

Sekwencje nukleotydowe obejmujące zmodyfikowane geny paramyksowirusa gołębiego serotypu 1, sekwencje zmodyfikowanych białek tworzące cząstki wirusopodobne oraz ich zastosowanie jako środek do zwalczania i/lub prewencji choroby paramyksowirozy gołębi, zwłaszcza jako szczepionka

Wynalazek dotyczy sekwencji nukleotydowych kodujących zmodyfikowane białka paramyksowirusa gołębiego serotypu 1 (PPMV-1) tworzące cząstki wirusopodobne (VLP) oraz konstrukt je zawierający, jak i sekwencje aminokwasowe w zakresie zmodyfikowanych białek i cząstek wirusopodobnych (VLP). Wynalazek dotyczy ich zastosowania jako środek do zwalczania i/lub prewencji choroby paramyksowirozy gołębiej, zwłaszcza mogące być użyte jako szczepionka przeciwko chorobie paramyksowirozie gołębiej oraz zastosowanie do jego otrzymywania.

Paramyksowiroza gołębi wywoływana jest przez wirusa należącego do pierwszego serotypu ptasich paramyksowirusów (APMV-1). Należy on do rodzaju avulavirów. Jego genom zbudowany jest z jednoniciowego RNA o ujemnej polarności. Na dzień dzisiejszy wyróżnia się szesnaście zróżnicowanych genetycznie typów wirusa. APMV-1 atakujący gołębie różni się od szczepów tego zarazka wykrywanych u drobiu. Wariant gołębi tego wirusa został sklasyfikowany do antygenowej grupy P (pigeon variants) oraz genetycznej grupy 4b i opisywany jest symbolem PPMV-1 (Pigeon Paramyxovirus Type 1). Choroba Newcastle, inaczej rzekomy pomór drobiu, u gołębi nazywana jest paramyksowirozą i wywoływana jest przez antygenowy „wariant gołębi” ptasiego paramyksowirusa serotypu 1 (PPMV-1). Jest to choroba wysoce zaraźliwa, powodująca niekiedy 100% śmiertelność.

Wirus paramyksowirozy gołębi inaczej nazywany też wirusem rzekomego pomoru drobiu przenosi się pomiędzy różnymi gatunkami ptactwa, ale też może infekować gady, ssaki oraz ludzi. Wśród ptaków wirus APMV-1 infekuje przynajmniej 241 gatunków należących do 27 z 50 rzędów. Możliwe jest, że wszystkie gatunki ptaków są podatne na infekcję, ale choroba może przybierać między nimi różne formy. Izolaty APMV-1 są często uzyskiwane z dzikiego wędrownego ptactwa oraz ptaków wodnych. Większość tych izolatów posiada niską wirulencję u drobiu hodowlanego. Jedną z najbardziej znaczących eskalacji choroby wśród dzikich ptaków była ta zaobserwowana u kormorana rogatego w północnej Ameryce w latach dziewięćdziesiątych XX wieku. Po niedługim czasie infekcja przeniosła się na hodowlę indyków. Również ptaki w chowie klatkowym nie są bezpieczne przed wirusem. Do infekcji dochodzi zwykle w stacjach przetrzymujących zwierzęta przed

eksportem, enzootycznie lub przez rozprzestrzenienie się z hodowlanego ptactwa, jeśli znajduje się w pobliżu. Najbardziej narażone na zakażenie są ptaki klatkowe transportowane i sprzedawane w sposób nielegalny. W ptactwie domowym różne szczepy wirusa rzekomego pomoru drobiu były izolowane z różnorodnych gatunków ptactwa, od gołębi po strusie.

Rzekomy pomór drobiu może przenosić się pomiędzy osobnikami jednego gatunku, a także międzygatunkowo na wiele różnych sposobów. Drogą przenoszenia się tego wirusa jest infekcja przez inhalację.

Taki rodzaj infekcji może być wynikiem dostania się cząsteczek wirusa do płynów, które następnie wejdą w kontakt z ptactwem w formie kropel lub aerozoli. Może to być spowodowane replikacją wirusa w układzie oddechowym ptaków lub zanieczyszczeniem wody. Fekalia wydane przez zakażone zwierzęta mogą również zawierać cząsteczki wirusa, które uwolnią się po ich wyschnięciu. Co więcej, w trakcie infekcji dróg oddechowych mogą tworzyć się aerozole zdolne pokonać znaczne odległości przed zakażeniem podatnego gospodarza.

