



Międzyuczelniany Wydział  
Biotechnologii  
Uniwersytetu Gdańskiego  
i Gdańskiego Uniwersytetu  
Medycznego

---

ROZPRAWA DOKTORSKA

---

*Mgr Gabriela Lucyna Brzuska*

Rekombinowane cząstki wirusopodobne jako  
potencjalne antygeny szczepionkowe przeciwko  
wirusowi Zika

*Recombinant virus-like particles as potential vaccine  
candidates against Zika virus*

Praca przedstawiona  
Radzie Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego  
celem uzyskania stopnia doktora  
w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych  
w dyscyplinie nauki biologiczne

Promotor: dr hab. Ewelina Król, prof. UG  
Zakład Szczepionek Rekombinowanych

GDAŃSK 2022

Praca doktorska powstała dzięki finansowaniu ze środków projektu „Szczepionka przeciwko wirusowi Zika - innowacyjne otrzymywanie antygenów podjednostkowych” (LIDER/1/0031/L-7/15/NCBR/2016) realizowanego w latach 2017-2021 pod kierownictwem dr hab. Eweliny Król, prof. UG w ramach konkursu LIDER Narodowego Centrum Badań i Rozwoju



*Dr hab. Ewelinie Król, prof. UG* dziękuję z całego serca za przekazaną wiedzę i umiejętności, cenne uwagi oraz opiekę nad przebiegiem mojej pracy naukowej, a przede wszystkim za wiarę i szansę realizacji kariery naukowej.

*Prof. dr hab. Bogusławowi Szewczykowi* dziękuję za opiekę nad przebiegiem mojej pracy naukowej we wczesnych latach studiów oraz cenne uwagi do publikowanych artykułów naukowych.

*Koleżankom i Kolegom z Zakładu Szczepionek Rekombinowanych oraz Zakładu Biologii Molekularnej Wirusów* za wszystkie merytoryczne wskazówki oraz pomoc w realizacji eksperymentów, jak również za wspianą atmosferę w pracy.

Wszystkim *studentom studiów magisterskich*, których miałam przyjemność mentorować, dziękuję za cierpliwość oraz możliwość nauki razem z Wami.

*Mojej siostrze Milenie* dziękuję serdecznie za nieocenioną wiarę we mnie, motywację oraz godziny rozmów telefonicznych podtrzymujących na duchu.

Dziękuję mojemu partnerowi *Łukaszowi Karpińskiemu* za wsparcie i słowa otuchy na każdym etapie pracy.

Moim rodzicom *Grażynie i Stanisławowi Brzuska* za wsparcie, motywację oraz entuzjazm z całego serca dziękuję.

<b>1.</b>	<b>Wykaz skrótów</b> .....	<b>8</b>
<b>2.</b>	<b>Wstęp</b> .....	<b>16</b>
<b>2.1.</b>	<b>Wirus Zika</b> .....	<b>16</b>
<b>2.1.1.</b>	<b>Klasyfikacja taksonomiczna</b> .....	<b>16</b>
<b>2.1.2.</b>	<b>Pochodzenie i epidemiologia</b> .....	<b>17</b>
<b>2.1.3.</b>	<b>Jednostki chorobowe powiązane z infekcjami ZIKV</b> .....	<b>19</b>
<b>2.1.4.</b>	<b>Transmisja</b> .....	<b>21</b>
<b>2.1.5.</b>	<b>Cykl replikacyjny</b> .....	<b>22</b>
<b>2.1.6.</b>	<b>Genom oraz białka wirusowe</b> .....	<b>24</b>
<b>2.1.7.</b>	<b>Struktura wirionu</b> .....	<b>26</b>
<b>2.1.1.</b>	<b>Oddziaływanie z układem immunologicznym</b> .....	<b>28</b>
<b>2.1.2.</b>	<b>Białka powierzchniowe prM/M i E</b> .....	<b>28</b>
<b>2.1.3.</b>	<b>Antygenowe determinanty białka E dla odpowiedzi przeciwciał</b> .....	<b>35</b>
<b>2.1.4.</b>	<b>Przegląd testowanych technologii szczepionkowych oraz terapii antywirusowych</b> .....	<b>38</b>
<b>2.2.</b>	<b>Cząstki wirusopodobne</b> .....	<b>44</b>
<b>2.2.1.</b>	<b>Strategie projektowania i produkcji VLPs</b> .....	<b>44</b>
<b>2.2.2.</b>	<b>Systemy ekspresji do produkcji VLPs</b> .....	<b>44</b>
<b>2.2.1.</b>	<b>Oddziaływanie VLPs z ludzkim układem immunologicznym</b> .....	<b>50</b>
<b>2.2.2.</b>	<b>Formulacja cząstek wirusopodobne jako antygenów szczepionkowe</b> .....	<b>52</b>
<b>3.</b>	<b>Cele</b> .....	<b>54</b>
<b>4.</b>	<b>Materiały</b> .....	<b>55</b>
<b>4.1.</b>	<b>Szczepy bakteryjne</b> .....	<b>55</b>
<b>4.2.</b>	<b>Geny syntetyczne</b> .....	<b>55</b>
<b>4.3.</b>	<b>Plazmidy</b> .....	<b>55</b>
<b>4.4.</b>	<b>Linie komórkowe owadzie</b> .....	<b>55</b>
<b>4.5.</b>	<b>Linie komórkowe ssacze</b> .....	<b>56</b>
<b>4.6.</b>	<b>Wirusy</b> .....	<b>56</b>
<b>4.7.</b>	<b>Pożywki hodowlane</b> .....	<b>57</b>
<b>4.8.</b>	<b>Startery</b> .....	<b>57</b>
<b>4.9.</b>	<b>Przeciwciała</b> .....	<b>58</b>
<b>4.9.1.</b>	<b>Przeciwciała pierwszorzędowe</b> .....	<b>58</b>
<b>4.9.2.</b>	<b>Przeciwciała drugorzędowe</b> .....	<b>59</b>
<b>4.10.</b>	<b>Antygeny białkowe</b> .....	<b>59</b>

4.11.	Lektyny .....	59
4.12.	Wzorce masowe.....	60
4.13.	Enzymy i bufory do reakcji enzymatycznych .....	60
4.14.	Bufory i inne odczynniki .....	61
4.15.	Zestawy komercyjne .....	64
4.16.	Aparatura .....	64
4.17.	Oprogramowanie .....	65
5.	<i>Metody</i> .....	67
5.1.	Metody pracy z DNA .....	67
5.1.1.	Przygotowanie kompetentnych komórek Escherichia coli TOP10 i DH10Bac...67	
5.1.2.	Transformacja komórek kompetentnych Escherichia coli TOP10 i DH10Bac DNA plazmidowym.....	67
5.1.3.	Izolacja plazmidowego lub bakmidowego DNA .....	68
5.1.4.	Amplifikacja genów za pomocą reakcji PCR.....	68
5.1.1.	Elektroforeza DNA w żelu agarozowym.....	69
5.1.2.	Izolacja DNA z żelu agarozowego .....	70
5.1.3.	Klonowanie amplifikowanych genów do wektora transferowego pJET 1.2/blunt .....	70
5.1.4.	Trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi.....	70
5.1.5.	Ligacja fragmentów DNA za pomocą ligazy DNA faga T4.....	71
5.2.	Metody pracy z komórkami owadzimi .....	71
5.2.1.	Hodowle komórek owadzych .....	71
5.2.2.	Transfekcja komórek owadzych w celu uzyskania bakulowirusów .....	71
5.2.3.	Namnażanie bakulowirusów .....	72
5.2.4.	Miarczkowanie bakulowirusów .....	72
5.2.5.	Produkcja rekombinowanych VLPs w komórkach owadzych.....	73
5.3.	Metody pracy z komórkami ssaczymi.....	73
5.3.1.	Hodowla komórek ssaczych .....	73
5.3.2.	Transfekcja komórek ssaczych DNA plazmidowym w celu produkcji rekombinowanych białek/VLPs.....	73
5.3.3.	Namnażanie wirusa Zika .....	74
5.3.4.	Miarczkowanie wirusa Zika metodą lysinkową .....	75
5.4.	Metody pracy z białkami i VLPs.....	75
5.4.1.	Przygotowanie lizatów komórkowych .....	75
5.4.2.	Precypitacja białek/VLPs z pożywki hodowlanej przy użyciu glikolu polietylenowego .....	75

5.4.3. Elektroforeza białek w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących.....	76
5.4.4. Barwienie żelu poliakryloamidowego Coomassie Brilliant Blue .....	76
5.4.5. Elektrotransfer mokry białek na błonę PVDF .....	76
5.4.6. Western blotting.....	76
5.4.7. Ultrawierowanie białek/VLPs w gradiencie sacharozy .....	77
5.4.8. Pomiar stężenia białek.....	78
5.4.9. DLS.....	78
5.4.10. Transmisyjna mikroskopia elektronowa.....	78
5.4.11. Znakowanie techniką immunogold.....	79
5.4.12. Test ELISA.....	79
5.4.13. Analiza profilu N- i O-glikozylacji.....	79
5.4.14. Test wiązania VLPs do lektyn .....	80
5.5. Produkcja i oczyszczanie rekombinowanych F2A VLPs .....	81
5.5.1. Produkcja rekombinowanych rekombinowanych F2A VLPs .....	81
5.5.2. Dwustopniowy proces oczyszczania rekombinowanych F2A VLPs.....	82
5.6. Immunizacja myszy .....	83
5.6.1. Immunizacja myszy F2A VLPs .....	83
5.6.2. Przygotowanie mysich surowic poszczepiennych.....	84
5.6.3. Izolacja mysich splenocytów .....	84
5.7. Analiza odpowiedzi immunologicznej po szczepieniu .....	85
5.7.1. Oznaczenie miana przeciwciał w surowicach poszczepiennych – test ELISA....	85
5.7.2. Test neutralizacji wirusa Zika – test PRNT .....	85
5.7.3. Analiza wydzielania IFN $\gamma$ przez splenocyty techniką ELISpot.....	85
6. Wyniki i dyskusja.....	87
6.1. Składnie i sekrecja VLPs.....	87
6.1.1. Wyniki.....	87
6.1.2. Dyskusja.....	92
6.2. Charakterystyka porównawcza VLPs wyprodukowanych w systemie ekspresji genów w komórkach ssaczych i komórkach owadzych .....	95
6.2.1. Produkcja VLPs w komórkach ssaczych .....	95
6.2.2. Produkcja VLPs w komórkach owadzych.....	99
6.2.3. Porównawcza analiza determinant antygenowych VLPs otrzymanych w komórkach 293T i komórkach Sf9 .....	106
6.2.4. Immunogenność VLPs.....	118
6.2.5. Dyskusja.....	120

<b>6.3. Produkcja i oczyszczanie zmodyfikowanych VLPs (F2A) w systemie ekspresji w komórkach 293T .....</b>	<b>125</b>
<b>6.3.1. Wpływ dawkowania i adiuwantu na immunogenność F2A VLPs.....</b>	<b>131</b>
<b>6.3.2. Dyskusja .....</b>	<b>137</b>
<b>7. Referencje.....</b>	<b>143</b>

## 1. Wykaz skrótów

aa – aminokwas

ADE – wzmocnienie infekcji zależne od przeciwciał (ang. *antibody-mediated enhancement of infection, ADE*)

AIA – dzakalina, lektyna izolowana z *Artocarpus integrifolia*

APC – komórki prezentujące antygeny (ang. *antigen presenting cells, APC*)

BEVS – system ekspresji genów w komórkach owadzych przy użyciu wektora bakulowirusowego (ang. *baculovirus expression vector system, BEVS*)

BSA – bydlęca surowicza albumina

CBB – barwienie barwnikiem Comassie Brilliant Blue

CZS – wrodzony zespół zika (ang. *congenital zika syndrome, CZS*)

DC – komórki dendrytyczne (ang. *dendritic cells, DC*)

DC-SIGN – receptor lektynowy typu C występujący na komórkach DC (ang. *dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin, DC-SIGN*)

DC-SIGNR – homolog DC-SIGN

DENV – wirus dengi

DI – domena I białka E

DII – domena II białka E

DIII – domena III białka E

DLS – technika dynamicznego rozpraszania światła (ang. *dynamic light scattering, DLS*)

EDE – epitop dimeru białka E

ELISA – test immunoenzymatyczny (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA*)

ER – siateczka śródplazmatyczna (ang. *endoplasmic reticulum, ER*)

FBS – bydlęca surowica płodowa (ang. *fetal bovine serum, FBS*)

FL – pętla fuzyjna (ang. *fusion loop, FL*)

FV – wirusy z rodzaju *Flavivirus*

GBS – Guillain-Barré syndrom

HPV – wirus brodawczaka ludzkiego (ang. *human papiloma virus, HPV*)

IFN – interferon

PRR - receptory rozpoznające patogeny (ang. *pathogen recognizing receptor, PRR*)

IgG – immunoglobulina G



- JEV – wirus japońskiego zapalenia mózgu (ang. *japanese encephalitis virus, JEV*)
- LAV – żywy-atenuowany wirus (ang. *live-attenuated virus, LAV*)
- MPLA – monofosforylo-lipid a (ang. *monophosphoryl lipid A, MPLA*)
- NaBut – maślan sodu (ang. *sodium butyrate, NaBut*)
- nt – nukleotyd
- PBS – buforowana fosforanem sól fizjologiczna
- TBEV – wirus kleszczowego zapalenia mózgu (ang. *tick-borne encephalitis virus, TBEV*)
- TEM – transmisyjna elektronowa mikroskopia
- TLR – receptory toll-podobne (ang. *toll-like receptors, TLR*)
- UEA I – lektyna izolowana z *Ulex europeus*
- VLPs – cząstki wirusopodobne (ang. *virus-like particles, VLPs*)
- WNV – wirus Zachodniego Nilu (ang. *West Nile virus, WNV*)
- YFV – wirus żółtej febry (ang. *yellow fever virus, YFV*)
- ZIKV – wirus Zika (ang. *Zika virus, ZIKV*)

## 2. Streszczenie

Wirus Zika (ZIKV) to patogen zakażający człowieka i należący do rodzaju *Flavivirus* w rodzinie *Flaviviridae*. Choć większość zakażeń ZIKV przebiega bezobjawowo, to czasem infekcja może prowadzić do rozwinięcia neurologicznych komplikacji np. syndromu Guillain-Barré. Co istotne, wirus może przenosić się drogą transmisji pionowej, czyli z matki na płód, w wyniku czego może dojść do rozwinięcia wrodzonego syndromu zika (*ang. congenital zika syndrome, CZS*). CZS obejmuje szerokie spektrum wad wrodzonych przede wszystkim małogłowie. ZIKV, podobnie jak inne wirusy z tego rodzaju, jest głównie przenoszony przez komary, co przyczyniło się do silnego rozprzestrzeniania się na świecie. Przez wiele lat infekcje ZIKV były sporadyczne i występowały głównie w rejonie Afryki, aż do epidemii w rejonie Mikronezji oraz Polinezji Francuskiej, a następnie pandemii w latach 2015-2016, która objęła prawie całą półkulę południową. Szacuje się, że w tym okresie tylko w Brazylii było ponad 1 300 000 przypadków infekcji. W związku ze zmianami klimatycznymi ZIKV nadal rozprzestrzenia się i obecnie występuje na terytorium 89 krajów na całym świecie. Chociaż ogólna liczba zakażeń ZIKV obecnie jest niska, to nadal wirus ten aktywnie krąży w Ameryce Łacińskiej i Azji. Ponadto, niedawne badania wskazują również na pojawienie się nowych szczepów ZIKV, które są bardziej zakaźne i patogenne.

Chociaż podjęto wiele wysiłków, aby opracować skuteczną szczepionkę lub terapię przeciwwirusową, nadal żadne z powyższych nie zostały zatwierdzone do użycia dla ludzi. Biorąc pod uwagę przenoszenie ZIKV i ryzyko kolejnej epidemii, a także powikłań neurologicznych po zakażeniu ZIKV, pozostaje on poważnym problemem dla populacji ludzkiej, zwłaszcza dla kobiet w ciąży. Dlatego istnieje potrzeba szczegółowego zbadania patologii ZIKV, a przede wszystkim opracowania nowych skutecznych szczepionek i leków antywirusowych.

Jednym z rodzajów rekombinowanych antygenów szczepionkowych są cząstki wirusopodobne (*ang. virus-like particles, VLPs*). VLPs to struktury składające się z jednego lub więcej różnych białek wirusowych, mających zdolność do samoorganizacji, przez co naśladują swoją formą natywne wiriony. Są one pozbawione materiału genetycznego, więc nie są zdolne do infekowania komórek gospodarza. Cechy te sprawiają, że VLPs posiadają wysoki potencjał immunogeny, a jednocześnie są znacznie bardziej bezpieczne w użyciu jako składnik szczepionki niż inaktywowany

wirus. Dla wirusa Zika, dwie glikoproteiny osłonki wirusowej prM i E są zdolne do składania się w VLPs, gdy ich geny ulegają ekspresji razem w różnych komórkach eukariotycznych np. komórkach owadzych lub ssaczych. Proces składania cząstek zachodzi w retikulum endoplazmatycznym, a następnie cząstki te ulegają dojrzewaniu tj. glikozylacji, cięciu proteolitycznemu oraz reorganizacji struktury. VLPs produkowane w różnych komórkach mogą różnić się antygenowością, co w konsekwencji może wpływać na ich potencjał immunogeny.

Praca ta miała na celu ocenić:

- wpływ systemu ekspresji genów oraz genetycznych modyfikacji na proces składania rekombinowanych VLPs oraz ich antygenowość, jak również określić ich potencjał immunogeny,
- wpływ schematu dawkowania i adiuwantów na immunogenność wybranych rekombinowanych VLPs.

W pierwszym etapie pracy zaprojektowano geny różnych wariantów rekombinowanych białek prM i E, które następnie wprowadzono do dwóch systemów ekspresji genów: systemu bakulowirusowej ekspresji genów w komórkach owadzych oraz systemu przejściowej ekspresji w komórkach ssaczych. Ekspresja genów obu białek była na niskim poziomie, dlatego następnie zoptymalizowano proces produkcji rekombinowanych VLPs poprzez modyfikację warunków hodowli komórek. W następnym etapie oceniono zdolność białek prM i E do tworzenia VLPs wykorzystując metodę ultrawierowania w gradiencie gęstości. Ponadto obecność VLPs analizowano także w transmisyjnej mikroskopii elektronowej oraz metodą dynamicznego rozpraszania światła. W obu systemach VLPs były produkowane na podobnym poziomie wydajności, lecz cząstki te różniły się stopniem dojrzałości. Dojrzałość cząstek, a szczególnie glikoproteiny E może wpływać na immunogenność VLPs, więc w kolejnym etapie analizowano dogłębnie determinanty antygenowe tj. profil glikozylacji VLPs i wiązanie do lektyn oraz prezentację specyficznych epitopów na powierzchni cząstek metodami immunoenzymatycznymi. Wyniki wykazały, że białka prM i E są glikozylowane w obu systemach ekspresji. Jednak zaobserwowano lepsze wiązanie się VLPs produkowanych w komórkach ssaczych do lektyn, jak i również lepszą ekspozycję epitopów na tych VLPs niż na cząstkach pochodzących z systemu bakulowirusowego. W celu porównania immunogenności obu typów VLPs, zaszczepiono dwie grupy myszy oczyszczonymi VLPs w kombinacji z adiuwantem typu olej-w-wodzie na bazie skwalenu. Analizy immunologiczne wykazały większą zdolność VLPs produkowanych w komórkach

ssaczycy do wzbudzania odpowiedzi humoralnej oraz do generowania przeciwciał neutralizujących wirusa Zika. Podsumowując wykazano, że system ekspresji genów wpływa na jakość cząstek wirusopodobnych wirusa Zika, co przekłada się na ich immunogenność. System komórek ssaczycy wykazał wyższą w kontekście produkcji dojrzałych VLPs o wysokim potencjale antygenowym i immunogennym.

W drugim etapie pracy zmodyfikowano sekwencje białek prM/E w celu zwiększenia produkcji VLPs w komórkach ssaczycy. Następnie zoptymalizowano dwuetapowe oczyszczanie VLPs przy użyciu metod chromatograficznych. Oczyszczone tą metodą VLPs posłużyły do badań immunologicznych w celu określenia wpływu schematu dawkowania oraz adiuwantów na wzbudzenie odpowiedzi immunologicznej w modelu mysim. Wybrano dwa schematy szczepień: 3 wzrastające lub malejące dawki VLPs w kombinacji z poprzednio użytym adiuwantem podawane w odstępie dwóch tygodni podskórnie. Ponadto, użyto także inny typ adiuwantu – system wodorotlenku glinu z monofosforylo-lipidem a (MPLA) w połączeniu VLPs podanymi wg schematu wzrastających dawek. Formułacja szczepionki podana wg schematu wzrastających dawek wzbudziła lepszą odpowiedź przeciwciał podklasy typu G (IgG), niezależnie od adiuwantu. Dodatkowo, VLPs podane wg schematu wzrastających dawek wzbudziły lepszą produkcję przeciwciał podklasy IgG1 i IgG2a. Surowice z myszy szczepionych schematem wzrastających dawek wykazały także lepszą aktywność neutralizującą wirusa Zika.

Podsumowując, wyniki uzyskane w tej pracy po raz pierwszy pokazują różnice w dojrzałości oraz antygenowości VLPs produkowanych w różnych komórkach eukariotycznych. Dojrzałość VLPs ma szczególne znaczenie w wykorzystaniu jako antygen szczepionkowy szczególnie w wzbudzaniu odpowiedzi przeciwciał neutralizujących wirusa Zika. Ponadto, wykazano, że immunogenność VLPs może być modyfikowana przez odpowiednie dobranie dawkowania VLPs oraz odpowiedniego adiuwantu w formułacjach szczepionkowych. Uzyskane w niniejszej pracy rezultaty mogą przyczynić się do racjonalnego zaprojektowania antygenów szczepionkowych w postaci cząstek wirusopodobnych, ich optymalnej produkcji w komórkach eukariotycznych, a także odpowiedniej formułacji szczepionki nie tylko przeciwko wirusowi Zika, ale także innym wirusom z rodzaju *Flavivirus*.

### **3. Streszczenie w języku angielskim (Abstract)**

Zika virus (ZIKV) is a human pathogen that belongs to the *Flavivirus* genus in the *Flaviviridae* family. Although most ZIKV infections are asymptomatic, they can sometimes lead to the development of neurological complications, such as Guillain-Barré syndrome. More importantly, the virus can spread through vertical transmission, i.e., from mother to fetus, which may result in the development of congenital zika syndrome (CZS). CZS covers a wide spectrum of birth defects, mainly microcephaly. ZIKV, like other flaviviruses, is mainly transmitted by mosquitoes, which has contributed to its worldwide spread. For many years, ZIKV infections were sporadic, mainly in Africa, until the epidemics in Micronesia and French Polynesia, followed by the 2015-2016 pandemic, which affected almost the entire southern hemisphere. During this period, it is estimated that there were 1,300,000 cases of infection in Brazil alone. Due to climate change, ZIKV continues to spread and is now found in 89 countries around the world. Although the overall number of ZIKV infections is currently low, the virus continues to circulate actively in Latin America and Asia. In addition, recent studies also point to the emergence of new ZIKV strains, that are more infectious and pathogenic.

While many efforts have been made to develop an effective vaccine or antiviral therapy, still none of the above have been approved for human use. Considering the transmission of ZIKV and the risk of another epidemic, as well as neurological complications following ZIKV infection, it remains a serious problem for the human population, especially for pregnant women. Therefore, there is a need for a detailed study of the pathology of ZIKV and, above all, the development of new effective vaccines and antiviral drugs.

Virus-like particles (VLPs) are one type of recombinant antigens used for vaccination purposes. VLPs are structures consisting of one or more different viral proteins, having the ability to self-assemble, thus mimicking native virions. They are devoid of genetic material and are therefore incapable of infecting host cells. Due to that, VLPs have a high immunogenic potential and at the same time are much safer to use as a vaccine component than inactivated virus. For Zika virus, the two viral envelope glycoproteins, prM and E, are capable of assembling into VLPs, when the genes are expressed together in different eukaryotic cells, e.g., insect or mammalian cells. The process of particle assembly takes place in the endoplasmic reticulum, and then the particles undergo maturation, i.e., glycosylation, proteolytic cleavage and structure

reorganization. VLPs produced in different cells may differ in antigenicity, which in turn may influence their immunogenic potential.

This work aimed at examining:

- the influence of the gene expression system and genetic modifications on the process of recombinant VLPs assembling and their antigenicity, as well as determining their immunogenic potential,
- the effect of the dosing regimen and adjuvants on the immunogenicity of selected recombinant VLPs.

In the first stage of the work, genes of different variants of recombinant prM and E proteins were designed, which were then introduced into two gene expression systems: the baculovirus gene expression system in insect cells and the transient expression system in mammalian cells. Gene expression of both proteins was low, therefore the production process of recombinant VLPs was first optimized by modifying the cell culture conditions. In the next step, the ability of prM and E proteins to form VLPs was assessed using the density gradient ultracentrifugation method. In addition, the presence of VLPs was also analyzed by transmission electron microscopy and by dynamic light scattering. In both systems, VLPs were produced at a similar level, but the particles differed in their degree of maturity. As the maturity of the particles, especially glycoprotein E, may affect the immunogenicity of VLPs, the next stage was to analyze the antigenic determinants, i.e., the glycosylation profile of VLPs and lectin binding, as well as the presentation of specific epitopes on the surface of the particles by enzyme immunoassays. The results showed that the prM and E proteins are glycosylated in both systems. However, better binding to lectins of VLPs produced in mammalian cells, as well as better epitope exposure on these VLPs, than on particles derived from the baculovirus system was observed. To compare the immunogenicity of both types of VLPs, two groups of mice were vaccinated with purified VLPs in combination with an oil-in-water adjuvant based on squalene. Immunological analyzes showed a greater ability of VLPs produced in mammalian cells to induce a humoral response and to generate Zika virus neutralizing antibodies. In summary, it was shown that the gene expression system affects the quality of Zika virus-like particles, which translates into their immunogenicity. The mammalian cell system showed superiority in producing mature VLPs with high antigenic and immunogenic potential.

In a second part of the project, the prM/E protein sequences were modified to increase the production of VLPs in mammalian cells. The two-step purification process of the VLPs using chromatographic methods was then optimized. VLPs purified by this method were used for immunological studies to determine the effect of the dosing schedule and adjuvant type on the induction of an immune response in a mouse model. Two vaccination schedules were selected: 3 increasing or decreasing doses of VLPs in combination with the previously used adjuvant administered two weeks apart by subcutaneous administration. In addition, another type of adjuvant was also used - an aluminum hydroxide monophosphoryl lipid a (MPLA) system in combination with VLPs given in an increasing dose schedule. The vaccine formulation following the increasing dose regimen elicited a better IgG antibody response regardless of adjuvant. In addition, VLPs administered with the increasing dose schedule induced better production of IgG1 and IgG2a subclass antibodies. Sera from mice vaccinated with the increasing dose schedule also showed better neutralizing activity of the Zika virus.

Overall, the results obtained in this study show for the first time differences in the maturity and antigenicity of VLPs produced in different eukaryotic cells. The maturity of the VLPs is of particular importance when used as a vaccine antigen, particularly in eliciting a neutralizing antibody response against Zika virus. Moreover, it has been shown that the immunogenicity of VLPs can be modified by appropriately selecting the dosage of the VLPs and an appropriate adjuvant in the vaccine formulations. This research may contribute to the rational design of vaccine antigens in the form of virus-like particles, their optimal production in eukaryotic cells, as well as the appropriate formulation of the vaccine not only for Zika virus, but also for other viruses from the *Flavivirus* genus.

## 4. Wstęp

### 4.1. Wirus Zika

#### 4.1.1. Klasyfikacja taksonomiczna

Wirus Zika (ang. *Zika virus*, *ZIKV*) należy do rodziny *Flaviviridae* (Simmonds i in., 2017). Wirusy z tej rodziny to wirusy osłonkowe, których genom jest w postaci dodatnio naładowanego, niesegmentowanego, jednoniciowego RNA (ssRNA (+)). Patogeny z tej rodziny wykazują liczne podobieństwa w strukturze genomu, morfologii wirionów oraz cyklu replikacyjnym. *ZIKV* jest klasyfikowany do rodzaju *Flavivirus* (FV). Rodzaj *Flavivirus* obejmuje ponad 70 wirusów przenoszonych przez stawonogi i można go podzielić dalej na dwie kategorie wg wektora owadziego (kleszcze i komary). (**Tabela 1**). Infekcja człowieka patogenem z rodzaju *Flavivirus* może doprowadzić m.in. do śmiertelnej gorączki krwotocznej lub choroby neurologicznej. Wektorem *ZIKV* są komary z rodzaju *Aedes*. Najbliżej spokrewnione do *ZIKV* są wirus Spondweni oraz wirus Kedougou (ang. *Kedougou virus*, *KEDV*), a dalej wirus dengi (de Bernadi Schneider, Jacob Machado, Guirales i Janies, 2020).

**Tabela 1. Rodzina *Flaviviridae*, podział na rodzaje oraz wybrani przedstawiciele**

Rodzaj	Wektor	Przedstawiciele
<i>Flavivirus</i>	Kleszcz	Wirus kleszczowego zapalenia mózgu (ang. <i>tick-borne encephalitis virus</i> , <i>TBEV</i> )
		Wirus omskiej gorączki krwotocznej (ang. <i>Omsk hemorrhagic fever virus</i> , <i>OHFV</i> )
		Wirus Powassan (ang. <i>Powassan virus</i> , <i>POWV</i> )
	Komar	<b>Wirus Zika</b>
		Wirus Spondweni (ang. <i>Spondweni virus</i> , <i>SPOV</i> )
		Wirus japońskiego zapalenia mózgu (ang. <i>Japanese encephalitis virus</i> , <i>JEV</i> )
		Wirus dengi (ang. <i>Dengue virus</i> , <i>DENV</i> )
		Wirus Zachodniego Nilu (ang. <i>West Nile fever virus</i> , <i>WNV</i> )



		Wirus dengi (ang. <i>Dengue virus</i> , <i>DENV</i> )
		Wirus żółtej gorączki (ang. <i>yellow fever virus</i> , <i>YFV</i> )
<i>Hepacivirus</i>	-	Wirus zapalenia wątroby typu C (ang. <i>hepatitis C virus</i> , <i>HCV</i> )
<i>Pegivirus</i>	-	Wirus zapalenia wątroby typu G (ang. <i>hepatitis G virus</i> , <i>GBV-C</i> , <i>HGV</i> )
<i>Pestivirus</i>	-	Wirus klasycznego pomoru świń (ang. <i>classical swine fever virus</i> , <i>CSFV</i> )

Ponadto, analizy serologiczne i genomowe różnych szczepów ZIKV sugerują istnienie tylko jednego pojedynczego serotypu z dwoma odrębnymi liniami genetycznymi: afrykańska (w tym pierwszy izolat z Ugandy, szczep MR766) i azjatycka (w tym pierwszy izolat z Malezji P6-740 i wszystkie współczesne szczepy z Azji, Oceanii i Ameryki) (Beaver, Lelutiu, Habib i Skountzou, 2018; Hu i in., 2019).

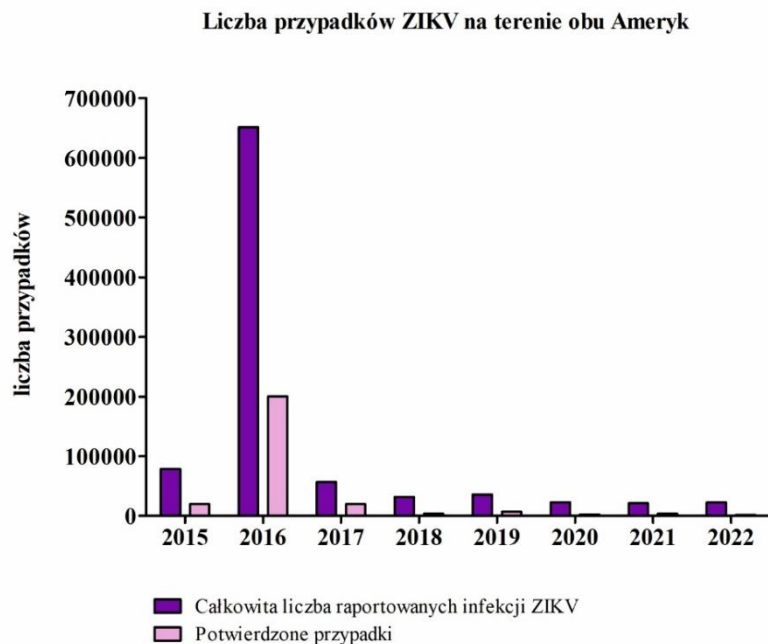
Podobieństwo sekwencji genomów pomiędzy różnymi szczepami jest bardzo wysokie – wynosi ponad 88.9%. Najwięcej punktowych różnic w sekwencji białek ZIKV między liniami genetycznymi zaobserwowano w sekwencji fragmentu pr białka osłonki prM (Wang i in., 2016a). Ponadto, występują zmiany w sekwencji nukleotydowej genomu ZIKV w izolatach pobranych od ludzi i komarów, jak również występują specyficzne mutacje w izolatach pobranych od płodów z rozwiniętą mikrocefalią (Tsetsarkin i in., 2016).

#### 4.1.2. Pochodzenie i epidemiologia

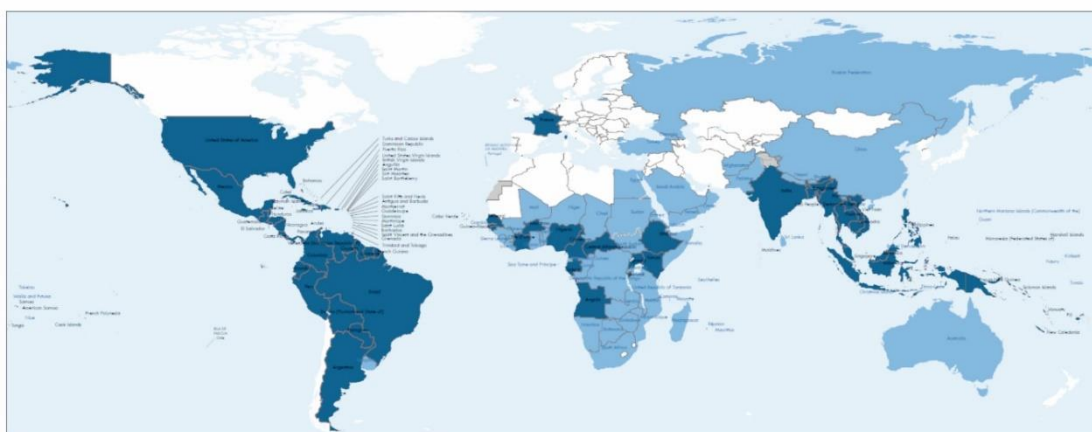
ZIKV został po raz pierwszy wyizolowany w 1947 roku z próbki krwi makaka królewskiego w lesie Zika w Ugandzie (Dick, Kitchen i Haddow, 1952). Natomiast, pierwsze przypadki infekcji ludzi przez ZIKV w tym rejonie zaobserwowano w 1962/1963 r. (Simpson, 1964). W ciągu następnych kilku dekad były odnotowane tylko sporadyczne epidemie w Afryce i Azji (Haddow i in., 2012). Wirus pojawił się ponownie w 2007 r. powodując wybuch epidemii na Wyspie Yap Sfederowanych Stanów Mikronezji, gdzie zaobserwowano u wielu pacjentów gorączkę, wysypkę, zapalenie stawów i zapalenie spojówek (Duffy i in., 2009). Następnie, kolejna epidemia wybuchła w Polinezji Francuskiej pod koniec 2013 roku, gdzie ponad 11% populacji tego regionu wykazała objawową infekcję. To właśnie tu po raz pierwszy powiązano infekcje ZIKV

z występowaniem syndromu Guillain-Barré, autoimmunologiczną chorobą nerwów obwodowych, która może powodować osłabienie i paraliż mięśni (Cao-Lormeau i in., 2014, 2016; Musso i in., 2014; Musso, Nilles i Cao-Lormeau, 2014). Dalej ZIKV rozprzestrzenił się na teren Ameryki Południowej, gdzie w 2015 roku wykryty został pierwszy przypadek (Zanluca i in., 2015). Jednak analiza retrospektywna sekwencji genomowych izolatów sugeruje, że aktywna transmisja ZIKV w Brazylii mogła wystąpić już w 2013 roku (Grubaugh, Faria, Andersen i Pybus, 2018). Szacuje się, że seroprewalencja ZIKV w tym okresie w Brazylii mogła wynosić około 63% (Netto i in., 2017). Ponadto, wirus gwałtownie rozprzestrzenił się dalej na region obu Ameryk oraz do innych części świata, co spowodowało, że 1 lutego 2016 r. Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organization, WHO*) ogłosiła stan zagrożenia zdrowia publicznego o zasięgu międzynarodowym (WHO, 2016). Skumulowana liczba udokumentowanych infekcji i podejrzanych przypadków na terenie obu Ameryk w latach 2015-2016 wynosiła 730 328, z czego 220 047 została potwierdzona laboratoryjnie (PAHO/WHO Data - ZIKA, 2017) (**Rycina 1 A**). Ponadto w tym okresie odnotowano 3490 potwierdzonych przypadków wrodzonego zespołu wad u noworodków, w tym małogłowia (Brasil i in., 2016; Costa i in., 2016; Panchaud i in., 2016). Do obecnych czasów aktywna transmisja ZIKV została odnotowana w 89 krajach na całym świecie, w tym, w ostatnim czasie we Francji (Giron et al., 2019; WHO Zika Epidemiology Update, 2022) (**Rycina 1 B**). Należy nadmienić, że częstość występowania zakażeń zmalała po 2017 r. (**Rycina 1 A**). Ostatnie epidemie miały miejsce w Indiach w latach 2018 i 2021. Pomimo tego, nowe badania pokazują pojawienie się nowych afrykańskich szczepów ZIKV na terenie Brazylii, na razie z odnotowaną transmisją jedynie wśród komarów i naczelnych jednak różniących się genetycznie od izolatów z Brazylii o 15% (Almeida i in., 2019; Aubry i in., 2021; Kasprzykowski i in., 2020; de Matos i in., 2021). Co więcej w badaniach na modelu mysim wykazano większą zakaźność tych szczepów oraz większą patogenność, szczególnie dla płodów.

A



B



■ Kraje i terytoria z obecną i przeszłą transmisją ZIKV

■ Kraje i terytoria z obecnością wektora owadziego, ale bez dotychczasowej transmisji

□ Kraje i terytoria bez obecności wektora i ZIKV

**Rycina 1. Epidemiologia ZIKV. Liczba przypadków infekcji ZIKV na terenie obu Ameryk w latach 2015-2022 (A)**

Źródło:

[https://www3.paho.org/data/index.php/en/?option=com\\_content&view=article&id=524:zika-weekly-en&Itemid=352](https://www3.paho.org/data/index.php/en/?option=com_content&view=article&id=524:zika-weekly-en&Itemid=352).

**Mapa krajów i terytoriów z obecną lub przeszłą transmisją ZIKV (B)**

Źródło: zmodyfikowano

[https://cdn.who.int/media/docs/defaultsource/documents/emergencies/zika/map-of-countries-with-zika-transmission-feb2022.pdf?sfvrsn=802a352a\\_5](https://cdn.who.int/media/docs/defaultsource/documents/emergencies/zika/map-of-countries-with-zika-transmission-feb2022.pdf?sfvrsn=802a352a_5).

#### 4.1.3. Jednostki chorobowe powiązane z infekcjami ZIKV

Duża część zakażeń ZIKV przebiega bezobjawowo (~29-80%) (Duffy i in., 2009; Haby, Pinart, Elias i Reveiz, 2018). U pacjentów objawowych często występują: wysypka

plamkowo-grudkowa, gorączka, zapalenie spojówek i ból stawów, który zwykle ustępuje po okresie inkubacji trwającym 1-2 tygodnie.

W poważniejszych przypadkach może dochodzić do rozwoju zespołu Guillain-Barré u dorosłych osób. GBS jest to choroba o podłożu autoimmunologicznym, która zwykle następuje po infekcji i nie jest spowodowana bezpośrednim uszkodzeniem układu nerwowego spowodowanym przez patogen. GBS został powiązany jako powikłanie poinfekcyjne poza ZIKV, z patogenami takimi jak *Campylobacter jejuni*, wirusem cytomegalii, wirusem Epstein-Barr (Jacobs i in., 1998). Infekcja powoduje stan zapalny obwodowego układu nerwowego z postępującym osłabieniem ramion, nóg i często mięśni czaszkowych, która z czasem może doprowadzić do niewydolności oddechowej (Leonhard i in., 2019). GBS po infekcji ZIKV, występuje 5-12 dni po wystąpieniu objawów. Prewalencja GBS związanego z ZIKV jest trudna do oszacowania ze względu na rozbieżności w diagnostyce i raportowaniu, jednak szacuje się na 1-2 przypadki na 10 000 zakażeń (Barbi, Coelho, Alencar i Crovella, 2018; Mier-y-Teran-Romero, Delorey, Sejvar i Johansson, 2018). Mimo to, stanowi powód dla ponad 40% hospitalizacji zakażonych pacjentów (Leonhard i in., 2020).

W związku możliwością transmisji ZIKV z matki na płód, wirus został dodany do listy patogenów TORCH (ang. *Toxoplasmosis, Other, Rubella, Cytomegalovirus, Herpes simplex, TORCH*). Są to patogeny, które mogą powodować wyniszczające wady wrodzone (Kovacs, 2020). ZIKV może powodować szereg wad takich jak: małogłowie (mikrocefalię), zapadnięcie czaszki, uszkodzenie tkanki ocznej/wzroku, uszkodzenie tkanki mózgowej, uszkodzenie układu oddechowego (Moore i in., 2017; de Paula Freitas i in., 2016). Razem te jednostki chorobowe reprezentują zespół wad neurologicznych i rozwojowych, określane zbiorczo jako wrodzony syndrom Zika (ang. *congenital zika syndrome, CZS*) (Wheeler, 2018). Wykazano, że infekcja ZIKV obniża poziom genów regulujących cykl komórkowy i mitozę, a także obniża ekspresję genów związanych z nerwowymi komórkami macierzystymi i rozwojem komórek nerwowych (Li i in., 2016; Rombi, Bayliss, Tuplin i Yeoh, 2020).

Co więcej, ZIKV był także powiązany ze zmniejszoną płodnością u mężczyzn (Avelino-Silva i in., 2018). Badania na modelach mysich wykazały możliwość wywołania atrofii jąder, co w konsekwencji może prowadzić do zmniejszenia płodności (Govero i in., 2016; Tsetsarkin i in., 2018). Jednakże, w badaniach z użyciem ssaków naczelnych oraz kohort ludzi nie potwierdziły tej teorii, ale wykazały możliwość replikacji ZIKV w organach reprodukcyjnych (Kurscheidt i in., 2019).

#### 4.1.4. Transmisja

Główną drogą transmisji ZIKV odpowiedzialną za rozprzestrzenianie się ZIKV na całym świecie jest przenoszenie przez komary z rodzaju *Aedes*. W zależności od miejsca występowania można wyodrębnić trzy cykle transmisyjne ZIKV: leśny, miejski z komarów na ludzi oraz miejski z ludzi na ludzi. Leśna transmisja odbywa się głównie na terenie Afryki przy udziale komarów z rodzaju *Aedes* podrodzaju *stegomyia* (*A. africanus*, *A. aegypti*, *A. albopictus*) i *diceromyia* (*A. furcifer*) przenoszących wirusa na ssaki naczelne. Gatunek *A. aegypti*, występujący na terenach miejskich jest głównym wektorem w transmisji miejskiej. Wykazuje on kilka cech korzystnych dla transmisji ZIKV: komary te mogą łatwo rozmnażać się w zbiornikach ze stojącą wodą – występujących w miejskich środowiskach, zazwyczaj do ukąszeń dochodzi w ciągu dnia w trakcie przebywania w pomieszczeniach oraz możliwość wielokrotnych ukąszeń w krótkim czasie (Scott i Takken, 2012). Ponadto, wykazano także możliwość przenoszenia ZIKV przez komary z zakażonych zbiorników wodnych np. ścieków komunalnych (Du i in., 2019). Gatunek *A. albopictus* pozwala na replikację wirusa do wysokich mian, jednak nie przenosi tak łatwo ZIKV jak *A. aegypti* (Ciota, Białosuknia, Ehrbar i Kramer, 2017). Za epidemie w Mikronezji i Polinezji były odpowiedzialne z kolei inne gatunki *A. hensilli* i *A. polynesiensis* (Musso, Nilles i Cao-Lormeau, 2014). Ponadto, testowano także kompetencję wektorową komarów z rodzaju *Culex* przenoszących inne FV np. JEV i stwierdzono, że nie ulegają infekcji przez ZIKV (Gomard, Lebon, Mavingui i Atyame, 2020).

ZIKV może być również przekazywany drogą seksualną (Moreira, Peixoto, Siqueira i Lamas, 2017). RNA wirusa wykryto w nasieniu u blisko 50% zakażonych mężczyzn (Barzon i in., 2018), oraz udowodniono, że wirus może utrzymywać się w narządach rozrodczych przez długi czas nawet do 90 dni (Kurscheidt i in., 2019; Oliveira Souto i in., 2018). Najczęściej odnotowuje się transmisję seksualną z mężczyzny na kobietę, są jednak doniesienia o transmisji z kobiety na mężczyznę oraz z mężczyzny na mężczyznę (Moreira i in., 2017). Szacuje się, że transmisja seksualna ZIKV wynosi około 3% całkowitego rozprzestrzeniania się wirusa, co mogło wydłużyć czas trwania epidemii (Gao i in., 2016). Ponadto, obecność infekcyjnych cząstek wirusowych wykryto we krwi, mleku matki i moczu, jednakże jest mało prawdopodobne, że stanowią one źródła infekcji (Cavalcanti i in., 2017; Gourinat i in., 2015; Magnus i in., 2018; Sotelo i in., 2017).

Charakterystyczną cechą ostatnich epidemii była wertykalna droga transmisji z matki na płód. Infekcja w pierwszych dwóch trymestrach wiązała się z wyższym ryzykiem dla płodu (Cao, Diamond i Mysorekar, 2017). Szacowane ryzyko transmisji spada z 47% w pierwszym trymestrze do 25% w trzecim, co jest skorelowane z ryzykiem wystąpienia CZS (9% - pierwszy trymestr, 1% - trzeci trymestr) (Ades i in., 2021). Chociaż dokładny mechanizm transmisji wertykalnej nie został jeszcze poznany, to droga zakażenia przez łożysko jest możliwa, ponieważ ZIKV demonstruje tropizm do wielu typów linii komórkowych oraz eksplantów tkankowych pochodzących z łożyska z okresu pierwszego trymestru (El Costa i in., 2016).

#### 4.1.5. Cykl replikacyjny

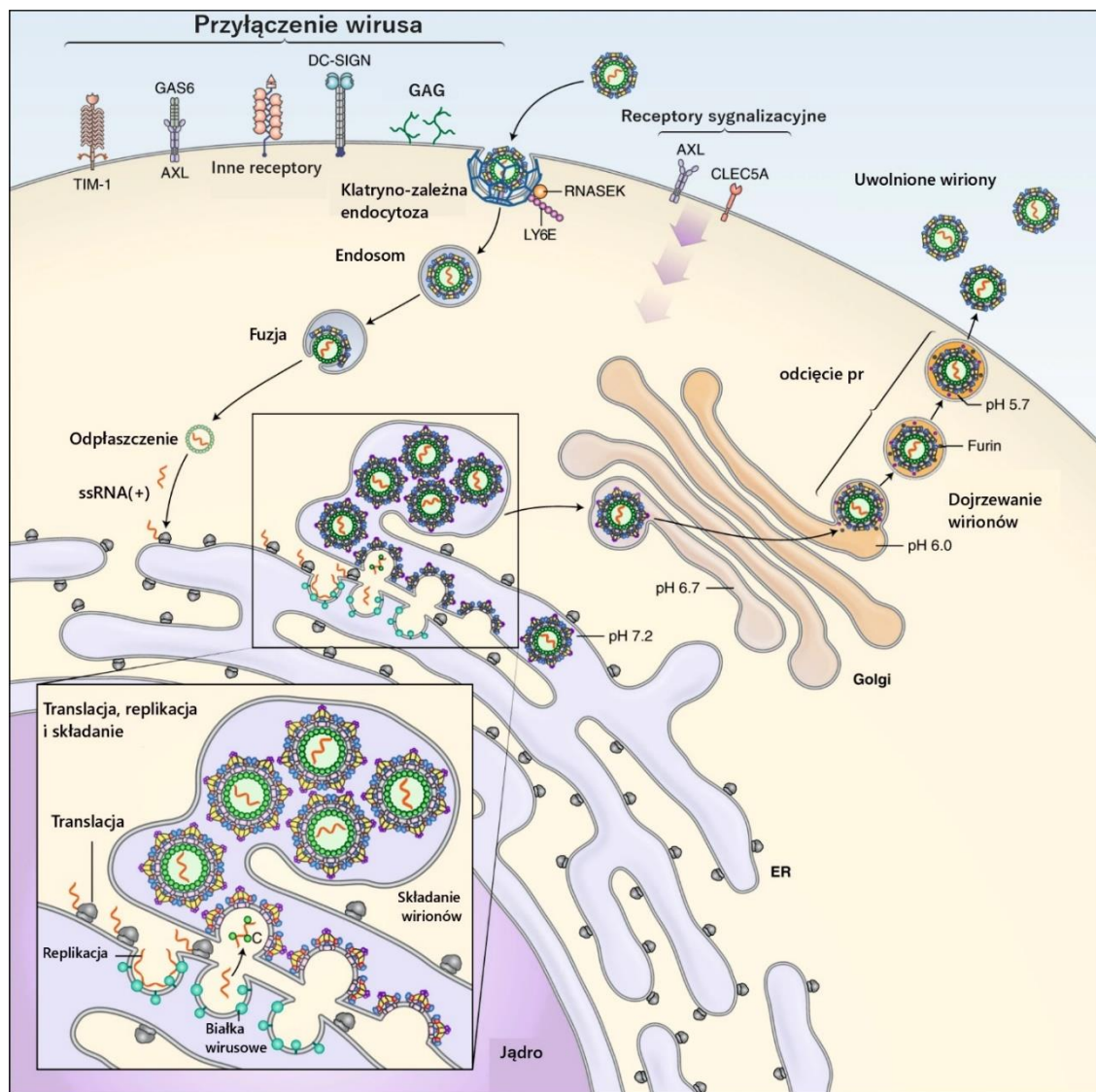
Cykl replikacyjny ZIKV to wieloetapowy proces, który rozpoczyna się od związania wirusa do glikozaminoglikanów (GAG), np. siarczanu heparyny czy siarczanu chondroityny, które stanowią czynnik adhezyjny (**Rycina 2**) (Gao i in., 2019; Kim i in., 2017). Następnie, wirion może ulec związaniu z receptorami. Receptory oddziałujące z glikoproteiną E osłonki to: receptor lektynowy DC-SIGN (ang. *dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin, DC-SIGN*), białko GRP78 (ang. *glucose regulated proteins 78, GRP78*) i NCAM1 (ang. *neural cell adhesion molecule 1, NCAM1*) (Hamel i in., 2015; Khongwichit i in., 2021; Routhu i in., 2019; Srivastava i in., 2020). Ponadto, ZIKV może wykorzystać także receptory oddziałujące z fosfatydyloseryną osłonki wirusowej z rodziny TAM (Tyro3, AXL, Mer) obecne głównie na makrofagach i komórkach dendrytycznych lub z rodziny TIM (ang. *T-cell immunoglobulin mucin, TIM*) obecne na limfocytach T (Hamel i in., 2015; Nobrega i in., 2020). Z nich AXL – receptor kinazy tyrozynowej jest najbardziej kontrowersyjny, który może pełnić dwojaką rolę tj. rolę czynnika adhezyjnego jak również antagonizować odpowiedź interferonową, przez odpowiedź cytokin, co może ułatwić replikację ZIKV (Chen i in., 2018). Sugeruje się także, że rola AXL jako receptora może być tkankowo-specyficzna np. ma znaczenie w procesie wejścia do komórek skóry, komórek Sertolego w jądrach, astrocytów, choć nie jest jedynym czynnikiem adhezyjnym (Hamel i in., 2015; Strange i in., 2019).

Następnie wejście do komórek gospodarza odbywa się głównie poprzez endocytozę za pośrednictwem klatryny (Li i in., 2020). Proces ten zależny jest także od innych białek (Hackett i Cherry, 2018). Wiriony są kierowane do endosomu wczesnego, gdzie niskie pH (~6) powoduje zmiany konformacyjne białek osłonki, głównie E

zmieniając formę dimeryczną na trimeryczną (forma fuzyjna wirionu) co prowadzi do fuzyji osłonki z błoną endosomu. W konsekwencji dochodzi do odpłaszczenia nukleokapsydu, jednak szczegóły tego procesu nie zostały jeszcze odkryte. Sugeruje się rolę niedegradującej ubikwitynacji białka kapsydu C, co powoduje dysocjację nukleokapsydu i uwolnienie RNA (Byk i in., 2016; Wang i in., 2022). Wirusowy RNA w postaci ssRNA(+) ulega translacji do pojedynczej poliproteiny, która ulega obróbce potranslacyjnej oraz jest cięta przez peptydazy sygnałowe gospodarza i wirusową proteazę NS2B/NS3 na poszczególne białka strukturalne i niestrukturalne. Replikacja genomu jest inicjowana przez nowo zsyntetyzowane białka niestrukturalne, szczególnie białko NS5, czyli RNA-zależną RNA polimerazę, która syntetyzuje nić komplementarną ssRNA(-), tworzącą pośrednie dwuniciowe dsRNA z innymi uwolnionymi cząsteczkami ssRNA(+). ssRNA(-) służy następnie jako matryca dla nowych kopii genomu wirusowego (Lindenbach i Rice, 2003). Nowo zsyntetyzowane kopie genomu akumulują się co prowadzi do powstania specyficznych pęcherzyków lub ich pakietów w obrębie siateczki śródplazmatycznej (ang. *endoplasmic reticulum*, *ER*), które razem tworzą tzw. fabryki replikacyjne (Cortese i in., 2017). Struktury te pozwalają na przestrzenne i czasowe skumulowanie metabolitów potrzebnych w procesie replikacji oraz na „ukrycie” nowo syntetyzowanych cząstek RNA przed układem immunologicznym. Z kolei w błonie ER, naprzeciwko fabryk replikacyjnych, białka strukturalne C-prM-E ulegają obróbce potranslacyjnej. Białko NS2A rekrutuje kompleks białek C-prM-E oraz proteazę NS2B/NS3, która odcina białko C od białek osłonki prM-E, a te z kolei są cięte przez kompleks peptydazy sygnałowej I (Zhang i in., 2016, 2019b). Wtedy białko NS2A wychwytuje nowo powstałe kopie genomu, które następnie oddziałują z białkiem C tworząc nukleokapsyd, opłaszczony przez osłonkę, co skutkuje powstaniem niedojrzałych wirionów. Ponadto, w trakcie procesu składania wytwarzane są także cząstki wirusopodobne składające się tylko z osłonki wirusowej z zakotwiczonymi glikoproteinami prM/M i E, które są nieinfekcyjne (Lobigs i Lee, 2004). W niedojrzałych cząstkach wirusowych glikoproteina E osłonki występuje w formie heterotrimerycznej z glikoproteiną osłonki prM. Cząstki ulegają dalej transportowi do aparatu Golgiego, gdzie poddawane są dalszym modyfikacjom np. dojrzewaniu glikanów. W sieci trans aparatu Golgiego, białko osłonki prM jest cięte przez furynę lub furynopodobne proteazy na fragment pr i dojrzałe białko M, co wywołuje reorganizację struktury wirionu – zmianę formy trimerycznej białka E w formę dimeryczną. Następnie, dojrzałe wiriony opuszczają komórkę, a zmiana pH na obojętne powoduje oddysocjowanie fragmentu pr



od cząstek (Yu i in., 2009). Ponadto, zaobserwowano sekrecję do pożywki również niedojrzałych oraz częściowo dojrzałych cząstek wirusowych, a także VLPs.



**Rycina 2. Cykl replikacyjny wirusa Zika**

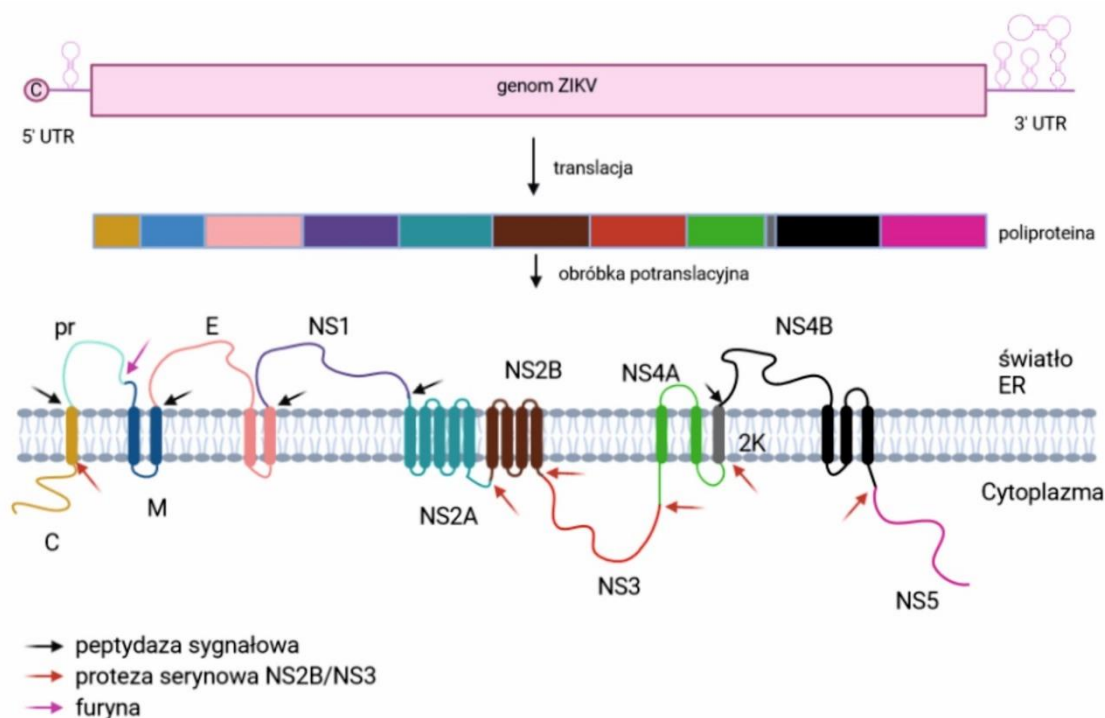
Źródło: na podstawie Pierson i Diamond 2020.

#### 4.1.6. Genom oraz białka wirusowe

Genom wirusa Zika jest w postaci ssRNA(+) i ma długość ~11 000 zasad. Genom ma pojedynczą otwartą ramkę odczytu (~10 200 zasad) i jest oflankowany przez nieulegające translacji regiony 5' UTR i 3' UTR (van Hemert i Berkhout, 2016) (**Rycina 3**). 5' UTR i 3' UTR to odpowiednio około 106 i 430 zasad. Ponadto, genom posiada strukturę czapeczki typu I (metylowana grupa hydroksylowa w pozycji 2' rybozy) na końcu 5', natomiast koniec 3' nie posiada ogona poliadenylowanego, za to konserwowany fragment CUOH, tworzący struktury drugorzędowe. Drugorzędowe struktury tzw.



pseudowęzły w regionach UTR, pomagają utrzymać integralność i stabilność genomu RNA oraz regulują replikację RNA i translację białek (Zhao i Woodside, 2021). ORF koduje jedną poliproteinę o długości ~3400 aminokwasów (aa). Pojedyncza poliproteina jest cięta i przetwarzana przez proteazy wirusowe i proteazy gospodarza na 3 białka strukturalne (C, prM, E) i siedem niestrukturalnych (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B i NS5). **Tabela 2** przedstawia ogólne funkcje poszczególnych białek ZIKV.



**Rycina 3. Organizacja genomu i poliproteiny, wraz organizacją białek ZIKV w błonie lipidowej w trakcie obróbki potranslacyjnej.**

**Tabela 2. Ogólne funkcje białek wirusa Zika.**

Białko	Funkcja
C	Tworzenie nukleokapsydu.
prM/M	Glikoproteina osłonki. PrM pełni rolę białka opiekuńczego dla glikoproteiny E podczas składania i dojrzewania wirionów.
E	Główna glikoprotein osłonki. Bierze udział w wejściu do komórki i składaniu wirionów. Cel dla przeciwciał neutralizujących.
NS1	Wymagane do tworzenia kompleksu replikacyjnego - remodelowanie struktury ER. Rola w unikaniu odpowiedzi immunologicznej (Ci i in., 2020; Shukla, Rastogi i Singh, 2021).

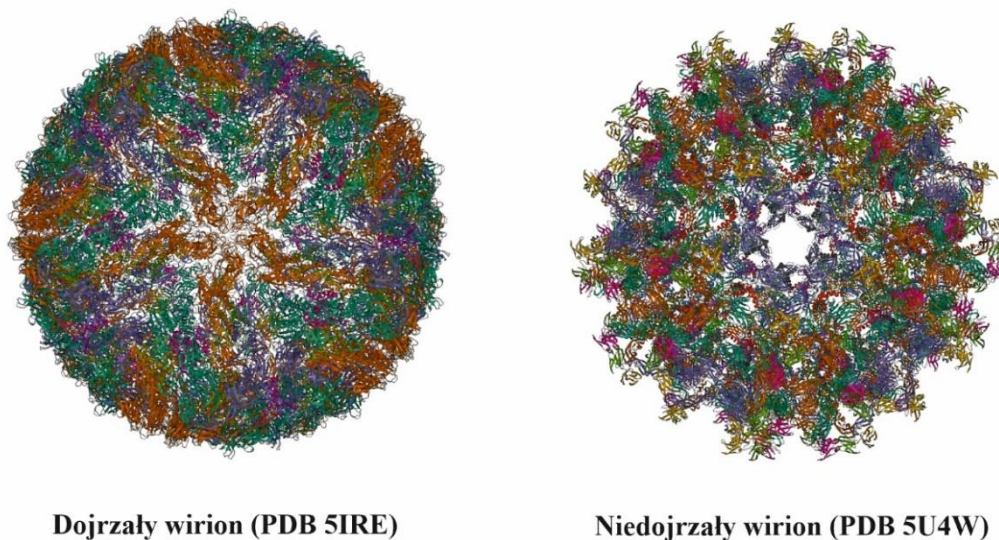
NS2A	Zaangażowane w działanie fabryk replikacyjnych i składnia wirionów. Blokowanie interferonu.
NS2B	Pełni funkcje kofaktora dla NS3 (Kurz, Stefan, Zhu i Skern, 2012).
NS3	Proteaza serynowa, cięcie poliproteiny wirusowej.
NS4A	Zaangażowane w remodelowanie struktury ER. Oddziaływanie z układem immunologicznym, blokuje odpowiedź wywołaną przez interferon typu I (Yu i in., 2022).
NS4B	Zaangażowane w replikację RNA i modulowanie odpowiedzi interferonowej (Fanunza i in., 2021).
NS5	RNA-zależna polimeraza RNA. Metylacja czapeczki wirusowego RNA. Hamowanie odpowiedzi przeciwwirusowej.

#### 4.1.7. Struktura wirionu

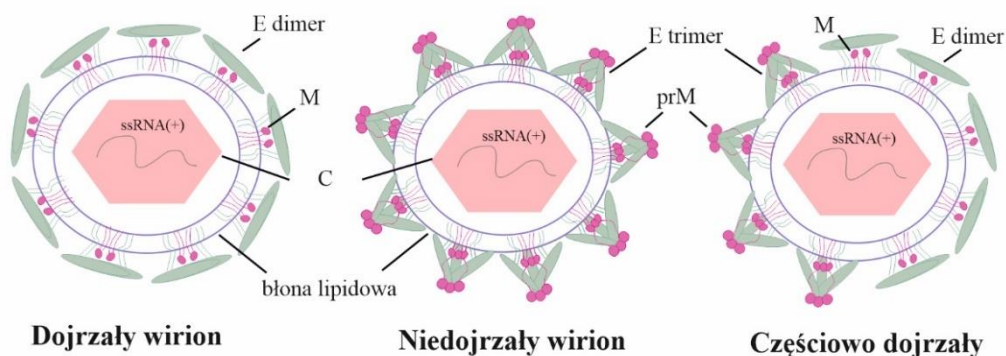
W ostatnich latach struktury dojrzałych i niedojrzałych wirionów ZIKV zostały pokazane przy użyciu kriomikroskopii elektronowej (cryo-EM) (Kostyuchenko i in., 2016; Prasad i in., 2017; Sevvana i in., 2018; Sirohi i in., 2016). Struktura dojrzałej cząstki wirionu została ustalona przy rozdzielczości atomowej 3.1 Å, a niedojrzałej 9 Å (**Rycina 4 a i B**). Dojrzała cząstka ZIKV ma średnicę ~50 nm, niedojrzała ~60 nm. Obie zbudowane są z nukleokapsydu otoczonego dwuwarstwą lipidową pochodzącą z błon ER gospodarza, w której zakotwiczone są 180 kopie dwóch białek powierzchniowych: glikoproteiny prM (niedojrzały wirion) lub białka M (dojrzały wirion) oraz glikoproteiny E. Dojrzały wirion wykazuje budowę dwudziestościenną (ikozaedralną), o gładkiej powierzchni z wyjątkiem N-glikanów w pętli glikozylacji w E, która jest eksponowana na powierzchni. Inny region eksponowany na powierzchni to domena III glikoproteiny E, szczególnie niektóre z jej pętli, bogate w serynę lub treoninę (Sevvana i in., 2018). Białko E w dojrzałej cząstce wykazuje strukturę jodełki tj. 30 kopii równoległych dimerów heterodimeru białek E i M (E-M)<sub>2</sub>, które są zlokalizowane na krawędziach ikozaedru, a 60 kopii (E-M)<sub>2</sub> na ścianach ikozaedru. Natomiast, niedojrzała cząstka charakteryzuje się obecnością 60 kopii trimerów heterodimeru białek E i prM (E-prM)<sub>3</sub>, co sprawia, że cząstka ma kolczastą powierzchnię. Trimery te nie wykazują symetrii trzykrotnej. Struktura niedojrzałej cząstki jest stabilizowana przez oddziaływanie fragmentu pr z pętlą fuzyjną, natomiast w przypadku formy dojrzałej wydaje się, że są to oddziaływania E-E, E-M i M-M w regionie ich domen transmembranowych (Sevvana i in., 2018). Struktura ZIKV jest bardzo podobna do DENV, jednak wykazuje większe

upakowanie i stabilność w wysokich temperaturach, co również zostało wykazane za pomocą techniki cryo-EM (Kostyuchenko i in., 2016). Co więcej, ekspozycja na różne temperatury może także wpływać na strukturę, jak to ma miejsce w przypadku DENV, co może pozwalać na wiązanie się przeciwciał do ukrytych epitopów lub receptorów np. TIM1 (Zhang i in., 2013). Ponadto, największe wariacje pomiędzy strukturą ZIKV, a innych FV obserwowane są w pętli glikozylacji oraz pętlach DIII glikoproteiny E w dojrzałych cząstkach oraz we fragmencie pr w niedojrzałych cząstkach. Dodatkowo struktura wirionu może ulegać przestrzennym nieodwracalnym reorganizacjom. W niskim pH homodimery białka E w dojrzałych wirionach mogą ulegać rearanżacji do formy trimerycznej, czyli takiej jaka występuje przy fuzji, gdzie pętla fuzyjna jest eksponowana na wierzchołkach homotrimerów (Wang i in., 2019a) (**Rycina 4 C**).

