

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Patrik SEVŠEK

**OPTIMIZACIJA POGOJEV SESTAVLJANJA IN
RAZSTAVLJANJA VIRUSOM PODOBNIH DELCEV**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Patrik SEVŠEK

**OPTIMIZACIJA POGOJEV SESTAVLJANJA IN RAZSTAVLJANJA
VIRUSOM PODOBNIH DELCEV**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja

**OPTIMIZATION OF CONDITION FOR VIRUS-LIKE PARTICLES
ASSEMBLY AND DISASSEMBLY**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Biotehnologija. Delo je bilo opravljeno na Centru odličnosti za biosenzoriko, instrumentacijo in procesno kontrolo ter na Nacionalnem inštitutu za biologijo.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorja/mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Aleša Podgornika, za somentorico prof. dr. Majo Ravnikar in za recenzenta prof. dr. Gorazda Avguština.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka Javornik

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Aleš Podgornik

Center odličnosti za biosenzoriko, instrumentacijo in procesno kontrolo,
Laboratorij za bioanalitiko

Član: prof. dr. Maja Ravnikar

Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko
biologijo

Član: prof. dr. Gorazd Avguštin

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Ocena:

Podpisani izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Patrik Sevšek

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2
DK UDK 606:61:578:89:577.2 (043.2)
KG virusom podobni delci/norovirus/izražanje/ zaključni postopki/ karakterizacija/ proces razstavljanja/ proces ponovnega sestavljanja
AV SEVŠEK Patrik
SA PODGORNIK, Aleš (mentor)/RAVNIKAR, Maja (somentorica)
KZ SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI 2015
IN OPTIMIZACIJA POGOJEV SESTAVLJANJA IN RAZSTAVLJANJA VIRUSOM PODOBNIH DELCEV.
TD Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja)
OP X, 58 str., 10 pregl., 30 sl., 72 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Virusom podobni delci (VPD) so visoko organizirane strukture, sestavljene iz več kopij enega ali več različnih virusnih proteinov, ki imajo naravno tendenco po spontanem sestavljanju v kapside. Te so po morfologiji zelo podobne ali identične morfologiji virusa, zato so zanimiva alternativa obstoječim cepivom. Kljub dobrim obetom množično proizvodnjo še vedno omejuje nekaj kritičnih dejavnikov, kot so izbira ustreznega sistema za izražanje, zaključni procesi in pomanjkanje ustreznih metod za karakterizacijo VPD. V magistrskem delu smo uporabili v rastlini *Nicotiana benthamiana* izražene norovirusom podobne delce (No-VPD). Z ustrezeno izbiro zaključnih procesov (homogenizacija, centrifugiranje, filtriranje, obarjanje, ionsko izmenjevalna kromatografija) smo uspeli pridobiti zadovoljivo količino čistih No-VPD, da smo jih lahko uporabili pri iskanju ustreznih analitskih metod za karakterizacijo VPD. Z njihovo pomočjo smo nato sledili razpadu No-VPD na kapsidne proteine v obdobju 4-urne inkubacije No-VPD v 50 mM natrijevem fosfatnem pufru pH 8.87 ter ponovnemu sestavljanju v 250 mM natrijevem fosfatnem pufru pri treh različnih pH-vrednostih. Delež pravilno sestavljenih No-VPD je bil največji v vzorcu, pri katerem je proces ponovnega sestavljanja potekal v 250 mM natrijevem fosfatnem pufru pH 6 (87,5 %), povprečna velikost pravilno sestavljenega delca pa je bila ($38,79 \pm 0,51$) nm. Rezultate, elektronsko mikroskopskega opazovanja morfologije No-VPD, smo potrdili z metodo dinamičnega razprševanja svetlobe (DLS). V 250 mM natrijevem fosfatnem pufru pH 6 je bila povprečna velikost delcev 39,26 ($\pm 8,46$) nm, vzorec je imel 21,6-odstotnega deleža polidisperznosti. V 50 mM natrijevem fosfatnem pufru pH 8.87 pa je bila povprečna velikost delca 16,57 ($\pm 3,99$) nm s 24,1-odstonim deležem polidisperznosti. Največji delež polidisperznosti je imel začetni vzorec (kromatografske frakcije) (78,7 %), kar kaže na zelo heterogeno stanje pred procesom razstavljanja in ponovnega sestavljanja.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2
DC UDC 606:61:578:89:577.2 (043.2)
CX Virus like particles/noroviruses/expresion/downstream processing/characterization/disassembly process/reassembly process
AU SEVŠEK Patrik
AA PODGORNIK, Aleš (supervisor)/RAVNIKAR, Maja (co-supervisor)
PP SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Academic Study in Biotechnology
PY 2015
TI OPTIMIZATION OF CONDITION FOR VIRUS-LIKE PARTICLES ASSEMBLY AND DISASSEMBLY
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
NO X, 58 p., 10 tab., 30 fig., 72 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Virus-like particles (VLPs) are highly organized structures consisting of multiple copies of one or more different viral proteins which have natural tendency for spontaneous assembling into capsids, which have similar or identical morphology to the virus. Thus they are a good alternative to the existing vaccines. Despite the good prospects, there are still certain limiting factors hindering the mass production, including the choice of an appropriate expression system, downstream processing and lack of suitable methods for the characterization of VLP. In this work we have used norovirus-like particles (No-VLP) expressed in the plant *Nicotiana benthamiana*. By appropriate selection of downstream processing techniques (homogenization, centrifugation, filtration, precipitation, ion-exchange chromatography), we managed to obtain a sufficient amount of clean No-VLPs which were further used to find appropriate analytical methods for the characterization of VLP. Using these, we followed the disassembly process of the No-VLP to the capsid proteins within a 4 hour incubation period in 50 mM sodium phosphate buffer pH 8.87, and re-assembly process in 250 mM sodium phosphate buffer at three different pH values. The proportion of correctly assembled No-VLPs was largest in the sample, where the process of re-assembly took place in 250 mM sodium phosphate buffer at pH 6 (87.5%). The average size of the correctly assembled particles was (38.79 ± 0.51) nm. The results obtained by observing the morphology of No-VLP under the electron microscope was confirmed by the method of dynamic light scattering (DLS). In 250 mM sodium phosphate buffer pH 6, the average particle size was 39.26 (± 8.46) nm with 21.6% share of polydispersity. On the other hand, in 50 mM sodium phosphate buffer pH 8.87, average particle size was 16.57 (± 3.99) nm with 24.1% share of polydispersity. The largest share of polydispersity had initial sample (chromatographic fractions) (78.7 %), indicating a very heterogeneous situation before disassembly and reassembly process.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
1.1 CILJI DELA	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 NOROVIRUSI	3
2.2 VIRUSOM PODOBNI DELCI (VPD)	3
2.2.1 Producija VPD	4
2.2.2 Zaključni procesi v proizvodnji VPD	5
2.2.2.1 Liza celic organizma za izražanje	6
2.2.2.2 Odstranitev celičnega lizata ter ostalih večjih agregatov	6
2.2.2.3 Korak koncentriranja	6
2.2.2.4 Fino čiščenje, izolacija	7
2.2.3 Razstavljanje in ponovno sestavljanje VPD	7
2.3 NOROVIRUSOM PODOBNI DELCI	7
2.3.1 Mali No-VPD	8
2.3.2 Pogoji za razstavljanje in ponovno sestavljanje No-VPD	9
2.4 ANALITSKE METODE	9
3 MATERIALI IN METODE	12
3.1 MATERIALI	14
3.1.1 No-VPD	14
3.1.2 Aparature in oprema	14
3.1.3 Ostali pripomočki	14
3.1.4 Pufri in reagenti	15
3.1.5 Ostale kemikalije	15
3.2 METODE	15
3.2.1 Transgeno izražanje No-VPD v rastlini <i>Nicotiana benthamiana</i>	15
3.2.1.1 Priprava rastlin za agroinfiltracijo	15
3.2.1.2 Priprava suspenzije za agroinfiltracijo	16
3.2.1.3 Agroinfiltracija listov rastline N. benthamiana	16
3.2.2 Elektronsko mikroskopiranje	17
3.2.2.1 Priprava mrežic za analizo na presevnem elektronskem mikroskopu	17
3.2.2.2 Analiza mrežic na presevnem elektronskem mikroskopu	17
3.2.2.3 Meritve povprečne velikosti delcev ter standardnega odklona v populaciji delcev	17
3.2.2.4 Ocena deleža pravilno sestavljenih delcev	18
3.2.3 Ionsko izmenjevalna kromatografija	18
3.2.3.1 Priprava diska	19
3.2.3.2 Delo na HPLC sistemu	19
3.2.3.3 Regeneracija in čiščenje monolitnega diska	19

3.2.4	Poliakrilamidna gelska elektroforeza v pristnosti natrijevega dodecil sulfata (SDS PAGE)	19
3.2.5	Dinamično razprševanje svetlobe (DLS).....	20
4	REZULTATI	21
4.1	RAZVOJ ANALITSKE METODE ZA DETEKCIJO NO-VPD/VP1 PROTEINA V VZORCU	21
4.1.1	Elektronski presevni mikroskop (TEM)	21
4.1.2	Poliakrilamidna gelska elektroforeza v pristnosti natrijevega dodecil sulfata (SDS PAGE)	22
4.1.3	Encimskoimunski test (ELISA).....	22
4.2	IZOLACIJA IN KONCENTRACIJA NO-VPD	23
4.2.1	Homogenizacija rastlinskega materiala	24
4.2.2	Groba odstranitev nečistoč	24
4.2.3	Obarjanje No-VPD	24
4.2.4	Odstranjevanje ostankov PEG-6000	25
4.2.5	Variabilnost med šaržama	27
4.3	(DODATEN) KROMATOGRAFSKI KORAK ČIŠČENJA IN KONCENTRIRANJE NO-VPD	27
4.3.1	Optimizacija pogojev za vezavo No-VPD na CIM QA disk monolitno kolono	27
4.3.2	Detekcija kromatografsko očiščenih No-VPD s TEM	29
4.3.3	Karakterizacija vrhov – analitska kromatografija	30
4.3.4	Koncentriranje No-VPD na CIM QA disk monolitni koloni	32
4.4	RAZSTAVLJANJE IN (PONOVO) SESTAVLJANJE NO-VPD	36
4.4.1	Sledenje procesa razpada in ponovnega sestavljanja No-VPF z elektronskim presevnim mikroskopom	36
4.4.1.1	Ocena deleža pravilno sestavljenih No-VPD	39
4.4.1.2	Ocena velikosti in homogenosti znotraj pravilno sestavljenih No-VPD	39
4.4.2	Monitoring procesa razpada in ponovnega sestavljanja VPD s DLS	40
4.4.3	Razvoj hitre metode za optimizacijo razstavljanja in sestavljanja	41
5	RAZPRAVA.....	43
5.1	IZBIRA ANALITSKIH METOD	43
5.1.1	Elektronski presevni mikroskop (TEM)	43
5.1.2	Poliakrilamidna gelska elektroforeza v pristnosti natrijevega dodecil sulfata (SDS PAGE)	43
5.1.3	Encimskoimunski test (ELISA).....	44
5.2	IZOLACIJA IN KONCENTRACIJA NO-VPD	44
5.3	DODATEN KROMATOGRAFSKI KORAK	45
5.4	OPTIMIZACIJA RAZSTAVLJANJA IN PONOVNega SESTAVLJANJA NO-VPD	47
6	SKLEPI	50
7	POVZETEK	51
8	VIRI	53
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Predstavitev sistemov za izražanje VPD	5
Preglednica 2: Pregled analitskih metod, uporabljenih pri analitiki VPD.....	10
Preglednica 3: Pufri, ki smo jih uporabili tokom eksperimentalnega dela ter njihova sestava.....	15
Preglednica 4: Postopek priprave CIM QA nosilca za delo	19
Preglednica 5: Rezultati testiranja encimskoimunskega testa (ELISA)	23
Preglednica 6: Postopek prve faze izolacije No-VPD	24
Preglednica 7: Morfološka variabilnost med serijama spremljana z elektronskim mikroskopom.....	27
Preglednica 8: Ocena delež pravilno sestavljenih No-VPD, s pomočjo opazovanja morfologije No-VPD z elektronskim mikroskopom.	39
Preglednica 9: Povprečne velikosti delcev v vzorcu, s podanim deležem polidisperznosti, rezultati pridobljeni z metodo dinamičnega razprševanja svetlobe (DLS)	40
Preglednica 10: Shema naložitve na SDS PAGE (slika 29).....	41

KAZALO SLIK

Slika 1:	Poenostavljen hodogram zaključnih procesov v proizvodnji VPD.	6
Slika 2:	Zgoraj – posneteka elektronske mikroskopije, negativni kontrast; levo velika različica, desno mala različica. Spodaj – shematska predstavitev obeh različic norovirusnih kapsid (White in sod., 1997).....	8
Slika 3:	Shema izbora analitskih metod uporabljenih pri eksperimentalnem delu	12
Slika 4:	Hodogram eksperimentalnega dela.....	13
Slika 5:	Elektronska mikroskopija, negativni kontrast: Primer ročnega označevanja (številčenja) No-VPD za potrebe naključnega izbora reprezentativnega vzorca. A – neoznačena slika, B – ročno oštevilčeni No-VPD.....	18
Slika 6:	Elektronska mikroskopija, negativni kontrast: A in B primer pravilno sestavljenega No-VPD, C in D primer nepopolno, napačno sestavljenega No-VPD	18
Slika 7:	38.17 nm velik delec (No-VPD) posnet z TEM pri 92000-kratni povečavi. Desno histogram intenzitete pikslov narejen s programom Gatan DigitalMicrograph, ki nakazuje na ustrezeno velikost NO-VPD z T=3 simetrijo.....	21
Slika 8:	NaDS-PAGE, 1(proteinski markerji), 2 (vzorec pri katerem so bili pod TEM vidni No-VPD).....	22
Slika 9:	Elektronska mikroskopija: A – posnetek permeata dobljenega po filtraciji skozi membrano s 100 kDa porami, B – posnetek retentata, na katerem vidimo prisotnost No-VPD.	23
Slika 10:	SDS PAGE, barvanje s srebrom: 1 (markerski proteini), 2 (homogenizat rastlinskega materiala), 3 (filtrat homogenizata rastlinskega materiala), 4 in 5 (resuspendiran preipitat poobarjanju s PEG-6000), 6 in 7 (supernatant poobarjanju s PEG 6000)	25
Slika 11:	Elektronska mikroskopija: negativni kontrast No-VPD posnetih pri različnih stopnjah izolacije. A (homogenizat rastlinskega materiala) B (filtrat homogenizata rastlinskega materiala, C (resuspendiran preipitat poobarjanju s PEG-6000), D (supernatant poobarjanju s PEG 6000), E (vodna faza po ekstrakciji z kloroformom).....	26
Slika 12:	Kromatogram: Naložitev 100 µl No-VPD izolata na CIM QA disk.Na sliki so z rdečimi navpičnimi črtami označene lovljene frakcije, ki so označene z zaporedno številko SDS-PAGE žepka, v katerega smo nanesli frakcijo (slika 13).	28
Slika 13:	SDS PAGE, barvanje s srebrom: 1 (markerki proteini), 2 (izolat No-VPD), 3 (kromatografska frakcija -0,6 - 0,4 ml), 4 (kr. frakcija 0,4 – 1,4 ml), 5 (kr. frakcija 1,4 – 2,4 ml), 6 (kr. frakcija 2,4 – 3,4 ml), 7 (kr. frakcija 3,4 – 4,4 ml), 8 (kr. frakcija 4,4 – 5,4 ml).....	28
Slika 14:	12-kratna naložitev izolata No-VPD na CIM QA disk; A (graf spremembe absorbance pri 280 nm po injiciranjih, injiciranja označena s puščico), B (graf spremembe prevodnosti po injiciranjih).....	29
Slika 15:	Kromatogram: Metoda izločanja No-VPD iz QA AIM diska v kromatografske frakcije. Puščici povezujeta vrh z pripadajočim TEM posnetkom. Meje lovljenih frakcij so na grafu označene z rdečo navpično črto.....	30

Slika 16: Kromatogram izločanja No-VPD z linearnim gradientom do 0,5M NaCl, skupaj z pripadajočima rezultatoma analiz vrhov.....	31
Slika 17: Elektronska mikroskopija, negativen kontrast: Mala (23 nm) in velika (38 nm) velika verzija No-VPD, skupaj z meritvijo velikosti (merjena delca sta označena z rdečo puščico). ..	32
Slika 18: Kromatogram: 5-kratno injiciranje 500 µl izolata No-VPD na QA CIM disk. ..	33
Slika 19: Primerjava intenzitete nevezne frakcije med nefiltriranim vzorcem in ter filtriranim skozi membranski filter s porami velikimi 100 nm. Vijolične vertikalne črte predstavljajo injiciranje 100 µl vzorca.....	33
Slika 20: SDS PAGE, barvanje s srebrom: 1 (markerski proteini), 2 (združeni kromatografski frakciji obeh vrhov prve stopnje koncentriranja), 3 (združene kromatografske frakcije obeh vrhov prve stopnje koncentriranja – ponovitev)	34
Slika 21: Kromatogram: Naložitev 200 ml redčenih kromatografskih frakcij na QA CIM disk preko črpalke.....	34
Slika 22: Kromatogram: Izločitev No-VPD iz QA CIM diska v kromatografsko frakcijo (5,2-6,4 ml).....	35
Slika 23: NaDS PAGE, barvanje s srebrom: 1 (združeni kromatografski frakciji obeh vrhov druge stopnje koncentriranja, 2 (združeni kromatografski frakciji obeh vrhov druge stopnje koncentriranja, ponovitev), 3 (kromatografska frakciji pri spremembi koncentracije soli na 0,5 M NaCl), 4 (kromatografska frakciji pri spremembi koncentracije soli na 1,0 M NaCl).	35
Slika 24: Začetno stanje, No-VPD v 10 mM fosfatnem pufru pH 7. A – mala povečava, B – večja povečava.	36
Slika 25: Vmesno stanje, razstavljeni No-VPD v 50 mM fofatnem pufru pH9. A – mala povečava, B – večja povečava.....	37
Slika 26: Končno stanje, ponovno sestavljeni No-VPD, A in B – 250 mM fosfatni pufer pH 6; B in C 250 mM fosfatni pufer pH 6,5; E in F 250 mM fosfatni pufer pH7. A, C, E – mala povečava; B, D, F – večja povečava.	38
Slika 27: Povprečna velikost No-VPD s pripadajočim standardnim odliklonom.....	39
Slika 28: Graf porazdelitve velikosti delcev v odvisnosti z deležem števila delcev, podatki pridobljeni z metodo dinamičnega razprševanja svetlobe.	40
Slika 29: SDS PAGE, barvanje s srebrom: Poskus razvoja hitre metode za spremljanje razstavljenosti, sestavljenosti No-VPD.....	41
Slika 30: Elektronska mikroskopija: A – retentat vzorca v pufru za sestavljanje pH 6, B – permeat vzorca v pufru za sestavljanje pH 6.....	42

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

DLS	metoda dinamičnega razprševanja svetlobe
DNA	deoksiribonukleinska kislina
ELISA	encimskoimunski test
SDS PAGE	poliakrilamidna gleska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata
No-VPD	norovirusom podobni delci
OD	optična gostota
ORF	odprt bralni okvir
PEG-6000	polietilenglikol z povprečno molekulsko maso 6000
RNA	ribonukleinska kislina
TEM	presevni elektronski mikroskop
TLR	Toll-u podobni receptor
VPD	virusom dodobni delci

1 UVOD

Cepiva so se v preteklosti izkazala kot dobra preventiva pri preprečevanju širjenja nalezljivih bolezni, še več, mnogi menijo (npr. Cooper in sod., 2012), da so ključna pri občutnem podaljšanju življenjske dobe človeka v 20. stoletju. Ne nazadnje so s cepivi izkoreninili bolezen črnih koz, skoraj izkoreninili otroško paralizo ter občutno zmanjšali pojavnost bolezni, kot so ošpice, rdečke, mumps, oslovski kašelj in davica (Plotkin, 2005). Povečini so cepiva osnovana na mrtvih ali oslabljenih patogenih mikroorganizmih, kar ima za posledico pojavnost stranskih učinkov v manjšem deležu cepljene populacije. To predstavlja resno težavo, ker se med ljudmi širi strah pred cepljenjem, kar vodi v zmanjšano precepljenost populacije, posledično nekoč že zajezene bolezni pa znova predstavlajo težavo (Amanna in Slifka, 2005).

