

Genetikailag módosított vírusok és rekombináns vakcinák

Szakdolgozat

biológia alapszak, biológus szakirány

készítette:

Tod Pál

témavezető:

Dr. Orosz László egyetemi tanár, MTA r. tagja

Genetikai Tanszék

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
BIOLÓGIAI INTÉZET



Budapest, 2013

Tartalomjegyzék

Bevezetés.....	3
Vírusok és a vakcinálás felfedezése.....	3
2. fejezet.....	4
Teljes genom szekvenálás és szintézis. Poliovírus attenuálásának lehetőségei	4
3. fejezet.....	9
Főemlősök és haszonállatok vakcinálásának lehetőségei vírusok ellen.....	9
Nem emberszabású főemlősök vakcinálása Ebola és Marburg vírus ellen	9
Juhok immunizálása rekombináns Capripoxvírus vakcinával.....	11
Rekombináns vakcina előállítására száj- és körömfájás betegséget okozó vírus ellen sertésekben	13
4. fejezet.....	16
Emberi vonatkozású vírusok és vakcinák	16
Hepatitisz B vírus elleni vakcináció.....	16
Az influenzavírus.....	18
Az influenza vírus és az A típusú influenza vírus módosításának lehetőségei	18
Az univerzális influenza vakcina megvalósítási lehetőségei.....	19
A madárinfluenza vírus.....	20
Példa rekombináns madárinfluenza vakcina kifejlesztésére.....	21
Vakcina gyártás növényi sejtek által.....	23
Az influenza B vírus.....	24
Az Influenza C vírus.....	26
Összefoglalás	29
Summary	30
Köszönetnyilvánítás.....	31
Felhasznált irodalom	32
NYILATKOZAT.....	37

Bevezetés

Vírusok és a vakcinálás felfedezése

„A vírusok olyan élősködők, amelyek csak a gazdasejten belül képesek szaporodni, életsiklusuk során felhasználják annak nukleinsav komponenseit, a fehérjeszintézishez szükséges összetevőket és anyagcsere-folyamatokat. A vírusok genetikai állományának mérete és természete fontos jellemzője az adott vírusnak, rendkívül fontos ezek ismerete.” (Erdei Anna, 2012)

A vírusok durván feloszthatók két nagy csoportra, a DNS-, és az RNS-genommal rendelkezőkre. DNS-genomú többek között a himlő vagy a herpeszvírusok. Léteznek olyan DNS-vírusok, például a hepatitis B, amelyek genomja a szaporodás során RNS-ből átíródik DNS-sé. A HIV vírus olyan RNS-vírusok közé tartozik, amelyek a képződő DNS-e képes a gazdasejt genomjába beépülni. Az influenzavírusok negatív szálú RNS-sel rendelkeznek, reverz transzkriptáz enzim segítségével erről pozitív szálú RNS-másolat képződik, majd ezt követően indul el a transzláció. (Erdei Anna, 2012)

Edward Jenner angol orvos 1776-ban megfigyelte, hogy a teheneket fejő emberek elkaphatják az enyhe lefolyású tehénhimlőt, viszont a halálos himlőjárványok alatt nem betegedtek meg. Ez alapján tehénhimlővel megfertőzött tehenészlány himlőhólyagjának tartalmával beoltott egy fiút. Egy hét után emberi himlőhólyagból nyert váladékkal fertőzte meg a gyermeket, aki védettnek bizonyult a betegséggel szemben. Ezt az eljárást maga Jenner nevezte el vakcinációnak, a tehén latin megfelelőjéből (vacca), majd Pasteur terjesztette ki általános megfogalmazásként a kórokozók elleni védelem létrehozásának módjára. (Erdei Anna, 2012)

A vakcináció történetében a következő állomást a legyengített vagy az elölt vírussal történő vakcináció jelentette. Ennek eredményességéhez szükséges a megfelelő specificitású ellenanyagok megjelenése a szervezetben. Annak alapján, hogy IgM vagy IgG típusú ellenanyag van jelen a szervezetben, megkülönböztethető, hogy elsődleges vagy másodlagos fertőzésről van-e szó. A vírusellenes antitestek több esetben viszont csak egy adott szerotípusú kórokozó ellen biztosítanak megfelelő védelmet. A szezonálisan felbukkanó variánsok ellen újra védettséget kell kialakítani. (Erdei Anna, 2012)

2. fejezet

Teljes genom szekvenálás és szintézis. Poliovírus attenuálásának lehetőségei

Napjainkban a kutatások a vírusok genomjának pontos megismerésére irányulnak, hogy ezáltal a fertőző mechanizmusukat megismerjük, és ezen ismeretek felhasználásával védekezzünk ellenük, gyógyítsunk emberi vírusos megbetegedéseket. Ez a molekuláris biológia és a szintetikus biológia gyors fejlődésének köszönhető. Ugyan a DNS szekvenálás, megabázisos nagyságrendben, manapság nem tart több ideig, mint egy hét, de a DNS szintetizálás nem ilyen hatékony, bár a 8-30 kilobázisos nagyságrend, ami a legtöbb RNS vírus és sok DNS vírus genomjának a nagyságába esik, könnyen megvalósítható. Vírus genomok kémiai szintetizálása által jobban meg tudjuk ismerni a virális gének expresszióját és fertőzőképességüket. Ez főként akkor lehet hasznos, ha nem áll rendelkezésünkre a természetes vírus templát. Másodsorban, így olyan mértékben meg tudjuk változtatni a genomot, amely a hagyományos molekuláris biológiai eljárásokkal (pl. klónozás és side-directed irányított mutagenézis) lehetetlen lenne. (Eckard Wimmer és mtsai., 2009)

Hosszabb DNS szakaszok összeillesztéséhez, amelyek géneket, genomokat reprezentálnak, sok primerre van szükségünk, amelyek meg vannak tisztítva, mivel a kémiai szintézis hibákkal terhelt. Így ezek hossza nem szokta meghaladni 40-80 nukleotid hosszúságot. Több megközelítést használnak ezen oligók összeillesztéséhez, de mindegyikben közös az enzimatis elonáció és/vagy a hibridizált átfedő oligók ligálása. (Eckard Wimmer és mtsai., 2009)

Az első de novo szintetizált DNS genomú vírus a ϕ X174 bakteriofág volt. Baktériumot transzfektáltak vele, ami életképes bakteriofágokat termelt. (Smith HO és mtsai., 2003). Endy és mtsai. bakteriofág T7 genomját alakították át úgy, hogy a 3' végéről 11,515 bázispárt kicseréltek 12,719 bázispárnyi szintetikus elállított DNS-sel és vizsgálták biológiai tulajdonságait, miután a maradék vad típusú genommal kombinálták. Replikálódni képes kiméra vírusokat kaptak, de ezek kevésbé voltak életképesek, mint a vad típusú T7 fág. (Chan L.Y. és mtsai., 2005)

RNS vírusok vizsgálatához elengedhetetlen, hogy az RNS genomot DNS-sé alakítsuk át. Weissmann és mtsai. 1978-ban RNS fág Q β RNS genomját duplaszálú DNS-sé írták át reverz transzkriptáz segítségével. A specifikus duplaszárú DNS-t (cDNS) plazmidba helyezték és baktériumokat fertőztek meg vele, amik az eredeti Q β fágot termelték. (Taniguchi T. és mtsai., 1978)

A virális cDNS szintézis reverz transzkriptázzal megköveteli a virion RNS templátot. Egy alternatív megoldás, ha kémiai szintetizálunk cDNS-t, amihez szükségünk van a teljes virális genom szekvenciájának ismeretére. Az első replikációs struktúra, amit szekvencia adatok alapján szintetizáltak, a hepatitis C vírus replikonja volt, amiből hiányoztak a struktúrfehérjék génei. Az első teljes vírus genom, amit szintetizáltak, a poliovírus volt 2002-ben. Sejtmentes környezetben, kémiai módszerekkel végezték a biokémiai szintézisét a poliovírus 1-es típus, Mahoney-nak (PV1(M)), természetes templát nélkül. Ezután a cDNS-t in vitro írták át fertőzőképes virális RNS-sé (Cello J. és mtsai., 2002). Ez a kísérlet egy új megközelítési lehetőséget nyitott a génfunkciók és a fertőzőképesség vizsgálatában azáltal, hogy széleskörű változtatási lehetőségeket biztosít a genomban. (Eckard Wimmer és mtsai., 2009)

A poliovírus a Picornaviridae családba tartozik, több humán és állati patogén vírussal egyetemben, ezért ismerete és genomjának célzott megváltoztatása mind orvosi, mind kereskedelmi szempontból fontos. Ezek a vírusok összes fehérjéjüket egyetlen polipeptidben expresszálják, aminek mérete meghaladja a 2000 aminosavat (Eckard Wimmer és mtsai., 1993). Ez a hatalmas prekursor poliprotein mind transláció közben, mind utána proteolitikus hasítást szenved két vírus proteínáz által, amelyek szintúgy a poliproteinben kódolódnak. Fontos megjegyezni, hogy a poliovírus, mint minden RNS vírus a természetben, egy nagy variabilitású, különböző genotípusú formában létezik. Vad típusnak azt a szekvenciát hívjuk, amelyik a leghatékonyabban tud proliferálni az adott körülmények között és kiszorítja a többi genotípust. (Eckard Wimmer és mtsai., 2009)

Eckard Wimmer, Steffen Mueller és mtsai. azt vizsgálták, milyen hatással vannak a poliovírus genomi szintű változásai a kodon használatban. Hogy csökkentse a kísérlet komplexitását, csak a vírus genomjának egyharmadát vizsgálták, ahol a P1 kapszid prekursor kódolódik. (Mueller S. és mtsai., 2006)



1. ábra: Poliovírus genomja. 5' végén kovalensen kötött a VPg virális fehérjéhez. Az ezt követő szakasz nem transzlálódik, majd egy folyamatos ORF és a 3' végen lévő nem transzlálódó szakasz és a poli-A farok következik. Az 5' nem transzlálódó szakasz a replikációban (cloverleaf) és transzkripcióban játszik szerepet.

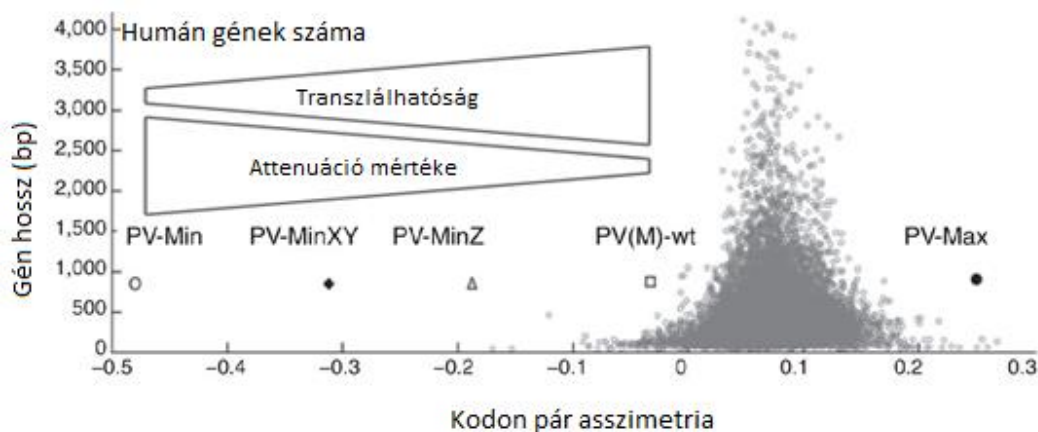
Az ORF a poliproteint kódolja. A 3' nem kódoló szakasz az RNS szintézisben játszik szerepet.

