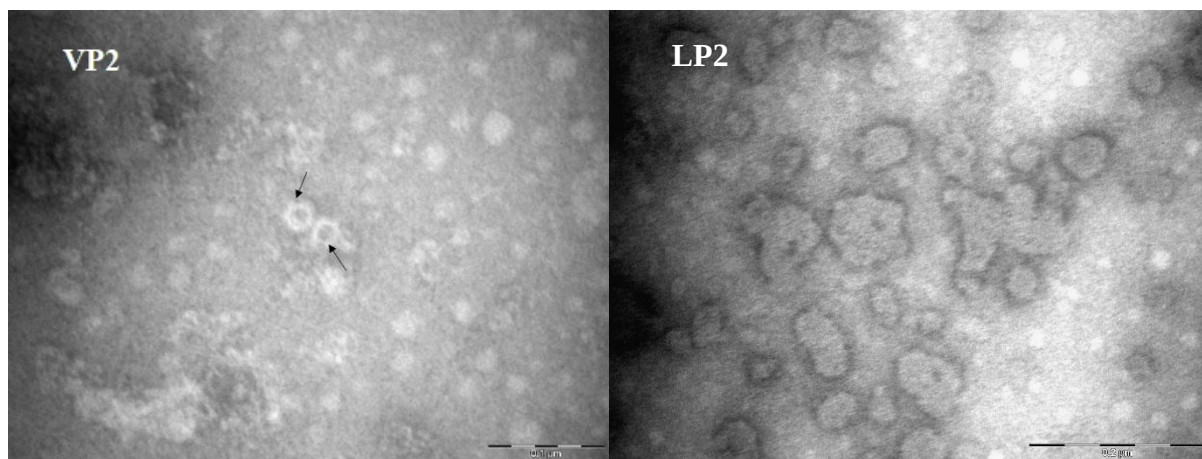
3.4 Į virusus panašių dalelių stebėjimas elektroniniu mikroskopu

Norint sukurti efektyvų svetimų epitopų nešiklį, jis turi išlaikyti savo natyvią stuktūrą – šiuo atveju svarbu, kad chimeriniai VP2 baltymai formuotų į virusus panašias daleles. Nustatyti ar tiksliniai baltymai formuoja daleles, pasinaudota transmisiniu elektroniniu mikroskopu (2.2.23).

Pirmiausia, tikslinių baltymų turinčios frakcijos po gryninimo CsCl gradientu stebėtos transmisiniu elektroniniu mikroskopu. Tiek nepakeisto VP2, tiek visų chimerinių VP2 baltymų atveju, matyti pavienės reikiamo dydžio, 23-25 nm, dalelės. 3.11 pav. pateiktos nepakeisto VP2 ir chimerinio Lp2 baltymų formuojamų dalelių nuotraukos. Tačiau dalelių kiekis yra nedidelis, aptinkamos tik pavienės į virusus panašios dalelės. Tad negalima tvirtai teigti, jog vyksta efektyvus savaiminis dalelių susirinkimas. Kaip jau buvo minėta anksčiau, tikslinių baltymų kiekis po gryninimo CsCl tirpalų gradientu buvo sąlyginai nedidelis, o tiriamų CsCl frakcijų tūris siekė 1-2 ml, tad galimai baltymas labai prasiskiedė, jo koncentracija mėginyje buvo nedidelė ir dėl šios priežasties matomos tik pavienės dalelės. Todėl buvo nuspręsta pažiūrėti jau sukonzentruotų tikslinių baltymų mėginius tirpintus PBS buferiniame tirpale, kuriuose baltymų koncentracija turėtų būti gerokai didesnė nei tirtose CsCl frakcijų mėginiuose. 3.12 pav. pavaizduotos nepakeisto VP2 ir chimerinio Lp2 baltymų elektroninės mikrografijos. Matyti pavienės reikiamo dydžio dalelės visų baltymų atveju, tačiau visuose mėginiuose dominuoja baltymų agregatai. Šie agregatai greičiausiai yra suirusios į virusus panašios dalelės, kadangi toks vaizdas nebuvo matomas CsCl frakcijų mėginiuose. Agregatai galėjo susidaryti dėl baltymų mėginio užšaldymo -20 °C temperatūroje PBS buferiniame tirpale. Taip pat svarbu paminėti, kad tiek CsCl frakcijų mėginiuose, tiek PBS mėginiuose matyti gerokai didesnės dalelės, apie 30-45 nm dydžio. Ar šios dalelės yra didesnės dalelės, formuojamos VP2 baltymo, ar natyvūs mielių virusai, nustatyti padėtų tolimesni tyrimai.