V iskanju varnejše različice cepiv, ki bi bi jih ljudje sprejeli z večjim zaupanjem, so farmacevti najprej razvili komponentna cepiva (angl. subunit vaccine). Gre za rekombinantno izražene beljakovinske podenote, ki povečini predstavljajo površinske antigene patogenih mikroorganizmov. Slabost takšnih cepiv je slaba imunogenost (Kushnir in sod., 2012).

Virusom podobni delci (VPD) predstavljajo alternativo cepivom, ki so pripravljena iz oslabljenih oziroma inaktiviranih virusov ali virusnih podenot. Njihova prednost je predvsem v tem, da v celoti odražajo zunanjou strukturo virusa, kar omogoča ustrezni imunski odziv, po drugi strani pa ne vsebujejo dednega materiala, zaradi česar je onemogočeno njihovo razmnoževanje v telesu in s tem možnost okužbe. Tako so bila v zadnjih 20 letih cepiva na osnovi VPD predmet mnogih predkliničnih ter kliničnih študij, kot rezultat omenjenih študij pa lahko izpostavimo cepivo proti hepatitisu B ter cepivo proti humanemu papiloma virusu (Jennings in Bachmann, 2008).

VPD lahko pripravimo z različnimi sistemi za izražanje, sama izbira je največkrat odvisna od kompleksnosti kapside (število kapsidnih proteinov, VPD-ovojnico z njo ali brez nje). V industriji pa so pomembne lastnosti še sposobnost prenosa v večje merilo, izkoristek, hitrost, stroškovna učinkovitost in stanje na področju predpisov. Rastline kot sistem za izražanje so s tega vidika zanimive, saj so zmožne produkcije velike količine heterologno izraženih proteinov po nizki ceni, ki so obenem še pravilno zviti, zaradi evolucijske oddaljenosti pa je možnost vnosa humanih patogenov majhna (Chen, 2011; Faye in Gomord, 2010). Prvi poskusi produkcije VPD s transgenimi rastlinami so rezultirali v nizki in počasni produkciji (Roldão in sod., 2010). To se je dogajalo predvsem, ko so žeeli izražati VPD v trajno transgenih rastlinah, boljše rezultate pa je dalo izražanje v prehodno transgenih rastlinah, na primer s sistemom magnICON 22 (Gleba in sod., 2005).

Zaključni procesi v proizvodnji VPD so zahtevni, saj moramo VPD ločiti od sestavin organizma za izražanje podobnih velikosti ter ostalih nečistoč (DNA in proteini gostitelja). Ker se VPD znotrajcelično spontano sestavijo, obstaja nevarnost, da med sestavljanjem pride do zajetja nečistoč v notranjost VPD-jev, kar ima lahko neželene učinke v primeru njihove uporabe kot cepiva. Zaradi tega je v nekaterih primerih potrebno po izolaciji VPD-je razstaviti na kapsidne proteine, proteine očistiti in jih nato ponovno sestaviti v VPD-je, s tem pa se lahko izboljšata tudi stabilnost in imunogenost VPD (Zhao in sod., 2012). Še

več, z *in vitro* procesom razstavljanja in ponovnega sestavljanja je možno v notranjost VPD zapakirati ligande za Toll podobne receptorje (TLR, angl. Toll-like receptor), s tem poleg antigenov dostavimo tudi aktivatorje za T-celični odgovor (Jennings in Bachmann, 2008).

1.1 CILJI DELA

- Izolacija zadostnega števila norovirusom podobnih delcev (No-VPD), namnoženega v rastlinah ter poiskati ustrezne tehnike zaključnih procesov.
- Poiskati analitske metode za karakterizacijo No-VPD.
- Fizikalno razstavljanje VPD na kapsidni protein in njegova ločba od nečistoč.
- Optimizacija pogojev spontanega fizikalnega sestavljanja VPD-jev in vitro.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Pred začetkom dela smo postavili naslednje hipoteze:

- V rastlinah je možno nagojiti večje količine No-VPD.
- No-VPD je mogoče izolirati od ostalih rastlinskih nečistoč.
- Obstaja fizikalno okolje, ki omogoča razklop VPD na kapsidni proteine.
- Kapsidni protein je mogoče očistiti in ločiti od nečistoč.
- Obstaja fizikalno okolje, ki omogoča spontano sestavljanje kapsidnega proteina v VPD.

2 PREGLED OBJAV

V poglavju je zbran pregled literature v obsegu, ki je potreben za razumevanje eksperimentalnega dela in razprave.

2.1 NOROVIRUSI

Rod Norovirusov (predhodno poimenovanih virusu Norwalk podobni virusi) je del družine *Caliciviridae*. So brez ovoja, v notranjosti kapside je 7,5–7,7 kilobaznih parov velika enovijačna RNA, sestavljena iz treh odprtih bralnih okvirjev (ORF) (Atmar in Estes, 2006; Bull in sod., 2007; Katayama in sod., 2002). Študije strukture so pokazale, da se gen za kapsidni protein VP1 nahaja na drugem ORF. Prvi ORF kodira nestruktурne proteine, vključno z RNA-polimerazo, ki je potrebna za pomnoževanje virusa, tretji ORF pa VP2-protein, čigar funkcija še ni popolnoma jasna, povezuje pa se z dodatno stabilizacijo virusnega delca ter regulacijo izražanja gena za protein VP1 (Zheng in sod., 2006; Bertolotti-Ciarlet in sod., 2003).

Norovirusi so vodilni vzrok za gastroentritise, ocenjuje se, da je približno 50 odstotkov gostoentritisov posledica okužbe z norovirusi. V slabše razvitih delih sveta letno zabeležijo 124 milijonov hospitalizacij in 1,8 milijona smrti, v razvitih državah pa 1,1 milijona hospitalizacij in 218.000 smrti. Med hospitaliziranimi in umrlimi je največ otrok, mlajših od 5 let (Patel in sod., 2008). Glavna težava, ki ovira temeljitejše spoznavanje norovirusa ter iskanja potencialnih poti k razvoju ustreznegata zaščitnega cepiva, je v pomanjkanju sistemov za gojenje virusa *in vitro* (Duizer in sod., 2004).

2.2 VIRUSOM PODOBNI DELCI (VPD)

Širše gledano se k VPD prištevajo vse neokarakterizirane strukture z virusno morfologijo, najdene v bioloških vzorcih, strukture virusnega izvora, ki ne vsebujejo dednega materiala, vsi infektivni virusni delci s kemično ali z genetsko modifikacijo strukture ter vsi delci, ki jih pridobimo z izražanjem strukturnih genov virusa v heterolognem gostitelju (Zeltins, 2013). Prav s heterolognim izražanjem strukturnih proteinov virusov, je možno doseči visoko produkcijo, to ponuja znanstvenikom široko paletmožnosti, od bazičnih raziskav sestavljanja ter strukture virusov do bolj aplikativnih raziskav, kot je razvoj cepiv na osnovi VPD.

Cepiva proti virusnim boleznim običajno temeljijo na oslabljenih ali kemično inaktiviranih živih virusih, na ta način vedno obstaja možnost razvoja bolezni zaradi cepljenja, če virus ni bil popolnoma inaktiviran, ali kadar se mu povrnejo virulentni dejavniki. Alternativno je v nekaterih primerih učinkovito že cepljenje z virusno podenoto, na primer virusnim proteinom ali peptidom. Pogosto pa se pojavi težava, saj je pri tem načinu potrebno več doz z visoko koncentracijo antiga, da dosežemo enak zaščitni efekt, kot pri cepljenju z oslabljenim virusom. To občutno poveča stroške cepljenja, kar seveda vodi v slabšo precepljenost populacije, še posebej v državah v razvoju (Noad in Roy, 2003).

Za razliko od posameznih proteinov, peptidov, so VPD sestavljeni iz več enot enega ali več različnih proteinov, ki imajo tendenco, da se struktorno organizirajo v delce, ki so identični

ali zelo podobni strukturi naravnega virusa, vendar v svoji notranjosti ne vsebujejo dednega materiala, ki je nujen za pomnoževanje virusa v gostitelju (Zeltins, 2013). Na ta način so VPD boljša izbira kot oslabljeni virusi, ki dednino še vedno vsebujejo, na drugi strani pa za razliko od posameznih podenot virusa vzbudijo enak imunski odziv kot oslabljeni virusi, saj zaradi velikosti delcev izzovejo ne samo z B-celicami posredovan imunski odziv, pač pa jih vase lahko poskajo tudi antigene predstavitevne celice, to pa vodi v aktivacijo T-celic (Noah in Roy, 2003; Zeltins, 2013).

Poleg cepiv imajo VPD velik potencial tudi pri številnih drugih uporabah. Omeniti velja zdravljenje genetskih bolezni z gensko terapijo, na tem področju se VPD ponujajo kot vektorji za prenos gena na ciljano mesto v telesu (Lamarre in sod., 2011). Obstojecih vektorjev (virusi in sintetični liposomi) imajo namreč nekaj ključnih pomanjkljivosti, na primer z velikostjo omejena sposobnost pakiranja večjih genov, težavna proizvodnja ter nezaželeni imunski odzivi. VPD je na drugi strani moč proizvesti v mnogo večjih koncentracijah, z nižjimi stroški, hkrati pa je mogoče z genskim inženiringom že na začetku zasnovati tak VPD, ki v telesu ne bo sprožil imunskega odgovora (Seow in sod., 2009).

V zadnjem času so VPD vse bolj zanimivi tudi za razvoj novih (nano)materialov, saj za razliko od kemično sintetiziranih produktov ponujajo več pestrosti, saj njihove velikosti variirajo od 10 do 2.000 nm, imajo unikatne strukture, ki jih lahko dodatno spremojamo s kemijskimi in z molekularno biološkimi tehnikami (Lee in sod., 2009).

2.2.1 Producija VPD

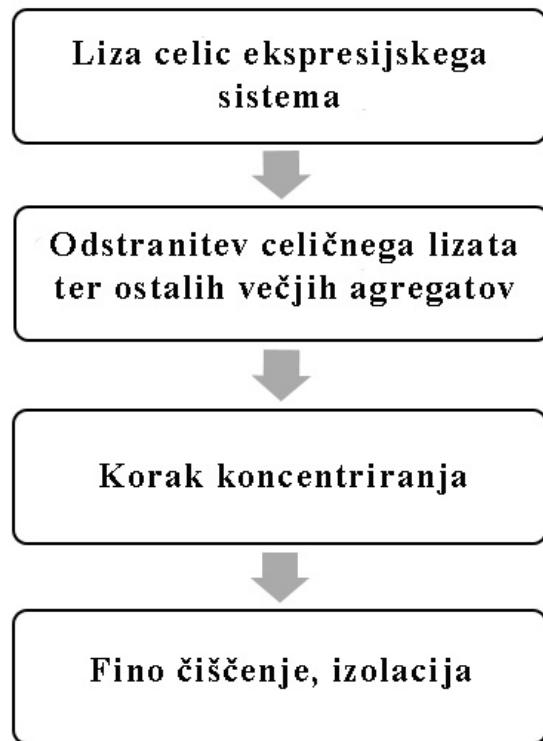
Izbira ustreznega sistema za izražanje je ključna za uspešnost pri proizvodnji VPD. Smiselno je, da že na začetku sestavimo gen na način, ki bo prilagojen sistemu za izražanje. Današnja tehnologija sinteze genov namreč omogoča, da originalen zapis, ki ga običajno dobimo iz baz podatkov, nekoliko preuredimo, z drugimi besedami izberemo kodone, ki so tipični za organizem, v katerem bo potekalo izražanje, rezultat tega je povečana stopnja izražanja ciljnega proteina. Izbira sistema za izražanje je odvisna od primera do primera, od 174 uspešnih konstrukcij VPD jih je 28 % izraženih v bakterijah, 20 % v kvasovkah, 28 % v celicah insektov, 9 % v rastlinah ter 15 % v sesalskih celicah. V preglednici 1 so povzete glavne prednosti, slabosti ter uporaba posameznih sistemov za izražanje.

Preglednica 1: Predstavitev sistemov za izražanje VPD

Organizem za izražanje	Prednosti	Slabosti	Pogosta uporaba
Bakterije	<ul style="list-style-type: none"> - dobro okarakteriziran organizem (<i>E.coli</i>), - poznana genska orodja, - poznana procesna tehnologija; 	<ul style="list-style-type: none"> - odsotnost postranslacijskih modifikacij; - nepravilna tvorba disulfidnih vezi; - težava s topnostjo virusnih proteinov; 	<ul style="list-style-type: none"> - za produkcijo VPD, ki izvirajo iz bakterijskih ali rastlinskih virusov; - za enostavne VPD, ki so sestavljeni iz več enot enakega proteina;
Kvasovke	<ul style="list-style-type: none"> - sposobnost postranslacijskih modifikacij (glikozilacija, fosforilacija); 	<ul style="list-style-type: none"> - kompleksnejša konstrukcija, vnos in integracija transgena v primerjavi z bakterijskim sistemom; - specifična glikozilacija (veliko manoznih ostankov); 	<ul style="list-style-type: none"> - za produkcijo VPD, sestavljenih iz ene ali več različnih podenot; - niso primerne za produkcijo VPD z ovojnico (npr. HIV-2);
Celice insektov	<ul style="list-style-type: none"> - hitra rast; - zmožnost kultivacije v velikem merilu; - odsotnost specifičnih nečistoč, povezanih s produkcijo v živalskih celicah; 	<ul style="list-style-type: none"> - postranslacijske modifikacije so kljub podobnosti s sesalčjem še vedno nekoliko drugačne; - odstranjevanje vektorja (baculovirus) v zaključnih postopkih, saj je v enakem velikostnem razredu kot večina VPD; 	<ul style="list-style-type: none"> - široko uporabljen sistem za produkcijo VPD tako v laboratorijskem kot tudi v proizvodnem merilu;
Rastline	<ul style="list-style-type: none"> - poceni proizvodnja; - odsotnost drage opreme (bioreaktorji); - lahek prenos v večje merilo; 	<ul style="list-style-type: none"> - slabša ponovljivost; - manj kontrolirana proizvodnja; - GSO-rastline (regulatorne omejitve); 	<ul style="list-style-type: none"> - razvijanje jedilnih cepiv. Kljub pomislikom farmacevtske industrije so rezultati prvih kliničnih študij, med katerimi so testirali tudi No-VPD, obetavni;
Celice sesalcev	<ul style="list-style-type: none"> - avtentičnost produkta; - pravilen vzorec glikozilacije. 	<ul style="list-style-type: none"> - zapletena konstrukcija; - draga gojišča za gojenje - možnost okužbe z humanimi patogenimi agensi 	<ul style="list-style-type: none"> - produkcija kompleksnih virusov z ovojnico, - produkcija VPD kot nosilcev za gensko zdravljenje.

2.2.2 Zaključni procesi v proizvodnji VPD

Kadar je govora o VPD, ki se proizvajajo za farmacevtske namene, morajo zaključni procesi zadostiti strogim regulatornim zahtevam, obenem pa morajo biti tudi stroškovno učinkoviti. Na drugi strani pa VPD niso več novost v farmacevtski industriji, temveč so prisotni že dobri dve desetletji, dodatno postavljanju zaključnih procesov pomagajo tudi izkušnje z izolacijo in s koncentriranjem pravih virusov (Vicente, 2011). Princip zaključnih procesov lahko povzamemo v štirih glavnih korakih (slika 1).



