

VILNIAUS UNIVERSITETAS

PAULIUS L. TAMOŠIŪNAS

**PARVOVIRUSŲ Į VIRUSUS PANAŠIŲ DALELIŲ SINTEZĖ MIELĖSE
IR JŲ PANAUDOJIMAS DIAGNOSTIKOJE**

Daktaro disertacijos santrauka

Fiziniai mokslai, biochemija (04 P)

Vilnius, 2017 metai

Disertacija rengta 2010-2014 m. Vilniaus universitete.

Disertacija ginama eksternu.

Mokslinis konsultantas – prof. habil. dr. Kęstutis Sasnauskas (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija – 04 P).

Disertacija ginama Vilniaus universiteto Biochemijos mokslo krypties taryboje:
Pirmininkas - prof. habil. dr. Rimantas Daugelavičius (Vytauto Didžiojo universitetas, fiziniai mokslai, biochemija – 04 P).

Nariai:

dr. Arvydas Kanopka (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija – 04P);
dr. Laura Kalinienė (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija – 04P);
dr. Evaldas Čiplys (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija – 04P);
prof. habil. dr. Paul Pumpens (Latvijos universitetas, fiziniai mokslai, biochemija – 04P).

Disertacija bus ginama viešame Biochemijos mokslo krypties tarybos posėdyje
2017 m. gegužės 31 d., 13:00, VU Gyvybės mokslų centro R-401 auditorijoje.

Adresas: Saulėtekio al. 7, LT-10222 Vilnius, Lietuva.

Disertacijos santrauka išsiuntinėta 2017 m. balandžio 28 d.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje ir VU interneto svetainėje
adresu: www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

VILNIUS UNIVERSITY

PAULIUS LUKAS TAMOŠIŪNAS

**YEAST-GENERATED PARVOVIRAL VIRUS-LIKE PARTICLES
AND THEIR USE IN DIAGNOSTICS**

Summary of doctoral dissertation

Physical sciences, biochemistry (04 P)

Vilnius, 2017

The work presented in this doctoral dissertation was carried out at the Institute of Biotechnology, Vilnius University in 2010-2014.

Dissertation is defended extramurally.

Scientific supervisor – Prof. Dr. habil. Kęstutis Sasnauskas (Vilnius University, physical sciences, biochemistry - 04 P).

Dissertation will be defended at the Council of Biochemistry of Vilnius University:

Chairman:

Prof. Dr. habil. Rimantas Daugelavičius (Vytautas Magnus University, physical sciences, biochemistry – 04 P).

Members:

Dr. Arvydas Kanopka (Vilnius University, physical sciences, biochemistry – 04 P);

Dr. Laura Kalinienė (Vilnius University, physical sciences, biochemistry – 04 P);

Dr. Evaldas Čiplys (Vilnius University, physical sciences, biochemistry – 04 P);

Prof. Dr. habil. Paul Pumpens (Latvian University, physical sciences, biochemistry – 04 P).

Dissertation will be defended in the public session on 31 May, 2017, 13:00, at Vilnius University Life Sciences Centre, R-401 auditorium.

Summary of the dissertation was distributed on 28 April, 2017.

The dissertation can be reviewed at the library of Vilnius University.

TURINYS	
SANTRUMPOS	6
ĮVADAS	7
1. Tyrimų metodika	10
2. Rezultatai ir jų aptarimas	15
2.1. Parvovirusų kapsidę formuojančių baltymų sintezė mielėse <i>S. cerevisiae</i>	15
2.1.1. Parvovirusinių baltymų raiškos mielėse vektorių konstravimas	15
2.1.2. PARV4 VP2 sintezė mielėse	16
2.1.3. HBoV1-4 VP2 sintezė mielėse	17
2.1.4. Kiaulių parvoviruso VP2 sintezė mielėse.....	19
2.1.5. Nepagrindinio kapsidę formuojančio virusų HBoV1 ir PARV4 baltymo VP1 sintezė mielėse.	20
2.1.6. Mozaikinių (VP1-VP2) HBoV1 ir PARV4 į virusus panašių dalelių sintezė	21
2.2. Rekombinantinių parvovirusų VP baltymų antigeninių savybių tyrimas	24
2.2.1. PARV4 VP2 VLP reaktyvumo su mažos rizikos žmonių serumais tyrimas.....	24
2.2.2. PARV4 VP2 baltymo B ląstelių linijinių epitopų nustatymas	25
2.2.3. Antigeninių HBoV1-4 VP2 baltymų savybių tyrimas.....	27
2.2.4. Rekombinantinių HBoV VLP reaktyvumo su žmonių serumais tyrimas	29
2.2.5. Mielėse susintetintų kiaulių parvoviruso VP2 VLP antigeninių savybių tyrimas	30
2.2.6. Monokloninių antikūnų prieš PPV gavimas ir jų savybių tyrimas.....	30
2.2.7. Mozaikinių parvovirusinių VP1-VP2 VLP savybių tyrimas	31
IŠVADOS	33
MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS	34
CURRICULUM VITAE.....	35
PADĖKA	36
SUMMARY	37
LITERATŪRAS SĄRAŠAS	39

SANTRUMPOS

ar.	- aminorūgštis
bp	- bazių pora
CAI	- angl. <i>codon adaptation index</i> , kodonų adaptacijos indeksas
EDTA	- etilendiamino tetraacto rūgštis
EIA	- angl. <i>enzyme immunoassay</i> , fermentinė imunoanalizė
HBoV	- žmogaus bokavirusas/-ai
HRP	- angl. <i>horse-radish peroxydase</i> , krienų peroksidazė
IgG	- G klasės imunoglobulinas
IgG+	- IgG seroteigiami
IgM	- M klasės imunoglobulinas
kDa	- kilodaltonas
MAB	- monokloninis antikūnas/-ai
mVPD	- mozaikinės į virusus panašios dalelės
NDS-PAGE	- denatūruojanti elektroforezė poliakrilamido geliyje su natrio dodecilsulfatu
nt	- nukleotidas/-ai
OD	- optinis tankis
PARV4	- žmogaus parvovirusas 4
PEG	- polietilenglikolis
PGR	- polimerazinė grandininė reakcija
PLA2	- fosfolipazė A2
PPV	- angl. <i>porcine parvovirus</i> , kiaulių parvovirusas
Tris	- tris(hidroksimetil)aminometanas
VP	- angl. <i>virus protein</i> , kapsidę formuojantis baltymas (konkrečiai VP1 arba VP2)
VPD	- į virusus panašios dalelės
WB	- angl. <i>Western blot</i> , imunoblotas

IVADAS

Parvovirusai yra vieni mažiausių žinomų gyvūnus infekuojančių virusų. Jie 18-27 nm skersmens ikosaedrinėje kapsidėje supakuoja 4-6 kb viengrandinį DNR genomą. Visų parvovirusų genomai organizuoti į du pagrindinius atvirojo skaitymo rėmelius: nestruktūriniai baltymai koduojami geno 5' gale, o kapsidę formuojantys struktūriniai baltymai koduojami 3' geno gale. Parvovirusų kapsidę sudaro 60 dviejų ar daugiau tipų struktūrinių baltymų subvienetų. Visi struktūriniai baltymai turi tą pačią C-galinę dalį, o mažiausios molekulinės masės baltymų natyviose kapsidėse aptinkama daugiausiai (Berns ir Parrish, 2007).

Parvovirusai infekuoja tiek stuburinius, tiek bestuburius gyvūnus. Kai kurie stuburinių parvovirusai, kaip šunų ir kiaulių parvovirusai, yra ypatingai pavojingi jaunikliams, nes iki 91 % negydomų atvejų baigiasi mirtimi. Iki 2005 m. parvovirusas B19 buvo žinomas kaip vienintelis žmonėms patogeniškas parvovirusas, sukeliantis bėrimais pasižyminčią infekcinę eritemą, tačiau nėščiosioms ši infekcija gali baigtis ir persileidimu. Per pastarąjį dešimtmetį, pritaikius didelio našumo sekoskaitos metodus, buvo nustatyti keli nauji žmones infekuojantys virusai. Žmogaus bokavirusas 1 buvo aptiktas jungtiniuose vaikų nosiaryklės mėginiuose (Allander et al., 2005), tačiau netrukus šis virusas buvo pradėtas aptikti dideliu dažniu visame pasaulyje. Netrukus trys papildomi žmogaus bokavirusai (HBoV2-4) buvo aptikti žarnyno sutrikimų turinčių vaikų išmatose (Kapoor et al., 2009; Arthur et al., 2009; Kapoor et al., 2010). Vėlesni tyrimai atskleidė, kad su bokavirusų infekcija iki 5 metų amžiaus skirtingose šalyse susiduria 70-100 % vaikų (Kantola et al., 2011; Hao et al., 2015). Žmogaus parvovirusas 4 (PARV4) buvo aptiktas intraveninių narkotikų vartotojo kraujo plazmoje (Jones et al., 2005) ir šio viruso infekcijos ilgą laiką buvo siejamas su padidintos rizikos asmenimis. Iki šiol nėra detalių tyrimų rezultatų apie šių naujų žmogaus parvovirusų sukeltas ligas, tačiau pastaruoju metu gausėja duomenų apie HBoV ir PARV4 infekcijas encefalitu ir encefalopatija sergančių vaikų atvejais (Chen et al., 2011; Benjamin et al., 2011), todėl neatmetamas šių virusų vaidmuo uždegiminių neurologinių ligų vystymesi. Išsamesniems šių virusų tyrimams reikalingi virusų antigenai, vertingi tiek virusų struktūriniais, tiek paplitimo tyrimams.

Gyvūnų virusai natūraliai replikuojasi žinduolių ląstelių kultūrose, tačiau tokių virusinių antigenų gamyba yra neefektyvi dėl mažų išeigų ir didelių kaštų. Mielinių ląstelės yra patogios tuo, kad jų kultivavimui nereikia sudėtingos įrangos, o šiose ląstelėse sintetinami rekombinantiniai baltymai gali būti modifikuoti beveik visomis žinduoliams būdingomis potransliacinėmis modifikacijomis. Mielėse susintetinti virusiniai antigenai jau anksčiau buvo sėkmingai pritaikyti kuriant jautrias *Paramyxoviridae* (Warrerner et al., 2010), *Bunyaviridae* (Petraityte et al., 2008) ir kitų virusų šeimų atstovų diagnostikos sistemas.

Darbo tikslas:

Ištirti mielių *S. cerevisiae* raiškos sistemos tinkamumą sintetinti rekombinantinių *Parvoviridae* šeimos virusų struktūrinius baltymus ir pritaikyti juos serologinei diagnostikai.

Darbo uždaviniai:

1. Mielėse *S. cerevisiae* susintetinti žmogaus parvoviruso 4, žmogaus bokavirusų 1-4 ir kiaulių parvoviruso kapsides formuojančius baltymus, juos išgryninti ir įvertinti jų imunogenines savybes.
2. Panaudojant rekombinantinius antigenus sukurti ir įvertinti serologinius diagnostikos testus, skirtus kraujo serumuose aptikti žmogaus parvovirusui 4, žmogaus bokavirusams 1-4 ir kiaulių parvovirusui specifinius antikūnus.
3. Įvertinti žmogaus parvoviruso 4 ir žmogaus bokavirusų 1-4 paplitimą Lietuvoje.

Mokslinis naujumas

Greiti virusinių infekcijų diagnostikos metodai remiasi PGR metodo variacijomis padauginto viruso genomo arba infekuoto organizmo imuninio atsako nustatymu. Pastarasis metodas gali suteikti papildomos informacijos apie jau praėjusias infekcijas ir gali būti pritaikytas supaprastinto naudojimo diagnostinių testų kūrimui. Tokiems testams atlikti nereikalingas specialiai paruoštas personalas ar brangi įranga, todėl itin svarbūs virusinių infekcijų valdymui mažai išsivysčiusiose valstybėse. Šiame darbe mielėse susintetinti žmonių parvovirusų (PARV4 ir HBoV1-4) kapsidę formuojantys baltymai yra labai imunogeniški ir tinkami taikymui serologiniuose testuose. Šie rezultatai atveria galimybę greitai ir ekonomiškai paruošti antigenus ateityje atsirasiančių parvovirusinių infekcijų tyrimams. 2013-2016 m. buvo atrasti keli nauji naminius gyvulius ar žmones infekuojantys *Parvoviridae* šeimai priskiriami virusai (kiaulių ir karvių hokovirusai, kiaulių parvovirusas 6 (Schirtzinger *et al.*, 2015), žmogaus bufavirusai ir tusavirusai (Väisänen *et al.*, 2016)). Todėl šiame darbe išbandytas modelis gali būti pritaikytas ir šių naujų virusų tyrimams.

Žmogaus parvoviruso 4 ir bokavirusų 1-4 serologiniai tyrimai Lietuvoje buvo atlikti pirmą kartą. Labai didelė (91,6 %) nustatyta HBoV seroteigiamų asmenų dalis įrodo, kad šie virusai yra gausiai paplitę šalyje. Tiriant PARV4 specifinių antikūnų buvimą nepadidintos rizikos Lietuvos pacientų grupėje buvo nustatytas iki šiol didžiausias Europoje dokumentuotas PARV4 paplitimo dažnis (9,4 %). Šie rezultatai pagrindė kylančias dvejones dėl iki šiol postuluoto šio viruso plitimo tik per kūno skysčius, be to atkreipė dėmesį, kad PARV4 infekcijos yra aktualios ne tik padidintos rizikos individams.

Mūsų žiniomis, rekombinantinės mozaikinės iš parvovirusų VP1 ir VP2 baltymų sudarytos dalelės mielėse buvo susintetintos pirmą kartą. Tokios mVPD buvo parodytos esant tinkamomis padidinti serologinių testų jautrumą.

Efektyvių virusinių baltymų sintezės sistemų kūrimas turi ir praktinę-ekonominę reikšmę. Kiaulių parvoviruso infekcijos turi ženklią ekonominę žalą gyvulininkystės ūkiuose, todėl mūsų sukurta imunogeniškų PPV VP2 antigenų sintezės sistema gali būti potencialia alternatyva šiuo metu naudojamoms inaktyvuotų virusų vakcinoms.

Ginamieji teiginiai:

1. Mielėse susintetinti PARV4, PPV ir HBoV1-4 struktūriniai VP2 baltymai suformuoja stabilias imunogeniškas į virusus panašias daleles, kurios sukelia specifinį imuninį atsaką pelėse ir šios VPD yra tinkamos diagnostinių testų kūrimui.
2. Sintetinant mielėse PARV4 ir HBoV1 nepagrindinį struktūrinį baltymą VP1 kartu su VP2 baltymu gaunamos antigeniškos mozaikinės į virusus panašios dalelės.
3. Žmogaus parvovirusas 4 yra paplitęs tarp žemos rizikos pacientų Lietuvoje, tai suponuoja alternatyvius, ne vien per organizmo skysčius, šio viruso perdavimo kelius.
4. Žmogaus bokavirusai 1-4 yra plačiai paplitę Lietuvoje.
5. Mielėse susintetintas kiaulių parvoviruso VP2 formuojamos VPD yra tinkamas antigenas PPV-specifinių antikūnų nustatymui kiaulių serumuose.
6. Pagrindinės žmogaus parvoviruso 4 VP2 baltymo B ląstelių linijiniai epitopai lokalizuoti EF, HI ir C-galinėje kilpose.