(Eckard Wimmer és mtsai., 2009 alapján szerkesztve)

Ugyan a genetikai kód degenerált, de az előfordulási gyakorisága az adott tripletnek más az emberben, mint például az *E. coli*-ban (például az alanint kódoló GCC négyszer gyakrabban szerepel, mint az azonos értelmű GCG). Ezt a jelenséget kodon hasznosításnak nevezik. A választás azért esett a kísérletben a P1-re mert ez a szakasz nem tartalmaz létfontosságú jeleket a proliferációhoz. A kísérlet során lecserélték a jellemző bázishármasokat ritkán használtakra, így kiegyensúlyozatlanná tették a poliprotein szintézisét, anélkül, hogy megváltoztatták volna az aminosav szekvenciát, és ennek eredményeképpen attenuálták a vírust, a genom replikáció súlyos károsodása, akár leállása által. (Eckard Wimmer és mtsai., 2009)

A kísérlet másik részében a kodon pár aszimmetriát vizsgálták. Ebben az esetben két kodon együttes előfordulása lesz más gyakoriságú, mint ami egyéni gyakoriságukból következne. Például azt várnánk, hogy az emberben az alanin-glutamin aminosav párt a GCCGAA és a GCAGAG közel azonos arányban kódolja, de az előbbi erősen alulreprezentált a genomban, hetede az utóbbinak, pedig ebben szerepel a leggyakoribb alanint kódoló bázishármas. A kísérlet első lépéseként egy 14,795 bázis hosszúságú annotált humán génből az E. Wimmer vezette csoport kodon pár értéket számolt mind a lehetséges 3,721 kodon pár kombinációhoz specifikusan, mind a gének kodon pár aszimmetriájához (CPB), figyelembe véve a kodon gyakoriságát az összes párt alkotó kodonnak és a kódolt aminosav pár gyakoriságát. A humán génből számolt CPB illeszkedik a fehérje hosszához. Az alulreprezentált kodon párok negatív értéket kaptak. A vad típus (PV1(M)) enyhe negatív értéket kapott, de hasonló a humán génekéhez. Algoritmust használva olyan poliovírusokat készítettek, amelyek P1 kódoló régiójának vagy lényegesen negatív kodon pár aszimmetriája van, sok alulreprezentált kodon párokat tartalmaz (PV-Min, CBP= - 0,474). Vagy lényegesen pozitív a kodon pár aszimmetriája,

sok felülreprezentált kodon párokat tartalmaz (PV-Max, CPB= +0,246), miközben megtartották a pontos kodonokat, amelyek megtalálhatóak a vad típusban is, ugyanazzal az aminosav szekvenciával. A PV-Min transzkriptumait nem tudták kimutatni, látszólag letális fenotípusúak, de többféle szubklónokat, amelyek tartalmazzák a P1 régióját a PV-Min-nek, vad típusba klónozták (például PV-MinXY, PV-MinZ, CBP értékük rendre -0,32 és -0,19) életképesnek bizonyult, ámbar gyengébb lett. Megfigyelték még az alklón RNS translációs aktivitásának leromlását, ami az életképesség és a virális fehérjeszintézis összefüggésére utal. Ezek után azt vizsgálták, hogy a PV-Max variáns gyorsabban növekszik-e vagy virulensebb, mint a vad típus. Az eredmények alapján megállapították, hogy nem. Ez arra utal, hogy a poliovírus evolúciója során már optimalizálta a kódolt poliproteint. A poliovírusra jellemző kicsi genomjának hatékony másolása. Ehhez optimális körülmények között fontos a genom nagyságának szinten tartása. Ez úgy történik, hogy a felesleges nukleotidok replikáció közben deletálódnak és a fontos replikációs jelek pedig folyamatos újraképződnek. Ez persze nem jelenti, hogy a PV-Max az egyetlen szekvencia, ami vad típusú fenotípust eredményez, hanem éppen ellenkezőleg, rengeteg ilyen létezik különböző környezetekben, életterekben. (Eckard Wimmer és mtsai., 2009)



2. ábra: Annotált emberi gének kodon pár használat értékei. Minden pont egy génnek az aminosav hosszával kalkulált értéket reprezentál. Az alulreprezentált értékek negatív előjelet kaptak. A Poliovírus P1 kapszidjainak értékei is jelölve vannak. Ahogy csökken a kodon pár használat a transzlálhatóság is és a vírus attenuációja nő. A PV-Min életképtelen a PV-Max replikációs képessége és virulenciája a vad fenotípussal egyező. (Eckard Wimmer és mtsai., 2009 alapján szerkesztve)

Ebből a két kísérletből levonható az a következtetés, hogy a ritka bázishármasokra vagy az alulreprezentált kodon párokra való cserét követően, a transláció hatékonysága erősen

lecsökken, míg a termék szerkezete ugyan az marad. Ha humán patogén vírust ily módon kezelünk, az ugyan bejuthat a sejtbe, de nagyon rossz hatásfokkal fog replikálódni, viszont még mindig képes lesz kiváltani immunválaszt és a hosszú távú immunizáltságot, így ezeket a vírusokat lehetséges vakcinaként használni. (Eckard Wimmer és mtsai., 2009)

Egy másik megközelítésben az E. Wimmer vezette kutatócsoport (S.M. és mtsai, 2006) egy számítógépes algoritmus segítségével maximalizálta a nukleotid cserék számát úgy, hogy megőrizték a létező kodonokat és a P1 régió azonos aminosavat kódoló tripletjeit összekeverték. A kapott P1 szekvenciát szintetizálták és transzfekeció után szaporították (PV-SD5). A PV-SD P1 régiója a 2,643 nukleotidból 934 helyen volt kicserélve. A PV-SD replikációjának üteme a HeLa sejtekben, a vad típusúéval egyezett. Ebből következtethető, hogy az azonos aminosavat kódoló bázishármasok pozíciója a PV-SD-ben, a kodon keverés után, nem befolyásolja a virális fehérjeszintézist, bebizonyítva, hogy néma mutációknak csak akkor van hatása a vírusra, ha azok specifikusan csökkentik a kodon aszimmetriát vagy a kodon pár aszimmetriát. Levonható az a következtetés is, hogy genom szinten az RNS vírusok érzéketlenek a nukleotid cserékre mindaddig, míg azok nem befolyásolják a fehérje funkcióját vagy a fehérjeszintézis ütemét. Más szóval a létfontosságú kódoló régió kívüli RNS szakaszok azon kivételekkel, mint például a kapszulációt kiváltó jelek, feltehetőleg nem létfontosságúak. Nagyszámú szekvencia változást elviselnek káros következmények nélkül. (Mueller S. és mtsai., 2006; Eckard Wimmer és mtsai., 2009)

3. fejezet

Főemlősök és haszonállatok vakcinálásának lehetőségei vírusok ellen

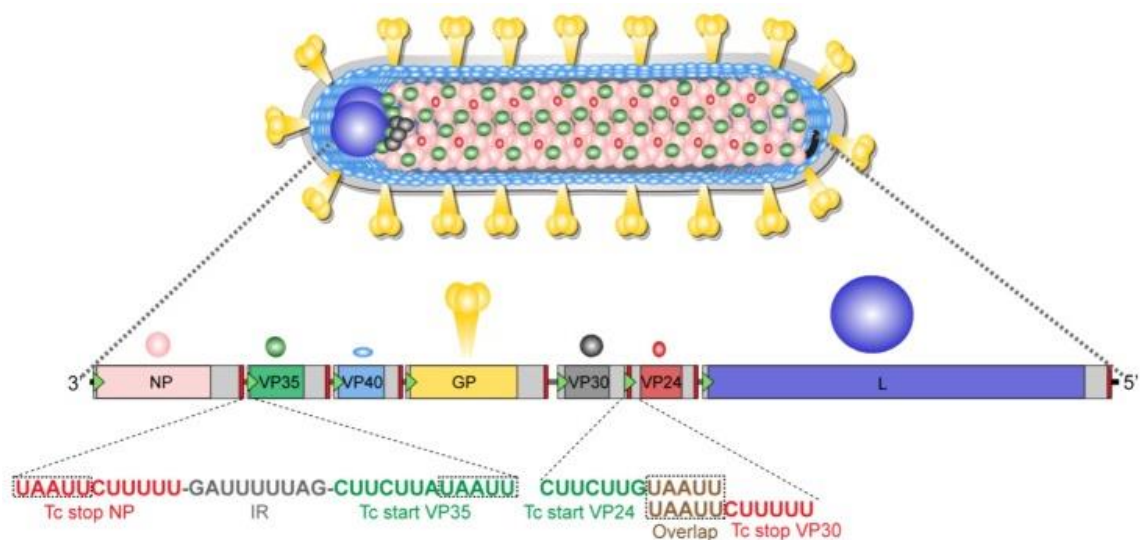
Nem emberszabású főemlősök vakcinálása Ebola és Marburg vírus ellen

Az Ebola vírus (EBOV) és a Marburg vírus (MARV) a Filoviridae családba tartozik. Mind emberben, mind a nem emberszabású főemlősökben vérzéses lázat okoz, főleg Afrikában fordul elő. Ezek ellen a vírusok ellen nincs vakcina vagy terápia humán alkalmazásban. A kísérlet olyan rekombináns vírus előállítását célozta meg hólyagos szájgyulladást okozó vírustól (rVSV), ami legyengített és expresszálja a Zaire ebolavírus (ZEBOV) transzmembrán glikoproteinjét. (Sanchez, A. és mtsai., 2001)

A kísérlet előtt főként EBOV vírus ellen próbálkoztak vakcina előállításával. Az első ilyen próbálkozás egy DNS primer-adenovírus megközelítés volt, ami a glikoproteint és a nukleoproteint szánta antigénnek (Sullivan, N.J és mtsai., 2000). Ennek a megoldásnak fő hibája az volt, hogy csak több hónap alatt alakult ki az immunitás. (Brandt, C. D. és mtsai., 1969; Piedra, P. A. és mtsai., 1998)

Egy másik próbálkozásnál Adenovírus 5 vektorokat használtak fel, ami vagy a ZEBOV glikoproteinjét hordozza, vagy azt a gént, ami a ZEBOV nukleoproteinjét kódolja. Ez a próbálkozás teljes védelmet biztosított nem emberszabású majmoknál, de mivel az emberiség 40-60% immunis az adenovírussal szemben, ez hátráltatja az alkalmazását az emberi vakcinálásban. (Sullivan, N.J és mtsai., 2003)

Noha sokkal kevesebb próbálkozás történt a MARV vírus elleni vakcina kifejlesztésére, de például az Alphavírus replikont alkalmazva, ami MARV fehérjét expresszál, sikeresen immunizáltak rák-evő makákókat. Sikertelen volt az Alphavírust alkalmazása Ebola vírus ellen. Az ideális vakcina az lenne, amely egyszerre védene mind a négy Ebola vírus fajjal (ZEBOV, Szudán ebolavírus (SEBOV), Reston ebolavírus, Elefántcsontparti ebolavírus) és a Marburg vírussal szemben. (Steven M. Jones és mtsai., 2005)



3. ábra: Felül a Marburg vírus sematikus képe látszik, alatta a MARV genomjának struktúrája transzkripciós szignálokkal. AZ ORF-ek színe megegyezik a virális fehérjék jelölésére használtakkal. A különböző gének át nem íródó szakaszai szürkével, az intergénikus (IR) szakaszai sötétszürke vonalakkal, a genom kezdete és vége feketével van jelölve. A zöld négyzetek a transzkripciós kezdő (Tc start) jeleket, a pirosak a transzkripciós végpontokat (Tc stop) jelölik. Két gén határoló szakaszai (NP/VP35 és VP30/VP24) 3'-5' irányultságot mutatnak, ahogyan az a negatív RNS-ben is jelen van. A VP30 és VP24 határoló szekvenciái átfedő transzkripciós szignálokat tartalmaznak, ahol a VP24 kezdő jelei „upstream” helyezkedik el a VP30 stop szignáljához képest. (Kristina Brauburger és mtsai., 2012 alapján szerkesztve)

Az rVSV alapú vakcina alkalmazása állati modellekben kitűnő hatásfokkal működik és külön előnye, hogy a beadása akár a nyálkahártya felületén át is történhet. Az rVSV embert nagyon ritkán fertőz és az ellene való előzetes immunizáltság elhanyagolható. (Wagner, R.R. és Rose, J.K., 1996)

A kísérlet során 12 makákóból hatot intramuszkuláris injekcióval, egyszeri dózissal VSVΔG/ZEBOVGP-val, a másik hatot ugyanilyen adagú VSVΔG/MARVGP-vel immunizáltak, majd klinikai megfigyelés alá vonták őket. Miután megbizonyosodtak, hogy nem mutatnak tüneteket, megállapították, hogy az rVSV nem patogén ezen állatokra nézve. 28 nappal később mind a tizenkét állatot intramuszkulárisan, nagy dózissal megfertőzték ZEBOV vagy MARV vírussal. Két állat, amelyik a VSVΔG/MARVGP-vel lett immunizálva, kontrollként szolgált a ZEBOV fertőzéshez. Ez a két állat három nap után kezdte el mutatni a klinikai tüneteket és a hatodik napon pusztultak el. Velük ellentétben azok az állatok, amelyeket előzetesen beoltottak VSVΔG/ZEBOVGP-vel teljes védettséget élveztek a ZEBOV fertőzéssel szemben. Az a két állat, amelyet VSVΔG/ZEBOVGP-vel

oltottak be és kontrollként szolgáltak a MARV-val szemben négy nap után mutattak tüneteket és a kilencedik napon pusztultak el. Velük ellentétben a VSVΔG/MARVGp-vel immunizált állatok teljes védelmet élveztek a MARV fertőzéssel szemben. A kísérlet során vizsgálták az állatok vérének is, hogy tartalmaz-e Marburg vagy Ebola vírust. Míg a két-két kontroll állatnál egyre növekvő számot kaptak, addig a másik négy-négy állatnál nem mutattak ki vírust. (Steven M. Jones és mtsai., 2005)

Ezek után vértesztet végeztek, hogy kimutassák, felmerül-e virémia vagy elszaporodik-e az rVSV az immunizáltság után. Ugyan kimutattak enyhe virémiát, de ez elszigetelt vírusszaporodásnak bizonyult és nem terjedt tovább. (Steven M. Jones és mtsai., 2005)

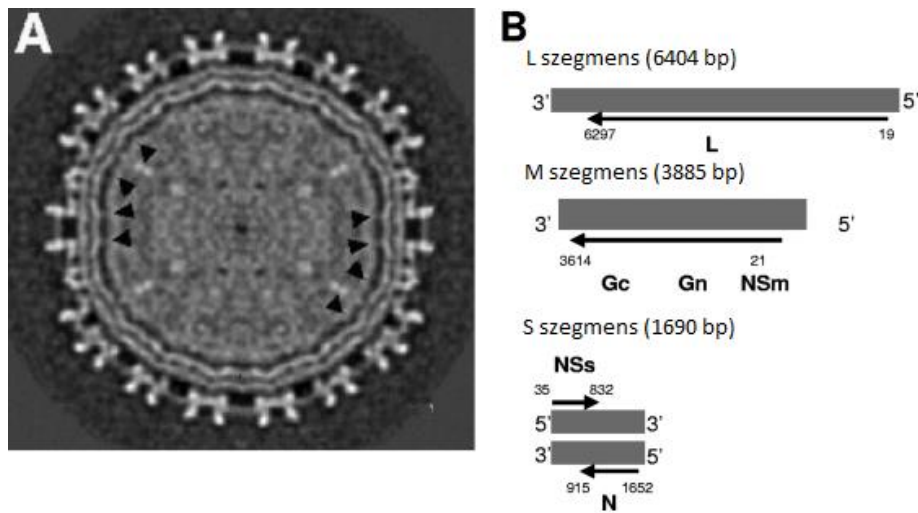
Megállapították, hogy rVSV EBOV vakcinával való immunizálás mind a humorális, mind a celluláris immunválaszhoz köthető, míg az rVSV MARV vakcina csak a humorális immunválaszt váltja ki. (Steven M. Jones és mtsai., 2005)