Slika 1: Poenostavljena shema zaključnih procesov v proizvodnji VPD

2.2.2.1 Liza celic organizma za izražanje

Liza celic je nujen korak, v kolikor se VPD izražajo znotrajcelično, kar v večini primerov tudi se. Postopek lize je za vsak sistem za izražanje nekoliko specifičen. Na eni strani sesalčje celice enostavno obdelamo z blagim detergentom, na drugi strani pa na primer rastlinski sistem za izražanje zahteva močno mehansko obdelavo. Da se izognemo oksidaciji ter delovanju gostiteljevih proteinaz, v ekstrakcijski pufer pogosto dodamo reducente, kelatorje in inhibitorje proteinaz (Zeltins, 2013).

2.2.2.2 Odstranitev celičnega lizata ter ostalih večjih agregatov

Zlati standard za odstranitev celičnega lizata tako v laboratoriju kot v industriji je centrifugiranje. Kljub temu je trend v industriji uporaba membranskih procesov, ki so lažje prenosljivi v večje merilo (npr. tangencialna mikrofiltracija, globinski filtri). S tovrstnimi procesi dosegajo izplen, večji od 90 % (Vicente in sod., 2008).

2.2.2.3 Korak koncentriranja

Glavni namen koncentriranja je zmanjšanje volumna, ta korak želimo izvesti čim prej, saj z njim zmanjšamo stroške nadaljnih zaključnih procesov, vključno z manjšo porabo pufov in topil. V tem koraku je široko uporabna ultrafiltracija s tangencialnim pretokom (Vicente in sod., 2011). Elegantna, stroškovno ugodna rešitev za koncentriranje večine virusov ter VPD je tudiobarjanje z amonijevim sulfatom ali s polietilen glikolom (PEG)

(Morenweiser, 2005). Tako učinkovito zmanjšamo volumen, hkrati pa odstranimo veliko večino z organizmom za izražanje povezanih nečistoč, kar zmanjša število potrebnih korakov v zaključnih procesih (Zeltins, 2013).

V zadnjem obdobju vse bolj prihajajo v veljavo tudi kromatografske metode koncentriranja VPD. Novi materiali stacionarnih faz, na primer monoliti, so posebej primerni za relativno velike delce, kot so VPD (Vicente in sod., 2011).

2.2.2.4 Fino čiščenje, izolacija

Kadar je cilj uporaba VPD v klinične namene, je fino čiščenje (ang. polishing) nujen korak, s katerim odstranimo nečistoče, povezane z organizmom za izražanje. Še dovoljene vrednosti so $100 \mu\text{g}/\text{dozo}$ za proteine in $10 \text{ ng}/\text{dozo}$ za dedni material. Za tovrstno odstranitev nečistoč sta najprimernejši afinitetna ali ionsko izmenjevalna kromatografija. V obeh primerih se nečistoče odstranijo v nevezne frakcije (Kalbfuss in sod.; 2007; Vicente in sod., 2008; Wu in sod., 2007). Za nečistoče, povezane s produkтом (nesestavljeni, poškodovani kapsidni proteini), se uporabi izključitvena kromatografija, pri kateri se očiščeni VPD izločijo v prostem volumnu kolone (Peixoto in sod., 2007).

2.2.3 Razstavljanje in ponovno sestavljanje VPD

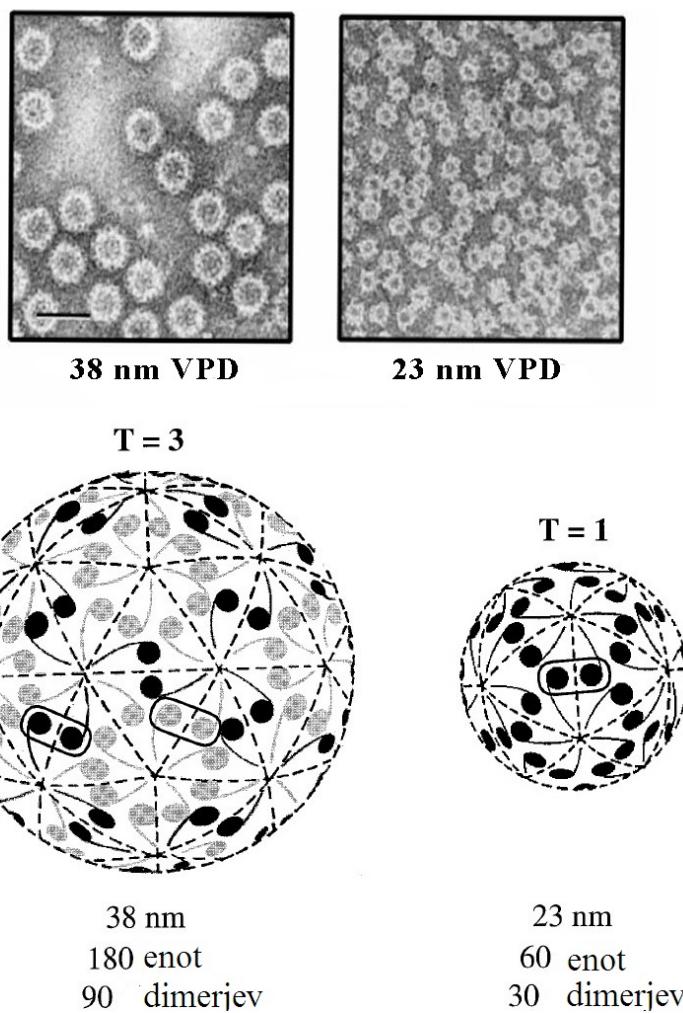
S standardnimi koraki čiščenja, ki so opisani zgoraj, odstranimo nečistoče, povezane z organizmom za izražanje. Možno je odstraniti tudi nekatere nečistoče, povezane s ciljnim produkтом (nestestavljeni, poškodovani kapsidni proteini) (Zeltins, 2013). Če pa želimo doseči večjo stabilnost in homogenost populacije VPD, kar je cilj v proizvodnji cepiv (McCarthy in Suzich, 1999), je smiselnno izvesti proces *in vitro* razstavljanja in ponovnega sestavljanja VPD. Z omenjenim procesom so Zhao in sod. (2012) pri papilloma VPD dosegli boljši imunski odgovor skupaj z izboljšano stabilnostjo VPD. Kljub hitremu razvoju na področju proizvodnje VPD je z vidika že postavljenih in optimiziranih procesov za čiščenje proteinov v industrijskih obratih smiselnno VPD najprej razstaviti, jih očistiti po uveljavljenih postopkih čiščenja proteinov ter jih po končanem čiščenju znova *in vitro* sestaviti (McCarthy in Suzich, 1999). S tem odstranimo tudi nečistoče, povezane z organizmom za izražanje, ki so jih VPD zajeli v svojo notranjost v fazi produkcije. Proses razstavljanja in ponovnega sestavljanja omogoča tudi umeščanje farmaloško zanimivih molekul v notranjost VPD (npr. gensko zdravljenje) (McCarthy in Suzich, 1999).

2.3 NOROVIRUSOM PODOBNI DELCI

Glavno oviro pri preučevanju in napredku pri razvoju cepiva proti boleznim, ki jih povzročajo norovirusi je dolgo predstavljal problem kultivacije (namnoževanja) norovirusov *in vitro*. Sledilo je pomembno odkritje, da je norovirusu podobne delce (No-VPD) moč proizvesti tudi z izražanjem v celicah insektov (Jiang in sod., 1992). Še več, ti delci so bili morfološko popolnoma podobni pravemu virusu, hkrati pa so na površini izkazovali tudi enake antigene (Green in sod., 1993; Jiang in sod., 1992). Z elektronsko kriomikroskopijo v kombinaciji z računalniško obdelavo podatkov so Prasad in sod. (1994) ugotovili, da je No-VPD sestavljen iz 90 dimerov kapsidnega proteina VP1, ki so dalje organizirani v T=3-ikozaedrično simetrijo kapside z zunanjim premerom 38 nm.

2.3.1 Mali No-VPD

Kot je navedeno že predhodno, pri heterolognem izražanju VP1 običajno pride do spontanega nastanka 38 nm velikih No-VPD. Raziskovalci pa so v svojih študijah opazili tudi manjše različice No-VPD. Ti so bili veliki 19 nm (White in sod., 1996), od 15 do 20 nm (Jiang in sod., 1995) ali 23 nm (White in sod., 1997). Vzrok za nastanek manjše različice še ni popolnoma razjasnjen, so pa White in sod. 1997 v svoji študiji podrobneje okarakterizirali malo različico No-VPD. Ta je sestavljena iz 60 enot oziroma 30 dimerov VP1-proteina, povezanih v T=1-ikozaedrično kapdisdo (slika 2).



Slika 2: Zgoraj – posnetka elektronske mikroskopije, negativni kontrast; levo velika različica, desno mala različica. Spodaj – shematska predstavitev oba tipa norovirusnih kapsid (White in sod., 1997)

Dodatno so našli tudi odgovor za specifične rezultate SDS PAGE analiz vzorcev, ki vsebujejo No-VPD. Za norovirusni kapsidni protein je značilen dvojček elektroforetskih lis pri 58 in 56 kDa, vzrok za to najverjetneje tiči v delovanju znotrajceličnih proteaz v celicah organizma za izražanje. Če pa No-VPD inkubiramo brez proteaznih inhibitorjev, se pri manjši različici No-VPD pojavitva še elektroforetski lisi pri 52 in 50 kDa, kar nakazuje, da je mala različica manj obstojna na delovanje proteaz kot večja (38 nm) različica No-VPD.

2.3.2 Pogoji za razstavljanje in ponovno sestavljanje No-VPD

Iz literature je znano, da so No-VPD (enako velja za nativni virus) relativno stabilni. Doultree in sod. (1999) poročajo, da so delci na sobni temperaturi obstojni od 21 do 28 dni. Pirtle in sod. (1991) so pokazali, da norovirusi ostanejo infektivni tudi pri ekstremnejših pogojih (3-urna izpostavitev pH 2,7; 30-minutno segrevanje pri 60 °C; 3-minutno segrevanje pri 70 °C). Težnja po dobrem poznavanju stabilnosti norovirusov ter No-VPD v odvisnosti od pH, temperature in ionske moči je upravičena iz več razlogov. Na primer s poznavanjem mehanizma razstavljanja bi lahko bolj ciljno pristopili k razvoju zdravil oziroma k inaktivaciji norovirusov v pitni vodi, hrani ter na delovnih površinah, ki prihajajo v stik z živili. Poznavanje mehanizma razstavljanja in ponovnega sestavljanja je prav tako pomembno pri razvoju cepiva proti norovirusom oziroma generalno pri razvoju vseh cepiv na osnovi VPD, saj so No-VPD zaradi svoje preproste zgradbe odličen model za tovrstne študije (Tacket in sod., 2005).

Ausar in sod. (2006) v študiji stabilnosti in razpada No-VPD pridejo do zaključka, da so No-VPD stabilni v pH območju od pH 3 do pH 7, pri pH 8 pa poročajo o reverzibilnem razpadu kapsid. Istega leta Shoemaker in sod. (2010) poročajo o spremeljanju razpada in ponovnega sestavljanja No-VPD z elektrosprej masno spektrometrijo (ESI-MS) in mikroskopijo na atomsko silo (AFM) kot potrditveno metodo. V študiji potrdijo predhodne ugotovitve (alkalni pH povzroči razpad No-VPD), kot dodatni dejavnik pa poudarijo še ionsko jakost. Razpad kapsid so spremljali v amonijevem acetatnem pufru z ionsko močjo od 50 do 500 mM pri vrednostih pH 7, 8, 9. Popoln razpad do VP1-dimerov so zabeležili pri 50 mM pufru pH 9, pri enaki pH-vrednosti, a večji ionski jakosti (500 mM) pa se, zanimivo, v največjem deležu pojavijo mase, ki ustrezajo 60 in 80 enotam VP1-proteina. Dalje Shoemaker in sod. (2010) izpostavijo tudi možnost ponovnega sestavljanja No-VPD iz razpadlih kapsid. Ko so vzorec s pH-vrednostjo pH 9 desetkrat redčili v 250 mM amonijevem acetatnem pufru pH 6, so se v masnem spektru znova pojavile mase, ki ustrezajo NO-VPD.

2.4 ANALITSKE METODE

Pri razvijanju, kliničnih študijah ali kasneje pri proizvodnji VPD je pomembno uporabljati zanesljive, validirane analitične metode (Thompson in sod., 2013), saj je to edini način generiranja kvalitativnih ter kvantitativnih podatkov, na podlagi katerih se lahko odločamo, v katero smer bo potekal nadaljnji razvoj oziroma ali je proizvodni produkt primeren za naslednji korak.

V preglednici 2 so povzete metode skupaj s primeri uporabe, ki so splošno uveljavljene pri determinaciji in karakterizaciji (norovirusnih) VPD.

Preglednica 2: Pregled analitskih metod, uporabljenih pri analitiki VPD

Analitska metoda	Osnovni podatki	Primeri uporabe
Elektronski presevni mikroskop (TEM)	Primeren je za potrjevanje VPD v vzorcu, saj so velikosti in značilne ultrastrukture virusov specifične za posamezne skupine (Wild, 2008). Slabost metode je nezmožnost odkrivanja nesestavljenih strukturnih proteinov virusa.	Potrjevanje No-VPD v vzorcu (Ausar in sod., 2006; Koho in sod., 2012; Tome-Amat in sod., 2014; Tresset in sod., 2013). Karakterizacija male različice No-VPD s T=1-simetrijo (White in sod., 1997).
SDS PAGE	Z metodo lahko sklepamo na prisotnost virusnega proteina in potencialnih nečistoč v vzorcu (za potrditev je potrebno izvesti še Western prenos na membrano). Metoda ne razlikuje med različnimi kvartarnimi strukturami No-VPD v vzorcu.	Sledenje No-VPD med izolacijskim postopkom (Koho in sod., 2012). Spremljanje produkcije VP1-proteina s kvasovko <i>Pichia pastoris</i> (Tomé-Amat in sod., 2014). Določitev vpliva protenaz na VP1-protein v odvisnosti od tipa kapside (T=1 ali T=3-simetrija) (White in sod., 1997).
Dinamično razprševanje svetlobe (DLS)	Metoda je primerena za ugotavljanje velikosti virusnih delcev in ugotavljanje stopnje agregiranosti (Ciringer, 2012).	Uporabljena pri odkrivanju in kvantifikaciji različnih virusov in VPD (Block in sod., 2012; Citkowicz in sod., 2008)
Encimsko imunski test (ELISA)	Primeren je za potrjevanje prisotnosti virusnega antigena (antigenov) v vzorcu. Ne poda informacije o kvartarni strukturi proteina v vzorcu.	Določanje rastlinskih virusov ter prilagoditev metode v delno kvantitativno metodo (Kramberger, 2006). De Bruin in sod. (2006) testirajo dva komercialna kompleta za diagnostiko okužbe z norovirusom, njihovi rezultati kažejo na slabo senzitivnost ter zadovoljivo specifičnost metode. Predlagajo uporabo metode ob predpostavki, da se negativne rezultate dodatno potrdi z RT-PCR.
Elektrosprej masna spektroskopija (ESI-MS)	Zaradi ionizacije z elektrosprejem proteinski kompleksi ostanejo intaktni (Fenn in sod. 1989), na ta način lahko iz masnega spektra razberemo, kako veliki so ter v kakšnem deležu so zastopani v vzorcu.	Spremljanje stabilnosti No-VPD v odvisnosti od ionske moči in pH vrednosti (Shoemaker in sod., 2010).
Analitsko ultracentrifugiranje	Analitska tehnika, ki karakterizira vzorec na podlagi različne sedimentacije posameznih komponent v vzorcu (van Tricht, 2013). Z metodo lahko hkrati ločimo med kapsidnimi proteinom, VPD ali agregatom.	Uporabljena pri karakterizaciji male različice No-VPD (White in sod., 1997), pri karakterizaciji procesa razstavljanja in ponovnega sestavljanja pri HPV-VPD (Mach in sod., 2006).
Kapilarno izoelektrično fokusiranje	Omogoča določanje izoelektrične točke, podobno kot klasično gelsko izoelektrično fokusiranje, a z možnostjo avtomatizacije in kvantifikacije (Hjerten in Zhu, 1985).	Določitev izoelektrične točke No-VPD z namenom razvoja diagnostične metode za identifikacijo norovirusov v vzorcu na podlagi pH-vrednosti (Goodridge, 2004).
Analitska kromatografija	Omogoča ločevanje molekul na osnovi velikosti ali različno močne absorbcije na kromatografski nosilec.	Merjenje razpršenosti velikosti delcev z izključitveno kromatografijo pred procesom razstavljanja in ponovnega sestavljanja HPV-VPD in po njem (Mach in sod., 2006).