Możliwa jest infekcja przez przyjęcie pokarmu. Przypadek wybuchu zachorowań wśród kur w Wielkiej Brytanii potwierdził możliwość przenoszenia choroby drogą pokarmową. Drób zachorował po spożyciu paszy zanieczyszczonej odchodami oraz padliną dzikich gołębi. Zauważalną właściwością tego typu infekcji jest jej wolne tempo rozprzestrzeniania się w stosunku do infekcji przez inhalację. Możliwa jest też transmisja pionowa.

Nie jest do końca wyjaśnione, czy choroba występująca u młodych kurcząt została nabyta poprzez kontakt zwierzęcia z zakażonym materiałem, czy przekazana od rodzica. Wiadome jest, że po zaszczepieniu szczepionka La Sota znajduje się także w jajnikach, jajowodach oraz macicy. Mimo to najbardziej prawdopodobnym źródłem zakażeń są zanieczyszczenia na skorupkach, materiały pakowne lub samochody do przewozu drobiu.

Wędrowną naturą ptaków wodnych oraz pobrane od nich izolaty patogenicznego wirusa choroby Newcastle zbieżne z izolatami z drobiu hodowlanego podczas epizootii sugeruje możliwość przeniesienia wirusa na duże dystanse. Kolejnym ważnym elementem na drodze przenoszenia choroby są egzotyczne ptaki głównie z rodziny papugowatych. To właśnie w wyniku importu tych zwierząt w roku 1971 wystąpił pierwszy wybuch epizootii

spowodowany welogenicznym wicerotropicznym typem APMV-1. W tym samym czasie podobne wydarzenia miały miejsce w różnych częściach świata.

Ludzie mogą przenosić wirusa w sposób mechaniczny – na sobie, na używanym sprzęcie, bądź jako wynik infekcji, który u ludzi objawia się zwykle jako zapalenie spojówek. Najgroźniejszy jest przy tym fakt szybkiego przemieszczania się ludzi oraz w przypadku wyspecjalizowanych pracowników, współpraca z wieloma fermami, co może prowadzić do zakażenia ogromnej ilości osobników.

Kolejnym możliwym sposobem przedostawania się wirusa pomiędzy zainfekowanymi, a podatnymi na infekcję ptakami, są latające insekty oraz wiele innych zwierząt, które w sposób mechaniczny mogą przenosić cząsteczki wirusa. Oprócz tego istnieje wiele gatunków zwierząt, które tak jak człowiek są nośnikami umożliwiającymi replikację wirusa. Warto także wspomnieć o możliwości zakażenia wirusem podczas szczepień ochronnych. Ten rodzaj przenoszenia choroby jest w tej chwili prawie niespotykany ze względu na rozwój techniki, lecz występowały przypadki w których szczepionki były zanieczyszczone żywym wirusem lub inaktywowane w niewystarczającym stopniu.

Okres inkubacji po zakażeniu wirusem może wahać się od 2 do 15 dni, u niektórych gatunków infekcja może zająć nawet 20 dni. Infekcje wirusem APMV-1 mogą wywoływać szeroki wachlarz objawów klinicznych. Zdolność wirusa do wywoływania tak różnorodnych objawów jest zależna nie tylko od jego patogenności, ale również od gatunku gospodarza, jego wieku, czy równoczesnej infekcji innymi patogenami. Śmiertelność i zachorowalność zależą głównie od tego, jakim szczepem wirusa zostanie zakażony organizm. Możemy wyróżnić 5 głównych szczepów. Asymptotyczny – bezobjawowa lekka infekcja przewodu pokarmowego, niegroźna dla zdrowia gospodarza. Lentogeniczny – bardzo lekkie zapalenie układu oddechowego, kaszel, kichnięcia, dreszcze, śmiertelność jest znikoma. Mezogeniczne – śmiertelność przy zakażeniach tym szczepem jest zwykle niska i wynosi do 10%. Może wywoływać ostre zapalenie dróg oddechowych, a u niektórych gatunków także symptomy neurologiczne. Welogeniczny neurotropiczny – przy zakażeniu nim śmiertelność jest niemal 100%, poprzedzają ją zwykle ostre zapalenia układu oddechowego oraz układu nerwowego, do których można zaliczać drgawki, spazmy, paraliż kończyn oraz kurczowy skręt szyi. Welogeniczny wicerotropiczny – najbardziej śmiertelny szczep choroby Newcastle, w przewodzie

pokarmowym występują krwotoczne uszkodzenia, mogą również występować opuchnięcia i nekrozy.