3.11 pav. PARV4 natyvaus VP2 ir chimerinio LP2 baltymų mėginių po gryninimo cezio chlorido gradientu elektroninė mikrografija. Rodyklėmis pažymėtos numanomos į virusus panašios dalelės.



3.12 pav. PARV4 natyvaus VP2 ir chimerinio LP2 baltymų mėginių po tirpinimo PBS buferiniame tirpale elektroninė mikrofotografija. Rodyklėmis pažymėtos numanomos į virusus panašios dalelės.

3.5 Rezultatų aptarimas

Ankstesniais tyrimais su PARV4 VP2, buvo parodyta, kad šis baltymas, susintetintas mielių *S. cerevisiae* raiškos sistemoje formuoja tipiškas ikosaedrinės struktūros, 25-28 nm skersmens į virusus panašias daleles. Imuniniais tyrimais su šiomis dalelėmis parodyta, jog pelėse yra iššaukiamas stiprus imuninis atsakas į tris šio dalelės formuojančio baltymo VP2 kilpų sritis (Lp2, Lp3 ir Lp4) (Tamošiūnas, 2017). Todėl šios baltymo sritys buvo pasirinktos kaip tolimesnių eksperimentų objektas, siekiant į šias kilpas įvesti HBsAg epitopo seką ir parodyti, ar chimeriniai VP2 baltymai geba formuoti VLP ir būti panaudojami kaip svetimo epitopo sekos nešikliai.

Sukonstravus mielių raiškos vektorius, turinčius chimerinio VP2 baltymo geno variantus su įterptomis HBsAg sekomis, buvo vykdoma *S. cerevisiae* mielių transformacija, po kurios mielių biomasė auginama, vykdoma tikslinio baltymo sintezės indukcija galaktoze ir galiausiai ląstelės suardomos mechanškai su stiklo rutuliukų ir ardymo buferinių tirpalų pagalba. Ląstelių lizatai gryninami skirtingo tankio tirpaluose ultracentrifuguojant. Visi chimeriniai VP2 baltymai, kartu su nepakeistu VP2 baltymu išgryninti. Atsižvelgiant į mažą tikslinių baltymų išeigą, toliau nuspręsta netęsti baltymų gryninimo nenorint dar labiau sumažinti bendro baltymų kiekio, nepaisant to, kad šiek tiek pašalinių baltymų visgi liko. Įvertinus gautų baltymų koncentracijas, pastebėta, jog bendras gautų baltymų kiekis yra santykinai mažas, lyginant su įprastais mielėse susintetintų į virusus panašių dalelių gryninimo metu gaunamais baltymų kiekiais. Baltymo išeigą galėjo lemti nepilnai optimizuotos mielių auginimo sąlygos, biomasės ardymo sąlygos bei pats biomasės sandėliavimas -20 °C temperatūroje prieš ląstelių ardymą.