A kísérletből megállapítható, hogy lehetséges olyan vakcinákat előállítani, amelyek hatásos védelmet biztosítanak az Ebola és a Marburg vírus ellen, és további kutatásokkal az összes Filoviridae családba tartozó vírus ellen kidolgozható vakcinálás. (Steven M. Jones és mtsai., 2005)

Juhok immunizálása rekombináns Capripoxvírus vakcinával

A Rift völgyi láz vírus (RVFV) a Bunyaviridae családba tartozó, Afrika középső és keleti részén elterjedt vírus. Mind a haszonállatokat, mint például a juhot, a szarvasmarhát vagy a kecskét megfertőzi, és az emberre is áterjedhet róluk (Reuben K. Soi és mtsai., 2010). Létezik oltás ellene, ami inaktivált vírust tartalmaz, de több hátránya is van, mint például okozhat abortuszt, három adagot kell belőle beadni és drága az előállítása. A legújabb törekvések ezen hátrányok kiküszöbölésére törekszenek. (A. Shimshony és R. Barzilai, 1983)

A vírus RNS-ének közepén (M) kódolódik a virális glikoprotein a Gn és Gc. A rekombináns Vaccinia vírus ezeket expresszálja, ami antitestképzést indukál az egerben. (Collett, M. S. és mtsai., 1985; Kakach, L. T. és mtsai., 1988). A Vaccinia vírus állatoknál biztonságosan alkalmazható, de felmerültek kockázatok humán kezelés során. (Williams, W. L. és mtsai., 1985)



4. ábra: Az RVFV struktúrális és genomi felépítése. (A) Elektronmikroszkópos képe a vírusnak, A nyílfejek feltehetően glikoprotein citoplazmatikus részeket jelölnek, amelyek áthaladnak a lipid burkolómembránon. (B) Az RVFV genomja. Az M szegmens felett látható csillagok a Gn és Gc fehérjék lehetséges hidrofób régiót jelölik. (Hani Boshra és mtsai., 2011 alapján szerkesztve)

Kérődzők esetében a Poxviridae családba tartozó *Capripoxvirus* (CPV) nemzetség egy hatékony rekombináns vektor. Ez a nemzetség három, közel rokon fajból áll, genetikai állományuk 96-97 %-a megegyezik, és csak kérődzőket fertőz meg, embert nem. (Davies, F. G. és mtsai., 1976; Tulman, E. R., 2002) Ez a három vírus okozza a juh himlőt, a kecske himlőt és a szarvasmarhák bőrcsomósodás kórját (Lumpy Skin Disease (LSD)). Ez utóbbiba építik be a Gn és a Gc géneket. Ez a rekombináns vírus a juhokban védelmet biztosít, ráadásul a CPV vektor vírussal szemben is védettek lesznek az állatok. (Wallace, D. B. és mtsai., 2006) Mivel ezek a vírusok erősen specifikálódtak a gazdaszervezetükhöz, az emberre való áttérjedés esélye minimális. (Reuben K. Soi és mtsai., 2010)

A kísérlet során a Capripoxvirus KS1 törzsét használták. Az inzerciós plazmid (pLSDRV) tartalmazta az RVFV glikoprotein géneket, amelyeket kétoldalról az LSD vírus TK gén szekvenciái vettek körül. A pLSDRV készítése úgy zajlott, hogy a 2,5 kb párnai SalI-XbaI fragmentumot a p1114 plazmidból, a P7,5 promótert és a P19 promótert összekapcsolták az *Escherichia coli* gpt (Ecogpt) génnel. Klenow polimerázzal feltöltötték a ragadós végeket. (Mackett, M. és mtsai., 1982) Az *Escherichia coli* gpt gén a későbbi elkülönítés céljából kellett. (Falkner, F. G. és B. Moss, 1988) Ezt követően ezeket a pLSDTK3c-hez ligálták, KpnI-gyel emésztették és T4 DNS polimerázzal kezelték ismét, hogy tompa végeket kapjanak.. A ligátumot (tompá végű SalI-XbaI p1114 fragmentum és

a tompa végű KpnI emésztett pLSDTK3) E. coli DH5 α -ba sejtekbe juttatták és ampicillin rezisztencia alapján válogatták ki a rekombináns sejteket. (Mackett, M. és mtsai., 1985), (Reuben K. Soi és mtsai., 2010) Ezután a 3,4 kbnyi NcoI-SspI fragmentumot a pSCRV-6 plazmidból kinyerték, amely tartalmazza a teljes Gn és Gc kódoló szekvenciát. (Collett, M. S., 1987) Ezt a fragmentumot Klenow DNS polimerázzal feltöltötték és a tompavégeket az SmaI emésztett p LSDTKgpt-hez ligálták „downstream” a P7,5 promótortól. Ezután ismét ampicillin rezisztencia alapján kinyerték a létrehozott rekombináns plazmidokat, majd beoltották a juhokat. Az RVFV fehérjék, amelyeket fertőzött juh sejtek expresszáltak, megegyeztek a vad típusú RVF vírus fehérjéivel. (Reuben K. Soi és mtsai., 2010)

A kapott eredmények alapján a megfertőzött juhok szignifikánsan védettnek bizonyultak az RVF vírussal szemben és virémiát sem fedeztek fel bennük. A rKS1/RVFV vakcina használatával elkerülhetőek az abortusz okozta komplikációk. (Reuben K. Soi és mtsai., 2010) Ezzel a vakcinával expresszált RVFV glikoproteinek képesek lehetnek a legtöbb elszigetelt vírusfertőzés esetében kiváltani az immunitást, mivel az RVFV glikoproteint kódoló szakasz csak minimális variabilitású, az eddig gyűjtött adatok alapján. (Battles, J. K. és J. M. Dalrymple. 1988)

Rekombináns vakcina előállítása száj- és körömfájás betegséget okozó vírus ellen sertésekben

A száj- és körömfájás vírus (FMDV) a Picornaviridae családba tartozik. Hét különböző szerotípusa létezik az O, A, C, SAT 1,2,3 és az Asia 1 jelű. (E. Beck és K. Strohmaier. 1987) A vakcinálás inaktivált, egész-vírusos oltás formájában történik. Ennek a módszernek több hátránya van, mint például, az ismételt újravakcinálás megfelelő időközönként, a vakcinákat mélyhűtött állapotban kell tárolni, és nehéz megkülönböztetni a már beoltott és a fertőzött állatokat. Emellett, mindegyik szerotípus ellen külön kell kifejleszteni a vakcinákat és a vakcinában élő állapotban fennmaradhat a vírus. (Lu, Z. és mtsai., 2007; Suttmoller, P. és R. Casas Olascoaga, 2003; Barteling, S. J. és J. Vreeswijk, 1991)

A VP1 fehérje két epitópja az FMD vírus fő immunogén epitópja. (Bittle, J. L. és mtsai., 1982) Egyik vagy mindkét epitóp használta rekombináns fehérjékben, vagy szintetikus polipeptidekben bizonyítottan képes magas titerszámú antitest választ kiváltani és kistermetű állatokban immunvédelmet kialakítani. Ezek immunogén hatása viszont kisebbnek bizonyult a természetes gazdáknak, így azok immunizálása nem lett megfelelő.

(van Lierop, M. J. és mtsai, 1995) Ezért különböző eljárásokkal hatékonyabb immunogénné tették ezen antigéneket, például az epitópok számának növelése, vagy az antigének egy "szállító" fehérjébe ágyazása által. (Chan, E. W. C. és mtsai., 2000) Ezen kísérlet során rekombináns sertés immunglobulin G fehérjét készítettek, amely a "szállító" fehérje funkciót látta el, és vizsgálták, hogy védelmet biztosít-e a száj- és körömfájást okozó vírus O szerotípusú változatával szemben. (Jun-Jun Shao és mtsai., 2011)

A FMDV O/China/99 jelű vírus VP1 fehérjének 141-160 és 200-213 aminosavig tartó szakaszát használták a két epitópnak. A tandem ismétlődő multiepitópikus gén, amely 402 bázispár hosszúságú, ezen szakaszok háromszor jelennek meg. Hogy elkerüljék a szomszédos epitópok interferenciáját és új epitóp kialakulását, egy összekötő szakasz választotta el őket egymástól (GGSSGG). A pUC-18 jelű vektorba ültették, és így megkapták a pUC-18-RE-t. A sertés IgG konstans régióját és az elkészített vektort PCR-rel amplifikálták specifikus primerekkel, majd a pET-22b expressziós vektorba ültették, így megkapták a rekombináns expressziós vektort a pET-22b-RE-scIgG. (Jun-Jun Shao és mtsai., 2011)



5. ábra: A két epitópot tartalmazó plazmid elkészítése. Az E1 a FMD vírus O szerotípusának VP1 fehérjének 141-160 aminosavak közötti szekvencia részletet, az E2 ugyanezen fehérje 200-213 számú aminosav felőli részlete. Az RE a tandem ismétlődő multiepitóp szakaszt jelöli, az MCS a multiklonozó szakaszt. (Jun-Jun Shao és mtsai., 2011 alapján szerkesztve)

A kísérleti eredmények alapján megállapítható, hogy magas titerű FMDV elleni antitestképzést indukál, proliferációra készíti a limfocitákat és teljes védelmet biztosít 10^3 ID₅₀ mennyiségű FMDV O/China/99 vírus ellen sertésekben. A tesztek alatt egy beoltott sertés sem mutatott virémiát. (Jun-Jun Shao és mtsai., 2011)

A kísérlet során alkalmazott vakcina genetikailag módosított, aminek több előnye is mutatkozott. Az antigén epitópok számának a megsokszorozása az immunogenitásukat is szignifikánsan megnöveli. Az IgG molekulák meghosszabbíthatják az antigének

féléletidejét in vivo körülmények között és in situ megnöveli a hatékonyságukat, hogy a fő hisztokompatibilitási molekulákhoz szállítsa a fehérjéket. (Zaghouani, H. és mtsai., 1993) Ezért az RE-scIgG fehérje képes lehet állandó immunvédelmet kiváltani a specifikus epitópok ellen in vivo. (Chan, E. W. C. és mtsai., 2000)

Mivel a rekombináns fehérje denaturált állapotban van, így tárolása egyszerű, nem igényel fagyasztást. *Escherichia coli* baktériumban jó hatékonysággal termelődik és az egyszerű tisztítás miatt előállítása olcsó. Multiepitóp rekombináns vakcina előállítása egyszerűbb az inaktivált vírussal szemben és mivel itt nem alkalmaznak élő vírust, a fertőző ágensek használata elkerülhető. (Jun-Jun Shao és mtsai., 2011) A hagyományos FMD vírussal való vakcinálás során a struktúrfehérjék és a 3ABC nem struktúrfehérjék ellen is termelődik antitest. A rekombináns vakcina ellen ezzel szemben viszont nem, így ez lehet az elkülönítés alapja a fertőzött és a beoltott állatok megkülönböztetésének. (Lu, Z. és mtsai., 2007)