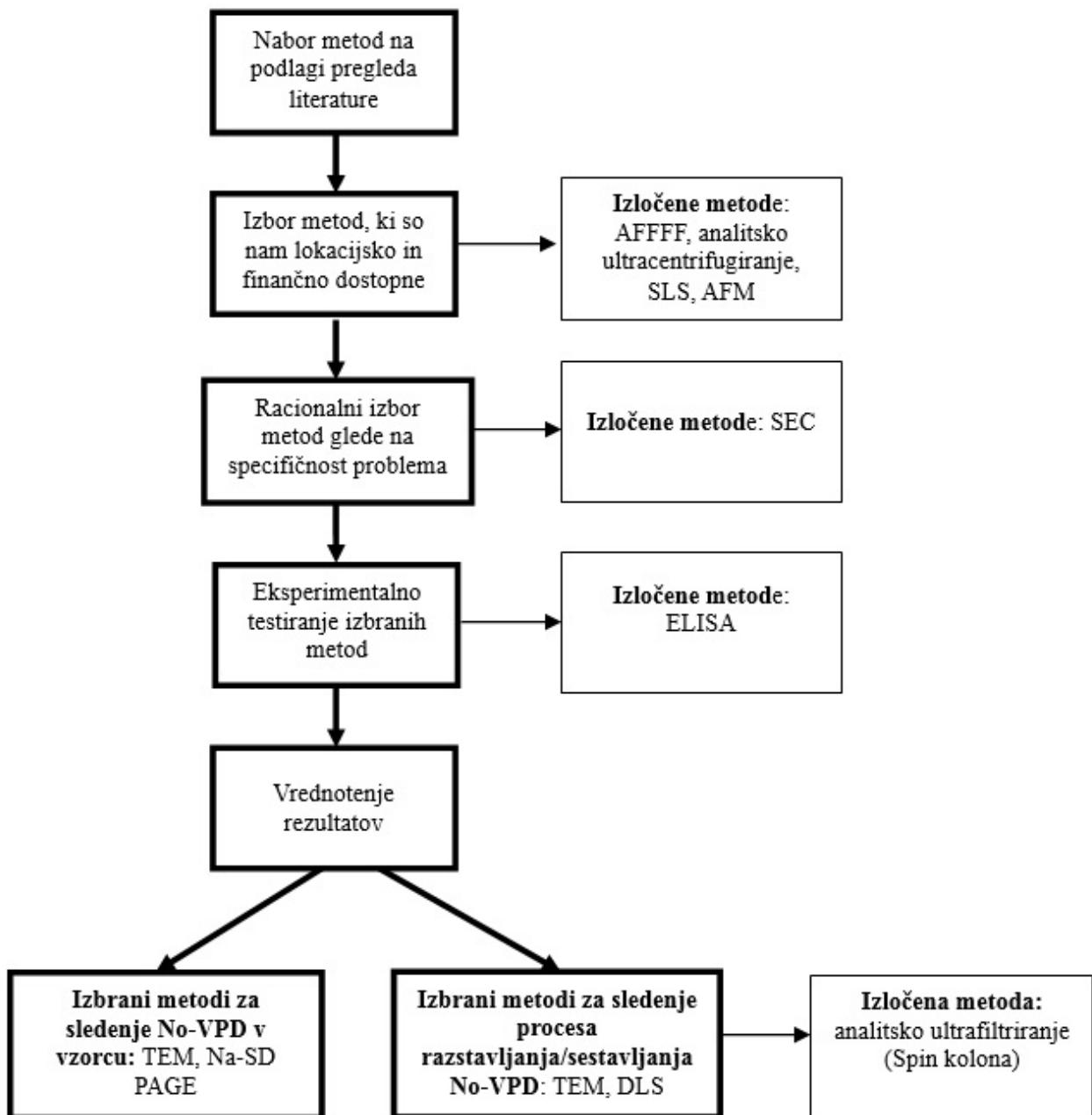
se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 3: Pregled analitskih metod, uporabljenih pri analitiki VPD

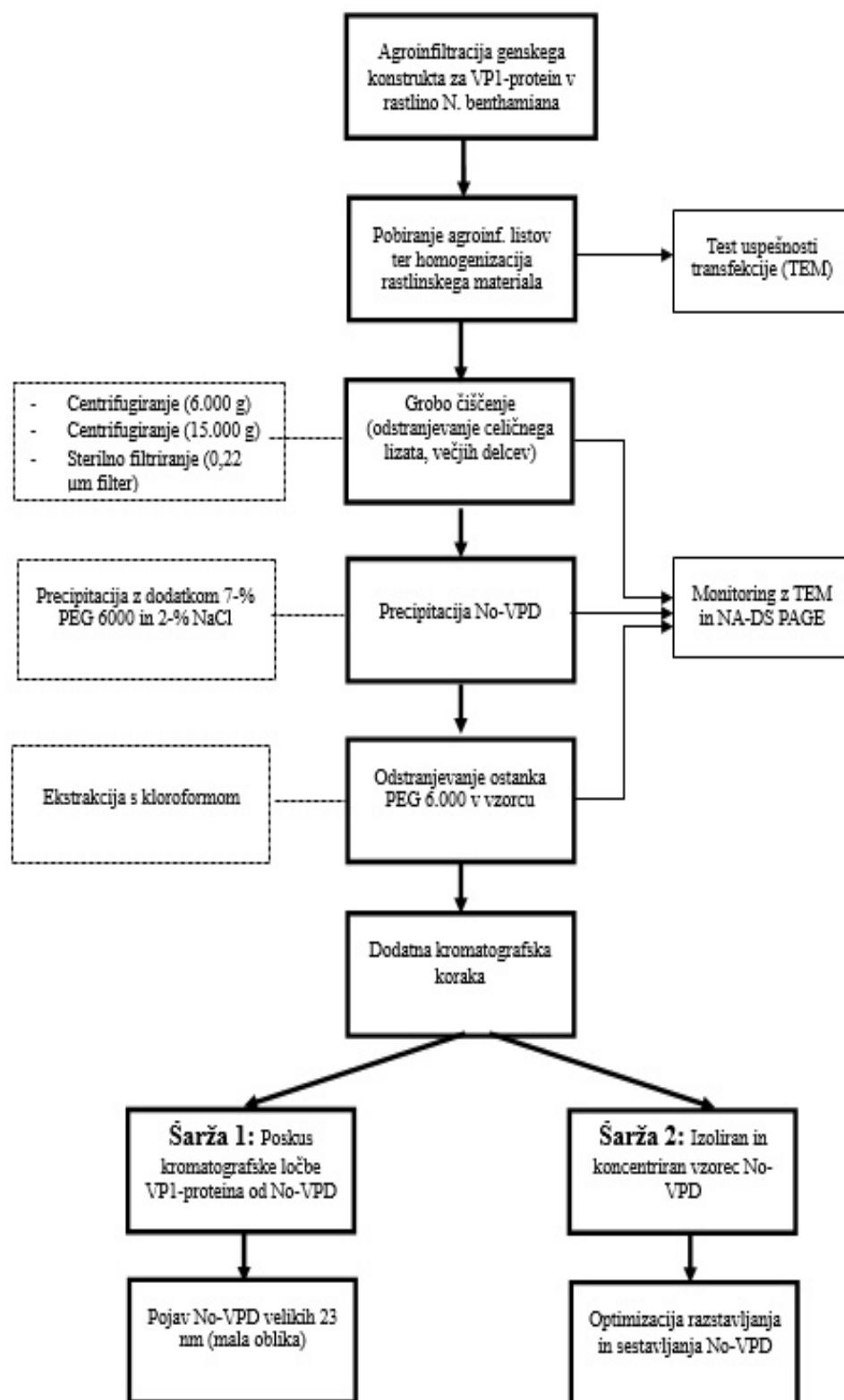
Analitska metoda	Osnovni podatki	Primeri uporabe
Asimetrično frakcioniranje v tokovnem polju (AFFF)	Z metodo lahko ugotavljamo celotno število virusnih delcev (Balch in sod., 2002). Princip ločevanja je podoben kot pri kromatografiji, s to razliko, da ni stacionarne faze, kar je lahko prednost, saj se s tem izognemo izgubi vzorca, ker ni adsorbcije na nosilec (Messaud in sod., 2009).	Yohannes in sod. (2011) so ločevali virusne delce in virusom podobne delce. Analizirali so različne frakcije, ki so vsebovale fragmente, monomere, dimere, oligomere in agregate.
Metoda sledenja nanodelcem (NTA)	Z metodo je mogoče določiti velikost in koncentracijo nanodelcev. Možno je posneti in analizirati gibanje posameznih delcev.	Ugotavljanje velikosti in koncentracije adenovirusov, virusov influence, bakteriofagov (Ciringer, 2012).

3 MATERIALI IN METODE

V tem poglavju so predstavljeni materiali in metode, ki smo jih uporabili pri izdelavi magistrske naloge. Hodogram na sliki 3 prikazuje postopek izbora analitskih metod, hodogram na sliki 4 pa potek eksperimentalnega dela.



Slika 3: Shema izbora analitskih metod, uporabljenih pri eksperimentalnem delu



Slika 4: Shema eksperimentalnega dela

3.1 MATERIALI

V podoglavlju 3.1 so opisani biološki material (No-VPD), aparature in oprema, pripomočki, pufri in ostale kemikalije, ki so bili uporabljeni pri eksperimentalnem delu.

3.1.1 No-VPD

No-VPD smo proizvajali s heterolognim izražanjem v rastlini *N. benthamiana*, v rastlinjakih Nacionalnega inštituta za biologijo (NIB).

3.1.2 Aparature in oprema

- Aparat DLS (Malvern Zetasizer),
- aparatura za SDS PAGE (Biorad),
- avtoklav (Sutjeska, SU-30),
- avtomatske pipete (Eppendorf),
- CIM 0,1 ml kolona (Bia separations),
- CIM QA-disk (Bia separations),
- CIM QA-ohišje (Bia separations),
- presevni elektronski mikroskop (Philips CM100),
- kamera na elektronskem mikroskopu (BioScan 792 Gatan),
- hladilnik (Gorenje),
- pH-meter (Metler toledo),
- sistem HPLC (Akta purifier),
- tehntica (Tehnica Železniki),
- zamrzovalnik -80 °C (Heto Ultra Freeze).

3.1.3 Ostali pripomočki

- 0,1 µm filtri,
- 0,22 µm filtri,
- britvice (Gillet),
- centrifugirke,
- čaše,
- gradientni poliakrilamidni geli (Expedeon),
- membrane (wb),
- injekcijske brizge,
- kivete,
- laboratorijske rokavice,
- nastavki za pipetiranje,
- pinceta,
- skalpel,
- centrifugalni koncentratorji,
- sredstvo za čiščenje laboratorijskega pribora,
- sredstvo za razkuževanje opreme,

- sredstvo za razkuževanje rok,
- steklenice,
- škatlice za shranjevanje mrežic za elektronsko mikroskopijo,
- vrečke za homogenizacijo rastlinskega materiala (Bioreba).

3.1.4 Pufri in reagenti

V preglednici 3 so navedeni pufri in reagenti, ki smo jih uporabili pri eksperimentalnem delu.

Preglednica 4: Pufri, ki smo jih uporabili med eksperimentalnim delom, ter njihova sestava

Pufer/reagent	Sestava
Pufer za agroinfiltracijo	– 10mM MES-NaOH, 10 mM MgSO ₄ (pH 5,5)
Ekstrakcijski pufer	– 50 mM Na-askorbat, 25 mM Na-fosfat, 10 mM NaCl, 1 mM PMSF (pH=5,5)
Kromatografski pufri	– 10 mM fosfatni pufer (pH7); – 10 mM fosfatni pufer, 1 M NaCl (pH7); – 10 mM fosfatni pufer, 0,5 M NaCl (pH7)
Pufer za razstavljanje VPD	– -50 mM Na-fosfatni pufer (pH 9)
Pufri za ponovno sestavljanje VPD	– 250 mM Na-fosfatni pufer (pH6) – 250 mM Na-fosfatni pufer (pH6,5) – 250 mM Na-fosfatni pufer (pH 7)
Precipitacija No-VPD s PEG	– 7 % PEG 6000, 2 % NaCl

3.1.5 Ostale kemikalije

- ELISA komplet (IDEIA™ Norovirus);
- komplet za barvanje gelov s srebrom (GE Healthcare);
- komplet za izvedbo SDS-PAGE elektroforeze (Expedeon).

3.2 METODE

3.2.1 Transgeno izražanje No-VDP v rastlini *Nicotiana benthamiana*

Opisana je metoda pridobivanja No-VDP s transgenim izražanjem v rastlini *Nicotiana benthamiana*. Celoten postopek smo izvedli dvakrat. 1. serija je bila agroinfiltrirana 25.11.2013, druga serija pa 20.5.2014. Delo je potekalo pod vodstvom dr. Ion Gutierrez.

3.2.1.1 Priprava rastlin za agroinfiltracijo

Povprečna starost rastlin, primernih za agroinfiltracijo, je 6–8 tednov. Na dan agroinfiltracije smo jih dodatno zalili z vodo, da smo ustvarili močan turgorski tlak, s tem smo olajšali izvedbo agroinfiltracije.

3.2.1.2 Priprava suspenzije za agroinfiltracijo

Suspenzija za agroinfiltracijo je bila pripravljena tako kot so to opisali Santi in sod. (2008). Bakterije *Agrobacterium tumefaciens* z vsebovanimi plazmidi smo vcepili v gojišče z antibiotikom; vsako v dve centrifugirki (10 ml).

- *Agrobacterium tumefaciens* s plazmidom pICH31070: NVCP v 4 ml LB-gojišče s kanamicinom (50ug/ml) in rifampicinom (12,5ug/ml);
- *Agrobacterium tumefaciens* s plazmidom pICH20111 v 4 ml LB-gojišče s karbenicilinom (50ug/ml) in rifampicinom (12,5ug/ml);
- *Agrobacterium tumefaciens* s plazmidom pICH14011 v 4 ml LB-gojišče s karbenicilinom (50ug/ml) in rifampicinom (12,5ug/ml)

Bakterije smo inkubirali čez noč (12 ur) pri 30 °C s stresanjem (250 rpm). Zjutraj smo jih precepili v svežo gojišče (500ul v 50 ml gojišča). Antibiotiki in koncentracije teh so ostale enake, sledila je vnovična inkubacija preko noči pri 28 °C s stresanjem (250 rpm).

Naslednji dan smo vsebino centrifugirali, 7 minut pri 6.000 g. Bakterije so posedle v pelet, supernatant smo zavrgli, pelet pa resuspendirali v 50 ml pufra za agroinfiltracijo.

Suspenzijam smo izmerili optično gostoto ter jih nato po potrebi redčili z agroinfiltracijskim pufrom, tako da je bila vrednost optične gostote $OD_{600} = 0,3$; nato smo vse tri suspenzije z različnimi plazmidi zmešali v razmerju 1 : 1 : 1.

3.2.1.3 Agroinfiltracija listov rastline *N. benthamiana*

Agroinfiltracijo smo izvedli tako, da smo na vsaki rastlini izbrali 3 ali 4 najbolj primerne liste (srednja velikost, vitalen videz, mehak na otip). 5-mililitrsko brizgo (brez igle) smo napolnili z zgoraj omenjeno suspenzijo za agroinfiltracijo, jo prislonili na spodnjo stran izbranega lista, zgornjo stran lista pa fiksirali s prstom. Nato smo počasi pritisnili na bat. Če smo bili uspešni, smo zaznali, kako se v notranjosti lista v krogu širi vbrizgana suspenzija. Običajno smo v vsak list vbrizgnili 3–7-krat, odvisno od velikosti in starosti lista.

Rastline smo nato v rastlinjakih gojili 8 dni pri konstantni 75% vlažnosti, s cirkadiadnim ciklom 16 ur na svetlobi, 25°C ter 8 ur v temi, 20°C. Nato smo potrgali agroinfiltrirane liste, ostale dele rastlin, vključno z zemljo, pa avtoklavirali.

Agroinfiltrirane liste smo do uporabe shranili pri -80 °C. Sledil je proces homogenizacije rastlinskega tkiva, ki je potekal tako, da smo v 50 ml vrečko za homogenizacijo rastlinskega materiala (Bioreba) natehtali 10 g agroinfiltriranih listov ter dodali 50 ml ekstrakcijskega pufra (sestava v preglednici 3). Nato smo z ročnim homogenizerjem (Bioreba) homogenizirali rastlinski material 5 minut oziroma do popolnoma homogene strukture.

3.2.2 Elektronsko mikroskopiranje

3.2.2.1 Priprava mrežic za analizo na presevnem elektronskem mikroskopu

Z pipeto smo zajeli 20 µl vzorca ter ga prenesli na parafilm. Na kapljico vzorca smo položili vnaprej naparjene mrežice, tako da je naparjena stran mrežice prišla v stik z vzorcem ter jo tako pustili 5 minut. Nato smo mrežico osušili na filter papirju ter jo po kapljicah sprali s 500 µl ultra prečiščene dH₂O. Mrežico smo kontrastirali z 1-odstotnim uranil acetatom, tako da smo s Pasteurjevo pipeto kapnili kapljico kontrastnega sredstva direktno na mrežico, počakali 5 sekund, nato pa osušili s filter papirjem, posušeno pa vstavili v označene škatlice za prenašanje mrežic. Do analize smo škatlice shranjevali pri sobni temperaturi.

3.2.2.2 Analiza mrežic na presevnem elektronskem mikroskopu

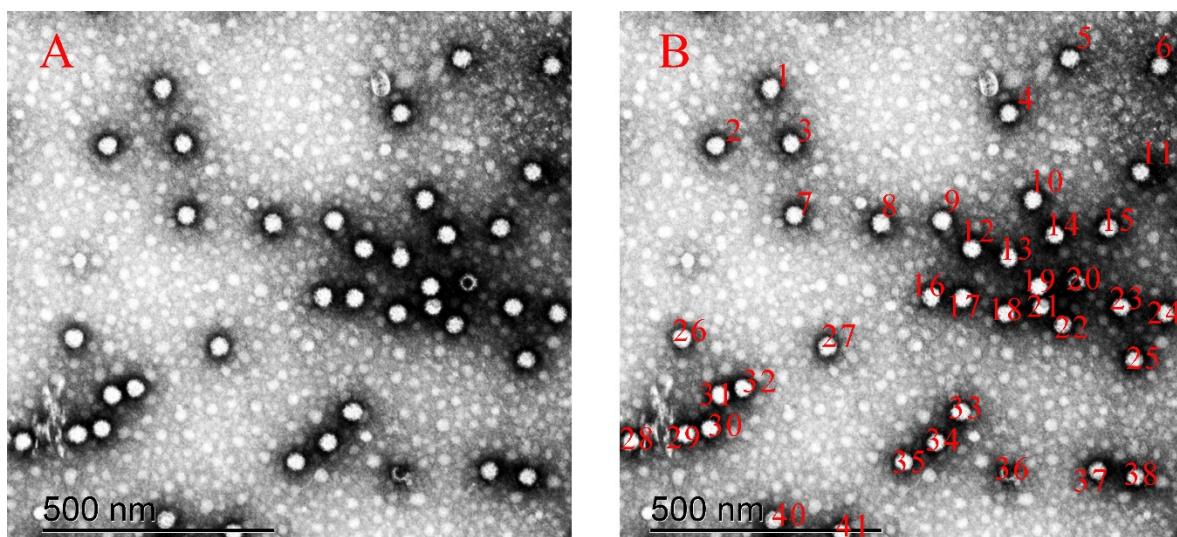
Za tvorbo slike v presevnem elektronskem mikroskopu uporabljamo elektrone, ki jih usmerjamo skozi vzorec. Filament (katoda) na vrhu kolone mikroskopa je vir elektronov, ki jih z visoko napetostjo med katodo in anodo pospešimo, ter snop elektronov nadalje usmerjamo s sistemom elektromagnetnih leč do vzorca in zaslona. Osnova tvorbe slike v TEM je različno sipanje elektronov na atomih različnih atomskih števil v vzorcu. Na zaslonu končno dobimo monokromatsko sliko vzorca, ki ustreza elektronski gostoti preparata (Infrastrukturni center Mikroskopija bioloških vzorcev, 2015).