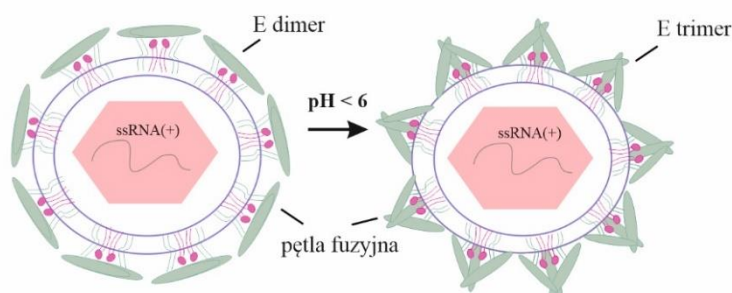
A



B



C



**Rycina 4. Struktura wirionów ZIKV. Struktura cryo-EM dojrzałych i niedojrzałych cząstek (A). Schematyczna struktura dojrzałych, niedojrzałych i częściowo dojrzałych cząstek (B). Wpływ niskiego pH na strukturę dojrzałych cząstek (C).**

#### 4.1.1. Białka powierzchniowe prM/M i E

##### Białko prM/M

Białko prM jest to glikoproteina osłonki wirusowej (~166 aa, ~26 kDa), która ulega cięciu na fragment pr i dojrzałe białko M (~75 aa, ~9 kDa) w trakcie dojrzewania wirionów przez proteazę furynową komórki gospodarza. PrM jest to białko transmembranowe typu I i posiada dwie domeny transmembranowe na końcu

karboksylowym, które znajdują się w obrębie dojrzałego białka M. Domeny transmembranowe poprzedzone są domeną helikalną i pętlą na N-końcu (białko M) (Sirohi i in., 2016). W poliproteinie wirusowej białko prM jest poprzedzone przez białko C, którego domena transmembranowa stanowi sekwencję sygnałową dla prM i jest odcinana przez peptydazę sygnałową gospodarza (Zhang i in., 2016).

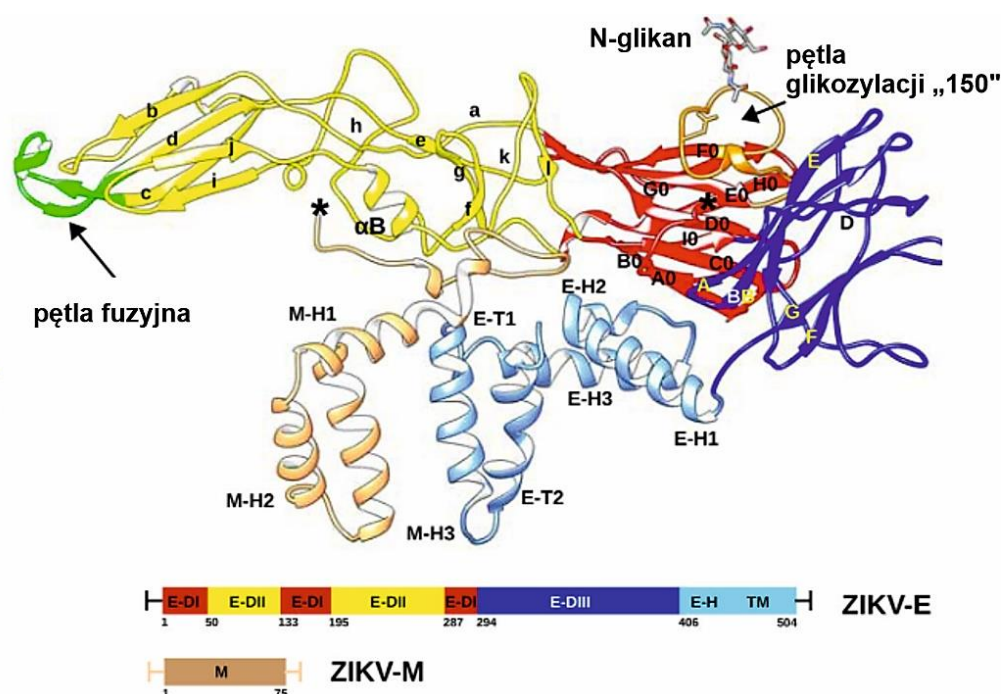
Glikoproteina prM odgrywa rolę białka opiekuńczego w trakcie fałdowania białka E (Lorenz, Allison, Heinz i Helenius, 2002). Ponadto, stabilizuje strukturę niedojrzałych wirionów, a fragment pr chroni przed przedwczesną fuzją z błoną pęcherzyków transportowych, gdzie panuje niskie pH (Nambala i Su, 2018; Zhang i in., 2018). Białko prM posiada jedno miejsce N-glikozylacji (N69) we fragmencie pr, które odgrywa kluczową rolę w sekrecji oraz infekcyjności wirionów. Ponadto, brak glikozylacji tego miejsca powoduje agregację białek osłonki, co dalej wywołuje stres ER (Gwon i in., 2020). Odkryto również, że ubikwitynacja białka prM promuje sekrecję cząstek wirusowych (Nambala i in., 2020).

Co więcej, usunięcie miejsca glikozylacji w białku E z reporterowych cząstek produkowanych w komórkach nieposiadających furyny, tylko częściowo obniżyło wejście do komórek Raji ekspresujących DC-SIGNR (Goo i in., 2018). Sugeruje to oddziaływanie glikanów białka prM z niedojrzałych lub częściowo dojrzałych wirionów z receptorami lektynowymi, co może wzmacniać wejście wirusa do komórek. Podobne zjawisko zaobserwowano dla wirusa Binjari, należącego do rodzaju *Flavivirus*, który naturalnie produkuje infekcyjne, niedojrzałe cząstki wirusowe, mimo tego, że pętla fuzyjna jest przykryta fragmentem pr (Newton i in., 2021). Prawdopodobnie, po adhezji wirusa, białko prM jest cięte przez furynę i wtedy białko E może ulec fuzji z błoną endosomu. Również niedojrzałe cząstki wirusowe DENV są zdolne do wejścia do komórek przez interakcję z DC-SIGN (Richter i in., 2014).

Dotychczasowe badania również odkryły znaczenie białka prM w neuroinwazyjności ZIKV. 10 konserwowanych reszt aminokwasowych w białku prM szczepów z linii afrykańskiej przyczynia się do większej neuroinwazyjności w mysim modelu zwierzęcym pozbawionych IFN $\alpha/\beta$  (*Ifnar<sup>-/-</sup>*) (Nakayama i in., 2021). Ponadto, mutacja seryny w pozycji 139 w białku prM obecna w szczepach brazylijskich przyczyniła się do zwiększenia neurowirulencji oraz rozwinięcia mikrocefalii u płodów myszy (Yuan i in., 2017).

## Białko E

Glikoproteina E osłonki ma długość 504 aa i masę cząsteczkową ~53 kDa (**Rycina 5**). Sekwencję sygnałową dla białka E stanowią domeny transmembranowe białka prM. W dojrzałym wirionie białko to występuje w formie anty-równoległego homodimeru, który ulega rearanżacji do trimeru w trakcie fuzji, przez co zalicza się do klasy II białek fuzyjnych (Kielian i Rey, 2006). E na końcu karboksylowym posiada domenę transmembranową – dwie  $\alpha$ -helisy (region „anchor”, TM) kotwiczące je w dwuwarstwie lipidowej oraz domenę helikalną (region „stem”, E-H) łączącą region anchor z ektodomeną. W ektodomenie można wyróżnić trzy strukturalnie odrębne domeny: I, II i III.



**Rycina 5. Struktura białka E i M** (na podstawie Sevvana et al., 2018)

Domena I (DI) przyjmuje konformację  $\beta$ -baryłki i zawiera pętlę z miejscem N-glikozylacji (N154), nazywaną także pętlą „150”. Szczepy linii afrykańskiej różnią się od szczepów linii azjatyckiej brakiem tego miejsca. Ponadto, stosując technikę spektrometrii mas, zaobserwowano N-glikany na białku E pochodzącym ze szczepów obu linii, co może sugerować obecność innych miejsc N-glikozylacji (Routhu i in., 2019). Należy nadmienić, że profil N-glikanów jest mocno uzależniony od typu N-glikozylacji danej linii komórkowej. Dodatkowo, wykryto również obecność O-glikanów na białkach powierzchniowych po infekcji ZIKV, co korelowało z danymi uzyskanymi z analizy spektrometrii masowej N-glikanów białka E. ZIKV (obie linie) może również infekować



komórki monocytarne ekspresujące DC-SIGN i DC-SIGNR. Mutacja miejsca N-glikozylacji N154 atenuuje ZIKV w inokulacji podskórnej, ale nie w inokulacji wewnątrzczaszkowej w mysim modelu *Ifnar*<sup>-/-</sup> (Carbaugh, Baric i Lazear, 2019). Ponadto, mutacja tego miejsca indukuje silniejszą odpowiedź cytokin w komórkach dendrytycznych, co sugeruje, że miejsce glikozylacji odgrywa rolę w unikaniu odpowiedzi immunologicznej gospodarza (Fontes-Garfias i in., 2017). N154 ma również znaczenie w replikacji ZIKV w komarach, gdyż mutacja tego miejsca silnie zredukowała poziom infekcji komarów *A. aegypti*. N-glikozylacja białka E odgrywa również znaczenie w składaniu i sekrecji cząstek wirusowych. Wykazano, że delecja N154 hamuje sekrecję białka E produkowanego w obecności lub braku białka prM, jednakże mogła być częściowo przywrócona przez zmianę temperatury hodowli komórek na niższą (z 37 °C na 28 °C) (Mossenta i in., 2017). Wykazano również ubikwitynację białka E w pozycji K67 w DI, która pozwala na oddziaływanie z TIM1, co zwiększa neurowirulencję ZIKV. Brak ubikwitynacji atenuuje replikację ZIKV w komórkach ludzkich i modelu mysim, natomiast nie u komarów (Giraldo i in., 2020).

Domena II (DII) ma konformację zbliżoną do domeny palca cynkowego i zawiera wysoce konserwowaną wśród FV hydrofobową pętlę fuzyjną. Ponadto, DII zawiera dwie konserwowane reszty aminokwasowe – V114 i A250 (Rangel i in., 2022). Walina 114 jest kluczowa dla replikacji ZIKV w płodach myszy, ale nie w komarach. Natomiast, alanina 250 pełni rolę w produkcji cząstek wirusowych. Treonina w pozycji 267 pełni rolę w stabilizacji temperaturowej cząstek wirusowych (Xie i in., 2018a).

Domena III (DIII) jest strukturalnie podobna do immunoglobuliny. DIII może być zaangażowana w składanie i sekrecję cząstek wirusowych, gdyż mutacja kwasu asparaginowego w pozycji 389, zaburza powstawanie trimerów i hamuje wyjście cząstek z komórki (Ma, Yuan i Yi, 2022). Co ważniejsze, DIII jest głównym celem dla przeciwciał neutralizujących, choć immunizacja samą DIII lub jej dimerem nie jest wystarczająca do kompletnej ochrony przed wirusem (Gallichotte i in., 2019; López-Camacho i in., 2020).

#### 4.1.2. Oddziaływanie z układem immunologicznym

##### **Odporność wrodzona**

Zazwyczaj inokulacja ZIKV następuje w trakcie ukąszenia człowieka przez komara. Cząstki wirusa dostają się wraz ze śliną komara do warstwy skórnej, gdzie ZIKV ulega pierwotnej replikacji, głównie w komórkach monocytarnych i mieloidalnych np.

komórkach Langerhansa, makrofagach, niedojrzałych komórkach dendrytycznych skóry (Hamel i in., 2015). Poza tym komórki skóry takie jak fibroblasty i keratynocyty również wykazują permisywność dla ZIKV. Pierwotna replikacja wirusa przyczynia się do wzrostu wirerii. Ponadto, najnowsze badanie sugeruje rolę białka śliny komarów jako czynnika indukującego autofagię w komórkach układu immunologicznego gospodarza, co promuje replikację wirusa (Sun i in., 2020). Wraz z komórkami mieloidalnymi ZIKV jest transportowany do węzła chłonnego, skąd dalej może rozprzestrzenić się do innych narządów. Ponadto, dwa rodzaje makrofagów (M1 i M2) odgrywa rolę w patogenezie mikrocefalii wywołanej przez ZIKV. Makrofagi M1 obecne w łożysku zainfekowanym ZIKV charakteryzują się prozapalną odpowiedzią, co koreluje z uszkodzeniami tkanki (Rabelo i in., 2018). Natomiast, makrofagi M2 zaangażowane są w odpowiedź antyzapalną, co ułatwia replikację ZIKV (Hirsch i in., 2018). Makrofagi M1 i M2 odgrywają rolę także w infekcji centralnego układu nerwowego. M1 wzmacniają stan zapalny komórek nerwowych, a M2 hamują, co chroni parenchymę mózgu przed szkodliwym działaniem stanu zapalnego (Azevedo i in., 2018). Jednakże, oba typy zaangażowane są w wywołanie apoptozy komórek nerwowych. Co więcej, komórki NK są także zaangażowane w wywołanie patologicznych zmian komórek nerwowych.

Oddziaływanie ZIKV z zewnątrz- i wewnątrzkomórkowymi receptorami rozpoznającymi patogeny (ang. *pathogen recognizing receptor*, *PRR*) np. receptorami toll-podobnymi-TLR (ang. *toll-like receptor*, *TLR*) (np. TLR3) powodują wytwarzanie cytokin i chemokin, które indukują stan zapalny (da Silva i in., 2019). Układ interferonowy (IFN), szczególnie typu I (IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ ) i II (IFN $\gamma$ ), jest głównym mechanizmem obronnym podczas stanu zapalnego wywołanego infekcją ZIKV. Modele infekcji *in vitro* wykazały, że stymulacja IFN typu I spowodowała zanik permisywności linii komórkowych dla ZIKV (Hamel i in., 2015). Zwiększoną ekspresję IFN typu I i II, czynników apoptotycznych i innych prozapalnych cytokin zaobserwowano we krwi obwodowej osób z ostrym zakażeniem ZIKV, w porównaniu ze zdrowymi kontrolami (da Silva i in., 2019). IFN $\beta$  aktywuje ścieżkę JAK-STAT, co promuje transkrypcję genów stymulowanych przez IFN. ZIKV NS2B/NS3 blokuje tę ścieżkę przez kierowanie Jak1 do degradacji i hamuje apoptozę indukowaną przez wirusa (Wu i in., 2017). Z kolei IFN $\beta$  może indukować degradację autofagalną NS2B/NS3, a NS1 i NS4B hamuje produkcję IFN, aby stabilizować NS2B/NS3. Ponadto wykazano, że białko NS5 ZIKV antagonizuje ścieżkę sygnalizacyjną IFN typu I przez degradację proteasomalną STAT2 – czynnika aktywującego transkrypcję (Grant i in., 2016, s. 2). Białka niestrukturalne hamują także



produkcję IFN przez oddziaływanie z elementami ścieżki RIG-1 (Xia i in., 2018). RIG-1 jest to cytozolowy PRR rozpoznający dwuniciowy RNA, którego rolą jest aktywacja ścieżki IFN typu I. RIG-1 rozpoznaje 5' UTR wirusa Zika (Chazal i in., 2018). Dodatkowo, wirusy z linii azjatyckiej posiadają mutację w NS1, która wzmacnia infekcje komarów, a co ważniejsze hamuje produkcję IFN $\beta$  (Xia i in., 2018).

### **Odpowiedź komórkowa**

Limfocyty T CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> odgrywają rolę zarówno przy infekcji jak i przy immunizacji antygenami ZIKV. Epitopy dla obu typów limfocytów T znajdują się zarówno w białkach strukturalnych jak i niestrukturalnych. Większość pacjentów wykazuje obecność limfocytów CD4<sup>+</sup> skierowanych do białek strukturalnych, jednakże silniejsza odpowiedź jest w kierunku NS1, NS3 i NS5. Odwrotna sytuacja jest w przypadku limfocytów CD8<sup>+</sup>, gdzie większość pacjentów wykazała odpowiedź do NS3, NS4B i NS5, ale silniejsza była do białek strukturalnych (El Sahly i in., 2018; Ricciardi i in., 2017). Limfocyty T pojawiają się po około 7 dniach od wystąpienia objawów, a ich poziom rośnie do około 20 dnia; limfocyty T pamięci można wykryć do około 6-10 miesięcy. Głównie limfocyty T pamięci obejmują limfocyty typu CD4<sup>+</sup> (Cimini i in., 2017, s. 4). Ponadto, zaobserwowano większy poziom limfocytów T u osób bez wiremii, co może sugerować udział tych komórek w usuwaniu ZIKV z organizmu (Lum i in., 2018).

Pomimo pozytywnego wpływu odpowiedzi komórkowej w zwalczaniu wirusa Zika, sugeruje się także rolę limfocytów T w patogenezie infekcji. Wykazano infiltrację mózgu limfocytami CD8<sup>+</sup> w trakcie infekcji ZIKV myszy *Ifnar*<sup>-/-</sup>, która korelowała z postępującym paralizem i śmiercią zwierząt. Usunięcie tych limfocytów zredukowało objawy neurologiczne i podwyższyło przeżywalność, ale zwiększyło poziom wirusa w mózgu. Natomiast usunięcie obu typów limfocytów T obniżyło przeżywalność, co sugeruje rolę CD4<sup>+</sup> w walce z wirusem (Jurado i in., 2018, s. 8). Transfer limfocytów T CD4<sup>+</sup> z myszy zainfekowanych ZIKV do myszy *Ifnar*<sup>-/-</sup> ochronił zwierzęta przed śmiertelną infekcją wirusową (Hassert i in., 2018).

Limfocyty T mogą także odgrywać rolę w wzmocnieniu infekcji, w tzw. zjawisku pierwotnego grzechu antygenowego (ang. *original antigen sin*, OAS). OAS występuje, gdy heterologiczna drugorzędowa infekcja aktywuje limfocyty T pamięci, które rozpoznają podobny antygen do antygeny, który był obecny w trakcie pierwotnej infekcji. Skutkuje to nieefektywną odpowiedzią limfocytów T przeciwko drugorzędowej infekcji. Zaobserwowano wiele epitopów w białku E i C, które występują w analogicznych

regionach w tych białkach u innych FV: DENV, TBEV i YFV (Koblichke i in., 2018). Limfocyty T pozostające po pierwotnej infekcji DENV rozpoznają epitopy zlokalizowane w proteomie ZIKV. Osoby DENV-pozytywne w momencie zakażenia ZIKV reagują silniej na ZIKV zarówno pod względem odpowiedzi komórek CD4+, jak i CD8+. Jednak, wzorce immunodominacji są różne w przypadku infekcji DENV i ZIKV, gdzie odpowiedzi limfocytów T CD8+ specyficzne dla ZIKV są skierowane głównie na białka strukturalne, a dla DENV na białka niestrukturalne (Grifoni i in., 2017). Co więcej, jedno badanie pokazało krzyżową ochronę przed ZIKV po immunizacji żywym atenuowanym wirusem JEV mysiego modelu zwierzęcego, która była spowodowana obecnością krzyżowo-reaktywnych limfocytów T (Reynolds i in., 2018). Tak, więc wpływ limfocytów T w infekcji oraz w zapewnieniu ochrony przed ZIKV po immunizacji nie jest do końca określony jako pozytywny czy negatywny.

### **Odpowiedź humoralna**

Przeciwciała specyficzne do ZIKV pojawiają się w krwioobiegu już w 2-3 dniu po infekcji (Rogers i in., 2017). Wzrost przeciwciał w surowicy koreluje i jest spowodowany z pojawieniem się plazmoblastów, czyli komórek produkujących przeciwciała, których zawartość w całkowitej puli limfocytów B może wynosić aż do ~60% (Lai i in., 2018). Plazmoblasty produkują głównie immunoglobuliny M (IgM) oraz G i A (IgG i IgA), specyficzne do ZIKV. Komórki te zanikają w około 20 dniu infekcji. Jednakże, przeciwciała wyizolowane z populacji limfocytów B z wczesnej/ostrej fazy infekcji wykazują większą reaktywność krzyżową z DENV, mniejszą specyficzność do ZIKV oraz słabe właściwości neutralizujące w porównaniu z przeciwciałami z późnej fazy/fazy rekonwalescencji (Yu et al., 2017). Wyniki te sugerują, że odpowiedź przeciwciał indukowana przez ZIKV dojrzeje z czasem i kłony komórek B, które wytwarzają przeciwciała o większym powinowactwie i silniejszym poziomie neutralizującym ZIKV ulegają selekcji i są w puli limfocytów po infekcji. Jednakże okres, przez jaki cyrkulują w krwioobiegu nie jest do końca znany; obecnie wiadomo, że utrzymują się do 3-5 miesięcy. Ponadto, produkcja przeciwciał specyficznych do ZIKV jest stymulowana również przez limfocyty T CD4+ (Lucas i in., 2018). Przeciwciała IgM występujące w fazie ostrej w moczu i w surowicy są skierowane głównie do białka E, NS3 oraz NS5 (Ravichandran i in., 2019). Natomiast przeciwciała IgG są obecne głównie w surowicy i są skierowane do białek E, prM, NS1 i NS2B (Gao i in., 2018; Ravichandran i in., 2019). Większość przeciwciał neutralizujących wyizolowanych z limfocytów B osób zakażonych jest skierowana przeciwko DIII lub czwartorzędowym

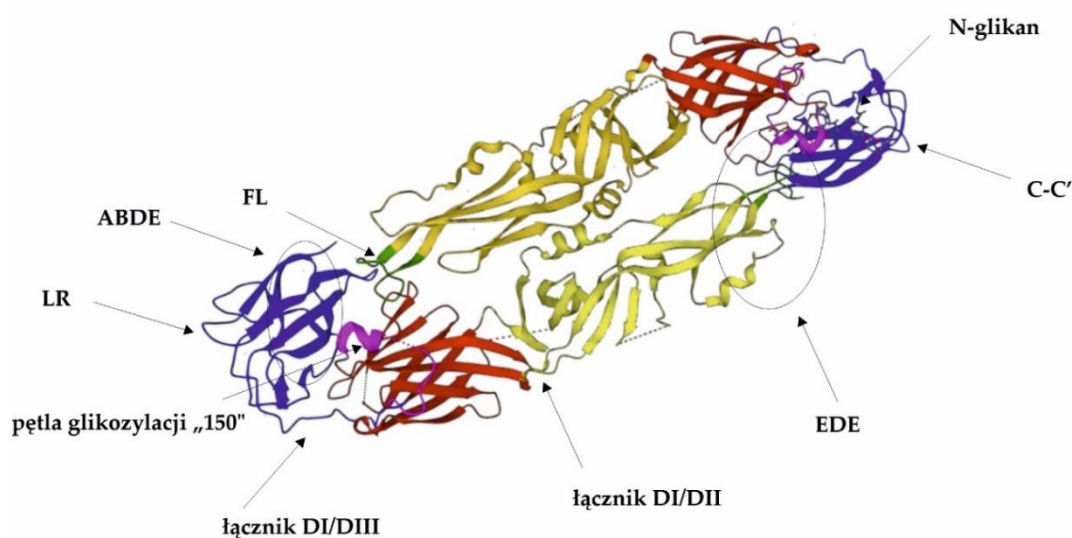
epitopom na powierzchni wirionu. Przeciwciała kierowane do DIII są w stanie zapewnić całkowitą ochronę przed infekcją ZIKV w modelu mysim (Stettler i in., 2016; Wang i in., 2016b). Przeciwciała skierowane przeciwko NS1 pojawiają się około dwa tygodnie później niż przeciwciała do E i nie są krzyżowo-reaktywne z DENV, co czyni je dobrym markerem diagnostycznym (Gao i in., 2018).

Badano również krzyżową reaktywność przeciwciał między ZIKV i DENV, szczególnie w kontekście prawdopodobieństwa wystąpienia zjawiska wzmocnienia infekcji zależnego od przeciwciał – ADE (ang. *antibody-mediated enhancement of infection, ADE*). ADE występuje gdy subneutralizujące, krzyżowo-reaktywne przeciwciała tworzą kompleksy z cząstkami wirusowymi i pośredniczą w endocytozie zależnej od receptorów Fcγ tych kompleksów, co prowadzi do infekcji komórek z ekspresją tych receptorów (Halstead, 2003). Zjawisko to dotyczy przede wszystkim wirusa DENV, gdzie np. infekcja serotypem 1 powoduje powstanie przeciwciał krzyżowo-reaktywnych, które wzmacniają infekcję innym serotypem. Wysokie podobieństwo sekwencji aminokwasowej białek ZIKV i DENV oraz podobna organizacja przestrzenna wirionów, sprawiła, że zjawisko ADE zostało pokazane w wyniku infekcji tymi wirusami w modelach *in vitro* oraz modelach mysich (Bardina i in., 2017; Priyamvada i in., 2016; Stettler i in., 2016). Ponadto, z użyciem tych modeli udowodniono, że ADE zależy od stężenia przeciwciał, gdyż wysokie stężenia chronią przed infekcją. Natomiast, badania na ssakach naczelnych wykazały brak zjawiska ADE w infekcji ZIKV, po wcześniejszym zakażeniu DENV (McCracken i in., 2017; Pantoja i in., 2017). W tych badaniach wykazano nawet pozytywny wpływ pierwotnej infekcji DENV na czas utrzymywania się wirerii. Jednakże, przeprowadzono perspektywiczne badanie wystąpienia ADE na kohorcie pacjentów pediatrycznych z okresu 2004-2020 z terenu Nikaragui, gdzie monitorowano zakażenia DENV (serotypy 1-4) i ZIKV (Katzelnick i in., 2020). Wykazano, że ryzyko wystąpienia objawowej/ciężkiej infekcji DENV serotypu 2 mogło być zwiększone przez wcześniejsze zakażenie ZIKV lub innym serotypem DENV. Pokazano również, że wielokrotna infekcja DENV redukuje wystąpienie groźnych objawów.

#### *4.1.3. Antygenowe determinanty białka E w odpowiedzi przeciwciał*

Przeciwciała anti-E zostały zmapowane do epitopów we wszystkich trzech domenach białka. Najbardziej konserwowanym epitopem jest pętla fuzyjna (FL), która jest także immunodominującym epitopem, ale jego dostępność zależy od stopnia

dojrzałości wirusa (**Rycina 6**) (Stiasny, Kiermayr, Holzmann i Heinz, 2006). Dostępność tego epitopu wzrasta przez obecność białka prM na powierzchni niedojrzałych wirionów (Cherrier i in., 2009). Na powierzchni dojrzałego wirusa, gdzie białko E występuje w konformacji dimerycznej, FL jest częściowo schowana, przez co jest mniej dostępna dla przeciwciał (Sevvana i in., 2018). Z tego powodu przeciwciała do tego epitopu np. 4G2, 2A10G6 są krzyżowo-reaktywne i wykazują słabe lub średnie właściwości neutralizacyjne. Administracja 500  $\mu$ g przeciwciała 2A10G6 zapewniła ochronę przed ZIKV w badaniach na modelu mysim (Dai i in., 2016). Z drugiej strony, immunizacja VLPs ze zmutowaną pętlą fuzyjną nie zapewniła ochrony przed ZIKV, a nawet surowice poszczepienne były w stanie wzmocnić efekt ADE infekcji DENV, w porównaniu do VLPs dzikiego typu (Thompson i in., 2022). Stettler i in. wyizolowali z surowic pacjentów zakażonych ZIKV inne przeciwciała skierowane do DI/DII – ZKA78, które było krzyżowo-reaktywne z DENV, i wykazywało częściową neutralizację oraz ADE wobec obu wirusów *in vitro* oraz *in vivo* (Stettler i in., 2016). Wprowadzenie mutacji LALA (Leu234Ala/Leu235Ala) do rejonu Fc tego przeciwciała zablokowało częściowo efekt ADE infekcji DENV serotypu 2. Inny rejon silnie eksponowany na powierzchni dojrzałych cząstek ZIKV to tzw. pętla glikozylacji „150” (147–161 aa białka E), która zawiera miejsce glikozylacji N154. Pętla ta jest specyficzna dla każdego z wirusów. Immunizacja królików białkiem eksponującym tę pętlę doprowadziła do generacji przeciwciała R34, które jest wykorzystywane jako element testu mikroneutralizacji ZIKV (López-Camacho i in., 2018).



**Rycina 6. Rozmieszczenie epitopów w strukturze homodimerów białka E.** Struktura dimeru – PDB 5LBV, DI-czerwony, DII-żółty, DIII niebieski, różowy pętla glikozylacji „150”, zielony – FL.

Jednak, to DIII jest najmniej konserwowaną domeną wśród FV, a przeciwciała do niej skierowane są zwykle specyficzne do danego wirusa. Przeciwciała do DIII także stanowią dużą frakcję panelu przeciwciał generowanych w infekcji ZIKV (Niu i in., 2020; Ravichandran i in., 2019). Jednakże, jedno badanie sugeruje większą dominację przeciwciał do domeny DIII po immunizacji białkiem E myszy niż po infekcji ZIKV (Gallichotte i in., 2019). Wiele przeciwciał monoklonalnych skierowanych do DIII zostało wygenerowanych w myszach po infekcji ZIKV (ZV2) lub po infekcji z połączoną z immunizacją rekombinowaną DIII (ZV84, ZV54, ZV64, ZV67) (Zhao i in., 2016). Wszystkie te przeciwciała są specyficzne tylko do ZIKV i rozpoznają trzy rodzaje epitopów w DIII: ABDE (ZV2), LR (ZV67, ZV54) i pętlę C-C' (ZV48, ZV64). ZV67 i ZV54 wykazują najsilniejszą neutralizację różnych szczepów ZIKV, ZV48 i 64 umiarkowaną, natomiast ZV2 na minimalnym poziomie. Sugeruje to ważność ekspozycji epitopu LR oraz pętli C-C' na antygenach szczepionkowych, aby uzyskać generację przeciwciał silnie neutralizujących. W stężeniach subneutralizujących przeciwciała te wykazują także efekt ADE infekcji ZIKV i DENV, jednakże wykazano to tylko w infekcji *in vitro*. Pomimo tego przeciwciała skierowane do epitopu LR były zdolne kompletnie ochronić przed letalną infekcją ZIKV myszy *Ifnar*<sup>-/-</sup>. Epitop LR jest także rozpoznawany przez ludzkie przeciwciała ZKA190 oraz Z004 (Robbiani i in., 2017; Stettler i in., 2016). Pomimo tego, że przeciwciała te wykazują neutralizację, to po podaniu ich do zwierząt wytwarzają się mutanty wirusa, które unikają odpowiedzi immunologicznej, czemu można zapobiec przez podanie bispecyficznego przeciwciała przeciwko LR oraz DII lub dwóch przeciwciał (Keefe i in., 2018; Wang i in., 2017). Sugeruje to także wyższość antygenów szczepionkowych z ekspozycją różnych determinant antygenowych np. cząstek wirusopodobnych, nad antygenami zawierającymi jeden epitop. Wyizolowano także panel przeciwciał z krwi osób zaszczepionych UV-inaktywowanym ZIKV (Dussupt i in., 2020). Wśród nich było 66% przeciwciał neutralizujących, gdzie część z nich była skierowana do łącznika między DI i DIII (299-306 aa białka E). Łącznik ten jest konserwowany wśród szczepów ZIKV i DENV, przez co przeciwciała do niego są w stanie neutralizować oba wirusy, chociaż również powodują efekt ADE. Mimo tego zapewniły ochronę przed letalną infekcją ZIKV.

Innymi rodzajami epitopów ważnymi w generacji przeciwciał neutralizujących są epitopy w czwartorzędowej strukturze białka E w wirionach tzw. epitopy dimeryczne

(ang. *E dimer epitope, EDE*) występujące w DI/DIII jednego z monomerów E w wirionie i DII w drugim monomerze. Pierwotnie odkryte u pacjentów zakażonych DENV, przeciwciała do EDE okazały się następnie krzyżowo neutralizować ZIKV (Barba-Spaeth i in., 2016; Dejnirattisai i in., 2015). EDE jest szczególnie wrażliwym miejscem, które jest wysoce konserwowane wśród FV, ponieważ zachodzi na miejsce wiązania fragmentu pr w niedojrzałej cząstce. Przeciwciała do EDE klasyfikuje się na dwa rodzaje: wiążące epitopy EDE1 (przeciwciała: C8, B10, C10) i epitopy EDE2 (przeciwciała A11, B7) w zależności od obecności miejsca glikozylacji. Przeciwciała EDE1 wiążą się w przypadku braku glikanów w pozycji N154/153, a EDE2 w ich obecności. Ponadto wykazano silniejszą neutralizację ZIKV przez przeciwciała skierowane do EDE1 (C8, B10). Stwierdzono, że przeciwciała B10 zapewniło ochronę myszy przed letalną infekcją oraz śmiercią płodów (Fernandez i in., 2017). Co więcej, wykazano jego protekcyjne działanie przed ZIKV w modelu ssaków naczelnych oraz nie stwierdzono wytworzenia się mutantów ucieczkowych wirusa (Abbink i in., 2018). Odkrycie tych silnych przeciwciał EDE zachęciło do prób stworzenia rekombinowanych immunogenów zdolnych do indukowania odpowiedzi komórek B wytwarzających przeciwciała do EDE. Dodanie wiązań dwusiarczkowych niezbędnych do stabilizacji dimerycznej rekombinowanej formy białka E ma również drugorzędą korzyść maskowania epitopu pętli fuzyjnej (Rouvinski i in., 2017). Mutację tą wprowadzono także do cząstek wirusopodobnych ZIKV, które użyto do immunizacji myszy (De Lorenzo i in., 2020). Zaobserwowano podobny poziom przeciwciał anty-E oraz neutralizacji czy ochrony przed letalną infekcją w myszach *Ifnar*<sup>-/-</sup>. Wykazano także redukcję efektu ADE w infekcji *in vitro* ZIKV, DENV, YFV, WNV w wyniku działania surowicy poszczepiennej. Ponadto, rekombinowana forma homodimeru E w fuzji z tagiem histydynowym może być również selekcyjowana w trakcie procesu oczyszczania i stabilizowana w niższej temperaturze (Metz i in., 2017).

#### *4.1.4. Przegląd testowanych technologii szczepionkowych oraz terapii antywirusowych*

Rozpiętość epidemii ZIKV w 2015-2016 r. i powikłania poinfekcyjne skłoniły globalną społeczność badawczą do zrozumienia patogenezy infekcji oraz szybkiego opracowania bezpiecznych i skutecznych antygenów szczepionkowych. Wysokie podobieństwo genetyczne i strukturalne ZIKV do innych FV, szczególnie DENV, sprawiło, że podczas rozwijania platform skupiono się nad uzyskaniem antygeny, który

powodowałyby generację dużego miana przeciwciał neutralizujących i który redukowałyby ryzyko ADE. Chociaż, ADE nie zostało potwierdzone w badaniach na populacji ludzkiej, to nadal wiele badań skupiło się na eliminacji tego efektu w testach *in vitro* oraz *in vivo*. Wykorzystano różne rodzaje antygenów szczepionkowych: inaktywowane/żywe atenuowane wirusy, oparte na DNA/RNA, oparte na wektorach wirusowych, podjednostkowe antygeny w tym rekombinowane białka, peptydy, VLPs. Niestety do tej pory nie zatwierdzono do użycia żadnej z nich, ale wiele z nich osiągnęło poziom badań klinicznych fazy I i II, ze stosunkowo pozytywnymi wynikami. Wszystkie z badanych technologii wykorzystują białko E lub jego fragmenty z obecnością lub brakiem białka prM. Dodatkowo, w niektórych platformach szczepionkowych wykorzystano także białko NS1. Celem większości z testowanych szczepionek jest głównie indukcja odpowiedzi humoralnej, a dalej odpowiedzi komórkowej. Inaktywowane szczepionki są zazwyczaj bezpieczne i mogą być podawane większości populacji docelowych, w tym kobietom w ciąży oraz kobietom w wieku rozrodczym. Jednak, aby wywołać silniejszą i trwalszą ochronę, może być konieczne wielokrotne podawanie i zastosowanie adiuwantów. Szczepionki oparte na kwasach nukleinowych wykorzystujące geny prM-E mogą generować VLPs i dlatego te, wraz ze szczepionkami podjednostkowymi opartymi na cząstkach, prezentują antygeny wirusowe układowi odpornościowemu gospodarza, podobnie do zakaźnego wirusa. Szczepionki podjednostkowe są ogólnie uważane za bezpieczne, w zależności od charakteru adiuwantów, do stosowania we wszystkich docelowych populacjach, w tym u kobiet w ciąży. Żywe-atenuowane wirusy i/lub oparte na wektorach wirusowych antygeny również wytwarzają cząstki zakaźne i/lub VLPs i mają podobne zalety jak niektóre szczepionki podjednostkowe. Jednak te szczepionki, wraz z żywymi-atenuowanymi szczepionkami ZIKV, mogą stwarzać problemy z potencjalnym powrotem do postaci zjadliwych, mogą wywoływać toksyczne reakcje zapalne lub mogą być mniej skuteczne ze względu na istniejącą wcześniej odporność na użyty wektor wirusowy.

### **Inaktywowany wirus**

Szczepionka z inaktywowanym wirusem jest wytwarzana poprzez zabicie żywego wirusa przez wysoką temperaturę, substancje chemiczne lub proces fizyczny. Najczęściej stosowana jest formalina. W ostatnim czasie ukazały się dwa raporty z I fazy badań klinicznych, gdzie stosowany był ZIKV inaktywowany formaliną (5 lub 10  $\mu\text{g}$ ) w połączeniu z wodorotlenkiem glinu (500 lub 200  $\mu\text{g}$ ) podawany domięśniowo w dwóch dawkach (Han i in., 2021; Stephenson i in., 2020). Oba preparaty były

bezpieczne i stymulowały produkcję przeciwciał neutralizujących, jednak czas utrzymania się tych przeciwciał w krwi był stosunkowo krótki. Ten sam preparat był także testowany w badaniach na zwierzętach w kontekście ochrony ZIKV w trakcie ciąży i rozwoju objawowej infekcji u płodów (Kim i in., 2022). Około 80% płodów oraz 50% samic myszy nie rozwinęło infekcji. Podobne wyniki uzyskano w modelu małych szerokonosych, gdzie szczepienie zapewniło ochronę płodów przed ZIKV, a czas trwania ochrony wynosił do 18 miesięcy. Inne strategie inaktywacji to UV i azydek jodonaftyłu. Wykazano, że 50 i 100  $\mu\text{M}$  azydku jodonaftyłu może całkowicie dezaktywować ZIKV (Austin i in., 2019). Inaktywowany chemicznie wirus po immunizacji myszy indukował przeciwciała neutralizujące, mimo zaobserwowanego zmniejszenia ekspozycji determinant antygenowych na powierzchni cząstek w porównaniu do żywego wirusa lub nawet inaktywowanego UV.

### **Żywy-atenuowany wirus**

Żywy-atenuowany wirus (ang. *live-attenuated virus*, LAV) Zika powstaje przez delecję fragmentu regionu 3' UTR. Niedawno, testowano LAV powstały przez delecję 10 nukleotydów w 3' UTR, który administrowany w jednej dawce, zapewnił wysoki poziom neutralizujących przeciwciał, odpowiedzi komórkowej oraz kompletną ochronę przed ZIKV w modelu myszy pozbawionych  $\text{IFN } \alpha/\beta/\gamma$  (Shan i in., 2017b). Inny rodzaj LAV powstał przez usunięcie 20 nt w tym samym regionie, który również zapewnił ochronę przed ZIKV w ssakach naczelnych i był bardziej immunogeny niż LAV z delecją 10 nt (Shan i in., 2017a). Poza tym zapobiegł transmisji wirusa na płód oraz uszkodzeniom jąder w badaniach na myszach. LAV był także uzyskany przez delecję 9 aminokwasów w białku C (Xie i in., 2018b). Immunizacja tym typem LAV zapewniła ochronę przed ZIKV oraz transmisją na płód w myszach AG129. Ponadto, spowodowała indukcję limfocytów T  $\text{CD4}^+$  i  $\text{CD8}^+$  skierowanych przeciwko peptydom pochodzącym z białka E. W 2018 roku rozpoczęła się I faza badań klinicznych LAV opartym na chimerycznym wirusie, gdzie białka osłonki są wkomponowane w szkielet LAV wirusa DENV serotypu 4, jednakże wyniki te nie zostały jeszcze opublikowane. Jedna dawka, gwałtowna odpowiedź immunologiczna i trwała ochrona to zalety LAV, ale produkcja i transport LAV wymaga urządzeń do hodowli komórek i przechowywania w łańcuchu chłodniczym, co często nie jest możliwe w wielu krajach. Ponadto istnieje również ryzyko postania mutacji adaptacyjnych w wirusie.



### **Szczepionki oparte na wektorach wirusowych**

Wektory lentiwirusowe, retrowirusowe i adenowirusy mogą zostać użyte jako nośniki genów. Skonstruowano dwie szczepionki przeciwko ZIKV oparte na wektorze adenowirusowym przez wprowadzenie kasety ekspresyjnej genu ZIKV prM-E do wektorów ludzkiego adenowirusa typu 4 (hAd4-prM-E) i 5 (hAd5-prM-E) (Bullard i in., 2018). Badania wykazały znikome poziomy przeciwciał anty-ZIKV po szczepieniu hAd4-prM-E u myszy, co sugeruje, że szczepienie hAd4-prM-E indukuje tylko odpowiedzi komórek T, podczas gdy hAd5-prM-E indukowało zarówno przeciwciała anty-ZIKV, jak i odpowiedź komórek T. Niestety oba typy zapewniły tylko częściową ochronę przed letalną infekcją w modelach mysich pozbawionych odpowiedzi interferonu. Inne szczepionki wektorowe hAd5 kodujące białka prM-E (Ad5-Sig-prM-Env) i E (Ad5-Env) wywołały silną humoralną i komórkową odpowiedź immunologiczną w myszach BALB/c i A129, ale myszy szczepione Ad5-Sig-prM-Env miały znacznie wyższe miana przeciwciał neutralizujących i niższą wiramię niż szczepione Ad5-Env (Guo i in., 2018a). Sugeruje to, że obecność prM w tym typie szczepionki jest wartością dodatnią. Co więcej, zaprojektowano cztery niezdolne do replikacji szympansie adenowirusy (ChAdOx1) kodujące białko E z dodatkiem lub delecją prM/domeny transmembranowej białka E (TM) (López-Camacho i in., 2018). ChAdOx1 prME z delecją TM zapewniał 100% ochronę z długotrwałą odpowiedzią immunologiczną anty-E i brakiem ADE po infekcji DENV. ChAdOx1 prME z delecją TM jest obecnie w fazie I badań klinicznych. Z drugiej strony usunięcie prM i dodanie TM zmniejszyło skuteczność ochronną i dawało słabsze odpowiedzi anty-E, sugerując, że powodem większej immunogenności była zwiększona sekrecja białka E w przypadku braku TM. Oba badania pokazują lekko sprzeczne wyniki, co podkreśla znaczenie racjonalnego projektowania antygenów szczepionkowych ZIKV. Szczepionka oparta na atenuowanym rekombinowanym wirusie pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej (rVSV) kodująca białka ZIKV prM-E-NS1 została przetestowana na modelach mysich BALB/c i A129. Ta szczepionka wektorowa indukowała przeciwciała specyficzne dla ZIKV i odpowiedź komórek T, które zapewniały częściową ochronę przed zakażeniem (Li i in., 2018).

Ponadto, zaprojektowano rekombinowaną szczepionkę opartą na VSV zawierającą białko C (VSV-Capsid) lub domenę III (VSV-DIII) (Shi i in., 2019). Obie szczepionki wywoływały silne odpowiedzi humoralne specyficzne do ZIKV w myszach BALB/c, ale immunizacja VSV-Capsid indukowała znacząco wyższe poziomy

limfocytów T CD8+ i CD4+ oraz większą redukcję wirerii w porównaniu z VSV-DIII. Szczepionki na ZIKV oparte na wektorach wirusowych mają wysoką skuteczność w wywoływaniu szybkiej odpowiedzi immunologicznej. Jednak duża część populacji ludzkiej może posiadać odporność na adenowirusy, szczególnie po pandemii wirusa SARS-CoV-2, gdyż część szczepionek była oparta na wektorze adenowirusowym.

Wykazano, że żywy-atenuowany wektor wirusa odry kodujący białka prM i E (MV-Zika-sE) chroni myszy przed infekcją ZIKV przez wzbudzenie przeciwciał neutralizujących oraz odpowiedzi limfocytów T (Nürnbergger i in., 2019). Immunizacja makaków również skutkowałą odpowiedzią neutralizujących przeciwciał specyficznych do wirusa Zika. Ta szczepionka i inna podobnie opracowana szczepionka oparta na MV (MV-ZIKV-RSP) są w badaniach klinicznych I fazy.

### **Szczepionki DNA/mRNA**

Zaprojektowano dwie szczepionki plazmidowe kodujące białka prM i E, gdzie w pierwszej sekwencji sygnałowa z białka prM wirusa JEV została wstawiona w miejsce sekwencji sygnałowej białka prM ZIKV (VRC5283), a w drugiej dodatkowo zamieniono region stem i anchor białka E na korespondujący region z wirusa JEV (VRC5288) (Larocca i in., 2016). Konstrukty te produkowały w hodowlach komórkowych *in vitro* VLPs, ale VRC5288 zapewnił wyższy poziom sekrecji. Szczepione tymi konstruktami DNA wywołało u makaków silną odpowiedź neutralizującą, która chroniła zwierzęta przed infekcją ZIKV. Dodatkowo, ostatnio wykazano, że szczepionka VRC5283 chroni myszy z obniżoną odpornością w czasie ciąży oraz przed wertykalną transmisją i śmiercią płodu (Jagger i in., 2019). Oba te konstrukty zostały użyte w badaniach klinicznych fazy I na ludziach, przy czym VRC5283 przeszedł do badań klinicznych fazy II. W badaniach na myszach i naczelnych porównano immunogenność inaktywowanego wirusa ze szczepionkami DNA oraz szczepionką wektorową opartą na adenowirusie kodującym białka M i E (Abbink i in., 2017). Pojedyncza immunizacja adenowirusem oraz podwójna immunizacja inaktywowanym wirusem, zapewniła protekcję przed wirusem do roku czasu po szczepieniu, w porównaniu z podwójną immunizacją szczepionką DNA, która nie była tak skuteczna w indukcji długotrwałej ochrony.

W przypadku szczepionek opartych na mRNA badano szczepionki zawierające geny białek prM i E. Zsyntetyzowano *in vitro* w obecności zmodyfikowanego nukleozydu-1-metylopseudourydyny cząstkę mRNA, którą otoczono nanocząsteczkami lipidowymi (ang. *lipid nanoparticles*, *LNP*). W myszach i makakach pojedyncze śródskórne wstrzyknięcie mRNA-LNP indukowało silną odpowiedź przeciwciał

neutralizujących i limfocytów T, która zapewniła całkowitą ochronę przed ZIKV (Pardi i in., 2017; Richner i in., 2017). Stwierdzono również, że schemat prime-boost w szczepieniach mRNA indukuje wyższy poziom przeciwciał neutralizujących. Te ostatnie szczepionki mRNA (mRNA-1325 i mRNA-1895) przechodzą obecnie badania kliniczne fazy I.

### **Szczepionki podjednostkowe**

Różnego typu szczepionki podjednostkowe zostały zaprojektowane i przetestowane w badaniach przedklinicznych na zwierzętach. Szczepionki podjednostkowe są uważane za bezpieczne, ale mogą mieć ograniczenia w kontekście immunogenności, gdyż mogą różnić się konformacją od żywego wirusa lub mogą być inaczej prezentowane przez komórki układu immunologicznego. Wśród tego typu szczepionek możemy wyróżnić pojedyncze białka rekombinowane jak i VLPs. Białka rekombinowane mogą być produkowane w różnych systemach ekspresji, co może wpływać na konformację i ich modyfikacje potranslacyjne.

Pojedyncze białka rekombinowane oparte są głównie na białku E, ektodomenie białka E lub jego domenie III, w celu uniknięcia efektu ADE. Wiele badań potwierdziło ich skuteczność w stymulowaniu produkcji przeciwciał neutralizujących oraz ochronie przed ZIKV (Medina i in., 2018; To i in., 2018). Porównano także immunogenność rekombinowanej DIII z ektodomeną białka E wyprodukowanych w komórkach *Drosophila* S2 (Qu i in., 2018). DIII w połączeniu z wodorotlenkiem glinu wzbudziło silniejszą odpowiedź przeciwciał neutralizujących oraz odpowiedź komórkową. Podobne wyniki uzyskano także dla DIII wyprodukowanej w komórkach *Pichia pastoris* (Zhang i in., 2019a). Immunogenność pojedynczych białek w kontekście indukcji odpowiedzi przeciwciał neutralizujących oraz limfocytów T silnie zależy także od adiuwantu (Wang i in., 2019b). W badaniu tym wykazano największy potencjał immunogeny dla połączenia DIII z wodorotlenkiem glinu i monofosforylolipidu a (ang. *monophosphoryl lipid A*, *MPLA*). Dodatkowo, zaprojektowano białka rekombinowane z mutacjami stabilizującymi dimery białka, które w kombinacji z różnymi adiuwantami indukowały wyższy poziom przeciwciał neutralizujących niż ich odpowiedniki dzikiego typu (Metz i in., 2019; Slon-Campos i in., 2019).

Cząstki wirusopodobne wirusa Zika, są z reguły złożone z białek prM i E i mogą być produkowane w różnych systemach ekspresji. VLPs ze względu na podobieństwo strukturalne do żywego wirusa są wysoce immunogenne. W kolejnych podrozdziałach VLPs wirusa Zika jak i innych FV zostały szczegółowo opisane.

## 4.2. Cząstki wirusopodobne

W artykule „**Production and Biomedical Application of Flavivirus-like Particles**” opublikowanym w czasopiśmie *Trends in Biotechnology* (doi: 10.1016/j.tibtech.2019.03.013) dokonaliśmy przeglądu artykułów naukowych odnośnie cząstek wirusopodobnych niektórych wirusów z rodzaju *Flavivirus*, przenoszonych przez komary. Literaturę tą zrecenzowaliśmy pod kątem: rodzaju i charakterystyki produkowanych VLPs, systemów produkcji oraz immunogenności. W kolejnych podrozdziałach zostały przedstawione różne aspekty dotyczące VLPs, omówione także w tym artykule.

### 4.2.1. *Strategie projektowania i produkcji VLPs*

Do produkcji rekombinowanych VLPs FV stosuje się dwa podejścia: ekspresję genów białek prM-E lub ko-ekspresję genów kodujących białka strukturalne C-prM-E jako pojedynczą kasetę wraz z genami kodującymi wirusową proteazę NS2B/ NS3. Białko C nie jest wymagane do tworzenia cząstek, chociaż włączenie białka kapsydu może mieć stabilizujący wpływ na składanie VLPs. Ekspresja białek prM i E (niezależnie czy pochodzą z jednego wektora czy z dwóch osobnych) z wektorów plazmidowych powinna skutkować powstaniem cząstek (Allison i in., 1999). Dodatkowo, VLPs mogą być produkowane w ekspresji przejściowej z użyciem wektorów plazmidowych/wirusowych lub ekspresji stabilnej. Oba podejścia zastosowano w przypadku ZIKV (Boigard i in., 2017; Garg i in., 2017). Dane literaturowe podają, że możliwa była produkcja VLPs w obu podejściach, choć ko-ekspresja białka C spowodowała zwiększenie ich sekrecji. VLPs można również wytworzyć przy użyciu strategii replikonu pakującego, gdzie geny białek niestrukturalnych wraz z białkiem C flawiwirusów są kodowane na jednym wektorze, a geny prM-E są kodowane na drugim wektorze (Fayzulin i in., 2006).

### 4.2.2. *Systemy ekspresji do produkcji VLPs*

Różne systemy ekspresji mogą być używane do produkcji białek rekombinowanych i VLPs. VLPs wirusa brodawczka ludzkiego (ang. *human papilloma virus*, HPV) oraz wirusa zapalenia wątroby typu B, które są składnikami szczepionek zatwierdzonych do użycia dla ludzi (Gardasil9<sup>®</sup>, Cervarix; Recombivax HB<sup>®</sup>, Engerix-B<sup>®</sup>), są produkowane w komórkach drożdżowych lub owadźch przy użyciu bakulowirusa jako wektora genów (ang. *baculovirus expression vector system*, BEVS).

System ekspresji w komórkach drożdżowych zapewnia szybką produkcję o dużej wydajności, dzięki produkcji dużej ilości biomasy. Natomiast, BEVS pozwala na produkcję białek/kompleksów o dużej masie dzięki możliwości wstawienia długich insertów do genomu bakulowirusa oraz na stosunkowo wydajną produkcję białek, które ulegają obróbce potranslacyjnej w sposób podobny do komórek ssaczych. System komórek ssaczych pozwala na produkcję białek rekombinowanych z zachowaniem ich naturalnych właściwości, jednakże cechuje się niską produktywnością, co przekłada się na duży koszt produkcji.

Różne systemy ekspresyjne wykorzystano do produkcji VLPs FV, w tym systemy ekspresyjne w komórkach drożdżowych, owadziach przy użyciu bakulowirusów, ssaczych lub roślinnych. Wybór systemu ekspresji ma duży wpływ na wydajność produkcji, składania i dojrzewania VLPs. Ekspresja peptydaz sygnałowych oraz furyny potrzebnych do składania VLPs FV jest kluczową kwestią przy wyborze systemu. Można to ominąć, stosując komórki ssaków z nadekspresją furyny do wytwarzania dojrzałych wirionów i replikonów (Mukherjee i in., 2016). Innym problemem napotykanym w produkcji VLPs jest stopień rozpoznawania sekwencji sygnałowych białka prM i E przez peptydazy sygnałowe. Zastosowano różne sekwencje sygnałowe do produkcji VLPs JEV w komórkach owadziach w systemie bakulowirusowym: sekwencja sygnałowa białka bakulowirusowego gp64, sekwencja sygnałowa *Drosophila* BiP (Yamaji i in., 2012). Jednakże, żadna z nich nie zwiększyła sekrecji VLPs w porównaniu z sekwencją sygnałową dzikiego typu, jedynie BiP zapewniła porównywalny poziom. W badaniu tym wykazano także 10-krotnie większą wydajność produkcji VLPs w komórkach owadziach niż w komórkach pochodzących z jajnika chomika chińskiego (ang. *chinese hamster ovary cells*, CHO). Do konstrukcji ZIKV i VLPs DENV używano także sekwencji sygnałowej białka prM JEV, która znacząco zwiększyła produkcję (Alvim, Itabiana i Castilho, 2019; Zhang i in., 2011). Chociaż system bakulowirusowy może zapewnić większe miano cząstek, to może także stanowić problem przy oczyszczaniu ze względu na dużą obecność cząstek bakulowirusowych. Do oczyszczania VLPs stosowano zazwyczaj trzy metody: wytrącanie glikolem polietylenowym (PEG), ultrawierowanie w gradience gęstości (UWG) i chromatografię wykluczenia (SEC). W nowszych podejściach VLPs są oczyszczane również metodami chromatograficznymi np. chromatografią jonowymienną (IEX), hydrofobową (HIC) lub multimodalną (MC). **Tabela 3** przedstawia wybrane platformy produkcji VLPs dla wirusów JEV, WNV,

DENV i ZIKA z wypunktowaniem systemu ekspresji, linii komórkowej oraz metody oczyszczania.

Tabela 3. Cechy produkcji VLPs wybranych wirusów z rodzaju *Flavivirus*

Wirus	Cechy produkcji							Referencje
	System ekspresji				Białka	Oczyszczanie	Średnica [nm]	
	Rodzaj komórek	Typ ekspresji	Wektor	Linia komórkowa				
JEV	ssacze	przejdściowa	wirus krowianki	HeLa	prM-E	PEG i UWG	20-30	(Konishi, Fujii i Mason, 2001; Konishi i in., 1992)
		stabilna	plasmid, rethrowirus	CHO, RK-13, BHK-21, COS-1, 293T	prM-E, chimeryczne prM-E z epitopami HCV	PEG, UWG, SEC	30-50	(Hua i in., 2014; Hunt, Cropp i Chang, 2001; Kojima i in., 2003; Okamoto i in., 2012; Saga i in., 2016)
	owadzie	stabilna	plazmid	Drosophila, High Five	prM-E	UWG, PEG i UWG	n.d.	(Yamaji i in., 2012; Zhang i in., 2007)
	owadzie	przejdściowa	bakulowirus	Sf9, High Five	prM-E, E	UWG, PEG i UWG	30-50	(Du i in., 2015; Yamaji i in., 2013)
WNV	ssacze	przejdściowa	HSV	HeLa	prM-E	UWG	28	(Taylor i in., 2016)
		stabilna	plazmid	CHO	prM-E	PEG i UWG	40-50, 20-30	(Ohtaki i in., 2010)
	owadzie	przejdściowa	bakulowirus	Sf9	prM-E, C-prM-E	UWG	40-60	(Qiao i in., 2004)
	bakterie	przejdściowa	plazmid	<i>Escherichia coli</i> strain RR1	Chimeryczne VLPs: DIII+ białko	UWG, SEC	30-40	(Cielens i in., 2014; Spohn i in., 2010)

					płaszczka AP205			
<b>DENV</b>	ssacze	przejściowa	plazmid	COS-1, HEK293T, Expi293™	prM-E (z sekwencją sygnałową I regionem stem/anchor z JEV, C-prM-E (+NS2B/NS3), prM-E z mutacjami	UWG	45-55	(Boigard, Cimica i Galarza, 2018; Mareze i in., 2016; Purdy i Chang, 2005)
	drożdżowe	przejściowa	plazmid	<i>Pichia pastoris</i>	E, ektodomena E, fuzja ektodomen E z różnych serotypów, chimeryczne VLPs: DIII w fuzji z białkiem C lub S HBV	UWG, chromatografia powinowactwa do Ni <sup>2+</sup> , HIC	30, 20-40	(Arora, Tyagi, Swaminathan i Khanna, 2013; Khetarpal i in., 2017; Liu i in., 2014; Mani i in., 2013; Poddar i in., 2016; Rajpoot i in., 2018; Ramasamy i in., 2018; Shukla i in., 2018; Tripathi i in., 2015)
	owadzie	przejściowa	bakulowirus	Sf9	DIII w fuzji z γRIgE i Pr55Gag	UWG	120-130	(Chua i in., 2013)
<b>ZIKV</b>	ssacze	przejściowa	plazmid	CAP-1,	prM-E,	UWG,	60	(Boigard i in., 2017; De Lorenzo i in., 2020; Salvo i in., 2018)



				293T	C-prM-E + NS2B/NS3, chimeryczne: E-NS1 + GAG	SEC, IEX, MC		
	stabilna	plazmid, lentiwirus		293T	prM-E, C-prM-E (+NS2B/NS3)	UWG, IEX, HIC, MC	30, 40-50	(Alvim, Itabaiana i Castilho, 2019; Garg i in., 2017)
owadzie	przejsciowa	bakulowirus		Sf9	prM-E, E	UWG	30-50	(Dai i in., 2018b; a)
roślinne	stabilna	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>		DIII w fuzji z C HBV	UWG	30	(Yang, Lai, Sun i Chen, 2017)

Systemy ekspresji różnią się pod względem modyfikacji potranslacyjnych. Kluczową modyfikacją dla VLPs FV jest N-glikozylacja białek. Obecność N-glikanów jest wymagana do wydajnej produkcji, sekrecji oraz wiązania przeciwciał neutralizujących (np. epitopy EDE). Jednak nie wiadomo jak dokładnie profil N-glikanów może wpływać na antygenowość oraz immunogenność VLPs. Komórki używane w różnych systemach ekspresji wykazują różnice w profilach N-glikozylacji ze względu na odmienną obecność oraz poziom glikozylotransferaz czy innych enzymów biorących udział w procesowaniu struktur cukrowych. Komórki drożdżowe wykazują hipermannozyzację N- i O-glikanów, która może wpływać na właściwości reaktogenne i immunogenne białek rekombinowanych (Khan i in., 2016; Luong, Lam, Chen i Levitz, 2007; Radoman i in., 2021). Z kolei, komórki owadzie wykazują syntezę krótkich łańcuchów N-glikanów, głównie zakończonych mannozą oraz bardzo niski poziom sializacji. Ponadto, wykazują również dodawanie fukozy  $\alpha$ -1,3 do rdzenia N-glikanu, co nie występuje w komórkach ssaczych i może być powodem wystąpienia reakcji alergicznych (Palmberger i in., 2014). Komórki owadzie Sf9 i High Five mogą syntetyzować złożone O-glikany, dodatkowo pozbawione kwasu sialowego (Gaunitz i in., 2013). Udowodniono również, różnice w glikozylacji między dwoma najczęściej wykorzystywanymi liniami komórek ssaczych – HEK293 oraz CHO, gdzie te pierwsze charakteryzują się bardziej złożonymi N-glikanami z mniejszą zawartością kwasu sialowego (Croset i in., 2012; Gugliotta i in., 2013). Różnice między systemami mogą wpływać na antygenowość czy immunogenność VLPs. Jednak do tej pory nie było badań na ten temat.

#### 4.2.1. *Oddziaływanie VLPs z ludzkim układem immunologicznym*

Nie ma danych literaturowych dotyczących oddziaływania VLPs FV z układem immunologicznym i ich detekcji przez komórki prezentujące antygeny (ang. *antigen presenting cells, APC*). Można założyć, że VLPs są rozpoznawane przez APC w sposób podobny do wirusa, dzięki wysokiemu podobieństwu strukturalnemu. FV wykorzystują komórki dendrytyczne, należące do APC w trakcie infekcji do pierwotnej replikacji. Dla VLPs innych rodzajów wirusów wykazano znaczenie rozmiaru cząstek oraz ładunku w wychwytywaniu przez różne DC. Mniejsze cząstki (10-200 nm) mogą bezpośrednio wędrować do węzła chłonnego, tam być wychwytywane przez DC, natomiast większe cząstki są raczej wychwytywane przez DC w miejscu immunizacji (Manolova i in., 2008). VLPs ze względu na multimeryczną strukturę należą do wzorców molekularnych

związanych z patogenami i mogą wiązać się do PRR. Wśród PRR oddziaływujących z wirusami wyróżniamy: receptory lektynowe typu C (CLR), receptory toll-podobne (TLR) oraz receptory Fcγ. CLR (np. DC-SIGN, DC-SIGNR, Langeryna) wiążą reszty cukrowe obecne na glikoproteinach w sposób zależny od jonów wapnia. Jak również GAG np. siarczan heparyny może być zaangażowany w oddziaływanie z PRR, np. VLPs HPV wymagają siarczanu heparyny do oddziaływania z Langeryną na komórkach Langerhansa, natomiast nie do oddziaływań z DC (Yan i in., 2004). Co ciekawe receptory Fcγ, które uczestniczą w powstawaniu efektu ADE, mogą również bezpośrednio oddziaływać z glikanami na VLPs jak zostało to pokazane np. dla VLPs HPV (Silva, Fausch, Verbeek i Kast, 2007). Po związaniu PRR, VLPs mogą ulec internalizacji przez dwa główne procesy: fagocytozę lub makropinocytozę. Różne komórki APC mogą wykorzystywać różne szlaki np. DC wychwytyją VLPs HPV głównie przez klatryno-zależną endocytozę lub makropinocytozę, natomiast komórki Langerhansa przez proces niezależny od aktyny (Fausch, Da Silva i Kast, 2003). Po internalizacji VLPs stymulują dojrzewanie komórek APC, przez wydzielanie prozapalnych cytokin, a VLPs mogą dalej być procesowane, aby peptydy z nich pochodzące mogły zostać zaprezentowane na MHC klasy I lub II. Prezentacja na MHC klasy I jest potrzebna do aktywacji odpowiedzi limfocytów T CD8+, natomiast kompleksy peptyd-MHCII do odpowiedzi limfocytów T CD4+ (Bachmann i in., 1996). Jednakże niektóre rodzaje DC, które internalizują VLPs, mogą nie ulegać dojrzewaniu, co utrudnia ich prezentację na MHCI/II. Przykładowo, plazmacytoidalne DC nie ulegają dojrzewaniu po stymulacji VLPs HPV (Lenz, Lowy i Schiller, 2005). Dlatego, ko-administracja adiuwantów może spowodować przyciąganie innych rodzajów DC w miejsce szczepienia lub indukcję innej ścieżki prezentacji, co dalej pozwala na wzmocnienie prezentacji VLPs i stymulacji odpowiedzi immunologicznej (Chua i in., 2012). Dodatkowo, VLPs mogą stymulować również odpowiedź limfocytów pomocniczych Th, które mogą wpływać na odpowiedź komórkową jak i humoralną. Limfocyty Th mogą indukować zmianę izotypu immunoglobulin G, np. limfocyty Th1 są powiązane z powstawaniem IgG2a, a Th2 z IgG1 w myszach (Snapper, Peschel i Paul, 1988). Poza tym, VLPs mogą również bezpośrednio oddziaływać z limfocytami B, które pełnią wówczas rolę komórek APC i mogą być transportowane do śledziony gdzie antygeny są prezentowane dla DC (Bessa i in., 2012).

#### 4.2.2. *Formulacja cząstek wirusopodobne jako antygenów szczepionkowych*

VLPs z powodu swojej struktury charakteryzują się gęstym upakowaniem powtarzających się epitopów, co sprawia, że są w stanie indukować silną odpowiedź immunologiczną na poziomie, co najmniej odpowiedzi indukowanej przez inaktywowanego wirusa (Liu i in., 2014). Pomimo tego większość formulacji szczepionkowych opartych na VLPs stosuje adiuwanty w celu wzmocnienia reakcji układu immunologicznego po immunizacji. Adiuwanty są to związki, które mogą wzmocnić poziom, rodzaj, jakość oraz czas trwania odpowiedzi immunologicznej do zadanego immunogenu. Co za tym idzie, w wyniku dodania adiuwantu do formulacji szczepionkowej, można użyć mniejszej dawki immunogenu lub zredukować liczbę szczepień. Adiuwanty można zaklasyfikować w zależności od mechanizmu działania do dwóch kategorii: służące jako system dostarczenia immunogenu i jego uwalniania w miejscu szczepienia oraz immunostymulanty. Do pierwszej kategorii zaliczamy: wodorotlenek glinu (alum), emulsje (olej-w-wodzie, woda-w-oleju), liposomy, polimery, kompleksy immunostymulujące. Do drugiej kategorii zalicza się ligandy TLR, cytokiny, saponiny, bakteryjne egzotoksyny. Niektóre z substancji zaliczanych do pierwszej kategorii również posiadają właściwości immunostymulujące. Adiuwanty zatwierdzone do użycia i stosowane w szczepionkach opartych na VLPs to wodorotlenek glinu, oparta na skwalenie nanoemulsja olej-w-wodzie (AS03™) oraz ligand TLR – monofosforylolipid A. Mechanizm działania alum prawdopodobnie oparty jest na: tworzeniu miejsc magazynowania immunogenu, co ułatwia ciągłe jego uwalnianie; formowanie struktur promujących fagocytozę antygeny przez APC; zwiększenie ekspresji prezentacji antygeny za pośrednictwem MHC klasy II. Jednakże, alum stymuluje głównie odpowiedź typu Th2, z minimalną indukcją limfocytów T (Brewer i in., 1999). Dlatego też, inne adiuwanty wzbudzające odpowiedź typu Th1 są testowane. W szczepionce przeciwko HBV (Fendrix®) i HPV (Cervarix®) zastosowano kombinację alumu z MPLA, który jest ligandem TLR4 i może stymulować Th1 (Fabrizi i in., 2015; Jenkins, 2008). Kombinacja ta pozwoliła na zwiększenie odpowiedzi immunologicznej do VLPs. Z kolei AS03™ może wzbudzać przejściowo zależną od NF-κB-wrodzoną odpowiedź immunologiczną, co indukuje wydzielaniem cytokin i chemokin, indukujących migrację komórek APC (Garçon, Vaughn i Didierlaurent, 2012). Ten adiuwant może wzbudzać zarówno odpowiedź przeciwciał jak i limfocytów T. Ponadto,

niedawno został on zatwierdzony do użycia z VLPs SARS-CoV-2 produkowanymi w komórkach roślinnych.