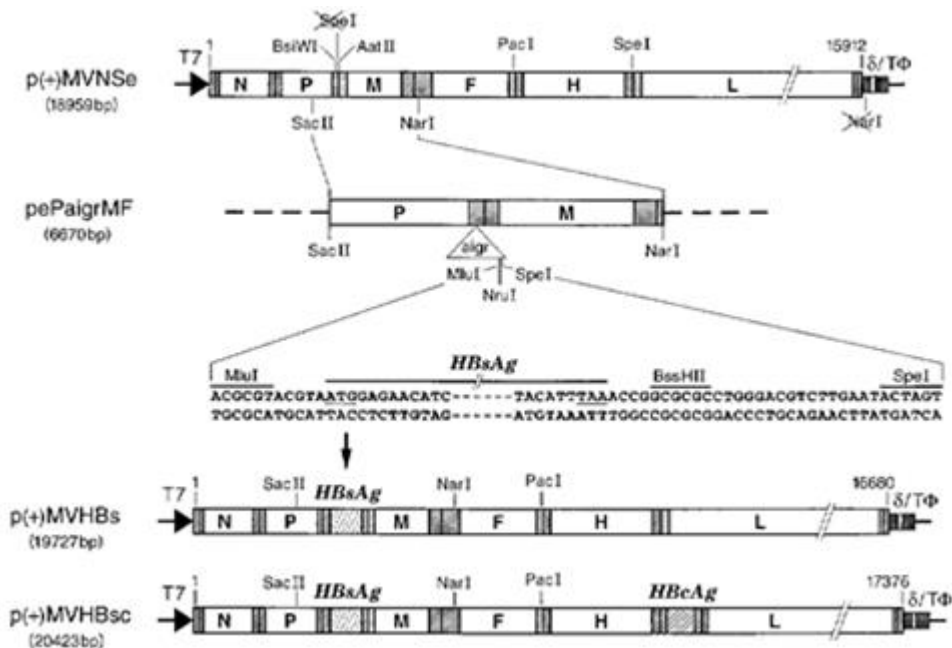
4. fejezet

Emberi vonatkozású vírusok és vakcinák

Hepatitisz B vírus elleni vakcináció

A Hepatitis B vírus (HBV) súlyos egészségügyi gondokat okoz világszerte. A ma használatban lévő vakcina HBV ellen hatékony humorális immunválaszt vált ki, de csak gyenge cellulárist, ami viszont segítené a kórmegelőzést és a tartós HBV fertőzés leküzdését. Hátránya az oltásoknak, hogy két vagy akár három alkalommal kell beadni, ahhoz, hogy hosszantartó immunitást szerezzen az egyén. Ráadásul az emberek 10%-a még ezek után sem lesz képes megfelelő immunválaszt adni a vírus ellen. (Sjogren M.H. 2005) A hagyományos immunizálás a HBV felszíni antigénjén (HBsAG) alapul. (Pol S. és mtsai., 1994) Más megoldások DNS vakcinákat helyeznek előtérbe annak érdekében, hogy specifikusan HBV-specifikus T-sejt választ stimuláljanak. (Mancini-Bourgine M. és mtsai., 2004) Egy másik megoldást jelent egy multigén vakcina, amely öt különböző plazmidot tartalmaz, amelyek a legtöbb HBV antigént kódolják, adjuvánsként pedig humán IL-12 tartalmaz. (Wen Y.M. és mtsai., 1995) Mindkét eljárás további tanulmányozást igényel. (Hong Chen és mtsai., 2012)

Egy további kísérletben másik megközelítést alkalmaztak. Olyan fehérje vakcinát készítettek (HBSS1), amely tartalmazza az S (1-223 aminosav) és PreS1 (21-47 as.) részeket, és ami képes stabil, szekretált vírusszerű részecskéket (VPL) alkotni. (Chen H. és mtsai., 2011) Az S1 régió feltehetően fontos szerepet játszik a vírusnak a májsejtekhez való hozzátapadásában és az azt követő fertőzésben, egyben hatékony T- és B-sejt immunogén. (Qiao M. és mtsai., 1994; Neurath A. R. és mtsai., 1989) Más tanulmányok rámutattak, hogy a T-, és B-sejt epitópok ezen a régión keresztül válogatódnak ki. (Maeng C.Y. és mtsai., 2000) Az S régió egy molekuláris hordozó, amely képes magát összeszerelni mind élesztő-, mind emlőssejtben. (Valenzuela P. és mtsai., 1982) Vektornak a Vaccinia vírus Tiantan törzsét választották és készítették el a rekombináns vírust (RVJSS1). Homológ rekombináció segítségével a pJSA1175-SS1 plazmidot és a szülői TTV vírust CEF (csirkeembrió fibroblaszt) sejtekben összekapcsolták. (Hong Chen és mtsai., 2012)



6. ábra: HBsAg és HBcAg ORF-ek klónozása p(*) MVnSc antigenomiális MV plazmidba. Az N gén a nukleokapszidot, a P a foszfopteint, az M a mátrixot, az F a fúziót, az h a hemagglutinint, az L az MV nagy fehérjéjét jelöli. Az árnyalt négyzetek a nem transzlálódó régiót, míg a függőleges vonalak a nem transzkriptálódó intergenikus trinukleotidokat jelenti. Az "aigr" jelő háromszög a mesterséges intergenikus régiót jelöli. Ez a szakasz a gén terminációs, intergenikus és gén kezdő szekvenciákból épül fel. Ezeket egy egyedi kódozó helyek követik. A HBsAg ORF start és stop kodonjai alá vannak húzva. A plazmid nevek alatt a hosszuk nukleotid mennyiségben vannak feltüntetve az EMBL accession no. Z66517 alapján. A T7 a T7 RNS polimeráz promóterjét, a δ a hepatitisz delta vírus ribozimjét, aTF a T7 RNS polimeráz terminátor szekvenciáit jelölik. (Mahender Singh és mtsai., 1999 alapján szerkesztve)

A kísérletben megállapították, hogy a HBV fehérje-vakcina prime és a rekombináns vaccinia alapú boost stratégia indukálta a legmagasabb humorális és celluláris immunválaszt és szignifikánsan megemelte mind a CD4+, mind a CD8+ T-sejt Th1 citokinre adott válaszát. Ez a kísérlet alapot ad a további vizsgálatokra, elsősorban a hatékonyság elérésére kis állatokban, és szükséges, hogy a vakcinát nagy állatokon is teszteljék. (Hong Chen és mtsai., 2012)

Pár szó a "prime-boost" stratégiáról. Ezen vakcinációs eljárás lényege, hogy egy adott antigén mennyiséggel végezzük a beoltást, majd protokolltól függően adott időközönként (pl. 3 hetente) két-három alkalommal az eredeti antigén mennyiség felével erősítjük a vakcinációt. (McShane, H., 2002)

Az influenzavírus

Az influenza vírus és az A típusú influenza vírus módosításának lehetőségei

Az influenza vírusok az Orthomyxoviridae családba tartoznak és három típusuk ismert. Az influenza A, B és C. Mind az A, mind a B típusú vírus nyolc RNS darabot tartalmaz, míg a C csak hetet. Az A és a B vírus képes emberi betegséget okozni, míg a C csak enyhe felső légúti fertőzést vált ki. (Palese P., Shaw M. L., 2007)

Az influenza A vírus egy negatív-szálú, burokkal rendelkező RNS vírus, amely 11 virális fehérjét képes kódolni. A burookban három integráns membránfehérje található a mátrix protein 2 (MP2) és két glikorprotein, a hemagglutinin (HA) és a neuramidináz (NA). Míg az A vírus HA fehérje szerepe a membránhoz való kötődésben van, a szíálsav tartalmú receptorokon keresztül, addig az NA szerepe ellentétes, lebontja a szíálsavat, így a kész vírusok el tudnak szakadni a sejttől. A HA prekursor formáját (HA₀) először a gazdasejt proteázának kell bontania, hogy a membránfúzió létrejöhessen. A burokokban a virális genom nyolc különböző szegmensben van tárolva, amelyek nukleoproteinekhez és RNS polimerázokhoz vannak kötődve, így ezek alkotják a ribonukleoproteint. (Lamb, R. A. és R. M. Krug, 2001) A csomagolódásban nélkülözhetetlen cisz-elemek („pakolási” jelek), az RNS nem kódoló régiójának 3’ és 5’ szekvenciájának végén helyezkednek el. Egyben a transzkripciót és a replikációt is szabályozzák. (Luytjes, W. és mtsai., 1989) Az NA fehérjekódoló régió mindkét vége fontos, a virionban való pakolásban. Ebben a kísérletben a hemagglutinin szerepét vizsgálták a pakolás folyamatában deléciós változatok készítése által. Ezekből az információkból olyan vírust készítettek, amelyben a HA régiót vezikuláris sztomatitisz vírus glikoproteinnel cserélték fel (VSVG), míg az NA fehérje nagy részét GFP-vel. A kísérlet során megállapították, hogy a HA fehérje kódoló régiójának mind a két vége nélkülözhetetlen a pakolás folyamatában. Képesek voltak előállítani olyan influenza vírusokat, amelyek két rekombináns szekvencia elemet tartalmaztak, amely szakaszok a VSVG-t és GFP-t kódolták és stabilan expresszálták. Ezeket a szakaszokat rendre a HA és az NA fehérje szekvenciák pakolásában nélkülözhetetlen szekvenciák fogták közre. (Tokiko Watanabe és mtsai., 2003)

Az adeno- és retrovírusokkal jó hatásfokkal juttatják be a mesterséges DNS-t a sejtbe, ugyanakkor a rekombináns vírusok tartalmazhatnak olyan DNS szakaszokat vagy replikációs intermediereket, amelyek beépülhetnek a gazdasejt genomjába, így nem várt

mellékhatásokat okozhatnak. (Benihoud, K. és mtsai., 1999; Federico, M. 1999.) Az influenza vírus alkalmazása ebből a szempontból előnyös, mert ennek a vírusnak nincs DNS replikációs fázisa a fertőzött sejtben. Mivel a VSVG(HA)GFP(NA) vírus nem követel meg tripszint a HA fehérje hasításához, ellentétben a természetes influenza vírusokkal, így sokkal többféle sejtípust képes megfertőzni. A virion felszíni glikoproteinjének megváltoztatásával pedig el lehet érni, hogy specifikus sejt felszíneket ismerjen fel és fertőzzön meg, így juttatva be a kívánt gént. (Tokiko Watanabe és mtsai., 2003)

Az univerzális influenza vakcina megvalósítási lehetőségei

A hemagglutinin HA₀ formája az endoplazmatikus retikulumban trimert alkot, majd ezután proteolízisen esik át és két alegység a HA₁ és a HA₂ keletkezik, amelyek diszulfid hidakon át kapcsolatban maradnak. A HA₁ a gazdasejt receptorhoz való kötődésében játszik szerepet, és természetes vagy a hagyományos vakcinák antitestjeinek a célpontja az ezen alegységnek receptor kötő része. De az influenza vírus genetikai megváltozása, genetikai sodródása miatt megváltoztatja ezt a szakaszt, így okozva járványokat és az addig hatékony antitest elveszti védelmet kialakító képességét. A HA-val ellentétben az NA fehérje kisebb antigén variabilitású, így ez ellen a régió ellen nagyobb valószínűséggel lehet kialakítani univerzális vakcinát. (Chia-Ying Wu és mtsai., 2012)

Ebben a kísérletben rekombináns vírusszerű részecskéket (VLP) használtak madár N1-VLP vakcinaként, ami a természetes NA fehérjét utánozta. Megvizsgálva, mind a HA alapú VLP, mind az NA alapú VLP vakcinálást, meghatározták az NA szerepét az influenza elleni keresztvédelemben. (Chia-Ying Wu és mtsai., 2012)

A konzervált virális M2 fehérje (M2e) 23 aminosav hosszú ektodoménjét hozzá fuzionáltatták a HA N-terminusához a H5N1-VLP-ben. Így létre hozták a H5M2eN1-VLP-t. Ezen kísérlet során védelmet biztosítottak az egereknek a halálos RG-14 (H5N1), az A/California/07/2009 H1N1 (CA/07) és az A/PR/8/34 H1N1 (PR8) vírusfertőzés ellen. (Chia-Ying Wu és mtsai., 2012)

Az eredmények alapján a H5M2eN1-VLP képes magas titerű neuraminidáz antitest képzését indukálni és humorális védelmet biztosítani a homológ H5N1 és heterológ CA/07 vírusok ellen. Az észlelt anti-avN1 immunitás, ami az egerek fokozott túlélési képességét okozta a heterológ N1 szerotípusú influenzafertőzést követően. Az immunitás eredetét

tekintve, két elmélet lehetséges. Az első szerint a madár H5N1 vírusok NA fehérje filogenetikai rokonságban van a sertés eredetű CA/07 H1N1 vírussal. A másik szerint, a H5N1 vírusnak és a CA/07 vírus neuraminidázának erősen konzervatív felépítésű felszíne van. (Ghosh A. és mtsai., 2010) A kísérlet szerint gyorsan újrameleztek az anti-HA2 antitestek a fertőzés válaszáként, ami kereszt védelmet biztosított a szezonális PR8 vírusfertőzéssel szemben. Vizsgálták még, hogy a VLP indukál-e celluláris immunválaszt. Kimutattak erős Th-2 sejtválaszt a homológ H5N1 és a heterológ PR8 virális antigén stimuláció mellett. A H5M2eN1-VLP vakcina képes észlelhető szintű IFN- γ termelést indukálni heterológ vírus stimuláció, illetve fertőzés esetén. Ez a vakcina sem képes szignifikáns vírusspecifikus citotoxikus választ kiváltani, ugyanakkor az IFN- γ általános védelmi szerepe rendkívül fontos és hasznos. (Chia-Ying Wu és mtsai., 2012)

A madárinfluenza vírus

A madárinfluenza A vírus rendszerezésének alapja, a vírus felszínén kifejeződő két glikoprotein (hemagglutinin (HA), neuraminidáz (NA)) antigén variációja. A vadonélő madaraktól 16 HA és 8 NA altípust izoláltak eddig, amelyek sok variációban megtalálhatóak. A madárinfluenzák több másik fajt is meg tudnak fertőzni, többek között házimadarakat és emlősöket. (J. Keawcharoen és mtsai., 2010; Webster R.G. és mtsai., 1992)