1. TYRIMŲ METODIKA

Reagentai, fermentai. Visi naudoti reagentai buvo aukščiausio grynumo laipsnio. Fermentai: restrikcijos endonukleazės, DNR polimerazės, FastAP šarminė fosfatazė, T4 DNR ligazė, RNAzė A bei DNR ir baltymų masės standartai, nukleotidų mišiniai, elektroforezės buferiniai tirpalai buvo įsigyti iš ThermoFisher Scientific Baltics (Lietuva). Mitybinių terpių komponentai įsigyti iš Sigma Aldrich (Vokietija), Applichem (Vokietija) ir Carl Roth GmbH (Vokietija).

Molekulinės biologijos rinkiniai. Phusion Site-Directed Mutagenesis Kit, GeneJET Gel Extraction and GeneJET Miniprep Plasmid Kit, agarose, GeneJET Viral DNA/RNA Purification Kit rinkiniai buvo įsigyti iš ThermoFisher Scientific Baltics (Lietuva) ir naudoti pagal gamintojo rekomendacijas.

Kraujo serumų mėginiai. Ūmiomis kvėpavimo takų ligomis sergančių mažos pacientų kraujo serumai (n=170) buvo surinkti Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Vaikų ligų klinikose 2008-2011 m. vadovaujantis Lietuvos Bioetikos Komiteto leidimu (Nr. 53, 2008-09-03). Kiaulių serumų mėginiai surinkti iš kiaulių ūkių Lietuvoje (n=160), Rumunijoje (n=14) ir Ukrainoje (n=13) vadovaujant dr. V. Sereikai ir dr. R. Lelešiui (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas) 2008-2010 m.

Ląstelės. Klonavimui naudoti bakterijų *E. coli* DH5 α F' (F⁻gyrA96(NaI^r) *recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*(r_k⁻m_k⁺) *glnV44 deoR* Δ (*lacZYA-argF*) U169 [ϕ 80*dlacZ* Δ M15]) (ThermoFisher Scientific Baltics) arba GM119 (F⁻ *dam-3 dcm-6 lacY1 galK2 galT22 tonA31 tsx-78 supE44 mtl-1*(*thi-1*)) (ATCCTM 53339) kamienai. Rekombinantinių baltymų sintezei naudoti bakterijų *E. coli* kamienas BL21(DE3) (F⁻ *ompT gal dcm lon hsdSB* (rB- mB-) λ (DE3 [*lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5*])) ir mielių *Saccharomyces cerevisiae* kamienai AH22-214 (*MATa leu2-3 leu2-112 his4-519 can1 [KIL-o]*)(ATCCTM 38626), 214 Δ *pep4* (*a ura3 leu2 his3* Δ *pep4*), FH4 (a/ α) (ATCCTM 42368) and *gcn2* (ATCCTM4033642).

Plazmidės. Raiškai mielėse naudoti pFX7, pFGG3 ir pFX7-His6N mielių raiškos vektoriai (Razanskiene *et al.*, 2004; Sasnauskas *et al.*, 1999). Raiškai bakterijose naudotas pET-43.1a(+) vektorius (Novagen, Madison, WI, JAV). Chemiškai susintetinti HBoV1-4 ir PARV4 VP1 bei VP2 genai buvo gauti pUC57 vektoriuje (GenScript, Piscataway, NJ, JAV).

Oligonukleotidai ir peptidai. Darbe naudoti oligonukleotidai įsigyti iš IDT (Miunchenas, Vokietija) arba MWG-Biotech AG (Ebersbergas, Vokietija). PARV4 VP2 epitopų nustatymui buvo naudoti sintetiniai peptidai iš Pepscan Presto BV (Nyderlandai). Oligonukleotidų ir peptidų sekos pateiktos 1.1 lentelėje.

1.1 lentelė. Darbe naudotų oligonukleotidų ir peptidų sekos.

<i>Genų padauginimui ir kolonijų atrankai naudoti pradmenys:</i>		
Oligonukleotidai	Seka (nuo 5' į 3')	Papildoma informacija
PPV-vp2-F	TCTACTAGTACAATGAGTGAAAATGTGGAACAA	PPV VP2 geno
PPV-vp2-R	GAGACTAGTCTAGTATAATTTTCTTGGTATAAGT	padauginimui
P4_FW2	GCACCTAGGACAATGTAGTAGTTGGCAATGC	PARV4 VP2 geno
P4_RV	CGACCTAGGTTATAGCAAATGAGAATAATTTTCGCG	padauginimui
hp4_FW1	GCACCTAGGACAATGTCTGCTGCTGATGC	PARV4 VP1 geno
		padauginimui
HBoV1_VP2F	GGATCTAGAACAATGTCTGACACTGACATTCAAGA C	HBoV1 VP2 geno
HBoV1_VP2R	CTTTCTAGATTACAACACTTTATTGATGTTTGTTTTT AC	padauginimui
BocDir1	GCATCTAGAACAATGCCTCCAATTAAGAGACAGCC T	HBoV1 VP1 geno
		padauginimui
N101Y_F	ACTTCAACTTCTACCAATACTCTTCAC	N101Y mutacijos
N101Y_R	ATGACCATGGAGTAGAAACACATC	HBoV3 VP2 sukūrimui
PYK5	TATTCATTCTTTTTCATCCTTTGG	Kolonijų atrankai
PGK3	TCCTTACCTCCAATAATTCCAAC	(pradmenys yra
GAL7P	ATTATGCAGAGCATCAACATG	specifiniai pFX7 ir
GAL7T	GTCTTTGTAGATAATGAATCTG	pFGG3 plasmidėms).
T7 TER	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	Kolonijų su pET43(a)+
T7 PRO	TAATACGACTCACTATAGG	atrankai
<i>Oligonukleotidai naudoti PARV4 VP2 epitopų paieškai:</i>		
Oligonukleotidai	Seka (nuo 5' į 3')	
121-135F	AATTCGTTTCTGATTCTGCAAGTGGTGGGATTACTGTATTTGCTGATGATG	
121-135R	TCGACATCATCAGCAAATACAGTAATCCCACCACTTGCAGAATCAGAAACG	
128-142F	AATTCGGGATTACTGTATTTGCTGATGATAGCTATGACTATCCATATGTAG	
128-142R	TCGACTACATATGGATAGTCATAGCTATCATCAGCAAATACAGTAATCCCG	
136-150F	AATTCGGGATTACTGTATTTGCTGATGATAGCTATGACTATCCATATGTAG	
136-150R	TCGACTACATATGGATAGTCATAGCTATCATCAGCAAATACAGTAATCCCG	
144-158F	AATTCGGTCATAATCAAGATACATTACCAGGTCATTTACCAGGAGAAAATG	
144-158R	TCGACATTTTCTCCTGGTAAATGACCTGGTAATGTATCTTGATTATGACCG	
248-262F	AATTCAATGATGGGACTGCCATTTGGAAACGCCCTGAAGGCATGGATGTTG	
248-262R	TCGACAACATCCATGCCTTCAGGGCGTTTCCAATGGCAGTCCCATCATTG	
256-270F	AATTCGCCCTGAAGGCATGGATGTTGGCAGACTCCCATTAATTAATGTTG	
256-270R	TCGACAACATAATTTAATGGGAGTCTGCCAACATCCATGCCTTCAGGGCGG	
264-278F	AATTCAGACTCCCATTAATTAATGTTCCAGGGCCAGCTCTAATGATGCCAG	
264-278R	TCGACTGGCATCATTAGAGCTGGCCCTGGAACATAATTTAATGGGAGTCTG	
hp4 VP2 N120	GAAAGATCTGTTTCTGATTCTGCA	
hp4 VP2 N150	GAAAGATCTCCAGGTCATTTACCA	
hp4 VP2 N180	GAAAGATCTGCTATTAGTGATCAT	
hp4 VP2 N210	GAAAGATCTGAGTTTCCAGATGAC	
hp4 VP2 N240	GAAAGATCTGCTATTATGACAGGT	
hp4 VP2 N270	GAAAGATCTCCAGGGCCAGCTCTA	
hp4 VP2 N300	GAAAGATCTGACAGGTATAGTGTA	
hp4 VP2 N330	GAAAGATCTAATTATTTAGGAGGT	

hp4 VP2 N360	GAAAGATCTCCATCCAGAGTTGTT
hp4 VP2 N390	GAAAGATCTGGTGGTACTGATACA
hp4 VP2 N420	GAAAGATCTTCATATGATTGCCAA
hp4 VP2 C165	CGAAGATCTTTACCCATACTGAGGCAA
hp4 VP2 C195	CGAAGATCTTTAATGGTGCTCTAAAAA
hp4 VP2 C225	CGAAGATCTTTAGTTGGGAGTTGACAA
hp4 VP2 C255	CGAAGATCTTTATTTCCAAATGGCAGT
hp4 VP2 C285	CGAAGATCTTTAGTTTCTAATTTGGGT
hp4 VP2 C315	CGAAGATCTTTAGACAGACCATGGTTG
hp4 VP2 C345	CGAAGATCTTTACTCTTCATGCTTTCT
hp4 VP2 C375	CGAAGATCTTTAATGAGGAGCTGCTAA
hp4 VP2 C405	CGAAGATCTTTAAGGTTCTGATATAA
hp4 VP2 C435	CGAAGATCTTTAACATTCTGTATTAGG
hp4 VP2 C465	CGAAGATCTTTAGCCTGGTTGTGACCT
hp4 VP2 N130	GAACCTAGGACAATGACTGTATTTGCT
hp4 VP2 N320	GAACCTAGGACAATGCTAGCAAACAAA
hp4 VP2 C420	CGACCTAGGTTATAAAGGATTTGG
hp4 VP2 C490	CGACCTAGGTTAACTATAATGCAA
hp4 VP2 C525	CGACCTAGGTTAGGCAAGGGTAAA
hp4 VP2 C552	CGACCTAGGTTATAGCAAATGAGAATAATTTTCGCG
492-506F	AATTCAGTTTTTTAGTTAAGCGCCGCAAGAGATCTCGCCGCCATAATCCCG
492-506R	TCGACGGGATTATGGCGGCGAGATCTCTTGCGGCGCTTAACTAAAAACTGG
507-521F	AATTCGAGAAACCTGCTCCTTTCCCGACAACAGATTCGGGACGTATGCCTG
507-521R	TCGACAGGCATACGTCCCGAATCTGTTGTTCGGGAAAGGAGCAGGTTTCTCG

Sintetiniai peptidai, naudoti detaliam PARV4 VP2 epitopų lokalizavimui:

<i>Peptide</i>	<i>Sequence (N- to C-terminus)</i>
hp4A-1	GHNQDTLPGH
hp4A-2	NQDTLPGHLP
hp4A-3	DTLPGHLPGE
hp4A-4	LPGHLPGEN
hp4A-5	GHNQDTLP
hp4B-1	NDGTAIWKRP
hp4B-2	GTAIWKRPEG
hp4B-3	AIWKRPEGMD
hp4B-5	WKRPEGMDV
hp4B-5	NDGTAIWK

Antikūnai ir diagnostikos rinkiniai

1.2 lentelė. Darbe naudoti konjuguotų antrinių antikūnų ir diagnostikos rinkiniai ir jų gamintojai:

Antikūnas / rinkinys	Gamintojas
Oškos anti-žmogaus IgM, HRP konjugatas	ThermoFisher, Carlsbad, CA, JAV
Triušio anti-žmogaus IgG, HRP konjugatas	DakoCytomation, Danija
Triušio anti-kiaulės IgG, HRP konjugatas	Sigma-Aldrich Biosciences, Seattle, JAV
Ožkos anti-palės IgG, HRP konjugatas	BioRad, JAV
INGEZIM PPV compact rinkinys	Ingenasa, Madridas, Ispanija
PPV KY-11 virusu infekuotos kiaulių sėklidžių ląstelės užfiksuotos ant objekcinio stiklelio	VMRD, Inc., Pullman, JAV

Pagrindiniai molekulinės biologijos metodai. DNR ir baltymų elektroforezė, DNR susiuvimas, hidrolizavimas, 5'-fosfatų pašalinimas, PGR, Western imunoblotingas, baltymų gryninimas Ni²⁺-afininės chromatografijos būdu, kompetentinių *E. coli* ir mielių ląstelių paruošimas ir transformacija plazmidėmis buvo atliekami kaip aprašyta Green and Sambrook, (2012). DNR fragmentų išskyrimas iš PGR mišinio ir agarozės gelio, taškinės mutacijos įvedimas, plazmidinės DNR išskyrimas, virusinių nukleorūgčių išskyrimas buvo atliktas su atitinkamais ThermoFisher Scientific Baltics pagamintais rinkiniais, pagal gamintojo rekomendacijas.

Mielių auginimas, rekombinantinių baltymų sintezės indukcija ir ląstelių lizatu paruošimas. Mielių kultūra auginama skystoje YEPD terpėje 24 val. Ląstelės indukuojamos pridėjus pusę tūrio 2xYEPD terpės ir pusę tūrio 12 % galaktozės tirpalo. Indukcija vyksta nuo 16-20 val. Visos mitybinės terpės turi 0,3 – 0,4 µg/mL formaldehido. Lizato paruošimui ląstelės surenkamos centrifuguojant 10 min. 3000 aps./min. greičiu, biomasė praplaunama vandeniu ir užpilama tokiu pat tūriu ardymo buferio. Ardymui imama dvigubai didesnė stiklo rutuliukų (Ø=212-300 µm) masė nei ląstelių biomasė. Vorteksuojama 8-10 kartų po 30 s gražinant mėgintuvėlius į ledą. Ląstelių nuolaužos nusofinamos centrifuguojant 2500 aps./min. greičiu 5 min.

Ultracentrifugavimas sacharozės tirpale ir cezio chlorido tankio gradientė. Sacharozės (30 % - 70 %) arba cezio chlorido (40 %) tirpalai ardymo buferiniame tirpale yra supilstomi į ultracentrifuginius mėgintuvėlius. Ląstelių lizatas yra atsargiai užnešamas ant tirpalų paviršaus. Ultracentrifugavimas sacharozės tirpale vyksta 3-4 val., o CsCl gradientė – 20-48 val. 37000 aps./min. greičiu, esant 4°C temperatūrai (Beckman ultracentrifuga L8-70, rotorius tipas 70 TI). Po centrifugavimo surenkamos frakcijos po 1 mL ir analizuojamos NDS-PAGE.

Stebėjimas elektroniniu mikroskopu. Cezio chlorido gradientė grynintos dalelės arba suardytų dalelių suspensija užlašinama ant anglimi padengto vario tinklelio su 200 nm dydžio akutėmis. Pavyzdžiai dažomi 2 % vandeniniu uranilacetato tirpalu, stebima elektroniniu mikroskopu Morgagni 268 (D) (FEI, JAV).