Przy zakażeniach szczepami welogenicznymi w niektórych przypadkach żadne z oznak mogą nie występować, lecz choroba kończy się wtedy gwałtowną śmiercią. Występują także dodatkowe objawy takie jak wodniste biegunki, duszności czy zapalenia w głowie i szyi, często nabierające niebieskawego zabarwienia, spada również nieśność kur.

Aktualne szczepionki przeciw APMV-1 składające się głównie z żywych nisko patogennych (dla kur) lub inaktywowanych wirusów (dla gołębi) nie chronią w pełni przed zakażeniami szczepami wysoko patogennymi. Znane są też szczepionki oparte na rekombinowanych (żywych) herpeswirusach indyjskich, które posiadają w swojej strukturze białko fuzyjne NDV. Jednakże brakuje szczepionek w pełni bezpiecznych i zarazem tanich w produkcji, które w razie potrzeby (pojawienia się nowego szczepu wirusa) mogłyby być wyprodukowane w krótkim okresie czasu.

W immunoprofilaktyce paramyksowirozy gołębi nie używa się szczepionek żywych, gdyż są mało immunogenne, a w przypadku gołębi pocztowych może dojść do rozprzestrzenienia się wirusa szczepionkowego na tereny, gdzie nie stosuje się szczepień przeciwko wirusowi ND. Warto zaznaczyć, że szczepienie nie zapobiega zakażeniu, czyli replikacji PPMV-1, a tylko powstrzymuje wystąpienie objawów klinicznych. Nie wiadomo jednak, jaką skuteczność szczepionki wykazują w odniesieniu do nowo odkrytego wariantu genetycznego PPMV-1 – 4a. Dlatego szczepienia powinny stanowić jeden z elementów strategii zwalczania wirusa PPMV-1, na równi z efektywną bioasekuracją. Jednak specyfika chowu gołębi (loty, wystawy) sprawia, że przestrzeganie zasad bioasekuracji staje się niemożliwe.

Wciąż poszukuje się metod skutecznych w zwalczaniu choroby Paramyksowirozie gołębiej i zapobieganiu zakażeniu APMV-1, zwłaszcza PPMV-1.

Wiriony paramyksowirusów są pleomorficzne, zwykle sferyczne, czasem spotyka się budowę filamentową, dla której długość może wynosić nawet 10  $\mu\text{m}$ . Klasyczny wirion ma około 150 nm średnicy, jest zbudowany z otoczki lipidowej, warstwy białek oraz nukleokapsydu. Otoczka wirusowa pochodzi z błony komórkowej i zawiera dwie lub trzy zatopione w niej rodzaje glikoprotein.

Genom APMV-1 występuje w formie jednoniciowego RNA o ujemnej polarności. Posiada on około 15 tysięcy nukleotydów i koduje 7 białek o wielkości 5-250 kDa. Znajduje się on w nukleokapsydzie o wydłużonym kształcie o długości od 600 do 800nm i szerokości 13 do 18 nm.

Wszystkie paramyksowirusy posiadają w swojej budowie kilka białek posiadających takie same funkcje w całej rodzinie wirusów.

Białko fuzyjne - F jest odpowiedzialne za przyłączanie wirusów do błony komórkowej, co inicjuje dalsze wchłonicie wirusa do komórki, proces ten zachodzi w obojętnym pH. Co więcej, wystąpienie białka F na powierzchni komórki skutkuje wytworzeniem syncytiów, umożliwia to wirusowi przemieszczanie się do nowych niezakażonych komórek bez konieczności wydostawania się poza komórkę. Glikoproteina ta składa się z 529 do 565 aminokwasów i występują w niej trzy domeny hydrofobowe, na końcu N, na końcu C oraz około setnego aminokwasu. Domena znajdująca się natomiast na końcu C, między 480 a 520 aminokwasem funkcjonuje jako domena transmembranowa zakotwicząca białko w błonie lipidowej.