Presevni elektronski mikroskop Philips CM 100 omogoča ultrastrukturne in citokemijske analize različnih bioloških vzorcev: virusov, bakterij, rastlinskih in živalskih celic. Prevladujoči tehniki priprave vzorcev sta vklapljanje suspenzije ali tkiva v smolu in izdelava ultratankih rezin ter negativno kontrastiranje vzorcev v suspenziji (Infrastrukturni center Mikroskopija bioloških vzorcev, 2015).

Mrežice smo pregledovali na Nacionalnem inštitutu za biologijo (NIB) ob pomoči dr. Magde Tušek Žnidarič, ekspert za elektronsko mikroskopijo.

3.2.2.3 Meritve povprečne velikosti delcev ter standardnega odklona v populaciji delcev

Za oceno homogenosti delcev smo z elektronskim mikroskopom posneli sliko, ki dovolj reprezentativno predstavlja stanje celotne mrežice (slika 5A). Nato smo na sliki z zaporednimi številkami označili vse delce, ki morfološko ustrezano No-VPD (primer prikazan na sliki 5B oziroma so bili po presoji eksperta za elektronski mikroskop potrjeni kot pravilno sestavljeni No-VPD. Izmed vseh označenih delcev smo z generatorjem nabora naključnih števil, ki je dosegljiv na spletni strani <https://www.random.org/integers/>, smo izbrali 20 številk. V tem primeru smo iz nabora 41 številk izbrali številke: 36, 2, 18, 37, 5, 28, 41, 32, 11, 8, 6, 3, 23, 30, 21, 9, 25, 12, 27, 15. Delcem pod izbranimi zaporednimi številkami smo nato izmerili premer s programom Gatan Micrograph. Meritve smo vnesli v program Microsoft Excel ter izračunali aritmetično sredino, mediano in standardni odklon. Podatke smo predstavili v obliki tabel.

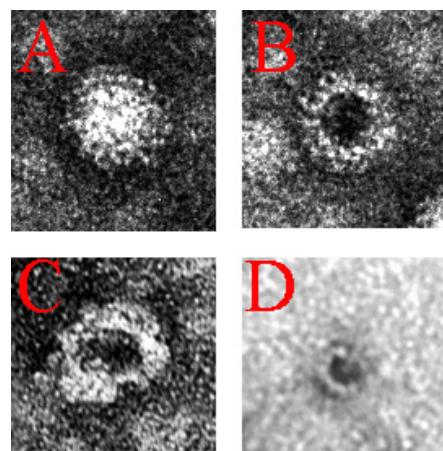


Slika 5: Elektronska mikroskopija, negativni kontrast: primer ročnega označevanja (številčenja) No-VPD za potrebe naključnega izbora reprezentativnega vzorca. A – neoznačena slika, B – ročno oštevilčeni No-VPD

3.2.2.4 Ocena deleža pravilno sestavljenih delcev

Za oceno deleža pravilno sestavljenih delcev smo enako kot pod točko 3.2.2.3 oštevilčili in naključno izbrali 32 delcev. Izmed izbranih delcev smo prešeli pravilno sestavljeni delci (sliki 6 A in B) ter nato še nepravilno, nepopolno sestavljeni delci. Primer nepopolno sestavljenega delca vidimo na slikah 6 C in 6 D. Delež pravilno sestavljenih delcev smo nato izračunali po formuli:

$$\% \text{ pravilno sest. No-VPD} = \frac{\text{št. pravilno sest}}{(\text{št. pravilno sest} + \text{št. napačno sest})} * 100. \quad \dots (1)$$



Slika 6: Elektronska mikroskopija, negativni kontrast: A in B – primer pravilno sestavljenega No-VPD, C in D – primer nepopolno, napačno sestavljenega No-VPD

3.2.3 Ionsko izmenjevalna kromatografija

Ionsko izmenjevalno kromatografijo smo uvedli kot dodatni korak pri čiščenju in koncentriranju vzorca z No-VPD. Za delo smo uporabljali HPLC-sistem (Acta) s CIM®

QA-0,34 ml diskom (Bia Separations, Ajdovščina), ki je močan anionski izmenjevalec.

3.2.3.1 Priprava diska

Pred vsakim začetkom dela s CIM® QA-0,34 ml diskom smo ga najprej uravnotežili. Postopek je prikazan v preglednici 4, pretok skozi disk je bil v vseh korakih 3,4 ml/min.

Preglednica 5: Postopek priprave CIM QA-nosilca za delo

Korak	Pufer	Namen	Čas
1.	10 mM fosfatni pufer (nizka ionska moč)	Odstranitev vseh zračnih mehurčkov ali drugih majhnih delcev, ki bi motili detektorski sistem.	3 min
2.	1 M NaCl (visoka ionska moč)	Odstranitev vseh vezanih komponent in nečistoč.	3 min
3.	10 mM fosfatni pufer (nizka ionska moč)	Ustvarjanje pogojev za vezavo vzorca.	3 min

3.2.3.2 Delo na HPLC-sistemu

Na sistem sta bili preko črpalk priključeni dve mobilni fazi, vezavna (črpalka A) ter elucijska (črpalka B), pri čemer je bila pri vezavnih pogojih vključena samo črpalka A, za ustvarjanje gradiента pa smo postopoma (linearni gradient) ali po korakih (stopničasti gradient) manjšali pretok skozi črpalko A in obratno sorazmerno večali pretok skozi črpalko B. Vzorec smo v sistem vnašali ročno z injiciranjem. Med procesom smo spremljali absorbanco ($A_{280\text{nm}}$ in $A_{260\text{nm}}$), prevodnost, tlak, pH, rezultate pa shranili v obliki kromatograma. Kromatografske frakcije smo pobirali ročno.

3.2.3.3 Regeneracija in čiščenje monolitnega diska

Regeneracijo monolitnega diska je priporočljivo izvesti po vsaki izvedbi kromatografije. To smo storili tako, da smo 10 minut spirali disk s pufrom visoke ionske moči (1 M NaCl) pri pretoku 3,4 ml/min.

Če nam z regeneracijo ni uspelo zadosti očistiti diska, smo uporabili metodo čiščenja diska, ta je potekala tako, da smo disk 10 minut pri pretoku 5 ml/min spirali z 1M NaOH. Nato smo ustavili pretok ter pustili disk 2 uri izpostavljenega NaOH. Sledilo je 10-minutno spiranje z dH₂O pri pretoku 5 ml/min. V zadnjem koraku je potekalo še umirjanje s pufrom šibke ionske moči (10 mM fosfatni pufer).

3.2.4 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata (SDS PAGE)

Uporabljali smo komercialno pripravljene gele ter elektroforetske pufre znamke Expedeon. 13 µl vzorca smo dodali 5 µl pufra za nalaganje vzorca NXB31002 ter 2 µl reagenta za redukcijo NXA32001 ter vse skupaj inkubirali 10 minut pri temperaturi 70°C. Celoten volumen (20µl) smo nato nanesli v žepek na elektroforetskem gelu. Elektroforeza je potekala 65 minut pri napetosti 180 V. Za vizualizacijo proteinov smo gele barvali s srebrom s kompletom PlusOne Silver stain (GE Helthcare, Švedska). Tehniko je leta 1979

opisal Switzer s sodelavci (Hames in Rickwood, 1990).

3.2.5 Dinamično razprševanje svetlobe (DLS)

DLS sistem je sestavljen iz laserja usmerjenega v optično celico s cilindrično obliko. Laserska svetloba potuje skozi vzorec, kjer se ob trku z delci razrpsi. Detektorski sistem beleži intenziteto razpršene svetlobe v odvisnosti od časa. S pomočjo računalniških programov je preko translacijskega difuzijskega koeficiente in Stokes-Einsteinove enačbe moč izračunati hidrodinamski premer delca (Murphy, 1997).

DLS-analizo smo izvedli na kemijskem inštitutu Ljubljana Slovenija na aparatu Malvern Zetasizer, ob pomoči strokovnjakinje za omenjeno metodo dr. Helene Gradišar. Uporabili smo vzorce, katerih lastnosti smo poznali na podlagi pregleda z elektronskim mikroskopom. Merjenje je potekalo pri 20 °C, meritve so bile nato obdelane v programu Zetasizer Software, rezultati so podrobnejše predstavljeni v poglavju Rezultati, pod točko 4.4.2.

4 REZULTATI

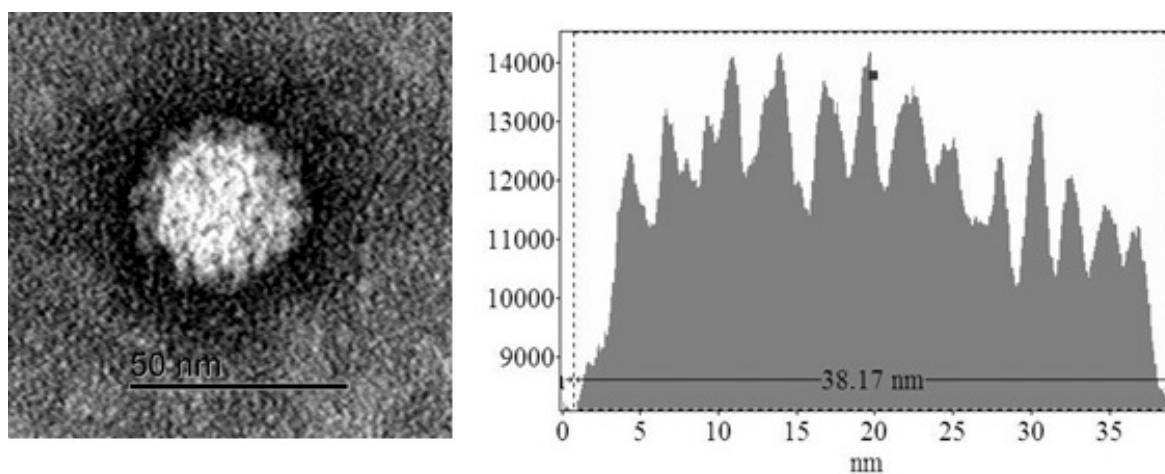
V tem poglavju so predstavljeni rezultati, ki smo jih dobili z eksperimentalnim delom. Najprej so prikazani rezultati testiranja izbranih analitskih metod, s katerimi smo bodisi detektirali No-VPD, VP1-proteina v vzorcu, bodisi spremljali proces razstavljanja, ponovnega sestavljanja No-VPD. V drugem delu je opisan postopek izolacije No-VPD iz agroinfiltiriranih listov rastline *N. benthamiana*. V zadnjem sklopu je predstavljen in vitro poskus razstavljanja in ponovnega sestavljanja No-VPD.

4.1 ANALIZA NO-VPD/VP1 PROTEINA IN RAZVOJ ANALITSKE METODE ZA NJIHOVO ODKRIVANJE V VZORCU

4.1.1 Elektronski presevni mikroskop (TEM)

Elektronski mikroskop je široko uporabno in uveljavljeno orodje za študij virusov kot tudi VPD (Thompson in sod. 2013). Z njim je možno na podlagi opazovanja morfologije in velikosti virusa oz. VPD potrditi, da se v vzorcu nahajajo VPD, ne nazadnje so Kapikian in sod. (1972) prav z uporabo elektronskega mikroskopa odkrili virus Norwalk.

Z elektronskim mikroskopom smo spremljali proces izolacije No-VPD, spremljali njegovo razpadanje in ponovno sestavljanje, prav tako nam je metoda služila kot potrditvena metoda vseh ostalih metod. Pod elektronskim mikroskopom so No-VPD ikozaedrični delci s T=3-simetrijo veliki 38 nm (Ausar in sod., 2006). Na sliki 7 je delec, posnet pri 92.000-kratni povečavi, ki ustreza zgoraj omenjenim zahtevam, skupaj s podobnostjo s posnetki No-VPD iz literature (slika 2) lahko predpostavimo, da je delec na sliki 7 No-VPD. Mrežice za elektronsko mikroskopijo smo pripravljali tako, kot je opisano pod točko 3.2.2.1.

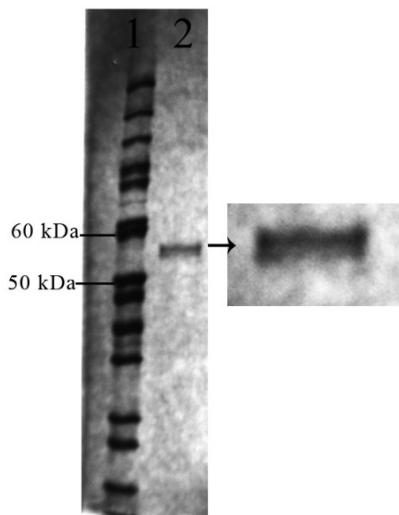


Slika 7: 38.17 nm velik delec (No-VPD), posnet s TEM pri 92.000-kratni povečavi. Desno histogram intenzitete pikslov, narejen s programom Gatan DigitalMicrograph, ki nakazuje na ustrezno velikost NO-VPD s T=3- simetrijo.

4.1.2 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata (SDS PAGE)

Za ločevanje proteinov, določitev norovirusnega VP1 v vzorcu in ocenjevanje čistosti vzorca smo uporabljali SDS poliakrilamidno gelsko elektroforezo (SDS-PAGE).

Po vizualizaciji gela z barvanjem s srebrom se v primeru prisotnosti VP1 norovirusnega proteina pojavita dve značilni lis pri 58 kDa in 56 kDa. White in sod. (1997) sklepajo, da sta različni velikosti proteina najverjetneje posledici posttranslacijskih modifikacij v organizmu za izražanje, saj so kljub prisotnosti proteaznih inhibitorjev med izolacijo dobili SDS PAGE vzorec lis. Za testiranje uporabnosti metode smo uporabili vzorec, v katerem smo z elektronskim mikroskopom potrdili prisotnost No-VPD. Po barvanju s srebrom smo odkrili dve značilni elektroforetski lis pri 58 in 56 kDa, ki smo ju dobro videli pri pregledu dela s prostimi očmi, teže pa se ju loči na fotografiji gela, predvsem zaradi slabše resolucije fotoaparata (slika 8).



Slika 8: NaDS-PAGE, 1 – proteinski markerji, 2 – vzorec, pri katerem so bili pod TEM vidni No-VPD

Edinstven vzorec elektroforetskih lis (lise pri 56 in 58 kDa) ter potrditev prisotnosti No-VPD v vzorcu z elektronskim mikroskopom, sta omogočila, da smo NaDS-PAGE lahko uporabili kot detekcijsko metodo za spremljanje prisotnosti No-VPD-proteinov v vzorcu med izolacijskim postopkom ter za ocenitev uspešnosti izolacije (odstranitev nečistoč).

4.1.3 Encimsko imunski test (ELISA)

Uporabljali smo IDEIA™ Norovirus diagnostični komplet. Metodo smo testirali tako, da smo vzorec No-VPD, pripravljen po postopku, opisanem pod točko 4.3 (začetni vzorec) ultrafiltrirali skozi filterno membrano z izključitveno molekulsko maso 100 kDa, po koncu ultrafiltracije smo retentat redčili z 10 mM natrijevim fosfatnim pufom pH 7 do volumna, ki je enak volumnu permeata. Oba vzorca smo nato testirali z diagnostičnim kompletom, vključno z negativno kontrolo ter začetnim vzorcem. Rezultati so prikazani v preglednici 5.