Vykdamas išgrynintų baltymų imunobloto tyrimą, buvo nustatyta, kad šie baltymai reaguoja su antikūnais nukreiptais prieš PARV4 VP2, taip buvo patvirtinta, kad išgryninti tiksliniai baltymai turi linijinius VP2 būdingus epitopus. Tuo tarpu imunobloto analizė su hibridomų terpe HB1 prieš HBsAg patvirtino, kad trys chimeriniai VP2 baltymų variantai turi įterptą HBsAg epitopo seką, kuri yra atpažįstama antikūnų, nukreiptų prieš HBsAg linijinį epitopą.

Netiesioginės imunofermentinės analizės rezultatai parodė, jog hibridomų terpės antikūnai nukreipti prieš HBsAg nereaguoja su chimeriniais VP2 baltymais, turinčiais įvestą HBsAg epitopo seką. Imunobloto rezultatai patvirtino HBsAg linijinio epitopo buvimą baltymo sekoje (3.8 pav.), todėl netiesioginės imunofermentinės analizės metu reakcija greičiausiai nebuvo fiksuojama dėl pačių baltymų konformacijos pokyčių, ar į virusus panašių dalelių neformavimo, kurių metu HBsAg erdvinis epitopas nėra pateikiamas antikūnams. Išgrynintų chimerinių VP2 bei nepakeistų VP2 baltymų atveju taip pat nėra pastebima teigiama reakcija su antikūnais nukreiptais prieš PARV4 VP2 atliekant imunofermentinę analizę. Tad šie baltymai taip pat nepateikia erdvinio epitopų, su kuriais reaguotų antikūnai. Taškinio imunobloto rezultatai patvirtina netiesioginės imunofermentinės analizės rezultatus parodant, jog reaktyvūs yra tik kontroliniai baltymai, tuo tarpu chimeriniai VP2 bei nepakeistas VP2 baltymas su antikūnais nukreiptais prieš PARV4 VP2 bei HBsAg natyviomis sąlygomis nereaguoja (3.10 pav.). Tokie rezultatai parodo, jog išgryninti baltymai galimai neformuoja į virusus panašių dalelių arba šios dalelės kurio nors eksperimento etapo metu galėjo suirti dėl fizinio arba cheminio aplinkos poveikio. Taip galėjo nutikti dėl netinkamo biomasės ir pačių išgrynintų baltymų mėginių sandėliavimo $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje, po kurio analizuojant elektronines mikrografijas buvo pastebėti susidarę baltymų agregatai (3.12 pav.). Galimai dėl baltymų agregatų susidarymo buvo prarastos erdvinės antigeninės chimerinių VP2 bei nepakeisto VP2 baltymų savybės. Atsižvelgiant į tai, kad visų tikslinių baltymų elektroninėse mikrografijose buvo pastebimos pavienės reikiamo dydžio (25-28 nm) į virusus panašios dalelės, manoma, kad VP2 tiek nepakeistas, tiek chimeriniai šio baltymo variantai, savaime susirenka į virusus panašias daleles. Daroma prielaida, kad dėl netinkamo išgrynintų baltymų laikymo ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ PBS buferiniame tirpale), dalelės suiro. Todėl norint galutinai įvertinti ar į virusus panašios dalelės yra efektyviai formuojamos, reikalingi tolimesni tyrimai, gryninimo bei baltymų laikymo sąlygų optimizavimas. Taip pat norint pagerinti santykinai mažą tikslinių baltymų išeigą, reikėtų optimizuoti mielių auginimo ir/ar ardymo sąlygas.

4. IŠVADOS

1. Suliejimo PGR metodo strategija yra tinkama mielių raiškos vektorių, turinčių chimerinius PARV4 VP2 baltymo geno variantus su įterpta HBsAg epitopo seka imunogeniškų kilpų srityse, konstravimui.
2. Mielių *S. cerevisiae* raiškos sistema yra tinkama trijų chimerinių PARV4 VP2 baltymo variantų, su įterpta HBsAg epitopo seka imunogeniškų kilpų srityse, sintezei.
3. Ultracentrifugavimo CsCl tirpalų gradientu baltymų gryninimo metodas yra tinkamas tikslinių chimerinių baltymų gryninimui.
4. Chimeriniuose VP2 baltymuose su įterpta HBsAg epitopo seka imunogeniškų kilpų srityse dominuoja linijiniai epitopai.
5. Chimeriniai VP2 baltymai formuoja pavienes į virusus panašias daleles, tačiau savaiminiam dalelių susirinkimo efektyvumo pagerinimui reikalingas sąlygų optimizavimas.