Drugą ważną glikoproteiną wirusa jest hemaglutynina-neuraminidaza, która występuje na powierzchni wirusów w postaci homo-oligomerów. Podobnie jak białko F tak i HN są syntetyzowane w postaci nieaktywnego prekursora HN0, który następnie jest aktywowany poprzez obróbkę proteolityczną – odcięcie dziewięćdziesięciu aminokwasów z końca C łańcucha. Uważane jest, że aktywacja proteolityczna glikoproteiny HN wpływa na wirulencję wirusa, gdyż w szczepach lentogenicznych do takiej obróbki nie dochodzi. Białko HN zawiera od 565 do 582 aminokwasów. Występuje w nim jedna domena hydrofobowa o długości 22-28 aminokwasów i zaczyna się około 17 do 32 aminokwasów od końca N. Pełni ona funkcję domeny przezbłonowej, a także peptydu sygnałowego dla glikozylacji.

Białko M pełni kluczową rolę w składaniu dojrzałych wirusów po replikacji. Białko to kieruje nukleokapsyd do miejsc w błonie, na których występują powierzchniowe glikoproteiny wirusa. Dzieje się to przy pomocy oddziaływań hydrofobowych oraz jonowych. Aby doszło do wytworzenia cząstek wirusa, musi wystąpić określona ilość białka M w komórce. Białko jest hydrofobowe ze względu na występowanie dużej ilości reszt hydrofobowych aminokwasów 32-38% i może mieć to związek z jego

oddziaływaniami z błoną komórkową oraz białkami nukleokapsydu - NP. Białko M składa się z 341 do 375 aminokwasów, a jego masa cząsteczkowa wynosi około 40 kDa. Jest to też jedyne białko paramyksowirusów, które samoistnie jest w stanie stworzyć cząsteczkę podobną do wirusa.

Gen P koduje u paramyksowirusów trzy białka. Są to białka P, V oraz W. Zakłada się, że białko P (fosfoproteina) odgrywa ważną rolę w procesie transkrypcji, a bogate w cysteinę białko V posiada funkcje regulatorowe w tym procesie. Białko P o wielkości około 50 kDa pełni rolę kofaktora polimerazy. Ostatnim z białek powstających z transkrypcji genu p jest białko W, które jest bardzo podobne do białka V w budowie oraz funkcji. Różnią się one jedynie ilością nie matrycowych guanidyn dodawanych w obróbce potranskrypcyjnej.

Białko nukleokapsydu NP jest ściśle związane z utrzymaniem struktury wirusowego RNA, oddziałuje ono także z białkami P i L (polimeraza wirusowa) w kompleksie nukleokapsydu. Białko jest złożone z 489 do 553 aminokwasów, a końce N oraz C tego białka wykazują znaczną hydrofilowość. Oddziaływanie białka z RNA zachodzi poprzez koniec 5'genomu lub antygenomowego RNA. Białko NP jest uznawane za czynnik odpowiadający za przełączanie maszynarii pomiędzy transkrypcją a replikacją.

Białko L (ang. large protein) jest wielofunkcyjnym białkiem, które jest polimerazą RNA zależną od RNA. Uczestniczy ono również w tworzeniu sekwencji liderowych, dodawaniu czapeczki, metylacji oraz poliadenylacji mRNA. Jest to największe białko paramyksowirusów złożone z 2204 do 2233 aminokwasów, a zarazem najmniej liczne w dojrzałym wirusie.

Replikacja wirusa zachodzi w cytoplazmie. Wirus przyłącza się do komórki gospodarza przy pomocy glikoproteiny HN. Następnie następuje fuzja błon, a nukleokapsyd jest uwalniany do cytoplazmy. W tym momencie, w cytoplazmie następuje sekwencyjna transkrypcja, wirusowe mRNA jest poliadenylowane oraz dodawana jest czapeczka. Replikacja cząsteczek zaczyna się, gdy zostanie osiągnięte odpowiednie stężenie białek budujących nukleokapsyd (takie które pozwoli na otoczenie nowo zsyntetyzowanych genomów). Rybonukleokapsyd oddziałuje z białkiem M pod błoną cytoplazmatyczną, a następnie wirus odpączkowuje przy pomocy kompleksu ESCRT.