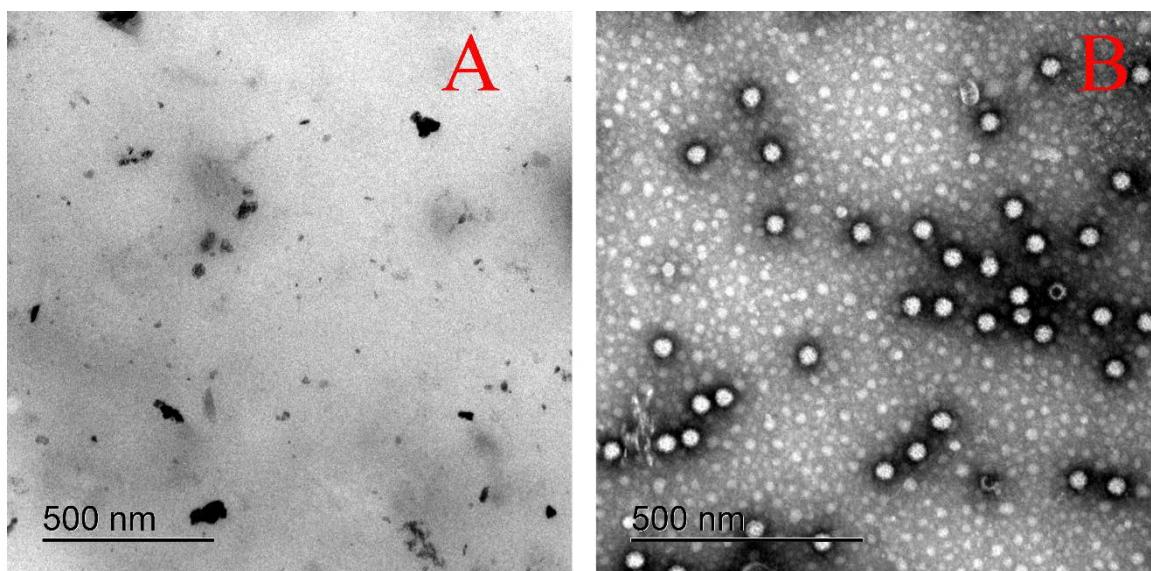
Preglednica 6: Rezultati testiranja encimskoimunskega testa (ELISA)

Vzorec	A ₄₅₀	Rezultat
Negativna kontrola	0,161	/
Začetni vzorec	1,335	pozitiven
Retentat	0,578	pozitiven
Permeat	2,828	pozitiven

Rezultat testa je pozitiven, ko je absorbanca pri 450 nm valovne dolžine vsaj 10 % višja od izključitvene vrednosti, ki se izračuna po naslednji formuli:

$$\text{Izklučitvena vrednost} = A_{450 \text{ negativna kontrola}} + 0,100. \quad \dots(2)$$

Vse tri pozitivne vzorce smo analizirali še z elektronskim mikroskopom. Kot je videti slike 9, so v začetnem vzorcu ter retentatu prisotni No-VPD, ne najdemo pa jih v permeatu, kljub dejству, da je ravno permeat z diagnostičnim testom imel največjo vrednost ekstinkcije pri 450 nm valovne dolžine.



Slika 9: Elektronska mikroskopija: A – posnetek permeata, dobljenega po filtraciji skozi membrano s 100 kDa porami, B – posnetek retentata, na katerem vidimo prisotnost No-VPD.

4.2 IZOLACIJA IN KONCENTRACIJA NO-VPD

Za študij razstavljanja in sestavljanja No-VPD smo potrebovali čist vzorec, v katerem so No-VPD zastopani v koncentraciji, ki je višja od spodnje meje odkrivanja izbranih analitskih metod (TEM, NaDS PAGE, DLS). Za dosego omenjenega cilja smo razvili postopek izolacije in koncentracije No-VPD, ki je podrobnejše opisan v tem podpoglavlju.

4.2.1 Homogenizacija rastlinskega materiala

Zamrznjene agroinfiltrirane liste rastline *N. benthamiana* ($m = 263\text{g}$) smo v prvem koraku homogenizirali. Proces homogenizacije je potekal tako, da smo v vrečko za homogenizacijo rastlinskega materiala (Bioreba) natehtali 10 g agroinfiltriranih listov ter dodali 50 ml ekstrakcijskega pufra (sestava v preglednici 3). S terilnico (Bioreba) smo nato ročno homogenizirali rastlinski material 5 minut oziroma do popolnoma homogene strukture. Postopek smo večkrat ponovili, dokler nismo porabili vsega rastlinskega materiala, dobili smo 1.600 ml homogenizata. Uspešnost homogenizacije smo preverili pod TEM ter z metodo SDS PAGE (slika 10 in slika 11 A).

4.2.2 Groba odstranitev nečistoč

Po homogenizaciji smo se lotili grobega čiščenja oziroma odstranjevanja večjih ostankov rastlinskega materiala ter ostalih večjih nečistoč. Postopek smo izvedli v treh korakih s kombinacijo centrifugiranja in filtriranja. Podrobnejši postopek je opisan v preglednici 6.

Preglednica 7: Postopek prve faze izolacije No-VPD

Korak	Postopek	Namen
Centrifugiranje	Homogenizat smo centrifugirali 10 minut pri 6.000 g in temperaturi 4 °C v velikih (50 ml) plastičnih centrifugirkah z navojnim zamaškom. Pelet smo zavrgli, supernatant previdno odpipetiramo s 25-ml pipeto v novo centrifugirko	Odstranitev celičnega lizata
Centrifugiranje pri višjih obratih	Supernatant iz prvega centrifugiranja smo dodatno centrifugirali 15 min; pri 15.000 g, 4 °C v posebnih 25-ml ultracentrifugirkah. Previdno smo odpipetirali supernatant v novo centrifugirko.	Dodatna odstranitev večjih delcev za lažje filtriranje skozi filter z 0,22 µm porami.
Vakuumska filtracija	Supernatant iz drugega centrifugiranja smo filtrirali skozi filter z 0,22 µm porami (filter TPP).	Odstranitev potencialnih kontaminatov (bakterije, kvasovke).

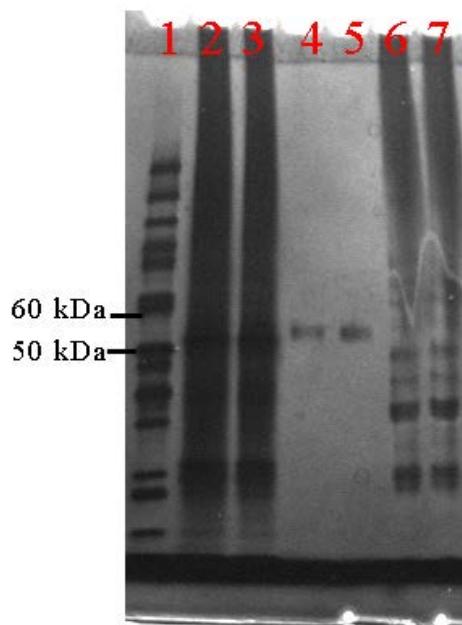
Permeat po filtriranju smo pregledali pod TEM ter z metodo SDS PAGE (slika 10 in slika 11 B).

4.2.3 Obarjanje No-VPD

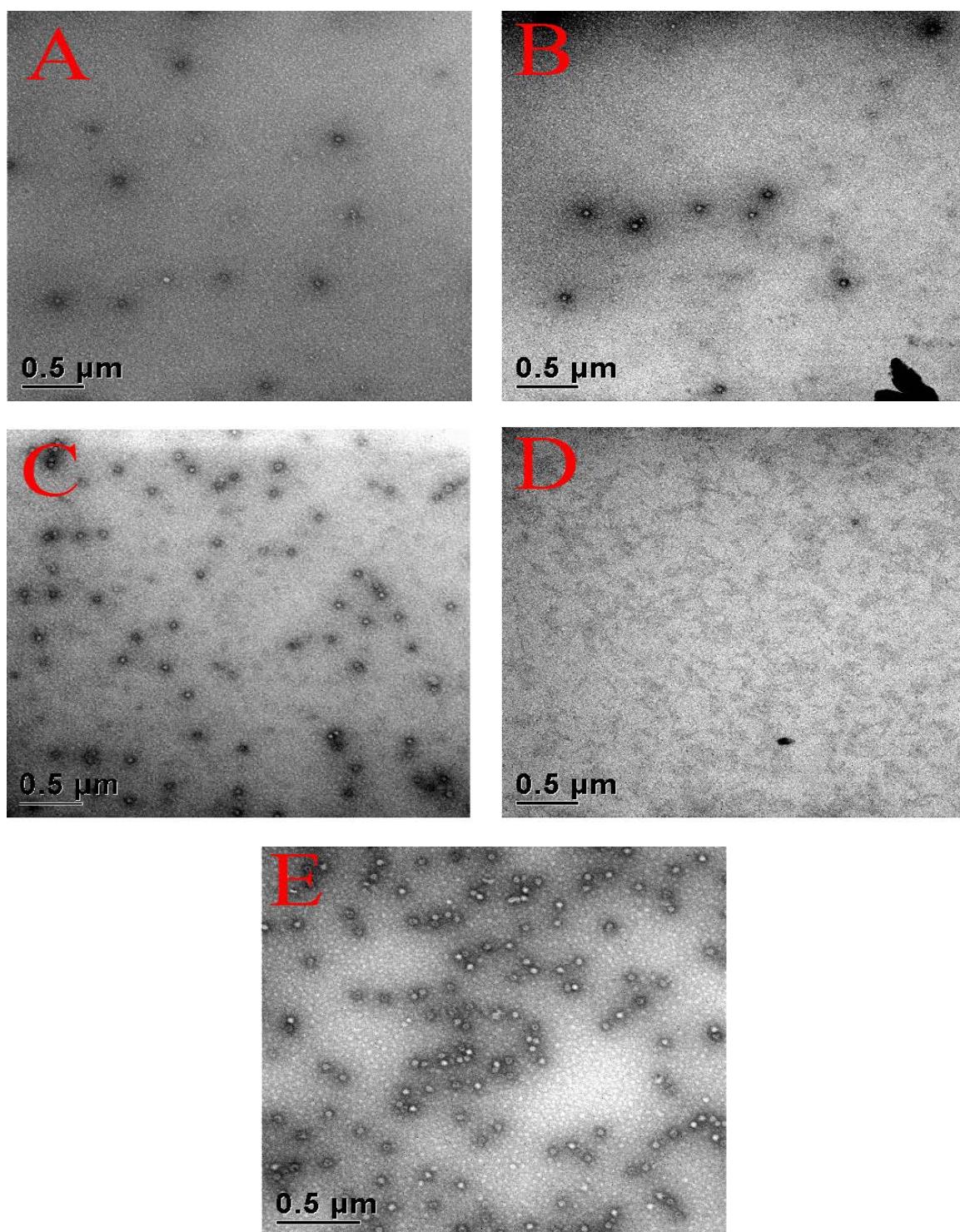
Filtratu iz prejšnjega koraka smo dodali PEG-6.000 do končne koncentracije 7 % ter NaCl do končne koncentracije 2 %. Pri raztopljanju smo si pomagali z magnetnim mešalom. Sledila je 4-urna inkubacija pri 4 °C z rahlim stresanjem. Po preteku štirih ur smo suspenzijo razdelili v več 50-mililitrskih plastično centrifugirko z navojnim zamaškom ter 30 minut centrifugirali pri 9.300 g in 4 °C. Nato smo supernatant previdno odlili, pelet pa resuspendirali v 10 mM fosfatnem pufru pH 7 tako, da smo v vsako plastično centrifugirko dodali 5 ml pufra. Uspešnostobarjanja No-VPD smo preverili s pregledom resuspendiranega peleta in supernatanta pod TEM ter z SDS PAGE (Slika 11, C, D in slika 10).

4.2.4 Odstranjevanje ostankov PEG-6.000

Za lažjo obdelavo oborjenih No-VPD s kromatografskimi tehnikami smo izvedli še korak, v katerem smo odstranili ostanke PEG-6.000 v vzorcu. To smo storili tako, da smo resuspendiranemu peletu dodali kloroform v razmerju 1 : 1, vse skupaj dobro premešali, nato pa centrifugirali 20 minut pri 4.000 g in 4 °C. Po centrifugiranju so nastale tri dobro vidne faze: vodna, vmesna in organska faza. No-VPD smo pričakovali v vodni fazi, zato smo jo previdno odpipetirali ter jo testirali na prisotnost No-VPD s pregledom pod TEM in NaDS-PAGE (slika 11 E in slika 10).



Slika 10: SDS PAGE, barvanje s srebrom: 1 – markerski proteini, 2 – homogenizat rastlinskega materiala, 3 – filtrat homogenizata rastlinskega materiala, 4 in 5 – resuspendiran pelet poobarjanju s PEG-6.000, 6 in 7 – supernatant poobarjanju s PEG 6.000.



Slika 11: Elektronska mikroskopija: negativni kontrast No-VPD, posnetih pri različnih stopnjah izolacije. A – homogenizat rastlinskega materiala, B – filtrat homogenizata rastlinskega materiala, C – resuspendiran pelet po obarjanju s PEG-6.000, D – supernatant po obarjanju s PEG 6.000, E – vodna faza po ekstrakciji s kloroformom.

4.2.5 Variabilnost med serijami

Med poskusnim delom smo po postopku homogenizacije in čiščenja No-VPD, opisanem od točke 4.2.1 do 4.2.4, obdelali dve seriji agroinfiltiranega rastlinskega materiala. Po podrobнем pregledu obeh serij z elektronskim mikroskopom, smo zabeležili nekoliko večji delež nepravilno, nepopolno sestavljenih No-VPD v drugi seriji. Pri vsaki seriji smo pregledali tri vidna polja na posamezni mrežici, rezultati so povzeti v preglednici 7.

Preglednica 8: Morfologija VPD med serijama, spremljana z elektronskim mikroskopom

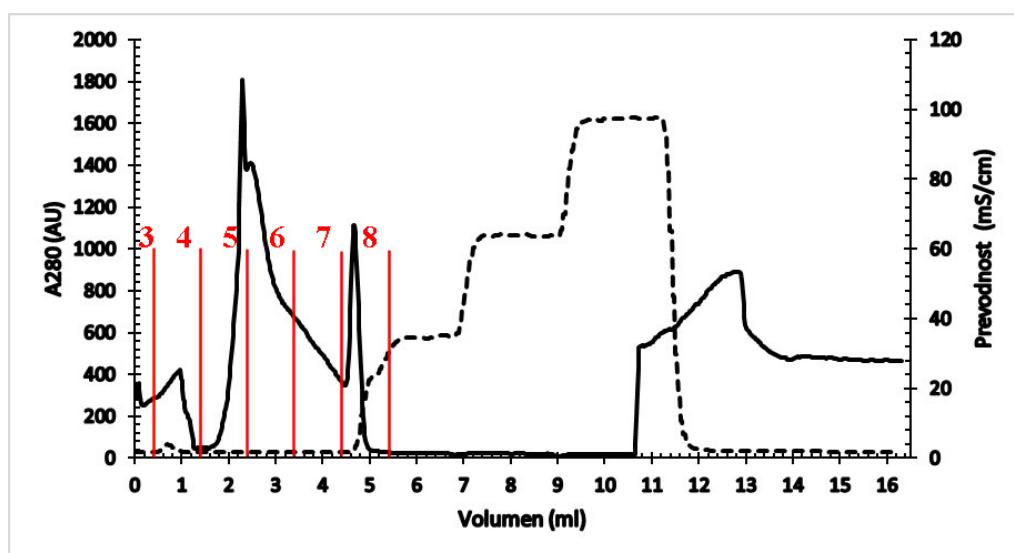
		Vidno polje 1	Vidno polje 2	Vidno polje 3	Povprečje serije
1. serija	Št. pravilno sest. No-VPD	103	125	129	/
	Vsi No-VPD	112	133	142	/
	Delež pravilno sest. No-VPD	91,9 %	94,0 %	90,8 %	92,2 %
2. serija	Št. pravilno sest. No-VPD	66	53	57	/
	Vsi No-VPD	86	75	82	/
	Delež pravilno sest. No-VPD	76,7 %	70,7 %	69,5 %	72,3 %

4.3 KROMATOGRAFSKI KORAK ČIŠČENJA IN KONCENTRIRANJA NO-VPD

V tem podpoglavlju je opisan korak čiščenja in koncentriranja No-VPD z uporabo ionsko izmenjevalne kromatografije. Korak je nujen, če potrebujemo čist, homogenenvzorec za nadaljnje analize (npr. analiza DLS).

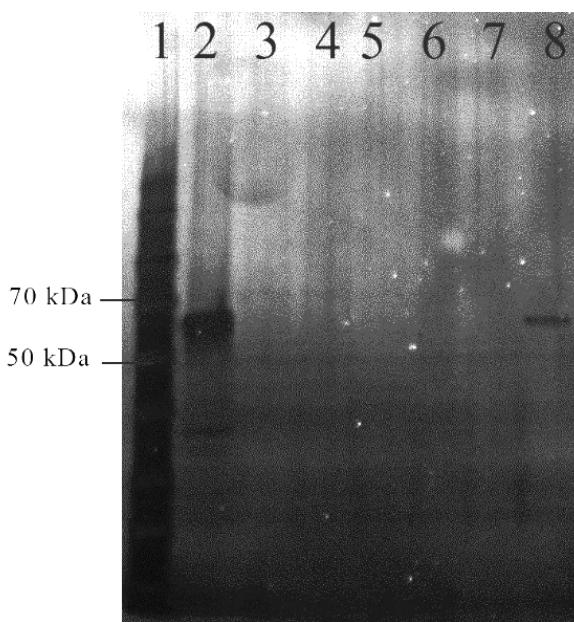
4.3.1 Optimizacija pogojev za vezavo No-VPD na CIM QA-disk monolitno kolono

Na CIM QA-disk monolitno kolono smo naložili 100 µl vzorca, pripravljenega po postopku, opisanem pod točko 4.2. Pretok skozi sistem je bil 3,4 ml/min, kar ustreza 10 volumnom kolone/minuto. Za vezni pufer smo uporabljali 10 mM natrijev fosfat (pH 7) (pufer A), za spiranje pa vezni pufer z 1 M NaCl (pufer B). Uporabili smo stopenjski gradient, in sicer 0, 30, 60, 100 % pufera B, čemur je sledilo kondicioniranje kolone s 100-odstotnim pufrom A (slika 12). Prevodnost veznega pufra je bila 1,824 mS/cm, po injiciraju vzorca je ta za kratek čas narasla na 4,008 mS/cm ter se nato vrnila na prvotno vrednost. Med analizo smo zaporedno lovili nevezne frakcije (ang. flow through fractions) v volumnu 1 ml. Začeli smo že pri 0,6 ml pretečenega volumna pred injiciranjem, končali pa pri 5,4 ml pretečenega volumna mobilne faze, ko je absorbanca padla na 0.



Slika 12: Kromatogram: naložitev 100 µl No-VPD-izolata na CIM QA-disk. Na sliki so z rdečimi navpičnimi črtami označene lovljene frakcije, ki so označene z zaporedno številko SDS-PAGE žepka, v katerega smo nanesli frakcijo (slika 13).