A kísérlet során rekombináns vírusokat készítettek, amelyek az influenzavírus A/Puerto Rico/8/1934 (A/PR/8/34)-ből hat génszegmenst és a HA, NA gén szegmenseit tartalmazzák. Azért az A/PR/8/34-t választották, mert egyrészt az emberben attenuált állapotú lesz fertőzés esetén, másrészt nagy határfokkal termelődik csirkeembriót hordozó tojásban és emlőssejtekben is, így vakcina törzskészítmények alapjául szolgálhatnak. Kétféle rekombináns vírust készítettek. Az első az összes HA és NA glikoprotein altípust tartalmazta, főként olyan kombinációkban, mint amelyek a vadonélő madarakban is megtalálhatóak. Ez a készlet a diagnosztikában segíthet az altípusok meghatározásában (WHO, 2002), lehetséges vakcina prototípusként használható fel, valamint további alap kutatásokban segíthet. A második készlet H5, H7 és H9 altípusokat tartalmaz, amelyek gyakran előfordulnak a szárnyasokat fertőző széleskörű járványok esetén, valamint a neuraminidáz gén N4, N5 altípusokból származik. Ezek az NA altípusok ritkán fordulnak elő mind a vadmadarak, mind háziszárnyasok között, és nagyon ritka a H5, H7 és H9-cel való kombinációjuk. (Krauss S. és mtsai., 2004) Az így kapott H5, H7 és H9 vírusok N4 és

N5 génekkel kombinálva, hasznosak lehetnek, mint prototípusok a szárnyasok vakcinálásakor. (Capua I. és mtsai., 2003)

Influenzavírus elleni vakcina törzskészítmények előállításának a hagyományos módja két vírus újrakombinálása embriót tartalmazó csirketojásban. (Gerdil C., 2003) Az egyik vírus a kívánt antigenitású HA és NA géneket tartalmazza, a másik egy jól szaporodó típus, rendszerint az A/PR/8/34 vírus. A legújabb protokoll szerint, reverz genetikai technikai eljárások által meggyorsítják a rekombináns vírusok készítését. Ezek a vírusok, bármelyik vírus alapján ugyanúgy tartalmazzák a kívánt HA és NA gén altípusokat. (J. Keawcharoen és mtsai., 2010)

A kísérlet során sikeresen hozták létre az összes HA és NA altípust. Az így előállított törzskészítmények egyik nagy haszna, hogy több idő áll rendelkezésre a vírus altípusok termelése optimalizálására még a járvány kitörése előtt, és szinte egy időben a járvány kirobbanásával már el lehet kezdeni a vakcina gyártást. Ilyenkor ugyan a törzskészítmény antigenitása a járvány során találhatóéval nem lesz tökéletesen egyenértékű, de lassítható a járvány terjedése és idő nyerhető megfelelő vakcinakészítmények előállítására. (J. Keawcharoen és mtsai., 2010; Jennings L.C. és mtsai., 2008)

Példa rekombináns madárinfluenza vakcina kifejlesztésére

A madárinfluenzát (AI) az erősen patogén madárinfluenza vírus (HPAIV) H5-ös és H7-es altípusa jelenti. Ez a vírus világszerte fertőzi a baromfikat és akár 100%-os mortalitású is lehet. (Alexander D.J. 2007) A vakcináció inaktív, teljes AIV vírus vakcinával történik, ami megfelelő védelmet biztosít, viszont immunválaszt vált ki az AIV nukleoproteinjével szemben is. Ez olyan problémát okoz, hogy megakadályozza a szerológiai elkülönítést, a beoltott és a természetes úton fertőzött csirkék között. (Capua I. és Marangon S., 2000) Ennek kiküszöbölése érdekében DNS és virális vektor alapú rekombináns vakcinát alkalmaznak, ami vagy egy hemagglutinin fehérjét, vagy kettő (egy hemagglutinin és egy neuraminidáz) fehérjét fejez ki. (Oveissi S. és mtsai., 2010)

A Marek's betegséget az 1-es szerotípusú (MDV-1) vírus váltja ki. Ez a vírus az Alphaherpesvirinae alcsaládba tartozik két másik nem patogén vírussal, a Gallid herpeszvírussal és a pulyka herpeszvírussal (HVT) egyetemben. (Schat K.A., Nair V., 2008) Ez a két vírus szoros antigén rokonságot mutat a Marek vírussal. A HVT vakcinák alkalmazásával sikerült a Marek's betegséget megelőzni, de néhány helyen nem biztosított

teljes védelmet a Marek's vírus gén egy erős virulenciát mutató változatával szemben. Az MDV-1 vírus változatok közé tartozó CVI/988 törzs nem virulens és mivel ennek van a patogén törzsekkel a legközelebbi genetikai rokonsága, ezt használják a HVT helyett. (Spatz S.J., 2007; Hongyu Cui és mtsai., 2013)

A kísérlet során arra keresték a választ, hogy az attenuált MDV-1 törzsek, vagy HVT vakcina törzsek hatásosabbak vektorként, hogy belőlük rekombináns élő vakcinát készítsenek Marek's vírus és madárinfluenza ellen. Rekombináns rMDV-HA jelű vírust készítették, amely a madárinfluenza H5 hemagglutinin gént fejezi ki. Ennek a HPAIV és a fertőző Marek's betegséggel szembeni immunológiai hatékonyságát vizsgálták. Az attenuált MDV 814-es vakcina törzsének US2 génjébe inzertálták a H5-ös hemagglutinin törzset. Az eredmények kiértékelése után megállapították, hogy a rekombináns MDV-HA sokkal hatékonyabbnak bizonyult a rekombináns HVT-HA-val szemben. (Hongyu Cui és mtsai., 2013)

Annak érdekében, hogy kinyerjék a rekombináns MDV-HA vírust, pUAB-gpt-HA vektorral és MDV 814 DNS-sel ko-transzfektáltak csirkeembrió fibroblasztot (CEF). Egy 4,6 kb hosszúságú szakaszt mutattak ki, ami tartalmazta a HA gént és a GFP-t, mint szelektáló markert és az 1,1 kb hosszúságú US2 kimutathatatlan volt az rMDV-HA DNS mintában. Míg az MDV 814-ből ki lehetett mutatni az US2 gént. Az 1,7 kb hosszúságú HA gént ki lehetett mutatni az rMDV-HA-ban, de az MDV 814-ből nem. (Hongyu Cui és mtsai., 2013)

A rekombináns MDV 1-es szerotípusú vakcina hatékonyságát több tényező is befolyásolja. Ilyen például az inzertálódott transzgén mérete, ami befolyásolja az immunogenitást. Az US1, US2, US10 és a timidin kináz gének a herpesz vírusokban nem létfontosságúak ahhoz, hogy sejt kultúrákban replikálódjanak. A HVT és MDV1 vírusok US2 és US10 génjének a helyére szokták a transzgéneket beültetni. (Morgan R.W. és mtsai., 1993; Zelnik V. és mtsai., 1995)

AZ rMDV-HA rekombináns vírus virémia szintje szignifikánsan magasabbnak bizonyult, mint az rHVT-HA-é. AZ rMDV-HA rekombináns vírussal történt fertőzés után a csirkék 80%-ában mutattak ki védettséget, míg az rHVT-HA csak 67%-ában. Az rMDV-HA vakcinálás során el lehet különíteni a beoltott és a természetes úton fertőzött csirkéket,

az NA és NP antigének jelenlétének vagy hiányának alapján, ugyanis ilyenkor az NP ellen nem termelődik antitest. (Hongyu Cui és mtsai., 2013)

Vakcina gyártás növényi sejtek által

A transzgénikus növény előállítására Ti plazmidok segítségével történik, amelyek képesek a kiválasztott gént a sejtmagba juttatni. A Ti vektorok, bináris vektorok, az *Agrobacterium tumefaciens* (Ti) törzsből származnak, a méretük a kívánt gén beépítése előtt kicsi. A Ti plazmidokban található baloldali és jobboldali határoló szekvenciák közé lehet beépíteni a transzgént a promóterével és terminációs szekvenciáival együtt. A határoló szekvenciák létfontosságúak ahhoz, hogy a nukleinsav bejusson a sejtmagba és a kromoszómákba. A Ti virulencia faktorai a genomba való beépülést katalizálják, de egyéb létfontosságú szekvenciák is találhatóak bennük, mint például promóter szekvenciák, vagy az RNS silencing szupresszor szekvenciák. Ezen túlmenően a Ti alapú vektor tartalmaz szelektáló markereket, például a neomicin foszfortranszferáz II gént. A sejtbe bejutó virális, egyszálú RNS rögtön elkezd transzlálódni a gazdasejt riboszómái segítségével. Az RNS 3' és 5' nem kódoló részei felerősítik a translációt. (Keith Saunders és George P. Lomonosoff, 2013) Rekombináns hepatitis B felszíni antigén vírusszerű részecskéket expresszáló transzgénikus növényekben a Tobacco etch vírus 5' „leader” szekvenciái felerősítették az antigén termelését. (Mason és mtsai, 1992). A dohánymozaik vírus 5' omega „leading” szekvenciái pedig a transzgén expresszióját növelték meg *in vitro* és *in vivo* (Gallie és mtsai., 1987; Creager és mtsai., 1999).

A 2009-es H1N1 világjárvány során alkalmazott tojás alapú vakcina hatékonynak bizonyult a vírussal szemben, de rámutatott annak határaitra is, főként a nagy tömegű és gyors vakcina előállítás nehézségeire. Ebben a kísérletben a dohánynövényeket módosították úgy, hogy gyorsan, nagy mennyiségben termelhessenek influenzaoltásokat. (Åsne Jul-Larsen és mtsai., 2012)

A 2009-es járványból izolált H1N1 vírus (A/California/4/2009) rekombináns hemagglutinin (HA) antigénjét (HAC1) termeltették a dohány növényekkel. Egy 2009-es kutatás során izolált szérum és limfocita készletét használták fel abból a célból, hogy megállapítsák, hogy a 2009-es H1N1 járvány során alkalmazott humán vakcina (pmd2009) felismeri-e a HAC1-t, valamint azt, hogy a HAC1 antigént *in vitro* felismerik-e a B- és T-sejtek. (Åsne Jul-Larsen és mtsai., 2012)

A HAC1 a HA glikoproteinnek 18-530 aminosavát tartalmazza. A HAC1-et a pdmH1N1 vírus A/California/4/2009 (H1N1) altípusából nyerték. Ezután növény vírus expressziós vektorba klónozták a HAC 1 kódoló szekvenciáját és helper vektorral együtt *Agrobacterium tumefaciens*-be injektálták. Ezután megfertőzték vele a *Nicotiana benthamiana* növényeket. Hét nappal később a növényekből kinyerték és megtisztították a HAC1 fehérjét. (Åsne Jul-Larsen és mtsai., 2012)

A HAC1 antigéneket a szérum antitestek és a kísérletben részt vevő személyek antitest szekretáló sejtjei jól felismerték, ugyanezek az emberek limfocitái stimulált citokintermelést mutattak, habár kisebbet, mint a hagyományos vakcina alkalmazása esetén. Ebből le lehetett vonni azt a következtetést, hogy a HAC1 fehérje jó vakcina jelölt, biztonságos és hatékony adjuváns kombinálásával akár klinikai teszteknek is alávethető. (Åsne Jul-Larsen és mtsai., 2012)

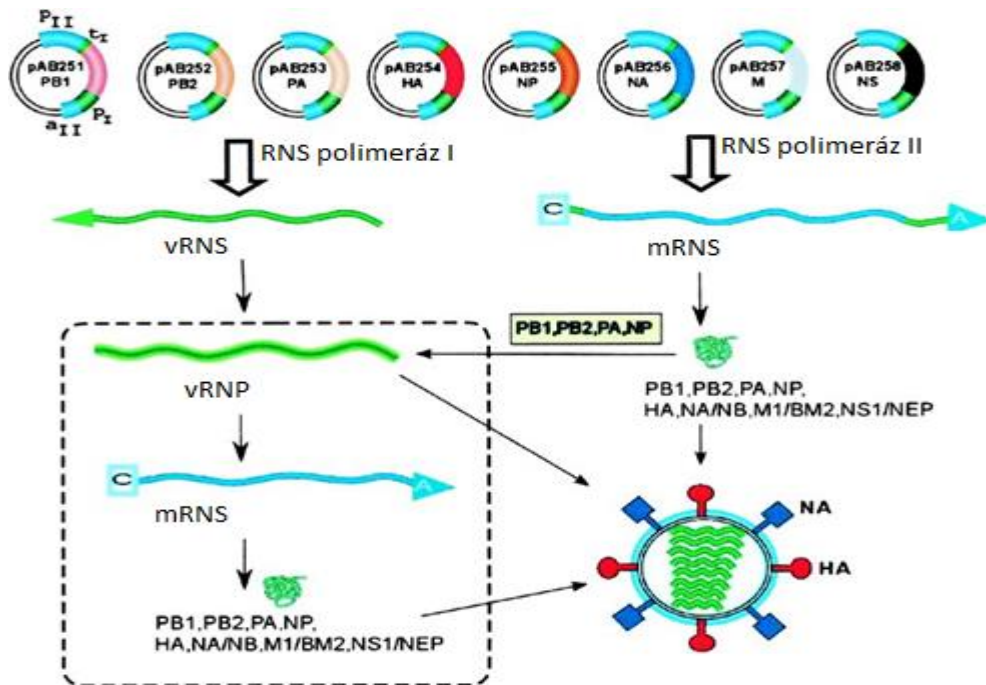
Az influenza B vírus

Az influenza B típusát kevesebbet tanulmányozták az A-hoz képest, pedig ez a fajta is súlyos fertőzéseket okozhat. Az influenza B vírus felszínén is megtalálhatóak a hemagglutinin (HA) és a neuraminidáz (NA) glikoproteinek. Hatékony vakcina termeléséhez két vírus törzs kell, az egyik a hatékony termelékenységért felelős, míg a másik a kívánatos HA és NA altípusukat hordozza. Ez a módszer az influenza A vírus esetében megfelelően működik, de a B típus esetén nem, mert nem találtak olyan B törzset, amely megfelelő gyorsasággal szaporodik. Az influenza A- és B vírusok törzsfejlődéstanilag külön fejlődtek, így nem lehet a magas hozamért felelős A típust a B törzsszel keresztezni, ezért csak élő attenuált formában oltanak vele. (Erich Hoffmann és mtsai., 2002)