W przypadku VLPs FV najczęściej testowane są formułacje z dodatkiem adiuwantów. Jedno badanie z użyciem VLPs WNV wyprodukowanych w komórkach owadzych pokazało zwiększenie ich immunogenności - miana przeciwciała anti-E/-M, przeciwciał neutralizujących oraz protekcję przed wirusem poprzez zastosowanie adiuwantu AS01B – (liposomalna formułacja MPLA i frakcji saponin QS21) (Qiao i in., 2004). Inne formułacje VLPs zawierały inne adiuwanty. Większość badań pokazuje silne wzbudzenie odpowiedzi przeciwciał, natomiast mało jest danych na temat odpowiedzi komórkowej po immunizacji formułacją VLPs. VLPs DENV wyprodukowane w drożdżach w formułacji z adiuwantem Freund (emulsja oleju mineralnego, typu woda-w-oleju, z dodatkiem inaktywowanych prątków gruźlicy), stymulowały odpowiedź przeciwciał oraz indukcję odpowiedzi cytotoksycznej (wydzielanie IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ ) (Liu i in., 2014).

Występują również rozbieżności w stosowanej dawce VLPs oraz schematu immunizacji w badaniach na modelach mysich. Najczęściej wykorzystywany jest wielodawkowy schemat szczepień, gdzie wykorzystuje się od 1  $\mu$ g do 50  $\mu$ g VLPs/1 dawkę/mysz. Dla przykładu w formułacji VLPs DENV (CprmE lub prME) z alumem stosowano 50  $\mu$ g białka (na mysz), podawaną trzykrotnie dootrzewnowo (Utomo, Pambudi i Park, 2022). VLPs JEV jako immunogen przetestowano bez dodatku adiuwantu w świńskim modelu zwierzęcym i wykazano, że trzykrotna immunizacja większymi dawkami (10-20  $\mu$ g) skutkuje silniejszą odpowiedzią przeciwciał neutralizujących niż niskimi dawkami (2.5  $\mu$ g) (Yang i in., 2022). Natomiast, w przypadku ZIKV wykazano, że dawka 1  $\mu$ g VLPs w połączeniu z alumem w podaniu domięśniowym w myszach wzbudziła podobny poziom przeciwciał neutralizujących, co dawka 25  $\mu$ g bez adiuwantu, co zostało jeszcze wzmocnione przez dodatkową dawkę formułacji (Espinosa i in., 2018).

## 5. Cele

Infekcje ZIKV są powiązane z ciężkimi powikłaniami chorobowymi, szczególnie dotyczącymi płodów i noworodków. I choć transmisja wirusa nie jest tak aktywna jak w uprzednich latach, to z powodu dużego zasięgu występowania nadal stanowi on zagrożenie dla populacji ludzi. Ponadto, pomimo wielu wysiłków ze strony naukowców oraz firm biotechnologicznych żadna szczepionka nie została zatwierdzona do profilaktyki zakażeń wirusem Zika. W związku z tym, że szczepienia w przypadku wirusa Zika byłyby najlepszą formą zapobiegania zakażeniom, należy dokładnie zbadać dostępne typy szczepionek jak również rozwijać nowe technologie i antygeny. Jednym z najbezpieczniejszych typów antygenów szczepionkowych, a jednocześnie wysoce skutecznych w generowaniu odpowiedzi immunologicznej, są cząstki wirusopodobne. Zastosowanie VLPs jako antygenów szczepionkowych przeciwko wielu wirusom z rodzaju *Flavivirus*, w tym przeciwko ZIKV zostało już wcześniej udowodnione. VLPs ZIKV są naturalnie produkowane w trakcie infekcji wirusowej i składają się z wielu kopii glikoprotein prM/M i E zakotwiczonej w dwuwarstwie lipidowej. Mogą być także otrzymane przez ko-ekspresję genów obu tych białek w komórkach eukariotycznych. Jednakże, pewne kwestie mogące wpływać na wydajność ich produkcji oraz potencjał immunogeny nie zostały zdefiniowane. Dlatego, praca ta miała na celu:

- Ocenic wpływ genetycznych modyfikacji białka E na proces składania rekombinowanych VLPs,
- Ocenic wpływ systemu ekspresji genów na produkcję VLPs, ich antygenowość oraz immunogenność.

Co więcej, kolejnym celem tej pracy było zaprojektowanie nowego typu rekombinowanych VLPs, w celu zwiększenia ich produkcji w systemie komórek ssaczy. Ostatnim zamierzeniem tej pracy, była ocena ich użyteczności jako antygeny szczepionkowego poprzez zbadanie wpływu schematu dawkowania i adiuwantów na zdolność indukowania odpowiedzi immunologicznej przeciwko wirusowi Zika.

## **6. Materiały**

### **6.1. Szczepy bakteryjne**

#### ***Escherichia coli*, TOP 10**

F - mcrA,  $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC),  $\Phi$ 80lacZ(del)M15,  $\Delta$ lacX74, deoR, recA1, araD139,  $\Delta$ (ara-leu)7697, galU, galK, rpsL(SmR), endA1, nupG

#### ***Escherichia coli*, DH10Bac**

F - mcrA  $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC)  $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ lacX74 recA1 endA1 araD139  $\Delta$ (ara, leu)7697 galU galK  $\lambda$ - rpsL nupG/bMON14272/pMON7124

### **6.2. Geny syntetyczne**

Kaseta genów białek prM i E wirusa Zika szczepu BeH818995 poprzedzona sekwencją sygnałową (GenBank: KU365777.1, 406-2082 nt); wklonowana w plazmid pFastBac1

### **6.3. Plazmidy**

pJET 1.2/blunt

pFastBac1

pcDNA 3.1 V5/His

### **6.4. Linie komórkowe owadzie**

**Sf9** – linia ciągła komórek owadzych pochodząca z jajnika motyla *Spodoptera frugiperda*, (Kolekcja Zakładu Szczepionek Rekombinowanych MWB UG-GUMed); hodowana w pożywce HyClone™ SFX-Insect™ i 1x AA

**High Five (Hi5)** – linia ciągła komórek owadzych pochodząca z jajnika motyla *Trichoplusia ni* (Kolekcja Zakładu Szczepionek Rekombinowanych MWB UG-GUMed); hodowana w pożywce Express Five® SFM i 1xAA

**Sf9 Easy Titer** – linia ciągła komórek owadzych z jajnika motyla *Spodoptera frugiperda*, (Kolekcja Zakładu Szczepionek Rekombinowanych MWB UG-GUMed); stabilnie transformowana plazmidem zawierającym gen zielonej fluorescencji (eGFP), komórki emitują zielone światło fluorescencji po zakażeniu bakulowirusem; hodowana w pożywce HyClone™ SFX-Insect™ i genetycyny (0.1 mg/ml)

### **6.5. Linie komórkowe ssacze**

**293T** – linia ciągła uzyskana z tkanki nabłonkowej ludzkiej embrionalnej nerki, transformowana adenowirusem i ekspresyjną antygen T wirusa SV40 (Kolekcja Zakładu Szczepionek Rekombinowanych MWB UG i GUMed); hodowana w suplementowanej pożywce DMEM z 8% FBS

**CHO-K1** – epitelialna linia uzyskana z jajnika chomika chińskiego (Kolekcja Zakładu Szczepionek Rekombinowanych MWB UG i GUMed); hodowana w pożywce suplementowanej DMEM z 8% FBS oraz 1x NEAA

**Vero E6 (VERO C1008)** – linia ciągła uzyskana z tkanki nabłonkowej nerki afrykańskiego koczodana zielonego *Cercopithecus aethiops*, klon E6 linii Vero 76 (MRC-University of Glasgow Centre for Virus Research); linia permissywna dla wielu wirusów; linia wykazuje pewien stopień zahamowania połączeń międzykomórkowych; hodowana w suplementowanej pożywce DMEM z 8% FBS

**A549** – linia ciągła uzyskana z tkanki nabłonkowej ludzkiego niedrobnokomórkowego raka płuc (Kolekcja Zakładu Szczepionek Rekombinowanych MWB UG i GUMed); hodowana w suplementowanej pożywce EMEM z 8% FBS

### **6.6. Wirusy**

**Dziki bakulowirus** (Kolekcja Zakładu Szczepionek Rekombinowanych MWB UG-GUMed)

**Wirus Zika szczep MR766** (BEI Resources, NIAID, NIH) - MR766 jest referencyjnym szczepem wirusa Zika i został wyizolowany z krwi makaka królewskiego w lesie Zika niedaleko Entebbe w Ugandzie 20 kwietnia 1947 roku (Dick, Kitchen i Haddow, 1952). Pełna sekwencja genomowa ZIKV MR 766 dostępna w bazie GenBank (GenBank: AY632535, DQ859059)

**Wirus Zika szczep H/PAN/2016/BEI-259634** (BEI Resources, NIAID, NIH) - H/PAN/2016/BEI-259634 został wyizolowany z próbki surowicy pobranej od człowieka w Panamie 15 stycznia 2016 r. Pełna sekwencja genomowa ZIKV H/PAN/2016/BEI-259634 dostępna w bazie GenBank (GenBank: KX198135, ZIKV/Homo sapiens/PAN/BEI-259634\_V4/2016)



### 6.7. Pożywki hodowlane

**LB (Luria-Broth)** - płynne podłoże hodowlane do bakterii (skład na 100 ml: 1g bacto tryptonu, 0.5 g ekstraktu drożdżowego, 1 g NaCl pH=7 i sterylizowana przez autoklawowanie przez 30 min przy 0.7 atm)

**LA (Luria Agar)** - stałe podłoże hodowlane do bakterii (skład na 100 ml: 1.5 g bacto agaru, 1 g bacto tryptonu, 0.5 ekstraktu drożdżowego, 1 g NaCl pH=7 i sterylizowana przez autoklawowanie przez 30 min przy 0.7 atm)

**HyClone™ SFX-Insect™** – pożywka do hodowli komórek owadzich (Cytiva)

**Express Five® SFM** – pożywka do hodowli komórek owadzich High Five (Thermo Fisher Scientific)

**DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)** (Corning, USA) - pożywka do hodowli komórek ssaczych, suplementowana roztworem antybiotyków Penicillin-Streptomycin (10 000 U/mL) (P/S) (zgodnie z zaleceniami producenta) oraz inaktywowaną surowicą bydlęcą (8%)

**EMEM (Minimum Essential Medium – Eagle with Earle's BSS)** (Lonza, Szwajcaria) - pożywka do hodowli komórek ssaczych, suplementowana roztworem antybiotyków P/S (zgodnie z zaleceniami producenta). W zależności od doświadczenia dodatkowo inaktywowaną surowicą bydlęcą (8%)

**RPMI 1640** (Thermo Fisher Scientific, USA) – pożywka do izolacji i hodowli mysich splenocytów, suplementowana roztworem antybiotyków P/S (zgodnie z zaleceniami producenta) oraz inaktywowaną surowicą bydlęcą (8%), 20 mM HEPES oraz 50  $\mu$ M  $\beta$ -merkaptanoolem

### 6.8. Startery

*Tabela 4. Lista starterów wykorzystanych do amplifikacji genów wariantów VLPs*

Nazwa	Sekwencja 5'-3'	Temperatura topnienia [°C]	Długość [nt]
<b>prM-rev</b>	GAATTCTCAGCTGTATGCCGGGGCA	61	25
<b>E-for</b>	AAAGGATCCATGTGGATATTTAGG	52.3	24
<b>E-rev</b>	GCAGAATTCTCACACATCAGC	52.4	21
<b>prM-for</b>	AAAGGATCCATGGGCGCAGAT	54.4	24
<b>Eanchor-rev</b>	AGCGGAATTCTCATGATTTGAAAGC	54.4	25
<b>Estemanchor-rev</b>	AAAGAATTCTCAAATGGTGCTGCC	54	24
<b>ETM2-rev</b>	GAATTCTCATCCATTCTTTGTGTT	50.6	25

ssME1partf	GCAGCGGAGGTCACTGTGACGCTCCCCTC C	71.2	30
ssME2partf	CTGCTGACCACAGCTATGGCAGCGGAGGT CACT	69.4	33
ssME3partf	GTCGGAATTGTTGGCCTCCTGCTGACCAC AGCT	68.1	33
ssME4partf	GGATCCATGGGCGCAGATACTAGTGTCCG AATTGTTGGC	69.7	39

## **6.9. Przeciwciała**

### *6.9.1. Przeciwciała pierwszorzędowe*

**Mysie, monoklonalne przeciwciało przeciwko pętli fuzyjnej białka E wirusów z rodzaju *Flavivirus*, IgG2a (4G2)** (Absolute Antibody) - WB: 1:2000 rozcieńczenie; używane tylko do analiz w warunkach nieredukujących, ELISA: 2 µg/ml

**Królicze, monoklonalne przeciwciało przeciwko DIII białka E wirusa Zika (szczep SPH2015)** (Sino Biological Inc.) - WB: 1:5000 rozcieńczenie

**Królicze, poliklonalne przeciwciała przeciwko białku prM** (GeneTex International) - WB: 1:1000 rozcieńczenie; ELISA: 1:500 rozcieńczenie

**Mysie, monoklonalne przeciwciało przeciwko epitopowi LR w DIII białka E wirusa Zika (ZV67), IgG2a** (Absolute Antibody) - ELISA: 2 µg/ml

**Mysie, monoklonalne przeciwciało przeciwko epitopowi C-C' w DIII białka E wirusa Zika (ZV64), IgG2a** (Absolute Antibody) - ELISA: 2 µg/ml

**Mysie, monoklonalne przeciwciało przeciwko epitopowi C-C' w DIII białka E wirusa Zika (ZV48), IgG2a** (Absolute Antibody) - ELISA: 2 µg/ml

**Mysie, monoklonalne przeciwciało przeciwko epitopowi ABDE w DIII białka E wirusa Zika (ZV2), IgG2a** (Absolute Antibody) - ELISA: 2 µg/ml

**Mysie, monoklonalne przeciwciało przeciwko DI/DII białka E wirusa Zika (ZKA78), IgG2a** (Absolute Antibody) - ELISA: 2 µg/ml

**Ludzkie, monoklonalne przeciwciało przeciwko epitopowi EDE1 (C10), IgG1** (Absolute Antibody) - ELISA: 4 µg/ml

**Ludzkie, monoklonalne przeciwciało przeciwko epitopowi EDE1 (C8), IgG1** (Absolute Antibody) - ELISA: 4 µg/ml

**Ludzkie, monoklonalne przeciwciało przeciwko epitopowi EDE2 (B7), IgG1** (Absolute Antibody) - ELISA: 4 µg/ml

**Ludzkie, monoklonalne przeciwciało przeciwko epitopowi EDE2 (A11), IgG1** (Absolute Antibody) - ELISA: 4 µg/ml

**Królicze, poliklonalne przeciwciała przeciwko pętli „150” białka E (a.a.: 147-161), IgG (R34)** (MRC-University of Glasgow Centre for Virus Research) – ELISA: 1:1000 rozcieńczenie; WB: 1:3000 rozcieńczenie

#### 6.9.2. *Przeciwciała drugorzędowe*

**Koniugat kozich anty-mysich przeciwciał IgG z peroksydazą chrzanową** (Jackson, Immuno-Research, USA) - WB: 1:3000

**Koniugat alpakowych anty-króliczych przeciwciał IgG z peroksydazą chrzanową** (Jackson, Immuno-Research, USA) - WB: 1:3000

**Koniugat mysich anty-ludzkich przeciwciał IgG1 z peroksydazą chrzanową** (Thermo Fisher Scientific, USA) - WB: 1:3000; ELISA: 0.7 µg/ml

**Koniugat kozich anty-mysich przeciwciał IgG1 z peroksydazą chrzanową** (Thermo Fisher Scientific, USA) - ELISA: 0.7 µg/ml

**Koniugat kozich anty-mysich przeciwciał IgG2a z peroksydazą chrzanową** (Thermo Fisher Scientific, USA) - ELISA: 0.7 µg/ml

**Kozie anty-mysie IgG przeciwciała sprzężone z 6 nm cząsteczkami złota** (Aurion, Holandia)

#### 6.10. Antygeny białkowe

**Rekombinowana ektodomena białka E ZIKV (aa: 40-400), 6xHisTag na C'-końcu, produkowana w *E. coli*** (MyBioSource, USA)

**Rekombinowana DIII białka E ZIKV (szczep SPH2015) HisTag** (Sino Biological, Chiny)

#### 6.11. Lektyny

**Dżakalina (AIA)** (Vector, USA) – (ang. *Jacalin*) lektyna specyficzna do O-glikozydowo połączonych oligosacharydów, preferująca strukturę galaktozylo(β-1,3)N-acetylogalaktozaminy (antygen T); izolowana z *Artocarpus integrifolia*,

**DC-SIGN (CD209)** (Sino Biological, Chiny) – nieintegryna swoista dla komórek dendrytycznych (DC) chwytająca ICAM (ang. *DC-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing nonintegrin, DC-SIGN*); receptor lektynowy typu C obecny na powierzchni makrofagów i komórek dendrytycznych z powinowactwem do

wysokomannozowych glikanów; rekombinowane białko z Fc tagiem ludzkiej IgG1 na N-końcu

**DC-SIGNR (CD209L, L-SIGN)** (Sino Biological, Chiny) – homolog lektyny DC-SIGN obecny na powierzchni komórek epitelialnych; receptor lektynowy typu C z powinowactwem do wysokomannozowych glikanów; rekombinowane białko z Fc tagiem ludzkiej IgG1 na N-końcu

**UEA I** (Vector, USA) – aglutynina I z *Ulex europaeus* mająca powinowactwo do fukozy połączonej wiązaniem typu  $\alpha$

### **6.12. Wzorce masowe**

**GeneRuler DNA Ladder Mix** – Wzorzec masowy do elektroforezy agarozowej DNA – fragmenty DNA o wielkości par zasad: 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 (Thermo Fisher Scientific, USA)

**PageRuler Prestained Protein Ladder** – Wzorzec masowy do elektroforezy SDS-PAGE białek – barwny wzorzec białek o wielkości 170, 130, 100, 70, 55, 40, 35, 25, 15, 10 kDa (Thermo Fisher Scientific, USA)

**PageRuler Plus Prestained Protein Ladder** – Wzorzec masowy do elektroforezy SDS-PAGE białek – barwny wzorzec białek o wielkości 250, 130, 100, 70, 55, 35, 25, 15, 10 kDa (Thermo Fisher Scientific, USA)

### **6.13. Enzymy i bufony do reakcji enzymatycznych**

**BamHI, Fast Digest, bufor Fast Digest (10x)** (Thermo Fisher Scientific, USA)

**EcoRI, Fast Digest, bufor Fast Digest (10x)** (Thermo Fisher Scientific, USA)

**Ligaza DNA faga T4, bufor do ligacji (10x)** (Thermo Fisher Scientific, USA)

**KAPA HiFi HotStart DNA Polymerase Ready Mix** (Roche, Szwajcaria)

**PNGaza F, GlycoBuffer 2 (10x)** (New England BioLabs, USA)

**NP-40 10%** (New England BioLabs, USA)

**Glycoprotein denaturing buffer (10x)** (New England BioLabs, USA)

**Endo H<sub>r</sub>, GlycoBuffer 3 (10x)** (New England BioLabs, USA)

**O-glikozydaza, Neuraminidaza** (New England BioLabs, USA)

#### **6.14. Bufory i inne odczynniki**

- 0.1 M CaCl<sub>2</sub>** (jałowiony przez autoklawowanie)
- 0.1 M CaCl<sub>2</sub>/15% glicerol** (jałowiony przez autoklawowanie)
- 1 M HEPES** (Thermo Fisher Scientific, USA)
- 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** (POCh, Polska)
- 0.5 M roztwór wodny maślanu sodu**
- 0.5 M roztwór wodny EDTA pH 8** (186.1 g EDTA, 20.0 g NaOH/1 l roztworu]
- 1.5 M Tris HCl pH 8.8** (Sigma, USA)
- 10 mg/ml roztwór konkanawaliny a** (Thermo Fisher Scientific, USA)
- 50 mg/ml roztwór gentamycyny** (Thermo Fisher Scientific, USA)
- 50 mg/ml roztwór genetycyny (G418)** (Thermo Fisher Scientific, USA)
- 10 mg/ml roztwór tetracykliny w 100% etanolu**
- 200 mg/ml roztwór wodny ampicyliny** (Polfa, Polska)
- 50 mg/ml roztwór wodny kanamycyny**
- 200 mg/ml roztwór wodny izopropyl-β-D-1-tiogalaktopiranozydu (IPTG)**
- 20 mg/ml roztwór 5-bromo-4-chloro-3-indolylo-beta-D-galaktopiranozydu (X-gal)**  
**w 100% dimetyloformamidzie**
- 99.8% etanol bezwodny (EtOH)** (POCh, Polska)
- 1% fiolet krystaliczny** (Park Scientific, UK)
- 1% metyloceluloza w pożywce MEM** [6.25% FBS, 0.2% NaHCO<sub>4</sub>, 4.2 mM L-glutamina, 0.7x stężony roztwór antybiotyków AA]
- 100% metanol (MetOH)** (POCh, Polska)
- 4% paraformaldehyd w PBS** (Sigma, USA)
- 2% roztwór octanu uranylu** (POCh, Polska)
- 5% roztwór mleka odtłuszczonego w TBST**
- 50% roztwór sacharozy w TEN**
- 7.5% roztwór wodorowęglanu sodu** (Thermo Fisher Scientific, USA)
- 0.25% Trypsyna-EDTA** (Thermo Fisher Scientific, USA)
- AEC** (BD Sciences, USA)
- Agaroza** (Merck/Sigma, USA)
- Albumina bydlęca (BSA)** (Merck/Sigma, USA)
- AddaVax** (InvivoGen)
- Alhydrogel 2%** (InvivoGen)
- Clarity Max Western ECL Blotting Substrate** (BioRad)

**GlutaMAX™** (Thermo Fisher Scientific, USA)

**Bacto agar** (Difco, USA)

**Bacto trypton** (Difco, USA)

**Błękit bromofenolowy** (Merck/Sigma, USA)

**Bufor ACK** (Thermo Fisher Scientific, USA)

**Bufor do elektrotransferu mokrego (3 l)** (9.08 g Tris, 43.24 g glicyny, 20% metanol)

**Bufor elektrodowy do elektroforezy poliakryloamidowej białek w warunkach denaturujących 1x stężony pH 8.3** (na 1 l buforu: 3.02 g Tris, 14.42 g glicyna, 1.00 g SDS)

**Bufor inkubacyjny (PBS/BSA-c™)** (Aurion, Holandia)

**Bufor lizujący** (150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 50 M Tris-HCl pH 8)

**Bufor lizująco-obciążający do elektroforezy poliakryloamidowej białek w warunkach nieredukujących 4x stężony** (0.25 M Tris HCl pH 6.8, 8% SDS, 40% glicerol, 0.04% błękit bromofenolowy)

**Bufor lizująco-obciążający do elektroforezy poliakryloamidowej białek w warunkach redukujących 4x stężony** (0.25 M Tris HCl pH 6.8, 8% SDS, 40% glicerol, 20% β-merkaptioetanol, 0.04% błękit bromofenolowy)

**Bufor obciążający do elektroforezy agarozowej DNA 6x stężony** (Thermo Fisher Scientific, USA)

**Bufor PBS 1x stężony** (na 1 l buforu: 1.44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.00 g NaCl, 0.2 g KCl)

**Bufor PBS-T** (PBS 1x stężony + 0.05% Tween 20)

**Bufor PBS-T80** (PBS 1x stężony + 1% Tween 80)

**Bufor TAE 1x stężony** (40 mM Tris, 20 mM kwas octowy, 1 mM EDTA)

**Bufor TBS** (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl)

**Bufor TBST** (1x stężony TBS + 0.1% Tween 20)

**Bufor TEN** (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA pH 7.4)

**Bufor TNE** (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA pH 8)

**Bydłęca surowica płodowa (FBS) termicznie inaktywowana** (Merck/Sigma, USA)

**Chlorek sodu (NaCl)** (Merck/Sigma, USA)

**Cholesterol Lipid Concentrate (250X)** (Thermo Fisher Scientific, USA)

**Dodecylo siarczan sodu (SDS)** (Merck/Sigma, USA)

**Ekstrakt drożdżowy** (Difco, USA)

**Fosforan monopotasowy (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)** (Merck/Sigma, USA)

**Glicerol** (POCh, Polska)

**Glicyna** (Merck/Sigma, USA)

**Kwas wersenowy (EDTA)** (Serva, Niemcy)

**Maślan sodu (NaBut)** (Merck/Sigma, USA)

**MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100X)** (Thermo Fisher Scientific, USA)

**Metyloceluloza** (Sigma-Aldrich, USA)

**Mleko odtłuszczone** (SN Gostyń, Polska)

**Quick Start™ Bradford 1x Dye Reagent** (Biorad, USA)

**Paraformaldehyd** (POCh, Polska)

**PEG 6000** (Merck/Sigma, USA)

**Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL) (100X) (P/S)** (Thermo Fisher Scientific, USA)

**PepMix™ ZIKV (E) Ultra** (JPT, Niemcy)

**PepMix™ ZIKV (M)** (JPT, Niemcy)

**Polyamine Supplement (1000×)** (Merck/Sigma, USA)

**PrestoBlue Cell Viability Assay** (Thermo Fisher Scientific, USA)

**Roztwór antybiotyków do hodowli komórkowych Antibiotic-Antimycotic (100X) (AA)** (Thermo Fisher Scientific, USA)

**Roztwór blokujący Blocking Solution for Goat Gold Conjugates** (Aurion, Holandia)

**Roztwór blokujący ROTI®ImmunoBlock** (Carl Roth, Niemcy)

**Roztwór do precypitacji białek PEG 6000** (10% PEG 6000, 0.3 M NaCl)

**Roztwór inhibitorów proteaz** (Pierce™ Protease Inhibitor Tablets, EDTA-free) (Thermo Fisher Scientific, USA)

**Roztwór TMB** (TMB Chromogen Solution (for ELISA)) (Thermo Fisher Scientific, USA)

**Sacharoza** (Merck/Sigma, USA)

**Simply Safe™** znacznik fluorescencyjny kwasów nukleinowych 5 µl/100 ml 1% roztworu agarozy (EURx, Polska)

**Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate** (Thermo Fisher Scientific, USA)

**Syntetyczny monofosforylo-lipid a (MPLA)** (InvivoGen)

**TransIT®-Insect Transfection Reagent** (Mirus, USA)

**Transporter™ 5 Transfection Reagent** (Polysciences Europe GmbH)

**Tris** (Merck/Sigma, USA)

**Triton X-100** (Merck/Sigma, USA)

**Tween 20** (POCh, Polska)

**Tween 80** (VWR, USA)

**Wodorofosforan sodu (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)** (POCh, Polska)

**Wodorotlenek sodu (NaOH)** (POCh, Polska)

**β-merkaptoetanol** (Merck/Sigma, USA)

### **6.15. Zestawy komercyjne**

**BD Mouse IFN<sub>γ</sub> ELISPOT Kit** (BD Sciences, USA)

**CloneJET PCR Cloning Kit** (Thermo Fisher Scientific, USA)

**Gel-Out** (A&A Biotechnology, Polska)

**jetPRIME Transfection Reagent** (Polyplus Transfection, Francja)

**NovaRed Substrate Kit** (Vector, USA)

**Plasmid Midi** (A&A Biotechnology, Polska)

**Plasmid Mini** (A&A Biotechnology, Polska)

**PureLink™ HiPure Plasmid Maxiprep Kit** (Thermo Fisher Scientific, USA)

### **6.16. Aparatura i inne materiały laboratoryjne**

**Aparat do elektroforezy poliakryloamidowej białek** (Thermo Fisher Scientific, USA)

**Bibuła Whatman 3MM** (GE Healthcare, USA)

**DS-11 spektrofotometr** (DeNovix, USA)

**Filtr Ø 0.02 μm, Ø 0.45 μm i Ø 0.22 nm** (membrana z polifluorku winylidenu)  
(Millipore, USA)

**Hemocytometr typu Thoma** (Medlab, Polska)

**HiTrap® Capto™ Q, 5 ml** (Cytiva, USA)

**HiScreen CaptoCore 700** (Cytiva, USA)

**Infinite® 200 PRO NanoQuant spektrofotometr z czytnikiem płytek** (TECAN, Niemcy)

**Inkubator 28 °C/ 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>** (Heraeus, Niemcy)

**Komora laminarna** (Heraeus, Niemcy)

**Kuchenka mikrofalowa** (LG Electronics Inc., USA)

**Membrana PVDF** (Millipore, USA)

**Mikroskop elektronowy JEM 1400** (JEOL, Japan)

**Mikroskop elektronowy Tecnai G2 Spirit BioTWIN** (FEI Inc., USA)

**Mikroskop świetlny** (Olimpus, Japonia)



**Mikrowirówka Biofuge fresco** (Heraeus Instrument, Niemcy)  
**Mikrowirówka Biofuge pico** (Heraeus Instrument, Niemcy)  
**Naczynia hodowlane** (płytki wielodołkowe M-6, M-12, butelki T-25, T-75, T-175  
płytki o średnicy 150 mm (Costar-Corning, USA/ BD Biosciences, USA)  
**pH-metr Radiometr Analytical PHM 83 AUTOCAL** (Random, Dania)  
**Pipety i probówki plastikowe 15 ml i 50 ml** (BD Bioscience, USA)  
**Płytki M-96 ELISA silnie wiążące-białka** (Greiner, USA)  
**Probówki plastikowe 1.5 ml i 2 ml** (Sarstedt, Niemcy)  
**Rotor uchylny SW28 oraz SW41Ti** (Beckman-Coulter, USA)  
**Sita komórkowe 70 µm** (Genoplast, Polska)  
**Strzykawka 10 ml** (Becton Dickinson, USA)  
**System do wizualizacji i dokumentacji białek wybarwionych  
chemiluminescencyjnie UVITEC Cambridge Mini HD** (UVITEC Cambridge)  
**System do wizualizacji kwasów nukleinowych w żelach agarozowych UVIDOC  
HD6**  
(UVITEC Cambridge)  
**Termoblok** (SigmaAldrich, USA)  
**Termocykler ProFlex PCR System** (Thermo Fisher Scientific, USA)  
**Ultrawirówka Optima L-80** (Beckman-Coulter, USA)  
**Waga analityczna** (MEDICAT, Szwajcaria)  
**Waga analityczna** (Sartorius Mechatronics, Niemcy)  
**Wirówka Heraeus Megafuge 16R z rotorem F15-6 x 100y** (Thermo Scientific, USA)  
**Wirówka Hraeus Fresco 17 z rotorem o średnicy 17.2 cm** (Thermo Scientific, USA)  
**Wortex Heidolph Top-Mix 94323** (Bioblock Scientific, Francja)  
**Zamrażarka -80 °C** (Revco, USA)  
**Zasilacz do elektroforezy MP-300V** (Syngen Biotech, Polska)  
**Zestaw filtrujący Amicon® Ultra-15 Centrifugal Units 100K** (Merck, USA)  
**Zestaw filtrujący Vivaspin® 20, 300 000 MWCO PES** (Sartorius, Niemcy)  
**Zestaw MycoAlert** (Lonza, Szwajcaria)

### **6.17. Oprogramowanie**

**Alliance-1D** - program systemu do wizualizacji i dokumentacji białek wybarwionych  
chemiluminescencyjnie UVITEC Cambridge Mini HD  
**CorelDRAW Standard** pakiet programów graficznych (Corel, Kanada)

**Geneious Prime** - program do analiz sekwencji nukleotydowych i aminokwasowych

**i-control oprogramowanie urządzenia Infinite® 200PRO NanoQuant**

**National Center for Biotechnology Information (NCBI) baza sekwencji nukleotydowych**

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

**NetNGlyc - 1.0** program do przewidywania miejsc N-glikozylacji w ludzkich białkach

(<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetNGlyc-1.0>)

**NetOGlyc - 4.0** program do przewidywania miejsc glikozylacji O-GalNAc (typ mucyn) w komórkach ssaczy (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetOGlyc-4.0>)

**PDB** – baza struktur białkowych (<https://www.rcsb.org/>)

**PrediSi PREDIction of SIgnal peptides** – program do przewidywania sekwencji sygnałowych i miejsc cięcia (<http://www.predisi.de/>)

**SignalP - 6.0** program do przewidywania sekwencji sygnałowych i miejsc cięcia

(<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP>)

**UVITEC-1D** program systemu do wizualizacji i dokumentacji kwasów nukleinowych w żelach agarozowych UVIDOC HD

## 7. Metody

### 7.1. Metody pracy z DNA

#### 7.1.1. *Przygotowanie kompetentnych komórek Escherichia coli TOP10 i DH10Bac*

Zaszczepiono hodowle komórek *Escherichia coli*, szczep TOP10 lub DH10Bac, w 50 ml pożywki LB i inkubowano 16 h w 37 °C z wytrząsaniem. Do hodowli komórek szczepu DH10Bac dodano antybiotyki selekcyjne: tetracyklinę (10 µg/ml) i kanamycynę (50 µg/ml). Następnego dnia, 0.5 ml hodowli nocnej dodano do 50 ml świeżej pożywki LB i hodowano dalej aż do uzyskania  $OD_{575}=0.4-0.6$ . Hodowle schłodzono, a następnie komórki osadzono przez wirowanie przy prędkości 3500 x g przez 10 min oraz temperaturze 4 °C. Supernatant zlano, a osad komórek zawieszono w 10 ml zimnego jałowego roztworu 0.1 M CaCl<sub>2</sub> i inkubowano w lodzie przez 1 h. Komórki bakteryjne ponownie wirowano w tych samych warunkach przez 10 min. Usunięto supernatant, a osad zawieszono w 2 ml zimnego jałowego roztworu 0.1 M CaCl<sub>2</sub> /15% glicerol. Przygotowane komórki kompetentne przechowywano w temperaturze -70 °C w objętości 200 µl.

#### 7.1.2. *Transformacja komórek kompetentnych Escherichia coli TOP10 i DH10Bac DNA plazmidowym*

Do rozmrożonych komórek kompetentnych *E.coli* dodawano 100 ng plazmidowego DNA lub całość mieszaniny ligacyjnej (szczep TOP10) lub 400-500 ng DNA plazmidowego (szczep DH10Bac). Następnie, komórki z DNA plazmidowym inkubowano w lodzie przez 30 min. Kolejno wykonano szok termiczny, poprzez przeniesienie próbówki na 45 s do termobloku o temperaturze 42 °C, po czym schłodzono próbówki w lodzie przez 3 min. Kolejno dodano 0.5 ml pożywki LB i inkubowano przez 45 min (szczep TOP10) lub 0.9 ml pożywki LB i inkubowano przez 4 h (szczep DH10Bac) w 37 °C z wytrząsaniem. Po tym czasie wysiano 100 µl zawiesiny lub zagęszczone komórki na płytkę Petriego z podłożem LA zawierającym czynniki selekcyjne: ampicylinę (100 µg/ml) (szczep TOP10) lub kanamycynę (50 µg/ml), gentamycynę (7 µg/ml), tetracyklinę (10 µg/ml) oraz X-gal (100 µg/ml) i IPTG (40 µg/ml) (szczep DH10Bac). Płytki inkubowano w 37 °C przez 16 h (szczep TOP10) lub 48 h (szczep DH10Bac).

### *7.1.3. Izolacja plazmidowego lub bakmidowego DNA*

W celu izolacji plazmidowego lub bakmidowego DNA zaszczipiano hodowle nocne koloniami bakteryjnymi uzyskanymi w wyniku transformacji komórek *E. coli*. Do hodowli transformowanych komórek *E. coli* dodawano ampicylinę (100 µg/ml) (szczep TOP10) lub kanamycynę (50 µg/ml) i gentamycyny (7 µg/ml) (szczep DH10Bac). Izolacje DNA plazmidowego były prowadzone zgodnie z zaleceniami protokołów zestawów odczynników do izolacji DNA plazmidowego Plasmid Mini lub Plasmid Midi oraz PureLink™ HiPure Plasmid Maxiprep Kit (w przypadku izolacji DNA bakmidowego z transformowanych komórek DH10Bac), które działają w oparciu o zdolność wiązania się DNA dodatnio naładowanych ziół krzemionkowych w obecności soli chaotropowych. DNA eluowano poprzez naniesienie na osuszoną kolumnę jałowej wody (50 µl) o temperaturze ok. 37 °C.

### *7.1.4. Amplifikacja genów za pomocą reakcji PCR*

Reakcję łańcuchową polimerazy DNA (ang. *polymerase chain reaction, PCR*) przeprowadzano w celu powielenia odpowiednich sekwencji genów białek wirusowych. W reakcji stosowano polimerazę KAPA HiFi HotStart DNA Polymerase oraz odpowiednie pary starterów forward i reverse zaprojektowane w oparciu o sekwencję nukleotydową genów białek wirusowych. Temperatury przyłączania starterów wyznaczono z wykorzystaniem aplikacji dostępnej na stronie internetowej dostawcy – Genomed. Przeprowadzano dwustopniowe reakcje PCR w celu podniesienia wydajności reakcji. Pierwszy etap obejmował 3 cykle, gdzie hybrydyzacja starterów odbywała się w niższej temperaturze niż została wyznaczona. Drugi etap obejmował 20 cykli z temperaturą hybrydyzacji starterów zgodną z wyznaczoną. Reakcję PCR przeprowadzane w całkowitej objętości 50 µl prowadzono w termocyklerze ProFlex PCR System. Mieszanina reakcyjna zawierała:

- KAPA HiFi HotStart DNA Polymerase Ready Mix – 25 µl,
- starter forward – 0.3 µM,
- starter reverse – 0.3 µM,
- DNA matrycowy – 10 ng,
- jałowa woda – do 50 µl.

Reakcje zostały przeprowadzone w termocyklerze zgodnie z warunkami przedstawionymi w **Tabela 5**.

**Tabela 5. Ogólny schemat reakcji PCR do amplifikacji genów wariantów VLPs**

Etap reakcji	Temperatura [°C]	Czas [s]	Ilość cykli
<b>Wstępna denaturacja</b>	95	180	1
<b>Denaturacja</b>	98	20	3
<b>Hybrydyzacja starterów (1)<sup>a</sup></b>	45-55	15	
<b>Elongacja<sup>b</sup></b>	72	30-90	
<b>Denaturacja</b>	98	20	20
<b>Hybrydyzacja starterów (2)<sup>c</sup></b>	55-65	15	
<b>Elongacja</b>	72	30-90	
<b>Wydlużanie końcowe</b>	72	80	1

<sup>a</sup> - Hybrydyzacja starterów (1) – pierwszy etap, temperatura zależna od pary starterów

<sup>b</sup> - czas elongacji zależny od amplifikowanego genu

<sup>c</sup> - Hybrydyzacja starterów (2) – drugi etap, temperatura zależna od pary starterów

Do amplifikacji poszczególnych genów wykorzystano pary starterów:

**prM** – prM-for i prM-rev,

**E** – E-for i E-rev,

**ME** – ssME1/2/3/4-for i E-rev,

**ΔTM2** – prM-for i ETM2-rev,

**ΔA** – prM-for i Eanchor-rev,

**ΔSA** – prM-for i Estemanchor-rev.

### 7.1.1. Elektroforeza DNA w żelu agarozowym

Rozdział elektroforetyczny DNA prowadzono w 1% żelu agarozowym/1x bufor TAE. Do roztworu agarozy dodawano fluorescencyjny barwnik do wizualizacji kwasów nukleinowych Simply Safe™ (5 µl/100 ml żelu). Roztwór wylewano do foremki będącej częścią zestawu elektroforetycznego i umieszczono w niej grzebień. Po spolimeryzowaniu, żel wstawiano do aparatu do elektroforezy i zalewano buforem 1x TAE. Próbkę DNA przygotowano przez dodanie odpowiedniej ilości 6x stężonego buforu obciążającego, a następnie nanoszono je do studzienek w żelu. Elektroforezę przeprowadzono przy stałym napięciu 100 V. Po zakończonym rozdziale żel oglądano przy użyciu UV transiluminatora i dokumentowano z zastosowaniem systemu UVIDOC

HD6. Wielkość rozdzielanego DNA określano przy użyciu wzorca masowego GeneRuler DNA Ladder.

#### *7.1.2. Izolacja DNA z żelu agarozowego*

Izolację DNA z żelu agarozowego przeprowadzono z użyciem komercyjnego zestawu Gel-Out. Metoda działania zestawu opiera się na wiązaniu się DNA do ziół krzemionkowych. Z żelu za pomocą skalpela wycięto bloczek żelu zawierający fragment DNA o odpowiedniej wielkości, a następnie przeprowadzono izolację zgodnie z protokołem producenta zestawu. DNA eluowano poprzez naniesienie na osuszoną kolumnę ze złożem krzemionkowym jałowej wody o temperaturze ok. 37 °C w objętości 30 µl.

#### *7.1.3. Klonowanie amplifikowanych genów do wektora transferowego pJET 1.2/blunt*

DNA amplifikowany w reakcji PCR po izolacji z żelu agarozowego był klonowany do plazmidowego wektora transferowego pJET 1.2/blunt z wykorzystaniem zestawu CloneJET PCR Cloning Kit. Ligację wektora i wstawki przeprowadzano zgodnie z protokołem producenta. Następnie przeprowadzono transformację komórek *E.coli* szczep TOP10, po czym izolowano DNA plazmidowy za pomocą zestawu Plasmid Mini. Obecność wstawki w wyizolowanym plazmidzie sprawdzano za pomocą trawienia enzymami restrykcyjnymi.

#### *7.1.4. Trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi*

Analizę restrykcyjną prowadzono używając enzymów wybranych podczas projektowania genów – BamHI i EcoRI. Do analiz używano enzymów typu FastDigest. Trawienie przeprowadzano zgodnie z zaleceniami producenta enzymów. Do preparatywnego trawienia używano 2 µg DNA plazmidowego, a reakcję prowadzono w objętości 50 µl. Do analiz restrykcyjnych używano odpowiednio: 100-500 ng DNA plazmidowego, a reakcję prowadzono w objętości 20 µl. Trawienie prowadzono w temperaturze 37 °C przez 45 min. Wynik reakcji sprawdzano za pomocą elektroforezy DNA w 1% żelu agarozowym. W przypadku trawienia preparatywnego fragment DNA o odpowiedniej długości nukleotydów wycinano z żelu i zolowano DNA z żelu agarozowego.

### 7.1.5. Ligacja fragmentów DNA za pomocą ligazy DNA faga T4

Ligację przeprowadzono z wykorzystaniem ligazy DNA faga T4, w stosunku ilościowym wektora do insertu: 1 do 3. Mieszanina reakcyjna o końcowej objętości 20  $\mu$ l zawierała:

- 25 ng DNA insertu,
- 75 ng DNA wektora,
- 1  $\mu$ l ligazy T4,
- 2  $\mu$ l 10 x bufor do ligacji,
- jałowa woda (dopełnienie do objętości 20  $\mu$ l).

Próby inkubowano przez 30 min do 1 godziny w temperaturze pokojowej. Następnie przeprowadzano transformację komórek *E. coli* TOP10, po czym poprawność ligacji wstawki do wektora weryfikowano za pomocą trawienia enzymami restrykcyjnymi oraz sekwencjonowaniem.

## 7.2. Metody pracy z komórkami owadzimi

### 7.2.1. Hodowle komórek owadzich

Hodowle komórek Sf9 oraz Sf9 Easy Titer prowadzono w pożywce HyClone™ SFX-Insect™ z dodatkiem antybiotyków AA (5  $\mu$ l/ 1 ml hodowli) lub genetycyny (100  $\mu$ g/ml). Hodowle komórek High Five prowadzono w pożywce Express Five-SFM z dodatkiem 1x GlutaMAX™ oraz antybiotyków AA. Komórki te hodowano w hodowlach zawiesinowych w temperaturze 27 °C z wytrząsaniem (120 rpm). Co 3 dni hodowlę odmładzano przez rozcieńczenie do gęstości komórek ok. 0.5 x10<sup>6</sup>/ml.

### 7.2.2. Transfekcja komórek owadzich w celu uzyskania bakulowirusów

Na płytkę 6-dołkową wysiano komórki Sf9 w ilości 1 x10<sup>6</sup> komórek na dołek w 2 ml pożywki HyClone™ SFX-Insect™ z dodatkiem antybiotyków AA, a następnie inkubowano w 27 °C przez 1h w celu adsorpcji do podłoża. Transfekcję prowadzono przy użyciu odczynnika TransIT®-Insect Transfection Reagent zgodnie ze protokołem producenta. Przygotowano mieszaninę transfekcyjną przez zmieszanie 5  $\mu$ g DNA bakmidowego zawieszonego w 250  $\mu$ l pożywki z 5  $\mu$ l odczynnika transfekcyjnego. Mieszaninę inkubowano przez 15 min w temperaturze pokojowej. Po tym czasie mieszaninę dodano kroplami na komórki. Komórki inkubowano 3-5 dni w 27 °C aż do

wystąpienia efektu cytopatycznego, po czym pożywkę zawierającą bakulowirusa zbierano z nad komórek, zwirowano 10 min przy prędkości 3500 xg i dodawano FBS do końcowego stężenia 2%. Lizaty bakulowirusowe przechowywano w 4 °C.

### *7.2.3. Namnażanie bakulowirusów*

W celu uzyskania wysokiego miana oraz dużej ilości bakulowirusa kodującego geny białek prM i E wirusa Zika wykonano serię pasaży zwiększając skalę hodowli. Komórki linii Sf9 ( $2.5 \times 10^6$ ,  $7.5 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^7$ ) wysiewano kolejno do butelek hodowlanych T-25, T-75 oraz T-175 do uzyskania 70-80% konfluencji. Inkubowano 1 godzinę w temperaturze 27 °C. Po tym czasie dodawano 200 µl bakulowirusa uzyskanego w poprzednim pasażu. Następnie butelki inkubowano w 27 °C przez 5-7 dni, aż do momentu pojawienia się efektu cytopatycznego. Pożywkę z nad komórek zawierającą bakulowirusy zbierano, wirowano 10 min 3500 xg i dodawano FBS do końcowego stężenia 2%. Bakulowirusy przechowywano w 4 °C. Pożywka zebrana z butelki T-175 stanowiła pasaż 3 bakulowirusa, który następnie był miareczkowany i stanowił pasaż wyjściowy do dalszych analiz.

### *7.2.4. Miareczkowanie bakulowirusów*

Do miareczkowania używano linii komórek Sf9 Easy Titer. Jest to linia reporterowa stabilnie ekspresyjna wzmacniony gen białka zielonej fluorescencji (eGFP) pod kontrolą promotora polihedrynowego. Miareczkowanie wykonano metodą TCID<sub>50</sub> wg protokołu Hopkins i Esposito (Hopkins i Esposito, 2009). Po krótko, przygotowano rozcieńczenia seryjne (1:5) bakulowirusowego lizatu w pożywce HyClone™ SFX-Insect™ na płycie M-96. Na końcu dodano do każdego z dołków  $7.5 \times 10^4$  komórek Sf9 Easy Titer. Po 3-6 dniach inkubacji w 27 °C zliczano dołki, w których obserwowano zieloną fluorescencję komórek, i oznaczano je jako pozytywne. Następnie miano TCID<sub>50</sub>/ml obliczano za pomocą metody Reed and Muench (Reed i Muench, 1938) z wykorzystaniem specjalnego arkusza kalkulacyjnego opracowanego przez Shi-Hsia HWA. Kolejno miano w jednostce TCID<sub>50</sub>/ml przeliczano na jednostkę PFU/ml poprzez przemnożenie razy stałą 0.69 (O'reilly, Miller i Luckow, 1992).

### *7.2.5. Pomiar żywotności komórek owadzych*

Pomiar żywotności komórek owadzych zainfekowanych rBV prME ZIKV wykonano za pomocą odczynnika PrestoBlue Cell Viability Reagent wg zaleceń



producenta. Po krótkce: do 90  $\mu$ l pożywki zebranej z hodowli komórkowych dodano 10  $\mu$ l odczynnika. Po 1h mierzono absorbancję przy długości fali 550 nm. Pomiarów wykonano w trzech powtórzeniach. Następnie, obliczono stosunek żywotności komórek traktowanych analizowanymi związkami do komórek nietraktowanych.

#### *7.2.6. Produkcja rekombinowanych VLPs w komórkach owadzych*

W celu produkcji rekombinowanych białek w komórkach owadzych, odpowiednią ilość (80-90% konfluencji) komórek Sf9 lub komórek High Five wysiewano na płytki hodowlane (M-6 –  $1 \times 10^6$  lub M-12 –  $0.5 \times 10^6$ ). Komórki pozostawiono w 27 °C na około 1 h w celu przytwierdzenia się do podłoża. Następnie, komórki infekowano rekombinowanymi bakulowirusami o różnej wartości MOI zawieszonymi w odpowiedniej pożywce suplementowanej roztworem poliamin (stężenie 1x), cholesterolu (stężenie 1x) lub oboma jednocześnie w zależności od doświadczenia. Komórki inkubowano od 2-5 dni w 27 °C. Infekowane komórki wraz z pożywką z nadkomórek zbierano po infekcji w celu dalszej analizy.

### **7.3. Metody pracy z komórkami ssaczymi**

#### *7.3.1. Hodowla komórek ssaczyc*

Hodowle komórek ssaczyc: 293T, CHO-K1, Vero E6 oraz A549 prowadzono na płytkach lub w butelkach hodowlanych w odpowiedniej dla danej linii komórkowej pożywce hodowlanej z dodatkiem FBS o stężeniu 8%, roztworu antybiotyków P/S w temperaturze 37 °C i atmosferze 5% CO<sub>2</sub>. Linie komórkowe pasażowano co 3-4 dni. W celu pasażu, komórki przemywano buforem PBS i poddawano trypsynizacji. W celu neutralizacji trypsyny dodawano pożywki hodowlanej, następnie komórki liczone i odpowiednią porcją komórek (1/3- 1/6 komórki A549; 1/12 -1/16 komórki 293T, CHO-K1, Vero E6) umieszczano w nowym naczyniu hodowlanym z pożywką. Obecność mykoplazm w hodowlach była regularnie monitorowana za pomocą kitu MycoAlert.

#### *7.3.2. Transfekcja komórek ssaczyc DNA plazmidowym w celu produkcji rekombinowanych białek/VLPs*

Komórki ssacze linii CHO-K1 i 293T były transfekowane plazmidowym DNA za pomocą komercyjnego zestawu do transfekcji jetPRIME Transfection Reagent. Na dobę przed transfekcją komórki wysiewano w odpowiedniej liczbie do naczynia hodowlanego w odpowiedniej ilości pożywki DMEM z 8% FBS i antybiotykami P/S (**Tabela 6**).

W transfekcji używano stosunek ilości DNA plazmidowego (w) do objętości odczynnika transfekcyjnego (o), w[ $\mu\text{g}$ ]:o[ $\mu\text{l}$ ] - 1:2. Do transfekcji używano ilości DNA i odczynnika transfekcyjnego zgodnie z zalecanymi ilościami przez producenta zestawu.

**Tabela 6. Liczba komórek ssaczych linii Vero i 293T wysiewanych do transfekcji w różnych naczyniach hodowlanych**

Linia komórkowa	Rodzaj naczynia hodowlanego	Liczba komórek	Objętość hodowli [ml]	Ilość DNA plazmidowego [ $\mu\text{g}$ ]	Objętość odczynnika transfekcyjnego [ $\mu\text{l}$ ]
<b>CHO-K1</b>	płytką M-12	$0.8 \times 10^5$	1	1	2
<b>293T</b>	płytką M-12	$1.4 \times 10^5$	1	1	2
	płytką M-6	$3 \times 10^5$	2	2	4
	płytką $\varnothing$ 15 cm	$3.5 \times 10^6$	25	25	50

Przygotowano mieszaninę transfekcyjną przez rozcieńczenie DNA plazmidowego w buforze jetPRIME, a następnie dodanie odczynnika transfekcyjnego jetPRIME. Mieszaninę inkubowano przez 10 min w temperaturze pokojowej, po czym nanoszono kroplami na komórki. 16 h po transfekcji zmieniano pożywkę hodowlaną na świeżą pożywkę DMEM suplementowaną 8% FBS, 1% P/S, 1% NEAA, 0.5% wodorowęglanem sodu, a w niektórych doświadczeniach 2 mM maślanem sodu. Hodowle po transfekcji prowadzono przez kolejne 48-96 h w 37 lub 28 °C z 5% CO<sub>2</sub>.

### 7.3.3. Namnażanie wirusa Zika

Komórki Vero E6 były wybrane jako komórki optymalne do namnożenia wirusa Zika (szczep MR766 lub H/PAN/2016/BEI-259634). Komórki wysiewano na butelkę hodowlaną T-75 i hodowano do momentu uzyskania 90% konfluencji. Pożywkę zbierano i przemywano buforem PBS, a następnie dodawano świeżą pożywkę DMEM bez FBS z inokulum wirusowym. Komórki inkubowano przez 3 godziny w 37 °C wraz z 5% CO<sub>2</sub> w celu wejścia wirusa do komórek, po czym zmieniano pożywkę na pożywkę DMEM z 8% FBS. Hodowlę prowadzono do uzyskania około 70-80% efektu cytopatycznego – lizy komórek, po czym zbierano pożywkę z nad komórek, odwirowywano przez 5 min przy 2500 xg, porcjowano i przechowywano w temperaturze -80 °C.

### 7.3.4. Miareczkowanie wirusa Zika metodą łysinkową

W celu oznaczenia miana wirusa wykonano seryjne rozcieńczenia zawiesiny wirusa (od  $10^{-1}$  do  $10^{-8}$ ) w pożywce bez FBS i nanoszono na konfluentne, przemyte buforem PBS komórki A549 wysiane na płytках M-12. Po 3 h inkubacji komórki płukano buforem PBS i pokrywano 1% roztworem metylocelulozy w MEM. Po 3-4 dniach infekcji metylocelulozę usuwano, a komórki przemywano PBS. W celu wizualizacji łysinek wirusowych nanoszono roztwór 1% fioletu krystalicznego w 20% etanolu (w/v), prowadząc inkubację przez 30 min w temperaturze pokojowej. Komórki płukano, a po wysuszeniu liczone łysinki. Miano wirusa [PFU/ml] (ang. *plaque-forming unit, PFU*) wyznaczono według wzoru:

$$PFU/ml = \frac{\text{liczba łysinek}}{\text{rozcieńczenie} \times \text{objętość rozcieńczenia}}$$

## 7.4. Metody pracy z białkami i VLPs

### 7.4.1. Przygotowanie lizatów komórkowych

Komórki owadzie lub ssacze zbierano po infekcji lub transfekcji i wirowano przy 3500 xg przez 10 min. Supernatant był zbierany do osobnych probówek, a osad komórkowy był przepłukiwany dwukrotnie w buforem PBS. Następnie do osadu dodawano buforu lizującego (1/10 objętości hodowli komórkowej) i 10% roztworu inhibitorów proteaz. Lizę komórek prowadzono na bujawce obrotowej w 4 °C przez 1 h, następnie próbki wirowano (15 min, 6200 xg, 4 °C), a supernatant stanowiący lizat komórkowy przenoszono do nowej probówki. Lizaty przechowywano w -20 °C.

### 7.4.2. Precypitacja białek/VLPs z pożywki hodowlanej przy użyciu glikolu polietylenowego

Do pożywki hodowlanej dodano ¼ objętości roztworu glikolu polietylenowego 6000 do precypitacji białek (50% PEG 6000 z 1.5 M NaCl), zostawiono na noc na bujawce obrotowej w 4 °C. Drugiego dnia próby zwirowano (30 min, 10000 xg, 4 °C), a następnie zlano supernatant. Osad zawieszono w buforze TNE (1/10 początkowej objętości pożywki hodowlanej) i pozostawiono na noc w 4 °C na bujawce obrotowej w celu powolnego zawieszenia białek/VLPs. Następnego dnia próby zwirowano (10 min,

3500 xg, 4 °C), a supernatant przeniesiono do nowych probówek i przechowywano w 4 °C.

#### *7.4.3. Elektroforeza białek w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących*

Elektroforeza SDS-PAGE białek w warunkach denaturujących prowadzona była przy użyciu żeli gradientowych 4-20% - Novex™ WedgeWell™ 4 to 20%, Tris-Glycine, 1.0 mm, Mini Protein Gel. Wyciągnięto grzebień z żelu, przemyto wodą destylowaną i umieszczono w aparacie do elektroforezy poliakryloamidowej. Próby były przygotowywane przez dodanie 4x stężonego buforu redukująco-obciążającego lub nieredukująco-obciążającego i inkubację przez 10 min w 37 °C. Jako wzorca mas białkowych używano PageRuler lub PagerRuler Plus Prestained Protein Ladder. Elektroforezę prowadzono w buforze 1x SDS-PAGE przy napięciu 150 V.

#### *7.4.4. Barwienie żelu poliakryloamidowego Coomassie Brilliant Blue (CBB)*

Po zakończonym rozdziale elektroforetycznym żele przemywano w wodzie ultraczystej (18 M Ohm·cm), a następnie barwiono przez 16 h roztworem Imperial™ Protein Stain, który jest roztworem barwnika Coomassie Brilliant Blue R-250. Po tym czasie żel odbarwiano w wodzie ultraczystej.

#### *7.4.5. Elektrotransfer mokry białek na błonę PVDF*

Po zakończonym rozdziale elektroforetycznym, białka z żelu były przenoszone na błonę PVDF (ang. *polyvinylidene fluoride, PVDF*) przy wykorzystaniu elektrotransferu mokrego. Poszczególne elementy (błonę PVDF aktywowaną w metanolu, równoważoną w buforze do transferu białek i bibuły Whatman nasączone roztworem buforu do transferu białek) układano w następującej kolejności od elektrody dodatniej: 3 fragmenty bibuły, błona PVDF, żel poliakryloamidowy, 3 fragmenty bibuły. Całość umieszczono w aparacie do elektrotransferu mokrego z buforem do transferu. Transfer prowadzony był przez noc przy stałym napięciu 20 V.

#### *7.4.6. Western blotting*

Po zakończonym elektrotransferze, błonę PVDF blokowano w 5% roztworze mleka odtłuszczonego w buforze TBS-T w temperaturze pokojowej przez 1 h. Po tym

czasie błonę inkubowano w roztworze odpowiednich przeciwciał pierwszorzędowych w 3% roztworze mleka w TBS-T na rotatorze horyzontalnym. Następnie błonę płukano 5 razy po 5 min z wytrząsaniem w buforze TBS-T, aby pozbyć się niezwiązanych przeciwciał. Kolejno błonę inkubowano z roztworem gatunkowo specyficznych przeciwciał drugorzędowych skoniugowanych z peroksydazą chrzanową (ang. *horseradish peroxidase, HRP*) w 3% roztworze mleka w TBS-T i płukano 5 razy po 5 min z wytrząsaniem buforem TBS-T. Detekcję związanych przeciwciał wykonano z użyciem zestawu Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate oraz aparatu do wizualizacji obrazów chemiluminescencyjnych UVITEC Cambridge MINI HD.

#### *7.4.7. Ultrawierowanie białek/VLPs w gradiencie sacharozy*

Pożywkę z nad komórek owadzych lub ssaczy zbierano i odwirowywano przez 10 min przy 3500 xg. Otrzymany supernatant filtrowano na filtrze PVDF 0.45 µm, a następnie poddano pelletowaniu białek przez ultrawierowanie przy 112 499 xg w 5 °C. Pellet białek/VLPs zawieszano w 2 ml buforu TEN z inhibitorami proteaz, a następnie rozdzielono na dwie próby po 1 ml. Jedną z nich inkubowano przez 30 min z 1% roztworem detergentu niejonowego Tritonu X-100 w 4 °C na bujawce obrotowej. W probówkach do ultrawierowania ułożono gradient roztworów sacharozy w buforze TEN o następujących stężeniach: 10-50% lub 12-42%. Na przygotowany gradient naniesiono próbki (inkubowane oraz nieinkubowane z roztworem detergentu) i poddano ultrawierowaniu przez noc w 106 979 xg w 5 °C. Zebrane frakcje poddano elektroforezie SDS-PAGE i analizie western blotting. Ponadto, frakcje o różnej gęstości z największą ilością białka E łączono i poddano ultrafiltracji za pomocą filtrów wirówkowych Amicon® Ultra odcinających białka o masie 100 kDa. Retentat zawierający VLPs był przechowywany do dalszych analiz w 4 °C.

#### *7.4.8. Chromatografia wykluczenia*

VLPs wyprodukowane w komórkach 293T oraz Sf9 zostały poddane oczyszczaniu za pomocą chromatografii wykluczenia (ang. *size exclusion chromatography, SEC*) w celu badań immunogenności. VLPs wyprecypitowane za pomocą PEG6000 były zawieszane w 1 ml buforu TEN. Następnie, VLPs nałożono na 15 cm kolumnę ze złoża sefarozowego CL-4B. Po 5 min adsorpcji prowadzono elucję buforem PBS z 0.32% (w/v) cytrynianu trisodowego o pH 7.4 (filtrowanego przez filtr o średnicy porów 0.02 µm). Zebrano 14 frakcji po 0.5 ml, w których zawartość białka E

oceniano metodą western blotting. Frakcje z największą zawartością łączono i poddano ultrafiltracji na filtrze wirówkowym Amicon® Ultra odcinającym białka o masie 100 kDa. Następnie zmierzono stężenie białek oraz VLPs poddano miareczkowaniu. Preparaty przechowywano w 4 °C.

#### *7.4.9. Pomiar stężenia białek*

Stężenie białek w analizowanych preparatach VLPs było oznaczane spektrofotometrycznie metodą Bradford przy użyciu komercyjnego odczynnika Quick Start™ Bradford 1x Dye Reagent wg zaleceń producenta. Metoda ta wykorzystuje zjawisko tworzenia się kompleksu pomiędzy barwnikiem (Brilliant Blue G), a białkami. Utworzenie kompleksu powoduje przesunięcie długości fali odpowiadającej maksimum absorpcji barwnika z 465 do 595 nm. Do 1 ml odczynnika dodano 20 µl próbki i inkubowano próbę przez 15 min w temperaturze pokojowej. Następnie, mierzono absorbancję przy długości fali 595 nm, a stężenie oznaczano na podstawie standardowej krzywej białkowej (roztwory BSA).

#### *7.4.10. DLS*

Aby zbadać wielkość i rozkład cząstek F2A VLPs, cząstki analizowano metodą dynamicznego rozpraszania światła (ang. *Dynamic Light Scattering, DLS*) za pomocą urządzenia Malvern Zetasizer Nano Z. Próbkę VLPs rozcieńczano w wodzie ultraczystej do stężenia białka ok. 10-50 µg/ml. Pomiar średnicy hydrodynamicznej wykonano w co najmniej dwóch powtórzeniach wg wskazówek producenta.

#### *7.4.11. Transmisyjna mikroskopia elektronowa*

Preparaty na mikroskop elektronowy przygotowywano w następujący sposób: na siatkę niklową pokrytą filmem węglowym nanoszono 20 µl próbki (stężenie białka 10-50 µg/ml) i inkubowano 10 min w temperaturze pokojowej. Następnie z płytki odsączono nadmiar cieczy przy użyciu bibuły Whatman. Barwienie wykonano z użyciem 2% roztworu octanu uranylu przez 1 min. Preparaty oglądano za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego Tecnai G2 Spirit BioTWIN przy 120 kV w Laboratorium Mikroskopii Elektronowej Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego lub JEM 1400 przy 80 kV w Laboratorium Mikroskopii Elektronowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego Polskiej Akademii Nauk w Warszawie.

#### *7.4.12. Znakowanie techniką immunogold*

Znakowanie techniką immunogold przeprowadzono zgodnie z protokołem firmy Aurion. Po krótkce, siatki z adsorbowanymi cząstkami blokowano roztworem blokującym Blocking Solution for Goat Gold Conjugates. Po przemyciu siatki inkubowano z roztworem mysiego przeciwciała przeciwko białku E DIII (LR) - ZV67 w buforze inkubacyjnym (PBS/BSA-c<sup>TM</sup>) (20 µg/ml) przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Znakowanie przeprowadzono kozim anti-mysim przeciwciałem IgG sprzężonym z 6 nm cząsteczkami złota (Aurion) (rozcieńczenie 1/40 w PBS/BSA-c<sup>TM</sup>) przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej, następnie siatki ponownie przemyto i utrwalono roztworem 4% paraformaldehydu. Na koniec siatki barwiono 2% octanem uranylu.

#### *7.4.13. Test ELISA*

W celu oceny antygenowości VLPs wykonano test ELISA (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA*). Na 96-dołkową płytkę do ELISA naniesiono, w 3 powtórzeniach, odpowiednią ilość VLPs (stężenie białka 1-10 µg/ml, w zależności od typu analizy). Płytkę inkubowano przez noc w 4 °C na bujawce horyzontalnej. Kolejnego dnia płytkę płukano 3 razy buforem PBS-T (200 µl/dołek), a następnie blokowano roztworem 3% BSA w PBS-T przez 2 h (200 µl/dołek). Płytkę ponownie płukano i inkubowano z odpowiednim roztworem przeciwciał pierwszorzędowych w 0.3% BSA w PBS-T przez 2 h w temperaturze pokojowej (2 µg/ml). Następnego dnia płytkę płukano 5 razy buforem PBS-T (200 µl/dołek) i inkubowano z odpowiednimi przeciwciałami drugorzędowymi sprzężonymi z HRP (0.5 µg/ml) w 0.3 % BSA w PBS-T przez 1 h. Płytkę przepłukano. Test ELISA wywołano przez dodanie roztworu wywoływacza TMB po 50 µl/dołek. Po max. 15 min zastopowano reakcję przy użyciu 50 µl 0.5 M kwasu siarkowego. Pomiar absorbancji przy długości fali 450 nm wykonano za pomocą czytnika płytek Infinite® 200PRO NanoQuant. Analizę wykonano trzykrotnie, przedstawiając na wykresach średnie wartości z pokazaną wartością progową testu, opatrzone odchyleniami standardowymi oraz analizą statystyczną.