SANTRAUKA

PARV4 viruso kapsidės baltymo VP2, kaip svetimų epitopų nešiklio, konstravimas

I virusus panašios dalelės dėl savo lanksčios modifikacijoms struktūros yra daug žadantis objektas vakcinų kūrimui, molekulių pernašai, ligų gydymui ir jų diagnostikai. Ankstesniais tyrimais parodyta, jog PARV4 VP2 yra baltymas, gebantis formuoti šias daleles bei turi tris imunogeniškas kilpas, kurias galima panaudoti svetimo epitopo eksponavimui.

Darbo metu sėkmingai sukurta *S. cerevisiae* mielių raiškos sistema, kurioje sintetinami chimeriniai VP2 baltymai, kurių imunogeniškų kilpų srityse įterpta HBsAg epitopo seka. Šie baltymai pasižymi linijiniais PARV4 VP2 bei HBsAg būdingais epitopais. Atlikus netiesioginę imunofermentinę analizę bei taškinį imunoblotą pastebėta, jog išgryninti baltymai nepasižymi erdvinėmis antigeninėmis savybėmis, dėl galimo į virusus panašių dalelių suirimo, kuriam įtaką galėjo padaryti netinkamas baltymų mėginių sandėliavimas. Elektroninėse mikrografijose visų tikslinių baltymų atveju pastebimos pavienės savaime susirenkančios reikiamo dydžio į virusus panašios dalelės, todėl norint įsitikinti, ar chimeriniai VP2 baltymai gali efektyviai formuoti šias daleles, reikalingi tolimesni tyrimai optimizuojant darbo sąlygas.

SUMMARY

Development of PARV4 Viral Capsid Protein VP2 as Foreign Epitope Carrier

Virus-like particles due to their flexible structures are promising objects in vaccine development, transfer of molecules, prevention and diagnostics of disease. Previous studies have shown that PARV4 VP2 protein is capable of forming such particles.