Cząstki wirusopodobne – VLP's (ang. Virus-like particles) są podjednostkowymi, samoskładającymi się strukturami z identyczną lub bardzo zbliżoną strukturą do wirusa, z

którego pochodzą. Nazwa cząsteczki podobne do wirusa - używane są do określania kilku obiektów biologicznych takich jak: niescharakteryzowane struktury posiadające morfologię wirusa znajdujące w próbach biologicznych, puste struktury pochodzenia wirusowego niezawierające kwasów nukleinowych, infekcyjne wirusy ze zmianami strukturalnymi wprowadzonymi chemicznie lub genetycznie oraz samoskładające się produkty genów powstałe na skutek ekspresji genów strukturalnych wirusa w systemie produkcji białek. Pierwszym, a zarazem najbardziej przełomowym wykorzystaniem VLP było stworzenie szczepionek przeciwko wirusowi zapalenia wątroby typu B oraz wirusowi brodawczaka ludzkiego. Po publikacji wyników klinicznych zainteresowanie wykorzystaniem cząsteczek podobnych do wirusa znacznie wzrosło. Istnieje także wiele badań twierdzących, że symetryczne i wysoko powtarzalne ułożenie aminokwasów w cząstkach VLP umożliwia silną odpowiedź zarówno komórkową jak i humoralną, nawet bez użycia adjuwantów. Historycznie, pierwsze cząstki podobne do wirusa zostały uzyskane poprzez ekspresję genów otoczki białkowej wirusa HBV oraz antygeny powierzchniowego wirusa HBV wklonowanych do genomu wirusa mozaiki tytoniu.

Cząstki podobne do wirusa posiadają ogromny potencjał w wielu obszarach zastosowań. Oprócz szczepionek, VLP mogą być wykorzystywane, jako nośniki substancji w terapii genowej oraz przy produkcji nanomateriałów, które składają się z różnego rodzaju cząstek podobnych do wirusów.

Znane jest zastosowanie VLP w zastosowaniu jako składnik antygenów, w zapobieganiu zakażeniom np. ze zgłoszenia P. P.430234.

Stąd celem wynalazku jest opracowanie dedykowanych sekwencji w zakresie cząsteczek VLP, które nadają się do wyprodukowania w olbrzymich ilościach w systemie bakulowirusowym.

Cel został osiągnięty poprzez opracowanie cząstek wirusopodobnych powstałych na bazie trzech wybranych genów M-seq.4 lub F-seq.3 lub HN i mCherry-seq.2 paramyksowirusa gołębiego PPMV-1, które zostały zmodyfikowane oraz zoptymalizowane do produkcji w systemie bakulowirusowym do zastosowania w zwalczaniu i/lub prewencji paramyksowirozy gołębi i zakażeniom PPMV-1. Wynalazek obejmuję zatem również sekwencje pokazaną jako seq. 1, która stanowi złożenie sekwencji 2, 3 i 4 oraz dodatkowe

fragmenty pomiędzy nimi. Kolejny wynalazek to wynik ekspresji seq. 2, seq 3 i seq 4 czyli białka odpowiadające sekwencjom aminokwasowym seq 5, seq 6 i seq 7.

Wynalazek dotyczy trzech sekwencji nukleotydowych jak również ich połączenia jako cały konstrukt pokazany jako seq.1, które podczas ekspresji w systemie bakulowirusowym/komórek owadzych prowadzi do powstania białek seq.5, seq.6 oraz seq.7 składających się w cząstki wirusopodobne. Możliwym jest uzyskanie tych białek w inny sposób również.

Wynikiem opracowanej sekwencji nukleotydowej jest dana sekwencja aminokwasowa, które następnie prowadzą do składania się struktur VLP. Finalnie, te struktury są używane jako środek do wzbudzania odpowiedzi humoralnej czyli jako środek w wprewencji i/lub zwalczaniu zakażeń wirusem PPMV-1. Wykazano, że cząstki wirusopodobne na bazie wynalazku są w stanie wzbudzić humoralną odpowiedź w immunizowanych gołębiach co wskazuje na ich zastosowanie jako szczepionek.

Wynalazkiem są trzy sekwencje nukleotydowe odpowiadające modyfikowanym genom F (seq. 3), HNmCherry (seq. 2 ) i M (seq. 4) wirusa PPMV-1 tworzących jeden konstrukt (seq. 1) kodujące białka według seq. 5-7, które prowadzą do powstania cząstek wirusopodobnych. Wynalazkiem jest również zastosowanie tych cząstek w celu prewencji/zwalczaniu zakażeniom wirusem PPMV-1, zwłaszcza w produkcji szczepionki dla gołębi oraz zastosowanie do otrzymywania środka w celu prewencji/zwalczaniu zakażeniom wirusem PPMV-1.