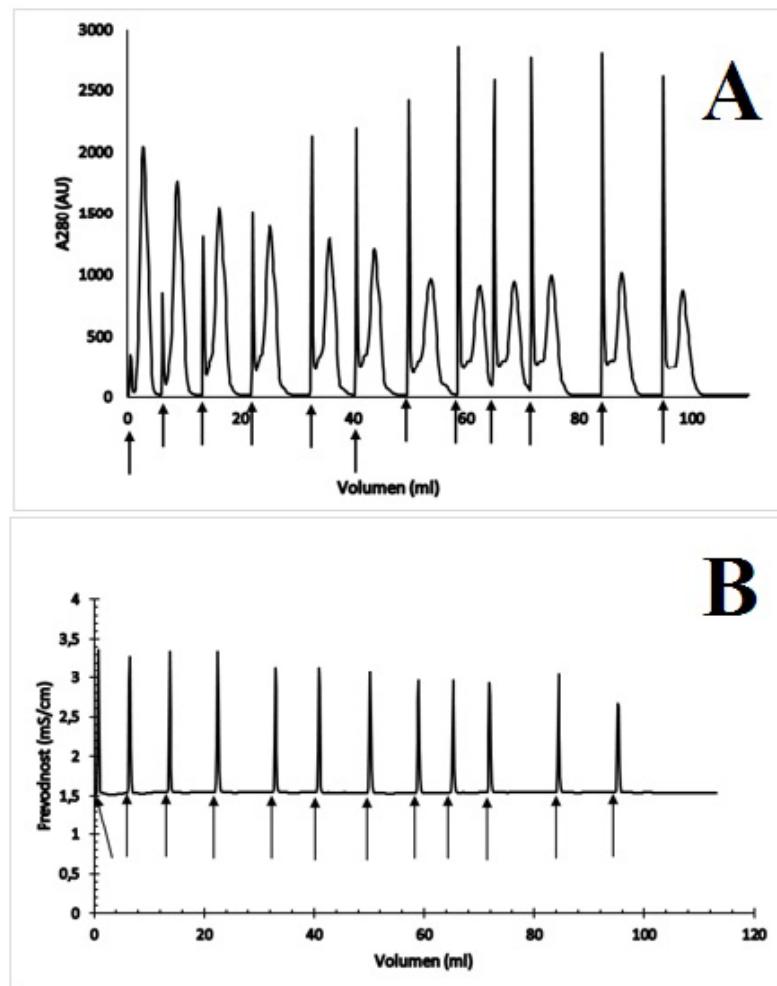
Frakcije (skupno 6 frakcij) ter začetni vzorec smo analizirali z SDS PAGE (slika 13), ki je pokazal, da je v začetnem vzorcu prisoten protein, ki ustreza velikosti VP1-proteina (58 kDa), v neveznih frakcijah omenjenega proteina ni zaslediti, lisa pa se znova pojavi pri frakciji, pobrani od 4,4 do 5,5 ml pretečenega volumna, kjer prevodnost naraste s 1,750 mS/cm na 31,396 mS/cm. Pomeni, da smo z izbiro 10 mM natrijevega fosfatnega nalagalnega pufra ustvarili pogoje za vezavo No-VPD na CIM QA-disk monolitno kolono.



Slika 13: SDS PAGE, barvanje s srebrom: 1 – markerski proteini; 2 – izolat No-VPD; 3 – kromatografska frakcija od 0,6 do 0,4 ml; 4 – kr. frakcija od 0,4 do 1,4 ml; 5 – kr. frakcija od 1,4 do 2,4 ml; 6 – kr. frakcija od 2,4 do 3,4 ml; 7 – kr. frakcija od 3,4 do 4,4 ml; 8 – kr. frakcija od 4,4 do 5,4 ml.

4.3.2 Detekcija kromatografsko očiščenih No-VPD s TEM

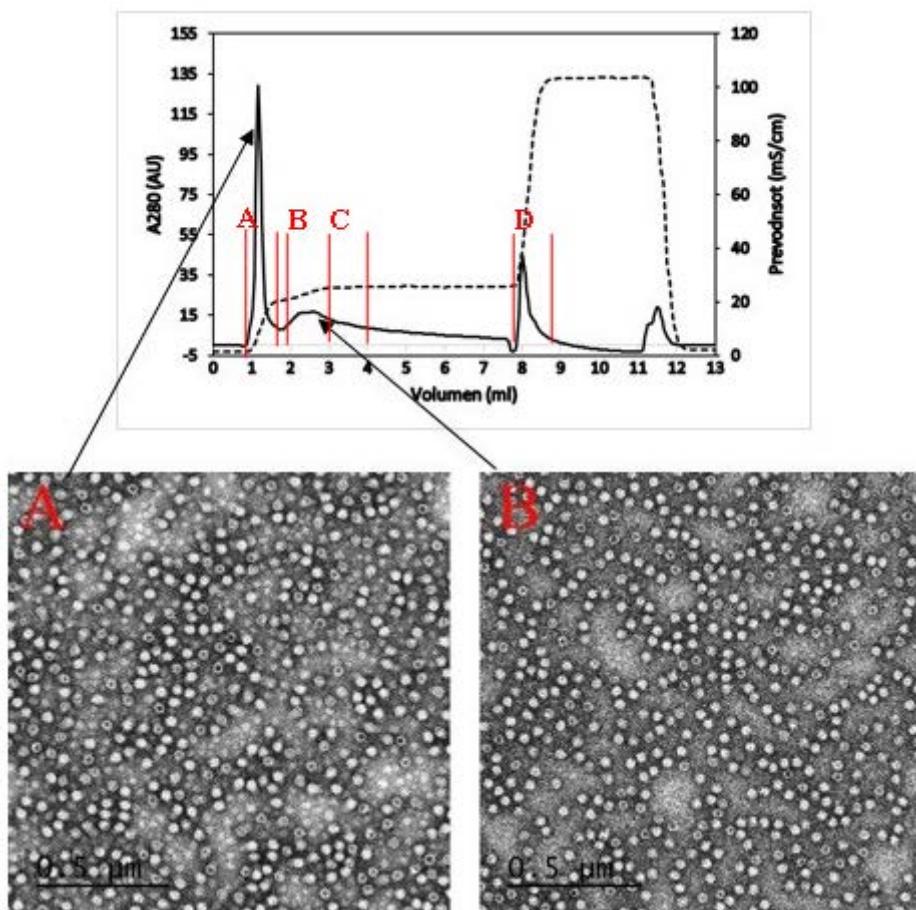
Na tej stopnji smo žeeli z elektronским mikroskopom potrditi rezultate iz prejšnjega poglavja. Če na QA-monolitni disk nanesemo 100 µl vzorca, pripravljenega po postopku, opisanem v poglavju 4.2, ter pobiramo kromatografske frakcije po 1 ml, pomeni, da smo izhodni vzorec 10-krat redčili. To bi lahko pomenilo padec pod območje detekcije elektronskega mikroskopa pri negativnem kontrastiranju vzorca. Da bi se temu izognili, smo 12-krat ročno vbrizgali 100 µl izhodnega vzorca (slika 14), ostali pogoji (pretok, vezni in elucijski pufer) so enaki kot v postopku, opisanem pod točko 4.3.1. Kot je razvidno iz kromatograma, prevodnost po injiciraju nikoli ni prerasla vrednosti 3,5 mS/cm.



Slika 14: 12-kratna naložitev izolata No-VPD na CIM QA-disk; A – graf spremembe absorbance pri 280 nm po injiciranjih, injiciranja označena s puščico, B – graf spremembe prevodnosti po injiciranjih

Po 12 injiciranjih smo zagnali kromatografsko metodo s stopenjskim gradientom v korakih 0, 20, 100 pufra B, čemur je sledilo kondicioniranje s pufrom A. Opazili smo dva vrhova (slika 15), prvi vrh pri pretečenem volumnu mobilne faze 0,9–1,7 ml in drugi vrh pri 1,9–3,0 ml, torej kmalu po začetku povečanja koncentracije soli v mobilni fazi. Polovili smo obe frakciji, ki vsebujeta svoj vrh (slika 15) ter dodatno še frakciji v pretečenem volumnu mobilne faze 3 do 4 ml (C) ter 7,8 do 8,8 ml (prehod prevodnosti od 25,6 do 103,2 mS/cm,

D). Iz vseh štirih frakcij smo pripravili mrežice za elektronsko mikroskopijo, s tem da smo prvo frakcijo redčili za faktor 1,4, tretjo in četrto frakcijo za faktor 1,1, druge frakcije, ki je zajela drugi vrh, pa nismo redčili. V frakcijah, ki zajemata prvi in drugi vrh, smo pod elektronskim mikroskopom opazili veliko število pravilno oblikovanih No-VPD (slika 15; A in B) z visoko stopnjo homogenosti. Kakršnih koli razlik (morfologija, stopnja homogenosti, število) med obema vrhovoma nismo opazili. V tretji frakciji (podaljšek drugega vrha) pod elektronskim mikroskopom nismo opazili No-VPD, prav tako ne v četrti frakciji.

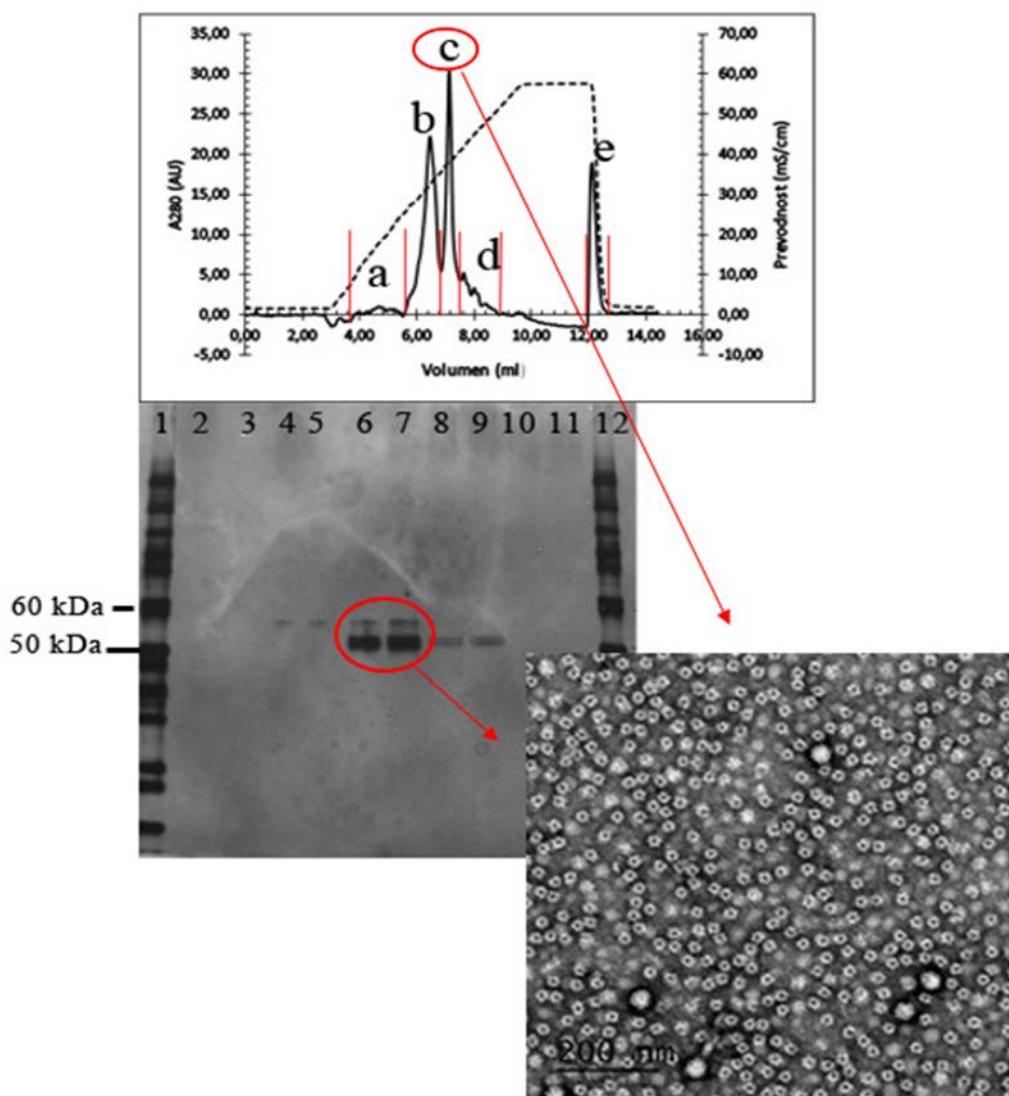


Slika 15: Kromatogram: metoda izločanja No-VPD iz QA AIM-diska v kromatografske frakcije. Puščici povezujeta vrh s pripadajočim TEM-posnetkom. Meje lovljenih frakcij so na grafu označene z rdečo navpično črto.

4.3.3 Karakterizacija vrhov – analitska kromatografija

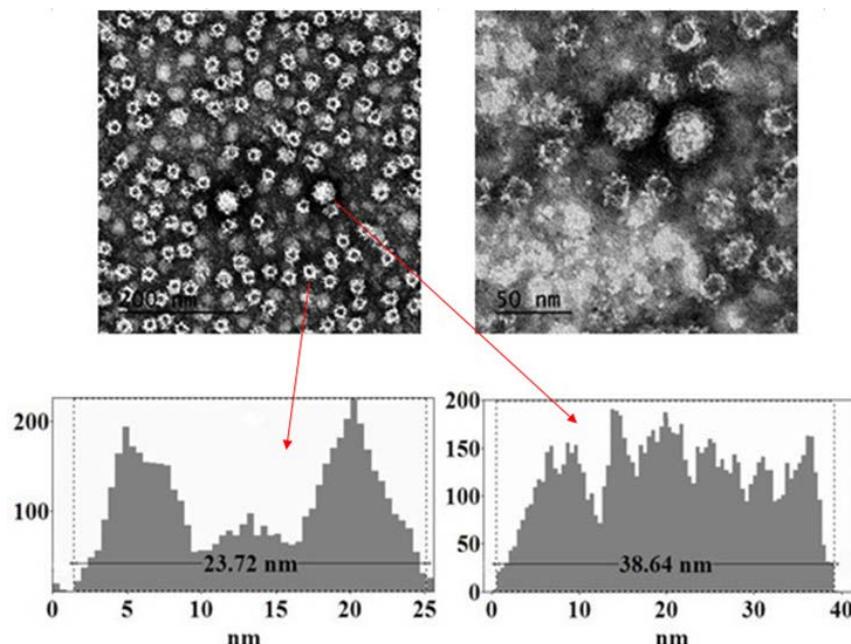
Kot smo ugotovili pri postopkih čiščenja in koncentriranja, se pri spremembni prevodnosti iz začetne (1,8 mS/cm) na 25,6 mS/cm, ki ustreza prevodnosti 10 mM natrijev fosfatnega pufra z 0,2 M NaCl, vedno pojavita dva vrhova. V želji po boljši ločbi obeh vrhov in s tem boljšem razumevanju procesa kromatografske ločbe, smo za spiranje No-VPD namesto stopenjske vpeljali metodo z linearnim gradientom od 0–100 %, pri čemer je bil nalagalni pufer 10 mM natrijev fosfat, spiralni pa 10 mM natrijev fosfatni pufer z 0,5 M NaCl. Zamenjali smo tudi volumen in geometrijo stacionarne faze tako, da smo namesto 0,34 ml CIM QA-disk monolitne kolone uporabili 0,1 ml CIM QA-analitsko kolono, s čimer smo

želeli izboljšati ločbo in občutljivost. Pri spremeljanju absorbance smo pričakovano opazili nekoliko spremenjen vzorec vrhov in sta se pojavila dva izrazita vrhova (slika 16 b in c). Med procesom smo nalovili 5 frakcij, na sliki 16 označenih od črke a do črke e, ki smo jih dalje testirali z NaDS-PAGE in elektronskim mikroskopom (slika 16).



Slika 16: Kromatogram izločanja No-VPD z linearnim gradientom do 0,5M NaCl, skupaj s pripadajočima rezultatoma analize vrhov

Na podlagi NaDS-Page analize so virusni proteini prisotni v frakcijah b (velikost 58 kDa), c (velikost 58 in 52 kDa) in d (velikost 52 kDa). Vse tri frakcije smo pregledali še z elektronskim mikroskopom, kjer v frakcijah b in d nismo detektirali No-VPD, v frakciji c pa smo opazili delce dveh velikosti, poleg manjšega števila 38 nm velikih No-VPD smo opazili še eno generacijo delcev s povprečnim premerom 23,51 nm (določeno po metodi, opisani pod točko 3.2.2.3).. Na sliki 17 sta prikazana primera meritve delca obeh velikosti.