During this study a *S. cerevisiae* expression system for synthesis of chimeric VP2 proteins with inserted HBsAg epitope sequence was developed. Purified target proteins contain linear PARV4 VP2 and HBsAg epitopes. However, indirect Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay and dot-blot analysis have shown that target proteins do not contain conformational epitopes. This can be explained by the absence of virus-like particles in the solution which could have been caused by non-favourable storage conditions of purified proteins. In electron micrographs of each protein solution individual virus-like particles of proper size were detected. To determine if chimeric VP2 proteins can assemble into virus-like particles further investigation needs to be completed.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Agbandje-McKenna M, Kleinschmidt J. AAV capsid structure and cell interactions. *Methods Mol. Biol.* 2011.807.
2. Allison AB, Kohler DJ, Ortega A, Hoover EA, Grove DM, Holmes EC, et al. Host-Specific Parvovirus Evolution in Nature Is Recapitulated by In Vitro Adaptation to Different Carnivore Species. *PLoS Pathog.* 2014;
3. Anderson EA, Isaacman S, Peabody DS, Wang EY, Canary JW, Kirshenbaum K. Viral nanoparticles donning a paramagnetic coat: Conjugation of MRI contrast agents to the MS2 capsid. *Nano Lett.* 2006;
4. Bachmann MF, Zinkernagel RM. Neutralizing antiviral B cell responses. *Annu. Rev. Immunol.* 1997.15.
5. Bai M, Wang R, Sun S, Zhang Y, Dong H, Guo H. Development and validation of a competitive ELISA based on virus-like particles of serotype Senecavirus A to detect serum antibodies. *AMB Express.* 2021;
6. Baneyx F, Mujacic M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.* 2004.22(11).
7. Bär S, Rommelaere J, Nüesch JPF. Vesicular Transport of Progeny Parvovirus Particles through ER and Golgi Regulates Maturation and Cytolysis. *PLoS Pathog.* 2013;
8. Berns KI, Parrish CR. *Parvoviridae*. *Fields Virol.* Sixth Ed. 2013.1.
9. Canaan S, Zádori Z, Ghomashchi F, Bollinger J, Sadilek M, Moreau ME, et al. Interfacial Enzymology of Parvovirus Phospholipases A2. *J. Biol. Chem.* 2004;
10. Çelik E, Çalik P. Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnol. Adv.* 2012.30(5).
11. Cha-Aim K, Hoshida H, Fukunaga T, Akada R. Fusion PCR via novel overlap sequences. *Methods Mol. Biol.* 2012;
12. Chabeda A, van Zyl AR, Rybicki EP, Hitzeroth II. Substitution of human papillomavirus type 16 L2 neutralizing epitopes into L1 surface loops: The effect on virus-like particle assembly and immunogenicity. *Front. Plant Sci.* 2019;
13. Chang D, Cai X, Consigli RA. Characterization of the DNA binding properties of polyomavirus capsid protein. *J. Virol.* 1993;
14. Chroboczek J, Szurgot I, Szolajska E. Virus-like particles as vaccine. *Acta Biochim. Pol.* 2014.61(3).
15. Cornuz J, Zwahlen S, Jungi WF, Osterwalder J, Klingler K, van Melle G, et al. A vaccine against nicotine for smoking cessation: A randomized controlled trial. *PLoS One.* 2008;
16. Cotmore SF, Tattersall P. Genome Packaging Sense Is Controlled by the Efficiency of the Nick Site in the Right-End Replication Origin of Parvoviruses Minute Virus of Mice and LuIII. *J. Virol.* 2005;
17. Cotmore SF, Tattersall P. Parvovirus diversity and DNA damage responses. *Cold Spring Harb.*