Ugyan vannak azonos fehérjék mindkét influenza vírus típusnál (például a polimeráz PB1 alegység), de több különbség is található közöttük. Az influenza A vírus hatodik szegmense monocisztronosan kódolja az NA fehérjét, míg ugyanez a szegmens a B vírusnál az NA és NB fehérjét kódolja bicisztronosan, két átfedő ORF-fel. Az NB fehérje egy membránfehérje, aminek a szerepe az A vírus M2-es fehérjéjével lehet azonos. (Betakova, T. és mtsai., 1996) Különbség a két vírus között még, hogy a hetedik RNS szegmens mindkét vírusnak az M1 mátrix fehérjét kódolja, de az M2 fehérjét már nem. Ezt a fehérjét kódoló mRNS az A vírus típusban spliceing variáns. (Inglis, S. C. és Brown, C. M., 1981) Az influenza B vírus hetedik szegmense bicisztronos, két átfedő ORF-et tartalmaz, az átfedő régió az M1 fehérje terminációs kodonját, és a BM2 fehérje iniciációs

kodonját tartalmazza. (Horvath, C. M. és mtsai., 1990) A BM2 fehérje egy foszfoprotein, ami a fertőzés végén szintetizálódik és bepakolódik a virionba. (Odagiri, T. és mtsai., 1999) Ilyen típusú fehérje nem található az influenza A-nál. (Chen, W. és mtsai., 2001) Erik Hoffmann és mtsai. nyolc plazmidból álló rendszert hoztak létre, amiből létre lehet hozni a rekombináns influenza B vakcinát, amely alapul szolgálhat a B vírus típus további vizsgálatához. (Erich Hoffmann és mtsai., 2002)

Az influenza B vírus a B Yamanashi/166/98 törzsbe tartozott. Reverz transzkripció után PCR technológiával amplifikálták. A kapott cDNS-t a pAD3000 plazmidba ültették be, ami tartalmaz PolI transzkripciós egységet, ami a vRNS egyik szálát határozza meg, ezt körülvéve pedig PolII-t, ami a másik szálát másolja. (Erich Hoffmann és mtsai., 2002)



7. ábra: Nyolc plazmidból álló kétirányú transzkripciós rendszer influenza B vírus készítésére. A nyolc plazmid cDNS-eket tartalmaz, amelyek az influenza B azonos mennyiségű génjét reprezentálják. Mindegyik plazmidban a cDNS-eket polI promóter terminátor szekvenciák veszik közre. Az RNS polII transzkripciós egységet a polIII promóter poliadenilációs szekvenciák fogják közre. A gazdasajtben polII szintetizálja a sapkanélküli vírusszerű negatív vRNS-t, míg a polIII sapkával ellátott mRNS-ek kódolják a virális fehérjéket. A PB1, PB2, PA és NP fehérjék transzlációja után a negatív vRNS transzkriptálódik és replikálódik. Végül a virális ribonukleoproteinek és struktúrfehérjék is transzkriptálódnak és összeszerelődnek új vírusegységé.

(Erich Hoffmann és mtsai., 2002 alapján szerkesztve)

A „csak-plazmid” rendszerek nagy előnye, hogy velük a virális RNS-ek mind kódoló, mind nem kódoló régiója módosítható. Az influenza B vírus nem kódoló régiója relative hosszú, elérheti a száz nukleotidot is. A kísérlet során sikeresen bebizonyították, hogy a nyolc plazmid segítségével lehetséges a szálak rekombinálása, amelyek mind a két influenza B vírus vonal antigénjét hordozzák. Ezek a rekombináns vírusok jól növekedtek csirkeembriót tartalmazó tojásban, nagyobb vírus titert szolgáltatottak, mint a vad típusú vírus. Emellett a plazmidok segítségével jobban vizsgálható az influenza B vírus, A-tól eltérő molekuláris biológiai eszköztára és géntermékei. (Erich Hoffmann és mtsai., 2002)

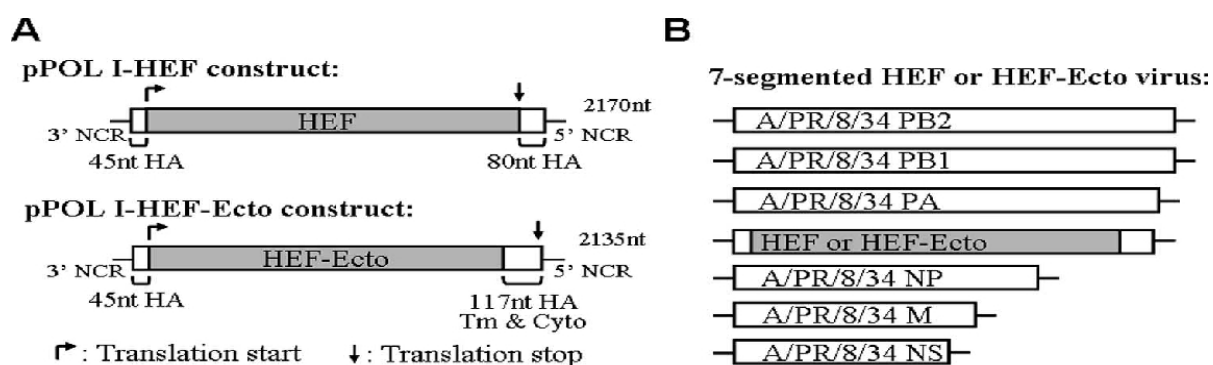
Az Influenza C vírus

Míg az influenza A és B típusú vírusok nyolc egyszálú RNS szegmentumot tartalmaznak, addig az Influenza C típusa csak hetet. Az első két fajta vírusnak a két fő membránalkotó fehérjéje a hemagglutinin, ami a kötést létesíti a sejten lévő receptorhoz, valamint a neuraminidáz, amely bontja. A C típusnak nincsenek meg ezek a gének önállóan, hanem csak a hemagglutinin-észteráz fúziós fehérje (HEF) található meg fő (vírus) membránalkotó glikoproteinként, amely a kötést és a hasítást is el tudja végezni. A két csoportba tartozó glikoproteinek más-más sejtfelszíni molekulákat észlelnek, de ugyanúgy homotrimer formában vannak jelen a vírus membránjában. (Palese, P. és M. L. Shaw. 2007)

Ebben a kísérletben kicserélték a két fő glikoprotein gént az influenza vírus A A/PR/8/34 fajtájában az influenza C vírus C/Johannesburg/1/66 egyetlen fő glikoprotein génjére, a HEF-re. Így sikeresen létre hoztak két darab, hét szegmenst tartalmazó kiméra influenza vírust. A két vírus hat szegmense az A vírus típusból, egyet pedig a C-ből tartalmaz, ami vagy a HEF teljes fehérjéjét kódolja, vagy a kiméra fehérjét HEF-Ecto-t. A HEF-Ecto a HEF ektodoménjéből és a HA glikoprotein transzmembrán és citoplazmatikus régiójából áll össze. Az 1,965 bp hosszúságú HEF ORF-et a C/JHB/1/66 vRNS-ből RT-PCR-rel amplifikáltatták, hogy ez a szakasz beépüljön az A vírus típusú virionba, az ORF-et az A/WSN/33 HA fehérjerégió pakoló szekvenciáit és a start kodon előtt lévő 45 nukleotidnyival és 80 nukleotidnyival a HA fehérje ORF stop kodonja közé illesztették. Ezután a kapott cDNS-t a pPol I plazmidba illesztették. Az eredeti HA start kodont (ATG) CTG-vé mutáltatták. Mind a HEF, mind a HEF-Ecto RNS az A/WSN/33 HA RNS szekvenciát hordozza a két végén, hogy be lehessen pakolni a vírus kapszidba. Továbbá, mind a HEF, mind a HEF-Ecto vírus képes stabilan beépíteni egy GFP-t kódoló RNS

szegmentumot, ami NA pakoló szekvenciákat hordoz. Ez egy új megközelítést jelez a vakcina vektor vagy génhordozó vektor fejlesztésére. (Qinshan Gao és mtsai., 2008)

A rekombináns vírusokat úgy állították elő, hogy 293T sejteket hat A/PR/8/34 plazmiddal, egy pPol I-HEF-fel, vagy pPol I-HEF-Ecto-val plazmiddal, három A/WSN/33 fehérjét expresszáló plazmiddal, és vagy igen, vagy nem a GFP plazmiddal. A rekombináns A/PR/8/34 előállításához, ami az A/WSN/33 HA-t és NA-t expresszálja, hat A/PR/8/34 plazmidot, két A/WSN/33 plazmidot juttattak be 293T sejtekbe. (Qinshan Gao és mtsai., 2008)



8. ábra: (A) A pPOL I-HEF és pPOL I-HEF-Ecto plazmidok készítése. A HEF ORF-et vagy ektodomént az A/WSN/33 HA 3' és 5' veszi közre és a HA ORF pakoló szekvenciái a két végén. Mindkét hibrid gén hordozza az emberi RNS polimeráz I-et. A "Tm" és "Cyto" a transzmembránrészt és a citoplazmatikus részt jelöli. A szürke színű szakasz a C/JHB/1/66 HEF ORF-et reprezentálja, míg a nyilak a transláció kezdő- és végpontját mutatják. A szekvenciák hossza az ábra jobb oldalán látható nukleotidban. (B) A hét szegmensből álló HEF és HEF-Ecto genomi felépítése. Hat A/PR/8/34 plazmid és egy pPOL I plazmidot használtak a rekombináns HEF és HEF-ecto előállítására, reverz genetikai megoldással. (Qinshan Gao és mtsai., 2008 alapján szerkesztve)

A kísérlet során arra jutottak, hogy az influenza C vírus HEF glikoprotein teljesen egyenértékű funkcionálisan az A vírus típus két glikoproteinjével. Ez azért lehet meglepő, mivel a HEF és a HA csak 12%-ban azonos aminosav szekvenciájukat tekintve. (Rosenthal, P. B., 1998) Ráadásul a transzmembrán és citoplazmatikus szakasza a HEF fehérjének rövidebb, mint a HA fehérjének. (Pfeifer, J. B. és R. W. Compans. 1984) Az, hogy ennek ellenére képes a HEF a HA-t és az NA fehérjét helyettesíteni a hét szegmensű vírusban, azt mutatja, hogy ezen glikoproteinek citoplazmatikus régiója nem szükséges specifikusan az influenza A vírusfertőzésekhez. Ezt erősíti meg az a tény is, hogy a HEF-Ecto kiméra vírusnak nagyobb a pakolási határfoka, és szaporodási hatékonysága megegyezett az HEF variánséval. Az is lehetséges, hogy a HEF ektodomén és a HA

transzmembrán és citoplazmatikus régió nem teljesen kompatibilis egymással, de ezt a kísérlet nem vizsgálta. (Qinshan Gao és mtsai., 2008)

Az influenza vírus, mint vakcina vektor ígéretes jelölt, mert replikációja során nincsen DNS fázisa és erősen immunogén. Ugyanakkor génhordozó vektorként is felhasználható, ha az idegen gént, a pakolást irányító szekvenciák közé építették be. Ebben a kísérletben a HEF és HEF-Ecto vírusok egy extra GFP proteint is tartalmaztak. Ugyanezek a vírusok hét RNS szegmenssel rendelkeznek, itt pedig, többszörös sejtfertőzési ciklus után is stabilak maradtak és ki lehetett mutatni egy extra szegmenst (GFP), amit az NA glikoprotein pakoló szekvenciák fogtak közre. Továbbá szaporodásuk megnövekedett csirkeembriót hordozó tojásban. Az, hogy a nyolc szegmenst tartalmazó vírus jobb növekedési rátával rendelkezett, mint a hét, azt mutatja, hogy a HEF és HEF-Ecto vírusok megfelelő jelöltek vakcina előállítására és génhordozó vektor előállítására. (Qinshan Gao és mtsai., 2008)

Összefoglalás

A fent ismertetett kísérletek és eljárások a fertőző vírusok elleni védekezés, vakcináció lehetőségeit ismertették. Különbőféle eljárások segítségével genetikailag módosított vírusokat készítettek, de mindegyik alapja a vírusok genom szekvenciájának pontos ismerete. A leggyakrabban alkalmazott eljárás szerint, a vírusra jellemző antigén sajátosságú doméneket, fehérjéket kódoló szekvenciákat egy expressziós vektorba ültetik, amely segítségével készítjük el a vakcinát. Másik megoldás, ha ismerjük a vírusok bázissorrendjét és életciklusukat. Így felderíthetőek azok a szekvenciák, amelyek nem létszükségletűek a szaporodásukhoz. Ezen szekvenciák kivágása egy nem patogén vírusban és egy virulens vírus specifikus doménjét, fehérjéjét kódoló szakasszal való cseréjével, olyan rekombináns vírust kaphatunk, amely ugyan nem fertőz, de képes immunválaszt kiváltani a patogén vírusrészlet ellen is.

Haszonállatok vakcinálása, az őket általában specifikusan fertőző vírusok ellen, nem csak gazdasági szempontból szükséges, hanem azt is meg kell akadályozni, hogy róluk átterjedjen az emberre. Különösen fontos, hogy a későbbiekben el lehessen különíteni a már beoltott állatokat a vírushordozó egyedektől. Ez általában valamilyen specifikus antigén vagy antitest jelenléte, illetve hiánya alapján történik.