#### *7.4.14. Analiza profilu N- i O-glikozylacji*

W celu określenia czy rekombinowane białka ulegają glikozylacji, traktowano próbki VLPs 3 różnymi enzymami: peptydo-N-glikozydazą (PNGaza F), rekombinowaną endoglikozydazą Hf (Endo H<sub>f</sub>) i O-glikozydazą odcinającymi reszty cukrowe N- i O-glikanów. VLPs (2 µg białka) traktowano enzymami zgodnie z zaleceniami producenta.

Reakcje enzymatyczne przeprowadzono w warunkach denaturujących lub natywnych. W warunkach denaturujących: do VLPs dodano 2  $\mu$ l 10x Glycoprotein Denaturing Buffer, uzupełniono wodą destylowaną do 20  $\mu$ l i inkubowano przez 10 min w 37 °C. Składniki poszczególnych reakcji dla każdego z enzymów przedstawia **Tabela 7**.

**Tabela 7. Skład mieszanin reakcyjnych w traktowaniu glikozydazami**

Reakcja Składnik	PNGaza F	Endo H <sub>f</sub>	O-glikozydaza
Zdenaturowane VLPs	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l
10% NP40	4 $\mu$ l	-	4 $\mu$ l
10x GlycoBuffer 2	4 $\mu$ l	-	4 $\mu$ l
10x GlycoBuffer 3	-	4 $\mu$ l	-
PNGase F	2 $\mu$ l	-	-
Endo H <sub>f</sub>	-	2 $\mu$ l	-
Neuraminidase/O-glycosidase	-	-	2 $\mu$ l/2 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	Do 40 $\mu$ l	Do 40 $\mu$ l	Do 40 $\mu$ l

Do próby kontrolnej tj. próbki nietraktowanej enzymem, zamiast enzymu dodano wodę destylowaną, tak, aby zachować objętość mieszaniny reakcyjnej. Próby inkubowano przez noc w 37 °C. Następnie wykonano elektroforezę SDS-PAGE w warunkach redukujących i western blotting z przeciwciałami anti-DIII i przeciwciałami anti-prM/M w celu analizy profilu migracji białek w żelu.

Protokół reakcji w warunkach natywnych (PNGaza F i O-glikozydaza): do VLPs (10  $\mu$ g białka) dodano 3  $\mu$ l PNGazyF/ 3  $\mu$ l Neuraminidazy i 3  $\mu$ l O-Glikozydazy, 3  $\mu$ l 10x GlycoBuffer 2 i dopełniono wodą destylowaną do 30  $\mu$ l; próby kontrolne były nietraktowane enzymami. Wszystkie próby inkubowano w 37 °C przez 4 godziny. Po zakończonej reakcji 5  $\mu$ l mieszaniny użyto do elektroforezy SDS-PAGE w warunkach redukujących i wykonano western blotting z przeciwciałami anti-DIII i przeciwciałami anti-prM/M w celu analizy profilu migracji białka w żelu. Pozostałą część mieszaniny reakcyjnej wykorzystano do testu ELISA.

#### 7.4.15. Test wiązania VLPs do lektyn

W celu oceny wiązania VLPs do lektyn wykonano test ELISA typu kanapkowego, gdzie lektyny były użyte do wychwycenia cząstek. Wykorzystano cztery różne lektyny



oraz receptory lektynowe: DC-SIGN, DC-SIGNR, AIA oraz UEA I. Na 96-dołkową płytkę do ELISA naniesiono, w 3 powtórzeniach, lektyny rozcieńczone w buforze PBS (5 µg/ml) w objętości 50 µl/dołek. Płytkę inkubowano przez noc w 4 °C na bujawce horyzontalnej. Kolejnego dnia płytkę płukano 3 razy buforem PBS-T (200 µl/dołek), a następnie blokowano roztworem na bazie polimerów ROTI®ImmunoBlock przez 90 min w temperaturze pokojowej. Następnie płytkę przepłukano ponownie, naniesiono rozcieńczone roztwory VLPs w buforze do lektyn 10 mM HEPES/ 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>/pH 8 i inkubowano 2 h w 37 °C. Płytkę przepłukano pięciokrotnie buforem PBS-T i blokowano roztworem 1% BSA w buforze do lektyn (200 µl/dołek) przez 45 min w 37 °C. Płytkę ponownie płukano i dalej inkubowano z roztworem przeciwciał pierwszorzędowych ZV67 w 0.3% BSA w PBS-T przez 2 h w temperaturze pokojowej (2 µg/ml). Płytkę po płukaniu inkubowano z odpowiednimi przeciwciałami drugorzędowymi sprzężonymi z HRP (0.5 µg/ml) w 0.3 % BSA w PBS-T przez 1 h. Płytkę przepłukano 5 razy buforem PBS-T. Test ELISA wywołano przez dodanie roztworu wywoływacza TMB po 50 µl/dołek. Po max. 15 min zastopowano reakcję przy użyciu 50 µl 0.5 M kwasu siarkowego. Pomiar absorbancji przy długości fali 450 nm wykonano za pomocą czytnika płytek. Analizę wykonano trzykrotnie, przedstawiając na wykresach średnie wartości po odjęciu wartości progowej, opatrzone odchyleniami standardowymi oraz analizą statystyczną.

## **7.5. Produkcja i oczyszczanie rekombinowanych F2A VLPs**

### *7.5.1. Produkcja rekombinowanych rekombinowanych F2A VLPs*

Komórki 293T transfekowano wektorami plazmidowymi pcDNA3.1 kodującymi konstrukt F2A VLPs przy użyciu Transporter™ 5 Transfection Reagent zgodnie z protokołem producenta. 16 godzin po transfekcji, hodowle suplementowano 2 mM maślanem sodu, 1x MEM NEAA i 0.075% roztworem wodorowęglanu sodu i dalej hodowano w 28 °C. Pożywkę z transfekowanych komórek zbierano 96 h po transfekcji i wstępnie oczyszczano z pozostałości komórkowych przez wirowanie przy 3500 xg przez 10 min w 4 °C, a następnie filtrację przez 0.45 µm filtr PVDF. Permeat zawierający rekombinowane F2A VLPs przechowywano w 4 °C do oczyszczania.

### *7.5.2. Dwustopniowy proces oczyszczania rekombinowanych F2A*

#### *VLPs*

Proces oczyszczania F2A VLPs opierał się na procedurze przeznaczonej do oczyszczania wirusa żółtej gorączki i VLPs z pewnymi modyfikacjami (Lima, Souza i Castilho, 2019; Pato i in., 2019). W pierwszym etapie permeat z F2A VLPs zatężono przy użyciu Vivaspin® 20, 300 000 MWCO PES. Retentat dalej rozcieńczono buforem PBS/50 mM NaCl.

Oczyszczanie cząstek przeprowadzono w dwóch etapach:

- 1 etap – chromatografia jonowymienna przy użyciu kolumny z anionitem HiTrap® Capto™ Q, 5 ml (Cytiva); złożo oparte na czwartorzędowych aminach; etap ten miał na celu wychwyt VLPs z zagęszczonej pożywki hodowlanej, więc kolumna była użyta w trybie wiązanie - elucja,
- 2 etap – chromatografia multimodalna z użyciem 4.7 ml kolumny HiScreen CaptoCore 700 (Cytiva) pracująca w trybie przepływowym; złożo CaptoCore 700 charakteryzuje się podwójną funkcjonalnością tzn. każde ziarno złoża posiada rdzeń aktywowany ligandem – oktylamina, dzięki temu rdzeń posiada właściwości hydrofobowe i jest dodatnio naładowany oraz nieaktywną powłokę, wykluczającą przedostawanie się dużych cząsteczek (odcięcie ~ Mr 700 000 Da) do jądra przez pory powłoki; te większe cząsteczki są gromadzone we frakcji niezwiązanej przez kolumnę („przesączu”), podczas gdy mniejsze zanieczyszczenia wiążą się z ligandami.

Oba etapy chromatograficzne przeprowadzono przy użyciu pompy perystaltycznej o natężeniu przepływu 2 ml/min.

W pierwszym etapie kolumnę HiTrap® Capto™ Q zrównoważono PBS/50 mM NaCl, a następnie rozcieńczono retentat z F2A VLPs w celu adsorpcji cząstek do złoża. Następnie kolumnę przemyto buforem PBS/50 mM NaCl (10 objętości kolumny) i dalej buforem PBS/100 mM NaCl (5 objętości kolumny). Elucję F2A VLPs przeprowadzono stosując bufor PBS/350 mM NaCl (5 objętości kolumny, zbierane jako osobne frakcje). Na koniec kolumnę zregenerowano przez przemycie buforem PBS/1 M NaCl, a następnie przemycie roztworem 1 M NaOH.

W drugim etapie kolumnę HiScreen CaptoCore 700 zrównoważono buforem PBS/350 mM NaCl i nałożono eluat (pierwsze 3 frakcje) z pierwszego etapu

oczyszczania. F2A VLPs odzyskano w przesączu kolumny. Następnie preparat był zagęszczany przez ultrafiltrację za pomocą filtrów wirówkowych Amicon® Ultra odcinających białka o masie 100 kDa. Retentat zawierający VLPs był przechowywany do dalszych analiz w 4 °C. Kolumnę HiScreen CaptoCore 700 regenerowano przez przemycie 30% izopropanolem w 1 M NaOH.

Całkowitą zawartość białka w końcowym preparacie F2A VLPs określono metodą Bradford. Oczyszczone F2A VLPs poddano dalszej ocenie za pomocą analizy SDS-PAGE, western blotting, ELISA, TEM i DLS.

## **7.6. Immunizacja myszy**

### *7.6.1. Immunizacja myszy F2A VLPs*

Przeprowadzono cztery rodzaje doświadczeń na zwierzętach.

Pierwsze badanie dotyczyło porównania immunogenności VLPs otrzymanych w różnych systemach ekspresji. Dwie grupy po 6 samic myszy, szczep BALB/c (w wieku 6-8 tygodni) immunizowano podskórnie mieszaniną VLPs i adiuwantem - AddaVax (stosunek 1:1 v/v, końcowa objętość 100 µl). Myszy immunizowano 3 razy w dwutygodniowych odstępach stosując schemat dawkowania 25, 15, 10 µg. Całkowitą zawartość białka w antygenie VLPs do immunizacji oznaczono ilościowo przy użyciu testu Quick Start™ Bradford Protein Assay. Myszy stanowiące grupę kontrolną immunizowano mieszaniną adiuwantu i buforu PBS. Ten sam protokół doświadczeń zastosowano do oceny immunogenności dwóch typów VLPs - F i F2A wyprodukowanych w systemie komórek 293T.

Drugie badanie miało na celu ocenę wpływu dawkowania na immunogenność VLPs. Dwie grupy po 6 samic myszy, szczep BALB/c (w wieku 6-8 tygodni) immunizowano podskórnie mieszaniną F2A VLPs i adiuwantem - AddaVax (stosunek 1:1 v/v, końcowa objętość 100 µl). Myszy immunizowano 3 razy w dwutygodniowych odstępach stosując dwa schematy dawkowania: malejące dawkowanie - 15, 10, 5 µg VLPs lub dawkowanie rosnące - 5, 10, 15 µg. Całkowitą zawartość białka w antygenie VLPs do immunizacji oznaczono ilościowo przy użyciu testu Quick Start™ Bradford Protein Assay. Myszy stanowiące grupę kontrolną immunizowano mieszaniną adiuwantu i buforu PBS.

Kolejne doświadczenie zostało przeprowadzone, żeby określić wpływ różnych adiuwantów na rodzaj wzbudzonej odpowiedzi immunologicznej przez VLPs. Zastosowano dwa różne adiuwanty: AddaVax i połączenie wodorotlenku glinu -

Alhydrogel 2% z syntetycznym monofosforylo-lipidem a (MPLA). Immunizacje przeprowadzono zgodnie ze schematem rosnących dawek. Adiuwant Alhydrogel/MPLA użyto w ilości 200 µg/5 µg. Jako kontrole negatywne dwie grupy myszy immunizowano buforem PBS i każdym z adiuwantów.

Krew pobierano z żyły ogonowej w dniu 0, 14, 28 w celu uzyskania surowicy do oznaczenia poziomu przeciwciał. W dniu 42 myszy poświęcono i przeprowadzono pełne skrwawienie w celu uzyskania dużej objętości surowicy. Pobrano również śledziony, z których izolowano splenocyty w celu analizy odpowiedzi cytotoksycznej.

Wszystkie doświadczenia na zwierzętach zostały przeprowadzone przez akredytowaną jednostkę (Trójmiejska Akademicka Zwierzętarnia Doświadczalna Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego) zgodnie z obowiązującymi wytycznymi dotyczącymi doświadczeń na zwierzętach. Protokoły zostały zatwierdzone przez Lokalną Komisję Etyki ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Bydgoszczy (nr uchwały: 35/2016 i 17/2020). Doświadczenia przeprowadzono zgodnie z zasadą 3R (zastępowanie, ograniczenie i udoskonalenie). Wszystkie operacje przeprowadzono w znieczuleniu izofluranowym oraz dołożono wszelkich starań, aby zminimalizować cierpienie zwierząt.

#### *7.6.2. Przygotowanie mysich surowic poszczepiennych*

Pobraną krew inkubowano w 37 °C przez 15-30 min, a następnie przez 30 min w 4 °C w celu utworzenia się skrzepu krwi. Kolejno oddzielono surowicę od skrzepu przez wirowanie przy 2500 xg przez 10 min. Surowice zebrano do nowych probówek. Surowice z myszy tej samej grupy z dnia 0, 14, 28 (tą samą objętość) łączono w jedną pulę surowic. Podobnie z surowicami z dnia 42, pobrano po 100 µl i połączono w jedną pulę. Surowice przechowywano w -80 °C.

#### *7.6.3. Izolacja mysich splenocytów*

Mysie śledziony były homogenizowane przez rozcieranie na sicie komórkowym 70 µm i przepłukanie 6 ml pożywki RPMI. Następnie homogenizat wirowano przez 15 min w 900 xg. Pellet zawieszono w 3 ml buforu lizującego ACK w celu lizy krwinek i inkubowano przez 5 min w RT. Następnie lizę zakończono przez dodanie 30 ml buforu PBS i ponownie zwirowano komórki. Osad splenocytów zawieszono w 20 ml pożywki i przelano przez sito. Splenocyty używano od razu do analizy odpowiedzi IFN $\gamma$  lub przechowywano w -80 °C.

## **7.7. Analiza odpowiedzi immunologicznej po szczepieniu**

### *7.7.1. Oznaczenie miana przeciwciał w surowicach poszczepiennych – test ELISA*

Silnie-wiążące białka płytki M-96 ELISA pokryto roztworem rekombinowanej ektodomeny białka E lub rekombinowanej DIII (2 µg/ml) w buforze PBS pH 7.4. Po zablokowaniu (3% BSA/PBS-T) i przemyciu, dodano seryjnie rozcieńczone surowice myszy i inkubowano przez 2 h w RT. Następnie po przepłukaniu, dodano przeciwciała drugorzędowe skoniugowane z HRP przeciwko mysim IgG, IgG1 i IgG2a (Santa Cruz Biotechnology, Thermo Fisher Scientific) (0.5 µg/ml). Do wizualizacji reakcji użyto roztworu substratu TMB (Thermo Fisher Scientific). Reakcję zatrzymano 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i zmierzono absorbancję przy 450 nm czytnikiem mikropłytek. Test wykonano w 2 lub 3 powtórzeniach.

### *7.7.2. Test neutralizacji wirusa Zika – test PRNT*

Aby zmierzyć poziom neutralizacji wirusa Zika przez uzyskane surowice poszczepienne, wykonano test PRNT. W skrócie, wysiano komórki A549 w ilości 1.5 x10<sup>4</sup> / dołek płytki hodowlanej M-12 tak, aby następnego dnia komórki były w stanie pełnej konfluencji. Surowice inaktywowano termicznie w 56 °C przez 30 min. Surowice rozcieńczono seryjnie zaczynając od rozcieńczenia dwukrotnego w świeżej pożywce EMEM i mieszano z równymi objętościami szczepu ZIKV: H/PAN/2016/BEI-259634 lub MR766 zawierającym około 50 PFU/studzienkę. Mieszaniny inkubowano przez 1 h w 37 °C, a następnie nałożono na przemyte buforem PBS komórki. Po 1 godzinie zebrano pożywkę, komórki przemyto buforem PBS dwukrotnie i pokryto roztworem 1% metylocelulozy w pożywce MEM. Płytki inkubowano przez 4 dni w 37 °C i barwiono 0.5% roztworem fioletu krystalicznego w 20% etanolu. Łysinki zliczono i obliczono PRNT<sub>90</sub> jako najwyższe rozcieńczenie, które skutkowało co najmniej 90% redukcją liczby łysinek ZIKV.

### *7.7.3. Analiza wydzielania IFN $\gamma$ przez splenocyty techniką ELISpot*

Odpowiedź limfocytów T była analizowana za pomocą techniki ELISpot do wykrywania IFN $\gamma$  wg instrukcji producenta. W skrócie, ELISPOT 96 płytka została pokryta przeciwciałem anti-mysi IFN $\gamma$  przez noc i zablokowana pożywką RPMI. Następnie na płytkę zostały dodane splenocyty (5 x10<sup>5</sup>/dołek), które były następie

stymulowane peptydami pokrywającymi region białka E i M (PepMix™ ZIKV (E) Ultra i PepMix™ ZIKV (M)) przez noc. Kolejnego dnia komórki odpłukano, a płytkę inkubowano kolejno z biotynylowanym przeciwciałem anti-mysi IFN $\gamma$  i koniugatem streptawidyny z HRP. Wizualizację spotów przeprowadzono z użyciem substratu AEC. Dodatkowo konkanawalina a była użyta jako kontrola pozytywna stymulacji splenocytów (10  $\mu$ g/ml).

## **8. Wyniki i dyskusja**

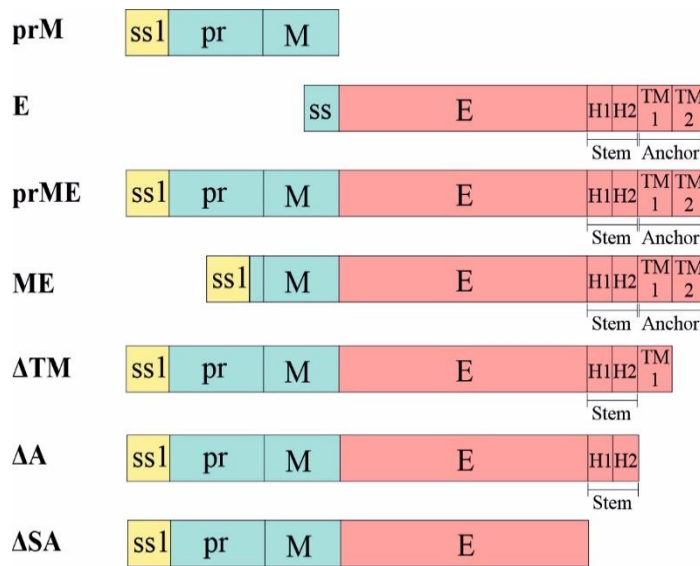
### **8.1. Składnie i sekrecja VLPs**

#### *8.1.1. Wyniki*

Pierwszy etap pracy miał na celu określenie znaczenia niektórych domen białka E oraz fragmentu pr na produkcję VLPs. W tym celu zaprojektowano 6 wariantów białek prM i E ZIKV (**Rycina 7**):

- białko E z sekwencją sygnałową (ss), którą stanowi druga domena transmembranowa białka prM (**E**) (~55 kDa),
- białka prM i E poprzedzone sekwencją sygnałową (ss1), którą stanowi domena transmembranowa białka C (**prME**) (~80 kDa; prM ~26 kDa; pr ~18 kDa; M ~ 9 kDa; E ~55 kDa),
- białka M i E poprzedzone sekwencją ss1 oraz miejscem cięcia dla peptydazy sygnałowej I (**ME**) (~62 kDa; M ~ 9 kDa; E ~55 kDa),
- białka prM i E poprzedzone sekwencją ss1, gdzie białko E posiada delecję regionu domeny transmembranowej (TM) 2 (**ΔTM**) (~77 kDa; prM ~26 kDa; pr ~18 kDa; M ~ 9 kDa; E ~52 kDa),
- białka prM i E poprzedzone sekwencją ss1, gdzie białko E posiada delecję regionu obu domen transmembranowych - anchor (**ΔA**) (~75 kDa; prM ~26 kDa; pr ~18 kDa; M ~ 9 kDa; E ~50 kDa),
- białka prM i E poprzedzone sekwencją ss1, gdzie białko E posiada delecję regionu obu domen helikalnych (H) oraz transmembranowych (**ΔSA**) (~70 kDa; prM ~26 kDa; pr ~18 kDa; M ~ 9 kDa; E ~45 kDa).

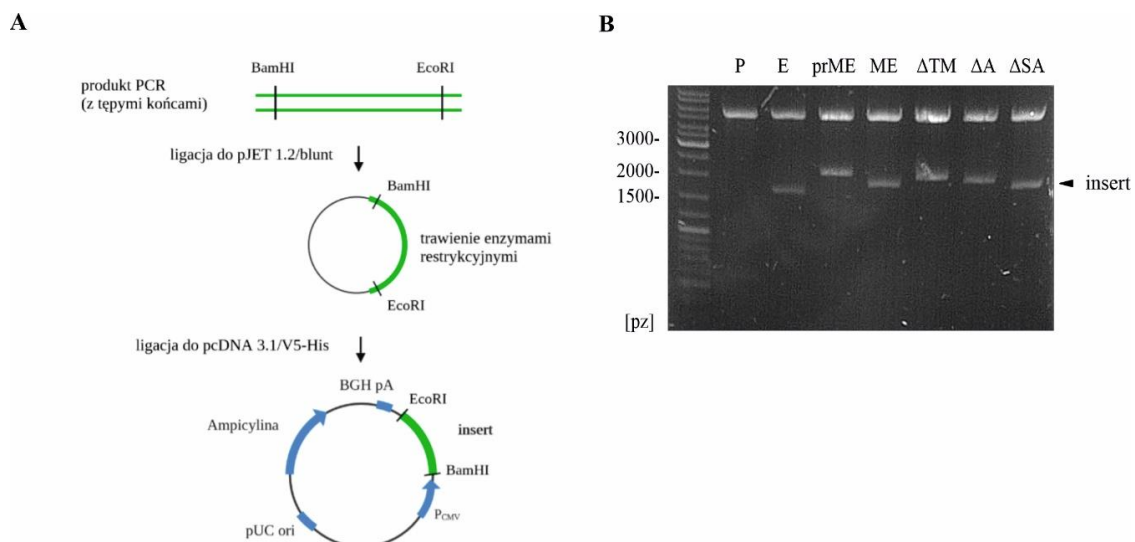
Dodatkowo, zaprojektowano białko prM poprzedzone sekwencją sygnałową ss1, które stanowiło kontrolę w immunodetekcji techniką western blottingu z użyciem przeciwciał anty-prM/M.



**Rycina 7. Schemat wariantów rekombinowanych białek prM i E ZIKV.**

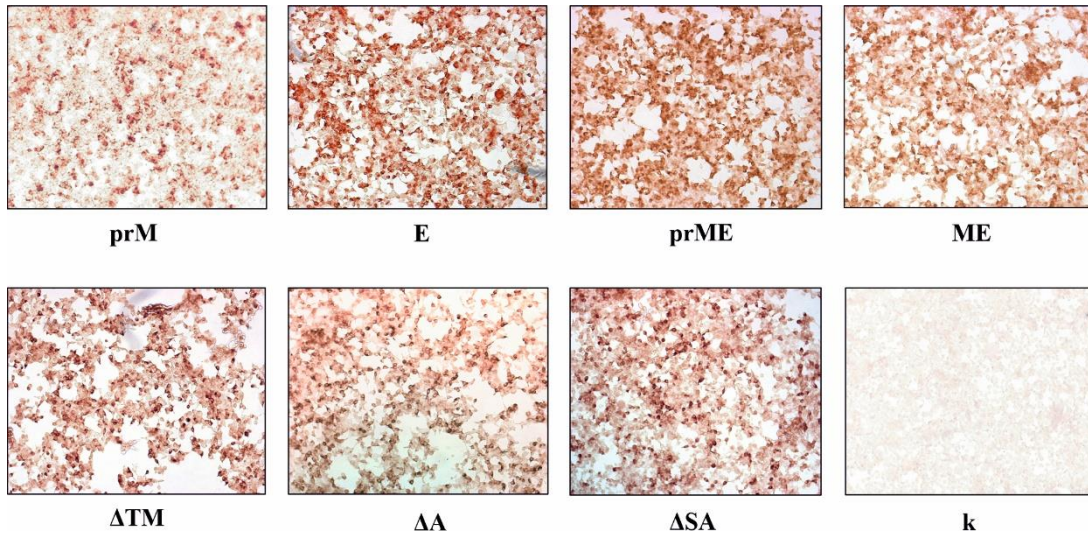
Następnie, przygotowano sekwencje genów kodujących powyższe warianty białek na podstawie sekwencji nukleotydowej wirusa Zika szczepu BeH818995 (GenBank: KU365777.1). Zlecono syntezę genu wariantu prME (406-2082 nt), wprowadzając dwa miejsca restrykcyjne – BamHI i EcoRI oraz kodon START i STOP na 5' i 3' końcu genu. Gen ten stanowił matrycę DNA do amplifikacji genów pozostałych wariantów za pomocą reakcji PCR z użyciem specyficznych par starterów. Powielone fragmenty DNA wklonowano do wektora pośredniego pJET 1.2/blunt, a następnie z użyciem enzymów restrykcyjnych do wektora plazmidowego pcDNA 3.1/V5-His (**Rycina 8**). Plazmid pcDNA 3.1/V5-His jest wektorem dedykowanym do użycia w systemie ekspresji genów w komórkach ssaczych. Posiada on silny promotor CMV, co pozwala uzyskać wysoki poziom ekspresji genów. Poprawność wklonowania zweryfikowano za pomocą analizy restrykcyjnej oraz sekwencjonowania wklonowanego insertu.





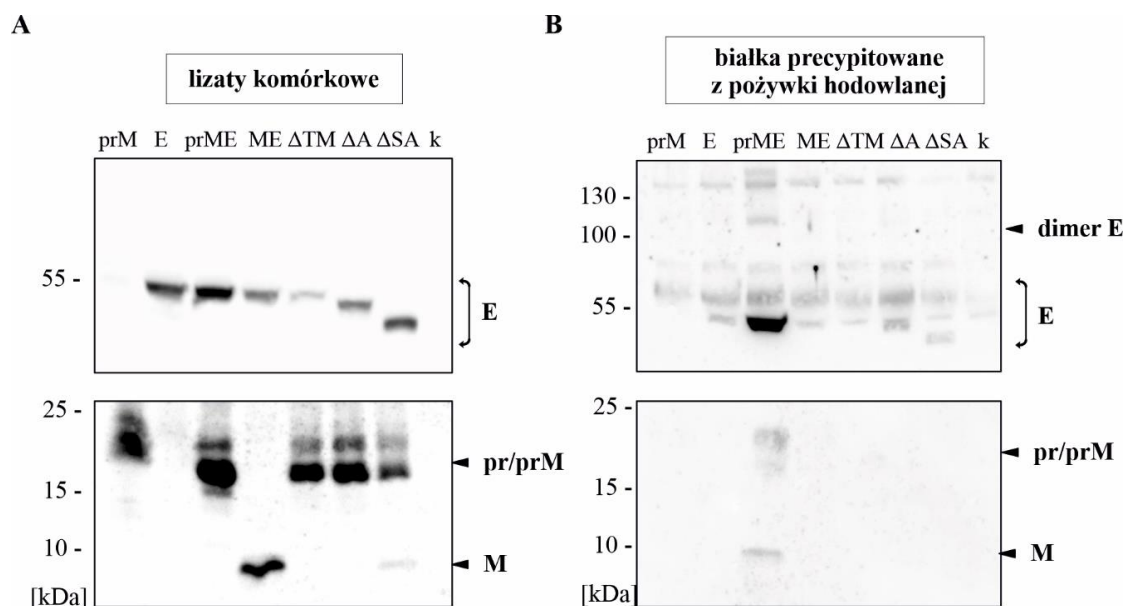
**Rycina 8. Schemat konstrukcji wektorów plazmidowych pcDNA 3.1 V5-His kodujących warianty białek prM i E ZIKV (A) oraz analiza restrykcyjna wektorów plazmidowych (B); pz – pary zasad**

Otrzymane plazmidy były następnie używane do transfekcji komórek 293T, w celu analizy produkcji i składania VLPs. Komórki 293T posiadają duży antygen T wirusa SV40, co umożliwia regulację transkrypcji i replikacji DNA plazmidowego, który posiada SV40 ori. Ponadto komórki te charakteryzują się wysoką wydajnością transfekcji, gdyż nie posiadają syntazy cyklicznego GMP-AMP – stymulatora genów interferonu (ang. *stimulator of interferon genes*, *STING*) służącego do wykrywania cząsteczek DNA cytozolowego (Sun i in., 2013; Zhang i in., 2014). Transfekcję wykonywano z użyciem komercyjnego odczynnika jetPRIME, który opiera się na polimerach kationowych, niwelujących ujemny ładunek DNA, co z kolei umożliwia endocytozę kompleksów. W pierwszym kroku wykonano test IPMA z odpowiednimi przeciwciałami specyficznymi do białka prM/M lub domeny III białka E w celu potwierdzenia ekspresji wprowadzonych genów rekombinowanych białek oraz oceny wydajności transfekcji komórek 293T (**Rycina 9**). Test potwierdził ekspresję genów rekombinowanych białek prM i E z skonstruowanych wektorów plazmidowych oraz wysoką wydajność transfekcji.



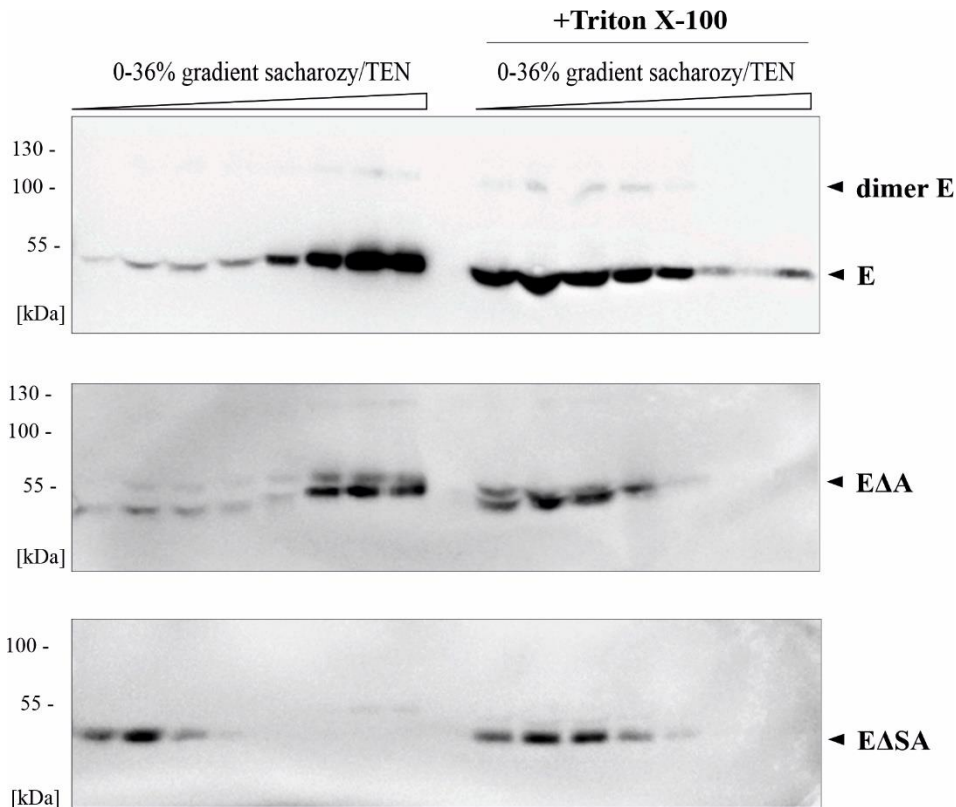
**Rycina 9.** Porównanie wydajności transfekcji komórek 293T skonstruowanymi wektorami plazmidowymi pcDNA3.1/V5-His kodującymi warianty rekombinowanych białek prM i E ZIKV z użyciem testu IPMA. Transfekcję przeprowadzono na komórkach 293T hodowanych na płytce M-12 za pomocą odczynnika jetPRIME; 40 h po transfekcji komórki utrwalono za pomocą roztworu 4% paraformaldehydu i wykonano test IPMA. Do wykrycia białka prM użyto przeciwciała anti-prM, natomiast do pozostałych wariantów rekombinowanych białek przeciwciała anti-DIII; k – komórki nietransfekowane barwione mieszaniną obu przeciwciał.

Następnie, przeprowadzono analizę produkcji rekombinowanych białek i ich sekrecji do pożywki hodowlanej. Ponownie przeprowadzono transfekcję, przygotowano lizaty komórkowe, a białka z pożywki hodowlanej precypitowano za pomocą PEG 6000, który ma większe powinowactwo do białek oraz kompleksów białkowych o dużej masie np. VLPs (Sim i in., 2012). Wszystkie warianty białka E zostały wykryte w lizatach komórkowych (**Rycina 10 A**). Wykryto 4 formy białka prM: dojrzałe białko M oraz dwie formy o wyższej masie mogące odpowiadać niedojrzałemu białku prM i fragmentowi pr. Najwydajniejszej sekrecji uległ wariant prME, czyli wariant pełnych form białka E (**Rycina 10 B**). Dla tego wariantu zaobserwowano formę monomeryczną jak i dimeryczną białka E. Ponadto, jedynie dla tego wariantu wykryto białko prM/ fragment pr oraz dojrzałe białko M w pożywce hodowlanej. W przypadku pozostałych wariantów rekombinowanych białek (E, ME,  $\Delta A$ ,  $\Delta SA$ ) zaobserwowano bardzo słabe prążki odpowiadające monomerom białka E. Nie wykryto białka E dla wariantu  $\Delta TM$ . Zaburzona sekrecja białka E i prM może sugerować znaczenie usuniętych regionów w formowaniu VLPs.



**Rycina 10.** Analiza produkcji wariantów rekombinowanych białek prM i E ZIKV w komórkach 293T (A) i ich sekrecji do pożywki hodowlanej (B). 48 h po transfekcji przygotowano lizaty komórkowe oraz precypitowano białka za pomocą PEG 6000. Następnie, białka (20  $\mu$ g) rozdzielono w żelu SDS-PAGE w warunkach redukujących i wykonano western blotting z przeciwciałami anty-DIII oraz anty-prM/M; k – nietransfekowane komórki 293T.

W kolejnym kroku postanowiono zbadać zdolność wybranych wariantów, które uległy sekrecji (prME,  $\Delta$ A,  $\Delta$ SA) do tworzenia VLPs. W tym celu wykorzystano ultrawirowanie w gradiencie gęstości roztworu sacharozy (0-36%) w połączeniu z uprzednim traktowaniem białek/VLPs detergentem niejonowym – Triton X-100. Metoda ta została wcześniej wykorzystana do analizy składania VLPs wirusa dengi (Hsieh, Tsai, Nerurkar i Wang, 2014; Tsai i in., 2012). Analiza wykazała kumulowanie się form białka E głównie we frakcjach o dużej gęstości w przypadku wariantu prME i E $\Delta$ A, a po traktowaniu detergentem we frakcjach o małej gęstości (**Rycina 11**). Nie wykryto białka prM/M/fragmentu pr w żadnej frakcji (wyniki niepokazane). W przypadku wariantu  $\Delta$ SA, niezależnie od traktowania, formę białka E wykryto we frakcjach o niskiej gęstości. Uzyskane wyniki sugerują formowanie się VLPs w przypadku pełnej formy białka E oraz tej niezawierającej regionu anchor, gdyż ulegają solubilizacji po traktowaniu detergentem.



**Rycina 11. Analiza składowania VLPs.** 72 h po transfekcji pożywkę hodowlaną zebrano, osadzono za pomocą ultrawierowania, a następnie zawieszono z buforze TEN. Połowę próbki traktowano Tritonem X-100 (0.1%), którą następnie poddano utrawiowaniu w gradiencie gęstości sacharozy (0-36%). Zebrano frakcje odpowiadające różnym gęstościom sacharozy, które analizowano za pomocą SDS-PAGE w warunkach redukujących, a następnie western blottingu z przeciwciałami 4G2.

### 8.1.2. Dyskusja

Klasycznie VLPs wirusa Zika jak i innych FV są złożone z pełnych form białek prM i E. Taka forma białek lub jej geny są najczęściej wykorzystywane w celach szczepionkowych. Wcześniejsze badania z użyciem VLPs FV sugerowały znaczenie regionu stem i anchor w formowaniu VLPs oraz ich sekrecji. Jednak, dla wirusa Zika nie przeprowadzono takich badań, aczkolwiek w literaturze dostępne były sprzeczne dane na temat roli tych regionów w sekrecji białek/VLPs. Należy nadmienić, że wydajniejsze składowanie i sekrecja mogłyby ułatwić oczyszczanie VLPs z pożywki oraz zwiększyć ich immunogenność. Dlatego, w pierwszym etapie pracy przeanalizowano sekrecję i formowanie się VLPs wirusa Zika stosując różne warianty białek prM i E: pełny prME, ME, z delecją drugiej domeny transmembranowej białka E, z delecją regionu anchor oraz delecją regionu stem/anchor. Analiza wykazała, że białka z konstruktu prME ulegały najwydajniejszej sekrecji i wykazywały najlepsze formowanie VLPs w porównaniu do pozostałych konstruktów. Konstrukt ME był swoistą kontrolą, gdyż ze względu na brak

fragmentu pr, może ulegać fuzji z błonami pęcherzyków wewnątrzkomórkowych przez co nie ulegał sekrecji.

Pozostałe warianty z delecjami regionów TM2, A i SA w niniejszych badaniach ulegały niskiej sekrecji. Jest to zgodne z badania przeprowadzonymi na VLPs DENV serotypu 4, gdzie VLPs pozbawione regionu stem/anchor ulegały zredukowanej sekrecji w transfekowanych komórkach 293T w porównaniu z pełnym konstrukt (Hsieh i in., 2014). Podobne wyniki uzyskano również dla wirusa kleszczowego zapalenia mózgu (Allison i in., 1999). Jedno badanie dotyczące fałdowania się białek prM i E ZIKV, pokazało zależną od temperatury sekrecję konstrukt pozbawionego fragmentu pr oraz domeny stem i anchor w transfekcji komórek 293T (Slon Campos i in., 2017). Grupa ta obserwowała brak sekrecji wariantu prME $\Delta$ SA ZIKV w temperaturze 37 °C, która była przywracana w 28 °C. Jednakże, w badaniu tym używano sekwencji białek prM i E pochodzących ze szczepu linii afrykańskiej - MR766, wykazującym brak glikozylacji miejsca N154 w białku E w porównaniu ze szczepem używanym w doświadczeniach pokazanych w niniejszej pracy (linia azjatycka, BeH818995). Warto nadmienić również, że podobne konstrukty – prME i prME $\Delta$ A zostały użyte w badaniach immunogenności szczepionki wektorowej opartej na szympansim adenowirusie kodującym te warianty (ChAdOx1) (López-Camacho i in., 2018). Ich badanie wykazało odwrotny efekt delecji regionu anchor, tj. tylko konstrukt prME $\Delta$ A uległ sekrecji, po infekcji komórek HEK293 tymi wektorami. Sekwencja nukleotydowa tych konstruktyw była konsensusową sekwencją powstałą z porównania wielu genomów szczepów linii azjatyckiej i posiadała ~1% zmian, co mogło wpłynąć na fałdowanie się białek oraz ich sekrecję.

Co więcej, wyniki przedstawione w niniejszej pracy sugerują rolę regionu stem białka E w tworzeniu VLPs. Natomiast region anchor może pełnić dodatkową funkcję stabilizacyjną, gdyż konstrukt białkowy pozbawiony tylko tego regionu zachował zdolność do tworzenia struktur o dużej gęstości. W niedawnym badaniu dotyczącym VLPs WNV wykazano zwiększoną sekrecję białka E po usunięciu regionu anchor czy regionu stem/anchor (Maezono i in., 2021). Ponadto, dalsza analiza formowania VLPs WNV wykazała tworzenie struktur o dużej gęstości w przypadku wariantu prME i prME $\Delta$ A, natomiast VLPs nie tworzyły się w przypadku delecji obu regionów stem i anchor, co sugeruje rolę regionu stem w składaniu VLPs tego wirusa (Maezono i in., 2021). Z drugiej strony, interesujące wyniki uzyskano dla VLPs DENV-4, gdzie mimo delecji regionu stem/anchor obserwowano formowanie się cząstek (Hsieh i in., 2014). Ponadto, w tym badaniu pokazano tworzenie się cząstek wirusopodobnych z konstrukt

pozbawionego stem/anchor, a także białka prM. Cząstki te prawdopodobnie składają się przy pomocy innego mechanizmu, gdyż zaobserwowano obecność białek cytoszkieletu we frakcjach o tej samej gęstości, czego nie obserwowano w pełnych VLPs. Tego typu VLPs, wyprodukowane w systemie drożdżowym były także immunogenne (Mani i in., 2013; Poddar i in., 2016). W przypadku ZIKV, nie zaobserwowałam tworzenia się żadnych wyższych struktur konstruktów pozbawionego białka prM i regionu stem/anchor (dane niepokazane). Podsumowując, składanie i sekrecja VLPs wirusa Zika przebiega w sposób odmienny niż dla niektórych FV. W związku z tym, że praca ta dotyczyła VLPs w kontekście użycia ich jako antygenów szczepionkowych, zaburzona sekrecja i składanie konstruktów białkowych z delecjami regionów stem lub anchor, wykluczyła je z użycia w dalszych badaniach jako immunogenów.

Należy również zwrócić uwagę, że VLPs są także uważane za model do badań składania wirionów FV. Badania cryo-EM struktury dojrzałego wirionu ZIKV sugerują, że cząstka jest stabilizowana głównie przez oddziaływania N-końcowej pętli M, helis M-H1 i M-H3 oraz C-końcowych reszt białka M (Sevvana i in., 2018). Słabsze oddziaływania występują między E-H3 i białkiem M oraz E-T1 i ektodomeną E. Autorzy tego artykułu sugerują również, że większa temperaturowa stabilność wirionów ZIKV w porównaniu do DENV, może wynikać ze zwiększonej liczby oddziaływań między białkami M i E. Zaburzona sekrecja oraz składanie VLPs ZIKV, które zaobserwowano w tej pracy, potwierdza pośrednio znaczenie domen helikalnych oraz transmembranowych białka E w składaniu i stabilizacji struktur oligomerycznych/VLPs. Jednak, w celu dokładnego zbadania roli tych regionów należałoby wprowadzić delecje lub mutacje do genomu wirusa i porównać ze składaniem VLPs lub zbadać strukturę VLPs ZIKV za pomocą techniki cryo-EM. Takie badania pozwoliłyby ocenić czy cząstki wirusopodobne mogą być uważane za model do badań procesu składania oraz sekrecji wirionów. W przypadku TBEV poznano strukturę cryo-EM VLPs (Ferlenghi i in., 2001). Te cząstki również tworzyły ikozaedralne cząstki, podobnie jak wiriony FV, jednakże ze średnicą ~30 nm, gdzie dojrzały wirion ZIKV ma średnicę ~50 nm. Największa różnica, była w liczbie kopii białka E i M, gdzie VLPs składały się z 30 kopii dimerów każdego z białka E i M, a wiriony z 90 kopii. Tak, więc, używanie VLPs jako modelu do badania procesu składania cząstek wirusowych może nie prowadzić do uzyskania bezpośrednich dowodów. Jednakże zróżnicowanie w udziale regionu stem i anchor w tworzeniu VLPs wśród FV, co pokazują także wyniki pokazane w niniejszej rozprawie, może sugerować, że proces tworzenia się VLPs/wirionów jest specyficzny dla danego wirusa.

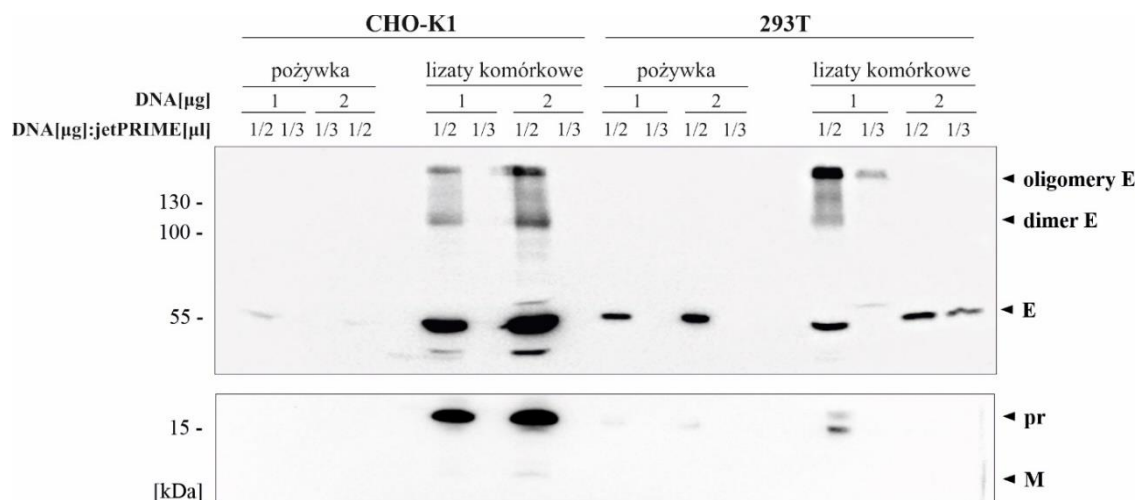


## **8.2. Charakterystyka porównawcza VLPs wyprodukowanych w systemie ekspresji genów w komórkach ssaczych i komórkach owadzych**

Do produkcji białek rekombinowanych oraz cząstek wirusopodobnych wykorzystywane są systemy ekspresji genów w komórkach: ssaczych, owadzych, drożdżowych, roślinnych oraz bakteryjnych (Lalonde i Durocher, 2017). Systemy ekspresji genów w komórkach ssaczych oraz owadzych były używane do otrzymywania VLPs FV w tym ZIKV. Jednakże, to tej pory nie porównano wydajności produkcji, właściwości antygenowych czy immunogennych tak otrzymanych cząstek.

### *8.2.1. Produkcja VLPs w komórkach ssaczych*

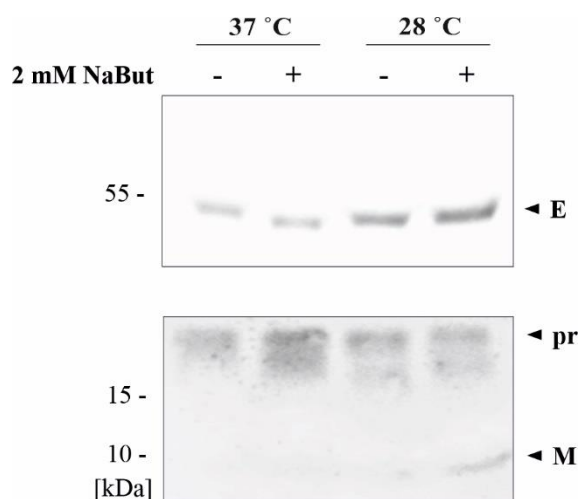
System ekspresji genów w komórkach ssaczych najczęściej wykorzystuje dwie linie komórkowe: z jajnika chomika chińskiego (CHO i jej pochodne np. CHO-K1, CHO-S ExpiCHO) lub ludzką linię z nerki embrionalnej (HEK293 i jej pochodne np. 293T, Expi293, FreeStyle 293-F). Obie linie mogą być wykorzystywane do stabilnej jak i przejściowej ekspresji genów z użyciem różnych wektorów plazmidowych lub wirusowych (Vatandoost i Dolatabadi, 2017). Linia komórkowa CHO w porównaniu z linią 293T może wykazywać niższy poziom transfekcji, lecz jednocześnie może produkować białka rekombinowane z większą wydajnością (Jain i in., 2017). Ponadto, ze względu na różnice w profilu glikozylacji linie komórkowe oparte na pierwotnej linii HEK293 wykazują wyższą w produkcji białek silnie glikozylowanych w stosunku z liniami CHO (Gugliotta i in., 2013). Białka prM i E wirusa Zika, wchodzące w skład VLPs posiadają po 1 miejscu N-glikozylacji. Porównano poziom produkcji VLPs w dwóch liniach: CHO-K1 i 293T, wykorzystując skonstruowany wcześniej wektor plazmidowy pcDNA 3.1/V5-His prME w przejściowej ekspresji genów (**Rycina 12**). Do transfekcji komórek tak jak wcześniej użyto odczynnika jetPRIME. Dodatkowo przetestowano różne ilości DNA oraz stosunek DNA do reagentu. Stosunek DNA do odczynnika jetPRIME miał znaczący wpływ na wydajność transfekcji w obu liniach. Najlepsze warunki transfekcji w tej skali hodowli dla obu linii uzyskano przy zastosowaniu 1 µg DNA w stosunku 1:2. W linii CHO-K1 uzyskano wysoki poziom białka w lizatach komórkowych, jednakże zaobserwowano większy poziom białka E oraz fragmentu pr w linii 293T. Do dalszych badań wybrano komórki 293T jako bardziej optymalną linię komórkową w systemie ekspresji przejściowej.



**Rycina 12. Porównanie produkcji VLPs wirusa Zika w linii komórkowej CHO-K1 i 293T.** Komórki CHO-K1 i 293T były transfekowane odczynnikami jetPRIME w różnych warunkach – dwie ilości DNA (1 µg lub 2 µg DNA), w dwóch różnych stosunkach (DNA/jetPRIME: 1/2 lub 1/3). 72 h po transfekcji komórki i pożywka zostały zebrane, użyte do precypitacji PEG 6000 lub lizy komórkowej. Następnie białka rozdzielono w żelu SDS-PAGE w warunkach nieredukujących i wykonano western blotting z przeciwciałami 4G2 i anti-prM.

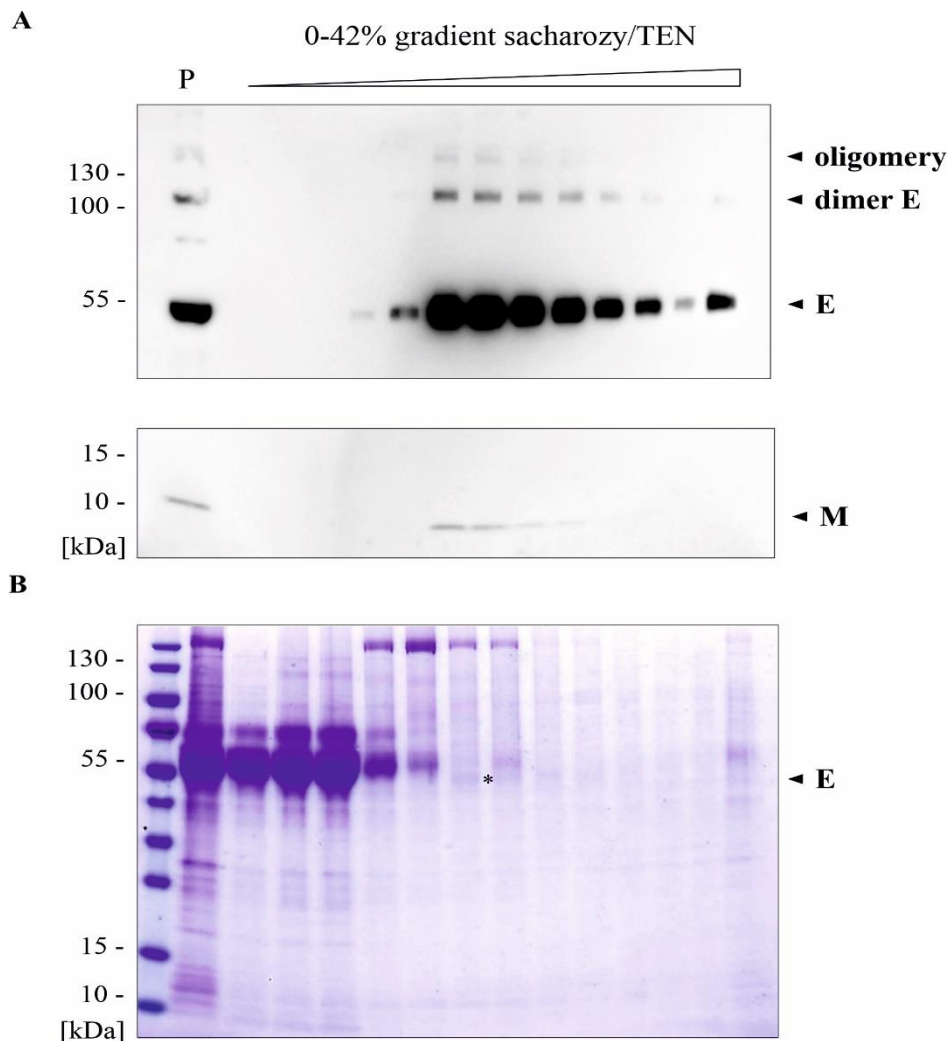
Ponadto, ekspresję genów w systemie komórek ssaczych można wzmocnić przez manipulację warunkami hodowli np. temperaturą czy suplementacją inhibitorami deacetylazy histonów np. roztworem maślanu sodu (NaBut) (Backliwal i in., 2008; Lin i in., 2015). Wykazano, że obniżenie temperatury hodowli z 37 °C na 28 °C dobę po transfekcji może zwiększyć poziom sekrecji oraz stabilizować formowanie się dimerów białka E wirusów z rodzaju *Flavivirus*, w tym wirusa Zika (Kudlacek i in., 2018; Slon Campos i in., 2017). Zbadano wpływ maślanu sodu w połączeniu ze zredukowaniem temperatury na sekrecję białek E i prM (**Rycina 13**). Potwierdzono zwiększenie sekrecji białka E w niższej temperaturze, co było dalej wzmocnione przez dodatek maślanu sodu. Analiza densytometryczna wykazała około dwukrotne zwiększenie poziomu białka E w przypadku kombinacji redukcji temperatury oraz suplementacji NaBut. W związku z tym VLPs wirusa Zika do dalszych analiz otrzymywano w komórkach 293T w ekspresji przejściowej, poprzez transfekcję wektorem plazmidowym pcDNA 3.1/V5-His prME suplementując pożywkę 2 mM NaBut i zmieniając temperaturę hodowli na 28 °C. Pożywkę zawierającą cząstki zbierano po 72 h od transfekcji.





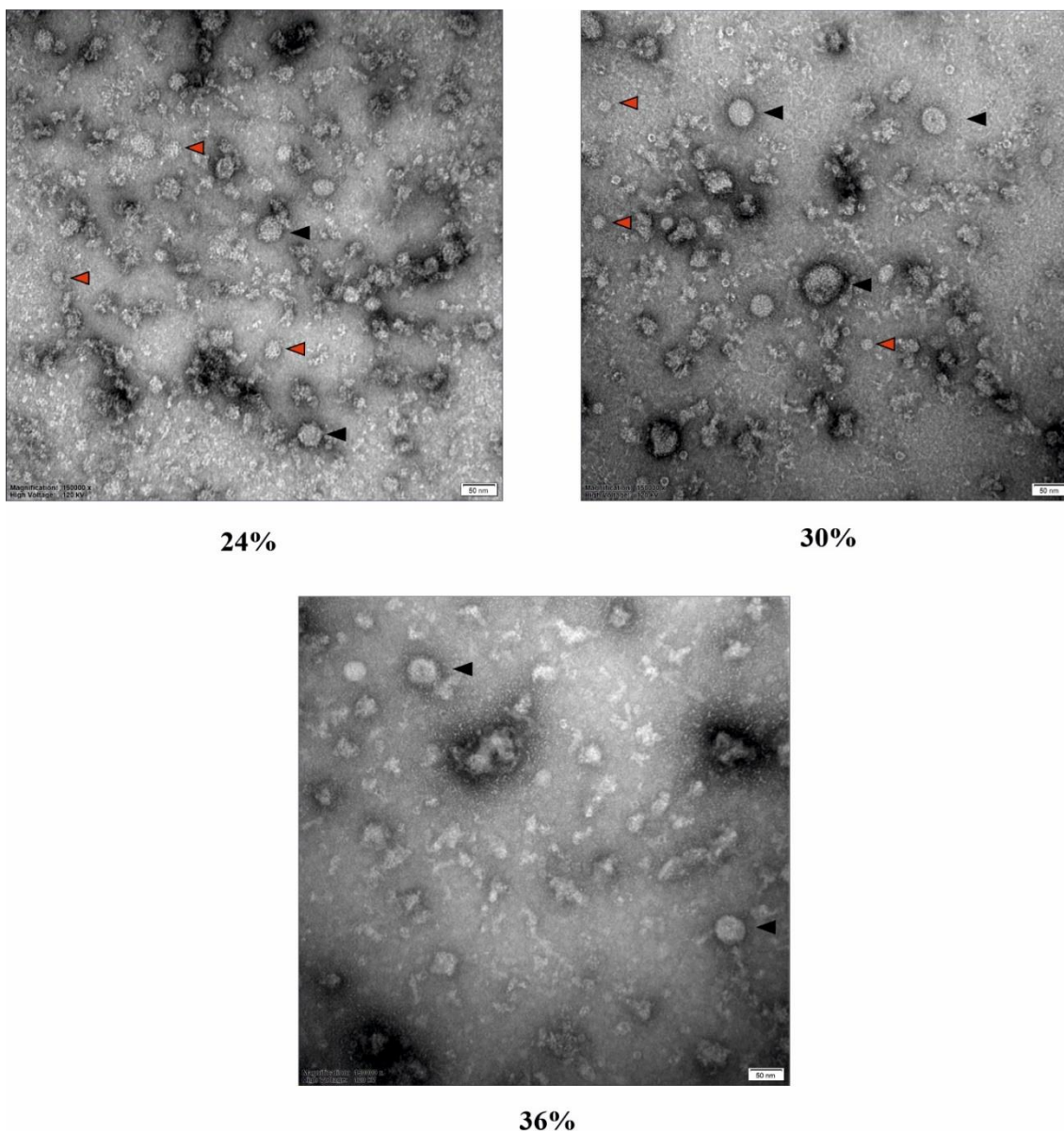
**Rycina 13.** Wpływ zredukowanej temperatury hodowli oraz maślanu sodu na sekrecję VLPs. Komórki 293T były transfekowane ustalonym protokołem, 16 h po transfekcji pożywkę hodowlaną suplementowano 2 mM maślanem sodu (NaBut), a komórki dalej hodowano w 28 °C lub 37 °C. 72 h po transfekcji pożywka została zebrana, precypitowana PEG 6000. Następnie, białka rozdzielono w żelu SDS-PAGE w warunkach redukujących i wykonano western blotting z przeciwciałami anti-DIII i anti-prM.

Następnie, wykonano ultrawierowanie w gradiencie gęstości sacharozy w celu oceny wydajności składania oraz wstępnego oczyszczenia VLPs. Pożywkę zawierającą cząstki poddano wstępnej filtracji, pelletowaniu, a następnie zawieszony pellet poddano ultrawierowaniu w nieciągłym gradiencie roztworów sacharozy (0-42% [w/w] sacharozy/bufor TEN, różnica stężeń—6%). Następnie przeprowadzono immunodetekcję białek prM/M i E w zebranych frakcjach (**Rycina 14 A**). Białko E wykryto we frakcjach od 18% do 42%. Jednak, największą zawartość białka E wraz z dimerami oraz oligomerami, jak również białko M zaobserwowano w dwóch frakcjach o stężeniu sacharozy 24% oraz 30%, co odpowiada gęstości  $\sim 1.10 \text{ g/cm}^3$  oraz  $\sim 1.16 \text{ g/cm}^3$ , odpowiednio. Frakcje te potencjalnie zawierają VLPs składające się z dwóch białek E i M, czyli dojrzałe VLPs. Ponadto, nie wykryto białka prM. Następnie, przeprowadzono barwienie CBB w celu oceny ilości białek E i M w zebranych frakcjach (**Rycina 14 B**). Wykryto prążek na wysokości monomeru białka E we frakcji 24%, jednakże ilość białka E była bardzo niska. Nie wykryto białka M.



**Rycina 14. Ultrawierowanie VLPs w gradiencie gęstości sacharozy.** Pożywkę hodowlaną poddano wstępnej filtracji, pelletowaniu, a następnie zawieszony pellet poddano ultrawierowaniu w nieciągłym gradiencie roztworów sacharozy (0-42% [w/w] sacharozy/bufor TEN). Następnie białka z zebranych frakcji (14 frakcji, po 2 frakcje na dane stężenie sacharozy) rozdzielono w żelu SDS-PAGE w warunkach nieredukujących i wykonano western blotting z przeciwciałami anti-DIII i anti-prM (A). Barwienie CBB białek w zebranych frakcjach po rozdziale elektroforetycznym w warunkach redukujących (B).

Następnie, przeprowadzono obserwacje morfologii VLPs za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) z wybranych frakcji – 24%, 30% oraz 36% (**Rycina 15**). W dwóch pierwszych frakcjach zaobserwowano mieszaną populację cząstek o średnicy ok. 25 nm oraz 50 nm. We frakcjach o większej gęstości można zauważyć dużą ilość cząstek o średnicy ~50 nm.



**Rycina 15.** Obserwacja VLPs w wybranych frakcjach za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej po barwieniu negatywnym octanem uranylu. Przedstawiono reprezentatywne obrazy dla poszczególnych frakcji; pasek skali 50 nm; czerwona trójkąt – VLPs o średnicy ~25 nm, czarny trójkąt – VLPs o średnicy ~50 nm.

### 8.2.2. Produkcja VLPs w komórkach owadzych

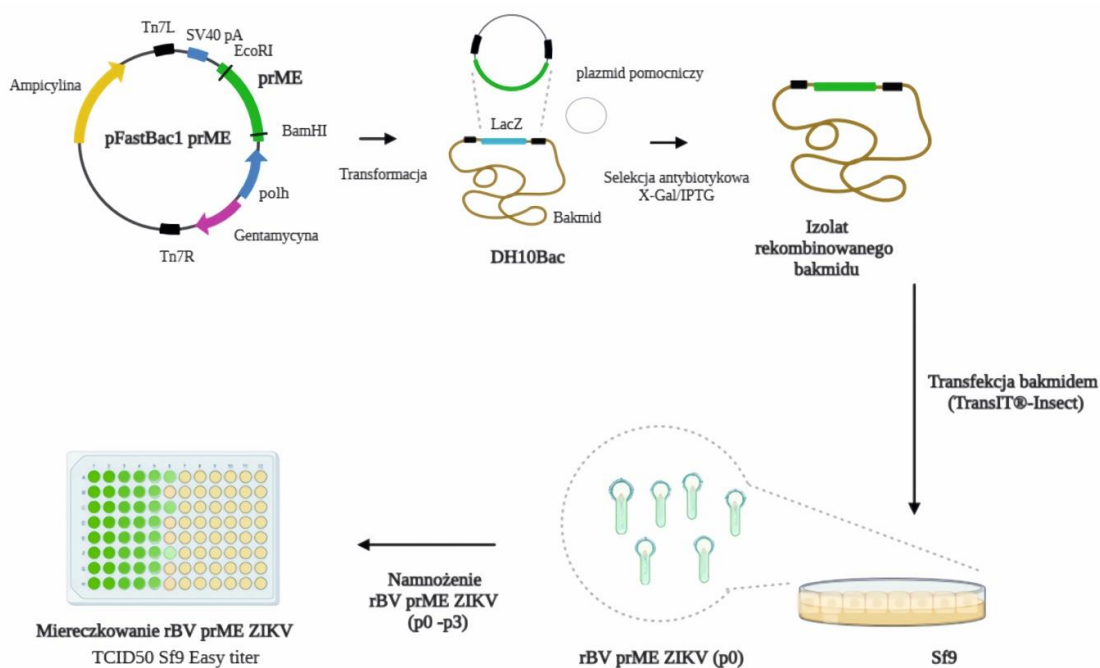
Do produkcji VLPs wybrano bakulowirusowy system ekspresji genów. W systemie tym wykorzystywany jest najczęściej wirus poliedrozy jądrowej *Autographa californica* (AcNPV) jako wektor genów heterologicznych, których ekspresja może odbywać się z dwóch różnych promotorów: polihedryny (polh) i włóknistego polipeptydu 10 kDa (p10). Popularnie używane linie komórkowe owadów z rzędu

*Lepidoptera* pochodzą od *Spodoptera frugiperda* (Sf9 i Sf21) i *Trichoplusia ni* (Tn5, komercyjnie znanej jako High Five™), które do wzrostu wymagają jedynie temperatury 27 °C i nie wymagają CO<sub>2</sub>. Dodatkowo, ich hodowla może być prowadzona w formie zawiesinowej lub adherentnej. BEVS umożliwia produkcję białek rekombinowanych z modyfikacjami potranslacyjnymi wysoce podobnymi do tych występujących w komórkach ssaczy: takich jak fałdowanie, oligomeryzacja, fosforylacja, glikozylacja, tworzenie wiązań dwusiarczkowych, modyfikacje proteolityczne. Dlatego też, system ten jest często wykorzystywany do ekspresji rekombinowanych białek i cząstek wirusopodobnych (Liu i in., 2013; Mi i in., 2021; Yamaji i in., 2012). Do produkcji VLPs ZIKV (wariant prME) wybrano popularny system Bac-to-Bac™, który wykorzystuje miejscowo-specyficzną transpozycję do generowania wektorów bakulowirusowych zachodzącą w komórkach bakteryjnych. Kasetę genów wariantu prME została wklonowana enzymami restrykcyjnymi w miejsce wielokrotnego klonowania do wektora donorowego – pFastBac1 pod kontrolę polh (**Rycina 16**). Region promotora wraz z genem i sygnałem poliadenylacji SV40 oraz genem markerowym niosącym oporność na gentamycynę jest oflankowany prawym i lewym ramieniem transpozonu Tn7. Plazmid był następnie użyty do transformacji komórek *E. coli* DH10Bac w celu skonstruowania rekombinowanego bakmidu za pomocą miejscowo-specyficznego transpozycji. Komórki te zawierają:

- bakmid - czyli genom bakulowirusa, zawierający replikon mini F odpowiedzialny za utonomiczną replikację wektora oraz miejsce włączania się transpozonu Tn7, wbudowane w obrębie genu lacZ, co umożliwia selekcję rekombinantów bakmidowych; bakmid zawiera ponadto gen markerowy niosący oporność na kanamycynę,
- plazmid pomocniczy - koduje białka TnsA i TnsB o aktywności transpozazy Tn7, rozpoznające miejsca Tn7R i Tn7L i mini att-Tn7 oraz białka TnsC i TnsD wspomagające transpozycję; zawiera gen markerowy niosący oporność na tetracyklinę.