Imunofermeninė analizė (EIA) Prie plokštelės adsorbuojamas antigenas 50 mM natrio karbonato (pH 9,3) tirpale, į šulinėlį pilama 100 µL antigeno tirpalo ir inkubuojama 4°C temperatūroje per naktį. Kiekvienas šulinėlis plaunamas praplovimo (PBS su 0,1 % Tween-20) tirpalu tris kartus. Tada blokuojama Roti-Block (Carl Roth GmbH, Vokietija) po 150 µL kiekviename šulinėlyje, 1 val. kambario temperatūroje. Blokuota plokštelė plaunama tris kartus plovimo tirpalu. Inkubuojama suserumo tirpalu (100 µL šulinėliui) 2 val. 37°C temperatūroje, serumai skiedžiami PBS tirpalu su 0,1 % Tween-20 ir 1 % jaučio serumo albumino. Po to plaunama 5 kartus ir inkubuojama su antriniais antikūnais 1 val. 37°C. Tada plaunama 5 kartus ir ryškinama pridėdant po 100 µL 3,3',5,5'-tetrametilbenzidino (TMB) substrato (DakoCytomation, Danija) į kiekvieną šulinėlį, palaikoma 10 min. tamsoje, kambario temperatūroje. Reakcijas sustabdoma įpilant po 100 µL 10 % sieros rūgšties. Spektrofotometru išmatuojama sugertis 450 nm bangos ilgyje (lyginant su sugertimi 620 nm). Išgaudančios ELISA imunofermeninės analizės atveju pirma adsorbuojami monokloniniai antikūnai, o visos likusios procedūros identiškos aukščiau minėtoms. Konkurencinės EIA atveju, serumai 1 val. iš pradžių inkubuojami 37°C temperatūroje su giminingų antigenų mišinių (bendra baltymo koncentracija 20 µg/mL), o po to šis mišinys užnešamas į blokuotus šulinėlius. Konkurencinės EIA su peptidais atveju, inkubacija buvo vykdoma 10 µg atitinkamo peptido sumaišius su 500 kartų skiesta MAb hibridomų augimo terpė iki bendro 400 µL tūrio.

Statistinė analizė. Statistinei analizei naudota Microsoft Excel 2013 programos Analysis ToolPak plėtinys. HBoV ir PARV4 specifinių antikūnų paplitimas buvo įvertintas χ^2 testu. Skirtumai tarp grupių laikyti statistiškai reikšmingais, kai reikšmingumo lygmuo $p < 0,05$. Efekto dydis nurodomas šansų santykiu (OR) su 95% pasikliautiniu intervalu (CI).

mVPD epitopų eksponavimo skirtumai įvertinti naudojant Vilkoksono ženklų kriterijų (angl. *Wilcoxon signed-rank test*).

2. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

2.1. Parvovirusų kapsidę formuojančių baltymų sintezė mielėse *S. cerevisiae*

2.1.1. Parvovirusinių baltymų raiškos mielėse vektorių konstravimas

Kiaulių parvoviruso (PPV) paviršiaus baltymo VP2 DNR buvo padauginta PGR metodu iš virusu užkrėstų kiaulių inkstų pataloginio audinio išskirtos virusinės DNR. Audinių homogenizatas gautas iš dr. V. Sereikos (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas). Gauto ~1700 nt DNR fragmento seka buvo nuskaityta DNR sekoskaitos centre (VU Biotechnologijos institutas), ir ją sulyginus su duomenų bazėse deponuotomis sekomis, paaiškėjo, jog ji yra identiška kiaulių parvoviruso NADL-2 kamieno VP2 sekai (GenBank identifikacijos numeris NC001718).

Žmogaus parvoviruso 4 (PARV4) VP1 geno seka buvo chemiškai susintetinta Genscript (Piscataway, NJ, JAV) pagal GenBank duomenų bazėje pateiktą EU546204 seką. Sintetinis genas buvo gautas įrėmintas papildomų restrikcijos endonukleazės *Xma*II taikinių pUC57 plazmidėje. Ši plazmidė buvo panaudota kaip matrica PGR metodu padauginant PARV4 VP2 geną, specifiniais pradmenimis P4_FW2 ir P4_RV geno galuose sukuriant papildomus *Xma*II taikinius klonavimui.

Žmogaus bokavirusų (HBoV) tyrimams, HBoV1 VP1 ir HBoV2-4 VP2 genų sekos buvo chemiškai susintetintos pagal GenBank duomenų bazėje pateiktas sekas (atitinkamai NC_007455, GU048664, FJ948861 ir FJ973561). Papildomai buvo užsakytos raiškai mielėse pagal GenScript OptimumGene™ algoritimą optimizuotos HBoV2 ir HBoV3 VP2 sekos. HBoV1 VP2 geno seka buvo padauginta nuo sintetinės HBoV1 VP1 matricos pUC57 plazmidėje naudojant specifinius HBoV1_VP2F ir HBoV1_VP2R pradmenis.

Rekombinantinių parvovirusų kapsidę formuojančių baltymų sintezei mielėse *Saccharomyces cerevisiae* buvo panaudoti du heterologinių baltymų raiškos vektoriai pFX7 ir pFGG3 (Sasnauskas et al., 1999; Slibinskas et al., 2004). Atitinkami virusiniai VP1 ar VP2 baltymai buvo įklonuoti žemiau galaktoze indukuojamų mielių promotoriaus GAL7 arba hibridinio GAL10-PYK1 promotoriaus. Teigiamų transformantų atrankai bakterijose buvo taikyta *bla* geno koduojama β-laktamazė (atsparumas ampicilinui), o transformuotoms mielėms atsparumą formaldehidui suteikė vektoriuose esantis *Candida maltosa* formaldehido dehidrogenazės *FDH1* genas (Sasnauskas et al., 1992). Tinkama genų kryptis vektoriuose buvo patikrinta restrikcine analize ir sekos analize DNR sekoskaitos centre (VU Biotechnologijos institutas). Visų rekombinantinių baltymų raiškai mielėse šiame darbe sukonstruotų vektorių sąrašas ir jų savybės pateiktos 2.1 lentelėje.

2.1 lentelė. Parvovirusų paviršiaus baltymų sintezei mielėse sukonstruotų vektorių sąrašas

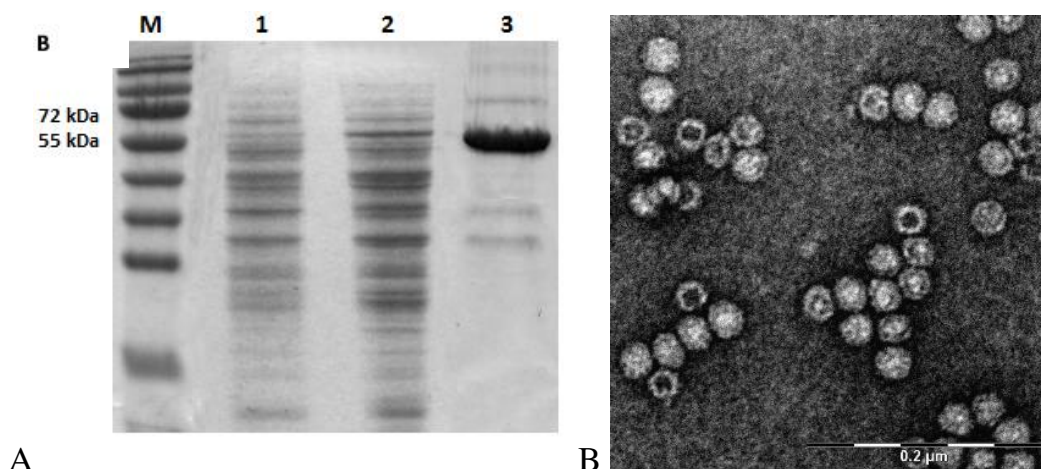
pFX7-pagrindu vektoriai	sukonstruoti Žemiau GAL10-PYK1 promotoriaus ir jo atitinkamas numeris duomenų bazėje.	įklonuotas GenBank	Vektoriaus dydis, bp
pFX7-PPV_VP2	PPV VP2 (NC001718, 2035...4833 nt)		10278
pFX7-PARV4_VP2	PARV4 VP2 (EU546204, 3412...5073 nt)		9141
pFX7-PARV4_VP1	PARV4 VP1 (EU546204, 2329...5073 nt)		10224
pFX7-HBoV1_VP1	HBoV1 VP1 (NC_007455, 3056...5071 nt)		9495
pFX7-HBoV1_VP2	HBoV1 VP2 (NC_007455, 3443...5071 nt)		9108
pFX7-HBoV2_VP2	HBoV2 VP2 (GU048664, 3426...5042 nt)		9096
pFX7-HBoV2opt_VP2	HBoV2 VP2, optimizuotas raiškai mielėse (KU212373, 1...1617 nt)		9096
pFX7-HBoV3_VP2	HBoV3 VP2 (FJ948861, 3420...5039 nt)		9099
pFX7-HBoV3opt_VP2	HBoV3 VP2, optimizuotas raiškai mielėse (KU212374, 1...1620 nt)		9099
pFX7-HBoV4_VP2	HBoV4 VP2 (FJ973561, 3331...4956 nt)		9105
pFGG3 pagrindu vektoriai	sukonstruoti Genai, įklonuoti žemiau nurodytų promotorių		Vektoriaus dydis, bp
pFGG3-HBoV1_VP1 _{GAL7+} VP2 _{GAL10}	GAL7 – HBoV1 VP1 ir GAL10-PYK1 - HBoV1 VP2		12296
pFGG3-HBoV1_VP2 _{GAL7+} VP1 _{GAL10}	GAL7 – HBoV1 VP2 ir GAL10-PYK1 - HBoV1 VP1		12296
pFGG3-PARV4_VP1 _{GAL7+} VP2 _{GAL10}	GAL7 – PARV4 VP1 ir GAL10-PYK1 – PARV4 VP2		13049
pFGG3-PARV4_VP2 _{GAL7+} VP1 _{GAL10}	GAL7 – PARV4 VP2 ir GAL10-PYK1 – PARV4 VP1		13049

2.1.2. PARV4 VP2 sintezė mielėse

Raiškos vektoriumi pFX7-PARV4_VP2 buvo transformuotas mielių *S. cerevisiae* AH22-214 kamienas. Po rekombinantinio baltymo raiškos indukavimo galaktoze mielių lizatas buvo analizuotas NDS-PAGE metodu (1A pav.) ir lizato baltymų mišinyje buvo stebima papildoma ~62 kDa juostelė (1A pav., 2 takelis), atitinkanti teorinę PARV4 VP2 baltymo molekulinę masę (~61.6 kDa). Po mielių lizatų centrifugavimo per sacharozės pagalvę ir CsCl gradiente, rekombinantinis PARV4 VP2 koncentravosi 1,28–1,29 g/mL frakcijoje (1 A pav., 3 takelis). Frakcijos mėginys buvo analizuotas elektroniniu mikroskopu. Mėginiuose buvo stebimos 25-28 nm skersmens struktūros (1 B pav.), primenančios natyvių parvovirusų daleles. Baltymo sekos atitikimas buvo patvirtintas VU Biochemijos instituto Proteomikos centre masės spektrometrijos metodu. Vidutinė rekombinantinio PARV4 VP2 baltymo išeiga buvo ~6,0±1,1 mg/L indukuotos mielių kultūros.

Išgrynintas PARV4 VP2 baltymas buvo dializuotas prieš skirtingus buferinius tirpalus ir buvo ištirtas baltymo stabilumas juose. Nustatyta, kad ilgalaikiam baltymo saugojimui labiausiai tinka PARV4 VP2 laikymas 50 mM Tris, pH 8,7 tirpale su 2 mM EDTA ir 40% glicerolio –20 °C temperatūroje, nes liofilizuotuose mėginiuose po 3 mėn. saugojimo buvo pastebėti ~30 kDa degradacijos produktai. Patikrinus PARV4 VP2

baltymo stabilumą įvairaus pH (3,2 - 9,6) tirpaluose, nustatyta, kad baltymo formuojamos VPD išlieka stabilios neutralaus ar šarminio pH (7,6 – 9,6) terpėje, be to, dalelių nesuardo chelatuojančios medžiagos (10 mM EDTA) ar mažos detergentų koncentracijos (0,5% TritonX arba 1% Tween-20).

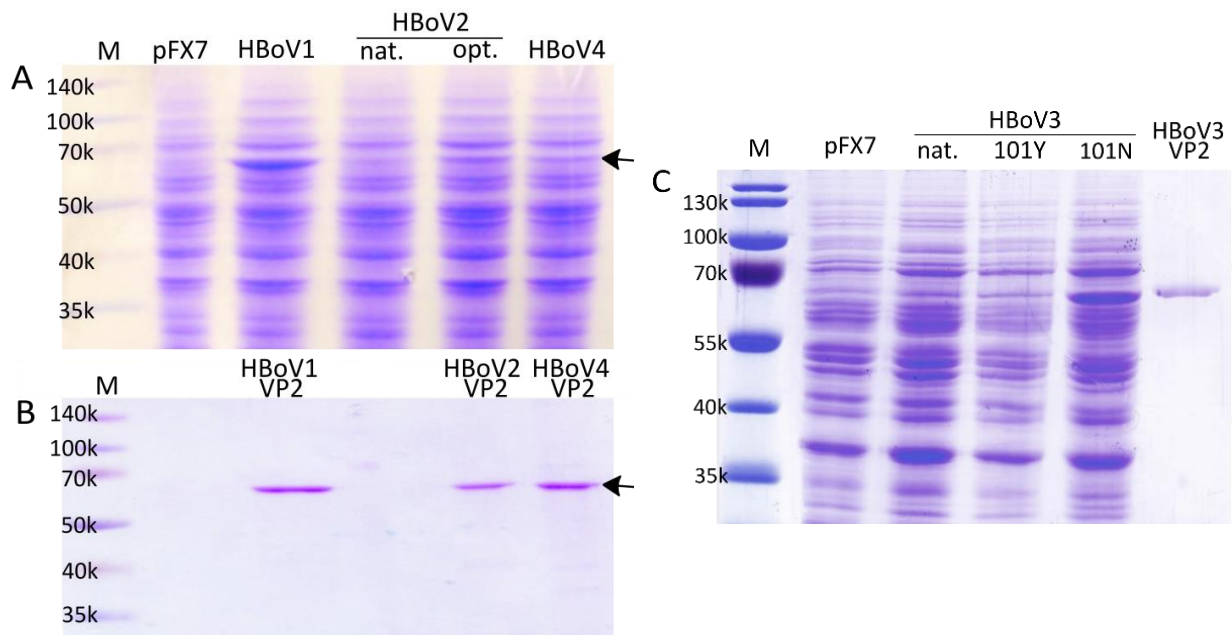


1 pav. PARV4 VP2 sintezės mielėse tyrimas. (A) Mielių lizatų analizė NDS-PAGE. 1 takelis - *S. cerevisiae*, transformuotų pFX7 plazmide, lizatas. 2 takelis - *S. cerevisiae*, transformuotų pFX7-PARV4_VP2 plazmide, lizato lizatas. 3 takelis – CsCl gradiente išgryninto PARV4 VP2 baltymas (6 μg). M takelis – baltymų molekulinės masės standartas (PageRuler Prestained Protein Ladder, ThermoFisher Scientific Baltics). (B) Mielėse susintetintų PARV4 VP2 VPD elektronė mikrofografija. Skalė – 200 nm.