- Perspect. Biol. 2013;
18. Cotmore SF, Tattersall P. Parvoviruses: Small does not mean simple. *Annu. Rev. Virol.* 2014;
 19. Cotmore SF TP. Parvoviruses. In *DNA Replication and Human Disease*. DePamphilis M, editor. New York: Cold Spring Harb. Lab. Press; 2006.
 20. Dickinson JR. Are yeasts free-living unicellular eukaryotes? *Lett. Appl. Microbiol.* 2005;
 21. Ding X, Liu D, Booth G, Gao W, Lu Y. Virus-Like Particle Engineering: From Rational Design to Versatile Applications. *Biotechnol. J.* 2018.13(5).
 22. Greiner VJ, Ronzon F, Larquet E, Desbat B, Estèves C, Bonvin J, et al. The structure of HBsAg particles is not modified upon their adsorption on aluminium hydroxide gel. *Vaccine.* 2012;
 23. Huang LY, Halder S, Agbandje-Mckenna M. Parvovirus glycan interactions. *Curr. Opin. Virol.* 2014.7(1).
 24. Ilyas M, Mietzsch M, Kailasan S, Väisänen E, Luo M, Chipman P, et al. Atomic resolution structures of human bufaviruses determined by cryo-electron microscopy. *Viruses.* 2018;
 25. Jennings GT, Bachmann MF. The coming of age of virus-like particle vaccines. *Biol. Chem.* 2008.
 26. Jones MS, Kapoor A, Lukashov V V., Simmonds P, Hecht F, Delwart E. New DNA Viruses Identified in Patients with Acute Viral Infection Syndrome. *J. Virol.* 2005;
 27. Khudyakov YE, Fields HA. Artificial DNA: Methods and Applications. 2003;
 28. Kim HJ, Kim HJ. Yeast as an expression system for producing virus-like particles: what factors do we need to consider? *Lett. Appl. Microbiol.* 2017.64(2).
 29. Kondo K. Development of an HPV vaccine--remaining issues and perspective. *Nippon rinsho. Japanese J. Clin. Med.* 2009.67(1).
 30. Lei X, Cai X, Yang Y. Genetic engineering strategies for construction of multivalent chimeric VLPs vaccines. *Expert Rev. Vaccines.* 2020.
 31. Li Z, Song S, He M, Wang D, Shi J, Liu X, et al. Rational design of a triple-type human papillomavirus vaccine by compromising viral-type specificity. *Nat. Commun.* 2018;
 32. Lombardo E, Ramírez JC, Agbandje-McKenna M, Almendral JM. A Beta-Stranded Motif Drives Capsid Protein Oligomers of the Parvovirus Minute Virus of Mice into the Nucleus for Viral Assembly. *J. Virol.* 2000;
 33. Lou S, Xu B, Huang Q, Zhi N, Cheng F, Wong S, et al. Molecular characterization of the newly identified human parvovirus 4 in the family Parvoviridae. *Virology.* 2012;
 34. Maroto B, Valle N, Saffrich R, Almendral JM. Nuclear Export of the Nonenveloped Parvovirus Virion Is Directed by an Unordered Protein Signal Exposed on the Capsid Surface. *J. Virol.* 2004;
 35. Mattanovich D, Branduardi P, Dato L, Gasser B, Sauer M, Porro D. Recombinant protein production in yeasts. *Methods Mol. Biol.* 2012;
 36. Matthews PC, Malik A, Simmons R, Sharp C, Simmonds P, Klennerman P. PARV4: An Emerging

- Tetraparvovirus. PLoS Pathog. 2014;
37. Maurer P, Jennings GT, Willers J, Rohner F, Lindman Y, Roubicek K, et al. A therapeutic vaccine for nicotine dependence: Preclinical efficacy, and phase I safety and immunogenicity. *Eur. J. Immunol.* 2005;
 38. Meng G, Zhang X, Plevka P, Yu Q, Tijssen P, Rossmann MG. The Structure and Host Entry of an Invertebrate Parvovirus. *J. Virol.* 2013;
 39. Mietzsch M, Péntzes JJ, Agbandje-Mckenna M. Twenty-five years of structural parvovirology. *Viruses.* 2019;
 40. Mohsen MO, Zha L, Cabral-Miranda G, Bachmann MF. Major findings and recent advances in virus-like particle (VLP)-based vaccines. *Semin. Immunol.* 2017.
 41. Parrish C, Cotmore S, Tattersall P. Structure and organization of the viral genome. *Parvoviruses.* 2005.
 42. Partow S, Siewers V, Bjørn S, Nielsen J, Maury J. Characterization of different promoters for designing a new expression vector in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 2010;
 43. Pillay S, Zou W, Cheng F, Puschnik AS, Meyer NL, Ganaie SS, et al. Adeno-associated Virus (AAV) Serotypes Have Distinctive Interactions with Domains of the Cellular AAV Receptor. *J. Virol.* 2017;
 44. Prakash S, Shukla S, Ramakrishna V, Mishra H, Bhagat AK, Jain A. Human Parvovirus 4: A harmless bystander or a pathogen of severe acute respiratory illness. *Int. J. Infect. Dis.* 2020;
 45. Pumpens P, Grens E. HBV core particles as a carrier for B cell/T cell epitopes. *Intervirology.* 2001;
 46. Pushko P, Pumpens P, Grens E. Development of virus-like particle technology from small highly symmetric to large complex virus-like particle structures. *Intervirology.* 2013;56(3).
 47. Qiu J, Söderlund-Venermo M, Young NS. Human parvoviruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 2017.
 48. Ricks KM, Shoemaker CJ, Dupuy LC, Flusin O, Voorhees MA, Fulmer AN, et al. Development of a bead-based immunoassay using virus-like particles for detection of alphaviral humoral response. *J. Virol. Methods.* 2019;
 49. Rioloobos L, Reguera J, Mateu MG, Almendral JM. Nuclear transport of trimeric assembly intermediates exerts a morphogenetic control on the icosahedral parvovirus capsid. *J. Mol. Biol.* 2006;
 50. Rohovie MJ, Nagasawa M, Swartz JR. Virus-like particles: Next-generation nanoparticles for targeted therapeutic delivery. *Bioeng. Transl. Med.* 2017;
 51. Roldão A, Mellado MCM, Castilho LR, Carrondo MJT, Alves PM. Virus-like particles in vaccine development. *Expert Rev. Vaccines.* 2010;9(10).
 52. Shirbaghaee Z, Bolhassani A. Different applications of virus-like particles in biology and medicine: Vaccination and delivery systems. *Biopolymers.* 2016.
 53. Simmons R, Sharp C, McClure CP, Rohrbach J, Kovari H, Frangou E, et al. Parvovirus 4 infection and clinical outcome in high-risk populations. *J. Infect. Dis.* 2012;