Zaletą jest to, że wynalazek stanowi układ sekwencji nukleotydowych, który zwłaszcza ulegając ekspresji w systemie bakulowirusowym umożliwiają powstanie immunogennych cząstek wirusopodobnych do zastosowań jako środek w prewencji/zwalczaniu zakażeniom wirusem PPMV-1, w tym jako szczepionka. Dotychczasowe szczepionki dla gołębi opierają się na pełnym inaktywowanym wirusie NDV co z jednej strony stanowi zagrożenie w procesie produkcyjnym (uwolnienie wirusa do środowiska) lub niepełnej inaktywacji (choroba ptaka). Zastosowanie preparatu opartego na przedstawionym wynalazku pozwoli na pełne wykluczenie tych dwóch zagrożeń. Dodatkowo dzięki zastosowaniu postaci VLP w tym środku, zwłaszcza jako szczepionka nie ma kontaktu z pełnym składem cząstki wirusowej w wyniku czego jest

możliwe (w przeciwieństwie do konwencjonalnych szczepionek) odróżnienie ptaka szczepionego od tego, który zachorował w przeszłości lub choruje aktualnie.

Wynalazek pokazano na sekwencjach co opisano poniżej.

Sekwencja 1 pokazuje ułożenie zmodyfikowanej sekwencji trzech genów PPMV-1 (seq.2, seq.3, seq.4) oraz elementów genomu ACMNPV.

Sekwencja 2 pokazuje modyfikowaną sekwencję genu HN wirusa PPMV-1 w fuzji z genem czerwonej fluorescencji mCherry o kodonach optymalizowanych do systemu bakulowirusowego,

Sekwencja 3 pokazuje modyfikowaną sekwencję genu F wirusa PPMV-1 o kodonach optymalizowanych do systemu bakulowirusowego

Sekwencja 4 pokazuje modyfikowaną sekwencję genu M wirusa PPMV-1 o kodonach optymalizowanych do systemu bakulowirusowego

Sekwencji 5 pokazuje sekwencję aminokwasową białka powstającego na podstawie genu seq.2

Sekwencja 6 pokazuje sekwencję aminokwasową białka powstającego na podstawie genu seq.3

Sekwencja 7 pokazuje sekwencję aminokwasową białka powstającego na podstawie genu seq.4.

Sekwencja 1 jest konstruktem. Seq 2-4, która ulega ekspresji tworząc białka o seq 5-7, a te prowadzą do powstania form VLP, które mają zastosowanie jako środek w prewencji/zwalczaniu zakażenia PPMV-1.

Schemat finalnego konstruktów pokazano na fig. 1 - Schematyczne przedstawienie budowy cząstki wirusopodobnej powstałej na podstawie sekwencji nukleotydowej i aminokwasowej będącej przedmiotem wynalazku.

Na fig.2 pokazano schematyczne przedstawienie ułożenia genów (seq. 2-4) w konstrukcie (seq. 1) do ekspresji białek (seq. 5-7) składających się w cząstkę PPMV-1-VLP. Potwierdzenie zastosowania wynalazku opisano w przykładzie. Dodatkowo na fig. 3 pokazano wynik western blot wykonany z użyciem surowicy gołębiej 039p (rozcieńczenie 1:400) po szczepieniu oczyszczonym VLP. Na zdjęciu wykrywane są białka

bakulowirusowe w ścieżce WT Bac oraz białko HN w ścieżkach PPMV-1-VLP, PPMV oraz LaSota. Fig 4 pokazuje wynik western blot wykonany z użyciem surowicy gołębiej 102p (rozcieńczenie 1:400) po szczepieniu oczyszczonym VLP. Na zdjęciu wykrywane są białka bakulowirusowe w ścieżce WT Bac, białko HN w ścieżce PPMV-1-VLP oraz białko M w ścieżkach PPMV oraz LaSota.

Cząstki podobne do wirusa – VLP gołębiego paramyksowirusa PPMV-1 według wynalazku zawierają trzy typy zmodyfikowanych białek: białka M (seq.7) (kodowane przez seq. 4), białka macierzy, białka F(seq.6) (kodowane przez seq. 3) i białka fuzyjnego oraz białka HN(seq.5)- hemaglutyniny-neuraminidazy bodącej w fuzji z białkiem fluorescencyjnym mCherry (kodowane przez seq. 2). Białka M budują wewnętrzną kolistą strukturę cząsteczki tworząc jej szkielet, białka HNmCherry oraz F są natomiast zakotwiczone w błonie i prezentowane na zewnętrznej stronie cząsteczki.