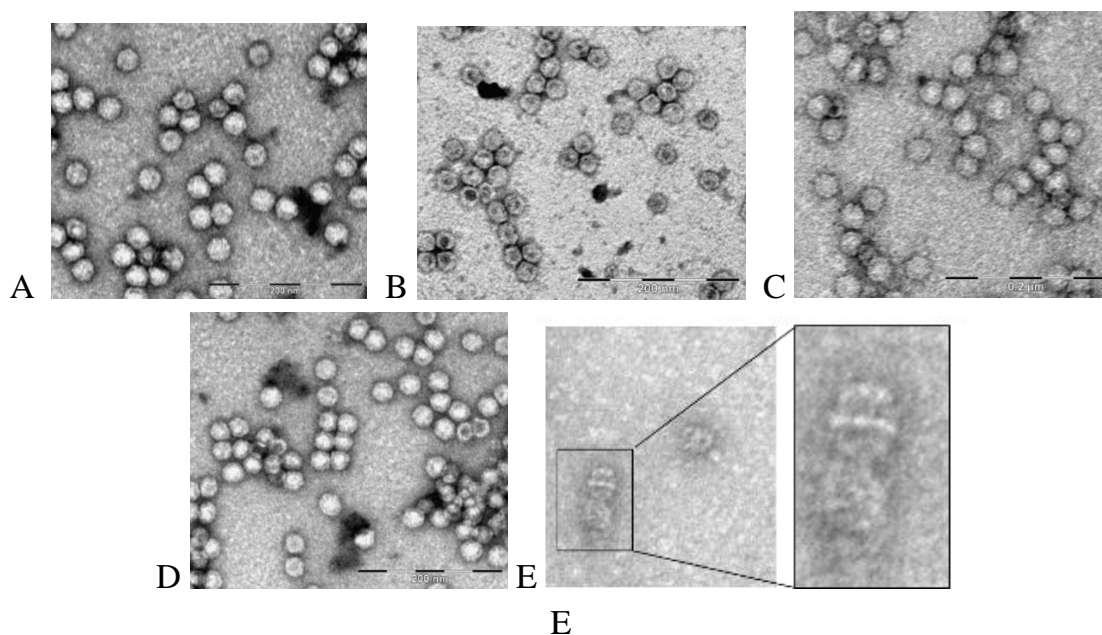
2.1.3. HBoV1-4 VP2 sintezė mielėse

Rekombinantinių žmogaus bokavirusų 1-4 paviršiaus VP2 baltymų sintezei buvo panaudotas mielių *S. cerevisiae* AH22-214 kamienas, transformuotas pFX7 plazmidėmis su žemiau GAL10-PYK1 promotoriaus įklonuotais HBoV1-4 VP2 baltymų genais (2.1 lentelė). Papildomos (~62 kDa) baltymų juostos buvo stebimos mielių, transformuotų HBoV1 ir HBoV4 VP2 genus turinčiomis plazmidėmis, lizatuose (2 pav.). Heterologinių baltymų raiška nebuvo stebima mielėse, transformuotose nemonifikuotomis HBoV2 ir HBoV3 VP2 sekomis pFX7 plazmidėse. Įvertinus žemą šių genų kodonų adaptyvumo indeksą raiškai mielėse (angl., *codon adaptation index*, CAI) (Sharp and Li, 1987), buvo užsakyti optimizuotos sekos HBoV2 ir HBoV3 VP2 genai, kurių CAI buvo padidintas iki 0,85. Šiuos genus turinčiomis pFX7 plazmidėmis transformuotų mielių lizatuose papildoma ~62 kDa baltymų juostelė buvo stebima, todėl tolimesniam HBoV2 ir 3 VP2 baltymų tyrimui buvo naudotos šios, optimizuotos genų sekos. Indukuotų mielių lizatus centrifuguojant per sacharozės pagalvę ir CsCl gradientę, rekombinantiniai HBoV1-4 VP2 baltymai koncentravosi 1,30-1,32 g/mL frakcijose (2 B pav.). Rekombinantinių HBoV1-4 VP2 išeiga buvo atitinkamai $8,0 \pm 0,3$, $4,1 \pm 0,3$, $10,9 \pm 0,5$ ir $6,7 \pm 0,2$ mg iš litro indukuotos mielių biomasės. Elektroniniu mikroskopu baltymų mėginiuose buvo stebimos 25-28 nm skersmens VPD struktūros (3 A-D pav.) Baltymų sekų atitikimas buvo patvirtintas VU Biochemijos instituto Proteomikos centre masės spektrometrijos metodu.

Atlikus GenBank duomenų bazėje publikuotų HBoV VP2 sekų bioinformatinę analizę paaiškėjo, kad vienintelėje Europoje izoliuotoje ir publikuotoje HBoV3 VP2 geno sekoje (identifikacinis numeris ADD39268) (Chieochansin et al., 2010) vietoj parvovirusams konservatyvios 101 arginino yra tirozino aminorūgštis. Atlikus taškinę HBoV3 VP2 baltymo N101Y mutagenzę paaiškėjo, kad rekombinantinio baltymo raiška mielėse yra mažesnė (2 C pav.), be to, baltymas nebeformuoja parvovirusams būdingų VPD, o sudaro nereguliarios formos daleles (3 E pav.). Išanalizavus giminingų parvovirusų išspręstų erdvinių struktūrų modelius, paaiškėjo, kad ši aminorūgštis yra greta konservatyvios α -spiralės, o didesnė aminorūgštis šoninė grandinė trukdytų parvovirusinių dalelių šerdį formuojančiai β -statinės struktūrai.



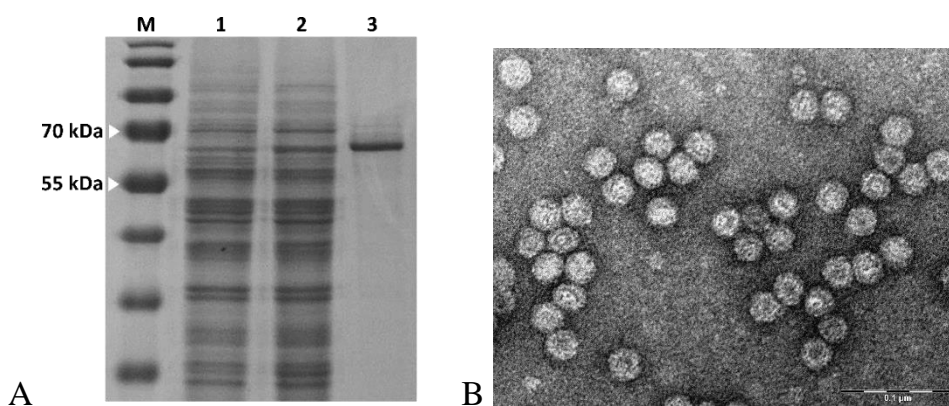
2 pav. HBoV1-4 VP2 baltymų sintezės mielėse tyrimas NDS-PAGE metodu. (A) Mielių *S. cerevisiae* ląstelių, transformuotų pFX7 ir atitinkamus rekombinantinius HBoV1, 2 ir 4 VP2 baltymų genus turinčiomis plazmidėmis, lizatai. (B) CsCl gradientu išgrynintų HBoV1, 2 ir 4 VP2 baltymų mėginiai. (C) Mielių *S. cerevisiae* ląstelių, transformuotų pFX7 ir tris skirtingus HBoV3 VP2 genus (natyvią seką, mielių raiškai optimizuotą (101N) ir turinčią N101Y pakaitą) turinčiomis plazmidėmis, ląstelių lizatai bei CsCl gradientu išgryninto HBoV3 VP2 baltymo mėginys (paskutinis takelis). M – molekulinės masės standartas su nurodytomis baltymų juostų masėmis.



3 pav. Mielėse susintetintų HBoV1-4 VP2 baltymų formuojamų struktūrų, stebimų elektroniniu mikroskopu, mikrografijos. (A) HBoV1 VP2, (B) HBoV2 VP2, (C) HBoV3 (101N) VP2, (D) HBoV4 VP2, skalė – 200 nm. (E) HBoV3 VP2 (101Y) baltymo formuojamos struktūros, padidintos 110 tūkst. kartų.

2.1.4. Kiaulių parvoviruso VP2 sintezė mielėse

Kiaulių parvoviruso kapsidę formuojančio VP2 baltymo geną turinti pFX7-PPV_VP2 plazmidė buvo transformuota į mielių *S. cerevisiae* AH22-214 kamieno ląsteles. Išanalizavus indukuotų ląstelių lizatus NDS-PAGE metodu, buvo pastebėta papildoma ~64 kDa baltymo juostelė. Rekombinantinis baltymas koncentravosi 1,28-1,31 g/mL tankio CsCl frakcijose (4 A pav.). Elektroniniu mikroskopu buvo stebimos parvovirusams būdingos 25-30 nm dydžio VPD (4 B pav.). Mielėse susintetinto PPV VP2 baltymo, formuojančio VPD, išeiga buvo 8,2-9,0 mg/L indukuotos mielių biomasės. Baltymas buvo dializuotas prieš PBS tirpalą ir saugotas –20 °C temperatūroje liofilizuotas arba papildomai pridėjus glicerolio iki 50% galutinės koncentracijos. Abi laikymo sąlygos buvo tinkamos išlaikyti nepažeistas VPD ne mažiau nei metus.

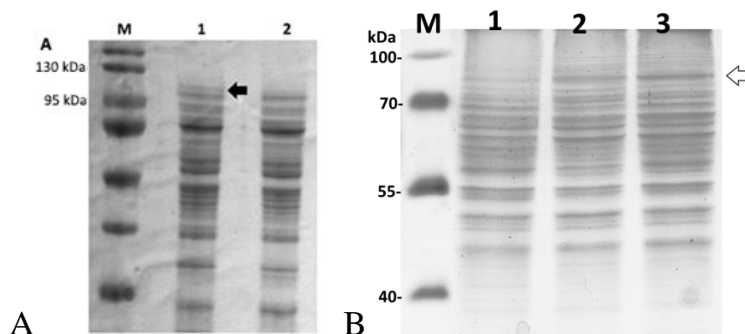


4 pav. PPV VP2 baltymo sintezės mielėse tyrimas.

(A) Mielių lizatų analizė NDS-PAGE. 1 takelis - *S. cerevisiae*, transformuotų pFX7 plazmide, lizatas. 2 takelis - *S. cerevisiae*, transformuotų pFX7-PPV_VP2 plazmide, ląstelių lizatas. 3 takelis – CsCl gradiente išgryninto PPV VP2 baltymas (5 µg). M takelis – molekulinės masės standartas su nurodytomis baltymų juostų masėmis. (B) Mielėse susintetintų PPV VP2 VPD elektroninė mikrofotografija. Skalė – 100 nm.

2.1.5. Nepagrindinio kapsidę formuojančio virusų HBoV1 ir PARV4 baltymo VP1 sintezė mielėse.

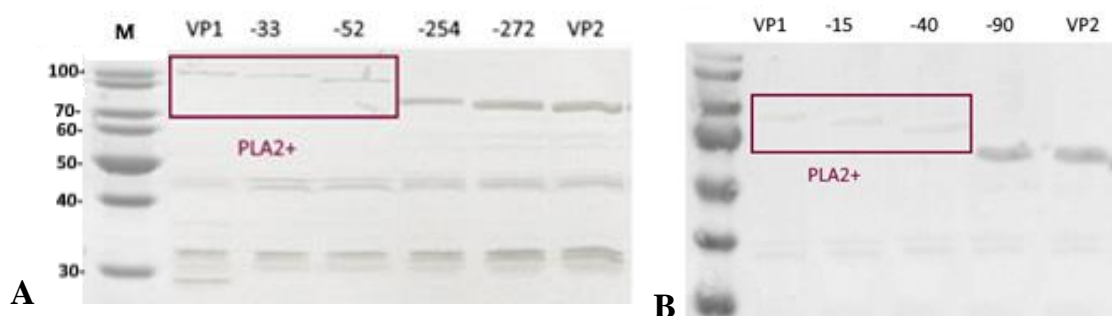
Nors natyviose parvovirusų kapsidėse VP1 baltymo yra vos 5-10 kopijų, tačiau šiame baltyme buvo nustatyti serologiniams tyrimams vertingi neutralizuojantys epitopai (Saikawa et al., 1993; Söderlund et al., 1995). PARV4 ir HBoV1 VP1 baltymų raiška mielėse buvo tirta pFX7-PARV4_VP1 ir pFX7-HBoV1_VP1 plazmidėmis transformuotų mielių *S. cerevisiae* AH22-214 kamieno ląstelių lizatus analizuojant NDS-PAGE metodu (5 pav.). Baltymų raiška šiame mielių kamieno buvo menka, o gryninimas CsCl gradiente buvo nesėkmingas. Papildomai buvo išbandyti *S. cerevisiae* gcn2, FH4 ir AH22-214Δpep4 kamieniai, tačiau efektyvesnės PARV4 VP1 raiškos nei viename iš šių kamienų nepavyko gauti. Pastebimai geresnė HBoV1 VP1 baltymo raiška buvo AH22-214Δpep4 kamieno (5B pav.), tačiau didžiausia šio baltymo išeiga buvo tik 0,77±0,12 mg/L indukuotos terpės, o šio baltymo formuojamų VPD aptikti nepavyko.



5 pav. PARV4 ir HBoV1 VP1 baltymų sintezės mielėse tyrimas.

(A) PARV4 VP1 raiškos tyrimas. Mielių *S. cerevisiae*, transformuotų pFX-PARV4_VP1 (1 takelis) ir pFX7 (2 takelis) plazmidėmis, ląstelių lizatai. (B) HBoV1 VP1 raiškos tyrimas. Mielių *S. cerevisiae*, transformuotų pFX7 (1 takelis) ir pFX-HBoV1_VP1 (2 takelis – AH22-214 kamienas, 3 takelis - AH22-214Δpep4 kamienas), ląstelių lizatai.

Parvovirusų VP1 baltymas pasižymi fosfolipaziniu A₂(PLA2) aktyvumu (Qu et al., 2008), o mielių ląstelės gali būti jautrios heterologinių fosfolipazių poveikiui (Sato et al., 2004). Tiriant galimą PLA2 neigiamą poveikį rekombinantinių VP1 baltymų sintezei mielėse, buvo sukonstruoti sutrumpintus PARV4 ir HBoV1 VP1 baltymų variantus koduojantys raiškos vektoriai. Ištyrus keturių (-33, -52, -254, -272 a. r. nuo N-galo) PARV4 VP1 raišką WB metodu pastebėta, kad pašalinus 216-260 a. r. srityje esantį PLA2 domeną (-254 ir -272 fragmentai), rekombinantinio baltymo raiška pagerėja (6 pav.). Tačiau analizuojant baltymų frakcijas po ultracentrifugavimo per sacharozės pagalvę, nei vieno iš keturių sutrumpintų VP1 baltymo variantų mėginiuose VPD nebuvo aptikta. Šie duomenys rodo, kad 90 N-gale esančių papildomų aminorūgščių trukdo PARV4 VP2 baltymo variantui formuoti daleles, galimai dėl erdvinių trukdžių. Analogiškai buvo iširta trijų HBoV1 VP1 trumpinių (-20, -40, -90 ar.) raiška mielėse ir VPD formavimas (3.6 pav.). Analogiškai PARV4 atveju, pašalinus HBoV1 VP1 PLA2 domeną (21-63 ar.), rekombinantinio baltymo raiška pastebimai pagerėjo, tačiau VPD aptikti nepavyko. PLA2 įtaka HBoV1 VP1 raiškai buvo papildomai tirta įvedant inaktyvuojančias H41A ir D42N mutacijas (Qu et al., 2008), tačiau šios dvi mutacijos neturėjo teigiamos įtakos VP1 baltymo raiškai mielėse. Neatmetama galimybė, kad pagerinta sutrumpintų VP1 baltymų raiška buvo pasiekta pašalinus N'-gale esančius retai mielių naudojamus kodonus, sudarančius efektyvią rekombinantinių baltymų raišką slopinančią transliacinę rampą (angl. *translational ramp*) (Shah et al., 2013), todėl tikslesnė geresnės sutrumpintų variantų raiškos priežastis reikalauja papildomų tyrimų.