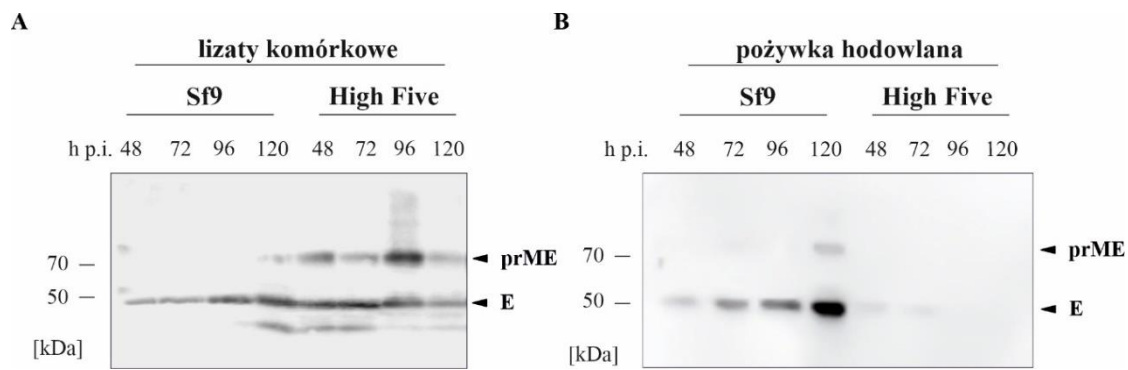
Przeprowadzono selekcję antybiotykową klonów, a następnie wyizolowano bakmid, który posłużył do transfekcji komórek owadnich Sf9. Wektor bakulowirusowy rBV prME ZIKV (p0) został dalej namnożony, a pasaż trzeci (p3) wirusa został zmiareczkowany.

Uzyskano miano  $8 \times 10^7$  PFU/ml. rBV prME ZIKV z tego pasażu był wykorzystywany do dalszych analiz.



**Rycina 16. Schemat konstrukcji wektora bakulowirusowego kodującego wariant prME ZIKV (rBV prME ZIKV) z użyciem systemu Bac-to-Bac**

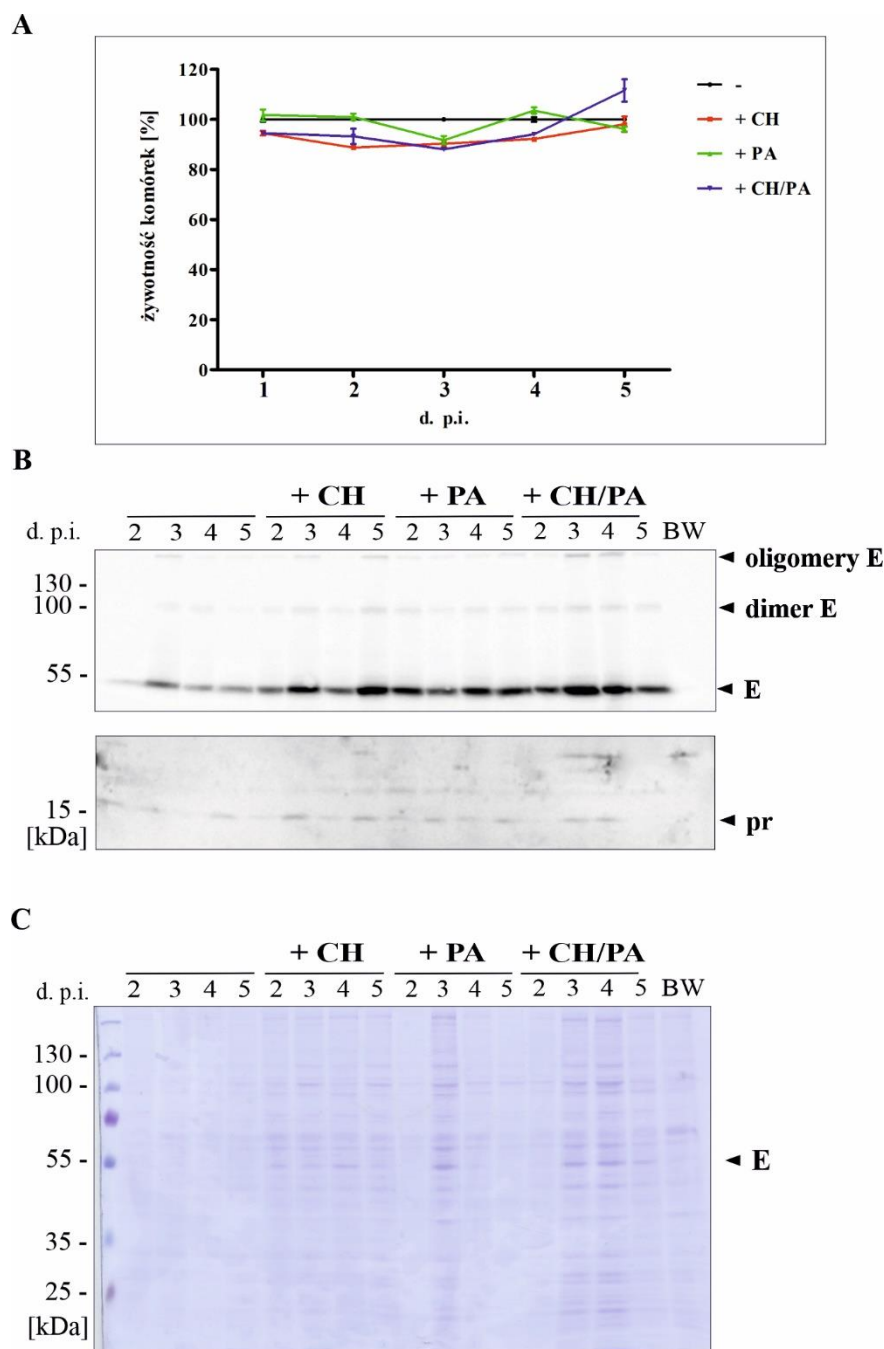
Doniesienia literaturowe wskazują na wyższość linii High Five w produkcji białek sekrecyjnych i VLPs (Krammer i in., 2010; Wilde i in., 2014). Dlatego, porównano poziom produkcji VLPs w dwóch owadzych liniach komórkowych: Sf9 i High Five. Obie linie zainfekowano rBV prME ZIKV (MOI 1) i przeprowadzono analizę ekspresji genu białka E oraz sekrecję tego białka do pożywki hodowlanej (**Rycina 17**). Produkcja białka E w obu liniach komórkowych przyrastała w czasie, jednakże tylko linia komórkowa Sf9 była zdolna do wydajnej sekrecji białka E. W lizatach komórkowych linii High Five zaobserwowano prążek na wysokości około 70 kDa, który odpowiada heterodimerowi białek prM i E, co może sugerować brak peptydazy sygnałowej w tych komórkach potrzebnej do obróbki proteolitycznej, co może zaburzyć składanie VLPs i ich sekrecję do pożywki. Kompleks białek prME został również zaobserwowany w 5 dniu produkcji VLPs w pożywce z komórek Sf9. Szczyt lizy komórek owadzych przez bakulowirusy przypada na 3-5 infekcji, co może doprowadzić do uwolnienia z komórki innych białek. Ponadto, zbyt wysoka ekspresja białek prME może doprowadzić do niewydajnego działania peptydaz. Powyższe wyniki wskazują jednoznacznie linię Sf9 jako najbardziej optymalną do produkcji VLPs wirusa Zika.



**Rycina 17. Porównanie produkcji i sekrecji VLPs wirusa Zika w liniach komórkowych Sf9 i High Five.** Poziom białka E w lizatach komórkowych linii Sf9 i High Five (A) i pożywce hodowlanej (B). Komórki i pożywka były zbierane 48-120 h po infekcji (h p.i.) rBV prME ZIKV (MOI 1). Przygotowano lizaty komórkowe oraz precypitowano białka za pomocą PEG 6000. Następnie, białka rozdzielono w żelu SDS-PAGE w warunkach redukujących i wykonano western blotting z przeciwciałami anti-DIII.

Niedawne badania pokazały możliwość manipulacji produktywnością BEVS przez celowaną w specyficzne szlaki metaboliczne suplementację (Monteiro i in., 2014, 2016). Dwa związki miały największy wpływ na produkcję białek rekombinowanych oraz na wzrost i żywotność komórek owadzych: poliaminy i cholesterol. Są one potrzebne w cyklu replikacyjnym wirusa Zika (Mounce i in., 2016; Osuna-Ramos, Reyes-Ruiz i del Ángel, 2018; Vasireddi i in., 2019). Dlatego w drugim etapie optymalizacji produkcji przetestowano wpływ suplementacji pożywki poliaminami oraz cholesterolem na sekrecję VLPs. Hodowle zainfekowanych rBV prME ZIKV komórek Sf9 traktowano roztworem poliamin lub cholesterolu oraz oboma związkami jednocześnie. Żywotność i proliferacja komórek w porównaniu z komórkami nietraktowanymi suplementami oscylowała na poziomie 90-95% (**Rycina 18 A**). Zaobserwowano największy spadek żywotności w przypadku traktowania cholesterolem lub kombinacją suplementów, szczególnie w trzecim dniu infekcji. W kolejnych dniach infekcji żywotność komórek wzrosła. Poziom białka E wzrósł w wyniku suplementacji zarówno cholesterolem jak i poliaminami, szczególnie w dniu trzecim (**Rycina 18 B**). Jednakże, największy wpływ na sekrecję białka E i prM miała kombinacja obu suplementów. Ponadto, zaobserwowano zwiększony poziom dimerów i oligomerów białka E. Barwienie CBB potwierdziło zwiększony poziom białka E w pożywce w wyniku suplementacji (**Rycina 18 C**).



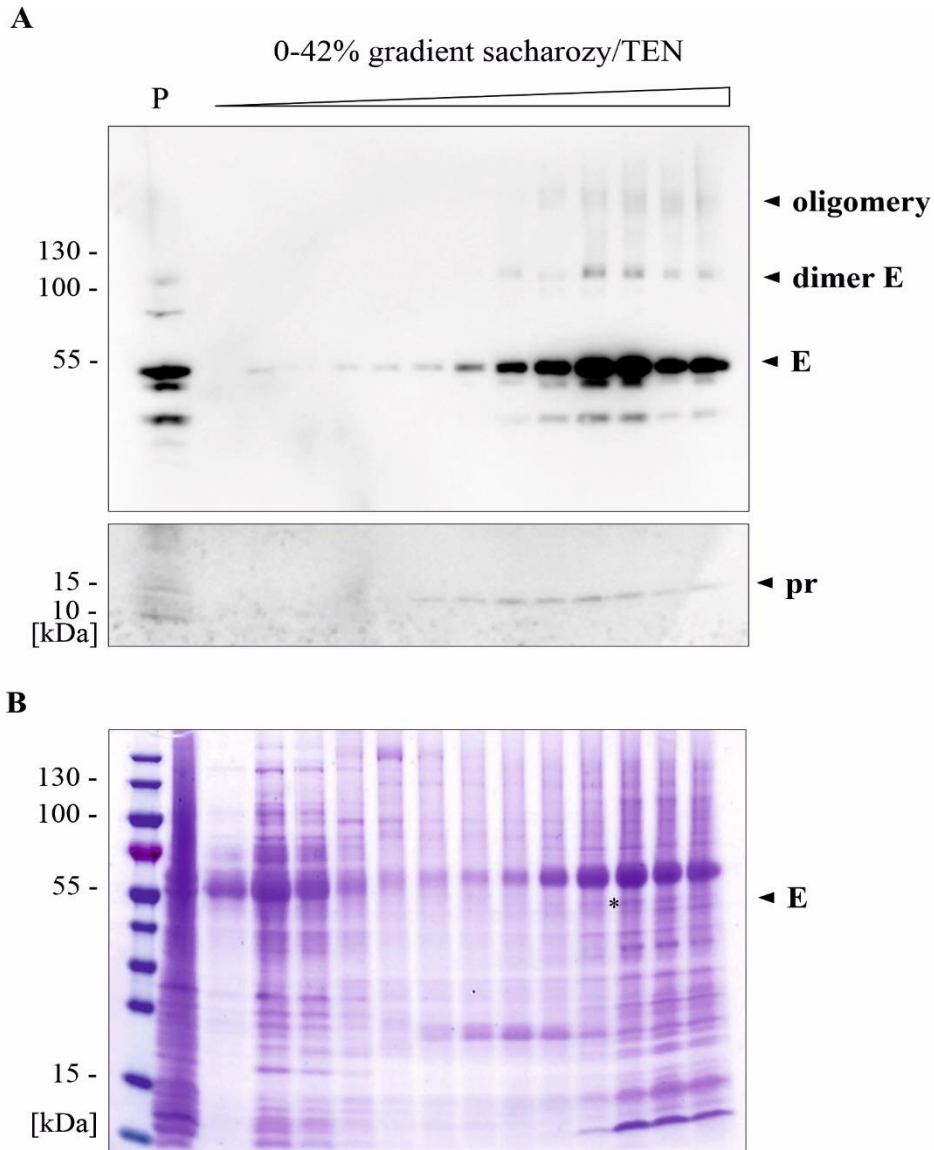


**Rycina 18. Wpływ suplementacji poliaminami, cholesterolem lub kombinacją obu związków na produkcję VLPs wirusa Zika.** Hodowle zainfekowanych rBV prME (MOI 1) ZIKV komórek Sf9 traktowano roztworem poliamin (PA) lub cholesterolu (CH) oraz oboma związkami jednocześnie (CH/PA). Żywotność traktowanych, zainfekowanych komórek w porównaniu do nietraktowanych, zainfekowanych komórek (-) określona za pomocą odczynnika PrestoBlue Cell Viability reagent (A). Słupki błędów wskazują odchylenia standardowe. Immunoblotting białka E i prM w pożywce hodowlanej za pomocą przeciwciał 4G2 i anty-prM/M rozdzielonych w 4-20% żelu SDS-PAGE w warunkach nieredukujących (B). Barwienie CBB białek z pożywki hodowlanej rozdzielonych w 10% żelu SDS-PAGE w warunkach redukujących (C).

Biorąc pod uwagę powyższe wyniki, do dalszych analiz VLPs wirusa Zika produkowano w linii komórek Sf9 infekowanych rBV prME ZIKV przy MOI 1,

suplementowanych kombinacją cholesterolu i poliamin. Pożywkę zawierającą cząstki zbierano po 3 dniach od infekcji.

Następnie, wykonano ultrawierowanie w gradiencie gęstości sacharozy podobnie jak w przypadku VLPs otrzymanych w komórkach ssaczych. Największą zawartość białka E wraz oligomerami wykryto we frakcji 36% (~ 1.15 g/cm<sup>3</sup>), mniejsze ilości były zaobserwowane we frakcjach 30% i 42% (**Rycina 19 A**). We frakcjach tych nie wykryto białka M, natomiast wykryto fragment pr. Ponadto, we frakcji 24% wykryto niewielkie ilości obu białek E i fragmentu pr. We frakcjach z największą ilością białek zaobserwowano inne formy poniżej monomeru białka E, które mogą odpowiadać formie białka pozbawionej glikanów lub być wynikiem obróbki proteolitycznej. Barwienie CBB wykryło monomer białka E we frakcji 36% (**Rycina 19 B**).

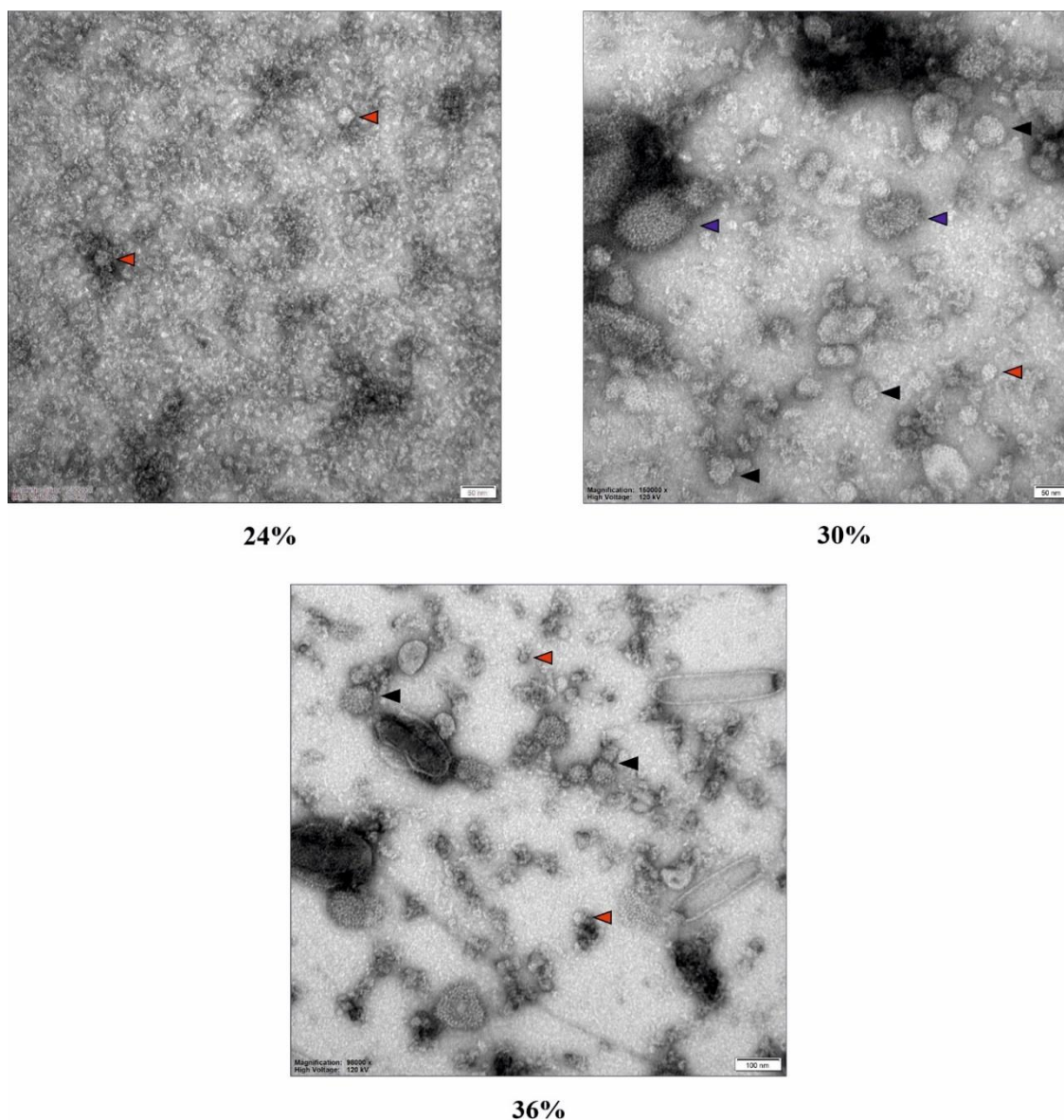


**Rycina 19. Ultrawierowanie VLPs w gradiencie sacharozy.** Pożywkę hodowlaną poddano wstępnej filtracji, pelletowaniu, a następnie zawieszony pellet poddano ultrawierowaniu w nieciągłym gradiencie roztworów sacharozy (0-42% [w/w] sacharozy/bufor TEN). Następnie,



białka z zebranych frakcji (14 frakcji, po 2 frakcje na dane stężenie sacharozy) rozdzielono w żelu SDS-PAGE w warunkach nieredukujących i wykonano western blotting z przeciwciałami anti-DIII i anti-prM (A). Barwienie CBB białek w zebranych frakcjach po rozdziale elektroforetycznym w warunkach redukujących (B).

W dalszym etapie przeprowadzono obserwacje TEM VLPs w wybranych frakcjach (24%, 30% i 36%) (Rycina 20). We frakcji 24% zaobserwowano tylko pojedyncze cząstki wirusopodobne, natomiast frakcje 30% i 36% stanowią mieszaninę VLPs, struktur peplomerycznych (oligomeryczne struktury złożone z białek wirusowych np. białka gp64 AcNPV) oraz wirionów bakulowirusowych.



**Rycina 20.** Obserwacja VLPs w wybranych frakcjach za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej po barwieniu negatywowym octanem uranylu. Przedstawiono reprezentatywne obrazy dla poszczególnych frakcji; pasek skali 50 nm lub 100 nm; czerwony trójkąt – VLPs o średnicy ~25 nm, czarny trójkąt – VLPs o średnicy ~50 nm, niebieski trójkąt – bakulowirusowe struktury peplomeryczne.

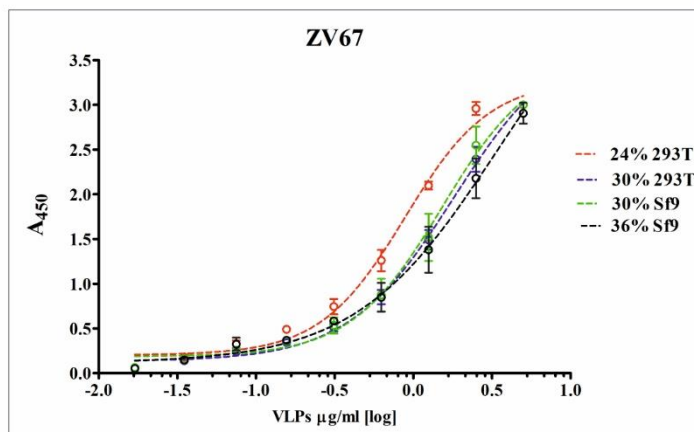
### 8.2.3. Porównawcza analiza determinant antygenowych VLPs

#### *otrzymanych w komórkach 293T i komórkach Sf9*

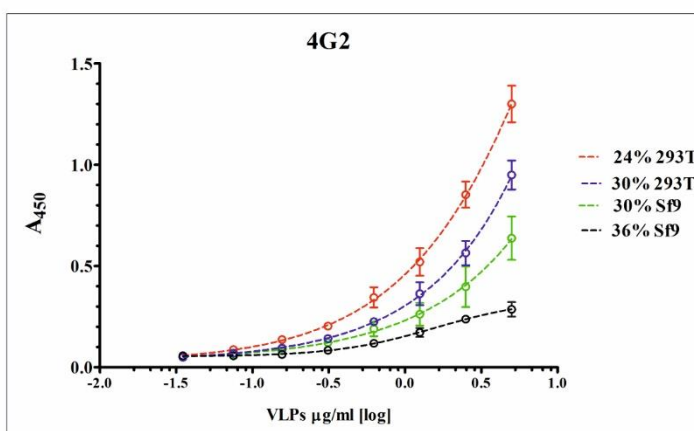
Powyższe wyniki wykazały różnice w składzie białkowym oraz gęstości VLPs wirusa Zika otrzymanych w komórkach 293T i komórkach Sf9. W związku z tym przeprowadzono analizę porównawczą determinant antygenowych cząstek tj. ekspozycji na powierzchni specyficznych epitopów w białku E, profilu glikozylacji oraz wiązaniu do receptorów lektynowych. Do badań wybrano VLPs zatrzymujące się w 24 i 30% (system komórek ssaczych 293T) oraz 30 i 36% (system komórek owadzych Sf9), ze względu na największą zawartość białka E i cząstek.

W pierwszym etapie przeprowadzono miareczkowanie VLPs używając dwóch przeciwciał przeciwko epitopom LR oraz FL w białku E - ZV67 i 4G2. Jak wspomniano już w rozdziale 4.1.10, epitop LR znajdujący się w DIII jest dobrze eksponowany na powierzchni dojrzałych wirionów, z kolei epitop FL w DII jest częściowo schowany w dojrzałych cząstkach, a może być lepiej eksponowany w konformacji trimerycznej białka E. Stąd miareczkowanie VLPs za pomocą przeciwciał skierowanych do tych dwóch epitopów może pozwolić pośrednio ocenić zawartość dojrzałych VLPs z dimeryczną konformacją białka E oraz VLPs z trimeryczną formą E (fuzyjną). **Rycina 21 (A i B)** przedstawia wyniki miareczkowania. VLPs z każdej frakcji były rozpoznane przez oba przeciwciała, jednakże większe sygnały uzyskano dla przeciwciała ZV67, co sugeruje przewagę dojrzałych form VLPs w analizowanych frakcjach. Oba przeciwciała wykazały większe wiązanie do VLPs z komórek 293T (frakcja 24%) w rozcieńczeniu 1.25 µg/ml w porównaniu do pozostałych analizowanych VLPs, co sugeruje większą zawartość obu form VLPs – formy dojrzałej i fuzyjnej (**Rycina 21 C**).

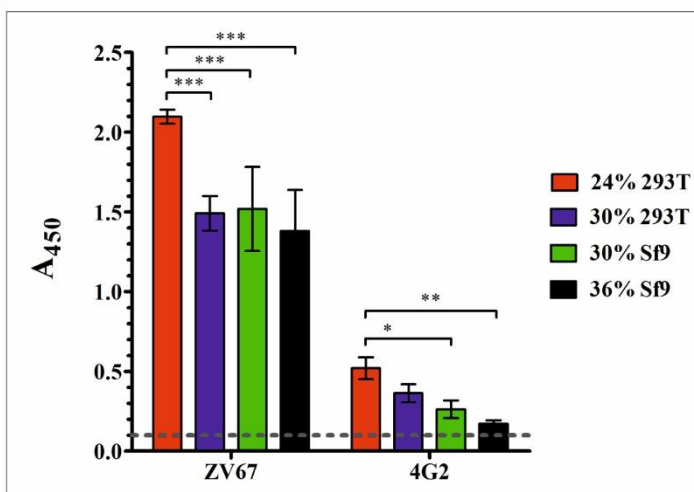
A



B



C



Rycina 21. Miareczkowanie VLPs otrzymanych w komórkach 293T (frakcja 24% i 30%) i komórkach Sf9 (frakcja 30% i 36%) za pomocą przeciwciała ZV67 (A) i 4G2 (B) w teście ELISA. Porównanie wiązania przeciwciał ZV67 i 4G2 do VLPs dla rozcieńczenia 1.25 µg/ml (C). Słupki błędów wskazują odchylenia standardowe. Analizę statystyczną przeprowadzono z użyciem dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z korekcją Bonferroniego;  $p < 0.001$ : \*\*\*,  $p < 0.01$ : \*\*,  $p < 0.05$ : \*.

W celu uzyskania jakościowego porównania prezentacji antygenowych determinant wykorzystano profil wiązania do przeciwciała ZV67 jako punkt odniesienia. Miało to na celu zredukować ilościowe różnice między analizowanymi frakcjami VLPs. Tak więc, do kolejnych analiz antygenowości posłużono się wynikami miareczkowania wobec przeciwciała ZV67 i obliczono wartości rozcieńczeń cząstek z poszczególnych frakcji, tak żeby uzyskać taki sam wysoki sygnał absorbancji z fazy liniowej krzywej ( $A=2$  U) (**Tabela 8**). Obliczenia wykonano wg regresji nieliniowej modelu czteroparametrowej logistycznej krzywej w programie GraphPad Prism.

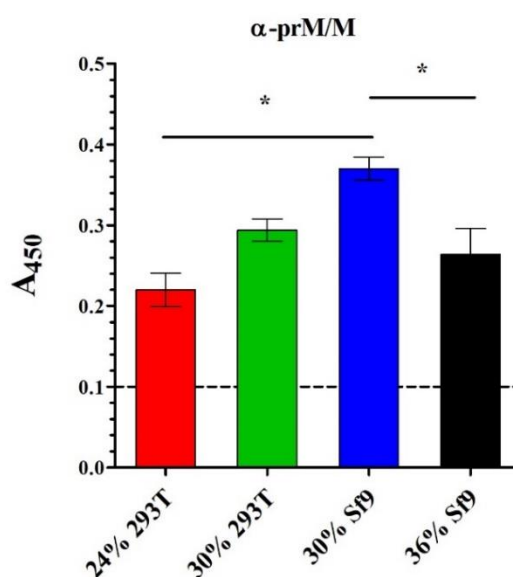
**Tabela 8. Wartości rozcieńczeń VLPs z poszczególnych frakcji wykazujące  $A_{450} = \sim 2$  dla przeciwciała ZV67**

Frakcja VLPs	Rozcieńczenie - stężenia białka [ $\mu\text{g/ml}$ ]
24% 293T	1.12
30% 293T	1.69
30% Sf9	1.82
36% Sf9	2.04

Badanie ekspozycji specyficznych epitopów na powierzchni VLPs wykonano z użyciem poliklonalnych przeciwciał do prM/M oraz trzech paneli przeciwciał specyficznych odpowiednio do epitopów w DI/DII i DIII białka E oraz epitopów EDE w teście ELISA.

Analiza western blotting wykazała obecność białka M tylko w VLPs pochodzących z komórek 293T i fragmentu pr w cząstkach otrzymanych w komórkach Sf9, co może wskazywać na różnice w procesie dojrzewania lub wyjścia z komórki (**Rycina 14**, **Rycina 19**). Dlatego, sprawdzono również w warunkach natywnych wiązanie przeciwciała anti-prM/M do uzyskanych VLPs. Jako, że białko M jest małym białkiem transmembranowym i w strukturze dojrzałego wirionu znajduje się pod dimerem E, założono, że sygnały pozytywne będą pochodną oddziaływań z białkiem prM lub fragmentem pr. Test wykazał słabe wiązanie przeciwciał anti-prM/M do wszystkich VLPs, z niewielkimi różnicami (**Rycina 22**). Największy sygnał zaobserwowano dla VLPs frakcji 30% z komórek Sf9. Uzyskane niskie sygnały dla VLPs pochodzących z komórek ssaczych są zgodne z wcześniejszymi analizami, gdzie obserwowano tylko

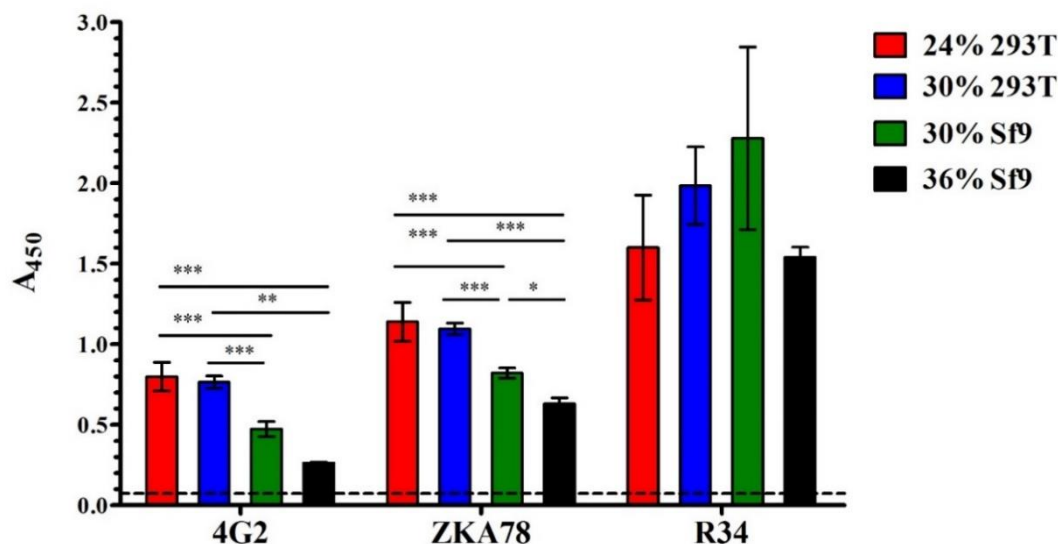
białko M. Natomiast w przypadku VLPs z komórek owadzych, spodziewano się silniejszego oddziaływania, gdyż wcześniej wykryto obecność tylko fragmentu pr we frakcjach zebranych po ultrawirowaniu. Sugeruje to brak oddysocjowania fragmentu pr od cząstek w trakcie sekrecji z komórek owadzych. Jednakże, dalsza obróbka przygotowawcza preparatów do analizy determinant antygenów, szczególnie wykorzystanie ultrafiltracji do zagęszczenia prób oraz wymiany buforu mogła spowodować odczepienie się fragmentu pr. Mimo to, uzyskane wyniki mogą sugerować obecność niewielkiej populacji niedojrzałych lub częściowo-dojrzałych VLPs, szczególnie we frakcji 30% z komórek Sf9.



**Rycina 22. Wiązanie przeciwciał anti-prM VLPs otrzymanych w komórkach 293T i Sf9.** Słupki błędów wskazują odchylenia standardowe. Analizę statystyczną przeprowadzono z użyciem jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z korekcją Bonferroni;  $p < 0.05$ : \*. Linia przerywana – wartość progowa testu ( $A_{450}=0.1$ ).

Następnie, zbadano ekspozycję epitopów w obrębie domeny I i II białka E. Analizowano wiązanie trzech przeciwciał: 4G2 (opisane wcześniej), ZKA78 - specyficznych do epitopu między DI i DII oraz R34 - specyficznych do pętli glikozylacji „150” w DI (**Rycina 23**). Przeciwciała 4G2 i ZKA78 wykazały podobny profil wiązania do poszczególnych frakcji. Najsilniej zostały rozpoznane VLPs z komórek 293T. Najsłabsze wiązanie do obu tych przeciwciał zaobserwowano dla cząstek frakcji 36% z komórek Sf9. R34 silnie związało wszystkie analizowane VLPs, jednakże różnice w średnich sygnałach między nimi były statystycznie nieistotne. Wyniki te wskazują na wysoką ekspozycję pętli „150” na powierzchni VLPs otrzymanych w obu systemach, co

jest zgodne z danymi strukturalnymi wirionów. Ze względu na wyrównanie ilościowe poziomu analizowanych VLPs, uzyskane wyniki wskazują na różnice w konformacji DII białka E między VLPs otrzymanych w komórkach ssaczych oraz komórkach owadzych.

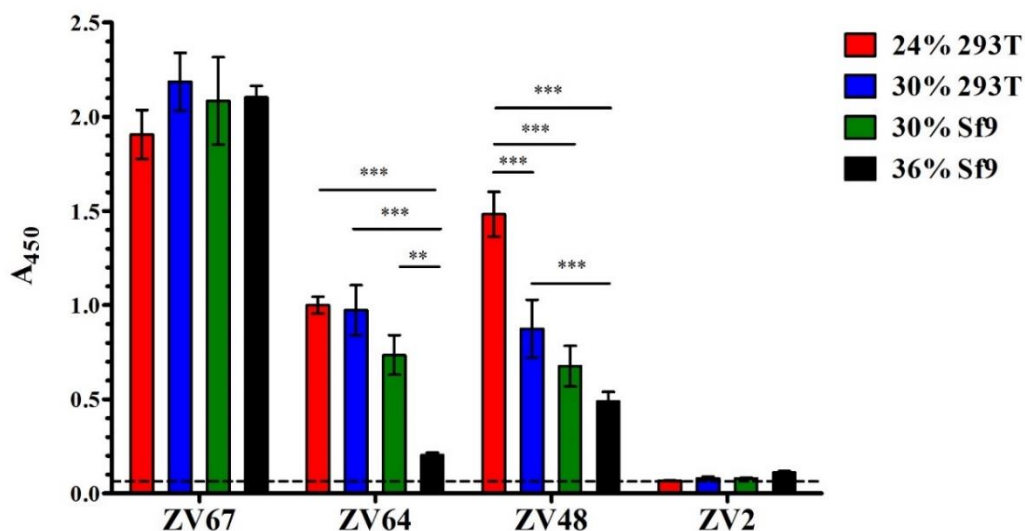


**Rycina 23.** Wiązanie przeciwciał 4G2, ZKA78 oraz R34 skierowanych do różnych epitopów w DI i DII białka E do VLPs otrzymanych w komórkach 293T i Sf9. Słupki błędów wskazują odchylenie standardowe. Analizę statystyczną przeprowadzono z użyciem jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z korekcją Bonferroni;  $p < 0.001$ : \*\*\*,  $p < 0.01$ : \*\*,  $p < 0.05$ : \*. Linia przerywana – wartość progowa testu ( $A_{450}=0.15$ ).

Kolejny panel przeciwciał obejmował 4 przeciwciała: ZV67 (epitop LR), ZV64 (pętla C-C'), ZV48 (pętla C-C') i ZV2 (epitop ABDE) (Rycina 24) (Zhao i in., 2016). Oba przeciwciała ZV64 i ZV48 wiążą się do pętli C-C' z podobnym powinowactwem, jednak różnią się czasem półtrwania. ZV67, ZV64 i ZV48 neutralizują wirusa Zika, z czego ZV67 ma największy potencjał i powinowactwo do cząstki wirusowej. Pętla C-C' w dojrzałej cząstce wirusowej jest częściowo przysłonięta, gdyż pełni rolę w kontakcie homodimerycznym białka E, stąd jej ekspozycja wymaga reorganizacji przestrzennej wirionu. Natomiast, epitop ABDE jest przysłonięty w dojrzałej cząstce wirusowej oraz rekombinowanej ektodomenie białka E. Z tego powodu wykazuje minimalną aktywność neutralizującą. Z powodu użycia zmiareczkowanych ilości VLPs uzyskano najwyższe sygnały dla ZV67 we wszystkich analizowanych frakcjach, bez istotnych różnic. Zaobserwowano podobny profil wiązania przeciwciał ZV64 i ZV48 do poszczególnych frakcji VLPs jak w przypadku przeciwciała 4G2 oraz ZKA78, tj. słabsze wiązanie VLPs wyprodukowanych w komórkach Sf9. Przeciwciało ZV2 nie wykazało wiązania do analizowanych VLPs, co jest zgodne z ich

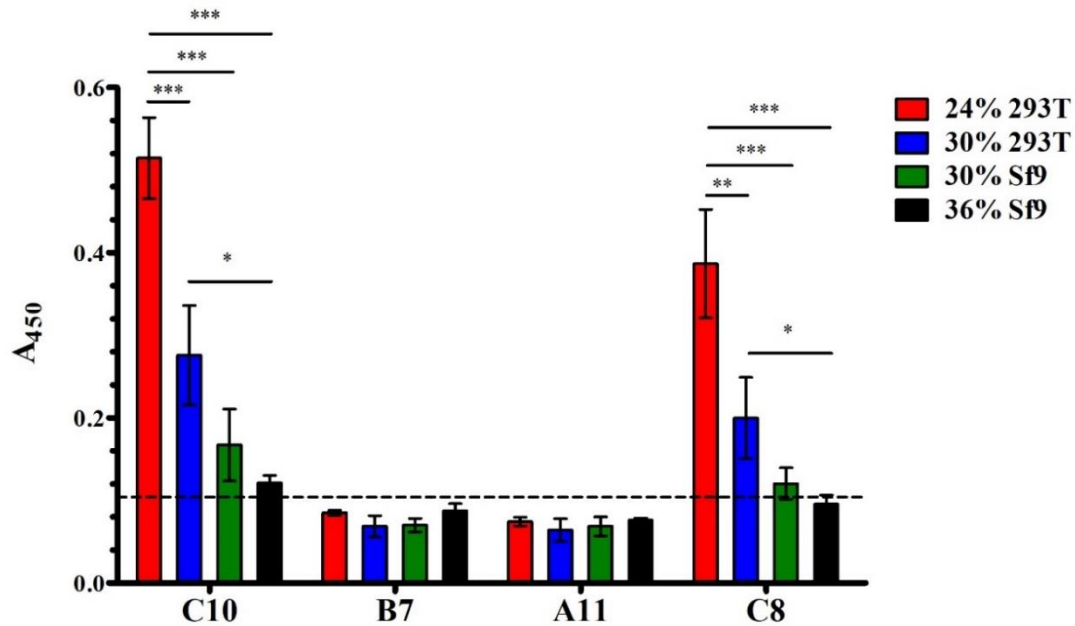


powinowactwem do wirionów. Wyniki te pokazują silniejszą ekspozycję epitopów w domenie III białka E w przypadku VLPs wyprodukowanych w komórkach 293T.



**Rycina 24.** Wiązanie panelu przeciwciał (ZV67, ZV64, ZV48 i ZV2) przeciwko różnym epitopom w DIII białka E do VLPs otrzymanych w komórkach 293T i Sf9. Słupki błędów wskazują odchylenia standardowe. Analizę statystyczną przeprowadzono z użyciem jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z korekcją Bonferroniego;  $p < 0.001$ : \*\*\*,  $p < 0.01$ : \*\*,  $p < 0.05$ : \*. Linia przerywana – wartość progowa testu ( $A_{450}=0.16$ ).

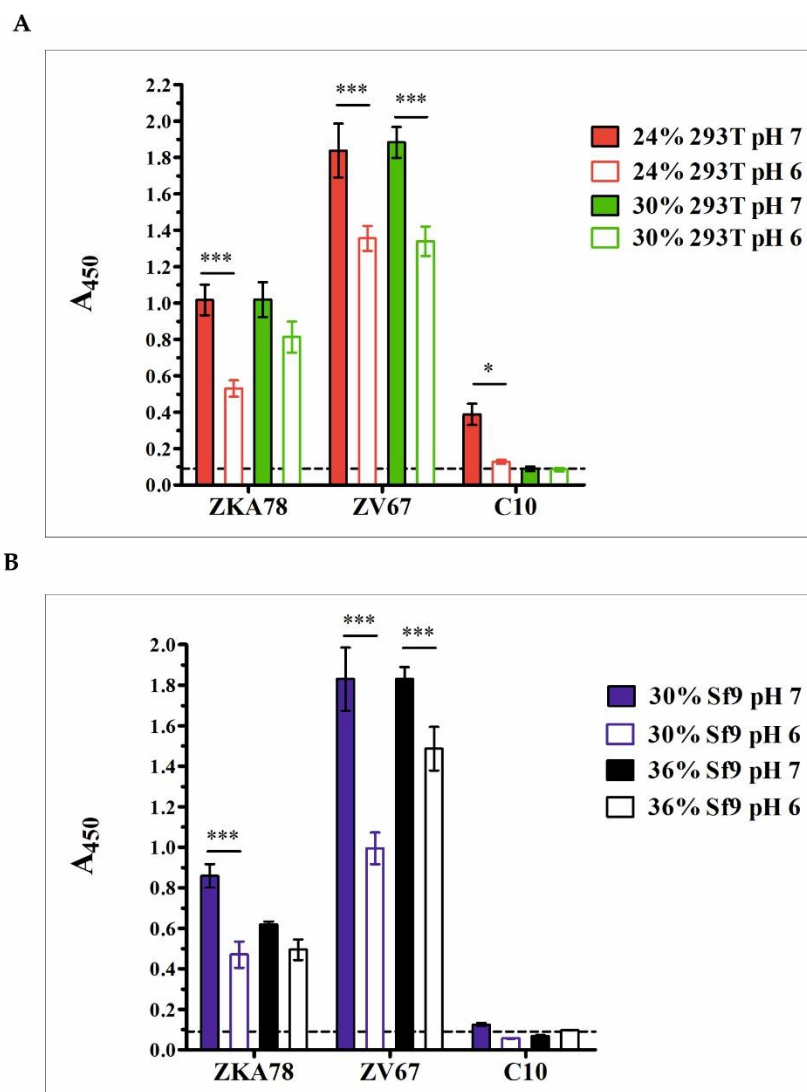
Ostatni panel przeciwciał obejmował cztery ludzkie przeciwciała skierowane do czwartorzędowych epitopów w dimerach białka E (C10, B7, A11 i C8) (Barba-Spaeth i in., 2016). Dwa z nich – C10 i C8 wiążą tzw. epitop EDE1, a B7 i A11 epitop EDE2. **Rycina 25** przedstawia wyniki analizy wiązania tych przeciwciał do VLPs. Tylko dwa przeciwciała C10 i C8 związały się z VLPs, jednakże uzyskane sygnały są stosunkowo niskie w porównaniu z sygnałami dla przeciwciał do DIII. Najsilniejsze wiązanie obu przeciwciał zaobserwowano ponownie z VLPs pochodzącymi z komórek 293T. Uzyskane wyniki sugerują ekspozycję tylko epitopu EDE1 na powierzchni VLPs, jednakże powinowactwo przeciwciał do tego epitopu na VLPs może być niskie.



**Rycina 25.** Wiązanie panelu przeciwciał (C10, B7, A11 i C8) przeciwko epitopom EDE1 i EDE2 do VLPs otrzymanych w komórkach 293T i Sf9. Słupki błędów wskazują odchylenia standardowe. Analizę statystyczną przeprowadzono z użyciem jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z korekcją Bonferroniego;  $p < 0.001$ : \*\*\*,  $p < 0.01$ : \*\*,  $p < 0.05$ : \*. Linia przerywana – wartość progowa testu ( $A_{450}=0.26$ ).

Jako że, wiriony ulegają nieodwracalnym zmianom konformacyjnym w środowisku o niskim pH, w kolejnym kroku sprawdzono wiązanie wybranych przeciwciał do DI/II, DIII oraz EDE1 po ekspozycji VLPs na pH 6. Zaobserwowano znaczną redukcję wiązania przeciwciała ZKA78 do VLPs frakcji o niższych gęstościach po inkubacji w niższym pH (**Rycina 26 A i B**). Nastąpiła, również redukcja wiązania przeciwciała ZV67 do wszystkich VLPs po zmianie pH. Dodatkowo zmiana odczynu środowiska zahamowała wiązanie przeciwciała C10 do VLPs wyprodukowanych w komórkach 293T. Wyniki te sugerują zmianę konformacji białka E w warunkach niskiego pH lub agregację cząstek.

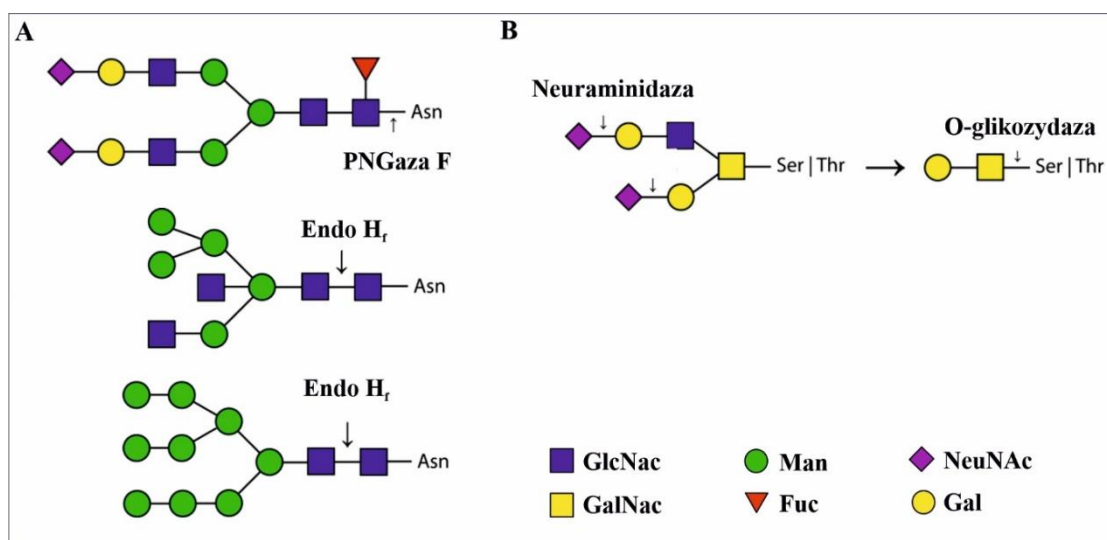




**Rycina 26.** Wpływ pH na wiązanie przeciwciał ZKA78, ZV67 oraz C10 do VLPs wyprodukowanych w komórkach 293T (A) oraz Sf9 (B). VLPs inkubowano 30 min w buforze PBS o pH 7 lub 6, a następnie rozcieńczono buforem PBS o pH 7 i wykonano test ELISA. Słupki błędów wskazują odchylenia standardowe. Analizę statystyczną przeprowadzono z użyciem jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z korekcją Bonferroniego;  $p < 0.001$ : \*\*\*,  $p < 0.05$ : \*. Linia przerywana – wartość progowa testu ( $A_{450}=0.09$ ).

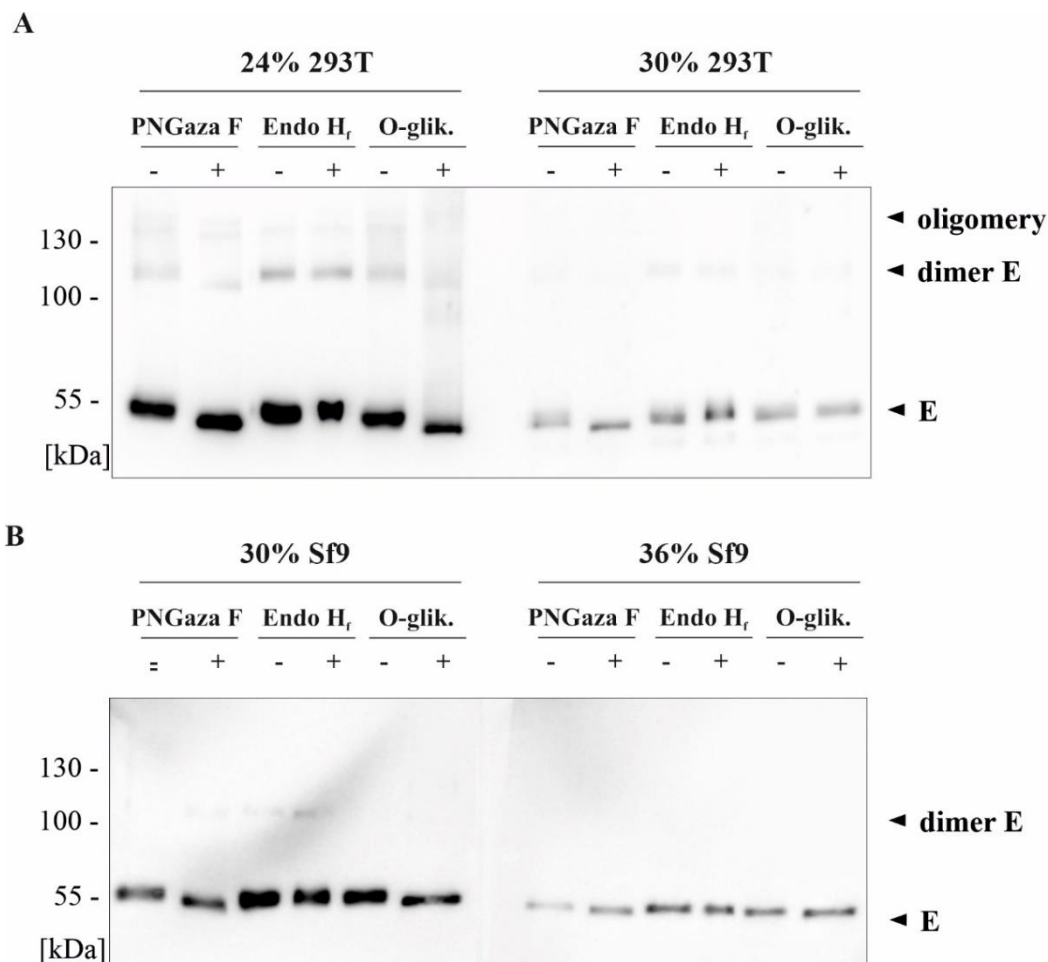
Następnie, analizowano profil glikozylacji uzyskanych VLPs. Analiza bioinformatyczna sekwencji aminokwasowej białek prM i E z wykorzystaniem programu do prognozowania obecności N-glikanów (NetNGlyc) potwierdziła obecność 1 miejsca N-glikozylacji w białku prM oraz 1 w białku E. Natomiast, analiza z wykorzystaniem programu do przewidywania obecności O-glikozylacji białek (NetOGlyc) wskazała 5 potencjalnych miejsc zlokalizowanych w domenie III białka E. Dlatego, zbadano eksperymentalnie obecność obu rodzajów glikanów na glikoproteinie E za pomocą

specyficznych glikozydaz: PNGazy F, Endo H<sub>f</sub> oraz O-glikozydazy. Glikozydaza PNGaza F odcina wszystkie typy N-glikanów, natomiast Endo H<sub>f</sub> – hybrydowe i oligomannozowe (**Rycina 27 A**). O-glikozydaza odcina O-glikany typu Core 1 i Core 3 oraz ich modyfikacje, jednakże jej działanie jest możliwe tylko w przypadku braku kwasu sialowego (NeuNac) (**Rycina 27 B**), dlatego w reakcji używano też neuraminidazy odcinającej kwas sialowy połączony wiązaniem  $\alpha$ 2-3,  $\alpha$ 2-6, i  $\alpha$ 2-8.



**Rycina 27. Schemat działania glikozydaz specyficznych do N-glikanów - PNGazy F i Endo H<sub>f</sub> (A) i O-glikanów - O-glikozydazy (B).** GlcNac – N-acetyloglukozamina, Man – mannoza, NeuNac – kwas sialowy, GalNac – N-acetylogalaktozamina, Fuc – fukoza, Gal – galaktoza

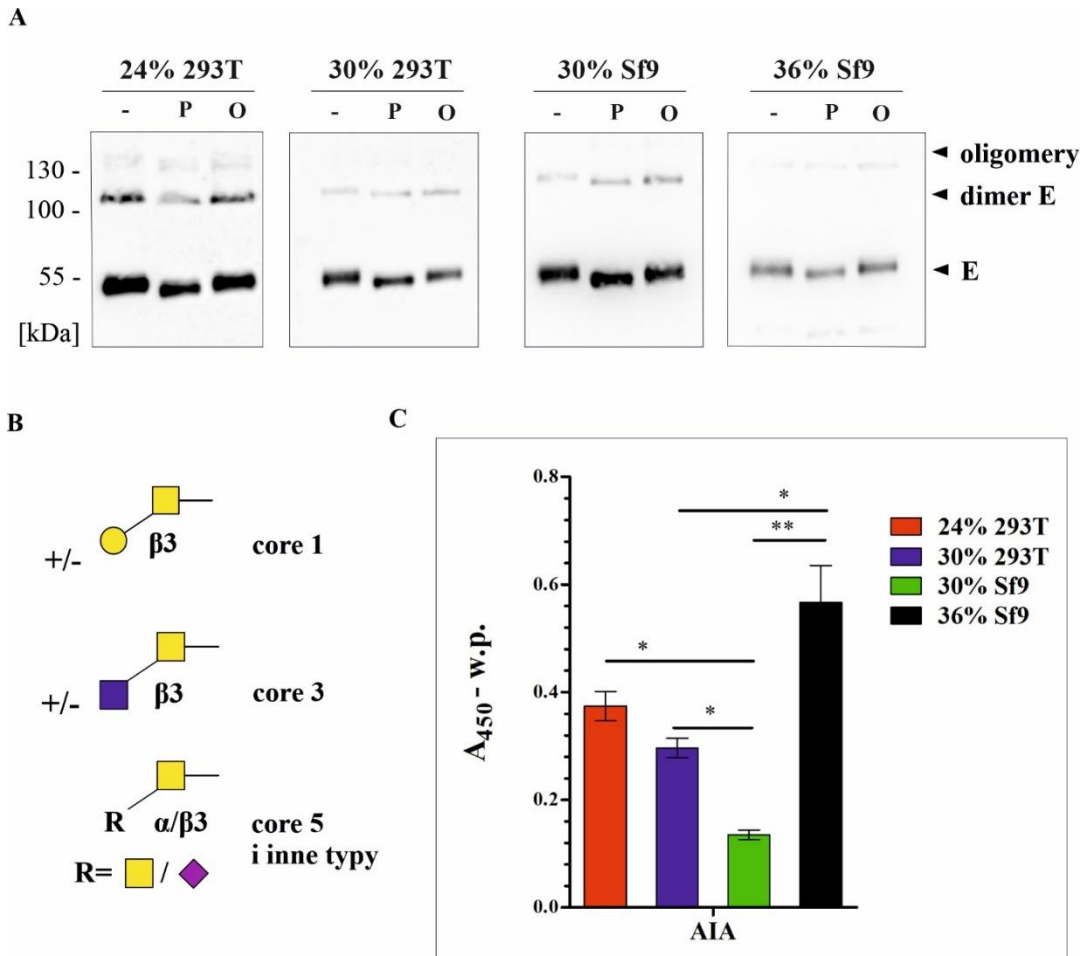
Reakcje enzymatyczne poszczególnych frakcji VLPs z komórek ssaczych i owadziach przeprowadzono w warunkach denaturujących, a następnie analizowano profil migracji białka E w żelu SDS-PAGE (**Rycina 28**). W przypadku cząstek otrzymanych w komórkach 293T, zaobserwowano znaczną zmianę migracji monomeru białka E, jak również dimeru w przypadku trawienia PNGazą F i O-glikozydazą we frakcji 24% (**Rycina 28 A**). We frakcji 30% wykryto tylko zmianę migracji po trawieniu PNGazą F. W przypadku VLPs z komórek Sf9 zaobserwowano zmianę migracji monomeru białka E w obu frakcjach po traktowaniu PNGazą F i O-glikozydazą (**Rycina 28 B**). VLPs z obu systemów były niewrażliwe na działanie Endo H<sub>f</sub>. Wyniki te potwierdzają N-glikozylację glikoproteiny E w VLPs wyprodukowanych w obu systemach. Ponadto, pokazano obecność O-glikozylacji białka E wirusa Zika w VLPs.



**Rycina 28.** *N*- i *O*-glikozylacja glikoproteiny *E* w poszczególnych frakcjach VLPs otrzymanych w komórkach 293T (A) oraz komórkach Sf9 (B). Reakcje enzymatyczne poszczególnych frakcji VLPs przeprowadzono w warunkach denaturujących, a następnie analizowano profil migracji białka *E* w żelu SDS-PAGE w warunkach redukujących. Western blotting przeprowadzono z użyciem przeciwciała *anti-DIII*. *O*-glik. – *O*-glikozydaza.

Aby ocenić czy oba typy reszt cukrowych są ekspozowane na powierzchni VLPs przeprowadzono ponownie reakcje enzymatyczne z użyciem PNGazy F i *O*-glikozydazy, tym razem w warunkach natywnych (**Rycina 29 A**). Zaobserwowano zmianę migracji monomeru i dimeru białka *E* tylko po traktowaniu PNGazą F we wszystkich frakcjach VLPs. W przypadku formy dimerycznej, po traktowaniu *O*-glikozydazą zmiana profilu migracji była niewielka, jednak miejsca cięć dla *O*-glikozydazy mogą być niedostępne w formie natywnej VLPs. Dlatego, przeprowadzono również detekcję *O*-glikanów na powierzchni VLPs za pomocą dżakaliny (AIA) w teście ELISA. AIA jest to lektyna specyficzna tylko do *O*-glikanów, dokładniej Gal $\beta$ 1–3GalNac $\alpha$ , wiążąca reszty cukrowe również w obecności kwasu sialowego (**Rycina 29 B**). Analiza potwierdziła obecność *O*-glikanów na powierzchni VLPs (**Rycina 29 C**). Najsilniejszą interakcję z lektyną

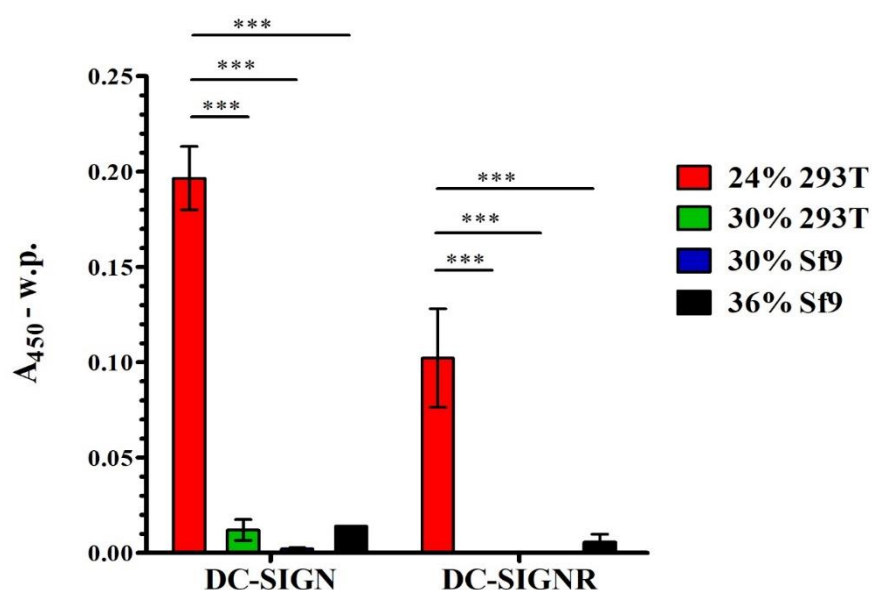
zaobserwowano dla frakcji 36% z komórek Sf9, natomiast najslabszą dla frakcji 30% z komórek 293T. Frakcja VLPs 24% 293T oraz 30% Sf9 wykazała pośrednie wiązanie do AIA. Test potwierdził obecność O-glikanów na powierzchni VLPs wyprodukowanych w komórkach ssaczych jak i owadzych. Jednakże, zaobserwowane dysproporcje w wiązaniu VLPs do AIA, mogą być rezultatem różnych ilości O-glikozyłowanych reszt S/T czy poziomem rozgałęzienia łańcuchów cukrowych.



**Rycina 29.** N- i O-glikozylacja na powierzchni glikoproteiny E w poszczególnych frakcjach VLPs otrzymanych w komórkach 293T oraz komórkach Sf9. Profil migracji białka E po traktowaniu PNGazą F (P) lub O-glikozydazą (O) w warunkach natywnych (A). Reakcje enzymatyczne poszczególnych frakcji VLPs przeprowadzono w warunkach natywnych, a następnie analizowano profil migracji białka E w żelu SDS-PAGE w warunkach redukujących. Western blotting przeprowadzono z użyciem przeciwciała anti-DIII. **Struktury cukrowe O-glikanów wiązane przez lektynę AIA (B).** **Wiązanie VLPs do AIA w teście ELISA (C).** Płytkę opłaszczano AIA, następnie inkubowano z VLPs, które wykrywano za pomocą przeciwciał ZV67. Wykres przedstawia znormalizowany sygnał absorbancji przez odjęcie od uzyskanych wartości  $A_{450}$  dla VLPs wartości progowej (w.p.) (wartość kontroli negatywnej - bez VLPs). Słupki błędów wskazują odchylenia standardowe. Analizę statystyczną przeprowadzono z użyciem jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z korekcją Bonferroniego;  $p < 0.01$ : \*\*,  $p < 0.05$ : \*.

Ponadto, zbadano wiązanie VLPs do rekombinowanych receptorów lektynowych DC-SIGN i jego homologu DC-SIGNR. Są to białka transmembranowe typu II wiążące reszty cukrowe - głównie oligomannozowe oraz reszty zawierające fukozę np. struktury typu Lewis (Gupta i Gupta, 2012). Aktywność obu receptorów jest zależna od jonów wapnia, stąd zalicza się je do rodziny receptorów lektynowych typu C. W analizie tej wykorzystano dostępne komercyjnie formy rekombinowane tych receptorów, które są białkami fuzyjnymi w połączeniu z domeną Fc ludzkiej immunoglobuliny 1. Przeprowadzony test ELISA z użyciem obu rekombinowanym receptorów wykazał najsilniejsze wiązanie VLPs frakcji 24% otrzymanych w komórkach 293T (

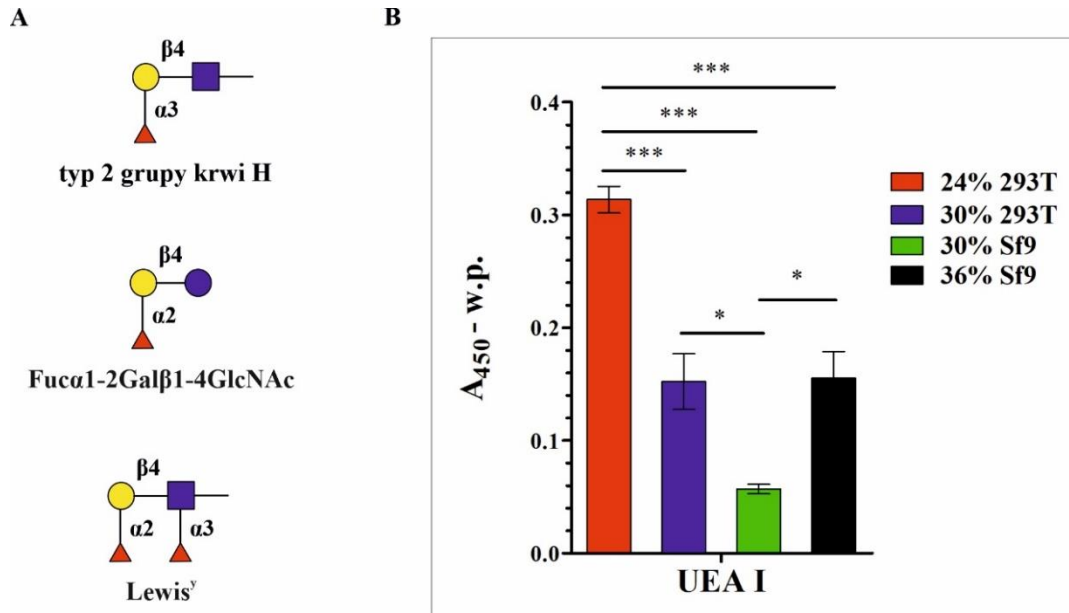
**Rycina 30**). Wiązanie do receptorów lektynowych może być wynikiem oddziaływań glikanów obecnych na glikoproteinie E. Jak również, może być rezultatem oddziaływań N-glikanu obecnego na białku prM, w niedojrzałych/ częściowo dojrzałych VLPs, które ze względu na czułość testu ELISA mogły być wykryte.



**Rycina 30. Wiązanie VLPs do receptorów lektynowych DC-SIGN i DC-SIGNR w teście ELISA.** Płytkę oplaszczano AIA, następnie inkubowano z VLPs, które wykrywano za pomocą przeciwciał ZV67. Wykres przedstawia znormalizowany sygnał absorbancji przez odjęcie od uzyskanych wartości  $A_{450}$  dla VLPs wartości progowej (w.p.) (wartość kontroli negatywnej - bez VLPs). Słupki błędów wskazują odchylenia standardowe. Analizę statystyczną przeprowadzono z użyciem jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z korekcją Bonferroniego;  $p < 0.001$ : \*\*\*.

Poprzednia analiza glikozylacji glikoproteiny E z użyciem Endo H<sub>f</sub> nie wykazała obecności hybrydowych/oligomannozowych reszt cukrowych, dlatego sprawdzono wiązanie VLPs do lektyny – UEA I specyficznej do fukozy połączonej wiązaniem typu  $\alpha$ , w tym do struktur typu Lewis<sup>y</sup>, wiązanych także przez DC-SIGN/DC-SIGNR (**Rycina**

**31 A).** Struktury te mogą występować zarówno na N- jak i O-glikanach. Frakcja 24% VLPs z komórek 293T wykazała najsilniejsze wiązanie z lektynami, a frakcja 30% z komórek Sf9 najsłabsze (**Rycina 31 B**). Obecność struktur wiązanych przez UEA I białka E lub białku prM w otrzymanych VLPs może być wyjaśnieniem różnic w wiązaniu z receptorami DC-SIGN/DC-SIGN R.