Geny w konstrukcie seq.1 ułożone są naprzemiennie, seq.2-gen HNmCherry ( HN w fuzji z genem białka fluorescencyjnego mCherry) oraz seq.3-gen F kodowane są od końca 5' gdzie posiadają promotor do końca 3' na którym znajduje się terminator umieszczone są one na nici kodującej. Promotory oraz terminatory tych genów zostały stworzone na podstawie sekwencji promotorowej i terminatorowej genu polihedryny wirusa AcMNPV . Gen M-seq.4 natomiast umieszczony jest w ten sam sposób ale na nici komplementarnej, w tym przypadku zastosowano zmodyfikowany promotor i terminator genu p10 wirusa AcMNPV.

#### Przykład

Aby otrzymać koekspresję białek PPMV-1 postanowiono stworzyć bakulowirusa zawierającego wszystkie trzy białka potrzebne do powstawania VLP. Z powodu braku dostępnego wektora do ekspresji trzech białek w systemie bakulowirusowym zdecydowano na stworzenie własnego plazmidu na podstawie pFastbac Dual poprzez proces składania Gibsona (Gibson assembly).

Klonowanie konstruktów.

W celu stworzenia plazmidu należało wykonać po 6 reakcji PCR na istniejących matrycach pFastBac zawierających wcześniej wklonowane geny M- seq.4, F-seq.3 oraz HNmCherry-seq.2 oraz pFastBac Dual (Thermo Fisher Scientific).

Po ligacji zgodnej z zaleceniami producenta (New England Biolabs) transformowano mieszaniną ligacyjną komórki kompetentne. W tym celu do rozmrożonych komórek dodano całość mieszaniny ligacyjnej, wymieszano i umieszczono na 30 minut w lodzie. Następnie dokonano szoku termicznego bakterii umieszczając je w termobloku (42°C) na minutę, po czym szybko przeniesiono je na 2 minuty do lodu. Do próbki dodano 900 µl pożywki LB bez antybiotyku, wymieszano przez kilkukrotne odwracanie próbówki i umieszczono w wytrząsarce w temperaturze 37°C na 1 godzinę. Po inkubacji komórki wysiano na płytki z ampicyliną (końcowe stężenie 100 µg/ml) metodą posiewu gładzonego używając 100 µl zawiesiny komórkowej. Płytki umieszczono na noc w cieplarni w 37°C.

#### Amplifikacja konstruktów.

W celu namnożenia plazmidów pożywkę płynną LB z ampicyliną rozporcjowano po 5ml do 50ml probówek typu falkon. Otrzymane na płytkach kolonie przepikowano pojedynczo przy użyciu końcówek do pipet do osobnych, ponumerowanych probówek. Probówki przeniesiono do wytrząsarki powietrznej i hodowano w 37°C przez noc.

Pięciomililitrowe nocne hodowle bakteryjne odwirowano przez 8 minut przy 8 tysiącach RPM. Supernatant zlano, a osad użyto do oczyszczenia plazmidowego DNA z użyciem zestawu Plasmid mini (A&A biotechnology).

#### Sekwencjonowanie nowej generacji.

W celu sprawdzenia poprawności sekwencji plazmidy zostało dodatkowo zsekwencjonowane za pomocą sekwentora MinION (Oxford Nanopore Technologies).

#### Transpozycja genów do bakmidu.

Następnie transformowano komórki E.coli DH10 aby zaszła transpozycja genów z plazmidu do bakmidu który został w kolejnych punktach wykorzystany do transfekcji komórek owadzi SF9.

#### Namnożenie i oczyszczanie bakmidu.

Bakmidy zostały namnożone w dużej objętości pożywki (300 ml pożywki LB wraz z antybiotykami gentamycyną-7 µg/ml i kanamycyną-50 µg/ml) i inkubowane przez noc w 37°C a następnie oczyszczone przy użyciu zestawu ZymoPURE Plasmid Midiprep Kit (Zymo Research).

Transfekcja, namnażanie bakulowirusa i nadprodukcja białek.

Do transfekcji komórek SF9 użyto środka do transfekcji Lipofektyna (Thermo Fisher Scientific) zgodnie z instrukcją dostarczoną przez producenta.

Wirus został następnie namnożony i pasażowany trzykrotnie do uzyskania wysokiej ilości infekcyjnych cząstek bakulowirusa. Tak przygotowane wirusy zostały użyte do nadprodukcji białek.