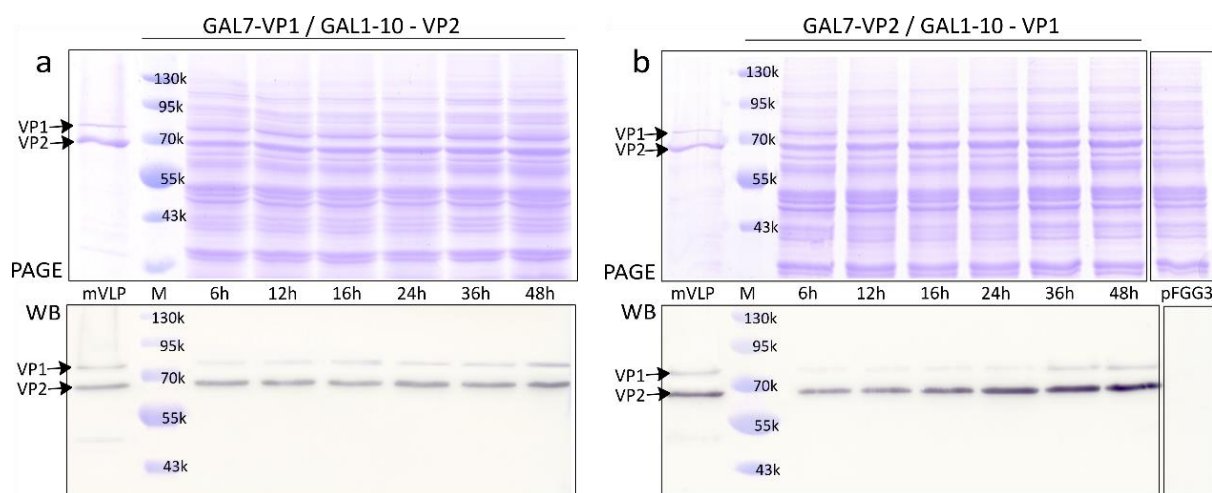


6 pav. PLA2-tipo motyvo įtakos VP1 baltymų raiškai mielėse tyrimas. (A) PARV4 VP1 ir jo sutrumpintų (pašalintų aminorūgščių nuo N-galo skaičius nurodytas virš takelių) variantų raiškos tyrimas WB metodu. Metodui buvo naudoti polikloniniai pelių antikūnai prieš PARV4 VP2. Tariamą PLA2-tipo motyvą (216-260 ar.) turintys fragmentai įrėminti kvadratu. (B) HBoV1 VP1 ir jo sutrumpintų variantų raiškos tyrimas WB metodu, panaudojant 19G7 MAb prieš HBoV1-4 VP2 baltymus (2.2.3 skyrius).

2.1.6. Mozaikinių (VP1-VP2) HBoV1 ir PARV4 į virusus panašių dalelių sintezė

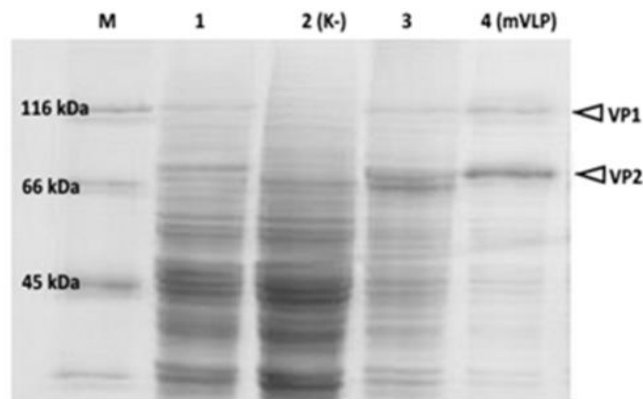
Nepavykus sukurti daleles formuojančių parvovirusinių VP1 baltymų sintezės mielėse sistemos, nutarta išbandyti šio baltymo koekspresijos su VP2 baltymais sistemą. Panašiu būdu susintetintos mozaikinės VP2-VP1 į virusus panašios dalelės (mVPD) buvo gautos vabzdžių sistemoje (Fang et al., 2014; Chandramouli et al., 2013). Dviejų baltymų

vienalaikiai raiškai mielėse buvo panaudotas dvi raiškos kasetės turintis pFGG3 vektorius. Išanalizavus mielių *S. cerevisiae* AH22, transformuotų HBoV1 VP1 ir VP2 genus turinčiais raiškos vektoriais, ląstelių lizatus NDS-PAGE ir WB metodais (7 pav.) paaiškėjo, kad nepaisant skirtingų VP2 ir VP1 baltymų raiškos lygių skirtingais vektoriais transformuotose mielėse, abiem atvejais 1,31-1,33 g/mL tankio CsCl frakcijose koncentravosi du HBoV1 kapsidę formuojantys baltymai VP1 ir VP2 santykiu 1 su 15-20. Toks paviršiaus baltymų santykis stebimas ir natyviose parvovirusų dalelėse (Cotmore et al., 1986). Elektroniniu mikroskopu analizuotuose abi baltymo juosteles turinčių frakcijų mėginiuose buvo stebimos parvovirusams būdingos VPD.

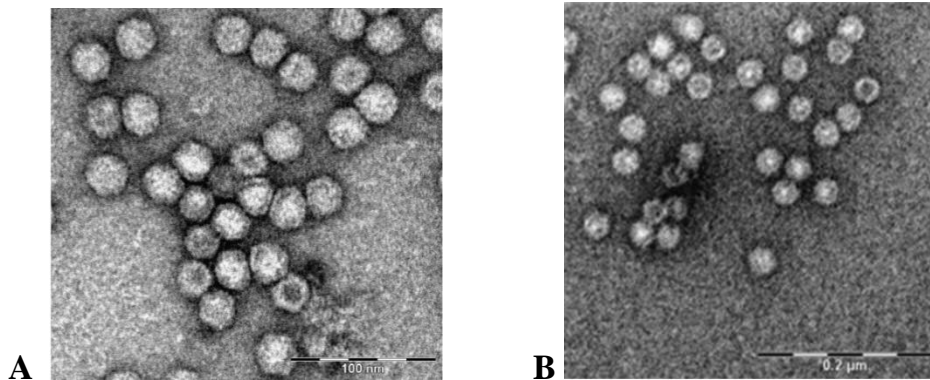


7 pav. HBoV1 VP1 ir VP2 koekspresijos mielėse tyrimas. Mielių ląstelių, transformuotų pFGG3_(HBoV1)_GAL7-VP1_GAL1-10-VP2 (A) arba pFGG3_(HBoV1)_GAL7-VP2_GAL1-10-VP1 (B) plazmidėmis mėginiai buvo paimami nurodytu laiko momentu po indukcijos galaktoze ir analizuoti NDS-PAGE (viršuje) ir WB (apačioje). Atitinkamos VP1 ir VP2 baltymų juostelės pažymėtos rodyklėmis. Dešinėje - pFGG3 plazmide transformuotų mielių lizatas po 16 val. indukcijos.

Analogiškai HBoV1, mielių *S. cerevisiae* AH22 kamiene, transformuotame raiškos vektoriumi pFGG3_(PARV4)_GAL7-VP1_GAL1-10-VP2 buvo gautos mozaikinės PARV4 VP1+VP2 į virusus panašios dalelės (8 ir 9 pav.). Tiek HBoV1, tiek PARV4 VP1+VP2 mVPD išliko stabilios mėginius laikant 3 mėnesius -20°C temperatūroje PBS tirpale su 2 mM EDTA ir 40% glicerolio (HBoV1 mVPD) arba 50 mM Tris (pH 8,7) su 2 mM EDTA ir 40% glicerolio (PARV4 mVPD). Šie rezultatai rodo, kad mielėse susintetintam nepagrindiniam parvovirusų kapsidę formuojančiam baltymui VP1 formuoti į virusus panašias daleles yra būtinas VP2 baltymas, o mozaikinėse į virusus panašiose dalelėse įpakuojamas ribotas skaičius VP1 monomerų.



8 pav. PARV4 VP1 ir VP2 koekspresijos mielėse tyrimas NDS-PAGE metodu. 1 takelis - pFGG3_(PARV4)_ GAL7-VP1_GAL1-10-VP2 plazmide transformuotų *S. cerevisiae* AH22-214 mielių lizatas, 2 takelis - pFGG3 plazmide transformuotų mielių lizatas, 3 takelis – mielių lizatas po ultracentrifugavimo per sacharozės pagalvę, 4 takelis – CsCl frakcija su VP1 ir VP2 baltymų juostelėmis.



9 pav. Mielėse susintetintų HBoV1 VP1+VP2 mVPD (A) (skalė - 100 nm) ir PARV4 VP1+VP2 mVPD (B) (skalė - 200 nm) mėginių CsCl frakcijose elektroninės mikrofotografijos.

Apibendrinus, mielių *S. cerevisiae* raiškos sistema yra tinkama efektyviai HBoV1-4, PARV4 ir PPV į virusus panašių dalelių, sudarytų iš pagrindinio kapsidę formuojančio baltymo VP2, sintezei. Šios dalelės yra panašios į natyvius virionus struktūros ir išlieka stabilios laikant atitinkamuose saugojimo tirpaluose ilgesnį laiką, kas palengvina jų pritaikymą įvairių diagnostinių testų kūrimui. Kitaip nei VP2 baltymų atveju, HBoV1 ir PARV4 VP1 baltymų raiška mielėse yra neefektyvi, net ir pašalinus galimą PLA2 motyvą. Tačiau sintetinant šių virusų VP1 baltymą kartu su VP2, gaunamos stabilios abu baltymus turinčios mozaikinės į virusus panašios dalelės, kuriose baltymų santykis artimas natyvių virionų sudėčiai. Šioje dalyje aprašytos VPD buvo panaudotos 2.2 dalyje aprašytiems tyrimams atlikti.

2.2. Rekombinantinių parvovirusų VP baltymų antigeninių savybių tyrimas

2.2.1. PARV4 VP2 VLP reaktyvumo su mažos rizikos žmonių serumais tyrimas

Rekombinantinės PARV4 VP2 VPD buvo panaudotos sukurti fermentinės imunoanalizės (EIA) metodu paremtą PARV4 specifinių IgM ir IgG antikūnų nustatymą žmonių kraujo serumuose. Nesant standartizuotų PARV4 infekcijos testų, šio sukurto serologinio testo perskyros taškai (angl. *cut-off values*) buvo nustatyti kaip aprašyta Sharp et al., 2009. Išanalizavus 170 žmonių kraujo serumų mėginių, nustatyta, kad 5,8 % (n=10) mėginių buvo IgG-teigiami ir 7,0 % (n=12) buvo IgM-teigiami (2.2 lentelė). Teigiami mėginiai pagal reaktyvumą suskirstyti į tris grupes: 4 mėginiai turėję ankstesnę infekciją (IgM-, IgG+), 6 mėginiai su vykstančia infekcija (IgM+, IgG-/IgG-dvejotini) ir 6 mėginiai su nesena infekcija (vykstanti serokonversija, IgM+, IgG+).

2.2 lentelė PARV4 paplitimo tyrimo mėginių demografinės charakteristikos.

	Mėginių skaičius	Vidutinis amžius (intervalas, m)	Seroteigiamų mėginių skaičius
Moterys	78	21.1 (0.5 – 63)	2
Vyrai	92	20.0 (0.5 – 60)	14
Iš viso	170	20.5 (0.5 – 63)	16

Papildomai atlikus visų teigiamų kraujo serumų analizę WB metodu, nustatyta, kad 4 iš 10 IgG+ ir 3 iš 12 IgM+ serumų mėginių reagavo su denatūruotu PARV4 VP2 antigenu (3.3 lentelė). Skirtingas aptiktų seroteigiamų mėginių dažnis paaiškinamas tuo, kad parvovirusų infekcijos metu dauguma specifinių antikūnų susidaro prieš konformacinius epitopus (Söderlund et al., 1995), nors, kitaip nei parvoviruso B19 infekcijos atveju, PARV4-specifiniai linijinius epitopus atpažįstantys antikūnai neišnyksta po infekcijos (Chen et al., 2015).

Šis tyrimas yra pirmas bandymas Lietuvoje įvertinti PARV4 paplitimą. Remiantis ankstyvesniais epidemiologiniais PARV4 paplitimo tyrimais, šis virusas siejamas su padidintos rizikos pacientais (intraveninių narkotikų vartotojais ar turinčiais ŽIV/hepatito C infekciją) ir Europoje yra paplitęs labai netolygiai (7,3-95 % tarp padidintos rizikos ligonių). Tokia didelė (5,8 % IgM ir 7 % IgG) seroteigiamų ligonių, neturinčių padidintos rizikos požymių, dalis populiacijoje užfiksuota pirmą kartą, ir prieštarauja PARV4 perdavimo tik per organizmo skysčius teoriją (Panning et al., 2010).

2.3 lentelė. PARV4 paplitimo tyrimo EIA ir imunoblotu rezultatai. Pateikiamos tik tos EIA optinio tankio vertės, kurios interpretuotos kaip teigiamos.

Serumo Nr	EIA, OD		Imunoblotas		Amžius(m)	Lytis
	<i>IgM</i>	<i>IgG</i>	<i>IgM</i>	<i>IgG</i>		
19	0.618	0.654		+	25	V
20	1.014	0.687	+	+	46	V
23	0.619				47	V
31		0.494			23	V
43	0.786				26	V
84		0.445			15	V
85		0.455			16	V
86	0.603				5	M
112	1.213	0.728	+	+	6	V
113	0.636	0.453		+	10	V
116	0.803				10	V
117	0.742				14	V
127	0.628				3	V
138	0.639	0.435			9	M
209		0.419			19	V
216	0.790	0.498	+		11	V

Santrumpos: V, vyras; M, moteris.

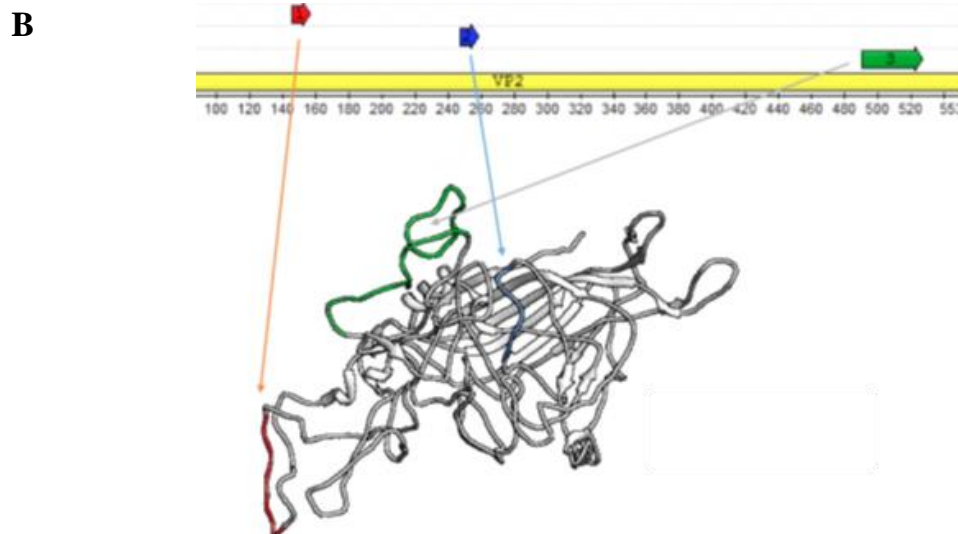
2.2.2. PARV4 VP2 baltymo B ląstelių linijinių epitopų nustatymas

Imunizavus mielėse susintetintu PARV4 VP2 antigenu peles, VU Ląstelės biologijos ir imunologijos skyriuje (vad. dr. A. Žvirblienė) buvo sukurta 28 monokloninių antikūnų (MAb) prieš PARV4 VP2 baltymą kolekcija (darbus atliko dr. I. Kučinskaitė-Kodžė). Visų MAb savybės apibendrintos 2.4 lentelėje. Tik vienas iš 28 kolekcijos MAb atpažįsta konformacinį epitopą, todėl esant tokiam dideliame kiekiui linijinius epitopus atpažįstančių MAb kiekiui nuspręsta identifikuoti vyraujančias PARV4 VP2 antigenines sritis epitopų kartiravimo metodu. Trijų etapų PARV4 VP2 baltymo fragmentų smulkinimo ir jų sintezės mielėse arba suliejus su tirpiu *E. coli* NusA baltymu taktika identifikuotos trys pagrindinės B ląstelių linijinių epitopų sritys: 144-158 ar., 248-257 ar. ir 507-513 ar. regionuose. Atlikus konkurencinės IEA analizę su sintetiniais peptidais nustatyta, kad 9 MAb specifiškai atpažįsta NQDTLPGHLP, 6 MAb atpažįsta NDGTAIWKRP, o 8 MAb – EKPAPFP peptidus (2.4 lentelė). Sugretinus anksčiau nustatytų parvovirusų B19 ir HBoV1 VP2 baltymų linijinių epitopų sritis matyti, kad visos trys sritys sutampa su HBoV1, o du epitopų regionai – su B19 VP2 baltymo antigeninėmis sritimis. Tai rodo, kad parvovirusų kapsidės baltymams būdingi konservatyvios B ląstelių linijinių epitopų sritys VP2 baltyme (10 A pav.). Išanalizavus sekų gretinius ir jas

lokalizavus parvoviruso B19 tretinės struktūros modelyje (10 B pav.) matosi, kad PARV4 VP2 epitopai susitelkę konservatyvias struktūrinės parvoviruso kapsidės β -juostas jungiančiose paviršinėse EF ir HI kilpose bei C-galinėje kilpoje. Pakeitimai šiose kilpose galėtų būti panaudoti PARV4 VP2 baltymo, kaip epitopų nešiklio, tyrimams.