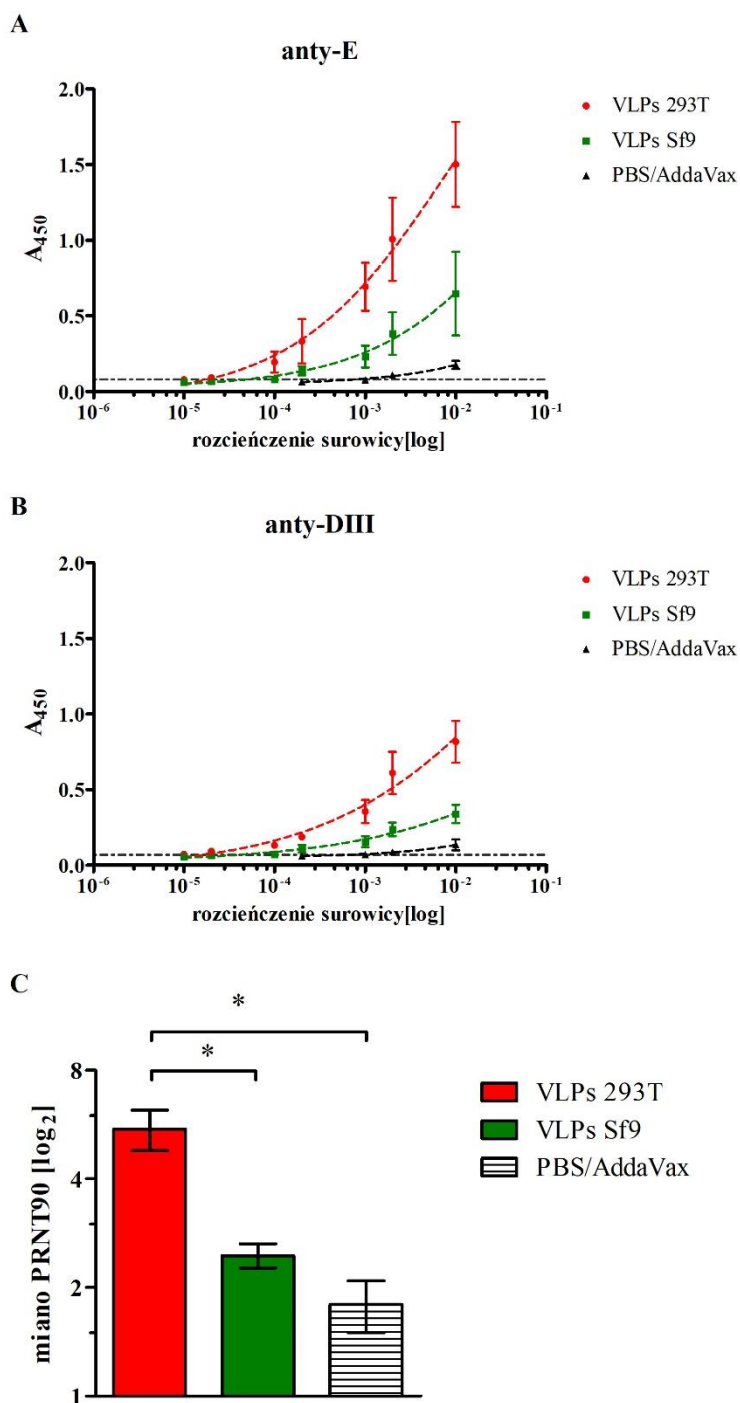
**Rycina 31.** Struktury cukrowe wiązane przez lektynę UEA I (A) oraz wiązanie VLPs do lektyny UEA I w teście ELISA (B). Płytkę opłaszczano A1A, następnie inkubowano z VLPs, które wykrywano za pomocą przeciwciał ZV67. Wykres przedstawia znormalizowany sygnał absorbancji przez odjęcie od uzyskanych wartości A<sub>450</sub> dla VLPs wartości progowej (w.p.) (wartość kontroli negatywnej - bez VLPs). Słupki błędów wskazują odchylenia standardowe. Analizę statystyczną przeprowadzono z użyciem jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z korekcją Bonferroniego;  $p < 0.001$ : \*\*\*,  $p < 0.05$ : \*.

#### 8.2.4. Immunogenność VLPs

Ostatni etap analizy porównawczej właściwości VLPs wirusa Zika otrzymanych w różnych systemach ekspresyjnych obejmował porównanie immunogenności w mysim modelu zwierzęcym. W tym celu oczyszczono VLPs za pomocą precypitacji PEG6000, chromatografią wykluczenia oraz ultrafiltracją. VLPs zmiareczkowano tak jak poprzednio przy użyciu przeciwciał ZV67. Dwie grupy myszy BALB/c ( $n = 6$ ) immunizowano drogą podskórną (ang. *subcutaneous*, *s.c.*), w odstępie dwóch tygodni, trzema dawkami F2A VLPs (25, 15, 10  $\mu\text{g}$  całkowitej zawartości białka) formułowanymi z adiuwantem AddaVax (nanoemulsja skwalenu, typu olej-w-wodzie, analog adiuwantu MF59, zatwierdzonego do użycia w szczepionkach), w stosunku objętościowym 1:1. Kontrolna grupa ( $n=3$ ) otrzymała bufor PBS z adiuwantem. Próbkę surowicy pobierano dwa tygodnie po każdej immunizacji i stosowano do oceny odpowiedzi przeciwciał.



Analizowano poziom przeciwciał do rekombinowanej ektodomenu E oraz domeny III za pomocą testu ELISA oraz aktywność neutralizującą ZIKV za pomocą testu PRNT (Rycina 32). Wszystkie testy wykazały większy poziom przeciwciał anti-E, anti-DIII oraz neutralizujących w surowicach poszczepiennych z grupy myszy zaszczepionej VLPs wyprodukowanych w komórkach 293T, w porównaniu z grupą myszy zaszczepioną cząstkami wyprodukowanymi w komórkach Sf9.



**Rycina 32. Porównywanie immunogenności VLPs wyprodukowanych w komórkach 293T oraz Sf9. Analiza poziomu przeciwciał przeciwko ektodomenie E (anty-E) (A) oraz domenie III (anty-DIII) (B) w surowicach za pomocą testu ELISA. Analiza miana przeciwciał neutralizujących do ZIKV (H/PAN/2016/BEI-259634) w surowicach poszczepiennych za pomocą testu PRNT (C). Słupki błędów wskazują odchylenia standardowe. Analizę statystyczną przeprowadzono z użyciem jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z korekcją Bonferroniego;  $p < 0.05$ : \*.**

#### 8.2.5. Dyskusja

Wiele różnych typów VLPs zostało z powodzeniem wyprodukowanych w różnych systemach ekspresji. Dwa najczęściej używane systemy ekspresji to system ekspresji przejściowej w komórkach ssaczy z użyciem wektorów plazmidowych oraz system ekspresji przejściowej w komórkach owadzych z użyciem wektora bakulowirusowego. Produkcja białek rekombinowanych lub VLPs w tych systemach może różnić się pod względem wydajności produkcji, fałdowania się cząstek czy ich modyfikacji potranslacyjnej. VLPs wyprodukowane w tych systemach były używane głównie jako antygeny szczepionkowe, ale także jako antygeny diagnostyczne. Pomimo tego, że cechy wymienione wcześniej mogą wpływać na immunogenność VLPs, do tej pory nie dokonano charakterystyki porównawczej VLPs wyprodukowanych w różnych systemach ekspresji dla żadnego z FV oraz nie porównano ich immunogenności. W związku z tym w przedstawionej pracy porównano produkcję, właściwości antygenowe oraz immunogenność VLPs wirusa Zika otrzymanych w tych dwóch systemach.

Produkcję VLPs w komórkach ssaczy (linia komórkowa CHO-K1 i 293T) przeprowadzono za pomocą transfekcji wektorem plazmidowym pcDNA3.1 V5/His kodującym białka prM i E. Wyniki pokazały wyższość linii 293T nad linią CHO-K1 w kontekście sekrecji VLPs do pożywki, pomimo większego poziomu białka E we frakcji komórkowej linii CHO-K1. Linia CHO-K1 była wcześniej używana do produkcji chimerycznych VLPs DENV zawierających sekwencję sygnałową białka prM i region stem/anchor JEV, w miejscu natywnych regionów, gdyż VLPs dzikiego typu, nie ulegały sekrecji, podobnie jak VLPs ZIKV (Purdy i Chang, 2005). Z kolei, stabilna ekspresja VLPs JEV w komórkach CHO-K1 skutkowałą fuzją błon komórkowych, co dalej zaburzało sekrecję (Konishi, Fujii i Mason, 2001). Pomimo mniejszego ryzyka kontaminacji wirusami linii CHO-K1, ze względu na pochodzenie odzwierzęce, to w niniejszej pracy potwierdziliśmy, że komórki 293T są lepszą platformą do otrzymywania VLPs, ze względu na wydajność produkcji. Natomiast w systemie BEVS, w ramach niniejszej pracy porównano ekspresję genów białek prM i E w infekcji



komórek linii Sf9 i High Five. Tylko w komórkach Sf9 otrzymano ekspresję w pełni rozciętych form białek prM/M i E, w porównaniu z drugim typem komórek, który wytwarzał kompleks białek prM-E, co sugeruje brak odpowiedniej peptydazy sygnałowej w trakcie obróbki potranslacyjnej. Odwrotny efekt był zaobserwowany dla VLPs JEV, tj. były silniej produkowane i wydzielane w komórkach High Five niż Sf9, co może sugerować różnice w obróbce potranslacyjnej dla VLPs różnych FV (np. wykorzystanie różnych peptydaz sygnałowych lub większą dostępność miejsca cięcia)(Yamaji i Konishi, 2013; Yamaji i in., 2012). Linia komórkowa Sf9 była także wykorzystana w innych badaniach z użyciem VLPs ZIKV oraz innych wirusów (Dai i in., 2018a; Krol, Brzuska i Szewczyk, 2019).

W następnym etapie analizowano wpływ suplementacji różnymi związkami chemicznymi hodowli komórkowych na produkcję VLPs. Wiadomo jest, że niska temperatura hodowli (28-31 °C) faworyzuje tworzenie się dimerów białka E oraz zwiększa sekrecję VLPs wirusa Zika oraz DENV, jednakże inne modyfikacje standardowych protokołów produkcji w obu systemach ekspresji nie były dotąd sprawdzane (Kudlacek i in., 2018; Slon Campos i in., 2017). W systemie komórek ssaczych analizowano wpływ suplementacji maślanem sodu, pełniącego rolę inhibitora deacetylazy histonów, który był wykorzystywany do zwiększania ekspresji rekombinowanych glikoprotein oraz produkcji lentiwirusów (Chung, Jeong, Choi i Kim, 2001; Cribbs, Kennedy, Gregory i Brennan, 2013; Mirzabekov i in., 1999). Wyniki uzyskane w niniejszej pracy, wykazały, że NaBut w połączeniu z niską temperaturą hodowli powoduje zwiększenie sekrecji białek E i M. W niedawnym doniesieniu wykazano również pozytywny wpływ maślanu sodu na produkcję VLPs JEV w komórkach BHK-21 (Mali i Bondre, 2022). Natomiast, w systemie BEVS analizowano efekt suplementacji cholesterolem, poliaminami lub ich kombinacją. Każdy ze związków zwiększył sekrecję glikoproteiny E ZIKV z komórek Sf9, jak również innych białek komórkowych/bakulowirusowych, jednakże kombinacja obu związków wykazała największy wpływ na produktywność BEVS. Wcześniej wykazano ich dodatni wpływ na produktywność BEVS w otrzymywaniu VLPs wirusa grypy (Monteiro i in., 2016). Choć wydaje się, że suplementacja cholesterolem i poliaminami jest skierowana bardziej na metabolizm komórek owadzych, to może także specyficznie modulować produkcję VLPs ZIKV. Pokazano udział cholesterolu w infekcji wirusem Zika (Leier i in., 2020; Li i in., 2020). Co więcej, białko E może oddziaływać z apolipoproteiną E na powierzchni wirionu w trakcie infekcji, oddziałującą z kroplami lipidowymi, w skład których może

wchodzi cholesterol (Cloherty, Olmstead, Ribeiro i Jean, 2020; Tréguier, Bull-Maurer i Roingear, 2022; Tréguier i in., 2022). Ponadto, oba białka prM/M i E są białkami zakotwiczonymi w błonie lipidowej, więc ich domeny transmembranowe mogą odgrywać rolę także w dojrzewaniu cząstek (Blazevic i in., 2016). Być może suplementacja innymi lipidami może także wpływać na wydzielanie VLPs, choć dla wirusa DENV wykazano, że kwas oleinowy zwiększa produkcję wirionów, ale nie VLPs (Ramphan i in., 2017). Dodatkowo, wykazano także rolę poliamin w infekcji ZIKV, których deplecja lub inhibicja ich metabolizmu redukuje namnażanie się wirusa (Mounce i in., 2016; Routhu i in., 2018). Tak więc oba związki mogą stanowić prostą metodę zwiększenia wydajności produkcji różnorodnych VLPs, co udało się wykazać w przeprowadzonych w ramach tej pracy doświadczeniach.

Ultrawierowanie w gradiencie gęstości wykazało różnice w gęstości oraz składzie białkowym wyprodukowanych cząstek w analizowanych komórkach. VLPs z komórek 293T wykazywały wolniejszą sedymentację niż z komórek Sf9. Może to wynikać z otrzymywania dojrzałych cząstek w komórkach ssaczych, gdyż zaobserwowano obecność białka M, którego nie wykryto w VLPs z komórek owadzych, a jedynie fragment pr. Sugeruje to prawidłowe rozcięcie białka prM przez furyno-podobne proteazy w komórkach owadzych, ale brak oddysocjowania fragmentu pr po wyjściu z komórki. Pożywka hodowlana do komórek owadzych wykazuje pH ok. 6.5, jednakże w dalszych etapach stosowano bufony o pH >7, co powinno spowodować odłączenie się pr. W dalszej analizie w warunkach natywnych nie wykryto znacząco wyższych poziomów białka prM/fragmentu pr w VLPs z komórek owadzych w porównaniu do tych pochodzących z komórek ssaczych. Co więcej, zaobserwowano obecność różnych populacji VLPs w analizie TEM. Sekrecja dwóch populacji VLPs z komórek ssaczych o zróżnicowanej średnicy i gęstości była wcześniej pokazana dla TBEV, WNV, a także w niektórych badaniach z użyciem ZIKV (Allison i in., 2003; Espinosa i in., 2018; Ohtaki i in., 2010). VLPs ZIKV wyprodukowane w obecności białka C i proteazy NS2B/NS3 były bardziej jednorodne i miały 50-60 nm średnicy (Boigard i in., 2017). Dla WNV wykazano, że cząstki o mniejszej gęstości są niedojrzałe. Natomiast dla TBEV, udowodniono, że oba rodzaje są dojrzałe, ale z różnicami w profilu glikozylacji - większe cząstki wykazały wyższy poziom wysokomannozowych N-glikanów. W niniejszej pracy wykazano niewrażliwość wszystkich analizowanych VLPs ZIKV na działanie Endo H<sub>f</sub>, mimo obecności N-glikanów wykazanych przez traktowanie PNGazą F. Tak więc

zróźnicowanie gęstościowe cząstek wirusopodobnych wirusa Zika nie jest rezultatem obecności oligomannozowych łańcuchów.

VLPs wyprodukowane w systemie komórek 293T, szczególnie frakcja o niższej gęstości, wykazały zwiększoną ekspozycję epitopów dla różnych przeciwciał skierowanych do DI/II, DIII oraz epitopu EDE1 w porównaniu do VLPs z komórek owadzych. Silne wiązanie wykazały przeciwciała do DIII, poza przeciwciałem ZV2, które również nie wiąże się do wirionu (Zhao i in., 2016). Jest to pierwsze porównanie determinant antygenowych VLPs ZIKV wyprodukowanych w różnych systemach. Wcześniej analizowano ekspozycję epitopów na VLPs TBEV oraz DENV wyprodukowanych w komórkach ssaczych w porównaniu z wirusem, gdzie VLPs posiadały bardzo zbliżony profil wiązania do przeciwciał jak wiriony (Allison i in., 2003; Metz i in., 2019; Schalich i in., 1996). Ponadto, VLPs badane w tej pracy były wrażliwe na zmiany pH i wykazywały redukcję wiązania do przeciwciał w niskim pH, co może być spowodowane nieodwracalną zmianą konformacji na trimeryczną lub agregacją cząstek. Zwraca to uwagę na konieczność kontrolowania pH buforów wykorzystywanych do oczyszczania VLPs, aby nie utracić ekspozycji determinant antygenowych.

W kontekście profilu glikozylacji VLPs wykazano po raz pierwszy obecność O-glikanów (typu Core 1 i Core 3) w glikoproteinie E VLPs, za pomocą traktowania O-glikozydazą oraz wiązaniem do lektyny – dżakaliny (specyficznej do typu Core 1, 3, i 5). Jednakże, wystąpiły różnice w sile wiązania do lektyny między VLPs o różnych gęstościach z obu systemów produkcji, co może sugerować różny stopień O-glikozylacji potencjalnych reszt S/T. Jedno badanie pokazało obecność O-glikanów w rekombinowanej DIII produkowanej w komórkach 293T, gdzie treonina w pozycji 353 była najsilniej O-glikozylowana (Yang i in., 2018). Inne 4 pozycje (T351, T325, T327, T406) wykazały również znaczną O-glikozylację. Większość zaobserwowanych struktur cukrowych (>99%) nie zawierała kwasu sialowego, natomiast znaczna część zawierała fukozę. T351 i T353 występują w eksponowanej pętli CD w DIII i mogą brać udział w oddziaływaniach polarnych z innymi pętlami w DIII (Sevvana i in., 2018). Obecność O-glikanów zademonstrowano również w cząstkach modelu wirusa zapalenia wątroby typ C - HCVcc (ang. *cell-culture HCV, HCVcc*), który należy również do rodziny *Flaviviridae* (Guo i in., 2018b). Znaczenie O-glikanów dla ZIKV jest nieznane, jednak dla innych wirusów (herpeswirusy, wirus Ebola, Sars-CoV-2) wykazano rolę tych struktur cukrowych w wejściu do komórki przez oddziaływanie z receptorami oraz unikaniu odpowiedzi immunologicznej przez maskowanie epitopów dla przeciwciał

(Collar i in., 2017; Machiels i in., 2011; Yang i in., 2020; Zhang i in., 2021). Ponadto, wcześniej odkryto również oddziaływanie O-glikanów z receptorem DC-SIGN (Cukan i in., 2012). W pracy tej wykazano oddziaływanie VLPs wyprodukowanych w systemie ssaczym z DC-SIGN i DC-SIGNR, choć silniejsze oddziaływanie było z tym pierwszym receptorem. Wiązanie VLPs do receptorów lektynowych może być bardziej spowodowane oddziaływaniem z fukożą niż oligomannozowymi resztami, gdyż cząstki te były niewrażliwe na działanie EndoH<sub>f</sub>, natomiast wykazały wiązanie do lektyny UEA I specyficznej do fukozy. Wcześniej udowodniono wiązanie ZIKV do obu receptorów i wykazano rolę DC-SIGN w procesie wejścia do komórki, jednakże nie zbadano, jaki typ N-glikanów może być za to odpowiedzialny oraz czy VLPs mogą z nimi oddziaływać (Gong i in., 2018, s. ; Routhu i in., 2019).

Ostatni etap charakterystyki VLPs dotyczył potencjału immunogennego. Immunizacja myszy oboma rodzajami VLPs skutkowała wzbudzeniem odpowiedzi przeciwciał, jednakże wyższy poziom przeciwciała do antygenów ZIKV oraz przeciwciał neutralizujących był obserwowany w grupie szczepionej VLPs z komórek 293T. Powodem tego może być silniejsza ekspozycja epitopów na powierzchni VLPs, przez co generowane są przeciwciała o większym powinowactwie do białek ZIKV. Jednocześnie różnice w wiązaniu do DC-SIGN/R mogą sugerować wydajniejszy wychwyt VLPs przez komórki APC, co może indukować silniejszą odpowiedź. Wiązanie VLPs HPV z różnymi PRR w tym z DC-SIGN oraz FcγR prowadzi do stymulacji produkcji cytokin prozapalnych, co dalej prowadzi do indukcji limfocytów T oraz odpowiedzi przeciwciał (García-Piñeres i in., 2006; Silva i in., 2007). Z drugiej strony, Dai i in. pokazali indukcję przeciwciała oraz limfocytów T po immunizacji myszy VLPs ZIKV wyprodukowanymi w komórkach Sf9, jednakże może to być spowodowane różnicą w drodze podania – droga domięśniowa oraz rodzajem adiuwantu – wodorotlenek glinu (Dai i in., 2018a). Poza tym, chociaż w niniejszej pracy użyto do immunizacji myszy zmiareczkowanych VLPs, to preparat pochodzący z komórek owadzych, zawierał stosunkowo więcej białek komórkowych oraz cząstek bakulowirusowych, co mogło również wpłynąć na immunogenność całej formulacji. Z drugiej strony, istnieją przesłanki do wykorzystywania żywego bakulowirusa jako adiuwantu, gdyż wzmacnia odpowiedź immunologiczną do antygenów monomerycznych (owalbuminy) czy innych rodzajów VLPs (norowirusa) w podaniu śródskórnym (Heinimäki i in., 2017). Podsumowując, wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie wskazują na negatywny wpływ BEVS, a pozytywny wpływ komórek ssaczych - 293T na potencjał szczepionkowy VLPs.

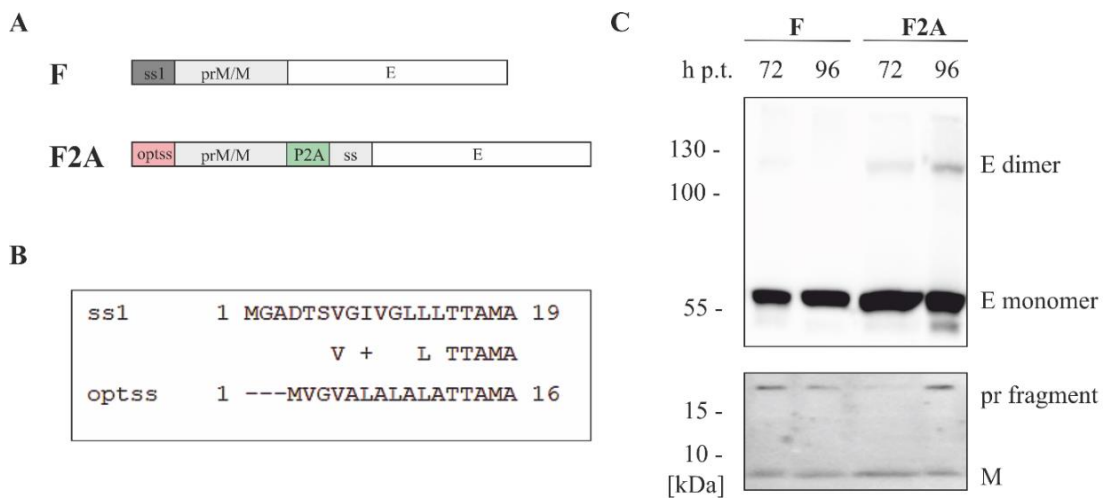
### **8.3. Produkcja i oczyszczanie zmodyfikowanych VLPs (F2A) w systemie ekspresji w komórkach 293T**

W celu zwiększenia produkcji VLPs wirusa Zika w komórkach ssaczy 293T zaprojektowano nowy rekombinowany konstrukt VLPs (F2A). Konstrukt F2A zawierał dwie modyfikacje (**Rycina 33 A**):

- wymianę natywnej sekwencji sygnałowej białka prM na zoptymalizowaną sekwencję sygnałową (optss),
- wprowadzenie samo-rozszczepiającego się peptydu 2A (P2A) pochodzącego ze świńskiego teschowirusa-1 między białkami prM i E.

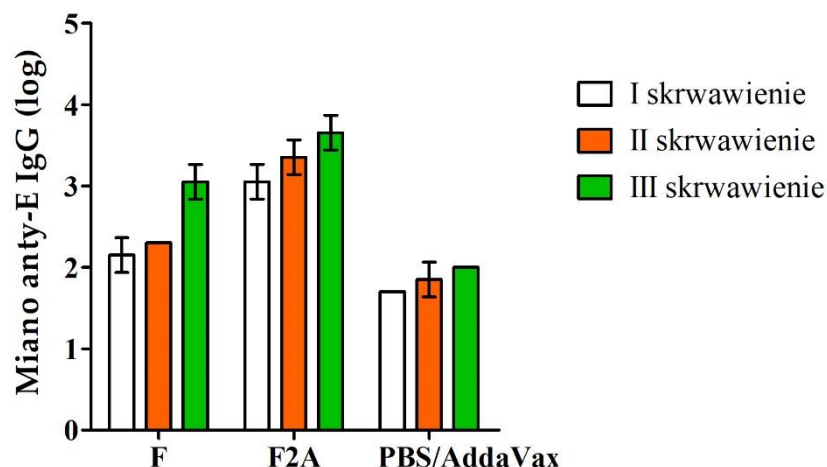
Sekwencja sygnałowa optss została opracowana na podstawie natywnej sekwencji sygnałowej ss1 białka prM. Optymalizacja sekwencji sygnałowej została przeprowadzona poprzez zwiększenie liczby aminokwasów hydrofobowych takich jak alanina, walina, glicyna i leucyna w sekwencji ss1 oraz skrócenie sekwencji (**Rycina 33 B**). Podobieństwo aminokwasowe obu sekwencji sygnałowych jest mniejsze niż 40%. Prawdopodobieństwo sekrecji VLPs oceniano przy pomocy programu PrediSi oraz SignalP, które przewidują obecność oraz siłę działania sekwencji sygnałowych. Sekwencja kodująca peptyd P2A pochodziła od świńskiego teschowirusa-1 i została poprzedzona linkerem GSG (glicyna-seryna-glicyna) w celu zapobiegania sterycznych oddziaływań. Dodatkowo białko E było poprzedzone sekwencją sygnałową (ss) pochodzącą z domen transbłonowych białka prM. Konstrukt F2A jak również powstały na jego podstawie chimeryczny konstrukt CH2A (który różni się od F2A wymianą regionu stem/anchor na region odpowiadający pochodzący z TBEV), wraz zastosowaniem jako antygen szczepionkowy, są przedmiotem zgłoszeń patentowych (P.430234 oraz EP20751675.8).

VLPs typu dzikiego (F) i F2A VLPs poddano następnie ekspresji w celu porównania produkcji białek prM i E oraz powstawania VLPs. Komórki 293T transfekowano wektorami plazmidowymi (pcDNA3.1) kodującymi oba typy VLPs (**Rycina 33 B**). Transfekcję przeprowadzono w 37°C przez 72 i 96 godzin po transfekcji. Następnie zbierano supernatanty z hodowli komórkowych i oceniano ekspresję białka prM/M i E metodą western blot. F2A VLPs wykazywały wyższy poziom formy monomerycznej białka E oraz dimerycznej niż F VLPs. Oba typy VLPs wykazały podobne poziomy fragmentu pr i białka M.



**Rycina 33. Schemat konstruktów i ekspresja rekombinowanych F2A VLPs. Schematyczna ilustracja genów F2A VLPs w porównaniu z VLPs typu dzikiego (F) (A) ss1 - sekwencja sygnałowa białka prM/M typu dzikiego, optss - zoptymalizowana sekwencja sygnałowa białka prM/M, P2A - peptyd samo-rozszczepiający 2A, ss - sekwencja sygnałowa białka E. Porównanie sekwencji aminokwasowych ss1 i optss (B). Analiza western blotting ekspresji białek E i prM/M w pożywce hodowlanej (C). Komórki 293T transfekowano plazmidami pcDNA 3.1 kodującymi geny F VLPs lub F2A VLPs, a następnie 72 i 96 h po transfekcji (h p.t.) pożywkę zebrano, precypitowano i poddano elektroforezie SDS-PAGE w warunkach redukujących, immunodetekcję białek E i prM/M wykonano przy użyciu przeciwciała 4G2 i przeciwciała anty-prM/M.**

Ponadto, w badaniach na myszach porównano właściwości immunogenne obu typów VLPs. W tym celu VLPs oczyszczono z pożywki hodowlanej za pomocą precypitacji glikolem polietylenowym 6000, a następnie metodą chromatografii wykluczania. Oczyszczone cząstki zastosowano w połączeniu z adiuwantem AddaVax do immunizacji myszy (droga podskórna, 3 dawki - 25, 15, 10  $\mu$ g, dwutygodniowa przerwa). Następnie, oceniono poziom przeciwciał IgG anty-E w surowicach poszczepiennych za pomocą testu ELISA (**Rycina 34**) oraz aktywność neutralizującą ZIKV(H/PAN/2016/BEI-259634) surowic w teście PRNT (**Tabela 9**). Uzyskane wyniki wykazały wyższość F2A VLPs w indukcji przeciwciał anty-E w surowicach immunizowanych zwierząt, a także silniejszą aktywność neutralizującą surowic odpornościowych. W związku z tym do dalszych eksperymentów użyto tylko F2A VLPs.

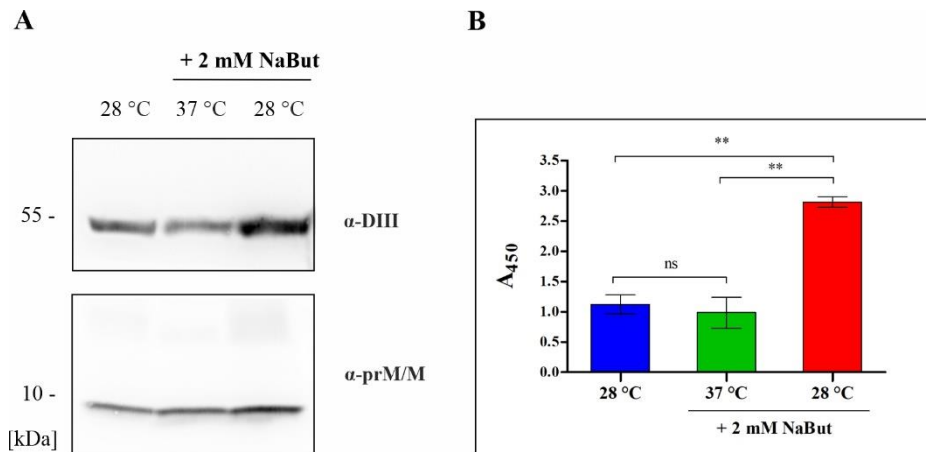


**Rycina 34.** Analiza poziomu przeciwciał przeciwko ektodomenie E (anty-E) w surowicach poszczepiennych za pomocą testu ELISA. Słupki błędów wskazują odchylenia standardowe między wykonanymi analizami.

**Tabela 9.** Miana przeciwciał neutralizujących do ZIKV (H/PAN/2016/BEI-259634) w surowicach poszczepiennych za pomocą testu PRNT.

Grupa	Średnie miano PRNT50 (III skrwawienie)
F	~20
F2A	~40
PBS/AddaVax	~10

W następnym etapie F2A VLPs otrzymano przy użyciu modyfikacji protokołu produkcji opisanego w poprzednim rozdziale tj. zastosowanie kombinacji hodowli transfekowanych komórek w 28 °C i suplementacji maślanem sodu. Wpływ obu tych zmian na produkcję F2A VLPs potwierdzono za pomocą western blottingu i testu ELISA (**Rycina 35**). Oba test potwierdziły znaczące zwiększenie sekrecji F2A VLPs w wyniku zastosowanych zmian.



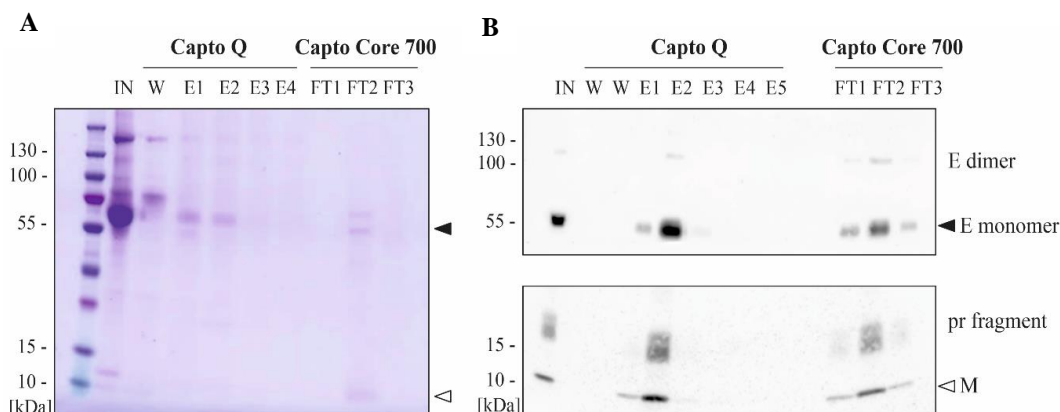
**Rycina 35.** Wpływ temperatury i suplementacji maślanem sodu na produkcję F2A VLPs. 16 godzin po transfekcji hodowle komórkowe suplementowano 2 mM maślanem sodu i hodowano dalej do 96 godzin w 37 °C lub 28 °C. Analiza western blot zawartości białka E i prM/M w precypitowanej pożywce przy użyciu, odpowiednio, przeciwciał anti-DIII i anti-prM/M (A). Test ELISA poziomu białka E w pożywce hodowlanej (B). Płytkę do ELISA pokryto filtrowaną pożywką hodowlaną a białko E wykrywano przy użyciu przeciwciała anti-DIII. Słupki błędów wskazują odchylenia standardowe. Istotność statystyczną obliczono przy użyciu jednokierunkowej analizy ANOVA z wielokrotnym porównaniem Tukeya.  $p > 0,05$ : ns;  $p < 0,01$ : \*\*.

W poprzedniej analizie TEM VLPs dzikiego typu wyprodukowanych w komórkach 293T i Sf9 zaobserwowano dużą ilość agregatów białkowych obok dojrzałych cząstek. Te VLPs w były wstępnie oczyszczane za pomocą metod ultrawirowania tj. pelletowania oraz gradientu sacharozy. Siła odśrodkowa w trakcie ultrawirowania może powodować rozrywanie się struktur takich jak VLPs. Dlatego, F2A VLPs oczyszczono za pomocą metod: filtracji/ultrafiltracji oraz chromatografii. Pożywkę hodowlaną zbierano i wstępnie oczyszczano przez delikatne wirowanie i ultrafiltrację, a następnie zagęszczony retenant z F2A VLPs oczyszczano stosując dwuetapowy proces chromatograficzny: anionowymienną i multimodalną chromatografię. Pierwszy krok wykonano przy użyciu kolumny Hitrap Capto Q w celu wychwycenia cząstek, które następnie eluowano i nakładano bezpośrednio na drugą kolumnę HiScreen Capto Core 700. Kolumna ta pozwoliła na wykluczenie F2A VLPs z powłoki złoża, które odzyskano we frakcjach przepływowych w przeciwieństwie do białek komórkowych, które zostały związane ze złożem.

Czystość F2A VLPs i zawartość białek prM/M i E oceniano we frakcjach zebranych podczas procesu oczyszczania za pomocą, odpowiednio, barwienia Coomassie i immunoblottingu (**Rycina 36**). F2A VLPs skutecznie oczyszczono za pomocą tej dwuetapowej metody. Zaobserwowano dwie formy białka E (monomer i dimer) oraz

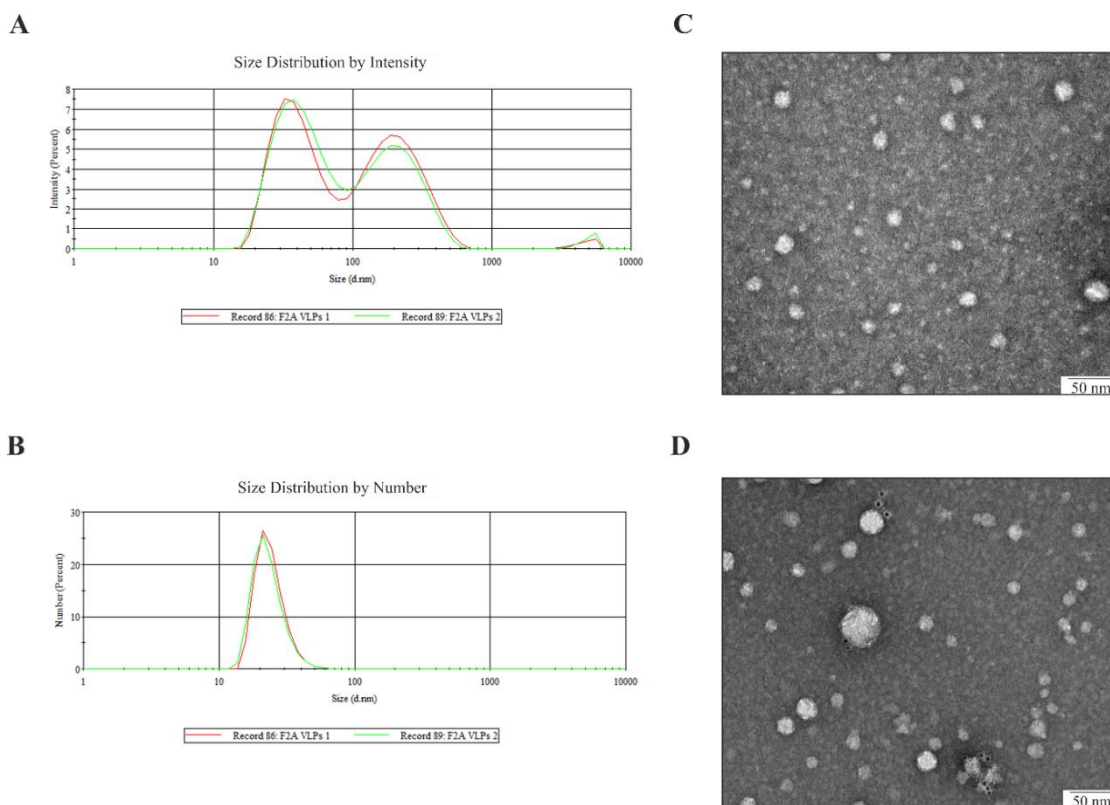


wykryto fragment pr i białko M, co może sugerować obecność mieszanej populacji o różnym stopniu dojrzałości. Stężenie białka w końcowym preparacie F2A VLPs wynosiło około 0.1-0.2 mg/ml przy użyciu metody Bradforda.



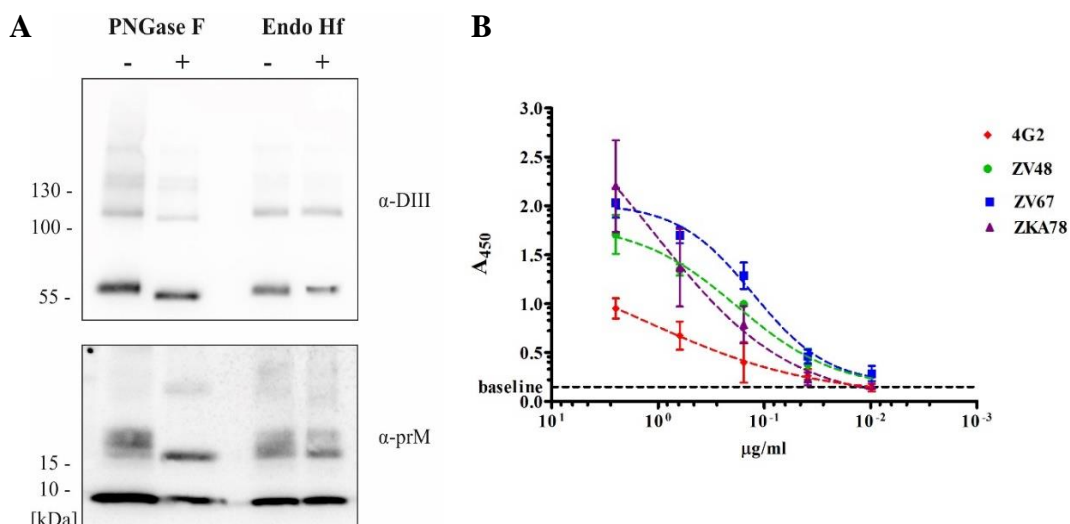
**Rycina 36. Oczyszczanie F2A VLPs. Barwienie CBB 4-20% żelu SDS-PAGE frakcji zebranych podczas oczyszczania (A). Western blotting białek E i prM/M we frakcjach zebranych podczas etapów oczyszczania (B).** IN- preparat wyjściowy nakładany na kolumnę, W- frakcje z płukania z pierwszego etapu oczyszczania na kolumnie Hitrap Capto Q, E1-5- frakcje elucyjne na kolumnie Hitrap Capto Q, FT1-3- frakcje przepływowe z drugiego etapu oczyszczania na HiScreen Kolumna Capto Core 700.

Obecność F2A VLPs w końcowym preparacie po oczyszczeniu oceniano za pomocą dynamicznego rozpraszania światła (DLS) i transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) (**Rycina 37**). Analiza DLS według intensywności wykazała dwie populacje cząstek o średniej hydrodynamicznej średnicy ~35 nm i ~260 nm, jednak większe cząstki miały mniejszą intensywność. Analiza DLS wg liczebności wykazała jeden pik o średniej średnicy hydrodynamicznej ~40 nm. Transmisyjna mikroskopia elektronowa potwierdziła obecność cząstek. Zaobserwowano VLPs o różnych rozmiarach (~60 nm i ~30 nm) w barwieniu octanem uranylu. Ponadto obecność VLPs w końcowym preparacie została potwierdzona metodą znakowania immunogold z użyciem przeciwciała ZV67. Koniugaty przeciwciał ze złotem zaobserwowano zarówno w pobliżu cząstek o większej jak i mniejszej średnicy.



**Rycina 37. Analiza DLS i mikrografie elektronowe F2A VLPs. Analiza dynamicznego rozpraszania światła (DLS) rozkładu wielkości cząstek F2A VLPs według intensywności (A) i liczby (B). Analiza TEM F2A VLPs po barwieniu 2% octanem uranylu (C) i po znakowaniu techniką immunogold przeciwciałem ZV67 (D); skala 50 nm.**

W związku z wprowadzeniem modyfikacji genetycznych do kasety genowej białek prME przeprowadzono analizę N-glikozylacji białek i antygenowości F2A VLPs. Profil N-glikozylacji glikoprotein prM/M i E oceniano stosując traktowanie glikozydazami: PNGazą F i Endo H<sub>f</sub> (**Rycina 38 A**). Traktowanie PNGazą F F2A VLPs spowodowało zmianę migracji białka E w żelu SDS-PAGE, zarówno formy monomerycznej, jak i dimerycznej, jak również migrację fragmentu pr, potwierdzając N-glikozylację obu białek. Trawienie Endo H<sub>f</sub> nie wpłynęło na mobilność glikoprotein, co wskazuje, że N-glikany nie zawierają struktur oligomannozowych. Ponadto wykonano analizę antygenowości F2A VLPs za pomocą wiązania z wybranymi przeciwciałami: 4G2, ZV48, ZV67 i ZKA78 (**Rycina 38 B**). Wiązanie przeciwciała 4G2 z cząsteczkami było najslabsze w porównaniu ze wszystkimi innymi badanymi przeciwciałami, które wykazały silne oddziaływania z cząstkami. Podsumowując, F2A VLPs zachowały N-glikozylację białek prM/M i E oraz wiązanie do 4 przeciwciał monoklonalnych przeciwko białku E.



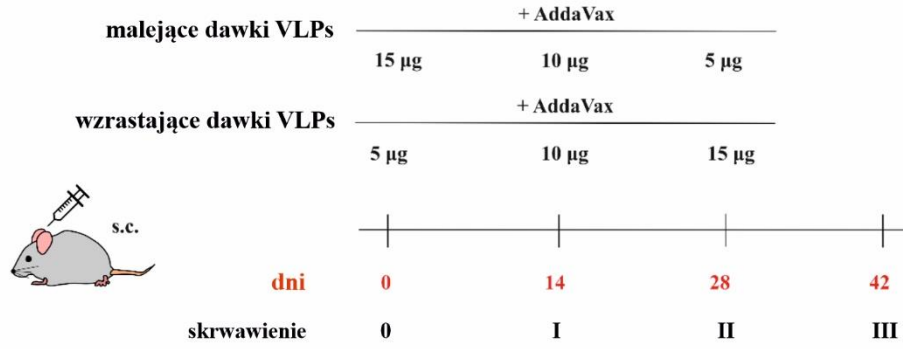
**Rycina 38.** Analiza N-glikozylacji i antygenowości glikoprotein prM/M i E F2A VLPs. Immunoblotting białek prM/M i E po rozdziale elektroforetycznym w żelu SDS-PAGE (4-20%) w warunkach redukujących po traktowaniu PNGazą F i Endo H<sub>f</sub> w warunkach denaturujących (A). Immunodetekcję białka E wykonano za pomocą przeciwciała anti-DIII, a białka prM/M przeciwciała anti-prM/M. Test ELISA wiązania przeciwciał: 4G2, ZV48, ZV67 i ZKA78 z F2A VLPs (B). Płytkę pokryto seryjnie rozcieńczonymi F2A VLPs, a następnie dodano rozcieńczone przeciwciała. w.p. – wartość progowa testu.

### 8.3.1. Wpływ dawkowania i adiuwantu na immunogenność F2A VLPs

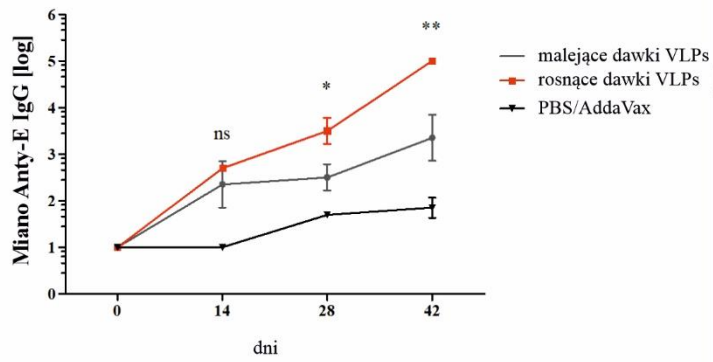
Następnie oceniono potencjał F2A VLPs jako antygenu szczepionkowego. W pierwszej kolejności zbadano wpływ schematu dawkowania na immunogenność F2A VLPs. Standardowo, w schemacie wielokrotnych szczepień podawane są 2-3 takie same, lub zmniejszające się dawki antygeny. Natomiast, wykazano dla antygenów ludzkiego wirusa niedoboru odporności, że podskórna immunizacja wzrastającymi dawkami lub za pomocą pomp osmotycznych prowadzi do zwiększenia poziomu przeciwciał neutralizujących, dzięki dłuższemu zatrzymaniu immunogenu w węzłach chłonnych, w porównaniu z immunizacją tymi samymi dawkami (Cirelli i in., 2019). Postanowiono porównać odpowiedź immunologiczną do VLPs administrowanych w dwóch schematach szczepień różniących się dawkowaniem cząstek. Dwie grupy myszy BALB/c (n = 6) immunizowano drogą podskórną (ang. subcutaneous, s.c.), w odstępie dwóch tygodni, trzema rosnącymi (schemat wzrastających dawek) lub malejącymi (schemat malejących dawek) dawkami F2A VLPs (5, 10 lub 15 µg całkowitej zawartości białka) formułowanych z adiuwantem AddaVax (nanoemulsja skwalen-olej w wodzie, analog adiuwantu MF59, zatwierdzonego do użycia w szczepionkach) (**Rycina 39 A**). Ten adiuwant jest zdolny do stymulowania odpowiedzi zarówno komórkowej, jak i odpowiedzi przeciwciał (Calabro i in., 2013, s. 59). Kontrolna grupa

(n=3) otrzymała bufor PBS plus adiuwant. Próbkę surowicy pobierano dwa tygodnie po każdej immunizacji i stosowano do oceny odpowiedzi przeciwciał. Do oceny wytwarzania przeciwciał w czasie, zastosowano ektodomenę glikoproteiny E jako antygen w teście ELISA (**Rycina 39 B**). Obie formułacje szczepionek spowodowały wytworzenie przeciwciał anti-E. Poziom tych przeciwciał był bardzo niski po pierwszej dawce każdego testowanego preparatu szczepionki i wzrastał po każdej dawce przypominającej. Najwyższy wzrost miana przeciwciał zaobserwowano w surowicach z grupy myszy immunizowanych schematem wzrastających dawek. Co więcej, poziom przeciwciał anti-E w surowicach pobranych po drugiej dawce przypominającej był ~100 razy wyższy dla grupy immunizowanej schematem wzrastających dawek F2A VLPs niż dla drugiego schematu szczepień (dawek malejących).

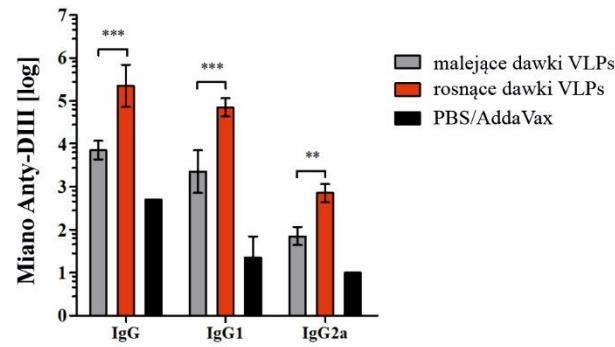
A



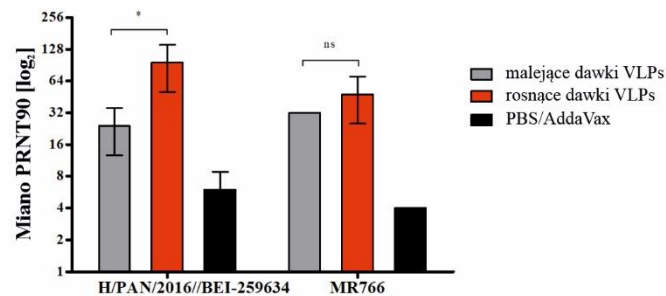
B



C



D

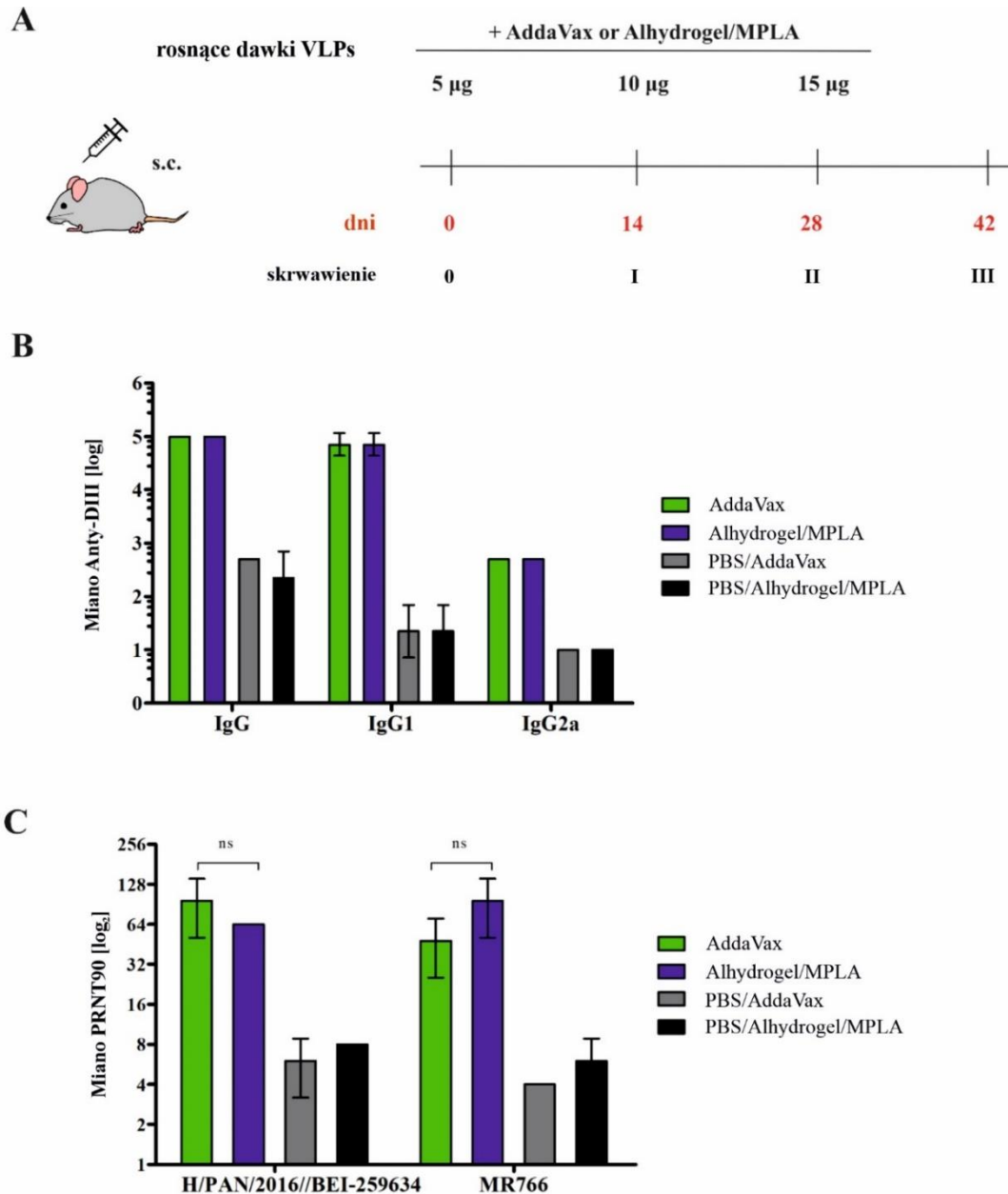


**Rycina 39. Wpływ schematów dawkowania na immunogenność VLPs. Schematyczna ilustracja schematów i harmonogramu szczepień (A). Analiza poziomu przeciwciał przeciwko białku E w surowicach immunizowanych myszy (B). Miano przeciwciał anty-E w surowicach zebranych w różnych punktach czasowych określono za pomocą testu ELISA. Analizę przeprowadzono dwukrotnie, a wartości średnie przedstawiono na wykresie; słupki błędów wskazują odchylenia standardowe. Istotność statystyczną obliczono stosując dwukierunkową analizę ANOVA z korekcją Bonferroniego.  $p > 0.05$ : ns;  $p < 0.05$ : \*,  $p < 0.01$ : \*\*. Analiza przeciwciał IgG/IgG1/IgG2a przeciwko domenie III ZIKV (C). Miana IgG, IgG1 i IgG2a przeciwko DIII w surowicach pobranych w dniu 42 określono za pomocą testu ELISA. Analizę przeprowadzono dwukrotnie, a wartości średnie przedstawiono na wykresie; słupki błędów wskazują odchylenia standardowe. Istotność statystyczną obliczono stosując dwukierunkową analizę ANOVA z korekcją Bonferroniego.  $p < 0.01$ : \*\*,  $p < 0.001$ : \*\*\*. Analiza aktywności neutralizującej ZIKV surowic poszczepiennych (D). Aktywność neutralizującą surowic mierzono za pomocą testu neutralizacji łysinek (PRNT) przeciwko dwóm szczepom wirusa Zika: H/PAN/2016/BEI-259634 i MR766. Wykres przedstawia wartości PRNT90, które są najwyższymi rozcieńczeniami surowic, które skutkowały co najmniej 90% redukcją łysinek ZIKV. Analizę przeprowadzono dwukrotnie, a wartości średnie przedstawiono na wykresie; słupki błędów wskazują odchylenia standardowe. Istotność statystyczną obliczono stosując dwukierunkową analizę ANOVA z korekcją.  $p > 0.05$ : \*;  $p < 0.05$ : \*\*.**

Ponadto, scharakteryzowano dokładniej wzbudzony typ odpowiedzi immunologicznej. Odpowiedź komórkową zbadano za pomocą IFN $\gamma$  ELISpot na mysich splenocytach stymulowanych peptydami pokrywającymi region ektodomeny białka E, jednak nie zaobserwowano wydzielania IFN $\gamma$  (dane nieprzedstawione). W związku z tym oceniono końcowe miana frakcji przeciwciał IgG i dwóch podklas - IgG1 (związanej z odpowiedzią typu Th2) i IgG2a (związanej z odpowiedzią typu Th1) wobec DIII białka E (**Rycina 39 C**). Immunizacja myszy wzrastającymi dawkami F2A VLPs skutkowała zwiększonym poziomem IgG przeciwko DIII glikoproteiny E, jak również eskalacją poziomu IgG1 i IgG2a. Jednak poziom IgG2a był znacznie niższy niż IgG1, niezależnie od testowanego schematu dawkowania, zatem można wnioskować, że odpowiedź przeciwciał na VLPs wykazuje profil odpowiedzi immunologicznej spolaryzowany w kierunku odpowiedzi typu Th2.

Następnie oceniono aktywność neutralizującą zebranych mysich surowic (dzień 42) przeciwko wirusowi Zika. Przeprowadzono test neutralizacji redukcji łysinek z dwoma szczepami: szczepem pandemicznym należącym do linii azjatyckiej - H/PAN/2016/BEI-259634 i szczepem referencyjnym z linii afrykańskiej - MR766 (**Rycina 39 D**). Surowice od myszy immunizowanych według schematu ze wzrastającym dawkowaniem wykazywały wyższą aktywność neutralizacyjną niż surowice ze schematu malejących dawek wobec obu szczepów, chociaż różnica między wartościami PRNT90 dla MR766 nie była znacząca.

W ostatnim etapie zbadano wpływ typu adiuwantu na potencjał immunogeny F2A VLPs. Porównany został adiuwant AddaVax z innym rodzajem systemu adiuwantowego - Alhydrogel/MPLA. System ten oparty jest na wodorotlenku glinu, który stymuluje silną odpowiedź przeciwciał (odpowiedź typu Th2) oraz syntetycznym monofosforylolipidzie A (MPLA) – agonisty receptora TLR4, przyczyniającym się do komórkowej odpowiedzi (odpowiedź typu Th1) (Brewer i in., 1999; Martin, Michalek i Katz, 2003). F2A VLPs formułowano z tymi adiuwantami i zastosowano do immunizacji myszy zgodnie ze wzrastającym harmonogramem dawkowania, a następnie zbadano odpowiedź komórkową i odpowiedź przeciwciał (**Rycina 40**). Ponownie, nie zaobserwowano odpowiedzi komórek T w teście IFN $\gamma$  ELISpot. Poziom IgG, IgG1 i IgG2a przeciwko DIII był taki sam dla grup immunizowanych każdym z typów adiuwantów. Podobnie, aktywność neutralizacyjna surowic przeciwko ZIKV była porównywalna dla obu adiuwantów.



**Rycina 40. Wpływ typu adiuwantu na immunogenność VLPs. Schematyczna ilustracja immunizacji i harmonogram eksperymentu (A). Analiza przeciwciał IgG/IgG1/IgG2a przeciwko domenie III ZIKV (B). Międzyna IgG, IgG1 i IgG2a anty-DIII w surowicach pobranych w dniu 42 określono za pomocą testu ELISA. Analizę przeprowadzono dwukrotnie, a wartości średnie przedstawiono na wykresie; słupki błędów wskazują odchylenia standardowe. Analiza aktywności neutralizującej ZIKV surowic poszczepiennych (C). Aktywność neutralizującą surowic mierzono za pomocą testu neutralizacji lysinek (PRNT) przeciwko dwóm szczepom wirusa Zika: H/PAN/2016//BEI-259634 i MR766. Wykres przedstawia wartości PRNT90, które są najwyższymi rozcieńczeniami surowic, które skutkowały co najmniej 90% redukcją lysinek ZIKV. Analizę przeprowadzono dwukrotnie, a wartości średnie przedstawiono na wykresie; słupki błędów wskazują odchylenia standardowe. Istotność statystyczną obliczono stosując dwukierunkową analizę ANOVA z testem post-post Bonferroniego.  $p > 0.05$ : ns.**



### 8.3.2. Dyskusja

Głównym celem badania była ocena wpływu schematu dawkowania rekombinowanych VLPs i typu adiuwantu na odpowiedź immunologiczną. Zaprojektowano nowe rekombinowane VLPs ZIKV (F2A VLPs), aby ułatwić produkcję w komórkach eukariotycznych. Wprowadzono dwie zmiany w sekwencji kasety białek prM i E: zoptymalizowaną sekwencję sygnałową białka prM oraz włączenie peptydu samo-rozszczepiającego (P2A) przed sekwencją sygnałową białka E. Inne grupy badawcze pokazały zastosowanie różnych sekwencji sygnałowych, w tym białka prM JEV lub sekwencji sygnałowej IL-2 z VLPs ZIKV w celu zwiększenia wydzielania cząstek do pożywki hodowlanej (Alvim, Itabaiana i Castilho, 2019; Vang i in., 2021). Peptyd sygnałowy białka prM JEV był wcześniej stosowany również z VLPs wirusa dengi (Chang i in., 2003). Co więcej, podstawienie jednego aminokwasu w sekwencji sygnałowej prM ZIKV doprowadziło do zwiększonego wydzielania białka E, które było nawet wyższe niż poziom białka uzyskany przy użyciu peptydu sygnałowego JEV (Jasperse, O'Connell, Wang i Verardi, 2021). W przypadku peptydu P2A, jest to pierwszy raport pokazujący zastosowanie tego rodzaju peptydu w konstrukcie VLPs FV. Powodem wprowadzenia peptydu była maksymalizacja rozdziału prM i białka E podczas translacji. Wcześniej samo-rozszczepiający się peptyd (pochodzący z wirusa pryszczycy) był używany tylko do oddzielenia białek C i prM wirusa kleszczowego zapalenia mózgu (Schrauf, Mandl, Bell-Sakyi i Skern, 2009). Zastosowany w tym badaniu peptyd P2A jest pochodną świńskiego teschowirusa-1 i został wyselekcjonowany ze względu na wysoką wydajność cięcia w linii komórkowej HEK293 (Kim i in., 2011). Chociaż, nie zaobserwowano istotnego wzrostu wydzielania prM/M do pożywki hodowlanej, połączenie obu modyfikacji spowodowało wzrost poziomu białka E zarówno w postaci monomerycznej, jak i dimerycznej. Obecność dimerów białka E w VLPs ma kluczowe znaczenie, ponieważ wykazano, że VLPs z kowalencyjnymi dimerami E były w stanie wzbudzić przeciwciała o wyższym potencjale neutralizacji ZIKV w porównaniu z VLPs typu dzikiego (De Lorenzo i in., 2020). W niniejszej rozprawie również porównano immunogenność rekombinowanych cząstek F2A z tymi VLPs i potwierdzono wyższość F2A VLPs nad typem dzikim w indukcji odpowiedzi przeciwciał. Ponadto, modyfikacje te pozwoliły również na poprawę produkcji VLPs w BEVS, w systemie ekspresji w komórkach pierwotniakowych oraz drożdżowych (dane nie pokazane). Również peptyd P2A wprowadzono do konstruktów białek prM i E TBEV, co zwiększyło produkcję VLPs w komórkach pierwotniakowych (dane nie pokazane).

Następnie, wyprodukowano F2A VLPs przy użyciu systemu ekspresji przejściowej w komórkach 293T zachowując protokół produkcji ze zmianą temperatury oraz suplementacją NaBut. Cząstki F2A VLPs oczyszczono za pomocą dwuetapowego procesu chromatograficznego. Najczęstszymi metodami oczyszczania VLPs FV są wytrącanie glikolem polietylenowym, diafiltracja i ultrawierowanie w gradientem gęstości. Jednak metody te są pracochłonne i trudne do przeskalowania. Nasze podejście było połączeniem chromatografii anionowymiennej z chromatografią multimodalną. W pierwszym etapie F2A VLPs zostały wychwycone z pożywki hodowlanej na złożu anionowymyennym HiTrap® Capto™ Q, co pozwala na zateżenie cząstek i usunięcie większości białek komórkowych gospodarza. W kolejnym etapie, cząstki F2A zostały dodatkowo oczyszczone przy użyciu HiScreen® CaptoCore 700, które odzyskano we frakcji przepływowej. Podobną strategię zastosowano również do oczyszczania VLPs typu dzikiego YFV i innych rekombinowanych VLPs ZIKV wytworzonych w stabilnych liniach komórkowych HEK293SF-3F6, jednak nie oceniono immunogenności tak oczyszczonych cząstek (Alvim, Itabaiana i Castilho, 2019). Ponadto, rekombinowane chimeryczne VLPs ZIKV (sekwencja domen transbłonowych prM i E pochodząca ze szczepu MR766, sekwencja ektodomeny E ze szczepu brazylijskiego SPH2015, poprzedzona sekwencją sygnałową IL-2) oczyszczono w dwuetapowym procesie chromatograficznym, jednak w odwrotnej kolejności: pierwszy etap - chromatografia multimodalna i drugi etap - chromatografia oddziaływań z tolerancją soli (STIC-PA), oba działały w trybie przepływowym (Espinosa i in., 2018). Wyniki uzyskane w doświadczeniach w ramach niniejszej rozprawy wraz z tymi raportami potwierdzają użyteczność tych dwóch procesów chromatograficznych do oczyszczania VLPs z wysokim odzyskiem oraz czystością preparatu. Analiza TEM i DLS wykazała dwie populacje cząstek o średnicy ~35 nm i ~55 nm w oczyszczonym preparacie, co jest zgodne z wynikami uzyskanymi dla VLPs typu dzikiego. Z powodu genetycznych modyfikacji sekwencji kasety genów białek prM i E, oceniono także determinanty antygenowe (wiązaną z wybranymi przeciwciałami specyficznymi do epitopów w białku E oraz profil N-glikozylacji). VLPs wykazały N-glikozylację białka E oraz prM oraz ekspozycję wybranych epitopów w białku E.

Głównym celem badania była ocena schematu dawkowania i typu adiuwantu na immunogenność rekombinowanych VLPs ZIKV. Zbadano dwa schematy szczepień: trzy zmniejszające lub zwiększające dawki VLPs sformułowane z adiuwantem – nanoemulsją typu olej-w-wodzie (AddaVax) podawane podskórną. Zwiększający się schemat

dawkowania skutkowało generacją przeciwciał IgG przeciwko białku E podczas szczepienia o ponad dwukrotnie wyższym poziomie. Jak wcześniej wspomniano, zaobserwowano również wzmocnienie siły odpowiedzi immunologicznej po podskórnej immunizacji wykładniczo rosnącymi dawkami rekombinowanych białek ludzkiego wirusa niedoboru odporności (Cirelli i in., 2019; Tam i in., 2016). Wzrost odpowiedzi immunologicznej przypisano utrzymującej się dostępności antygeny, ponieważ wykładniczo zmniejszające się dawki antygenów powodowały niższą odpowiedź immunologiczną. Chociaż w badaniach opisanych w niniejszej rozprawie podawano tylko trzy wzrastające dawki F2A VLPs, nadal odpowiedź przeciwciał była zwiększona. Rosnący schemat dawkowania zwiększył również poziom przeciwciał IgG1 i IgG2a przeciwko antygenowi DIII, choć ogólny poziom IgG2a był niski. Sugeruje to, że odpowiedź immunologiczna przeciwko F2A VLPs może być spolaryzowana w kierunku odpowiedzi typu Th2, zwłaszcza, że nie wykryto odpowiedzi komórkowej. W przeciwieństwie do przedstawionych wyników, doniesienia literaturowe wskazują, że VLPs ZIKV ekspresjonowane przez bakulowirusa indukują odpowiedź komórkową i odpowiedź spolaryzowaną w kierunku Th1, co może wynikać z różnicy w drodze podawania (droga domięśniowa) (Dai i in., 2018a). Co więcej, immunizacja rosnącym schematem dawek F2A VLPs wzbudziła również wyższy poziom przeciwciał neutralizujących przeciwko dwóm szczepom ZIKV - z linii afrykańskiej oraz azjatyckiej.