A vírusok elleni védekezéshez szükséges a járványok elterjedésének megállítása, legalábbis lelassítása. Egy jó megoldás, ha egy olyan készletet készítünk, amely tartalmazza az adott vírus szerotípusait. A járvány kitörésekor ezekkel lehet immunizálni és lelassítani a járvány terjedését, ameddig el nem készül a megfelelő hatékonyságú és immungenitású vakcina. Ezt főleg azoknál a vírusoknál lehetséges alkalmazni, amelyek rendkívül variábilisek és nincs időben állandó, specifikus antigén jellemzőjük.

Az influenzavírusnak három altípusa ismert, az A, a B és a C. Az első két fajta komoly egészségügyi problémát jelent az egész világon és a harmadik variáns is képes megfertőzni mind embert, mind különféle állatfajokat. Az influenza A és B vírus felszíni fehérjéi közül a hemagglutinint és a neuraminidázt szokták antigénként használni. Mivel az influenza vírus rendkívül variábilis, nem lehet ellene tartós immungenitást kiváltani oltással, általában évente új vakcinát kell kifejleszteni ellene.

Summary

The experiments and methods described above, shows the possible ways to protect and vaccinate against infectious viruses. There are many ways to construct genetically modified viruses, but all of them based on, that we know their whole genome sequence. The most used method is to insert the sequences, coding the antigenic domains and proteins, into an expression vector. Transformed from this expression "construct" into a living cell, we are able to make a vaccine producing cell. Another way, if we know the genome sequence of the virus and the life cycle, we can explore the segments of their DNAs or RNAs, that are not necessary to replicate themselves. If we cut these sequences from a non-pathogenic virus and insert the segment, coding for an immunogenic specific domain or protein of a pathogenic one, we get a recombinant virus, which is not infectious, but still able to induce immunogenic response against the antigen of the pathogenic virus.

Vaccination of the domestic animals against their specific viruses, is not only economically useful by inhibiting the outbreak of epidemics, but also prevents to spread the virus to the human population. It is crucial to distinguish the animals, that already vaccinated, from the ones, which were not. It is usually based on the detection of whether present or absent the specific antigen.

Protections against viruses is crucial to stop or at least slow down the spread of the epidemic. The good solution is to make deposit biobanks, which contains the various serotypes of the virus. In this case, when outbreaks a local epidemic, it is possible to immunise with the available vaccine stocks in order to slow down the spread, until the appropriate and immunogenically efficient vaccine is under development. In this strategy that is advantageous, if the wild-type (ie. the biobanks) virus is highly variable, and has not a stable and very specific antigen.

The influenza virus has three different types, the A, B and C. The first two lead to serious health diseases worldwide while the third type is able to infect humans or various animals in less harmful consequences. Hemagglutinin and neuraminidase are the surface proteins of the virus, which are used to construct the vaccines against the influenza type A and B. Because the influenza virus is highly variable, the vaccines can not produce sustained protections against its infection, that is why every year has to develop whole new sets of vaccines.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani elsősorban Dr. Orosz László témavezetőmnek, akinek segítsége és szakértelme nélkül nem lettem volna képes megírni a szakdolgozatot. Valamint Dr. Vellai Tibor tanszékvezetőnek, aki megteremtette a lehetőséget, hogy a Genetikai Tanszéken készíthettem a szakdolgozatomat. Végezetül szeretnék még köszönetet mondani a családomnak, valamint Morvai Boglárkának és Gergina Laurának, akik mind segítettek átnézni a szakdolgozatot és kijavítani a hibákat, valamint hasznos tanácsokat adtak.

Felhasznált irodalom

1. Szerkesztő: Erdei Anna, Társszerkesztő Sármai Gabriella, Prechl József, 17. fejezet: A kórokozók ellen kialakuló immunválasz és a vakcináció (írta: Erdei Anna) 426, 428, 446 oldal. Immunológia, Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 2012
2. Eckard Wimmer, Steffen Mueller, Terence M Tumpey, Jeffery K Taubenberger (2009). Synthetic viruses: a new opportunity to understand and prevent viral disease. *Nat Biotechnol*
3. Chan L.Y., Kosuri S., Endy D. Refracting bacteriophage T7. *Mol Syst Biol* 2005;1 2005.0018
4. Smith HO, Hutchison CA III, Pfannkoch C, Venter JC. Generating a synthetic genome by whole genome assembly: Φ X174 bacteriophage from synthetic oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:15440-15445. [PubMed: 14657399]
5. Taniguchi T, Palmieri M, Weissmann C. Q β DNA-containing hybrid plasmids giving rise to Q β phage formation in the bacterial host. *Nature* 1978;274:223-228. [PubMed: 355887]
6. Wimmer E, Hellen CU, Cao X. Genetics of poliovirus. *Annu Rev Genet* 1993;27:353-436. [PubMed: 8122908]
7. Mueller S, Papamichail D, Coleman JR, Skiena S, Wimmer E. Reduction of the rate of poliovirus protein synthesis through large-scale codon deoptimization causes attenuation of viral virulence by lowering specific infectivity. *J Virol* 2006;80:9687-9696. [PubMed: 16973573]
8. Sanchez, A., A. S. Khan, S. R. Zaki, G. J. Nabel, T.G. Ksiazek and C. J. Peters *Filoviridae: Marburg and Ebola Viruses*. in *Fields Virology* (eds. Knipe, D.M. & Howley, P.M.) 1279-1304 (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001).
9. Nancy J. Sullivan, Thomas W. Geisbert, Joan B. Geisbert, Ling Xu, Zhi-yong Yang, Mario Roederer, Richard A. Koup, Peter B. Jahrling and Gary J. Nabel (2003). Accelerated vaccination for Ebola virus haemorrhagic fever in non-human primates. *Nature* 424, 681-684
10. Steven M Jones, Heinz Feldmann, Ute Ströher, Joan B Geisbert, Lisa Fernando, Allen Grolla, Hans-Dieter Klenk, Nancy J Sullivan, Viktor E Volchkov, Elizabeth A Fritz, Kathleen M Daddario, Lisa E Hensley, Peter B Jahrling and Thomas W Geisbert (2005). Live attenuated recombinant vaccine protects nonhuman primates against Ebola and Marburg viruses. *nature medicine*
11. Wagner, R.R. and Rose, J.K. *Rhabdoviridae: The Viruses And Their Replication*. in *Fields Virology*, Vol. 1 (eds. Knipe, D.M. & Howley, P.M.) (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 1996).
12. Kristina Brauburger, Adam J. Hume, Elke Mühlberger and Judith Olejnik (2012). Forty-Five Years of Marburg Virus Research, Review; *Viruses*
13. Sullivan, N.J., Sanchez, A., Rollin, P.E., Yang, Z.Y. and Nabel, G.J. (2000). Development of a preventive vaccine for Ebola virus infection in primates. *Nature* 408, 605-609
14. Carl D. Brandt, Hyun Wha Kim, Andrew J. Vargosko, Barbara C. Jeffries, Julita O. Arrobio, Beatrice Rindge, Robert H. Parrott and Robert M. Chancock *Infections in 18,000 infants and children in a controlled study of respiratory tract disease*. (1969). I. Adenovirus pathogenicity in relation to serologic type and illness syndrome. *Am. J. Epidemiol.* 90, 484-500
15. Piedra, P.A., Poveda, G.A., Ramsey, B., McCoy, K. and Hiatt, P.W. (1998). Incidence and prevalence of neutralizing antibodies to the common adenoviruses in children with cystic fibrosis: implication for gene therapy with adenovirus vectors. *Pediatrics* 101, 1013-1019
16. Reuben K. Soi, Fred R. Rurangirwa, Travis C. McGuire, Paul M. Rwambo, James C. DeMartini, and Timothy B. Crawford (2010). Protection of Sheep against Rift Valley Fever Virus and Sheep Poxvirus with a Recombinant Capripoxvirus Vaccine. *Clinical and Vaccine Immunology*, p. 1842-1849
17. Shimshony, A., and R. Barzilai. (1983). Rift Valley fever. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 27:347-425.

18. Collett, M. S., A. F. Purchio, K. Keegan, S. Frazier, W. Hays, D. K. Anderson, M. D. Parker, C. Schmaljohn, J. Schmidt, and J. M. Dalrymple. 1985. Complete nucleotide sequence of the M RNA segment of Rift Valley fever virus. *Virology* 114:228-245.
19. Kakach, L. T., T. L. Wasmoen, and M. S. Collett (1988). Rift Valley fever virus M segment: use of recombinant vaccinia viruses to study Phlebovirus gene expression. *J. Virol.* 61:826-833.
20. Williams, W. L., H. T. Cook, and C. T. Caraway (1985). Contact spread of vaccinia from a recently vaccinated marine. *JAMA* 251:883-8845.
21. Sherman, M. B., A. N. Freiberg, M. R. Holbrook, and S. J. Watowich (2009). Single-particle cryo-electron microscopy of Rift Valley fever virus. *Virology* 387:11-15.
22. Hani Boshra, Gema Lorenzo, Nu'ria Busquets, and Alejandro Brun (2011). Rift Valley Fever: Recent Insights into Pathogenesis and Prevention. *Journal of Virology* p. 6098-6105,
23. Tulman, E. R., C. L. Afonso, Z. Lu, L. Zsak, J. H. Sur, N. T. Sandybaev, U. Z. Kerembekova, V. L. Zaitsev, G. F. Kutish, and D. L. Rock. (2002). The genomes of sheeppox and goatpox viruses. *J. Virol.* 76:6054-6061.
24. Davies, F. G. (1976). Characteristics of a virus causing a pox disease in sheep and goats in Kenya, with observations on the epidemiology and control. *J. Hyg. (Camb.)* 76:163-171.
25. Wallace, D. B., C. E. Ellis, A. Espach, S. J. Smith, R. R. Greyling, and G. J. Viljoen (2006). Protective immune responses induced by different recombinant vaccine regimes to Rift Valley fever. *Vaccine* 24:7181-7189.
26. Mackett, M., G. L. Smith, and B. Moss (1982). Vaccinia virus: a selectable eucaryotic cloning and expression vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79:7415-7419
27. Falkner, F. G., and B. Moss (1988). *Escherichia coli* gpt gene provides dominant selection for vaccinia virus open reading frame expression vectors. *J. Virol.* 62:1849-1854.
28. Mackett, M., G. L. Smith, and B. Moss (1985). The construction and characterization of vaccinia virus recombinant expressing foreign genes, p. 191-211. In D. M. Glover (ed.), *DNA cloning: a practical approach*, vol. 2. IRL Press, Oxford, United Kingdom.
29. Collett, M. S., K. Keegan, S. Hu, P. Sridhar, A. F. Purchio, W. H. Ennis, and J. M. Dalrymple (1987). Protective subunit immunogens to Rift Valley fever virus from bacteria and recombinant vaccinia virus, p. 321-329. In B. Mahy and D. Kolakofsky (ed.), *The biology of negative strand viruses*. Elsevier, New York, NY.
30. Battles, J. K., and J. M. Dalrymple (1988). Genetic variation among geographic isolates of Rift valley fever virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 39:617-631.
31. Tokiko Watanabe, Shinji Watanabe, Takeshi Noda, Yutaka Fujii, and Yoshihiro Kawaoka (2003) Exploitation of Nucleic Acid Packaging Signals To Generate a Novel Influenza Virus-Based Vector Stably Expressing Two Foreign Genes. *Journal of Virology*, p. 10575-10583 Vol. 77, No. 19
32. Palese P, ShawML (2007). Orthomyxoviridae: The Viruses and Their Replication. In *Fields Virology*, eds Knipe DM, Howley PM (Lippincott Williams &Wilkins, Philadelphia, PA), pp 1647-1689
33. Lamb, R. A., and R. M. Krug. (2001). Orthomyxoviridae: the viruses and their replication, p. 1487-1531. In D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), *Fields virology*, 4th ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa.
34. Luytjes, W., M. Krystal, M. Enami, J. D. Pavin, and P. Palese (1989). Amplification, expression, and packaging of foreign gene by influenza virus. *Cell* 59:1107-1113.
35. Benihoud, K., P. Yeh, and M. Perricaudet (1999). Adenovirus vectors for gene delivery. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10:440-447.
36. Federico, M. (1999). Lentiviruses as gene delivery vectors. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10:448-453.
37. Jun-Jun Shao, Chung Kai Wong, Tong Lin, Shuk Kwan Lee, Guo-Zheng Cong, Fion Wai Yee Sin, Jun-Zheng Du, Shan-Dian Gao, Xiang-Tao Liu, Xue-Peng Cai, Yong Xie, Hui-