A

PARV4_VP2	143	<u>LGHNODTLRGHLRGENVVL</u> PQYGYITRGREIDQQ--NSI-----VAISDHKTELFFFLEHH
B19_VP2	163	LGQGQDTLAPELPIWVYFPQYAYLSVGDVNTQGITGDS-----KKLASEESAFYVLEHS
BoV1_VP2	169	<u>SHFWEDEVMPDL</u> PKTWKLFQYGYIPIENELADLDGNAAGGNATEKALLYQMPFFLENS
		: : : .** : **.* : : : : : : : : : : : .**.
PARV4_VP2	196	DAECLGTGDHWSHHYEFDDLPWRKLTSPNQTLYARHNPIPSSRLAINTGVDNDGTAUVK
B19_VP2	218	SFQLLGTGGSASMSYKFPVAPP-ENLEGCSQHFYEMV <u>NLYGSRI</u> GVPDTLGGDP--KFR
BoV1_VP2	229	DHQVLRGTGESTFTFFNFD--CEWVNNERAYIPPGLMFNPKVPTRRVQYIRQNGSTA---A
		. : * * * . : : * : . : . : * * : * : .
PARV4_VP2	256	<u>RPEGMDVGRPLN</u> YVPGALMMPTDQIRNTTFRDP-VAIGNPATSDRYSVAPLVHQPWS
B19_VP2	275	SLTHEDHAIQPNFMFRPLVNSVSTNEGDSNTGAKALTLGRKGTQNTLISLRPGFVS
BoV1_VP2	284	<u>STGRIOPYSKPT</u> SWMTGPGLLSAORVGPQSSDT-APFMVCTNPEGTHINTGAAGFGSGFD
		: * . : : * : : : : : : : : : : .
PARV4_VP2	315	VRTEEWLANKTDYSVHNYLGGVAYTRRKHEESYD----KHEEDRDG-RVSNPSRV-VQID
B19_VP2	335	QPYHHWDTD-----KYVTGINAISHG-QTTYGNAEDKEYQQGVG-RFPNEKEQLKQLQ
BoV1_VP2	343	PPSGCLAPTNLQYKQWYQTP-----EG-----TGNNNGNIANPISLSM--LR
		* : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
PARV4_VP2	369	GDLAAPHVGHTEFFVPGHTRVTSGGTDTVYSPKLYQEPVFLPFGAVWNPPLSYDCQIWT
B19_VP2	386	GL-----NMHTYFPN-----KGT-----QQYTDQIERPLMVGSVWNRRLHYESQLWS
BoV1_VP2	383	D-----QLLYKGNQTT---YNLVGDIWMFPNQVDRFPITRENPIWC
		* : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
PARV4_VP2	429	KIPNTECHFFAQYPLLGGWGMTPPPMIFVKLRSQPGPPSPAHTVPQSNLNQYAIIFHLH
B19_VP2	429	KIPNLDDSPKTQFAALGGWGLHQPPPQIFLKILPQSGPIG-GIKSMGITTLVQYAVGIMT
BoV1_VP2	422	KKPRADKHTIM-DPFDGSIAMDHPPGTIFIKMAKIPVPTATNA----DSYLNICYCTGQVS
		* * . : * . : * . : * * * * : * . : * * . : *
PARV4_VP2	489	YSMQFLVKRRKRSRRHN <u>PKPAP</u> PTTD-SGRMPFTLANSIQ---DPSTPVYEVPSDQW
B19_VP2	488	VTMTIKLGRKATGRWNP-OPGVYPPHA-AGHLPGLYDPTATDAKHRRHGYPEELW
BoV1_VP2	477	<u>CEIVWEVE-RYATKNWRPERRHTALGMSL</u> GGESNYTPTYH-----VD-PTGAVIQPTSYD
		: : * : . * : . * . : * . : : * * .



10 pav. Šiame darbe nustatytos PARV4 VP2 epitopų sritys. (A) Dalinis PARV4, HBoV1 ir B19 VP2 sekų gretinys (atliktas Clustal O programa) su pažymėtais linijiniais B ląstelių epitopais nustatytais šiame darbe (PARV4), arba ankstesniuose tyrimuose (Tolfvenstam et al., 2000; Zhou et al., 2014). (B) Trys pagrindinės PARV4 VP2 epitopų lokalizacijos sugretintos ant tretinės B19 VP2 struktūros modelio (numeris PDB duomenų bazėje – 1S58). Paveikslėlis paruoštas naudojantis Chimera v1.10.1 programa.

2.4 lentelė. PARV4 VP2 baltymui specifinių monokloninių antikūnų savybės.

Klonas	Izotipas*	Reaktyvumas WB	Atpažįstamo epitopo lokalizacija (ar.) ir nustatyta konkreti epitopo amirūgščių seka.
7F8	IgG2a	+	390-420
13H11	IgG1	+	330-375
12F8	IgG2a	+	150-195
8G8	IgG2a	+	150-195
4A7	IgG2a	+	507-513: EKPAPFP
7C7	IgG1	+	507-513: EKPAPFP
8A2	IgG2a	+	507-513: EKPAPFP
10C9	IgG2a	+	507-513: EKPAPFP
10D1	IgG2a	+	507-513: EKPAPFP
12D1	IgG1	+	507-513: EKPAPFP
12F10	IgG2a	+	507-513: EKPAPFP
15G7	IgG1	+	507-513: EKPAPFP
18E3	IgG1	+	248-257: NDGTAIWKRP
17G2	IgG1	+	248-257: NDGTAIWKRP
17G9	IgG2a	+	248-257: NDGTAIWKRP
2G8	IgG1	+	248-257: NDGTAIWKRP
5A6	IgG2a	+	248-257: NDGTAIWKRP
12E8	IgG2a	+	248-257: NDGTAIWKRP
1G4	IgG2a	+	146-155: NQDTLPGHLP
6E6	IgG2a	+	146-155: NQDTLPGHLP
7C5	IgG2a	+	146-155: NQDTLPGHLP
11F8	IgG2a	+	146-155: NQDTLPGHLP
16H9	IgG2a	+	146-155: NQDTLPGHLP
19H9	IgG2a	+	146-155: NQDTLPGHLP
3D10	IgG2a	+	146-155: NQDTLPGHLP
11H3	IgG2a	+	146-155: NQDTLPGHLP
12D6	IgG2a	+	146-155: NQDTLPGHLP
16E12	IgG2a	-	<i>konformacinis epitopas</i>

* MAb izotipavimas atliktas dr. I. Kučinskaitės-Kodzės, Ląstelės biologijos ir imunologijos skyriuje.

2.2.3. Antigeninių HBoV1-4 VP2 baltymų savybių tyrimas

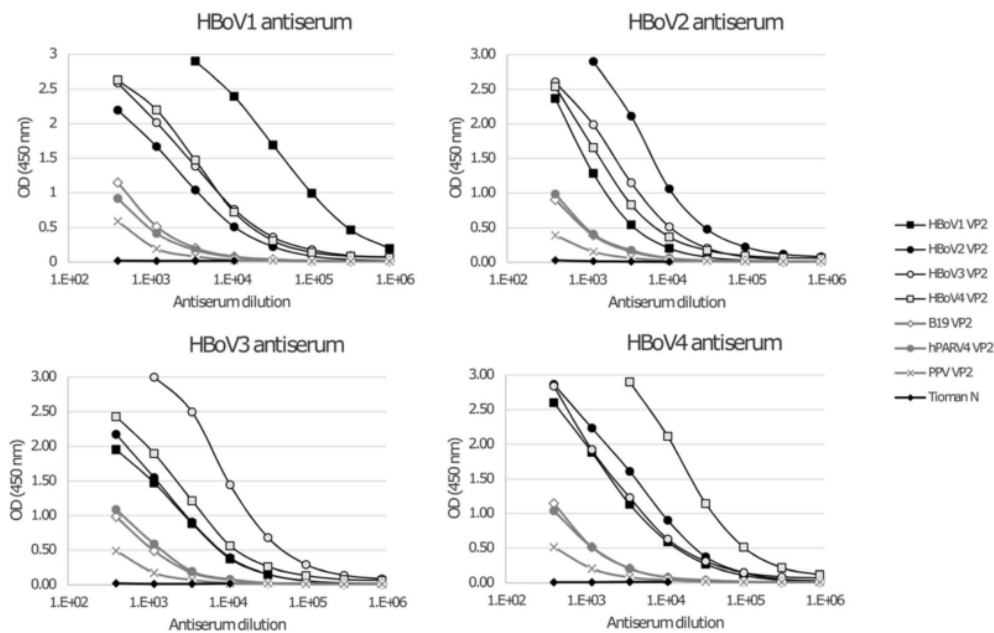
Rekombinantinėmis mielėse susintetintomis HBoV1-4 VP2 VPD buvo imunizuotos pelės ir sukurta 36 monokloninių antikūnų kolekcija (2.5 lentelė). Šis darbas buvo atliktas VU Ląstelės biologijos ir imunologijos skyriuje (vad. dr. A. Žvirblienė). Išanalizavus MAb savybes, nustatyta, kad didžioji dalis (28/36) MAb atpažįsta konformacinius epitopus. Sukurti specifiniai, tik vieną iš giminingų antigenų atpažįstantys MAb: HBoV1 (3 MAb), HBoV3 (2 MAb) ir HBoV4 (15 MAb) VP2. Visi linijinius epitopus atpažįstantys MAb kryžmiškai reaguoja su HBoV2-4 (2 MAb) arba su visais 4 skirtingų HBoV VP2 antigenais (6 MAb). Tai paaiškinama dėl itin giminingos (77,7 - 90,9 %) šių antigenų pirminės sekos. Nei vienas iš MAb nereagavo su kitais parvovirusų (PARV4, PPV, B19 VP2) antigenais.

2.5 lentelė. HBoV1-4 VP2 baltymams specifinių monokloninių antikūnų savybės.

Antigenas	Klonas	Izotipas*	HBoV VP2 antigenų reaktyvumas EIA metode:				Reaktyvumas WB*
			HBoV1	HBoV2	HBoV3	HBoV4	
HBoV1 VP2	4C2	IgG1	+	-	-	-	-
HBoV1 VP2	12C1	IgG1	+	-	-	-	-
HBoV1 VP2	9G12	IgG1	+	-	-	-	-
HBoV1 VP2	15C6	IgG1	+	+	-	+	-
HBoV2 VP2	4B11	IgG1	+	+	-	+	-
HBoV2 VP2	4A7	IgG1	-	+	+	+	+
HBoV2 VP2	7C8	IgG2b	-	+	+	+	+
HBoV2 VP2	5A10	IgG1	+	+	+	+	+
HBoV2 VP2	18D11	IgG1	+	+	+	+	+
HBoV2 VP2	19C6	IgG1	+	+	+	+	+
HBoV3 VP2	9D6	IgG2b	-	-	+	-	-
HBoV3 VP2	10G7	IgG1	-	-	+	-	-
HBoV4 VP2	2B5	IgG1	-	-	-	+	-
HBoV4 VP2	3F12	IgG1	-	-	-	+	-
HBoV4 VP2	5B6	IgG1	-	-	-	+	-
HBoV4 VP2	7D5	IgG1	-	-	-	+	-
HBoV4 VP2	9G11	IgG1	-	-	-	+	-
HBoV4 VP2	9F5	IgG1	-	-	-	+	-
HBoV4 VP2	13D4	IgG1	-	-	-	+	-
HBoV4 VP2	13G6	IgG1	-	-	-	+	-
HBoV4 VP2	16D9	IgG1	-	-	-	+	-
HBoV4 VP2	17D7	IgG1	-	-	-	+	-
HBoV4 VP2	3C4	IgG1	-	-	-	+	-
HBoV4 VP2	5E9	IgG2a	-	-	-	+	-
HBoV4 VP2	12F7	IgG2a	-	-	-	+	-
HBoV4 VP2	18D6	IgG2b	-	-	-	+	-
HBoV4 VP2	24C7	IgG3	-	-	-	+	-
HBoV4 VP2	20B10	IgG1	+	-	+	+	-
HBoV4 VP2	17G11	IgG2a	+	+	+	+	-
HBoV4 VP2	25F6	IgG2a	+	+	+	+	-
HBoV4 VP2	13H4	IgG2b	+	+	+	+	-
HBoV4 VP2	20D10	IgG2b	+	+	+	+	-
HBoV4 VP2	4D4	IgG2a	+	+	+	+	-
HBoV4 VP2	11F6	IgG1	+	+	+	+	+
HBoV4 VP2	13D12	IgG1	+	+	+	+	+
HBoV4 VP2	19G7	IgG1	+	+	+	+	+

* MAb izotipavimas atliktas R. Lasickienės, Ląstelės biologijos ir imunologijos skyriuje.

Pelių polikloniniai antikūnai buvo panaudoti kryžminio antikūnų reaktyvumo su HBoV1-4 VP2 antigenais tyrimui EIA metodu (11 pav.). Pelių, imunizuotų vienu HBoV antigenu, serumai kryžmiškai reagavo su kitais HBoV VP2 antigenais. Mažesnis reaktyvumas buvo stebimas ir su kitais parvovirusiniais (B19 ir PARV4 VP2) antigenais, nors nebuvo nustatyta reakcija su mielėse susintetintu Tioman viruso N antigenu (Petraityte et al., 2009). Tai rodo, kad parvovirusai turi bendrus konformacinius epitopus, kuriuos atpažįsta žemo afiniškumo antikūnai.



11 pav. HBoV1-4 VP2 baltymais imunizuotų pelių antiserumų reaktyvumo su mielėse susintetintais parvovirusiniais (HBoV1-4, PPV, PARV4, B19) VP2 ir kontroliniu Tioman viruso N antigenais tyrimas.