Drugim aspektem tego badania była ocena wpływu typu adiuwantu na profil odpowiedzi immunologicznej. Porównano dwa typy adiuwantów AddaVax oraz kombinację wodorotlenku glinu z MPLA (Alhydrogel/MPLA). Oba adiuwanty stosowano w połączeniu z VLPs ZIKV w różnych schematach (AddaVax – dwie dawki domięśniowo i Alhydrogel/MPLA – trzy dawki podskórnie) i wykazano już wcześniej, że indukują silną odpowiedź przeciwciał (Boigard i in., 2017; De Lorenzo i in., 2020). Uważa się, że adiuwanty te mogą zatrzymywać antygen w węzłach chłonnych lub miejscu szczepienia, jednak transport obu tych komponentów może zachodzić niezależnie, co w konsekwencji może skrócić czas odpowiedzi immunologicznej (Calabro i in., 2013). W związku z tym zbadano wpływ obu adiuwantów na immunogenność F2A VLPs przy użyciu rosnącego harmonogramu dawkowania. Oba adiuwanty nie wzbudziły odpowiedzi IFN $\gamma$ , a poziomy przeciwciał anti-DIII były porównywalne. Ponadto, w obu przypadkach odpowiedź immunologiczna była prawdopodobnie spolaryzowana w kierunku Th2. Doniesienia literaturowe wskazują, że adiuwant Alhydrogel/MPLA w połączeniu z rekombinowaną podjednostką DIII

wzmacnia i generuje bardziej zrównoważoną odpowiedź immunologiczną niż MF59 w podaniu domięśniowym (dwie dawki) (Wang i in., 2019b). W badaniach opisanych w niniejszej rozprawie, zastosowano podskórną drogę podania, gdyż dla tej drogi wykazano dodatni wpływ zwiększających się dawek na poziom indukowanych przeciwciał. Dlatego też godne uwagi byłoby porównanie immunogenności ZIKV lub VLPs innych FV podawanych różnymi drogami. Najważniejszą obserwacją wynikającą z badań przedstawionych w tej pracy jest kluczowa rola schematu dawkowania, ale nie typu adiuwanta, dla immunogenności VLPs ZIKV w modelu mysim.

## 9. Wnioski

Podsumowując, wyniki uzyskane w niniejszej pracy pozwalają na sformułowanie następujących wniosków:

1. Oba regiony domen helikalnych - stem oraz transmembranowych – anchor glikoproteiny E ZIKV są zaangażowane w sekrecję cząstek wirusopodobnych z komórek ssaczy.
2. Region stem jest niezbędny do formowania się VLPs ZIKV w komórkach ssaczy.
3. Najbardziej optymalne do produkcji VLPs są linie komórkowe: 293T (system przejściowej ekspresji genów w komórkach ssaczy) oraz Sf9 (BEVS), gdyż tylko w nich białka prM i E ulegają prawidłowej obróbce proteolitycznej oraz sekrecji.
4. Produkcja VLPs w systemie komórek ssaczy może być wzmocniona przez suplementację maślanem sodu, a w systemie BEVS przez suplementację poliaminami oraz cholesterolem.
5. VLPs wyprodukowane w obu typach komórek eukariotycznych charakteryzują się odmienną gęstością, która może wynikać z odmiennego składu białkowego – cząstki pochodzące z komórek 293T zawierają białko E i dojrzałe białko M, natomiast w cząstkach pochodzących z komórek Sf9 wykryto białko E i fragment pr.
6. VLPs wyprodukowane w komórkach 293T charakteryzują się silniejszą ekspozycją epitopów w glikoproteinie E oraz epitopów dimerycznych tego białka.
7. Glikoproteina E w VLPs w obu typach komórek ulega N-glikozylacji. Nie zaobserwowano obecności wysokomannozowych łańcuchów cukrowych. Pomimo tego, VLPs pochodzące z komórek 293T o najmniejszej gęstości wykazały wiązanie do receptorów lektynowych typu C - DC-SIGN i DC-SIGN-R, co wskazuje na możliwy udział innych cukrów w tym oddziaływaniu.
8. Po raz pierwszy wykazano O-glikozylację glikoproteiny E w VLPs wyprodukowanych w obu typach komórek. Jednakże zaobserwowano zróżnicowanie między VLPs o różnej gęstości oraz między systemami. Dalsze badania są wymagane do dokładnego poznania profilu glikozylacji białek ZIKV oraz roli O-glikozylacji w procesie składania VLPs/cyklu replikacyjnym.
9. VLPs z komórek 293T charakteryzują się silniejszą immunogennością niż VLPs z komórek Sf9 w modelu mysim. Może być to spowodowane niższą ekspozycją determinant antygenowych na cząstkach pochodzących z systemu BEVS.

10. Modyfikacja sekwencji sygnałowej białka prM oraz wstawienie samorozszczepiającego peptydu P2A między białka prM i E pozwoliło na bardziej wydajne formowanie się dimerów białka E w komórkach 293T. Rekombinowane VLPs (F2A) miały również wyższy potencjał immunogeny.
11. Oczyszczanie rekombinowanych VLPs z pożywki hodowlanej jest możliwe przez zastosowanie prostych metod chromatograficznych. Oczyszczone cząstki zachowują swoje właściwości antygenowe.
12. Schemat dawkowania rekombinowanych VLPs w formulacji szczepionkowej miał kluczowe znaczenie we wzbudzeniu silnej odpowiedzi humoralnej w modelu mysim. Podskórne podanie trzech wzrastających dawek VLPs (w połączeniu z adiuwantem) przyczyniło się do zwiększenia poziomu przeciwciał IgG oraz przeciwciał neutralizujących wirusa Zika.
13. Nie zaobserwowano różnic w typie oraz sile odpowiedzi immunologicznej po podaniu rekombinowanych VLPs z różnymi adiuwantami (AddaVax lub alum/MPLA).

Uzyskane w niniejszej pracy rezultaty mogą przyczynić się do racjonalnego zaprojektowania antygenów szczepionkowych w postaci cząstek wirusopodobnych, wyboru systemu ekspresji genów do ich optymalnej produkcji w komórkach eukariotycznych. Ponadto, wyniki przedstawione w poniższej pracy zwracają uwagę na ważność rodzaju podania oraz formulacji VLPs jako antygenów szczepionkowych. Co więcej, dane te mogą w przyszłości pomóc opracować skuteczny oraz bezpieczny preparat szczepionkowy do profilaktyki wirusa Zika, a także innych wirusów z rodzaju *Flavivirus*.

## 10. Referencje

1. Abbink, P., Larocca, R.A., Dejnirattisai, W., Peterson, R., Nkolola, J.P., Borducchi, E.N., Supasa, P., Mongkolsapaya, J., Screaton, G.R. i Barouch, D.H., 2018. Therapeutic and Protective Efficacy of a Dengue Antibody Against Zika Infection in Rhesus Monkeys. *Nature medicine*, 24(6), s. 721–723.
2. Abbink, P., Larocca, R.A., Visitsunthorn, K., Boyd, M., De La Barrera, R.A., Gromowski, G.D., Kirilova, M., Peterson, R., Li, Z., Nanayakkara, O., Nityanandam, R., Mercado, N.B., Borducchi, E.N., Chandrashekar, A., Jetton, D., Mojta, S., Gandhi, P., LeSuer, J., Khatiwada, S., Lewis, M.G., Modjarrad, K., Jarman, R.G., Eckels, K.H., Thomas, S.J., Michael, N.L. i Barouch, D.H., 2017. Durability and correlates of vaccine protection against Zika virus in rhesus monkeys. *Science Translational Medicine*, 9(420), s. eaao4163.
3. Ades, A.E., Soriano-Arandes, A., Alarcon, A., Bonfante, F., Thorne, C., Peckham, C.S. i Giaquinto, C., 2021. Vertical transmission of Zika virus and its outcomes: a Bayesian synthesis of prospective studies. *The Lancet. Infectious Diseases*, 21(4), s. 537–545.
4. Allison, S.L., Stiasny, K., Stadler, K., Mandl, C.W. i Heinz, F.X., 1999. Mapping of functional elements in the stem-anchor region of tick-borne encephalitis virus envelope protein E. *Journal of virology*, 73(7), s. 5605–5612.
5. Allison, S.L., Tao, Y.J., O’Riordain, G., Mandl, C.W., Harrison, S.C. i Heinz, F.X., 2003. Two Distinct Size Classes of Immature and Mature Subviral Particles from Tick-Borne Encephalitis Virus. *Journal of Virology*, 77(21), s. 11357–11366.
6. Almeida, P.R. de, Ehlers, L.P., Demoliner, M., Eisen, A.K.A., Girardi, V., Lorenzo, C.D., Bianchi, M.V., Mello, L., Pavarini, S.P., Driemeier, D., Sonne, L. i Spilki, F.R., 2019. *Detection of a novel African-lineage-like Zika virus naturally infecting free-living neotropical primates in Southern Brazil.* Dostępne na: <<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/828871v1>> [dostęp 6.08.2022].
7. Alvim, R.G.F., Itabaiana, I. i Castilho, L.R., 2019. Zika virus-like particles (VLPs): Stable cell lines and continuous perfusion processes as a new potential vaccine manufacturing platform. *Vaccine*, 37(47), s. 6970–6977.
8. Anon, 2019. *Epidemiological update: third case of locally acquired Zika virus disease in Hyères, France.* [online] European Centre for Disease Prevention and Control. Dostępne na: <<https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/epidemiological-update-third-case-locally-acquired-zika-virus-disease-hyeres-france>> [dostęp 17.09.2020].
9. Anon, 2022. *WHO statement on the first meeting of the International Health Regulations (2005) (IHR 2005) Emergency Committee on Zika virus and observed increase in neurological disorders and neonatal malformations.* [online] Dostępne na: <[https://www.who.int/news/item/01-02-2016-who-statement-on-the-first-meeting-of-the-international-health-regulations-\(2005\)-\(ihr-2005\)-emergency-committee-on-zika-virus-and-observed-increase-in-neurological-disorders-and-neonatal-malformations](https://www.who.int/news/item/01-02-2016-who-statement-on-the-first-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-(ihr-2005)-emergency-committee-on-zika-virus-and-observed-increase-in-neurological-disorders-and-neonatal-malformations)> [dostęp 6.08.2022].
10. Anon, 2022. *Zika epidemiology update - February 2022.* [online] Dostępne na: <<https://www.who.int/publications/m/item/zika-epidemiology-update---february-2022>> [dostęp 18.05.2022].
11. Anon, b.d. *2017-ago-10-phe-ZIKV-cases.pdf.* Dostępne na: <<https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2017/2017-ago-10-phe-ZIKV-cases.pdf>> [dostęp 6.08.2022].
12. Arora, U., Tyagi, P., Swaminathan, S. i Khanna, N., 2013. Virus-like particles displaying envelope domain III of dengue virus type 2 induce virus-specific antibody response in mice. *Vaccine*, 31(6), s. 873–878.
13. Aubry, F., Jacobs, S., Darmuzey, M., Lequime, S., Delang, L., Fontaine, A., Jupatanakul, N., Miot, E.F., Dabo, S., Manet, C., Montagutelli, X., Baidaliuk, A., Gámbaro, F., Simon-Lorière, E., Gilsoul, M., Romero-Vivas, C.M., Cao-Lormeau, V.-M., Jarman, R.G., Diagne, C.T., Faye, O., Faye, O., Sall, A.A., Neyts, J., Nguyen, L., Kaptein, S.J.F. i Lambrechts, L., 2021. Recent African strains of Zika virus display higher

- transmissibility and fetal pathogenicity than Asian strains. *Nature Communications*, 12(1), s. 916.
14. Austin, A.L., Galasso, B., Nickens, C., Knollmann-Ritschel, B. i Sharma, A., 2019. Inactivation of Zika Virus by Photoactive Iodonaphthyl Azide Preserves Immunogenic Potential of the Virus. *Pathogens*, 8(4), s. 188.
  15. Avelino-Silva, V.I., Alvarenga, C., Abreu, C., Tozetto-Mendoza, T.R., do Canto, C.L.M., Manuli, E.R., Mendes-Correa, M.C., Sabino, E.C., Figueiredo, W.M., Segurado, A.C. i Mayaud, P., 2018. Potential effect of Zika virus infection on human male fertility? *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 60, s. e64.
  16. Azevedo, R.S.S., de Sousa, J.R., Araujo, M.T.F., Martins Filho, A.J., de Alcantara, B.N., Araujo, F.M.C., Queiroz, M.G.L., Cruz, A.C.R., Vasconcelos, B.H.B., Chiang, J.O., Martins, L.C., Casseb, L.M.N., da Silva, E.V., Carvalho, V.L., Vasconcelos, B.C.B., Rodrigues, S.G., Oliveira, C.S., Quaresma, J.A.S. i Vasconcelos, P.F.C., 2018. In situ immune response and mechanisms of cell damage in central nervous system of fatal cases microcephaly by Zika virus. *Scientific Reports*, 8(1), s. 1.
  17. Bachmann, M.F., Lutz, M.D.B., Layton, G.T., Harris, S.J., Fehr, T., Rescigno, M. i Ricciardi-Castagnoli, P., 1996. Dendritic cells process exogenous viral proteins and virus-like particles for class I presentation to CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes. *European Journal of Immunology*, 26(11), s. 2595–2600.
  18. Backliwal, G., Hildinger, M., Kuettel, I., Delegrange, F., Hacker, D.L. i Wurm, F.M., 2008. Valproic acid: a viable alternative to sodium butyrate for enhancing protein expression in mammalian cell cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 101(1), s. 182–189.
  19. Barba-Spaeth, G., Dejnirattisai, W., Rouvinski, A., Vaney, M.-C., Medits, I., Sharma, A., Simon-Lorière, E., Sakuntabhai, A., Cao-Lormeau, V.-M., Haouz, A., England, P., Stiasny, K., Mongkolsapaya, J., Heinz, F.X., Screaton, G.R. i Rey, F.A., 2016. Structural basis of potent Zika–dengue virus antibody cross-neutralization. *Nature*, 536(7614), s. 48–53.
  20. Barbi, L., Coelho, A.V.C., Alencar, L.C.A. de i Crovella, S., 2018. Prevalence of Guillain-Barré syndrome among Zika virus infected cases: a systematic review and meta-analysis. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 22(2), s. 137–141.
  21. Bardina, S.V., Bunduc, P., Tripathi, S., Duehr, J., Frere, J.J., Brown, J.A., Nachbagauer, R., Foster, G.A., Krysztof, D., Tortorella, D., Stramer, S.L., García-Sastre, A., Krammer, F. i Lim, J.K., 2017. Enhancement of Zika virus pathogenesis by preexisting antinflavivirus immunity. *Science*, 356(6334), s. 175–180.
  22. Barzon, L., Percivalle, E., Pacenti, M., Rovida, F., Zavattoni, M., Del Bravo, P., Cattelan, A.M., Palù, G. i Baldanti, F., 2018. Virus and Antibody Dynamics in Travelers With Acute Zika Virus Infection. *Clinical Infectious Diseases*, 66(8), s. 1173–1180.
  23. Beaver, J.T., Lelutiu, N., Habib, R. i Skountzou, I., 2018. Evolution of Two Major Zika Virus Lineages: Implications for Pathology, Immune Response, and Vaccine Development. *Frontiers in Immunology*, 9, s. 1640.
  24. de Bernadi Schneider, A., Jacob Machado, D., Guirales, S. i Janies, D.A., 2020. FLAVi: An Enhanced Annotator for Viral Genomes of Flaviviridae. *Viruses*, 12(8), s. 892.
  25. Bessa, J., Zabel, F., Link, A., Jegerlehner, A., Hinton, H.J., Schmitz, N., Bauer, M., Kündig, T.M., Saudan, P. i Bachmann, M.F., 2012. Low-affinity B cells transport viral particles from the lung to the spleen to initiate antibody responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(50), s. 20566–20571.
  26. Blazevic, J., Rouha, H., Bradt, V., Heinz, F.X. i Stiasny, K., 2016. Membrane Anchors of the Structural Flavivirus Proteins and Their Role in Virus Assembly. *Journal of Virology*, 90(14), s. 6365–6378.
  27. Boigard, H., Alimova, A., Martin, G.R., Katz, A., Gottlieb, P. i Galarza, J.M., 2017. Zika virus-like particle (VLP) based vaccine. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11(5), s. e0005608.



28. Boigard, H., Cimica, V. i Galarza, J.M., 2018. Dengue-2 virus-like particle (VLP) based vaccine elicits the highest titers of neutralizing antibodies when produced at reduced temperature. *Vaccine*, 36(50), s. 7728–7736.
29. Brasil, P., Pereira, J.P., Moreira, M.E., Nogueira, R.M.R., Damasceno, L., Wakimoto, M., Rabello, R.S., Valderramos, S.G., Halai, U.-A., Salles, T.S., Zin, A.A., Horovitz, D., Daltro, P., Boechat, M., Gabaglia, C.R., de Sequeira, P.C., Pilotto, J.H., Medialdea-Carrera, R., da Cunha, D.C., de Carvalho, L.M.A., Pone, M., Siqueira, A.M., Calvet, G.A., Baião, A.E.R., Neves, E.S., de Carvalho, P.R.N., Hasue, R.H., Marschik, P.B., Einspieler, C., Janzen, C., Cherry, J.D., de Filippis, A.M.B. i Nielsen-Saines, K., 2016. Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. *The New England journal of medicine*, 375(24), s. 2321–2334.
30. Brewer, J.M., Conacher, M., Hunter, C.A., Mohrs, M., Brombacher, F. i Alexander, J., 1999. Aluminium hydroxide adjuvant initiates strong antigen-specific Th2 responses in the absence of IL-4- or IL-13-mediated signaling. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 163(12), s. 6448–6454.
31. Bullard, B.L., Corder, B.N., Gorman, M.J., Diamond, M.S. i Weaver, E.A., 2018. Efficacy of a T Cell-Biased Adenovirus Vector as a Zika Virus Vaccine. *Scientific Reports*, 8(1), s. 18017.
32. Byk, L.A., Iglesias, N.G., De Maio, F.A., Gebhard, L.G., Rossi, M. i Gamarnik, A.V., 2016. Dengue Virus Genome Uncoating Requires Ubiquitination. *mBio*, 7(3), s. e00804-16.
33. Calabro, S., Tritto, E., Pezzotti, A., Taccone, M., Muzzi, A., Bertholet, S., De Gregorio, E., O'Hagan, D.T., Baudner, B. i Seubert, A., 2013. The adjuvant effect of MF59 is due to the oil-in-water emulsion formulation, none of the individual components induce a comparable adjuvant effect. *Vaccine*, 31(33), s. 3363–3369.
34. Cao, B., Diamond, M.S. i Mysorekar, I.U., 2017. Maternal-Fetal Transmission of Zika Virus: Routes and Signals for Infection. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 37(7), s. 287–294.
35. Cao-Lormeau, V.-M., Blake, A., Mons, S., Lastère, S., Roche, C., Vanhomwegen, J., Dub, T., Baudouin, L., Teissier, A., Larre, P., Vial, A.-L., Decam, C., Choumet, V., Halstead, S.K., Willison, H.J., Musset, L., Manuguerra, J.-C., Despres, P., Fournier, E., Mallet, H.-P., Musso, D., Fontanet, A., Neil, J. i Ghawché, F., 2016. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *The Lancet*, 387(10027), s. 1531–1539.
36. Cao-Lormeau, V.-M., Roche, C., Teissier, A., Robin, E., Berry, A.-L., Mallet, H.-P., Sall, A.A. i Musso, D., 2014. Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013. *Emerging Infectious Diseases*, 20(6), s. 1085–1086.
37. Carbaugh, D.L., Baric, R.S. i Lazear, H.M., 2019. Envelope Protein Glycosylation Mediates Zika Virus Pathogenesis. *Journal of Virology*, [online] 93(12). Dostępne na: <<https://jvi.asm.org/content/93/12/e00113-19>> [dostęp 16.10.2020].
38. Cavalcanti, M.G., Cabral-Castro, M.J., Gonçalves, J.L.S., Santana, L.S., Pimenta, E.S. i Peralta, J.M., 2017. Zika virus shedding in human milk during lactation: an unlikely source of infection? *International Journal of Infectious Diseases*, 57, s. 70–72.
39. Chang, G.-J.J., Hunt, A.R., Holmes, D.A., Springfield, T., Chiueh, T.-S., Roehrig, J.T. i Gubler, D.J., 2003. Enhancing biosynthesis and secretion of premembrane and envelope proteins by the chimeric plasmid of dengue virus type 2 and japanese encephalitis virus. *Virology*, 306(1), s. 170–180.
40. Chazal, M., Beauclair, G., Gracias, S., Najburg, V., Simon-Lorière, E., Tangy, F., Komarova, A.V. i Jouvenet, N., 2018. RIG-I Recognizes the 5' Region of Dengue and Zika Virus Genomes. *Cell Reports*, 24(2), s. 320–328.
41. Chen, J., Yang, Y.-F., Yang, Y., Zou, P., Chen, J., He, Y., Shui, S.-L., Cui, Y.-R., Bai, R., Liang, Y.-J., Hu, Y., Jiang, B., Lu, L., Zhang, X., Liu, J. i Xu, J., 2018. AXL promotes Zika virus infection in astrocytes by antagonizing type I interferon signalling. *Nature Microbiology*, 3(3), s. 302–309.

42. Cherrier, M.V., Kaufmann, B., Nybakken, G.E., Lok, S.-M., Warren, J.T., Chen, B.R., Nelson, C.A., Kostyuchenko, V.A., Holdaway, H.A., Chipman, P.R., Kuhn, R.J., Diamond, M.S., Rossmann, M.G. i Fremont, D.H., 2009. Structural basis for the preferential recognition of immature flaviviruses by a fusion-loop antibody. *The EMBO journal*, 28(20), s. 3269–3276.
43. Chua, A.J., Vitoret, C., Tan, M.L., Gonzalez, G., Boulanger, P., Ng, M.-L. i Hong, S.-S., 2013. a novel platform for virus-like particle-display of flaviviral envelope domain III: induction of Dengue and West Nile virus neutralizing antibodies. *Virology journal*, 10(1), s. 129.
44. Chua, B.Y., Johnson, D., Tan, A., Earnest-Silveira, L., Sekiya, T., Chin, R., Torresi, J. i Jackson, D.C., 2012. Hepatitis C VLPs Delivered to Dendritic Cells by a TLR2 Targeting Lipopeptide Results in Enhanced Antibody and Cell-Mediated Responses. *PLOS ONE*, 7(10), s. e47492.
45. Chung, B., Jeong, Y., Choi, O. i Kim, J., 2001. Effect of Sodium Butyrate on Glycosylation of Recombinant Erythropoietin. W: E. Lindner-Olsson, N. Chatzissavidou i E. Lüllau, red., *Animal Cell Technology: From Target to Market: Proceedings of the 17th ESACT Meeting Tylösand, Sweden, June 10–14, 2001*, ESACT Proceedings. [online] Dordrecht: Springer Netherlands, s. 207–209. Dostępne na: <[https://doi.org/10.1007/978-94-010-0369-8\\_46](https://doi.org/10.1007/978-94-010-0369-8_46)> [dostęp 29.05.2022].
46. Ci, Y., Liu, Z.-Y., Zhang, N.-N., Niu, Y., Yang, Y., Xu, C., Yang, W., Qin, C.-F. i Shi, L., 2020. Zika NS1-induced ER remodeling is essential for viral replication. *The Journal of Cell Biology*, 219(2), s. e201903062.
47. Cielens, I., Jackevica, L., Strods, A., Kazaks, A., Ose, V., Bogans, J., Pumpens, P. i Renhofa, R., 2014. Mosaic RNA Phage VLPs Carrying Domain III of the West Nile Virus E Protein. *Molecular Biotechnology*, 56(5), s. 459–469.
48. Cimini, E., Castilletti, C., Sacchi, A., Casetti, R., Bordoni, V., Romanelli, A., Turchi, F., Martini, F., Tumino, N., Nicastrì, E., Corpolongo, A., Di Caro, A., Kobinger, G., Zumla, A., Capobianchi, M.R., Ippolito, G. i Agrati, C., 2017. Human Zika infection induces a reduction of IFN- $\gamma$  producing CD4 T-cells and a parallel expansion of effector V $\delta$ 2 T-cells. *Scientific Reports*, 7, s. 6313.
49. Ciota, A.T., Bialosuknia, S.M., Ehrbar, D.J. i Kramer, L.D., 2017. Vertical Transmission of Zika Virus by *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* Mosquitoes. *Emerging Infectious Diseases*, 23(5), s. 880–882.
50. Cirelli, K.M., Carnathan, D.G., Nogal, B., Martin, J.T., Rodriguez, O.L., Upadhyay, A.A., Enemuo, C.A., Gebru, E.H., Choe, Y., Viviano, F., Nakao, C., Pauthner, M.G., Reiss, S., Cottrell, C.A., Smith, M.L., Bastidas, R., Gibson, W., Wolabaugh, A.N., Melo, M.B., Cosette, B., Kumar, V., Patel, N.B., Tokatlian, T., Menis, S., Kulp, D.W., Burton, D.R., Murrell, B., Schief, W.R., Bosinger, S.E., Ward, A.B., Watson, C.T., Silvestri, G., Irvine, D.J. i Crotty, S., 2019. Slow delivery immunization enhances HIV neutralizing antibody and germinal center responses via modulation of immunodominance. *Cell*, 177(5), s. 1153-1171.e28.
51. Cloherty, A.P.M., Olmstead, A.D., Ribeiro, C.M.S. i Jean, F., 2020. Hijacking of Lipid Droplets by Hepatitis C, Dengue and Zika Viruses—From Viral Protein Moonlighting to Extracellular Release. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), s. 7901.
52. Collar, A.L., Clarke, E.C., Anaya, E., Merrill, D., Yarborough, S., Anthony, S.M., Kuhn, J.H., Merle, C., Theisen, M. i Bradfute, S.B., 2017. Comparison of N- and O-linked glycosylation patterns of ebolavirus glycoproteins. *Virology*, 502, s. 39–47.
53. Cortese, M., Goellner, S., Acosta, E.G., Neufeldt, C.J., Oleksiuk, O., Lampe, M., Haselmann, U., Funaya, C., Schieber, N., Ronchi, P., Schorb, M., Pruunsild, P., Schwab, Y., Chatel-Chaix, L., Ruggieri, A. i Bartenschlager, R., 2017. Ultrastructural Characterization of Zika Virus Replication Factories. *Cell Reports*, 18(9), s. 2113–2123.
54. Costa, F., Sarno, M., Khouri, R., de Paula Freitas, B., Siqueira, I., Ribeiro, G.S., Ribeiro, H.C., Campos, G.S., Alcântara, L.C., Reis, M.G., Weaver, S.C., Vasilakis, N., Ko, A.I. i Almeida, A.R., 2016. Emergence of Congenital Zika Syndrome: Viewpoint From the Front Lines. *Annals of internal medicine*, 164(10), s. 689–691.

55. Cribbs, A.P., Kennedy, A., Gregory, B. i Brennan, F.M., 2013. Simplified production and concentration of lentiviral vectors to achieve high transduction in primary human T cells. *BMC Biotechnology*, 13(1), s. 98.
56. Croset, A., Delafosse, L., Gaudry, J.-P., Arod, C., Glez, L., Losberger, C., Begue, D., Krstanovic, A., Robert, F., Vilbois, F., Chevalet, L. i Antonsson, B., 2012. Differences in the glycosylation of recombinant proteins expressed in HEK and CHO cells. *Journal of Biotechnology*, 161(3), s. 336–348.
57. Cukan, M.C., Hopkins, D., Burnina, I., Button, M., Giaccone, E., Houston-Cummings, N.R., Jiang, Y., Li, F., Mallem, M., Mitchell, T., Moore, R., Nylen, A., Prinz, B., Rios, S., Sharkey, N., Zha, D., Hamilton, S., Li, H. i Stadheim, T.A., 2012. Binding of DC-SIGN to glycoproteins expressed in glycoengineered *Pichia pastoris*. *Journal of Immunological Methods*, 386(1–2), s. 34–42.
58. Dai, L., Song, J., Lu, X., Deng, Y.-Q., Musyoki, A.M., Cheng, H., Zhang, Y., Yuan, Y., Song, H., Haywood, J., Xiao, H., Yan, J., Shi, Y., Qin, C.-F., Qi, J. i Gao, G.F., 2016. Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody. *Cell Host & Microbe*, 19(5), s. 696–704.
59. Dai, S., Zhang, T., Zhang, Y., Wang, H. i Deng, F., 2018a. Zika Virus Baculovirus-Expressed Virus-Like Particles Induce Neutralizing Antibodies in Mice. *Virologica Sinica*, 33(3), s. 213–226.
60. Dai, S., Zhang, Y., Zhang, T., Zhang, B., Wang, H. i Deng, F., 2018b. Establishment of Baculovirus-Expressed VLPs Induced Syncytial Formation Assay for Flavivirus Antiviral Screening. *Viruses*, 10(7).
61. De Lorenzo, G., Tandavanitj, R., Doig, J., Setthapramote, C., Poggianella, M., Sanchez-Velazquez, R., Scales, H.E., Edgar, J.M., Kohl, A., Brewer, J., Burrone, O.R. i Patel, A.H., 2020. Zika Virus-Like Particles Bearing a Covalent Dimer of Envelope Protein Protect Mice from Lethal Challenge. *Journal of Virology*, 95(1), s. e01415-20.
62. Dejnirattisai, W., Wongwiwat, W., Supasa, S., Zhang, X., Dai, X., Rouvinski, A., Jumnainsong, A., Edwards, C., Quyen, N.T.H., Duangchinda, T., Grimes, J.M., Tsai, W.-Y., Lai, C.-Y., Wang, W.-K., Malasit, P., Farrar, J., Simmons, C.P., Zhou, Z.H., Rey, F.A., Mongkolsapaya, J. i Screaton, G.R., 2015. a new class of highly potent, broadly neutralizing antibodies isolated from viremic patients infected with dengue virus. *Nature Immunology*, 16(2), s. 170–177.
63. Dick, G.W.A., Kitchen, S.F. i Haddow, A.J., 1952. Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 46(5), s. 509–520.
64. Du, R., Yin, F., Wang, M., Hu, Z., Wang, H. i Deng, F., 2015. Glycoprotein E of the Japanese encephalitis virus forms virus-like particles and induces syncytia when expressed by a baculovirus. *Journal of General Virology*, 96(5), s. 1006–1014.
65. Du, S., Liu, Y., Liu, J., Zhao, J., Champagne, C., Tong, L., Zhang, R., Zhang, F., Qin, C.-F., Ma, P., Chen, C.-H., Liang, G., Liu, Q., Shi, P.-Y., Cazelles, B., Wang, P., Tian, H. i Cheng, G., 2019. Aedes mosquitoes acquire and transmit Zika virus by breeding in contaminated aquatic environments. *Nature Communications*, 10(1), s. 1324.
66. Duffy, M.R., Chen, T.-H., Hancock, W.T., Powers, A.M., Kool, J.L., Lanciotti, R.S., Pretrick, M., Marfel, M., Holzbauer, S., Dubray, C., Guillaumot, L., Griggs, A., Bel, M., Lambert, A.J., Laven, J., Kosoy, O., Panella, A., Biggerstaff, B.J., Fischer, M. i Hayes, E.B., 2009. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *The New England Journal of Medicine*, 360(24), s. 2536–2543.
67. Dussupt, V., Sankhala, R.S., Gromowski, G.D., Donofrio, G., De La Barrera, R.A., Larocca, R.A., Zaky, W., Mendez-Rivera, L., Choe, M., Davidson, E., McCracken, M.K., Brien, J.D., Abbink, P., Bai, H., Bryan, A.L., Bias, C.H., Berry, I.M., Botero, N., Cook, T., Doria-Rose, N.A., Escuer, A.G. i Frimpong, J.A., Geretz, A., Hernandez, M., Hollidge, B.S., Jian, N., Kabra, K., Leggat, D.J., Liu, J., Pinto, A.K., Rutvisuttinunt, W., Setliff, I., Tran, U., Townsley, S., Doranz, B.J., Rolland, M., McDermott, A.B., Georgiev, I.S., Thomas, R., Robb, M.L., Eckels, K.H., Barranco, E., Koren, M., Smith, D.R., Jarman, R.G., George, S.L., Stephenson, K.E., Barouch, D.H., Modjarrad, K., Michael,

- N.L., Joyce, M.G. i Krebs, S.J., 2020. Potent Zika and dengue cross-neutralizing antibodies induced by Zika vaccination in a dengue-experienced donor. *Nature Medicine*, 26(2), s. 228–235.
68. El Costa, H., Gouilly, J., Mansuy, J.-M., Chen, Q., Levy, C., Cartron, G., Veas, F., Al-Daccak, R., Izopet, J. i Jabrane-Ferrat, N., 2016. ZIKA virus reveals broad tissue and cell tropism during the first trimester of pregnancy. *Scientific Reports*, 6, s. 35296.
69. El Sahly, H.M., Gorchakov, R., Lai, L., Natrajan, M.S., Patel, S.M., Atmar, R.L., Keitel, W.A., Hoft, D.F., Barrett, J., Bailey, J., Edupuganti, S., Raabe, V., Wu, H.M., Fairley, J., Roupahel, N., Murray, K.O. i Mulligan, M.J., 2018. Clinical, Virologic, and Immunologic Characteristics of Zika Virus Infection in a Cohort of US Patients: Prolonged RNA Detection in Whole Blood. *Open Forum Infectious Diseases*, 6(1), s. ofy352.
70. Espinosa, D., Mendy, J., Manayani, D., Vang, L., Wang, C., Richard, T., Guenther, B., Aruri, J., Avanzini, J., Garduno, F., Farness, P., Gurwith, M., Smith, J., Harris, E. i Alexander, J., 2018. Passive Transfer of Immune Sera Induced by a Zika Virus-Like Particle Vaccine Protects AG129 Mice Against Lethal Zika Virus Challenge. *EBioMedicine*, 27, s. 61–70.
71. Fabrizi, F., Tarantino, A., Castelnuovo, C., Martin, P. i Messa, P., 2015. Recombinant Hepatitis B Vaccine Adjuvanted With AS04 in Dialysis Patients: a Prospective Cohort Study. *Kidney & Blood Pressure Research*, 40(6), s. 584–592.
72. Fanunza, E., Grandi, N., Quartu, M., Carletti, F., Ermellino, L., Milia, J., Corona, A., Capobianchi, M.R., Ippolito, G. i Tramontano, E., 2021. INMI1 Zika Virus NS4B Antagonizes the Interferon Signaling by Suppressing STAT1 Phosphorylation. *Viruses*, 13(12), s. 2448.
73. Fausch, S.C., Da Silva, D.M. i Kast, W.M., 2003. Differential Uptake and Cross-Presentation of Human Papillomavirus Virus-like Particles by Dendritic Cells and Langerhans Cells1. *Cancer Research*, 63(13), s. 3478–3482.
74. Fayzulín, R., Scholle, F., Petrakova, O., Frolov, I. i Mason, P.W., 2006. Evaluation of replicative capacity and genetic stability of West Nile virus replicons using highly efficient packaging cell lines. *Virology*, 351(1), s. 196–209.
75. Ferlenghi, I., Clarke, M., Ruttan, T., Allison, S.L., Schalich, J., Heinz, F.X., Harrison, S.C., Rey, F.A. i Fuller, S.D., 2001. Molecular Organization of a Recombinant Subviral Particle from Tick-Borne Encephalitis Virus. *Molecular Cell*, 7(3), s. 593–602.
76. Fernandez, E., Dejnirattisai, W., Cao, B., Scheaffer, S.M., Supasa, P., Wongwiwat, W., Esakky, P., Drury, A., Mongkolsapaya, J., Moley, K.H., Mysorekar, I.U., Screaton, G.R. i Diamond, M.S., 2017. Human antibodies to the dengue virus E-dimer epitope have therapeutic activity against Zika virus infection. *Nature Immunology*, 18(11), s. 1261–1269.
77. Fontes-Garfias, C.R., Shan, C., Luo, H., Muruato, A.E., Medeiros, D.B.A., Mays, E., Xie, X., Zou, J., Roundy, C.M., Wakamiya, M., Rossi, S.L., Wang, T., Weaver, S.C. i Shi, P.-Y., 2017. Functional Analysis of Glycosylation of Zika Virus Envelope Protein. *Cell Reports*, 21(5), s. 1180–1190.
78. Gallichotte, E.N., Young, E.F., Baric, T.J., Yount, B.L., Metz, S.W., Begley, M.C., de Silva, A.M. i Baric, R.S., 2019. Role of Zika Virus Envelope Protein Domain III as a Target of Human Neutralizing Antibodies. *mBio*, 10(5), s. e01485-19.
79. Gao, D., Lou, Y., He, D., Porco, T.C., Kuang, Y., Chowell, G. i Ruan, S., 2016. Prevention and Control of Zika as a Mosquito-Borne and Sexually Transmitted Disease: a Mathematical Modeling Analysis. *Scientific Reports*, 6(1), s. 28070.
80. Gao, H., Lin, Y., He, J., Zhou, S., Liang, M., Huang, C., Li, X., Liu, C. i Zhang, P., 2019. Role of heparan sulfate in the Zika virus entry, replication, and cell death. *Virology*, 529, s. 91–100.
81. Gao, X., Wen, Y., Wang, J., Hong, W., Li, C., Zhao, L., Yin, C., Jin, X., Zhang, F. i Yu, L., 2018. Delayed and highly specific antibody response to nonstructural protein 1 (NS1) revealed during natural human ZIKV infection by NS1-based capture ELISA. *BMC Infectious Diseases*, 18(1), s. 275.

82. García-Piñeres, A.J., Hildesheim, A., Trivett, M., Williams, M., Wu, L., KewalRamani, V.N. i Pinto, L.A., 2006. Role of DC-SIGN in the activation of dendritic cells by HPV-16 L1 virus-like particle vaccine. *European Journal of Immunology*, 36(2), s. 437–445.
83. Garçon, N., Vaughn, D.W. i Didierlaurent, A.M., 2012. Development and evaluation of AS03, an Adjuvant System containing  $\alpha$ -tocopherol and squalene in an oil-in-water emulsion. *Expert Review of Vaccines*, 11(3), s. 349–366.
84. Garg, H., Sedano, M., Plata, G., Punke, E.B. i Joshi, A., 2017. Development of Virus like Particle Vaccine and Reporter Assay for Zika Virus. *Journal of Virology*, s. JVI.00834-17.
85. Gaunitz, S., Jin, C., Nilsson, A., Liu, J., Karlsson, N.G. i Holgersson, J., 2013. Mucin-type proteins produced in the *Trichoplusia ni* and *Spodoptera frugiperda* insect cell lines carry novel O-glycans with phosphocholine and sulfate substitutions. *Glycobiology*, 23(7), s. 778–796.
86. Giraldo, M.I., Xia, H., Aguilera-Aguirre, L., Hage, A., van Tol, S., Shan, C., Xie, X., Sturdevant, G.L., Robertson, S.J., McNally, K.L., Meade-White, K., Azar, S.R., Rossi, S.L., Maury, W., Woodson, M., Ramage, H., Johnson, J.R., Krogan, N.J., Morais, M.C., Best, S.M., Shi, P.-Y. i Rajsbaum, R., 2020. Envelope protein ubiquitination drives entry and pathogenesis of Zika virus. *Nature*, 585(7825), s. 414–419.
87. Giron, S., Franke, F., Decoppet, A., Cadiou, B., Travaglini, T., Thirion, L., Durand, G., Jeannin, C., L'Ambert, G., Grard, G., Noël, H., Fournet, N., Auzet-Caillaud, M., Zandotti, C., Aboukaïs, S., Chaud, P., Guedj, S., Hamouda, L., Naudot, X., Ovize, A., Lazarus, C., de Valk, H., Paty, M.-C. i Leparc-Goffart, I., 2019. Vector-borne transmission of Zika virus in Europe, southern France, August 2019. *Eurosurveillance*, [online] 24(45). Dostępne na: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6852313/>> [dostęp 15.03.2020].
88. Gomard, Y., Lebon, C., Mavingui, P. i Atyame, C.M., 2020. Contrasted transmission efficiency of Zika virus strains by mosquito species *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* from Reunion Island. *Parasites & Vectors*, 13(1), s. 398.
89. Gong, D., Zhang, T.-H., Zhao, D., Du, Y., Chapa, T.J., Shi, Y., Wang, L., Contreras, D., Zeng, G., Shi, P.-Y., Wu, T.-T., Arumugaswami, V. i Sun, R., 2018. High-Throughput Fitness Profiling of Zika Virus E Protein Reveals Different Roles for Glycosylation during Infection of Mammalian and Mosquito Cells. *iScience*, 1, s. 97–111.
90. Goo, L., DeMaso, C.R., Pelc, R.S., Ledgerwood, J.E., Graham, B.S., Kuhn, R.J. i Pierson, T.C., 2018. The Zika virus envelope protein glycan loop regulates virion antigenicity. *Virology*, 515, s. 191–202.
91. Gourinat, A.-C., O'Connor, O., Calvez, E., Goarant, C. i Dupont-Rouzeyrol, M., 2015. Detection of Zika Virus in Urine. *Emerging Infectious Diseases*, 21(1), s. 84–86.
92. Govero, J., Esakky, P., Scheaffer, S.M., Fernandez, E., Drury, A., Platt, D.J., Gorman, M.J., Richner, J.M., Caine, E.A., Salazar, V., Moley, K.H. i Diamond, M.S., 2016. Zika virus infection damages the testes in mice. *Nature*, 540(7633), s. 438–442.
93. Grant, A., Ponia, S.S., Tripathi, S., Balasubramaniam, V., Miorin, L., Sourisseau, M., Schwarz, M.C., Sánchez-Seco, M.P., Evans, M.J., Best, S.M. i García-Sastre, A., 2016. Zika Virus Targets Human STAT2 to Inhibit Type I Interferon Signaling. *Cell Host & Microbe*, 19(6), s. 882–890.
94. Grifoni, A., Pham, J., Sidney, J., O'Rourke, P.H., Paul, S., Peters, B., Martini, S.R., de Silva, A.D., Ricciardi, M.J., Magnani, D.M., Silveira, C.G.T., Maestri, A., Costa, P.R., de-Oliveira-Pinto, L.M., de Azeredo, E.L., Damasco, P.V., Phillips, E., Mallal, S., de Silva, A.M., Collins, M., Durbin, A., Diehl, S.A., Cerpas, C., Balmaseda, A., Kuan, G., Coloma, J., Harris, E., Crowe, J.E., Stone, M., Norris, P.J., Busch, M., Vivanco-Cid, H., Cox, J., Graham, B.S., Ledgerwood, J.E., Turtle, L., Solomon, T., Kallas, E.G., Watkins, D.I., Weiskopf, D. i Sette, A., 2017. Prior Dengue Virus Exposure Shapes T Cell Immunity to Zika Virus in Humans. *Journal of Virology*, 91(24), s. e01469-17.
95. Grubaugh, N.D., Faria, N.R., Andersen, K.G. i Pybus, O.G., 2018. Genomic Insights into Zika Virus Emergence and Spread. *Cell*, 172(6), s. 1160–1162.

96. Gugliotta, A., Oggero-Eberhardt, M., Etcheverrigaray, M., Kratje, R. i Ceaglio, N., 2013. Differences in the production of hyperglycosylated IFN alpha in CHO and HEK 293 cells. *BMC Proceedings*, 7(Suppl 6), s. P33.
97. Guo, Q., Chan, J.F.-W., Poon, V.K.-M., Wu, S., Chan, C.C.-S., Hou, L., Yip, C.C.-Y., Ren, C., Cai, J.-P., Zhao, M., Zhang, A.J., Song, X., Chan, K.-H., Wang, B., Kok, K.-H., Wen, Y., Yuen, K.-Y. i Chen, W., 2018a. Immunization With a Novel Human Type 5 Adenovirus-Vectored Vaccine Expressing the Premembrane and Envelope Proteins of Zika Virus Provides Consistent and Sterilizing Protection in Multiple Immunocompetent and Immunocompromised Animal Models. *The Journal of Infectious Diseases*, 218(3), s. 365–377.
98. Guo, Y., Yu, H., Zhong, Y., He, Y., Qin, X., Qin, Y., Zhou, Y., Zhang, P., Zhang, Y., Li, Z. i Jia, Z., 2018b. Lectin microarray and mass spectrometric analysis of hepatitis C proteins reveals N-linked glycosylation. *Medicine*, 97(15), s. e0208.
99. Gupta, R.K. i Gupta, G.S., 2012. DC-SIGN Family of Receptors. W: G.S. Gupta, red., *Animal Lectins: Form, Function and Clinical Applications*. [online] Vienna: Springer, s. 773–798. Dostępne na: <[https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1065-2\\_36](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1065-2_36)> [dostęp 1.08.2022].
100. Gwon, Y.-D., Zusinaite, E., Merits, A., Överby, A.K. i Evander, M., 2020. N-glycosylation in the Pre-Membrane Protein Is Essential for the Zika Virus Life Cycle. *Viruses*, 12(9), s. 925.
101. Haby, M.M., Pinart, M., Elias, V. i Reveiz, L., 2018. Prevalence of asymptomatic Zika virus infection: a systematic review. *Bulletin of the World Health Organization*, 96(6), s. 402-413D.
102. Hackett, B.A. i Cherry, S., 2018. Flavivirus internalization is regulated by a size-dependent endocytic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(16), s. 4246–4251.
103. Haddow, A.D., Schuh, A.J., Yasuda, C.Y., Kasper, M.R., Heang, V., Huy, R., Guzman, H., Tesh, R.B. i Weaver, S.C., 2012. Genetic Characterization of Zika Virus Strains: Geographic Expansion of the Asian Lineage. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 6(2), s. e1477.
104. Halstead, S.B., 2003. Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. *Advances in Virus Research*, 60, s. 421–467.
105. Hamel, R., Dejarnac, O., Wichit, S., Ekchariyawat, P., Neyret, A., Luplertlop, N., Perera-Lecoin, M., Surasombattana, P., Talignani, L., Thomas, F., Cao-Lormeau, V.-M., Choumet, V., Briant, L., Desprès, P., Amara, A., Yssel, H. i Missé, D., 2015. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *Journal of Virology*, 89(17), s. 8880–8896.
106. Han, H.-H., Diaz, C., Acosta, C.J., Liu, M. i Borkowski, A., 2021. Safety and immunogenicity of a purified inactivated Zika virus vaccine candidate in healthy adults: an observer-blind, randomised, phase 1 trial. *The Lancet Infectious Diseases*, 21(9), s. 1282–1292.
107. Hassert, M., Wolf, K.J., Schwetye, K.E., DiPaolo, R.J., Brien, J.D. i Pinto, A.K., 2018. CD4+T cells mediate protection against Zika associated severe disease in a mouse model of infection. *PLoS Pathogens*, 14(9), s. e1007237.
108. Heinimäki, S., Tamminen, K., Malm, M., Vesikari, T. i Blazevic, V., 2017. Live baculovirus acts as a strong B and T cell adjuvant for monomeric and oligomeric protein antigens. *Virology*, 511, s. 114–122.
109. van Hemert, F. i Berkhout, B., 2016. Nucleotide composition of the Zika virus RNA genome and its codon usage. *Virology Journal*, 13, s. 95.
110. Hirsch, A.J., Roberts, V.H.J., Grigsby, P.L., Haese, N., Schabel, M.C., Wang, X., Lo, J.O., Liu, Z., Kroenke, C.D., Smith, J.L., Kelleher, M., Broeckel, R., Kreklywich, C.N., Parkins, C.J., Denton, M., Smith, P., DeFilippis, V., Messer, W., Nelson, J.A., Hennebold, J.D., Grafe, M., Colgin, L., Lewis, A., Ducore, R., Swanson, T., Legasse, A.W., Axthelm, M.K., MacAllister, R., Moses, A.V., Morgan, T.K., Frias, A.E. i Streblow, D.N., 2018. Zika virus infection in pregnant rhesus macaques causes placental dysfunction and immunopathology. *Nature Communications*, 9(1), s. 263.

111. Hopkins, R. i Esposito, D., 2009. a rapid method for titrating baculovirus stocks using the Sf-9 Easy Titer cell line. *BioTechniques*, 47(3), s. 785–788.
112. Hsieh, S.-C., Tsai, W.-Y., Nerurkar, V.R. i Wang, W.-K., 2014. Characterization of the ectodomain of the envelope protein of dengue virus type 4: expression, membrane association, secretion and particle formation in the absence of precursor membrane protein. *PLoS one*, 9(6), s. e100641.
113. Hu, T., Li, J., Carr, M.J., Duchêne, S. i Shi, W., 2019. The Asian Lineage of Zika Virus: Transmission and Evolution in Asia and the Americas. *Virologica Sinica*, 34(1), s. 1–8.
114. Hua, R.-H., Li, Y.-N., Chen, Z.-S., Liu, L.-K., Huo, H., Wang, X.-L., Guo, L.-P., Shen, N., Wang, J.-F. i Bu, Z.-G., 2014. Generation and characterization of a new mammalian cell line continuously expressing virus-like particles of Japanese encephalitis virus for a subunit vaccine candidate. *BMC Biotechnology*, 14, s. 62.
115. Hunt, A.R., Cropp, C.B. i Chang, G.-J.J., 2001. a recombinant particulate antigen of Japanese encephalitis virus produced in stably-transformed cells is an effective noninfectious antigen and subunit immunogen. *Journal of Virological Methods*, 97(1), s. 133–149.
116. Jacobs, B.C., Rothbarth, P.H., Meché, F.G.A. van der, Herbrink, P., Schmitz, P.I.M., Klerk, M.A. de i Doorn, P.A. van, 1998. The spectrum of antecedent infections in Guillain-Barré syndrome: a case-control study. *Neurology*, 51(4), s. 1110–1115.
117. Jagger, B.W., Dowd, K.A., Chen, R.E., Desai, P., Foreman, B., Burgomaster, K.E., Himansu, S., Kong, W.-P., Graham, B.S., Pierson, T.C. i Diamond, M.S., 2019. Protective Efficacy of Nucleic Acid Vaccines Against Transmission of Zika Virus During Pregnancy in Mice. *The Journal of Infectious Diseases*, 220(10), s. 1577–1588.
118. Jain, N.K., Barkowski-Clark, S., Altman, R., Johnson, K., Sun, F., Zmuda, J., Liu, C.Y., Kita, A., Schulz, R., Neill, A., Ballinger, R., Patel, R., Liu, J., Mpanda, A., Huta, B., Chiou, H., Voegtli, W. i Panavas, T., 2017. a high density CHO-S transient transfection system: Comparison of ExpiCHO and Expi293. *Protein Expression and Purification*, 134, s. 38–46.
119. Jasperse, B., O’Connell, C.M., Wang, Y. i Verardi, P.H., 2021. Single dose of a replication-defective vaccinia virus expressing Zika virus-like particles is protective in mice. *Scientific Reports*, 11(1), s. 1–14.
120. Jenkins, D., 2008. a review of cross-protection against oncogenic HPV by an HPV-16/18 AS04-adjuvanted cervical cancer vaccine: importance of virological and clinical endpoints and implications for mass vaccination in cervical cancer prevention. *Gynecologic Oncology*, 110(3 Suppl 1), s. S18-25.
121. Jurado, K.A., Yockey, L.J., Wong, P.W., Lee, S., Huttner, A.J. i Iwasaki, A., 2018. Antiviral CD8 T cells induce Zika virus associated paralysis in mice. *Nature microbiology*, 3(2), s. 141–147.
122. Kasprzykowski, J.I., Fukutani, K.F., Fabio, H., Fukutani, E.R., Costa, L.C., Andrade, B.B. i Queiroz, A.T.L., 2020. a recursive sub-typing screening surveillance system detects the appearance of the ZIKV African lineage in Brazil: Is there a risk of a new epidemic? *International Journal of Infectious Diseases*, 96, s. 579–581.
123. Katzelnick, L.C., Narvaez, C., Arguello, S., Mercado, B.L., Collado, D., Ampie, O., Elizondo, D., Miranda, T., Carrillo, F.B., Mercado, J.C., Latta, K., Schiller, A., Segovia-Chumbez, B., Ojeda, S., Sanchez, N., Plazaola, M., Coloma, J., Halloran, M.E., Premkumar, L., Gordon, A., Narvaez, F., de Silva, A.M., Kuan, G., Balmaseda, A. i Harris, E., 2020. Zika virus infection enhances future risk of severe dengue disease. *Science (New York, N.Y.)*, 369(6507), s. 1123–1128.
124. Keffe, J.R., Van Rompay, K.K.A., Olsen, P.C., Wang, Q., Gazumyan, A., Azzopardi, S.A., Schaefer-Babajew, D., Lee, Y.E., Stuart, J.B., Singapuri, A., Watanabe, J., Usachenko, J., Ardeshir, A., Saeed, M., Agudelo, M., Eisenreich, T., Bournazos, S., Oliveira, T.Y., Rice, C.M., Coffey, L.L., MacDonald, M.R., Bjorkman, P.J., Nussenzweig, M.C. i Robbiani, D.F., 2018. a Combination of Two Human Monoclonal

- Antibodies Prevents Zika Virus Escape Mutations in Non-human Primates. *Cell Reports*, 25(6), s. 1385-1394.e7.
125. Khan, A.H., Bayat, H., Rajabibazl, M., Sabri, S. i Rahimpour, A., 2016. Humanizing glycosylation pathways in eukaryotic expression systems. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(1), s. 4.
  126. Khetarpal, N., Shukla, R., Rajpoot, R.K., Poddar, A., Pal, M., Swaminathan, S., Arora, U. i Khanna, N., 2017. Recombinant Dengue Virus 4 Envelope Glycoprotein Virus-Like Particles Derived from *Pichia pastoris* are Capable of Eliciting Homotypic Domain III-Directed Neutralizing Antibodies. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 96(1), s. 126–134.
  127. Khongwichit, S., Sornjai, W., Jitobaom, K., Greenwood, M., Greenwood, M.P., Hitakarun, A., Wikan, N., Murphy, D. i Smith, D.R., 2021. a functional interaction between GRP78 and Zika virus E protein. *Scientific Reports*, 11(1), s. 393.
  128. Kielian, M. i Rey, F.A., 2006. Virus membrane-fusion proteins: more than one way to make a hairpin. *Nature Reviews Microbiology*, 4(1), s. 67–76.
  129. Kim, I.-J., Lanthier, P.A., Clark, M.J., De La Barrera, R.A., Tighe, M.P., Szaba, F.M., Travis, K.L., Low-Beer, T.C., Cookenham, T.S., Lanzer, K.G., Bernacki, D.T., Johnson, L.L., Schneck, A.A., Ross, C.N., Tardif, S.D., Layne-Colon, D., Mdaki, S.D., Dick, E.J., Chuba, C., Gonzalez, O., Brasky, K.M., Dutton, J., Rutherford, J.N., Coffey, L.L., Singapuri, A., Martin, C.S.S., Chiu, C.Y., Thomas, S.J., Modjarrad, K., Patterson, J.L. i Blackman, M.A., 2022. Efficacy of an inactivated Zika vaccine against virus infection during pregnancy in mice and marmosets. *npj Vaccines*, 7(1), s. 1–10.
  130. Kim, J.H., Lee, S.-R., Li, L.-H., Park, H.-J., Park, J.-H., Lee, K.Y., Kim, M.-K., Shin, B.A. i Choi, S.-Y., 2011. High Cleavage Efficiency of a 2A Peptide Derived from Porcine Teschovirus-1 in Human Cell Lines, Zebrafish and Mice. *PLoS ONE*, 6(4), s. e18556.
  131. Kim, S.Y., Zhao, J., Liu, X., Fraser, K., Lin, L., Zhang, X., Zhang, F., Dordick, J.S. i Linhardt, R.J., 2017. Interaction of Zika Virus Envelope Protein with Glycosaminoglycans. *Biochemistry*, 56(8), s. 1151–1162.
  132. Koblishcke, M., Stiasny, K., Aberle, S.W., Malafa, S., Tsouchnikas, G., Schwaiger, J., Kundi, M., Heinz, F.X. i Aberle, J.H., 2018. Structural Influence on the Dominance of Virus-Specific CD4 T Cell Epitopes in Zika Virus Infection. *Frontiers in Immunology*, 9, s. 1196.
  133. Kojima, A., Yasuda, A., Asanuma, H., Ishikawa, T., Takamizawa, A., Yasui, K. i Kurata, T., 2003. Stable High-Producer Cell Clone Expressing Virus-Like Particles of the Japanese Encephalitis Virus E Protein for a Second-Generation Subunit Vaccine. *Journal of Virology*, 77(16), s. 8745–8755.
  134. Konishi, E., Fujii, A. i Mason, P.W., 2001. Generation and Characterization of a Mammalian Cell Line Continuously Expressing Japanese Encephalitis Virus Subviral Particles. *Journal of Virology*, 75(5), s. 2204–2212.
  135. Konishi, E., Pincus, S., Paoletti, E., Shope, R.E., Burrage, T. i Mason, P.W., 1992. Mice immunized with a subviral particle containing the japanese encephalitis virus prM/M and E proteins are protected from lethal JEV infection. *Virology*, 188(2), s. 714–720.
  136. Kostyuchenko, V.A., Lim, E.X.Y., Zhang, S., Fibriansah, G., Ng, T.-S., Ooi, J.S.G., Shi, J. i Lok, S.-M., 2016. Structure of the thermally stable Zika virus. *Nature*, 533(7603), s. 425–428.
  137. Kovacs, A.A.Z., 2020. Zika, the Newest TORCH Infectious Disease in the Americas. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 70(12), s. 2673–2674.
  138. Krammer, F., Schinko, T., Palmberger, D., Tauer, C., Messner, P. i Grabherr, R., 2010. Trichoplusia ni cells (High Five™) are highly efficient for the production of influenza a virus-like particles: a comparison of two insect cell lines as production platforms for influenza vaccines. *Molecular biotechnology*, 45(3), s. 226–234.



139. Krol, E., Brzuska, G. i Szewczyk, B., 2019. Production and Biomedical Application of Flavivirus-like Particles. *Trends in Biotechnology*, [online] 0(0). Dostępne na: <[https://www.cell.com/trends/biotechnology/abstract/S0167-7799\(19\)30072-1](https://www.cell.com/trends/biotechnology/abstract/S0167-7799(19)30072-1)> [dostęp 26.05.2019].
140. Kudlacek, S.T., Premkumar, L., Metz, S.W., Tripathy, A., Bobkov, A.A., Payne, A.M., Graham, S., Brackbill, J.A., Miley, M.J., de Silva, A.M. i Kuhlman, B., 2018. Physiological temperatures reduce dimerization of dengue and Zika virus recombinant envelope proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 293(23), s. 8922–8933.
141. Kurscheidt, F.A., Mesquita, C.S.S., Damke, G.M.Z.F., Damke, E., Carvalho, A.R.B. de A., Suehiro, T.T., Teixeira, J.J.V., da Silva, V.R.S., Souza, R.P. i Consolaro, M.E.L., 2019. Persistence and clinical relevance of Zika virus in the male genital tract. *Nature Reviews. Urology*, 16(4), s. 211–230.
142. Kurz, M., Stefan, N., Zhu, J. i Skern, T., 2012. NS2B/3 proteolysis at the C-prM junction of the tick-borne encephalitis virus polyprotein is highly membrane dependent. *Virus Research*, 168(1–2), s. 48–55.
143. Lai, L., Roupheal, N., Xu, Y., Natrajan, M.S., Beck, A., Hart, M., Feldhammer, M., Feldpausch, A., Hill, C., Wu, H., Fairley, J.K., Lankford-Turner, P., Kasher, N., Rago, P., Hu, Y.-J., Edupuganti, S., Patel, S.M., Murray, K.O. i Mulligan, M.J., 2018. Innate, T-, and B-Cell Responses in Acute Human Zika Patients. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 66(1), s. 1–10.
144. Lalonde, M.-E. i Durocher, Y., 2017. Therapeutic glycoprotein production in mammalian cells. *Journal of Biotechnology*, 251, s. 128–140.
145. Larocca, R.A., Abbink, P., Peron, J.P.S., de A. Zanotto, P.M., Iampietro, M.J., Badamchi-Zadeh, A., Boyd, M., Ng'ang'a, D., Kirilova, M., Nityanandam, R., Mercado, N.B., Li, Z., Moseley, E.T., Bricault, C.A., Borducchi, E.N., Giglio, P.B., Jetton, D., Neubauer, G., Nkolola, J.P., Maxfield, L.F., De La Barrera, R.A., Jarman, R.G., Eckels, K.H., Michael, N.L., Thomas, S.J. i Barouch, D.H., 2016. Vaccine protection against Zika virus from Brazil. *Nature*, 536(7617), s. 474–478.
146. Leier, H.C., Weinstein, J.B., Kyle, J.E., Lee, J.-Y., Bramer, L.M., Stratton, K.G., Kempthorne, D., Navratil, A.R., Tafesse, E.G., Hornemann, T., Messer, W.B., Dennis, E.A., Metz, T.O., Barklis, E. i Tafesse, F.G., 2020. a global lipid map defines a network essential for Zika virus replication. *Nature Communications*, 11(1), s. 3652.
147. Lenz, P., Lowy, D.R. i Schiller, J.T., 2005. Papillomavirus virus-like particles induce cytokines characteristic of innate immune responses in plasmacytoid dendritic cells. *European Journal of Immunology*, 35(5), s. 1548–1556.
148. Leonhard, S.E., Bresani-Salvi, C.C., Batista, J.D.L., Cunha, S., Jacobs, B.C., Ferreira, M.L.B. i Albuquerque, M. de F.P.M. de, 2020. Guillain-Barré syndrome related to Zika virus infection: a systematic review and meta-analysis of the clinical and electrophysiological phenotype. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 14(4), s. e0008264.
149. Li, A., Yu, J., Lu, M., Ma, Y., Attia, Z., Shan, C., Xue, M., Liang, X., Craig, K., Makadiya, N., He, J.J., Jennings, R., Shi, P.-Y., Peeples, M.E., Liu, S.-L., Boyaka, P.N. i Li, J., 2018. a Zika virus vaccine expressing premembrane-envelope-NS1 polyprotein. *Nature Communications*, 9(1), s. 3067.
150. Li, C., Xu, D., Ye, Q., Hong, S., Jiang, Y., Liu, X., Zhang, N., Shi, L., Qin, C.-F. i Xu, Z., 2016. Zika Virus Disrupts Neural Progenitor Development and Leads to Microcephaly in Mice. *Cell Stem Cell*, 19(1), s. 120–126.
151. Li, M., Zhang, D., Li, C., Zheng, Z., Fu, M., Ni, F., Liu, Y., Du, T., Wang, H., Griffin, G.E., Zhang, M. i Hu, Q., 2020. Characterization of Zika Virus Endocytic Pathways in Human Glioblastoma Cells. *Frontiers in Microbiology*, 11, s. 242.
152. Lima, T.M., Souza, M.O. i Castilho, L.R., 2019. Purification of flavivirus VLPs by a two-step chromatographic process. *Vaccine*, 37(47), s. 7061–7069.
153. Lin, C.-Y., Huang, Z., Wen, W., Wu, A., Wang, C. i Niu, L., 2015. Enhancing Protein Expression in HEK-293 Cells by Lowering Culture Temperature. *PLOS ONE*, 10(4), s. e0123562.

154. Lindenbach, B.D. i Rice, C.M., 2003. Molecular biology of flaviviruses. *Advances in Virus Research*, 59, s. 23–61.
155. Liu, F., Wu, X., Li, L., Liu, Z. i Wang, Z., 2013. Use of baculovirus expression system for generation of virus-like particles: Successes and challenges. *Protein Expression and Purification*, 90(2), s. 104–116.
156. Liu, Y., Zhou, J., Yu, Z., Fang, D., Fu, C., Zhu, X., He, Z., Yan, H. i Jiang, L., 2014. Tetravalent recombinant dengue virus-like particles as potential vaccine candidates: immunological properties. *BMC Microbiology*, [online] 14(1). Dostępne na: <<http://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-014-0233-3>> [dostęp 7.02.2018].
157. Lobigs, M. i Lee, E., 2004. Inefficient Signalase Cleavage Promotes Efficient Nucleocapsid Incorporation into Budding Flavivirus Membranes. *Journal of Virology*, 78(1), s. 178–186.
158. Lorenz, I.C., Allison, S.L., Heinz, F.X. i Helenius, A., 2002. Folding and Dimerization of Tick-Borne Encephalitis Virus Envelope Proteins prM and E in the Endoplasmic Reticulum. *Journal of Virology*, 76(11), s. 5480–5491.
159. López-Camacho, C., Abbink, P., Larocca, R.A., Dejnirattisai, W., Boyd, M., Badamchi-Zadeh, A., Wallace, Z.R., Doig, J., Velazquez, R.S., Neto, R.D.L., Coelho, D.F., Kim, Y.C., Donald, C.L., Owsianka, A., Lorenzo, G.D., Kohl, A., Gilbert, S.C., Dorrell, L., Mongkolsapaya, J., Patel, A.H., Screaton, G.R., Barouch, D.H., Hill, A.V.S. i Reyes-Sandoval, A., 2018. Rational Zika vaccine design via the modulation of antigen membrane anchors in chimpanzee adenoviral vectors. *Nature Communications*, 9(1), s. 2441.
160. López-Camacho, C., De Lorenzo, G., Slon-Campos, J.L., Dowall, S., Abbink, P., Larocca, R.A., Kim, Y.C., Poggianella, M., Graham, V., Findlay-Wilson, S., Rayner, E., Carmichael, J., Dejnirattisai, W., Boyd, M., Hewson, R., Mongkolsapaya, J., Screaton, G.R., Barouch, D.H., Burrone, O.R., Patel, A.H. i Reyes-Sandoval, A., 2020. Immunogenicity and Efficacy of Zika Virus Envelope Domain III in DNA, Protein, and ChAdOx1 Adenoviral-Vectorized Vaccines. *Vaccines*, 8(2), s. 307.
161. Lucas, C.G.O., Kitoko, J.Z., Ferreira, F.M., Suzart, V.G., Papa, M.P., Coelho, S.V.A., Cavazzoni, C.B., Paula-Neto, H.A., Olsen, P.C., Iwasaki, A., Pereira, R.M., Pimentel-Coelho, P.M., Vale, A.M., de Arruda, L.B. i Bozza, M.T., 2018. Critical role of CD4+ T cells and IFN $\gamma$  signaling in antibody-mediated resistance to Zika virus infection. *Nature Communications*, 9(1), s. 3136.
162. Lum, F.-M., Lye, D.C.B., Tan, J.J.L., Lee, B., Chia, P.-Y., Chua, T.-K., Amrun, S.N., Kam, Y.-W., Yee, W.-X., Ling, W.-P., Lim, V.W.X., Pang, V.J.X., Lee, L.K., Mok, E.W.H., Chong, C.-Y., Leo, Y.-S. i Ng, L.F.P., 2018. Longitudinal Study of Cellular and Systemic Cytokine Signatures to Define the Dynamics of a Balanced Immune Environment During Disease Manifestation in Zika Virus-Infected Patients. *The Journal of Infectious Diseases*, 218(5), s. 814–824.
163. Luong, M., Lam, J.S., Chen, J. i Levitz, S.M., 2007. Effects of Fungal N- and O-linked Mannosylation on the Immunogenicity of Model Vaccines. *Vaccine*, 25(22), s. 4340–4344.
164. Ma, X., Yuan, Z. i Yi, Z., 2022. Identification and characterization of key residues in Zika virus envelope protein for virus assembly and entry. *Emerging Microbes & Infections*, 11(1), s. 1604–1620.
165. Machiels, B., Lété, C., Guillaume, A., Mast, J., Stevenson, P.G., Vanderplasschen, A. i Gillet, L., 2011. Antibody Evasion by a Gammaherpesvirus O-Glycan Shield. *PLOS Pathogens*, 7(11), s. e1002387.
166. Maezono, K., Kobayashi, S., Tabata, K., Yoshii, K. i Kariwa, H., 2021. Development of a highly specific serodiagnostic ELISA for West Nile virus infection using subviral particles. *Scientific Reports*, 11(1), s. 9213.
167. Magnus, M.M., Espósito, D.L.A., Costa, V.A. da, Melo, P.S. de, Costa-Lima, C., Fonseca, B.A.L. da i Addas-Carvalho, M., 2018. Risk of Zika virus transmission by blood donations in Brazil. *Hematology, Transfusion and Cell Therapy*, 40(3), s. 250–254.