54. Slilaty SN, Aposhian HV. Gene transfer by polyoma-like particles assembled in a cell-free system. *Science* (80-.). 1983;
55. Sonntag F, Bleker S, Leuchs B, Fischer R, Kleinschmidt JA. Adeno-Associated Virus Type 2 Capsids with Externalized VP1/VP2 Trafficking Domains Are Generated prior to Passage through the Cytoplasm and Are Maintained until Uncoating Occurs in the Nucleus. *J. Virol.* 2006;
56. Spitzer AL, Parrish CR, Maxwell IH. Tropic determinant for canine parvovirus and feline panleukopenia virus functions through the capsid protein VP2. *J. Gen. Virol.* 1997;
57. Tamošiūnas PL. Yeast-Generated Parvoviral Virus-like Particles and Their Use in Diagnosis, 2017;
58. Tamošiūnas PL, Simutis K, Kodze I, Firantiene R, Emužyte R, Petraityte-Burneikiene R, et al. Production of human parvovirus 4 VP2 virus-like particles in yeast and their evaluation as an antigen for detection of virus-specific antibodies in human serum. *Intervirology.* 2013;
59. Tattersall P, Ward DC. Rolling hairpin model for replication of parvovirus and linear chromosomal DNA. *Nature.* 1976;
60. Tu M, Liu F, Chen S, Wang M, Cheng A. Role of capsid proteins in parvoviruses infection. *Virol. J.* 2015.12(1).
61. Voronkova T, Kazaks A, Ose V, Özel M, Scherneck S, Pumpens P, et al. Hamster polyomavirus-derived virus-like particles are able to transfer in vitro encapsidated plasmid DNA to mammalian cells. *Virus Genes.* 2007;
62. Wang JW, Roden RBS. Virus-like particles for the prevention of human papillomavirus-associated malignancies. *Expert Rev. Vaccines.* 2013.12(2).
63. Wei M, Wang D, Li Z, Song S, Kong X, Mo X, et al. N-terminal truncations on L1 proteins of human papillomaviruses promote their soluble expression in *Escherichia coli* and self-assembly in vitro. *Emerg. Microbes Infect.* 2018;
64. Yu X, Zhang J, Hong L, Wang J, Yuan Z, Zhang X, et al. High prevalence of human parvovirus 4 infection in HBV and HCV infected individuals in Shanghai. *PLoS One.* 2012;
65. Zádori Z, Szelei J, Tijssen P. SAT: a Late NS Protein of Porcine Parvovirus. *J. Virol.* 2005;
66. Zhao RY. Yeast for virus research. *Microb. Cell.* 2017.4(10).