2.2.4. Rekombinantinių HBoV VLP reaktyvumo su žmonių serumais tyrimas

Rekombinantinės žmogaus bokavirusų 1-4 VP2 formuojamos į virusus panašios dalelės buvo panaudotos šiems virusams specifinių antikūnų aptikimui kvėpavimo ligomis sergančių žmonių kraujo serumuose. Dėl jau anksčiau aptikto šiems virusams specifinių antikūnų kryžminio reaktyvumo (Kantola et al., 2011) įtakos sumažinimo buvo taikytas konkurencinės netiesioginės imunofermentinės analizės (c-EIA) metodas. Kaip konkuruojantys antigenai buvo panaudoti HBoV1 VP2 arba HBoV2-4 VP2 mišinys lygiomis dalimis. Serumų mėginių inkubavimas su šiais konkurenciniais mišiniais leido eliminuoti kryžmiškai reaktyvius IgG, ir prie plokštelės dugno sorbuoto antigeno jungėsi tik jam specifiniai antikūnai. Įvertinus antigeno koncentraciją (20 µg/mL), kurios reikia pasiekti 95 % specifinių antikūnų slopinimą, buvo atlikta 154 žmonių kraujo serumų analizė. Šie serumai buvo surinkti iš kliniškai patvirtintų ūmiomis kvėpavimo ligomis sergančių ligonių Vilniaus Universiteto Medicinos fakulteto Vaikų ligų klinikose, bendradarbiaujant su dr. R. Ėmužyte ir dr. R. Firantiene. Imunofermentinės analizės rezultatai pateikti 2.6 lentelėje.

Bendra antikūnų prieš žmogaus bokavirusą 1 turinčių pacientų dalis Lietuvoje yra 91.6 %, ir yra panaši į kitose šalyse gautus duomenis (93-100 %). Įvertinus kryžmiškai reaktyvių antikūnų įtaką, tik HBoV1 specifinių IgG buvo aptikta 44.2 % mėginių. Tai kol kas žemiausias dokumentuotas seroteigiamumas, nes kituose tyrimuose nustatyta 53% - 76,7 % HBoV1 specifinių antikūnų turinčių žmonių dalis (Kantola et al., 2011; Hustedt et al., 2012). Jungtinis HBoV2-4 virusams specifinių IgG paplitimas tirtoje imtyje buvo 35,7 %. Žemesnis nei HBoV1 šių virusų paplitimas nustatytas ir kituose tyrimuose

(Kantola et al., 2011; Guo et al., 2012). Mažiau seroteigiamų mėginių buvo aptikta jaunesnių nei 2 metų vaikų imtyje nei suaugusiųjų imtyje (38,5 % prieš 68,9 %). Šie rezultatai pagrindžia ankstesnius duomenis, kas šių virusų infekcijomis persergama ankstyvoje vaikystėje. Apibendrinus, mielėse susintetinti HBoV1-4 VP2 antigenai, formuojantys į virusus panašias daleles, gali būti sėkmingai naudojami įvertinti virusui specifinių IgG paplitimui žmonių serumuose įvertinti.

2.6 lentelė. HBoV1-4 IgG seroteigiamų mėginių dalis tarp pacientų su ūimomis kvėpavimo ligomis Lietuvoje

	N	Netiesioginė EIA				Konkurencinė EIA									
		HBoV1 IgG+	HBoV2 IgG+	HBoV3 IgG+	HBoV4 IgG +	HBoV1 IgG+	HBoV2-4 IgG+	HBoV1-4 IgG-							
Visi vaikai	51	42	82,4%	38	74,5%	42	82,4%	38	74,5%	22	43,1%	17	33,3%	17	33,3%
<2 m	13	8	61,5%	8	61,5%	9	69,2%	8	61,5%	2	15,4%	3	23,1%	8	61,5%
2-14 m	38	34	89,5%	30	78,9%	33	86,8%	30	78,9%	20	52,6%	14	36,8%	9	23,7%
Visi suaugę	103	99	96,1%	87	84,5%	90	87,4%	82	79,6%	46	44,7%	38	36,9%	32	31,1%
15-30 m	44	42	95,5%	39	88,6%	40	90,9%	37	84,1%	18	40,9%	22	50,0%	8	18,2%
30-55 m	47	46	97,9%	39	83,0%	42	89,4%	38	80,9%	23	48,9%	13	27,7%	19	40,4%
>55 m	12	11	91,7%	9	75,0%	8	66,7%	7	58,3%	5	41,7%	3	25,0%	5	41,7%
Visi mėginiai	154	141	91,6%	125	81,2%	132	85,7%	120	77,9%	68	44,2%	55	35,7%	49	31,8%

2.2.5. Mielėse susintetintų kiaulių parvoviruso VP2 VLP antigeninių savybių tyrimas

Mielėse susintetintų PPV VP2 VPD antigeninės savybės buvo tirtos palyginant šio antigeno reaktyvumą su kiaulių kraujo serumais, juos charakterizavus komerciniu standartizuotu rinkiniu INGEZIM PPV Compac. Iš dr. V. Sereikos ir dr. R. Lelešiaus (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas) buvo gauti 2008-2010 m. Lietuvoje (n=160), Rumunijoje (n=14) ir Ukrainoje (n=13) iš komercinių kiaulių ūkių surinkti kiaulių serumų mėginiai, kurie buvo ištirti netiesioginės EIA metodu ir komerciniu rinkiniu. Mielėse susintetinto PPV VP2 antigeno pagrindu sukurtame EIA teste perskyros taškai (angl. *cut-off values*) buvo nustatyti kaip aprašyta Sharp et al., 2009. Šiuo testu, iš viso 129 mėginiai buvo nustatyti kaip IgG+, o 58 serumai – kaip IgG-. Tuos pačius serumus įvertinus komerciniu INGEZIM PPV Compac rinkiniu, nustatyti 137 IgG+, 39 IgG- ir 11 IgG-abejotinų mėginių. Įvertinus šiuos rezultatus, naujai mielėse sintetinto PPV VP2 antigeno pagrindu sukurto testo specifiškumas ir jautrumas buvo atitinkamai 97,4 % (38/39) ir 93,4 % (128/137). Šie duomenys leidžia teigti, kad šis antigenas yra tinkamas tolimesniam jautresnių ir specifiškesnių diagnostinių testų kūrimui.

2.2.6. Monokloninių antikūnų prieš PPV gavimas ir jų savybių tyrimas

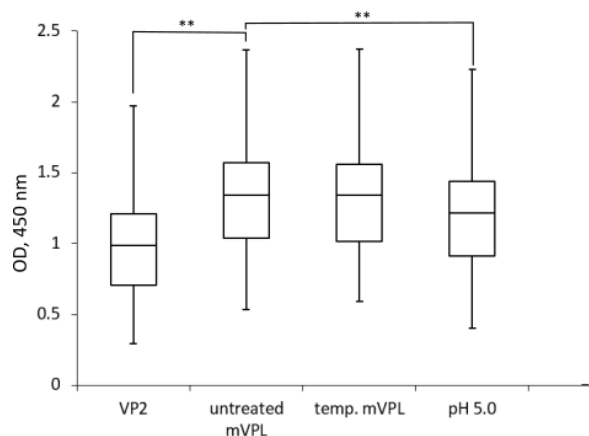
Išgrynintomis PPV VP2 VPD buvo imunizuotos pelės ir sukurti 9 PPV specifiniai monokloniniai antikūnai. Šis darbas buvo atliktas VU Ląstelės biologijos ir imunologijos skyriuje (vad. dr. A. Žvirblienė). Gauti MAb atpažino linijinius (5 MAb: 4F11, 6D1, 10A7,

16G11, 25C5; visi IgG1 izotipo) arba konformacinius (4 MAb: 16A1, 22G2, 23A7 (IgG2a izotipo) ir 1F8 (IgG1 izotipo)) antikūnus, bet nereagavo su kontroliniais mielėse sintetintais Hantaan ar Tioman virusų nukleokapsidės baltymais. Visi MAb gebėjo jungtis prie natyvaus kiaulių parvoviruso dalelių šiuo virusu užkrėstose ląstelėse.

2.2.7. Mozaikinių parvovirusinių VP1-VP2 VLP savybių tyrimas

Mozaikinių HBoV1 ir PARV4 VP1+VP2 į virusus panašių dalelių antigeninės savybės įvertintos ištyrus jų reaktyvumą su anksčiau charakterizuotais žmonių serumais. Ros et al. (2006) pademonstravo, kad B19 parvoviruso VP1u domenas yra negrižtamai eksponuojamas į kapsidės paviršių po terminio ar rūgštinio poveikio. Įvertintas nepaveiktų, 60°C temperatūroje ar pH 5,0 terpėje laikytų HBoV1 VP+VP2 dalelių reaktyvumas su 26 charakterizuotais HBoV1 IgG+ žmonių serumais (12 pav.). Nustatyta, kad netiesioginėje EIA antigenu naudojant nepaveiktas ar termiškai apdorotas VP1+VP2 mVPD, vidutinis tų pačių mėginių optinis tankis yra statistiškai didesnis ($p=1.11 \times 10^{-5}$) nei naudojant HBoV1 VP2 VPD. Šie duomenys leidžia manyti, kad mozaikinėse į virusus panašiose VP1+VP2 dalelėse paviršiuje pateikiami papildomi serumo antikūnų atpažįstami epitopai, kurių prieinamumas nekinta daleles termiškai apdorojus.

Naudojant rūgštine terpe paveiktas mVPD, statistiškai reikšmingo reaktyvumo skirtumo nebuvo nustatyta. Rūgštinis poveikis labiausiai tikėtina sukėlė konformacinius pokyčius, nes NDS-PAGE analizės metu baltymų degradacijos požymių neaptikta. Papildomai įvertinus mVPD reaktyvumą su 24 HBoV1 IgG- serumais, OD, palyginus su reakcija naudojant VP2 VPD, nepakito ($p<0.001$).



12 pav. 26 HBoV1 IgG+ serumų reakcijos su HBoV1 VP2, neveiktomis bei 60°C temperatūra ar rūgštine terpe paveiktomis VP1+VP2 mVPD optinio tankio verčių vidurkiai. ***, $p<0.001$

Ištyrus PARV4 IgG+ serumų reaktyvumą su PARV4 VP1+VP2 mVPD, nustatyta, kad visų 10 testuotų serumų OD naujajame teste buvo didesnės, nors 86 IgG- mėginių OD nepakito (2.7 lentelė). Šie duomenys rodo, kad mozaikinės VP1+VP2 parvovirusų dalelės gali būti naudojamos kaip jautresnė VP2 antigenų alternatyva diagnostiniuose serologiniuose testuose.

2.7 lentelė. Išgaudančios IgG EIA naudojant PARV4 VP2 ir VP1+VP2 į virusus panašias daleles. Antigenai buvo išgaudyti šulinėliuose užsorbuoto PARV4 VP2 specifinio 12E8 MAb. Lentelėje pateikiamos vidutinės trijų bandymų su atitinkamais PARV4 IgG+ serumais arba vidutinė visų IgG-serumų OD vertės.

IgG+ serumo numeris	OD (450 nm), išgaudančioji EIA	
	VP2-VPD	mVPD
19	0.654±0.023	0.908±0.036
20	0.687±0.045	0.871±0.089
31	0.494±0.022	0.501±0.012
84	0.445±0.049	0.564±0.067
85	0.455±0.069	0.649±0.044
112	0.728±0.056	1.018±0.105
113	0.453±0.034	0.489±0.069
138	0.435±0.078	0.579±0.022
209	0.419±0.023	0.724±0.045
216	0.498±0.024	0.818±0.028
IgG- serumų (n=86) OD vidurkis	0.176±0.046	0.179±0.069

IŠVADOS

1. Rekombinantinėse *S. cerevisiae* mielėse susintetinti PARV4, PPV ir HBoV1-4 pagrindiniai kapsidę formuojantys baltymai (VP2) formuoja stabilias ir imunogeniškas į virusus panašias daleles. Jos yra tinkamos diagnostiniams testams ir pelėse sukelia specifinį imuninį atsaką. Efektyviai HBoV2 ir HBoV3 VP2 baltymų sintezei mielėse būtinos genų sekos, optimizuotos raiškai mielėse.
2. Nepagrindinio PARV4 ir HBoV1 virusų kapsides formuojančio VP1 baltymo raiška mielėse yra neefektyvi, tačiau sintetinat šiuos baltymus kartu su VP2 baltymais gaunamos stabilios mozaikinės į virusus panašios dalelės. Šios parvovirusų mVPD gali būti naudojamos kaip antigenai jautresnių diagnostinių testų kūrimui.
3. Ištyrus nepadidintos rizikos Lietuvos pacientų kraujo serumų (n=170), nustatyta, kad 9,4 % jų turi PARV4 specifinių antikūnų, dėl ko galima manyti, kad šis virusas yra perduodamas ne tik per organizmo skysčius.
4. Polikloniniai antikūnai, susidarantys prieš žmogaus bokavirusų 1-4 VP2 baltymą, yra tarpusavyje kryžmiškai reaktyvūs. Panaikinus kryžmiškai reaktyvių antikūnų įtaką, buvo nustatyta, kad HBoV1 specifinių antikūnų yra 44,2 %, o HBoV2-4 – 35,7 % ūmiomis kvėpavimo takų ligomis sergančių ligonių serumo mėginiuose.
5. Mielėse susintetinto kiaulių parvoviruso VP2 baltymo formuojamos VPD yra tinkamos virusui specifinių antikūnų aptikimui kiaulių serumų mėginiuose.
6. Pagrindiniai B ląstelių linijiniai epitopai PARV4 VP2 baltyme yra susitelkę EF, HI ir C-galinėje kilpose.

MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS

Disertacijoje pateikta medžiaga paskelbta šiuose moksliniuose straipsniuose:

Tamošiūnas PL, Simutis K, Kodžė I, Firantienė R, Ėmužytė R, Petraitytė-Burneikienė R, Žvirblienė A, Sasnauskas K. 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 Aug 7;56(5):271-7.

Tamošiūnas PL, Petraitytė-Burneikienė R, Lasickienė R, Akatov A, Kundrotas G, Sereika V, Lelešius R, Žvirblienė A, Sasnauskas K. Generation of recombinant porcine parvovirus virus-like particles in *Saccharomyces cerevisiae* and development of virus-specific monoclonal antibodies. *Journal of immunology research*. 2014 Jun 19;2014.

Tamošiūnas PL, Petraitytė-Burneikienė R, Bulavaitė A, Marcinkevičiūtė K, Simutis K, Lasickienė R, Firantienė R, Ėmužytė R, Žvirblienė A, Sasnauskas K. Yeast-generated virus-like particles as antigens for detection of human bocavirus 1–4 specific antibodies in human serum. *Applied microbiology and biotechnology*. 2016 Jun 1;100(11):4935-46.

Stendiniai pranešimai:

Petraitytė-Burneikienė R, **Tamošiūnas PL**, Lasickienė R, Firantienė R, Ėmužytė R, Žvirblienė A, Sasnauskas K. Production in yeast of human bocavirus 1-4 VP2 virus-like particles and generation of VP2-specific monoclonal antibodies as novel tools for bocavirus serology. 6-asis Europos mikrobiologų kongresas. 2015 m. liepos 7-11 d., Maastichtas, Nyderlandai.

Tamošiūnas PL, Simutis K, Petraitytė-Burneikienė R, Firantienė R, Ėmužytė R, Žvirblienė A, Sasnauskas K. Generation of mosaic virus-like particles of parvoviruses in yeast as antigens for serological assays. 3-iasis Baltijos šalių mikrobiologų kongresas. 2016 m. spalio 18-21 d., Vilnius.