168. Mali, D. i Bondre, V., 2022. Japanese encephalitis genotype I virus-like particles stably expressed in BHK-21 cells serves as potential antigen in JE IgM ELISA. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(5), s. 1945–1955.
169. Mani, S., Tripathi, L., Raut, R., Tyagi, P., Arora, U., Barman, T., Sood, R., Galav, A., Wahala, W., de Silva, A., Swaminathan, S. i Khanna, N., 2013. Pichia pastoris-Expressed Dengue 2 Envelope Forms Virus-Like Particles without Pre-Membrane Protein and Induces High Titer Neutralizing Antibodies. *PLoS ONE*, 8(5), s. e64595.
170. Manolova, V., Flace, A., Bauer, M., Schwarz, K., Saudan, P. i Bachmann, M.F., 2008. Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. *European Journal of Immunology*, 38(5), s. 1404–1413.
171. Mareze, V.A., Borio, C.S., Bilen, M.F., Fleith, R., Mirazo, S., Mansur, D.S., Arbiza, J., Lozano, M.E. i Bruña-Romero, O., 2016. Effects in mice of a dengue vaccine candidate made of chimeric Junin virus-like particles and conserved dengue virus envelope sequences. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(1), s. 125–133.
172. Martin, M., Michalek, S.M. i Katz, J., 2003. Role of Innate Immune Factors in the Adjuvant Activity of Monophosphoryl Lipid A. *Infection and Immunity*, 71(5), s. 2498–2507.
173. de Matos, S.M.S., Hennigen, A.F., Wachholz, G.E., Rengel, B.D., Schuler-Faccini, L., Roehe, P.M., Varela, A.P.M. i Fraga, L.R., 2021. Possible Emergence of Zika Virus of African Lineage in Brazil and the Risk for New Outbreaks. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, s. 680025.
174. McCracken, M.K., Gromowski, G.D., Friberg, H.L., Lin, X., Abbink, P., De La Barrera, R., Eckles, K.H., Garver, L.S., Boyd, M., Jetton, D., Barouch, D.H., Wise, M.C., Lewis, B.S., Currier, J.R., Modjarrad, K., Milazzo, M., Liu, M., Mullins, A.B., Putnak, J.R., Michael, N.L., Jarman, R.G. i Thomas, S.J., 2017. Impact of prior flavivirus immunity on Zika virus infection in rhesus macaques. *PLoS Pathogens*, 13(8), s. e1006487.
175. Medina, L.O., To, A., Lieberman, M.M., Wong, T.A.S., Namekar, M., Nakano, E., Andersen, H., Yalley-Ogunro, J., Greenhouse, J., Higgs, S., Huang, Y.-J.S., Vanlandingham, D.L., Horton, J.S., Clements, D.E. i Lehrer, A.T., 2018. A Recombinant Subunit Based Zika Virus Vaccine Is Efficacious in Non-human Primates. *Frontiers in Immunology*, [online] 9. Dostępne na: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.02464>> [dostęp 17.08.2022].
176. Metz, S.W., Gallichotte, E.N., Brackbill, A., Premkumar, L., Miley, M.J., Baric, R. i de Silva, A.M., 2017. In Vitro Assembly and Stabilization of Dengue and Zika Virus Envelope Protein Homo-Dimers. *Scientific Reports*, 7, s. 4524.
177. Metz, S.W., Thomas, A., Brackbill, A., Forsberg, J., Miley, M.J., Lopez, C.A., Lazear, H.M., Tian, S. i de Silva, A.M., 2019. Oligomeric state of the ZIKV E protein defines protective immune responses. *Nature Communications*, 10, s. 4606.
178. Mi, Y., Xie, T., Zhu, B., Tan, J., Li, X., Luo, Y., Li, F., Niu, H., Han, J., Lv, W. i Wang, J., 2021. Production of SARS-CoV-2 Virus-Like Particles in Insect Cells. *Vaccines*, 9(6), s. 554.
179. Mier-y-Teran-Romero, L., Delorey, M.J., Sejvar, J.J. i Johansson, M.A., 2018. Guillain-Barré syndrome risk among individuals infected with Zika virus: a multi-country assessment. *BMC Medicine*, 16, s. 67.
180. Mirzabekov, T., Bannert, N., Farzan, M., Hofmann, W., Kolchinsky, P., Wu, L., Wyatt, R. i Sodroski, J., 1999. Enhanced Expression, Native Purification, and Characterization of CCR5, a Principal HIV-1 Coreceptor \*. *Journal of Biological Chemistry*, 274(40), s. 28745–28750.
181. Monteiro, F., Bernal, V., Chaillet, M., Berger, I. i Alves, P.M., 2016. Targeted supplementation design for improved production and quality of enveloped viral particles in insect cell-baculovirus expression system. *Journal of Biotechnology*, 233, s. 34–41.
182. Monteiro, F., Bernal, V., Saelens, X., Lozano, A.B., Bernal, C., Sevilla, A., Carrondo, M.J.T. i Alves, P.M., 2014. Metabolic profiling of insect cell lines: Unveiling

- cell line determinants behind system's productivity. *Biotechnology and bioengineering*, 111(4), s. 816–828.
183. Moore, C.A., Staples, J.E., Dobyns, W.B., Pessoa, A., Ventura, C.V., da Fonseca, E.B., Ribeiro, E.M., Ventura, L.O., Neto, N.N., Arena, J.F. i Rasmussen, S.A., 2017. Congenital Zika Syndrome: Characterizing the Pattern of Anomalies for Pediatric Healthcare Providers. *JAMA pediatrics*, 171(3), s. 288–295.
184. Moreira, J., Peixoto, T.M., Siqueira, A.M. i Lamas, C.C., 2017. Sexually acquired Zika virus: a systematic review. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 23(5), s. 296–305.
185. Mossenta, M., Marchese, S., Poggianella, M., Slon Campos, J.L. i Burrone, O.R., 2017. Role of N-glycosylation on Zika virus E protein secretion, viral assembly and infectivity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 492(4), s. 579–586.
186. Mounce, B.C., Poirier, E.Z., Passoni, G., Simon-Loriere, E., Cesaro, T., Prot, M., Stapleford, K.A., Moratorio, G., Sakuntabhai, A., Levraud, J.-P. i Vignuzzi, M., 2016. Interferon-Induced Spermidine-Spermine Acetyltransferase and Polyamine Depletion Restrict Zika and Chikungunya Viruses. *Cell Host & Microbe*, 20(2), s. 167–177.
187. Mukherjee, S., Sirohi, D., Dowd, K.A., Chen, Z., Diamond, M.S., Kuhn, R.J. i Pierson, T.C., 2016. Enhancing dengue virus maturation using a stable furin over-expressing cell line. *Virology*, 497, s. 33–40.
188. Musso, D., Nhan, T., Robin, E., Roche, C., Bierlaire, D., Zisou, K., Yan, A.S., Cao-Lormeau, V.M. i Broult, J., 2014. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. *Eurosurveillance*, 19(14), s. 20761.
189. Musso, D., Nilles, E.J. i Cao-Lormeau, V.-M., 2014. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 20(10), s. O595-596.
190. Nakayama, E., Kato, F., Tajima, S., Ogawa, S., Yan, K., Takahashi, K., Sato, Y., Suzuki, T., Kawai, Y., Inagaki, T., Taniguchi, S., Le, T.T., Tang, B., Prow, N.A., Uda, A., Maeki, T., Lim, C.-K., Khromykh, A.A., Suhrbier, A. i Saijo, M., 2021. Neuroinvasiveness of the MR766 strain of Zika virus in IFNAR<sup>-/-</sup> mice maps to prM residues conserved amongst African genotype viruses. *PLOS Pathogens*, 17(7), s. e1009788.
191. Nambala, P., Yu, W.-Y., Lo, Y.-C., Lin, C.W. i Su, W.-C., 2020. Ubiquitination of Zika virus precursor membrane protein promotes the release of viral proteins. *Virus Research*, 286, s. 198065.
192. Netto, E.M., Moreira-Soto, A., Pedrosa, C., Höser, C., Funk, S., Kucharski, A.J., Rockstroh, A., Kümmerer, B.M., Sampaio, G.S., Luz, E., Vaz, S.N., Dias, J.P., Bastos, F.A., Cabral, R., Kistemann, T., Ulbert, S., de Lamballerie, X., Jaenisch, T., Brady, O.J., Drosten, C., Sarno, M., Brites, C. i Drexler, J.F., 2017. High Zika Virus Seroprevalence in Salvador, Northeastern Brazil Limits the Potential for Further Outbreaks. *mBio*, 8(6), s. e01390-17.
193. Newton, N.D., Hardy, J.M., Modhiran, N., Hugo, L.E., Amarilla, A.A., Bibby, S., Venugopal, H., Harrison, J.J., Traves, R.J., Hall, R.A., Hobson-Peters, J., Coulibaly, F. i Watterson, D., 2021. The structure of an infectious immature flavivirus redefines viral architecture and maturation. *Science Advances*, 7(20), s. eabe4507.
194. Niu, X., Yan, Q., Yao, Z., Zhang, F., Qu, L., Wang, C., Wang, C., Lei, H., Chen, C., Liang, R., Luo, J., Wang, Q., Zhao, L., Zhang, Y., Luo, K., Wang, L., Wu, H., Liu, T., Li, P., Zheng, Z., Tan, Y.J., Feng, L., Zhang, Z., Han, J., Zhang, F. i Chen, L., 2020. Longitudinal analysis of the antibody repertoire of a Zika virus-infected patient revealed dynamic changes in antibody response. *Emerging Microbes & Infections*, 9(1), s. 111–123.
195. Nobrega, G.M., Samogim, A.P., Parise, P.L., Venceslau, E.M., Guida, J.P.S., Japecanga, R.R., Amorim, M.R., Toledo-Teixeira, D.A., Forato, J., Consonni, S.R.,

- Costa, M.L., Proenca-Modena, J.L., i Zika-Unicamp Network, 2020. TAM and TIM receptors mRNA expression in Zika virus infected placentas. *Placenta*, 101, s. 204–207.
196. Nürnbergger, C., Bodmer, B.S., Fiedler, A.H., Gabriel, G. i Mühlebach, M.D., 2019. a Measles Virus-Based Vaccine Candidate Mediates Protection against Zika Virus in an Allogeneic Mouse Pregnancy Model. *Journal of Virology*, 93(3), s. e01485-18.
197. Ohtaki, N., Takahashi, H., Kaneko, K., Gomi, Y., Ishikawa, T., Higashi, Y., Kurata, T., Sata, T. i Kojima, A., 2010. Immunogenicity and efficacy of two types of West Nile virus-like particles different in size and maturation as a second-generation vaccine candidate. *Vaccine*, 28(40), s. 6588–6596.
198. Okamoto, S., Yoshii, H., Matsuura, M., Kojima, A., Ishikawa, T., Akagi, T., Akashi, M., Takahashi, M., Yamanishi, K. i Mori, Y., 2012. Poly- $\gamma$ -Glutamic Acid Nanoparticles and Aluminum Adjuvant Used as an Adjuvant with a Single Dose of Japanese Encephalitis Virus-Like Particles Provide Effective Protection from Japanese Encephalitis Virus. *Clinical and Vaccine Immunology : CVI*, 19(1), s. 17–22.
199. Oliveira Souto, I., Alejo-Cancho, I., Gascón Brustenga, J., Peiró Mestres, A., Muñoz Gutiérrez, J. i Martínez Yoldi, M.J., 2018. Persistence of Zika virus in semen 93 days after the onset of symptoms. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica (English Ed.)*, 36(1), s. 21–23.
200. O'reilly, D., Miller, L. i Luckow, V., 1992. Baculovirus expression vectors: a laboratory manual. *undefined*. [online] Dostępne na: <<https://www.semanticscholar.org/paper/Baculovirus-expression-vectors%3A-a-laboratory-O%27reilly-Miller/dd28b83a4d01fa6805d71469cc0a5aa98f446a3b>> [dostęp 8.07.2022].
201. Osuna-Ramos, J.F., Reyes-Ruiz, J.M. i del Ángel, R.M., 2018. The Role of Host Cholesterol During Flavivirus Infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, s. 388.
202. Palmberger, D., Ashjaei, K., Strell, S., Hoffmann-Sommergruber, K. i Grabherr, R., 2014. Minimizing fucosylation in insect cell-derived glycoproteins reduces binding to IgE antibodies from the sera of patients with allergy. *Biotechnology journal*, 9(9), s. 1206–1214.
203. Panchaud, A., Stojanov, M., Ammerdorffer, A., Vouga, M. i Baud, D., 2016. Emerging Role of Zika Virus in Adverse Fetal and Neonatal Outcomes. *Clinical Microbiology Reviews*, 29(3), s. 659–694.
204. Pantoja, P., Pérez-Guzmán, E.X., Rodríguez, I.V., White, L.J., González, O., Serrano, C., Giavedoni, L., Hodara, V., Cruz, L., Arana, T., Martínez, M.I., Hassert, M.A., Brien, J.D., Pinto, A.K., de Silva, A. i Sariol, C.A., 2017. Zika virus pathogenesis in rhesus macaques is unaffected by pre-existing immunity to dengue virus. *Nature Communications*, 8, s. 15674.
205. Pardi, N., Hogan, M.J., Pelc, R.S., Muramatsu, H., Andersen, H., DeMaso, C.R., Dowd, K.A., Sutherland, L.L., Scarce, R.M., Parks, R., Wagner, W., Granados, A., Greenhouse, J., Walker, M., Willis, E., Yu, J.-S., McGee, C.E., Sempowski, G.D., Mui, B.L., Tam, Y.K., Huang, Y.-J., Vanlandingham, D., Holmes, V.M., Balachandran, H., Sahu, S., Lifton, M., Higgs, S., Hensley, S.E., Madden, T.D., Hope, M.J., Karikó, K., Santra, S., Graham, B.S., Lewis, M.G., Pierson, T.C., Haynes, B.F. i Weissman, D., 2017. Zika virus protection by a single low dose nucleoside modified mRNA vaccination. *Nature*, 543(7644), s. 248–251.
206. Pato, T.P., Souza, M.C.O., Mattos, D.A., Caride, E., Ferreira, D.F., Gaspar, L.P., Freire, M.S. i Castilho, L.R., 2019. Purification of yellow fever virus produced in Vero cells for inactivated vaccine manufacture. *Vaccine*, 37(24), s. 3214–3220.
207. de Paula Freitas, B., de Oliveira Dias, J.R., Prazeres, J., Sacramento, G.A., Ko, A.I., Maia, M. i Belfort, R., 2016. Ocular Findings in Infants With Microcephaly Associated With Presumed Zika Virus Congenital Infection in Salvador, Brazil. *JAMA ophthalmology*, 134(5), s. 529–535.
208. Poddar, A., Ramasamy, V., Shukla, R., Rajpoot, R.K., Arora, U., Jain, S.K., Swaminathan, S. i Khanna, N., 2016. Virus-like particles derived from *Pichia pastoris*-

- expressed dengue virus type 1 glycoprotein elicit homotypic virus-neutralizing envelope domain III-directed antibodies. *BMC Biotechnology*, [online] 16(1). Dostępne na: <<http://bmcbiotechnol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12896-016-0280-y>> [dostęp 7.02.2018].
209. Prasad, V.M., Miller, A.S., Klose, T., Sirohi, D., Buda, G., Jiang, W., Kuhn, R.J. i Rossmann, M.G., 2017. Structure of the immature Zika virus at 9 Å resolution. *Nature Structural & Molecular Biology*, 24(2), s. 184–186.
  210. Priyamvada, L., Quicke, K.M., Hudson, W.H., Onlamoon, N., Sewatanon, J., Edupuganti, S., Pattanapanyasat, K., Chokephaibulkit, K., Mulligan, M.J., Wilson, P.C., Ahmed, R., Suthar, M.S. i Wrammert, J., 2016. Human antibody responses after dengue virus infection are highly cross-reactive to Zika virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(28), s. 7852–7857.
  211. Purdy, D.E. i Chang, G.-J.J., 2005. Secretion of noninfectious dengue virus-like particles and identification of amino acids in the stem region involved in intracellular retention of envelope protein. *Virology*, 333(2), s. 239–250.
  212. Qiao, M., Ashok, M., Bernard, K.A., Palacios, G., Zhou, Z.H., Lipkin, W.I. i Liang, T.J., 2004. Induction of Sterilizing Immunity against West Nile Virus (WNV), by Immunization with WNV-Like Particles Produced in Insect Cells. *The Journal of Infectious Diseases*, 190(12), s. 2104–2108.
  213. Qu, P., Zhang, W., Li, D., Zhang, C., Liu, Q., Zhang, X., Wang, X., Dai, W., Xu, Y., Leng, Q., Zhong, J., Jin, X. i Huang, Z., 2018. Insect cell-produced recombinant protein subunit vaccines protect against Zika virus infection. *Antiviral Research*, 154, s. 97–103.
  214. Rabelo, K., Souza, L.J., Salomão, N.G., Oliveira, E.R.A., Sentinelli, L. de P., Lacerda, M.S., Saraquino, P.B., Rosman, F.C., Basílio-de-Oliveira, R., Carvalho, J.J. i Paes, M.V., 2018. Placental Inflammation and Fetal Injury in a Rare Zika Case Associated With Guillain-Barré Syndrome and Abortion. *Frontiers in Microbiology*, 9, s. 1018.
  215. Radoman, B., Grünwald-Gruber, C., Schmelzer, B., Zavec, D., Gasser, B., Altmann, F. i Mattanovich, D., 2021. The Degree and Length of O-Glycosylation of Recombinant Proteins Produced in *Pichia pastoris* Depends on the Nature of the Protein and the Process Type. *Biotechnology Journal*, 16(3), s. 2000266.
  216. Rajpoot, R.K., Shukla, R., Arora, U., Swaminathan, S. i Khanna, N., 2018. Dengue envelope-based ‘four-in-one’ virus-like particles produced using *Pichia pastoris* induce enhancement-lacking, domain III-directed tetravalent neutralising antibodies in mice. *Scientific Reports*, 8(1), s. 8643.
  217. Ramasamy, V., Arora, U., Shukla, R., Poddar, A., Shanmugam, R.K., White, L.J., Mattocks, M.M., Raut, R., Perween, A., Tyagi, P., de Silva, A.M., Bhaumik, S.K., Kaja, M.K., Villinger, F., Ahmed, R., Johnston, R.E., Swaminathan, S. i Khanna, N., 2018. a tetravalent virus-like particle vaccine designed to display domain III of dengue envelope proteins induces multi-serotype neutralizing antibodies in mice and macaques which confer protection against antibody dependent enhancement in AG129 mice. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, [online] 12(1). Dostępne na: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5774828/>> [dostęp 20.03.2018].
  218. Ramphan, S., Suksathan, S., Wikan, N., Ounjai, P., Boonthaworn, K., Rimthong, P., Kanjanapruthipong, T., Worawichawong, S., Jongkaewwattana, A., Wongsiriroj, N. i Smith, D.R., 2017. Oleic acid Enhances Dengue Virus But Not Dengue Virus-Like Particle Production from Mammalian Cells. *Molecular Biotechnology*, 59(9–10), s. 385–393.
  219. Rangel, M.V., Catanzaro, N., Thannickal, S.A., Crotty, K.A., Noval, M.G., Johnson, K.E.E., Ghedin, E., Lazear, H.M. i Stapleford, K.A., 2022. Structurally Conserved Domains between Flavivirus and Alphavirus Fusion Glycoproteins Contribute to Replication and Infectious-Virion Production. *Journal of Virology*, 96(2), s. e01774-21.

220. Ravichandran, S., Hahn, M., Belaunzarán-Zamudio, P.F., Ramos-Castañeda, J., Nájera-Cancino, G., Caballero-Sosa, S., Navarro-Fuentes, K.R., Ruiz-Palacios, G., Golding, H., Beigel, J.H. i Khurana, S., 2019. Differential human antibody repertoires following Zika infection and the implications for serodiagnostics and disease outcome. *Nature Communications*, 10(1), s. 1943.
221. REED, L.J. i MUENCH, H., 1938. a SIMPLE METHOD OF ESTIMATING FIFTY PER CENT ENDPOINTS<sup>12</sup>. *American Journal of Epidemiology*, 27(3), s. 493–497.
222. Reynolds, C.J., Suleyman, O.M., Ortega-Prieto, A.M., Skelton, J.K., Bonnesoeur, P., Blohm, A., Carregaro, V., Silva, J.S., James, E.A., Maillère, B., Dorner, M., Boyton, R.J. i Altmann, D.M., 2018. T cell immunity to Zika virus targets immunodominant epitopes that show cross-reactivity with other Flaviviruses. *Scientific Reports*, [online] 8. Dostępne na: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5766511/>> [dostęp 22.02.2018].
223. Ricciardi, M.J., Magnani, D.M., Grifoni, A., Kwon, Y.-C., Gutman, M.J., Grubaugh, N.D., Gangavarapu, K., Sharkey, M., Silveira, C.G.T., Bailey, V.K., Pedreño-Lopez, N., Gonzalez-Nieto, L., Maxwell, H.S., Domingues, A., Martins, M.A., Pham, J., Weiskopf, D., Altman, J., Kallas, E.G., Andersen, K.G., Stevenson, M., Lichtenberger, P., Choe, H., Whitehead, S.S., Sette, A. i Watkins, D.I., 2017. Ontogeny of the B- and T-cell response in a primary Zika virus infection of a dengue-naïve individual during the 2016 outbreak in Miami, FL. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11(12), s. e0006000.
224. Richner, J.M., Himansu, S., Dowd, K.A., Butler, S.L., Salazar, V., Fox, J.M., Julander, J.G., Tang, W.W., Shresta, S., Pierson, T.C., Ciaramella, G. i Diamond, M.S., 2017. Modified mRNA Vaccines Protect against Zika Virus Infection. *Cell*, 168(6), s. 1114-1125.e10.
225. Richter, M.K.S., Voorham, J.M. da S., Pedraza, S.T., Hoornweg, T.E., Pol, D.P.I. van de, Rodenhuis-Zybert, I.A., Wilschut, J. i Smit, J.M., 2014. Immature Dengue Virus Is Infectious in Human Immature Dendritic Cells via Interaction with the Receptor Molecule DC-SIGN. *PLOS ONE*, 9(6), s. e98785.
226. Robbiani, D.F., Bozzacco, L., Keefe, J.R., Khouri, R., Olsen, P.C., Gazumyan, A., Schaefer-Babajew, D., Avila-Rios, S., Nogueira, L., Patel, R., Azzopardi, S.A., Uhl, L.F., Saeed, M., Sevilla-Reyes, E.E., Agudelo, M., Yao, K.-H., Golijanin, J., Gristick, H.B., Hurley, A., Caskey, M., Pai, J., Oliveira, T., Wunder, E.A., Sacramento, G., Nery, N., Orge, C., Costa, F., Reis, M.G., Thomas, N.M., Eisenreich, T., Weinberger, D.M., de Almeida, A.R.P., West, A.P., Rice, C.M., Bjorkman, P.J., Reyes-Teran, G., Ko, A.I., MacDonald, M.R. i Nussenzweig, M.C., 2017. Recurrent Potent Human Neutralizing Antibodies to Zika Virus in Brazil and Mexico. *Cell*, 169(4), s. 597-609.e11.
227. Rogers, T.F., Goodwin, E.C., Briney, B., Sok, D., Beutler, N., Strubel, A., Nedellec, R., Le, K., Brown, M.E., Burton, D.R. i Walker, L.M., 2017. Zika virus activates de novo and cross-reactive memory B cell responses in dengue-experienced donors. *Science immunology*, 2(14), s. eaan6809.
228. Rombi, F., Bayliss, R., Tuplin, A. i Yeoh, S., 2020. The journey of Zika to the developing brain. *Molecular Biology Reports*, 47(4), s. 3097–3115.
229. Routhu, N.K., Lehoux, S.D., Rouse, E.A., Bidokhti, M.R.M., Giron, L.B., Anzurez, A., Reid, S.P., Abdel-Mohsen, M., Cummings, R.D. i Byrareddy, S.N., 2019. Glycosylation of Zika Virus is Important in Host–Virus Interaction and Pathogenic Potential. *International Journal of Molecular Sciences*, [online] 20(20). Dostępne na: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6829355/>> [dostęp 17.09.2020].
230. Routhu, N.K., Xie, Y., Dunworth, M., Casero, R.A., Oupicky, D. i Byrareddy, S.N., 2018. Polymeric Prodrugs Targeting Polyamine Metabolism Inhibit Zika Virus Replication. *Molecular pharmaceutics*, 15(9), s. 4284–4295.
231. Rouvinski, A., Dejnirattisai, W., Guardado-Calvo, P., Vaney, M.-C., Sharma, A., Duquerroy, S., Supasa, P., Wongwiwat, W., Haouz, A., Barba-Spaeth, G., Mongkolsapaya, J., Rey, F.A. i Screaton, G.R., 2017. Covalently linked dengue virus envelope glycoprotein dimers reduce exposure of the immunodominant fusion loop

- epitope. *Nature Communications*, [online] 8. Dostępne na: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5457521/>> [dostęp 24.05.2018].
232. Saga, R., Fujimoto, A., Watanabe, N., Matsuda, M., Hasegawa, M., Watashi, K., Aizaki, H., Nakamura, N., Tajima, S., Takasaki, T., Konishi, E., Kato, T., Kohara, M., Takeyama, H., Wakita, T. i Suzuki, R., 2016. Bivalent vaccine platform based on Japanese encephalitis virus (JEV) elicits neutralizing antibodies against JEV and hepatitis C virus. *Scientific Reports*, 6, s. 28688.
233. Salvo, M.A., Kingstad-Bakke, B., Salas-Quinchucua, C., Camacho, E. i Osorio, J.E., 2018. Zika virus like particles elicit protective antibodies in mice. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 12(2), s. e0006210.
234. Schalich, J., Allison, S.L., Stiasny, K., Mandl, C.W., Kunz, C. i Heinz, F.X., 1996. Recombinant subviral particles from tick-borne encephalitis virus are fusogenic and provide a model system for studying flavivirus envelope glycoprotein functions. *Journal of Virology*, 70(7), s. 4549–4557.
235. Schrauf, S., Mandl, C.W., Bell-Sakyi, L. i Skern, T., 2009. Extension of Flavivirus Protein C Differentially Affects Early RNA Synthesis and Growth in Mammalian and Arthropod Host Cells. *Journal of Virology*, 83(21), s. 11201–11210.
236. Scott, T.W. i Takken, W., 2012. Feeding strategies of anthropophilic mosquitoes result in increased risk of pathogen transmission. *Trends in Parasitology*, 28(3), s. 114–121.
237. Sevana, M., Long, F., Miller, A.S., Klose, T., Buda, G., Sun, L., Kuhn, R.J. i Rossmann, M.G., 2018. Refinement and Analysis of the Mature Zika Virus Cryo-EM Structure at 3.1 Å Resolution. *Structure*, 26(9), s. 1169-1177.e3.
238. Shan, C., Muruato, A.E., Jagger, B.W., Richner, J., Nunes, B.T.D., Medeiros, D.B.A., Xie, X., Nunes, J.G.C., Morabito, K.M., Kong, W.-P., Pierson, T.C., Barrett, A.D., Weaver, S.C., Rossi, S.L., Vasconcelos, P.F.C., Graham, B.S., Diamond, M.S. i Shi, P.-Y., 2017a. a single-dose live-attenuated vaccine prevents Zika virus pregnancy transmission and testis damage. *Nature Communications*, 8, s. 676.
239. Shan, C., Muruato, A.E., Nunes, B.T.D., Luo, H., Xie, X., Medeiros, D.B.A., Wakamiya, M., Tesh, R.B., Barrett, A.D., Wang, T., Weaver, S.C., Vasconcelos, P.F.C., Rossi, S.L. i Shi, P.-Y., 2017b. a live-attenuated Zika virus vaccine candidate induces sterilizing immunity in mouse models. *Nature Medicine*, 23(6), s. 763–767.
240. Shi, X., Hu, J., Guo, J., Wu, C., Xiong, S. i Dong, C., 2019. a Vesicular Stomatitis Virus-Based Vaccine Carrying Zika Virus Capsid Protein Protects Mice from Viral Infection. *Virologica Sinica*, 34(1), s. 106–110.
241. Shukla, A., Rastogi, M. i Singh, S.K., 2021. Zika virus NS1 suppresses the innate immune responses via miR-146a in human microglial cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 193(Pt B), s. 2290–2296.
242. Shukla, R., Rajpoot, R.K., Arora, U., Poddar, A., Swaminathan, S. i Khanna, N., 2018. Pichia pastoris-Expressed Bivalent Virus-Like Particulate Vaccine Induces Domain III-Focused Bivalent Neutralizing Antibodies without Antibody-Dependent Enhancement in Vivo. *Frontiers in Microbiology*, [online] 8. Dostępne na: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5768101/>> [dostęp 22.03.2018].
243. Silva, D.M.D., Fausch, S.C., Verbeek, J.S. i Kast, W.M., 2007. Uptake of Human Papillomavirus Virus-Like Particles by Dendritic Cells Is Mediated by Fcγ Receptors and Contributes to Acquisition of T Cell Immunity. *The Journal of Immunology*, 178(12), s. 7587–7597.
244. da Silva, M.H.M., Moises, R.N.C., Alves, B.E.B., Pereira, H.W.B., de Paiva, A.A.P., Morais, I.C., Nascimento, Y.M., Monteiro, J.D., de Souto, J.T., Nascimento, M.S.L., de Araújo, J.M.G., da Guedes, P.M.M. i Fernandes, J.V., 2019. Innate immune response in patients with acute Zika virus infection. *Medical Microbiology and Immunology*, 208(6), s. 703–714.
245. Sim, S.-L., He, T., Tscheliessnig, A., Mueller, M., Tan, R.B.H. i Jungbauer, A., 2012. Protein precipitation by polyethylene glycol: a generalized model based on hydrodynamic radius. *Journal of Biotechnology*, 157(2), s. 315–319.



246. Simmonds, P., Becher, P., Bukh, J., Gould, E.A., Meyers, G., Monath, T., Muerhoff, S., Pletnev, A., Rico-Hesse, R., Smith, D.B. i Stapleton, J.T., 2017. ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. *The Journal of General Virology*, 98(1), s. 2–3.
247. Simpson, D.I.H., 1964. Zika virus infection in man. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 58(4), s. 335–338.
248. Sirohi, D., Chen, Z., Sun, L., Klose, T., Pierson, T.C., Rossmann, M.G. i Kuhn, R.J., 2016. The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. *Science*, 352(6284), s. 467–470.
249. Slon Campos, J.L., Marchese, S., Rana, J., Mossenta, M., Poggianella, M., Bestagno, M. i Burrone, O.R., 2017. Temperature-dependent folding allows stable dimerization of secretory and virus-associated E proteins of Dengue and Zika viruses in mammalian cells. *Scientific Reports*, [online] 7. Dostępne na: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5430527/>> [dostęp 24.05.2018].
250. Slon-Campos, J.L., Dejnirattisai, W., Jagger, B.W., López-Camacho, C., Wongwiwat, W., Durnell, L.A., Winkler, E.S., Chen, R.E., Reyes-Sandoval, A., Rey, F.A., Diamond, M.S., Mongkolsapaya, J. i Screaton, G.R., 2019. a protective Zika virus E-dimer-based subunit vaccine engineered to abrogate antibody-dependent enhancement of dengue infection. *Nature immunology*, 20(10), s. 1291–1298.
251. Snapper, C.M., Peschel, C. i Paul, W.E., 1988. IFN-gamma stimulates IgG2a secretion by murine B cells stimulated with bacterial lipopolysaccharide. *The Journal of Immunology*, 140(7), s. 2121–2127.
252. Sotelo, J.R., Sotelo, A.B., Sotelo, F.J.B., Doi, A.M., Pinho, J.R.R., Oliveira, R. de C., Bezerra, A.M.P.S., Deutsch, A.D., Villas-Boas, L.S., Felix, A.C., Romano, C.M., Machado, C.M., Mendes-Correa, M.C.J., Santana, R.A.F., Menezes, F.G. i Mangueira, C.L.P., 2017. Persistence of Zika Virus in Breast Milk after Infection in Late Stage of Pregnancy. *Emerging Infectious Diseases*, 23(5), s. 856–857.
253. Spohn, G., Jennings, G.T., Martina, B.E., Keller, I., Beck, M., Pumpens, P., Osterhaus, A.D. i Bachmann, M.F., 2010. a VLP-based vaccine targeting domain III of the West Nile virus E protein protects from lethal infection in mice. *Virology Journal*, 7, s. 146.
254. Srivastava, M., Zhang, Y., Chen, J., Sirohi, D., Miller, A., Zhang, Y., Chen, Z., Lu, H., Xu, J., Kuhn, R.J. i Andy Tao, W., 2020. Chemical proteomics tracks virus entry and uncovers NCAM1 as Zika virus receptor. *Nature Communications*, 11(1), s. 3896.
255. Stephenson, K.E., Tan, C.S., Walsh, S.R., Hale, A., Ansel, J.L., Kanjilal, D.G., Jaegle, K., Peter, L., Borducchi, E.N., Nkolola, J., Makoni, T., Fogel, R., Bradshaw, C., Tyler, A., Moseley, E., Chandrashekar, A., Yanosick, K.E., Seaman, M.S., Eckels, K.H., De La Barrera, R.A., Thompson, J., Dawson, P., Thomas, S.J., Michael, N.L., Modjarrad, K. i Barouch, D.H., 2020. Safety and immunogenicity of a purified inactivated Zika virus vaccine candidate given via standard versus accelerated vaccination schedules: a phase 1, single-center, double-blind, sequential-group, randomized, placebo-controlled clinical trial. *The Lancet. Infectious diseases*, 20(9), s. 1061–1070.
256. Stettler, K., Beltramello, M., Espinosa, D.A., Graham, V., Cassotta, A., Bianchi, S., Vanzetta, F., Minola, A., Jaconi, S., Mele, F., Foglierini, M., Pedotti, M., Simonelli, L., Dowall, S., Atkinson, B., Percivalle, E., Simmons, C.P., Varani, L., Blum, J., Baldanti, F., Cameroni, E., Hewson, R., Harris, E., Lanzavecchia, A., Sallusto, F. i Corti, D., 2016. Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection. *Science (New York, N.Y.)*, 353(6301), s. 823–826.
257. Stiasny, K., Kiermayr, S., Holzmann, H. i Heinz, F.X., 2006. Cryptic properties of a cluster of dominant flavivirus cross-reactive antigenic sites. *Journal of Virology*, 80(19), s. 9557–9568.
258. Strange, D.P., Jiyarom, B., Pourhabibi Zarandi, N., Xie, X., Baker, C., Sadri-Ardekani, H., Shi, P.-Y. i Verma, S., 2019. Axl Promotes Zika Virus Entry and Modulates the Antiviral State of Human Sertoli Cells. *mBio*, 10(4), s. e01372-19.

259. Sun, L., Wu, J., Du, F., Chen, X. i Chen, Z.J., 2013. Cyclic GMP-AMP Synthase is a Cytosolic DNA Sensor that Activates the Type-I Interferon Pathway. *Science (New York, N.Y.)*, 339(6121), s. 10.1126/science.1232458.
260. Sun, P., Nie, K., Zhu, Y., Liu, Y., Wu, P., Liu, Z., Du, S., Fan, H., Chen, C.-H., Zhang, R., Wang, P. i Cheng, G., 2020. a mosquito salivary protein promotes flavivirus transmission by activation of autophagy. *Nature Communications*, 11, s. 260.
261. Tam, H.H., Melo, M.B., Kang, M., Pelet, J.M., Ruda, V.M., Foley, M.H., Hu, J.K., Kumari, S., Crampton, J., Baldeon, A.D., Sanders, R.W., Moore, J.P., Crotty, S., Langer, R., Anderson, D.G., Chakraborty, A.K. i Irvine, D.J., 2016. Sustained antigen availability during germinal center initiation enhances antibody responses to vaccination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(43), s. E6639–E6648.
262. Taylor, T.J., Diaz, F., Colgrove, R.C., Bernard, K.A., DeLuca, N.A., Whelan, S.P.J. i Knipe, D.M., 2016. Production of Immunogenic West Nile Virus-like Particles using a Herpes Simplex Virus 1 Recombinant Vector. *Virology*, 496, s. 186–193.
263. Thompson, D., Guenther, B., Manayani, D., Mendy, J., Smith, J., Espinosa, D.A., Harris, E., Alexander, J., Vang, L. i Morello, C.S., 2022. Zika virus-like particle vaccine fusion loop mutation increases production yield but fails to protect AG129 mice against Zika virus challenge. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 16(7), s. e0010588.
264. To, A., Medina, L.O., Mfuh, K.O., Lieberman, M.M., Wong, T.A.S., Namekar, M., Nakano, E., Lai, C.-Y., Kumar, M., Nerurkar, V.R. i Lehrer, A.T., 2018. Recombinant Zika Virus Subunits Are Immunogenic and Efficacious in Mice. *mSphere*, [online] 3(1). Dostępne na: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5760751/>> [dostęp 29.08.2018].
265. Tréguier, Y., Bull-Maurer, A. i Roingeard, P., 2022. Apolipoprotein E, a Crucial Cellular Protein in the Lifecycle of Hepatitis Viruses. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(7), s. 3676.
266. Tréguier, Y., Cochard, J., Burlaud-Gaillard, J., Lemoine, R., Chouteau, P., Roingeard, P., Meunier, J.-C. i Maquart, M., 2022. The envelope protein of Zika virus interacts with apolipoprotein E early in the infectious cycle and this interaction is conserved on the secreted viral particles. *Virology Journal*, 19(1), s. 124.
267. Tripathi, L., Mani, S., Raut, R., Poddar, A., Tyagi, P., Arora, U., de Silva, A., Swaminathan, S. i Khanna, N., 2015. Pichia pastoris-expressed dengue 3 envelope-based virus-like particles elicit predominantly domain III-focused high titer neutralizing antibodies. *Frontiers in Microbiology*, [online] 6. Dostępne na: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4585145/>> [dostęp 20.03.2018].
268. Tsai, W.-Y., Hsieh, S.-C., Lai, C.-Y., Lin, H.-E., Nerurkar, V.R. i Wang, W.-K., 2012. C-Terminal Helical Domains of Dengue Virus Type 4 E Protein Affect the Expression/Stability of prM Protein and Conformation of prM and E Proteins. *PLoS ONE*, 7(12), s. e52600.
269. Tsetsarkin, K.A., Kenney, H., Chen, R., Liu, G., Manukyan, H., Whitehead, S.S., Laassri, M., Chumakov, K. i Pletnev, A.G., 2016. a Full-Length Infectious cDNA Clone of Zika Virus from the 2015 Epidemic in Brazil as a Genetic Platform for Studies of Virus-Host Interactions and Vaccine Development. *mBio*, 7(4), s. e01114-16.
270. Tsetsarkin, K.A., Maximova, O.A., Liu, G., Kenney, H., Teterina, N., Bloom, M.E., Grabowski, J.M., Mlera, L., Nagata, B.M., Moore, I., Martens, C., Amaro-Carambot, E., Lamirande, E.W., Whitehead, S.S. i Pletnev, A.G., 2018. Routes of Zika virus dissemination in the testis and epididymis of immunodeficient mice. *Nature Communications*, 9(1), s. 5350.
271. Utomo, D.I.S., Pambudi, S. i Park, E.Y., 2022. Humoral immune response induced with dengue virus-like particles serotypes 1 and 4 produced in silkworm. *AMB Express*, 12(1), s. 8.
272. Vang, L., Morello, C.S., Mendy, J., Thompson, D., Manayani, D., Guenther, B., Julander, J., Sanford, D., Jain, A., Patel, A., Shabram, P., Smith, J. i Alexander, J., 2021.

- Zika virus-like particle vaccine protects AG129 mice and rhesus macaques against Zika virus. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 15(3), s. e0009195.
273. Vasireddi, M., Crum, A., May, H., Katz, D. i Hilliard, J., 2019. a novel antiviral inhibits Zika virus infection while increasing intracellular glutathione biosynthesis in distinct cell culture models. *Antiviral Research*, 161, s. 46–52.
274. Vatandoost, J. i Dolatabadi, B., 2017. Stable and Transient Expression of Human Coagulation Factor IX in Mammalian Expression Systems; CHO Versus HEK Cells. *Gene, Cell and Tissue*, [online] 4(2). Dostępne na: <<https://brieflands.com/articles/gct-13096.html#abstract>> [dostęp 24.07.2022].
275. Wang, J., Bardelli, M., Espinosa, D.A., Pedotti, M., Ng, T.-S., Bianchi, S., Simonelli, L., Lim, E.X.Y., Foglierini, M., Zatta, F., Jaconi, S., Beltramello, M., Cameroni, E., Fibriansah, G., Shi, J., Barca, T., Pagani, I., Rubio, A., Broccoli, V., Vicenzi, E., Graham, V., Pullan, S., Dowall, S., Hewson, R., Jurt, S., Zerbe, O., Stettler, K., Lanzavecchia, A., Sallusto, F., Cavalli, A., Harris, E., Lok, S.-M., Varani, L. i Corti, D., 2017. a human bi-specific antibody against Zika virus with high therapeutic potential. *Cell*, 171(1), s. 229-241.e15.
276. Wang, L., Moreira, E.A., Kempf, G., Miyake, Y., Oliveira Esteves, B.I., Fahmi, A., Schaefer, J.V., Dreier, B., Yamauchi, Y., Alves, M.P., Plückthun, A. i Matthias, P., 2022. Disrupting the HDAC6-ubiquitin interaction impairs infection by influenza and Zika virus and cellular stress pathways. *Cell Reports*, 39(4), s. 110736.
277. Wang, L., Valderramos, S.G., Wu, A., Ouyang, S., Li, C., Brasil, P., Bonaldo, M., Coates, T., Nielsen-Saines, K., Jiang, T., Aliyari, R. i Cheng, G., 2016a. From Mosquitos to Humans: Genetic Evolution of Zika Virus. *Cell host & microbe*, 19(5), s. 561–565.
278. Wang, L., Wang, R., Wang, L., Ben, H., Yu, L., Gao, F., Shi, X., Yin, C., Zhang, F., Xiang, Y. i Zhang, L., 2019a. Structural Basis for Neutralization and Protection by a Zika Virus-Specific Human Antibody. *Cell Reports*, 26(12), s. 3360-3368.e5.
279. Wang, Q., Yang, H., Liu, X., Dai, L., Ma, T., Qi, J., Wong, G., Peng, R., Liu, S., Li, J., Li, S., Song, J., Liu, J., He, J., Yuan, H., Xiong, Y., Liao, Y., Li, J., Yang, J., Tong, Z., Griffin, B.D., Bi, Y., Liang, M., Xu, X., Qin, C., Cheng, G., Zhang, X., Wang, P., Qiu, X., Kobinger, G., Shi, Y., Yan, J. i Gao, G.F., 2016b. Molecular determinants of human neutralizing antibodies isolated from a patient infected with Zika virus. *Science Translational Medicine*, 8(369), s. 369ra179.
280. Wang, X., Tai, W., Zhang, X., Zhou, Y., Du, L. i Shen, C., 2019b. Effects of Adjuvants on the Immunogenicity and Efficacy of a Zika Virus Envelope Domain III Subunit Vaccine. *Vaccines*, 7(4), s. 161.
281. Wheeler, A.C., 2018. Development of Infants With Congenital Zika Syndrome: What Do We Know and What Can We Expect? *Pediatrics*, 141(Suppl 2), s. S154–S160.
282. Wilde, M., Klausberger, M., Palmberger, D., Ernst, W. i Grabherr, R., 2014. Tnao38, high five and Sf9—evaluation of host–virus interactions in three different insect cell lines: baculovirus production and recombinant protein expression. *Biotechnology Letters*, 36(4), s. 743–749.
283. Wu, Y., Liu, Q., Zhou, J., Xie, W., Chen, C., Wang, Z., Yang, H. i Cui, J., 2017. Zika virus evades interferon-mediated antiviral response through the co-operation of multiple nonstructural proteins in vitro. *Cell Discovery*, 3, s. 17006.
284. Xia, H., Luo, H., Shan, C., Muruato, A.E., Nunes, B.T.D., Medeiros, D.B.A., Zou, J., Xie, X., Giraldo, M.I., Vasconcelos, P.F.C., Weaver, S.C., Wang, T., Rajsbaum, R. i Shi, P.-Y., 2018. An evolutionary NS1 mutation enhances Zika virus evasion of host interferon induction. *Nature Communications*, 9(1), s. 414.
285. Xie, D.-Y., Liu, Z.-Y., Nian, Q.-G., Zhu, L., Wang, N., Deng, Y.-Q., Zhao, H., Ji, X., Li, X.-F., Wang, X., Shi, P.-Y. i Qin, C.-F., 2018a. a single residue in the  $\alpha$ B helix of the E protein is critical for Zika virus thermostability. *Emerging Microbes & Infections*, 7, s. 5.
286. Xie, X., Kum, D.B., Xia, H., Luo, H., Shan, C., Zou, J., Muruato, A.E., Medeiros, D.B.A., Nunes, B.T.D., Dallmeier, K., Rossi, S.L., Weaver, S.C., Neyts, J., Wang, T.,

- Vasconcelos, P.F.C. i Shi, P.-Y., 2018b. a single-dose live-attenuated Zika virus vaccine with controlled infection rounds that protects against vertical transmission. *Cell host & microbe*, 24(4), s. 487-499.e5.
287. Yamaji, H. i Konishi, E., 2013. Production of Japanese encephalitis virus-like particles in insect cells. *Bioengineered*, 4(6), s. 438–442.
288. Yamaji, H., Nakamura, M., Kuwahara, M., Takahashi, Y., Katsuda, T. i Konishi, E., 2013. Efficient production of Japanese encephalitis virus-like particles by recombinant lepidopteran insect cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(3), s. 1071–1079.
289. Yamaji, H., Segawa, M., Nakamura, M., Katsuda, T., Kuwahara, M. i Konishi, E., 2012. Production of Japanese encephalitis virus-like particles using the baculovirus–insect cell system. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 114(6), s. 657–662.
290. Yan, M., Peng, J., Jabbar, I.A., Liu, X., Filgueira, L., Frazer, I.H. i Thomas, R., 2004. Despite differences between dendritic cells and Langerhans cells in the mechanism of papillomavirus-like particle antigen uptake, both cells cross-prime T cells. *Virology*, 324(2), s. 297–310.
291. Yang, L., Xiao, A., Wang, H., Zhang, X., Zhang, Y., Li, Y., Wei, Y., Liu, W. i Chen, C., 2022. a VLP-Based Vaccine Candidate Protects Mice against Japanese Encephalitis Virus Infection. *Vaccines*, 10(2), s. 197.
292. Yang, M., Lai, H., Sun, H. i Chen, Q., 2017. Virus-like particles that display Zika virus envelope protein domain III induce potent neutralizing immune responses in mice. *Scientific Reports*, [online] 7. Dostępne na: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5550446/>> [dostęp 7.05.2018].
293. Yang, Q., Hughes, T.A., Kelkar, A., Yu, X., Cheng, K., Park, S., Huang, W.-C., Lovell, J.F. i Neelamegham, S., 2020. Inhibition of SARS-CoV-2 viral entry upon blocking N- and O-glycan elaboration. *eLife*, 9, s. e61552.
294. Yang, S., Onigman, P., Wu, W.W., Sjogren, J., Nyhlen, H., Shen, R.-F. i Cipollo, J., 2018. Deciphering Protein O-Glycosylation: Solid-Phase Chemoenzymatic Cleavage and Enrichment. *Analytical Chemistry*, 90(13), s. 8261–8269.
295. Yu, I.-M., Holdaway, H.A., Chipman, P.R., Kuhn, R.J., Rossmann, M.G. i Chen, J., 2009. Association of the pr peptides with dengue virus at acidic pH blocks membrane fusion. *Journal of Virology*, 83(23), s. 12101–12107.
296. Yu, L., Wang, R., Gao, F., Li, M., Liu, J., Wang, J., Hong, W., Zhao, L., Wen, Y., Yin, C., Wang, H., Zhang, Q., Li, Y., Zhou, P., Zhang, R., Liu, Y., Tang, X., Guan, Y., Qin, C.-F., Chen, L., Shi, X., Jin, X., Cheng, G., Zhang, F. i Zhang, L., b.d. Delineating antibody recognition against Zika virus during natural infection. *JCI Insight*, 2(12), s. e93042.
297. Yu, Y., Gao, C., Wen, C., Zou, P., Qi, X., Cardona, C.J. i Xing, Z., 2022. Intrinsic features of Zika Virus non-structural proteins NS2A and NS4A in the regulation of viral replication. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 16(5), s. e0010366.
298. Yuan, L., Huang, X.-Y., Liu, Z.-Y., Zhang, F., Zhu, X.-L., Yu, J.-Y., Ji, X., Xu, Y.-P., Li, G., Li, C., Wang, H.-J., Deng, Y.-Q., Wu, M., Cheng, M.-L., Ye, Q., Xie, D.-Y., Li, X.-F., Wang, X., Shi, W., Hu, B., Shi, P.-Y., Xu, Z. i Qin, C.-F., 2017. a single mutation in the prM protein of Zika virus contributes to fetal microcephaly. *Science*, 358(6365), s. 933–936.
299. Zanluca, C., Melo, V.C.A. de, Mosimann, A.L.P., Santos, G.I.V.D., Santos, C.N.D.D. i Luz, K., 2015. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(4), s. 569–572.
300. Zhang, F., Ma, W., Zhang, L., Aasa-Chapman, M. i Zhang, H., 2007. Expression of particulate-form of Japanese encephalitis virus envelope protein in a stably transfected *Drosophila* cell line. *Virology Journal*, 4, s. 17.
301. Zhang, R., Miner, J.J., Gorman, M.J., Rausch, K., Ramage, H., White, J.P., Zuiani, A., Zhang, P., Fernandez, E., Zhang, Q., Dowd, K.A., Pierson, T.C., Cherry, S. i Diamond, M.S., 2016. a CRISPR screen defines a signal peptide processing pathway required by flaviviruses. *Nature*, 535(7610), s. 164–168.

302. Zhang, S., Liang, M., Gu, W., Li, C., Miao, F., Wang, X., Jin, C., Zhang, L., Zhang, F. i Zhang, Q., 2011. Vaccination with dengue virus-like particles induces humoral and cellular immune responses in mice. *Virology journal*, 8(1), s. 333.
303. Zhang, W., Qu, P., Li, D., Zhang, C., Liu, Q., Zou, G., Dupont-Rouzeyrol, M., Lavillette, D., Jin, X., Yin, F. i Huang, Z., 2019a. Yeast-produced subunit protein vaccine elicits broadly neutralizing antibodies that protect mice against Zika virus lethal infection. *Antiviral Research*, 170, s. 104578.
304. Zhang, X., Sheng, J., Plevka, P., Kuhn, R.J., Diamond, M.S. i Rossmann, M.G., 2013. Dengue structure differs at the temperatures of its human and mosquito hosts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(17), s. 6795–6799.
305. Zhang, X., Xie, X., Xia, H., Zou, J., Huang, L., Popov, V.L., Chen, X. i Shi, P.-Y., 2019b. Zika Virus NS2A-Mediated Virion Assembly. *mBio*, 10(5), s. e02375-19.
306. Zhang, Y., Yeruva, L., Marinov, A., Prantner, D., Wyrick, P., Lupashin, V. i Nagarajan, U.M., 2014. The DNA sensor, cyclic GMP-AMP synthase (cGAS) is essential for induction of IFN beta during Chlamydia trachomatis infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 193(5), s. 2394–2404.
307. Zhang, Y., Zhao, W., Mao, Y., Chen, Y., Zheng, S., Cao, W., Zhu, J., Hu, L., Gong, M., Cheng, J. i Yang, H., 2021. O-Glycosylation Landscapes of SARS-CoV-2 Spike Proteins. *Frontiers in Chemistry*, 9, s. 689521.
308. Zhao, H., Fernandez, E., Dowd, K.A., Speer, S.D., Platt, D.J., Gorman, M.J., Govero, J., Nelson, C.A., Pierson, T.C., Diamond, M.S. i Fremont, D.H., 2016. Structural Basis of Zika Virus-Specific Antibody Protection. *Cell*, 166(4), s. 1016–1027.
309. Zhao, M. i Woodside, M.T., 2021. Mechanical strength of RNA knot in Zika virus protects against cellular defenses. *Nature Chemical Biology*, 17(9), s. 975–981.

## 11. Spis rycin

<b>Rycina 1. Epidemiologia ZIKV .....</b>	<b>19</b>
<b>Rycina 2. Cykl replikacyjny wirusa Zika.....</b>	<b>24</b>
<b>Rycina 3. Organizacja genomu i poliproteiny, wraz organizacją białek ZIKV w błonie lipidowej w trakcie obróbki potranslacyjnej.....</b>	<b>25</b>
<b>Rycina 4. Struktura wirionów ZIKV.....</b>	<b>28</b>
<b>Rycina 5. Struktura białka E i M.....</b>	<b>30</b>
<b>Rycina 6. Rozmieszczenie epitopów w strukturze homodimerów białka E.....</b>	<b>36</b>
<b>Rycina 7. Schemat wariantów rekombinowanych białek prM i E ZIKV .....</b>	<b>88</b>
<b>Rycina 8. Schemat konstrukcji wektorów plazmidowych pcDNA 3.1 V5-His kodujących warianty białek prM i E ZIKV (A) oraz analiza restrykcyjna wektorów plazmidowych (B) .....</b>	<b>89</b>
<b>Rycina 9. Porównanie wydajności transfekcji komórek 293T skonstruowanymi wektorami plazmidowymi pcDNA3.1/V5-His kodującymi warianty rekombinowanych białek prM i E ZIKV z użyciem testu IPMA. ....</b>	<b>90</b>
<b>Rycina 10. Analiza produkcji wariantów rekombinowanych białek prM i E ZIKV w komórkach 293T (A) i ich sekrecji do pożywki hodowlanej (B).. ....</b>	<b>91</b>
<b>Rycina 11. Analiza składania VLPs.....</b>	<b>92</b>
<b>Rycina 12. Porównanie produkcji VLPs wirusa Zika w linii komórkowej CHO-K1 i 293T. ....</b>	<b>96</b>
<b>Rycina 13. Wpływ zredukowanej temperatury hodowli oraz maślanu sodu na sekrecję VLPs. ....</b>	<b>97</b>
<b>Rycina 14. Ultrawierowanie VLPs w gradiencie gęstości sacharozy.....</b>	<b>98</b>
<b>Rycina 15. Obserwacja VLPs w wybranych frakcjach za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej po barwieniu negatywowym octanem uranylu. ....</b>	<b>99</b>
<b>Rycina 16. Schemat konstrukcji wektora bakulowirusowego kodującego wariant prME ZIKV (rBV prME ZIKV) z użyciem systemu Bac-to-Bac .....</b>	<b>101</b>
<b>Rycina 17. Porównanie produkcji i sekrecji VLPs wirusa Zika w liniach komórkowych Sf9 i High Five. ....</b>	<b>102</b>
<b>Rycina 18. Wpływ suplementacji poliaminami, cholesterolem lub kombinacją obu związków na produkcję VLPs wirusa Zika. ....</b>	<b>103</b>
<b>Rycina 19. Ultrawierowanie VLPs w gradiencie sacharozy.....</b>	<b>104</b>

<b>Rycina 20. Obserwacja VLPs w wybranych frakcjach za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej po barwieniu negatywowym octanem uranylu.....</b>	<b>105</b>
<b>Rycina 21. Miareczkowanie VLPs otrzymanych w komórkach 293T (frakcja 24% i 30%) i komórkach Sf9 (frakcja 30% i 36%) za pomocą przeciwciała ZV67 (A) i 4G2 (B) w teście ELISA. Porównanie wiązania przeciwciał ZV67 i 4G2 do VLPs dla rozcieńczenia 1.25 µg/ml (C). .....</b>	<b>107</b>
<b>Rycina 22. Wiązanie przeciwciał anti-prM VLPs otrzymanych w komórkach 293T i Sf9.....</b>	<b>109</b>
<b>Rycina 23. Wiązanie przeciwciał 4G2, ZKA78 oraz R34 skierowanych do różnych epitopów w DI i DII białka E do VLPs otrzymanych w komórkach 293T i Sf9... </b>	<b>110</b>
<b>Rycina 24. Wiązanie panelu przeciwciał (ZV67, ZV64, ZV48 i ZV2) przeciwko różnym epitopom w DIII białka E do VLPs otrzymanych w komórkach 293T i Sf9.....</b>	<b>111</b>
<b>Rycina 25. Wiązanie panelu przeciwciał (C10, B7, A11 i C8) przeciwko epitopom EDE1 i EDE2 do VLPs otrzymanych w komórkach 293T i Sf9.....</b>	<b>112</b>
<b>Rycina 26. Wpływ pH na wiązanie przeciwciał ZKA78, ZV67 oraz C10 do VLPs wyprodukowanych w komórkach 293T (A) oraz Sf9 (B).....</b>	<b>113</b>
<b>Rycina 27. Schemat działania glikozydaz specyficznych do N-glikanów - PNGazy F i Endo H<sub>f</sub> (A) i O-glikanów - O-glikozydazy (B). .....</b>	<b>114</b>
<b>Rycina 28. N- i O-glikozylacja glikoproteiny E w poszczególnych frakcjach VLPs otrzymanych w komórkach 293T (A) oraz komórkach Sf9 (B). .....</b>	<b>115</b>
<b>Rycina 29. N- i O-glikozylacja na powierzchni glikoproteiny E w poszczególnych frakcjach VLPs otrzymanych w komórkach 293T oraz komórkach Sf9. ....</b>	<b>116</b>
<b>Rycina 30. Wiązanie VLPs do receptorów lektynowych DC-SIGN i DC-SIGNR w teście ELISA. ....</b>	<b>117</b>
<b>Rycina 31. Struktury cukrowe wiązane przez lektynę UEA I (A) oraz wiązanie VLPs do lektyny UEA I w teście ELISA (B). ....</b>	<b>118</b>
<b>Rycina 32. Porównywanie immunogenności VLPs wyprodukowanych w komórkach 293T oraz Sf9. A .....</b>	<b>120</b>
<b>Rycina 33. Schemat konstruktów i ekspresja rekombinowanych F2A VLPs.....</b>	<b>126</b>
<b>Rycina 34. Analiza poziomu przeciwciał przeciwko ektodomenie E (anty-E) w surowicach poszczepiennych za pomocą testu ELISA. ....</b>	<b>127</b>
<b>Rycina 35. Wpływ temperatury i suplementacji maślanem sodu na produkcję F2A VLPs.....</b>	<b>128</b>

<b>Rycina 36. Oczyszczanie F2A VLPs. ....</b>	<b>129</b>
<b>Rycina 37. Analiza DLS i mikrografie elektronowe F2A VLPs.....</b>	<b>130</b>
<b>Rycina 38. Analiza N-glikozylacji i antygenowości glikoprotein prM/M i E F2A VLPs. ....</b>	<b>131</b>
<b>Rycina 39. Wpływ schematów dawkowania na immunogenność VLPs.....</b>	<b>134</b>
<b>Rycina 40. Wpływ typu adiuwantu na immunogenność VLPs. ....</b>	<b>136</b>



## 12. Spis tabel

<b>Tabela 1. Rodzina Flaviviridae, podział na rodzaje oraz wybrani przedstawiciele</b>	<b>16</b>
<b>Tabela 2. Ogólne funkcje białek wirusa Zika</b> .....	<b>25</b>
<b>Tabela 3. Cechy produkcji VLPs wybranych wirusów z rodzaju Flavivirus</b> .....	<b>47</b>
<b>Tabela 4. Lista starterów wykorzystanych do amplifikacji genów wariantów VLPs</b> .....	<b>57</b>
<b>Tabela 5. Ogólny schemat reakcji PCR do amplifikacji genów wariantów VLPs</b> .	<b>69</b>
<b>Tabela 6. Liczba komórek ssaczych linii Vero i 293T wysiewanych do transfekcji w różnych naczyniach hodowlanych</b> .....	<b>74</b>
<b>Tabela 7. Skład mieszanin reakcyjnych w traktowaniu glikozydazami</b> .....	<b>80</b>
<b>Tabela 8. Wartości rozcieńczeń VLPs z poszczególnych frakcji wykazujące <math>A_{450} \approx 2</math> dla przeciwciała ZV67</b> .....	<b>108</b>
<b>Tabela 9. Miana przeciwciał neutralizujących do ZIKV (H/PAN/2016/BEI-259634) w surowicach poszczepiennych za pomocą testu PRNT</b> .....	<b>127</b>

## 13. Osiągnięcia naukowe

### 13.1. Publikacje naukowe

#### 13.1.1. Powiązane tematycznie z rozprawą doktorską

1. Krol, E., Brzuska, G., & Szewczyk, B. (2019). Production and Biomedical Application of Flavivirus-like Particles. *Trends in biotechnology*, 37(11), 1202–1216.

<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.03.013>

2. Manuskrypt w procesie recenzji: Brzuska, G., Szewczyk, B., Krol, E. Influence of dosing regimen and adjuvant type on the immunogenicity of novel recombinant Zika virus-like particles. Praca złożona do czasopisma *Microbiology Spectrum*

#### 13.1.2. Dodatkowy dorobek naukowy

1. Krol, E., Pastuch-Gawolek, G., Chaubey, B., Brzuska, G., Erfurt, K., & Szewczyk, B. (2018). Novel Uridine Glycoconjugates, Derivatives of 4-Aminophenyl 1-Thioglycosides, as Potential Antiviral Compounds. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(6), 1435. <https://doi.org/10.3390/molecules23061435>

2. Brzuska, G., Pastuch-Gawolek, G., Krawczyk, M., Szewczyk, B., & Krol, E. (2020). Anti-Tick-Borne Encephalitis Virus Activity of Novel Uridine Glycoconjugates Containing Amide or/and 1,2,3-Triazole Moiety in the Linker Structure. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 13(12), 460. <https://doi.org/10.3390/ph13120460>

3. Krol, E., Wandzik, I., Brzuska, G., Eyer, L., Růžek, D., & Szewczyk, B. (2019). Antiviral Activity of Uridine Derivatives of 2-Deoxy Sugars against Tick-Borne Encephalitis Virus. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(6), 1129.

<https://doi.org/10.3390/molecules24061129>

4. Gonzalez, S.\*, Brzuska, G.\*, Ouarti, A., Gallier, F., Solarte, C., Ferry, A., Uziel, J., Krol, E., & Lubin-Germain, N. (2022). Anti-HCV and Zika activities of ribavirin C-nucleosides analogues. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 68, 116858.

\* równocenny wkład w pracę

<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2022.116858>

5. Karłowicz, A., Dubiel, A. B., Czerwinska, J., Bleda, A., Purzycki, P., Grzelewska, M., McAuley, R. J., Szczesny, R. J., Brzuska, G., Krol, E., Szczesny, B., & Szymanski, M. R. (2022). In vitro reconstitution reveals a key role of human mitochondrial EXOG

in RNA primer processing. *Nucleic acids research*, 50(14), 7991–8007.

<https://doi.org/10.1093/nar/gkac581>

## **13.2. Konferencje**

### *13.2.1. Wystąpienia ustne*

Młodzi dla Fahrenheita (2021 Gdańsk): Gabriela Brzuska, *Rekombinowane cząstki wirusopodobne jako potencjalne antygeny szczepionkowe przeciwko wirusom z rodzaju Flavivirus*

### *13.2.2. Postery*

1. 7th International Weigl Conference (2017 Lviv, Ukraine): Ewelina Król, Gabriela Brzuska, Bogusław Szewczyk. *Expression of recombinant tick-borne encephalitis virus-like particles in insect cells*
2. Bioinnovation International Summit 2017 (2017, Gdansk, Poland): Ewelina Król, Gabriela Brzuska, Bogusław Szewczyk. *Expression of recombinant tick-borne encephalitis virus-like particles in insect cells*
3. Virus-Like Particle & Nano-Particle Vaccines (2018, Bern, Switzerland): Ewelina Krol, Gabriela Brzuska and Boguslaw Szewczyk. *Production of virus-like particles of tick-borne encephalitis virus in insect cells*
4. 7th European Seminar in Virology (EUSEV) “Vaccines and antibodies against viral infections” (Padova, Italy, 2019): Gabriela Brzuska, Ewelina Król, Bogusław Szewczyk. *Production of flavivirus virus-like particles for vaccine purposes*
5. 7th EUROBIOTECH Congress, (Krakow, 2019). Brzuska Gabriela, Dziadosz Alicja, Szewczyk Boguslaw, Krol Ewelina, *Characterization of Zika virus-like particles for vaccine purposes.*

### *13.2.3. Abstrakty konferencyjne*

Brzuska, G., Dziadosz, A., Szewczyk, B., Krol, E. (2020). Characterization of Zika virus-like particles as potential vaccine antigens. *International Journal of Infectious Diseases*, 1147/ Volume 101, SUPPLEMENT 1, 472. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.09.1236>

### **13.3. Zgłoszenia patentowe**

#### *13.3.1. Zgłoszenia do Urzędu Patentowego Rzeczypospolitej Polskiej*

1. Król, E., Szewczyk, B., Brzuska, G., Czarnota, A. Sekwencje aminokwasowe rekombinowanych białek flawiwirusowych oraz rekombinowanych flawiwirusowych cząstek wirusopodobnych, ich zastosowanie do zapobiegania zakażeniom wirusem Zika oraz zastosowanie diagnostyczne in vitro (P.430234), Data zgłoszenia - 2019-06-13
2. Król, E., Szewczyk, B., Zimna, M., Brzuska, G. Sekwencja aminokwasowa rekombinowanych cząstek wirusopodobnych wirusa kleszczowego zapalenia mózgu oraz ich zastosowanie jako antygeny szczepionkowego do zapobiegania zakażeniom wirusem kleszczowego zapalenia mózgu (P.438966), Data zgłoszenia – 2021-09-17

#### *13.3.2. Zgłoszenia do Europejskiego Urzędu Patentowego*

Król, E., Szewczyk, B., Brzuska, G., Czarnota, A. Amino acid sequences of recombinant flaviviral virus-like particles, their medical use in the prevention of Zika virus infection (EP20751675.8).

### **13.4. Granty naukowe**

Grant uzyskany w wyniku Konkursu dla Młodych Pracowników Nauki UG (2019) *Nadprodukcja i analiza cząstek wirusopodobnych wirusa Zika ze zmodyfikowanymi własnościami antygenowymi.*

Grant uzyskany w wyniku Konkursu Projektów Badawczych dla Uczestników Interdyscyplinarnych Przyrodniczo-Matematycznych Studiów Doktoranckich UG-GUMed (2021) *Wpływ O-glikanów na właściwości antygenowe cząstek wirusopodobnych wirusa Zika.*

Grant NCN – Preludium (2022) (UMO-2021/41/N/NZ6/01610). *Rola O-glikozylacji białek osłonkowych wirusa Zika w cyklu replikacyjnym oraz wpływ na antygenowość*