Białka nadprodukowano poprzez zakażenie komórek owadzych o gęstości  $2,5 \times 10^6$  komórek na ml odpowiednią ilością wirusa- MOI=5 co oznacza dodanie 5 infekcyjnych cząsteczek wirusa na jedną komórkę. Tak przygotowane hodowle inkubowano 4 doby w 27°C z wytrząsaniem.

#### Oczyszczanie PPMV-11-VLP

Komórki owadzie odwirowano a pożywkę poddano ultrawiroowaniu w celu osadzenia cząstek VLP. Osad zawieszono w buforze TNE i dwukrotnie ultrawiroowano na gradientach sacharozy. Odpowiednie prążki zbierano, dodano buforu do rozpuszczenia sacharozy poniżej ilości 5%. Cząstki osadzono i zawieszono w buforze TNE.

Tak przygotowane cząsteczki wraz z adjuwantem użyto do immunizacji gołębi. Immunizację powtórzono po 4 tygodniach. Po kolejnych 4 tygodniach pobrano gołębiom krew z której wyizolowano surowice. Zostały one następnie poddane analizom z użyciem metody western blot.

#### Western blot.

Zmierzono ilości białek w każdym z preparatów przy użyciu metody BCA. Do każdej ze studzienek w żelu poliakrylamidowym ( rozdzielający-12%, zagęszczający-5%) nałożono 50µg białka dzikiego bakulowirusa (WT-Bac) lub oczyszczonego PPMV-1-VLP lub wirusa PPMV-1 lub wirusa APMV-1 szczepu LaSota z dodanym buforem denaturująco-obciążającym. Rozwijanie żelu prowadzono w żelu zagęszczającym przy

130V a gdy próbki weszły w żel rozdzielający przy 180V. Po zakończeniu rozdzielania wykonano transfer póluchy na błonę PVDF z użyciem buforu i aparatury Trans-Blot Turbo (Bio-Rad). Błony z białkami inkubowano następnie w 5% odtłuszczonego mleku przez noc w celu wyblokowania niespecyficznego sygnału. Surowice gołębie (039p lub 102p) rozcieńczono mlekiem (1:400) i inkubowano w nich błony przez 1 godzinę. Następnie błony płukano w buforze TBS-T czterokrotnie po 5 minut energicznie wytrząsając. W tym czasie przygotowano przeciwciała drugorzędowe sprzężone z peroksydazą chrzanową w mleku (1:2000). Odpłukane błony inkubowano 1 godzinę z przeciwciałami drugorzędowymi. Po inkubacji dokonano identycznego płukania jak po przeciwciałach pierwszorzędowych. W celu obserwacji reakcji na błonie użyto zestawu SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific) zgodnie z instrukcją producenta.

Na obydwu przedstawionych figurach 3 i 4 można zaobserwować sygnał we wszystkich ścieżkach. Przy czym sygnał najsilniejszy jest dla ścieżki PPMV-1-VLP (preparat na bazie cząstek VLP). Wykryte sygnały w ścieżkach PPMV (wirus paramyksowirusy gołębi) oraz LaSota (wirus szczepionkowy APMV-1) świadczą o wzbudzeniu odpowiedzi humoralnej w immunizowanych gołębiach. Surowice gołębi nieszczepionych nie wzbudziły sygnału w ścieżkach PPMV i LaSota.

Powstały sygnał (będący eksperymentalnym urzeczywistnieniem obecności specyficznych przeciwciał skierowanych przeciw białkom VLP w surowicy gołębia) przedstawiony na Fig. 3 i Fig. 4 jest bezpośrednim dowodem na wzbudzenie odpowiedzi humoralnej w immunizowanym gołębiu. Cząstki PPMV-1-VLP znajdujące się w preparacie służącym do immunizacji gołębi powstały dzięki ekspresji genów odpowiadających seq.2-4 znajdujących się w konstrukcie odpowiadającym seq. 1. W wyniku ekspresji wymienionych genów powstały trzy białka posiadające sekwencje aminokwasowe odpowiadające seq. 5-7. Na bazie tych białek, spontanicznie powstały cząstki PPMV-1-VLP. Podanie tych cząstek do organizmu ptaka spowodowało wytworzenie się przeciwciał skierowanych przeciwko białkom zawartym w cząstce PPMV-1-VLP. Przeciwciała te są wykrywane w surowicy zwierzęcia dzięki metodzie westernblot. Obecność przeciwciał powstałych po podaniu preparatu jest warunkiem koniecznym aby preparat uznać za możliwy do wykorzystania do szczepień.