CURRICULUM VITAE

Vardas, pavardė	Paulius Lukas Tamošiūnas
Gimimo data	1984-11-15
Darbo adresas	Eukariotų genų inžinerijos skyrius, Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biotechnologijos institutas Saulėtekio al. 7, LT-10223 Vilnius
Telefonas	+370-678-77447
El. paštas	paulius.tamosiunas@bti.vu.lt
Išsilavinimas	
2003-2007	Biochemijos bakalauras Vilniaus universitetas
2008-2010	Biochemijos magistras Vilniaus universitetas
Darbo patirtis	
2014-	jaunesnysis mokslo darbuotojas, Vilniaus universiteto Biotechnologijos institutas
2010-2014	Biologas-tyrėjas, Vilniaus universiteto Biotechnologijos institutas
2006-2010	Laborantas, Biotechnologijos institutas

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju savo vadovui prof. habil. dr. Kęstučiui Sasnauskui už suteiktas galimybes darbus atlikti VU Biotechnologijos institute, patarimus, idėjas, palaikymą ir paraginimą, kai to labiausiai prireikdavo. Širdingai dėkoju visiems VU Gyvybės mokslų centro Biotechnologijos instituto Eukariotų genų inžinerijos skyriaus vadovui dr. G. Žvirbliui ir kolegoms už darbingą aplinką, patarimus ir pagalbą. Ypatinga padėka skiriama dr. Rasai Petraitytei-Burneikienei, kuri buvo kantriosia visų metodų mokytoja ir pirmoji patarėja iškilusiais klausimais. Dėkoju Biotechnologijos instituto Imunologijos ir ląstelės biologijos skyriaus darbuotojoms Ritai Lasickienei, Indrei Kučinskaitei-Kodzei bei vadovei dr. Aurelijai Žvirblienei už atliktus imunizavimo ir monokloninių antikūnų atrankos eksperimentus, bet kurių šis darbas neturėtų tokios taikomosios vertės. Dėkoju ir kantriosiems studentams: Artiomui Akatovui, Kornelijai Marcinkevičiūtei ir Karoliui Simučiai, kurie leido tobulėti pedagogiškai.

Už vaisingą bendradarbiavimą tiriant žmogaus parvovirusų paplitimą dėkoju dr. R. Ėmužytei ir dr. R. Firantienei (VU Medicinos fakultetas) bei Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Veterinarijos akademijos mokslininkams dr. V. Sereikai ir dr. R. Lelešiui už indėlį tiriant kiaulių parvoviruso paplitimą.

Dėkoju Lietuvos Mokslo Tarybai (LMT) už finansuotą projektą MIP-060/2011 “Naujų žmogaus Parvoviridea šeimos virusų tyrimai ir diagnostika”.

Dėkoju kantriosiems gyvenimo mokytojams – tėvams ir seseriai – už skatinimą tobulėti ir nepasiduoti.

Ir, žinoma, ištikimiausiems bendražygiams ir draugams, ypač Mindaugui, nenustojusiems klausti: „Kada?“.

SUMMARY

Parvoviruses are single-stranded DNA viruses that infect both vertebrates and insects. Those of the smallest viruses known have a diameter of only 18-27 nm and a genome of 4-6 kb. Some animal parvoviruses, like the canine and porcine parvoviruses, are highly contagious with mortality reaching up to 91 % of untreated cases. Until 2005, parvovirus B19 was known as the only pathogenic human parvovirus, causing *erythema infectiosum* and chronic arthralgia. In the recent decade using the high throughput sequencing methods, several new human-infecting parvoviruses were discovered. Human bocavirus 1 was detected in paediatric respiratory samples, and its prevalence was confirmed worldwide with high incidence rate already in the early childhood. In 2010, three more human bocavirus genotypes (HBoV2–4) had been identified in gastrointestinal samples. Human parvovirus 4 was identified in the plasma of an intravenous drug user with the acute viral syndrome, and this pathogen was initially considered to be transmitted by parenteral means and prevalent primarily among high-risk individuals. Data on the clinical significance of these novel human parvoviruses are still sparse, however, HBoV and PARV4 presence in children with encephalitis and encephalopathy show its possible involvement in the pathogenesis of inflammatory neurological diseases. Further studies of these parvoviruses require recombinant viral proteins as tools for both diagnostic and virus structure research purposes.

Animal viruses naturally propagate in mammalian cells, however, the proteins synthesised in such cell cultures for extensive protein production for research and industry is complicated due to cost and yield. Yeasts, on the other hand, offer the ease of microbial growth and gene manipulation found in bacteria as well as the eukaryotic environment and ability to perform many eukaryote-specific post-translational modifications. Yeast-generated viral antigens were previously successfully used to develop sensitive diagnostic assays for viruses from families of *Paramyxoviridae* (Warrerner *et al.*, 2010), *Bunyaviridae* (Petraityte *et al.*, 2008) and other.

This PhD thesis focused on the investigation of yeast *S. cerevisiae* expression system for synthesis of recombinant structural proteins of novel human and economically relevant porcine parvoviruses for virus prevalence studies. In this work for the first time in yeast major structural proteins (VP2) of human parvovirus 4 (PARV4), human bocaviruses (HBoV) 1, 2, 3, and 4, as well as porcine parvovirus (PPV) were synthesised. The recombinant VP2 proteins were purified, and their ability to self-assemble into immunogenic virus-like particles was demonstrated. These antigenic VLPs were employed to estimate for the first time the prevalence of PARV4 and HBoV1-4 viruses within Lithuanian population. Using the recombinant yeast-generated parvoviral VLPs serodiagnostic assays were created and estimated, that 91.6 % of Lithuanian patients with clinically confirmed respiratory tract infections had antibodies recognising HBoV VP2 proteins. After the elimination of cross-reactive antibodies in the competition enzyme immunoassay, 44.2 % patients had HBoV1, and 35.7% of patients had HBoV2-4 specific

antibodies. The serological study of PARV4 prevalence among low-risk individuals in Lithuania revealed the highest rate (9.4 %) reported in Europe to date. Taking into consideration that the patients had no records of parenteral exposure, this study supported the raising objection to the prevailing theory of parenteral PARV4 transmission mode. Detailed B-cell epitope mapping was done to confirm three main epitope locations in PARV4 VP2 protein. Yeast-generated porcine parvovirus VP2 VLPs were evaluated to be suitable for use in virus-specific antibody detection assay and to elicit the PPV-specific immune response in mice. To our best knowledge, the recombinant mosaic virus-like particles composed of major and minor structural parvoviral proteins were generated for the first time in yeast expression system. These mVLPs of HBoV1 and PARV4 were evaluated as more sensitive antigens in EIA in comparison to VP2-only VLPs. All these results show that yeast *S. cerevisiae* is suitable expression system to generate valuable parvoviral antigens.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005 Sep 6;102(36):12891-6.
- Arthur JL, Higgins GD, Davidson GP, Givney RC, Ratcliff RM. A novel bocavirus associated with acute gastroenteritis in Australian children. *PLoS Pathog*. 2009 Apr 17;5(4):e1000391.
- Benjamin LA, Lewthwaite P, Vasanthapuram R, Zhao G, Sharp C, Simmonds P, Wang D, Solomon T. Human parvovirus 4 as potential cause of encephalitis in children, India. *Emerging Infectious Diseases*. 2011; 17:1484-7.
- Berns K & Parish CR Parvovirus. In: Knipes DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, et al. editors. *Fields virology.*, 4th edn. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott, Williams and Wilkins. 2007
- Chandramouli S, Medina-Selby A, Coit D, Schaefer M, Spencer T, Brito LA, Zhang P, Otten G, Mandl CW, Mason PW, Dormitzer PR. Generation of a parvovirus B19 vaccine candidate. *Vaccine*. 2013 Aug 20;31(37):3872-8.
- Chen M. Placental Transmission of Human Parvovirus 4 in Newborns with Hydrops, Taiwan-Volume 17, Number 10—October 2011-Emerging Infectious Disease journal-CDC.
- Chieochansin T, Simmonds P, Poovorawan Y. Determination and analysis of complete coding sequence regions of new discovered human bocavirus types 2 and 3. *Archives of virology*. 2010 Dec 1;155(12):2023-8.
- Cotmore SF, McKie VC, Anderson LJ, Astell CR, Tattersall PE. Identification of the major structural and nonstructural proteins encoded by human parvovirus B19 and mapping of their genes by procaryotic expression of isolated genomic fragments. *Journal of virology*. 1986 Nov 1;60(2):548-57.
- Fang L, Wang Z, Song S, Kataoka M, Ke C, Suzuki T, Wakita T, Takeda N, Li TC. Characterization of human bocavirus-like particles generated by recombinant baculoviruses. *Journal of virological methods*. 2014 Oct 31;207:38-44.
- Guo C, Zhong Z, Huang Y. Production and immunogenicity of VP2 protein of porcine parvovirus expressed in *Pichia pastoris*. *Archives of virology*. 2014 May 1;159(5):963-70.
- Hao Y, Gao J, Zhang X, Liu N, Li J, Zheng L, Duan Z. Seroepidemiology of human bocaviruses 1 and 2 in China. *PloS one*. 2015 Apr 29;10(4):e0122751.
- Hustedt JW, Christie C, Hustedt MM, Esposito D, Vazquez M. Seroepidemiology of human bocavirus infection in Jamaica. *PLoS One*. 2012 May 29;7(5):e38206.

- Jones MS, Kapoor A, Lukashov VV, Simmonds P, Hecht F, Delwart E. New DNA viruses identified in patients with acute viral infection syndrome. *Journal of virology*. 2005 Jul 1;79(13):8230-6.
- Kantola K, Hedman L, Arthur J, Alibeto A, Delwart E, Jartti T, Ruuskanen O, Hedman K, Söderlund-Venermo M. Seroepidemiology of human bocaviruses 1–4. *Journal of Infectious Diseases*. 2011 Sep 15;jir525.
- Kapoor A, Simmonds P, Slikas E, Li L, Bodhidatta L, Sethabutr O, Triki H, Bahri O, Oderinde BS, Baba MM, Bukbuk DN. Human bocaviruses are highly diverse, dispersed, recombination prone, and prevalent in enteric infections. *Journal of Infectious Diseases*. 2010 Jun 1;201(11):1633-43.
- Kapoor A, Slikas E, Simmonds P, Chieochansin T, Naeem A, Shaukat S, Alam MM, Sharif S, Angez M, Zaidi S, Delwart E. A newly identified bocavirus species in human stool. *Journal of Infectious Diseases*. 2009 Jan 15;199(2):196-200.
- Panning M. Novel Human Parvovirus 4 Genotype 3 in Infants, Ghana-Volume 16, Number 7—July 2010-Emerging Infectious Disease journal-CDC.
- Petraityte R, Tamosiunas PL, Juozapaitis M, Zvirbliene A, Sasnauskas K, Shiell B, Russell G, Bingham J, Michalski WP. Generation of Tioman virus nucleocapsid-like particles in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Virus research*. 2009 Oct 31;145(1):92-6.
- Razanskiene A, Schmidt J, Geldmacher A, Ritzi A, Niedrig M, Lundkvist Å, Krüger DH, Meisel H, Sasnauskas K, Ulrich R. High yields of stable and highly pure nucleocapsid proteins of different hantaviruses can be generated in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of biotechnology*. 2004 Aug 5;111(3):319-33.
- Qu XW, Liu WP, Qi ZY, Duan ZJ, Zheng LS, Kuang ZZ, Zhang WJ, Hou YD. Phospholipase A 2-like activity of human bocavirus VP1 unique region. *Biochemical and biophysical research communications*. 2008 Jan 4;365(1):158-63.
- Ros C, Gerber M, Kempf C. Conformational changes in the VP1-unique region of native human parvovirus B19 lead to exposure of internal sequences that play a role in virus neutralization and infectivity. *Journal of virology*. 2006a Dec 15;80(24):12017-24.
- Saikawa TO, Anderson ST, Momoeda MI, Kajigaya SA, Young NS. Neutralizing linear epitopes of B19 parvovirus cluster in the VP1 unique and VP1-VP2 junction regions. *Journal of virology*. 1993 Jun 1;67(6):3004-9.
- Green MR, Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012. Print.
- Sasnauskas K, Buzaitė O, Vogel F, Jandrig B, Razanskas R, Staniulis J, Scherneck S, Krüger DH, Ulrich R. Yeast cells allow high-level expression and formation of polyomavirus-like particles. *Biological chemistry*. 1999 Mar 1;380(3):381-6.
- Sasnauskas K, Jomantien R, Januska A, Lebedien E, Lebedys J, Janulaitis A. Cloning and analysis of a *Candida maltosa* gene which confers resistance to formaldehyde in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*. 1992 Dec 1;122(1):207-11.

- Sato H, Frank DW. ExoU is a potent intracellular phospholipase. *Molecular microbiology*. 2004 Sep 1;53(5):1279-90.
- Schirtzinger EE, Suddith AW, Hause BM, Hesse RA. First identification of porcine parvovirus 6 in North America by viral metagenomic sequencing of serum from pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology journal*. 2015 Oct 16;12(1):170.
- Shah P, Ding Y, Niemczyk M, Kudla G, Plotkin JB. Rate-limiting steps in yeast protein translation. *Cell*. 2013 Jun 20;153(7):1589-601.
- Sharp CP, Lail A, Donfield S, Simmons R, Leen C, Klenerman P, Delwart E, Gomperts ED, Simmonds P. High frequencies of exposure to the novel human parvovirus PARV4 in hemophiliacs and injection drug users, as detected by a serological assay for PARV4 antibodies. *Journal of Infectious Diseases*. 2009 Oct 1;200(7):1119-25.
- Sharp PM, Li WH. The codon adaptation index—a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic acids research*. 1987 Feb 11;15(3):1281-95.
- Slibinskas R, Samuel D, Gedvilaite A, Staniulis J, Sasnauskas K. Synthesis of the measles virus nucleoprotein in yeast *Pichia pastoris* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of biotechnology*. 2004 Jan 22;107(2):115-24.
- Söderlund M, Brown CS, Spaan WJ, Hedman L, Hedman K. Epitope type-specific IgG responses to capsid proteins VP1 and VP2 of human parvovirus B19. *Journal of Infectious Diseases*. 1995 Dec 1;172(6):1431-6.
- Tolfvenstam T, Lundqvist A, Levi M, Wahren B, Broliden K. Mapping of B-cell epitopes on human parvovirus B19 non-structural and structural proteins. *Vaccine*. 2000 Nov 22;19(7):758-63.
- Väisänen E, Paloniemi M, Kuisma I, Lithovius V, Kumar A, Franssila R, Ahmed K, Delwart E, Vesikari T, Hedman K, Söderlund-Venermo M. Epidemiology of two human protoparvoviruses, bufavirus and tusavirus. *Scientific Reports*. 2016;6.
- Warrener L, Slibinskas R, Brown D, Sasnauskas K, Samuel D. Development and evaluation of a rapid immunochromatographic test for mumps-specific IgM in oral fluid specimens and use as a matrix for preserving viral nucleic acid for RT-PCR. *Journal of medical virology*. 2010 Mar 1;82(3):485-93.
- Zhou Z, Gao X, Wang Y, Zhou H, Wu C, Paranhos-Baccalà G, Vernet G, Guo L, Wang J. Conserved B-cell epitopes among human bocavirus species indicate potential diagnostic targets. *PloS one*. 2014 Jan 27;9(1):e86960.