- Yun Chang, and Ji-Xing Liu (2011) Promising Multiple-Epitope Recombinant Vaccine against Foot-and-Mouth Disease Virus Type O in Swine. *Clinical and Vaccine Immunology*, p. 143–149
38. Beck, E., and K. Strohmaier (1987). Subtyping of European foot-and-mouth disease virus strains by nucleotide sequence determination. *J. Virol.* 61: 1621-1629.
39. Zengjun Lu, Yimei Cao, Jianhong Guo, Shuyun Qi, Dong Li, Qiang Zhang, Junwu Ma, Huiyun Chang, Zaixin, Xiangtao Liu, Qingge Xie (2007). Development and validation of a 3ABC indirect ELISA for differentiation of foot-and-mouth disease virus infected from vaccinated animals. *Vet. Microbiol.* 125:157-169.
40. Suttmoller, P., and R. Casas Olascoaga (2003). The risks posed by the importation of animals vaccinated against foot and mouth disease and products derived from vaccinated animals: a review. *Rev. Sci. Tech.* 22:823-835.
41. Barteling, S. J., and J. Vreeswijk (1991). Developments in foot-and-mouth disease vaccines. *Vaccine* 9:75-88.
42. James L. Bittle, Richard A. Houghten, Hannah Alexander, Thomas M. Shinnick, J. Gregor Sutcliffe, Richard A. Lerner, David J. Rowlands and Fred Brown (1982). Protection against foot-and-mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence. *Nature* 298:30-33.
43. van Lierop, M. J., J. P. Wagenaar, J. M. van Noort, and E. J. Hensen (1995). Sequences derived from the highly antigenic VP1 region 140 to 160 of foot-and-mouth disease virus do not prime for a bovine T-cell response against intact virus. *J. Virol.* 69:4511-4514.
44. E.W.C Chan, H.T Wong, S.C.S Cheng, W.Y Yan, Z.X Zheng, Z.T Sheng, L.Q Zhu, Y Xie (2000). An immunoglobulin G based chimeric protein induced foot-and-mouth disease specific immune response in swine. *Vaccine* 19:538-546.
45. H. Zaghouani, R. Steinman, R. Nonacs, H. Shah, W. Gerhard, C. Bona (1993). Presentation of a viral T cell epitope expressed in the CDR3 region of a self immunoglobulin molecule. *Science* 259:224-227.
46. Hong Chen, Xia Chuai, Yao Deng, Bo Wen, Wen Wang, Shaoqing Xiong, Li Ruan, Wenjie Tan (2012). Optimisation of Prime–Boost Immunization in Mice Using Novel Protein-Based and Recombinant Vaccinia (Tiantan)-Based HBV Vaccine. *PLoS ONE* 7(9):e43730. doi:10.1371/journal.pone.0043730
47. Sjogren M.H. (2005). Prevention of hepatitis B in nonresponders to initial hepatitis B virus vaccination. *Am J Med* 118 Suppl 10A: 34S–39S.
48. Pol S., Driss F., Michel M.L., Nalpas B., Berthelot P., Brechot C. (1994). Specific vaccine therapy in chronic hepatitis B infection; *Lancet* 343:1460–1463.
49. Maryline Mancini-Bourguine, Hélène Fontaine, Daniel Scott-Algara, Stanislas Pol, Christian Bréchet, Marie-Louise Michel (2004). Induction or expansion of T cell responses by a hepatitis B DNA vaccine administered to chronic HBV carriers. *Hepatology* 40:874–882.
50. Wen Y.M., Wu X.H., Hu D.C., Zhang QP, Guo S.Q. (1995). Hepatitis B vaccine and anti-HBs complex as approach for vaccine therapy. *Lancet* 345:1575–1576.
51. Chen H., Wen B., Deng Y., Wang W., Yin X., Guan J., Ruan L., Tan W. (2011). The enhanced effect of DNA immunization combined in vivo electroporation of hepatitis B Virus Core- PreS1 and S-PreS1 plasmids. *Clin Vaccine Immunol* 2011. *Clin Vaccine Immunol* 18:1789–1795.
52. Qiao M, Macnaughton T.B., Gowans E.J. (1994). Adsorption and penetration of hepatitis B virus in a nonpermissive cell line. *Virology* 201:356–363.
53. Neurath A.R., Seto B, Strick N. (1989). Antibodies to synthetic peptides from the preS1 region of the hepatitis B virus (HBV) envelope (env) protein is virusneutralizing and protective. *Vaccine* 7:234–236.
54. Maeng C.Y., Ryu C.J., Gripon P., Guguen-Guillouzo C., Hong H.J. (2000). Fine mapping of virus-neutralizing epitopes on hepatitis B virus preS1. *Virology* 270:9–16.
55. Valenzuela P., Medina A., Rutter W.J., Ammerer G., Hall B.D. (1982). Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature* 298:347–350.

56. Mahender Singh, Roberto Cattaneo and Martin A. Billeter (1999). A Recombinant Measles Virus Expressing Hepatitis B Virus Surface Antigen Induces Humoral Immune Responses in Genetically Modified Mice. *Journal of Virology*, 73(6):4823
57. Chia-Ying Wu, Yi-Chun Yeh, Jia-Tsrong Chan, Yu-Chih Yang, Ji-Rong Yang, Ming-Tsan Liu, HoSheng Wu, Pei-Wen Hsiao (2012). A VLP Vaccine Induces Broad-Spectrum Cross-Protective Antibody Immunity against H5N1 and H1N1 Subtypes of Influenza A Virus. *PLoS ONE* 7(8): e42363. doi:10.1371/journal.pone.0042363
58. Ghosh A., Nandy A., Nandy P. (2010). Computational analysis and determination of a highly conserved surface exposed segment in H5N1 avian flu and H1N1 swine flu neuraminidase. *BMC Struct Biol* 10: 6.
59. J. Keawcharoen, M.I.J. Spronken, O. Vuong, T.M. Bestebroer, V.J. Munster, A.D.M.E Osterhaus, G.F Rimmelzwaan, and R.A.M. Fouchier (2010). Repository of Eurasian influenza virus hemagglutinin and neuraminidase reverse genetics vectors and recombinant viruses. *Vaccine*; 28(36): 5803–5809. doi:10.1016/j.vaccine.2010.06.072.
60. Webster R.G., Bean W.J., Gorman O.T., Chambers T.M., Kawaoka Y. M. (1992). Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev.* 56(1):152-79. [PubMed: 1579108]
- 61 WHO (2002). WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance.
62. Scott Krauss, David Walker, S. Paul Pryor, Larry Niles, Li Chenghong, Virginia S. Hinshaw, and Dr. Robert G. Webster Influenza A viruses of migrating wild aquatic birds in North America. *Vector Borne Zoonotic Dis.* Fall; 2004 4(3):177-89. [PubMed: 15631061]
63. Capua I, Terregino C, Cattoli G, Mutinelli F, Rodriguez JF. Development of a DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) strategy using a vaccine containing a heterologous neuraminidase for the control of avian influenza. *Avian Pathol.* Feb; 2003 32(1): 47-55. [PubMed: 12745380]
64. Gerdil C. The annual production cycle for influenza vaccine. *Vaccine.* May 1; 2003 21(16):1776-9. [PubMed: 12686093]
65. Jennings LC, Monto AS, Chan PK, Szucs TD, Nicholson KG. Stockpiling prepandemic influenza vaccines: a new cornerstone of pandemic preparedness plans. *Lancet Infect Dis.* Oct; 2008 8(10): 650-8. [PubMed: 18922487]
66. Hongyu Cui., Hongbo Gao., Xianlan Cui, Yan Zhao, Xingming Shi, Qiaoling Li, Shuai Yan, Ming Gao, Mei Wang, Changjun Liu, Yunfeng Wang: Avirulent Marek's Disease Virus Type 1 Strain 814 Vectored Vaccine Expressing Avian Influenza (AI) Virus H5 Haemagglutinin Induced Better Protection Than Turkey Herpesvirus Vectored AI Vaccine.2013, *PLoS ONE* 8(1): e53340. doi:10.1371/journal.pone.0053340
67. Alexander D.J. (2007). An overview of the epidemiology of avian influenza. *Vaccine* 25(30): 5637-5644.
68. Capua I., Marangon S. (2000). The avian influenza epidemic in Italy, 1999-2000: a review. *Avian Pathol* 29: 289-294.
69. Oveissi S, Omar AR, Yusoff K, Jahanshiri F, Hassan SS (2010). DNA vaccine encoding avian influenza virus H5 and Esat-6 of *Mycobacterium tuberculosis* improved antibody responses against AIV in chickens. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 33: 491-503.
- 70.. Schat KA, Nair V (2008). Marek's disease. In: Saif YM, Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Swayne DE, editors. *Diseases of Poultry*, 12th edition. Ames, IA, USA: Blackwell Publishing. 452-514.
- 71.. Spatz SJ, Zhao Y, Petherbridge L, Smith LP, Baigent SJ, et al. (2007). Comparative sequence analysis of a highly oncogenic but horizontal spread-defective clone of Marek's disease virus. *Virus Genes* 35 (3): 753-766.
72. Morgan RW, Gelb J Jr, Pope CR, Sondermeijer PJ (1993). Efficacy in chickens of a herpesvirus of turkeys recombinant vaccine containing the fusion gene of Newcastle disease virus: onset of protection and effect of maternal antibodies. *Avian Dis* 37: 1032-1040.
73. Zelnik V, Tyers P, Smith GD, Liang C, Ross NL (1995). Structure and properties of a herpesvirus of turkeys recombinant in which US1, US10 and SORF3 genes have been

replaced by a lacZ expression cassette. *J Gen Virol* 76(Pt 11): 2903-2907.

74. Keith Saunders and George P. Lomonosoff: Exploiting plant virus-derived components to achieve in planta expression and for templates for synthetic biology applications, *Review*. 2013, *New Phytologist*, doi: 10.1111/nph.12204

75. Mason HS, Lam DM-K, Arntzen CJ. 1992. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 89: 11745–11749.

76. Gallie DR, Sleat DE, Watts JW, Turner PC, Wilson TMA. (1987). The 5'-leader sequence of tobacco mosaic virus RNA enhances the expression of foreign gene transcripts in vitro and in vivo. *Nucleic Acids Research* 15: 3257–3273.

77. Creager ANH, Scholthof K-BG, Citovsky V, Scholthof H. (1999). Tobacco mosaic virus: pioneering research for a century. *The Plant Cell* 11: 301–308.

78. Åsne Jul-Larsen, Abdullah S. Madhun, Karl A. Brokstad, Emanuele Montomoli, Vidadi Yusibov and Rebecca J. Cox: The human potential of a recombinant pandemic influenza vaccine produced in tobacco plants. 2012, *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 8:5, 653–661

79. Erich Hoffmann, Kutubuddin Mahmood, Chin-Fen Yang, Robert G. Webster, Harry B. Greenberg, and George Kemble: Rescue of influenza B virus from eight plasmids. 2002 *PNAS*, vol. 99, no. 17, 11411–11416

80. Betakova, T., Nermut, M. V. & Hay, A. J. The NB protein is an integral component of the membrane of influenza B virus. 1996, *J. Gen. Virol.* 77, 2689-2694

81. Inglis, S. C. & Brown, C. M. Spliced and unspliced RNAs encoded by virion RNA segment 7 of influenza virus. 1981, *Nucleic Acids Res.* 9, 2727-2740.

82. Horvath, C. M., Williams, M. A. & Lamb, R. A. Eukaryotic coupled translation of tandem cistrons, identification of the influenza B virus BM₂ polypeptide. 1990, *EMBO J.* 9, 2639-2647.

83. Odagiri, T., Hong, J. & Ohara, Y. (1999). The BM2 protein of influenza B virus is synthesized in the late phase of infection and incorporated into virions as a subviral component *J. Gen. Virol.* 80, 2573-2581.

84. Chen, W., Calvo, P. A., Malide, D., Gibbs, J., Schubert, U., Bacik, I., Basta, S., O'Neill, R., Schickli, J., Palese, P., Henklein, P., Bennink, J. R. & Yewdell, J. W. (2001). A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat. Med.* 7, 1306-1312

85. Qinshan Gao, Edward W. A. Brydon, and Peter Palese: A Seven-Segmented Influenza A Virus Expressing the Influenza C Virus Glycoprotein HEF. 2008 *Journal of Virology*, p. 6419–6426

86. Palese, P., and M. L. Shaw. (2007). Orthomyxoviridae: the viruses and their replication, p. 1647-1689. In D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), *Fields virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.

87. Rosenthal, P. B., X. Zhang, F. Formanowski, W. Fitz, C. H. Wong, H. Meier-Ewert, J. J. Skehel, and D. C. Wiley. 1998. Structure of the haemagglutinin-esterase-fusion glycoprotein of influenza C virus. *Nature* 396:92-96.

88. Pfeifer, J. B., and R. W. Compans. Structure of the influenza C glycoprotein gene as determined from cloned DNA. 1984, *Virus Res.* 1:281-296.

89. McShane, H. Prime-boost immunization strategies for infectious diseases. *Current Opinion in Molecular Therapeutics* 2002. 4(1):23-27

NYILATKOZAT

Név: Tod Pál

Neptun azonosító: KQAZQQ

ELTE Természettudományi Kar, biológia alapszak

Szakedolgozat címe: Genetikailag módosított vírusok és rekombináns vakcinák

A szakdolgozat szerzőjeként fegyelmi felelősségem tudatában kijelentem, hogy a dolgozatom önálló munkám eredménye, saját szellemi termékem, abban a hivatkozások és idézések standard szabályait következetesen alkalmaztam.

Tudomásul veszem, hogy plágiumnak számít:

- szó szerinti idézet közlése idézőjel és hivatkozás megjelölése nélkül;
- tartalmi hivatkozás a forrás megjelölése nélkül;
- más személy publikált gondolatainak saját gondolatként való feltüntetése.

Kijelentem továbbá, hogy a szakdolgozat leadott nyomtatott példányai és elektronikus változata szövegükben, tartalmukban megegyeznek.

Budapest, 2013. _____

a hallgató aláírása