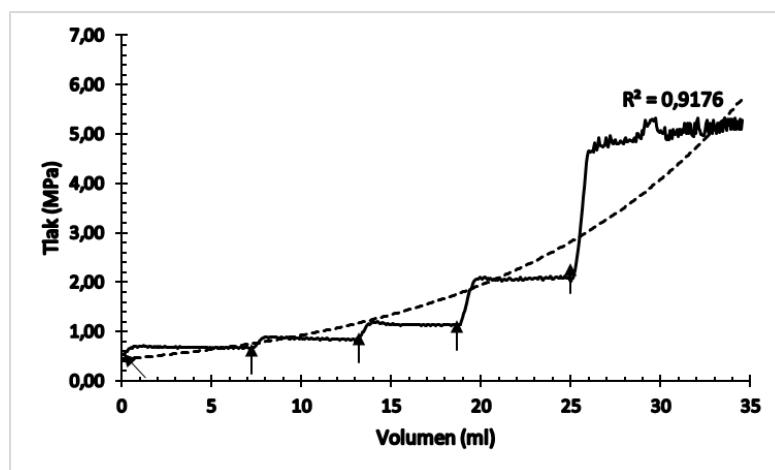


Slika 17: Elektronska mikroskopija, negativen kontrast: mala (23 nm) in velika (38 nm) verzija No-VPD, skupaj z meritvijo velikosti (merjena delca sta označena z rdečo puščico)

4.3.4 Koncentriranje No-VPD na CIM QA-disk monolitni koloni

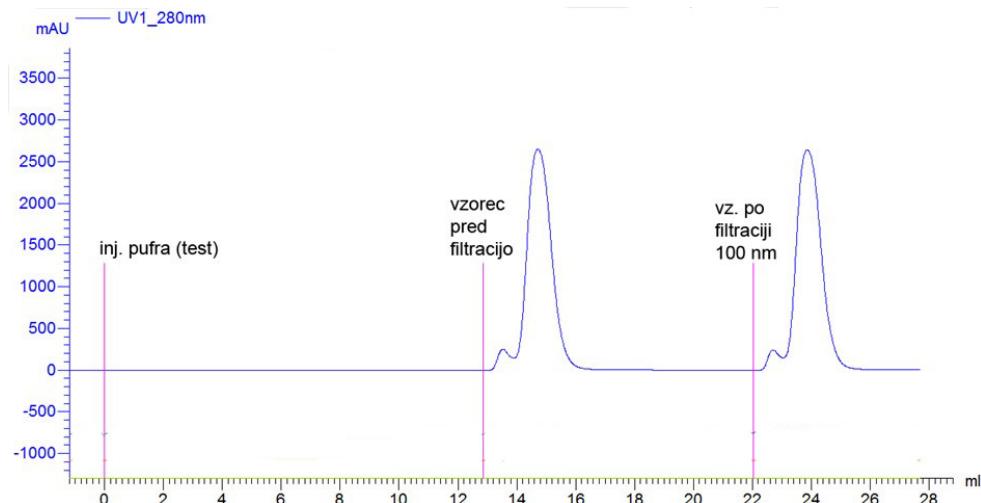
Pod to točko je opisan (dvostopenjski) postopek koncentriranja No-VPD na CIM QA-disk monolitni koloni, ki smo ga izvedli v dveh korakih.

V prvem koraku smo večkrat zapored ročno injicirali 500 µl vzorca, pripravljenega po postopku, opisanem v poglavju 4.2, ostali pogoji (vezni pufer, pH, pretok) so bili enaki, kot je opisano pod točko 4.3.1. Pri tem postopku smo bili pozorni predvsem na naraščanje tlaka. Kot je razvidno iz kromatograma (slika 18), tlak z vsakim injiciranjem eksponentno narašča. Po nanosu 2.500 µl vzorca (5. injiciranje) je tlak narastel do kritične meje 5,00 MPa, zato smo prekinili z nanašanjem vzorca. Za desorpcijo No-VPD s kolone smo izvedli metodo s stopenjskim gradientom, in sicer v korakih 0, 30, 100 % pufra B, čemur je sledilo kondicioniranje kolone. Pri spiranju s 30 % pufra B smo znova dobili dva vrhova, ki, sodeč po predhodnih rezultatih, kažeta na vsebnost No-VPD v frakciji.



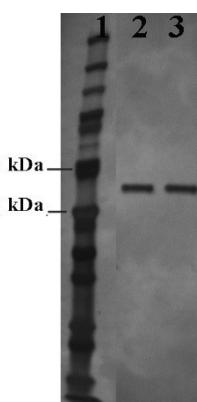
Slika 18: Kromatogram: 5-kratno injiciranje 500 µl izolata No-VPD na QA CIM-disk

Čezmerno naraščanje tlaka smo želeli zmanjšati z dodatno filtracijo vzorca skozi membrano s 100 nm porami, kar je za velikostni red manjše od por monolita (okoli 1.500 nm). Rezultati (slika 19) niso pokazali razlik (enaka intenziteta nevezne frakcije med vzorcem, ki smo ga filtrirali, ter vzorcem brez filtracije).



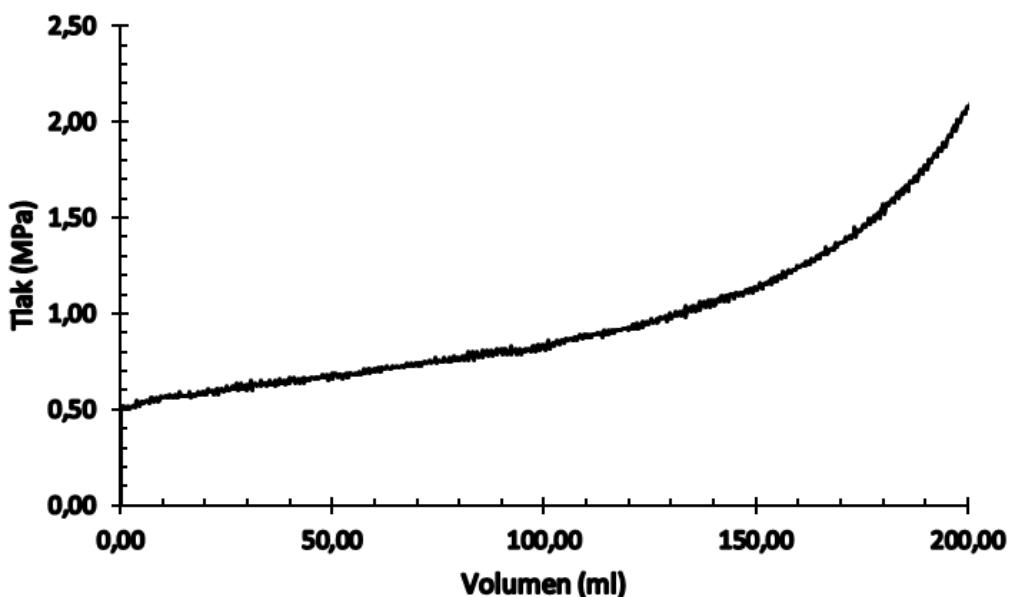
Slika 19: Primerjava intenzitete nevezne frakcije med nefiltriranim vzorcem ter filtriranim skozi membranski filter s porami, velikimi 100 nm. Vrijoličaste vertikalne črte predstavljajo injiciranje 100 µl vzorca.

Ker se filtriranje ni izkazalo za učinkovito, smo ubrali drugačno taktiko. Celoten proces (večkratno nalaganje 500 µl vzorca) smo večkrat ponovili, s to razliko, da smo v enem sklopu naložili le 2.000 µl (4-kratno nalaganje), nato smo naložene No-VPD sprali s stopenjskim dvigom ionske moči z 0,3 M NaCl ter monolitno kolono regenerirali tako, da smo obrnili pretok skoznjo ter 10 minut spirali z 1 M NaCl. Na ta način smo zbrali 37 ml kromatografskih frakcij, v katerih smo na podlagi kromatogramov sklepali (dva vrhova), da so v njih prisotni No-VPD. Sklepe smo potrdili z SDS PAGE-analizo (slika 20).



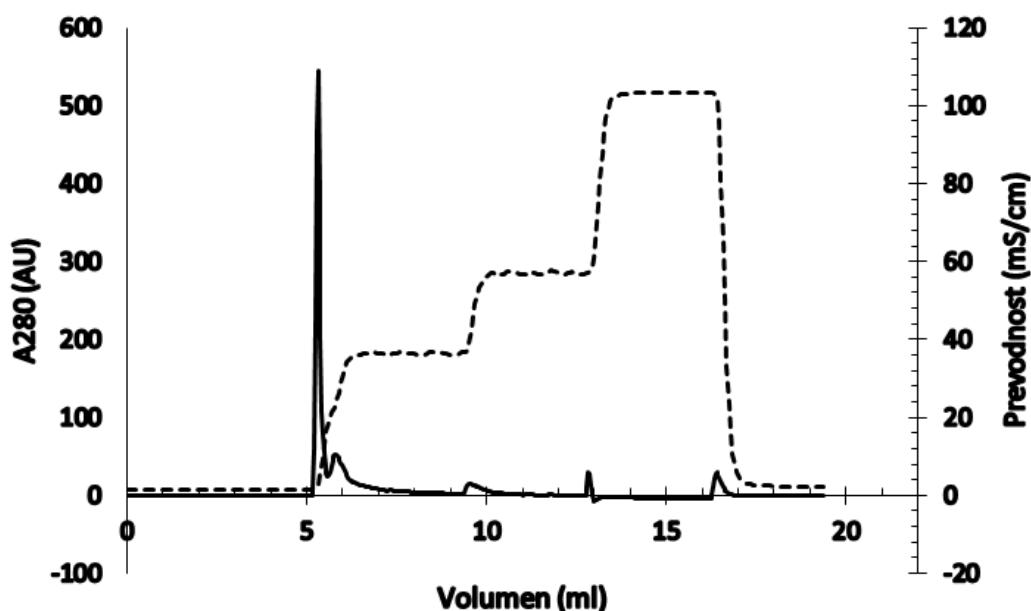
Slika 20: SDS PAGE, barvanje s srebrom: 1 – markerski proteini, 2 – združeni kromatografski frakciji obeh vrhov prve stopnje koncentriranja, 3 – združene kromatografske frakcije obeh vrhov prve stopnje koncentriranja – ponovitev

V drugem koraku smo zbranih 37 ml kromatografskih frakcij združili in redčili z 10 mM natrijevega fosfatnega puflra pH 7 v razmerju 1 : 9, da smo znižali ionsko moč do vrednosti, ki je omogočila vezavo No-VPD na kolono. 370 ml tako pripravljene raztopine smo nato preko črpalke nanesli na CIM QA-disk monolitno kolono. Pretok redčine skozi sistem je bil 3 ml/min. Prevodnost se je ustalila pri 3,8 mS/cm. Znova smo spremljali naraščanje tlaka, sprva je tlak naraščal premo sorazmerno s količino naloženega vzorca, po naloženih 100 ml je tlak ponovno začel rasti eksponentno. Pri 200 ml naloženega vzorca smo proces iz previdnosti prekinili (slika 21), saj je naraščanje tlaka nakazovalo na možnost zamašitve kolone.



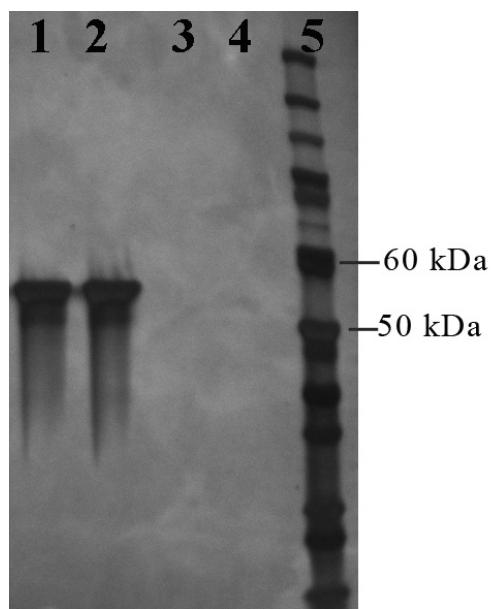
Slika 21: Kromatogram: naložitev 200 ml redčenih kromatografskih frakcij na QA CIM-disk preko črpalke

Za spiranje No-VPD s kromatografske kolone smo izvedli metodo s stopničastim gradientom z 0, 30, 50, 100 % puflra B. Lovili smo frakcijo med 5,2 do 6,4 ml pretečenega volumna, ki je vsebovala oba vrhova. Prevodnost je med pobrano frakcijo narasla z 1,831 na 36,107 mS/cm (slika 22).



Slika 22: Kromatogram: izločitev No-VPD iz QA CIM-diska v kromatografsko frakcijo (5,2–6,4 ml)

Nato smo po enakem postopku naložili in sprali še preostalih 170 ml raztopine in dobili ponovljive rezultate. Obe kromatografski frakciji smo združili in iz začetnih 37 ml vzorca dobili 2,4 ml koncentrata, v katerem glede na kromatogram (slika 22) in NaDS PAGE (slika 23) predvidevamo, da so bili No-VPD zastopani v visoki koncentraciji. Rezultatov pa nismo potrdili z elektronskim mikroskopom, saj analiza ni bila opravljena.



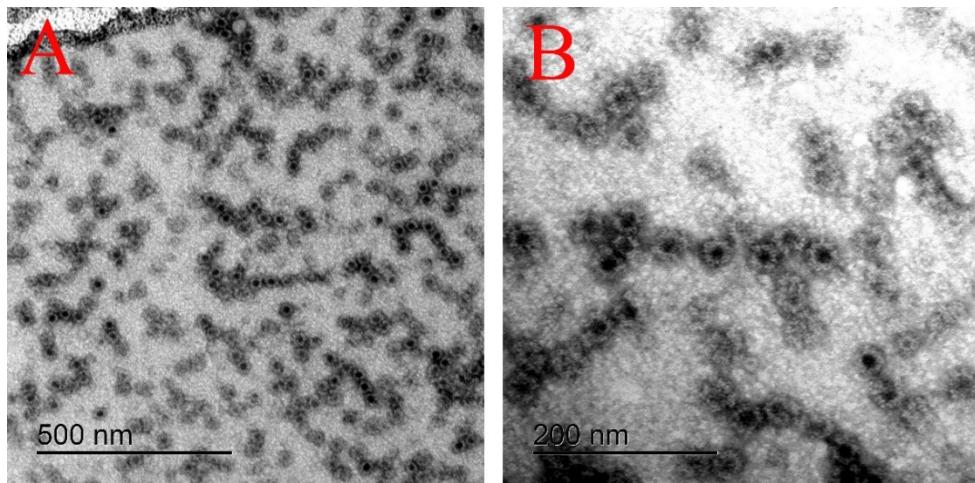
Slika 23: NaDS PAGE, barvanje s srebrom: 1 – združeni kromatografski frakciji obeh vrhov druge stopnje koncentriranja; 2 – združeni kromatografski frakciji obeh vrhov druge stopnje koncentriranja, ponovitev; 3 – kromatografski frakciji pri spremembi koncentracije soli na 0,5 M NaCl; 4 – kromatografski frakciji pri spremembi koncentracije soli na 1,0 M NaCl

4.4 RAZSTAVLJANJE IN (PONOVNO) SESTAVLJANJE NO-VPD

V tem poglavju je opisan postopek razstavljanja in ponovnega *in vitro* sestavljanja No-VPD, ki smo ga spremljali s TEM ter z DLS kot podporno metodo, opisan je tudi poskus razvoja hitre in cenovno ugodne metode za razlikovanje med razstavljenim in sestavljenim stanjem v vzorcu, ki temelji na NaDS-PAGE-analizi ob predhodni obdelavi vzorca z ultrafiltracijo.

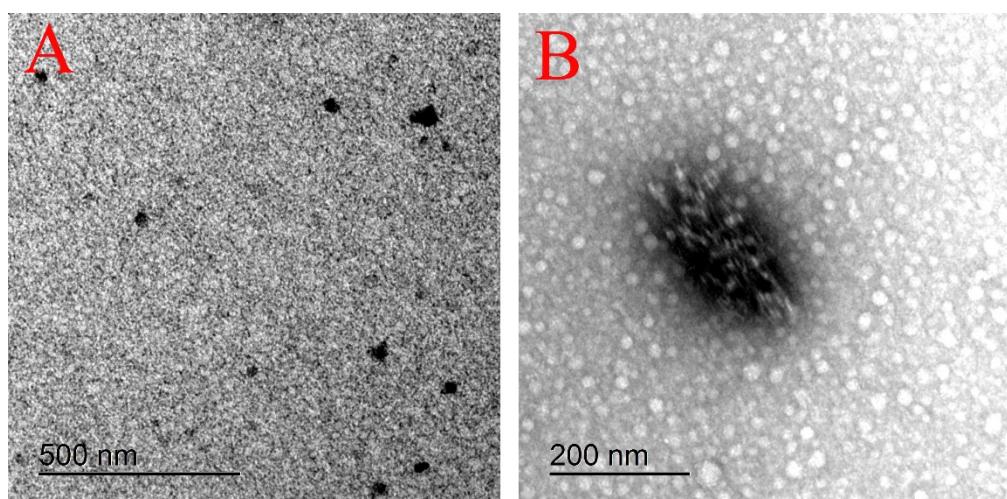
4.4.1 Sledenje procesa razpada in ponovnega sestavljanja No-VPD z elektronskim presevnim mikroskopom

Pri procesu razstavljanja in ponovnega sestavljanja No-VPD smo za začetni vzorec uporabili kromatografsko očiščene in koncentrirane No-VPD, pridobljene po postopku iz točke 4.3. Najprej smo jih razsolili, njihov razpad pa smo povzročili z zamenjavo pufra. Razsoljevanje smo izvedli tako, da smo 12 ml začetnega vzorca razdelili na 4 alikvote po 3 ml in jih odpipetirali v centrifugalne koncentratorje Vivaspin® 6. Centrifugirali smo 20 minut na 6.000 g pri 20 °C. Sledilo je še dvakratno spiranje s 3 ml 10 mM fosfatnega pufra pH 7, nakar smo vse tri frakcije ponovno združili. Iz 12 ml začetnega vzorca smo po centrifugiranju dobili 250 µl retentata. 50 µl smo odvzeli ter jim dodali 1.200 µl 10 mM fosfatnega pufra pH 7 (redčenje) ter izvedli TEM-analizo, ki nam je služila kot referenčno začetno stanje. Iz slike 24 je razvidno, da so v analiziranem vzorcu prisotni No-VPD, ki pa kažejo razlike v strukturi (nepravilno, nepopolno sestavljeni).



Slika 24: Začetno stanje, No-VPD v 10 mM fosfatnem pufru pH 7. A – mala povečava, B – večja poveča.

Preostalim 200 µl retentata smo dodali 4.800 µl 50 mM fosfatnega pufra pH 9, s tem smo želeli ustvariti pogoje za razstavljanje No-VPD na osnovne gradnike (dimeri VP1-proteina). Izmerjena pH vrednost vzorca je bila pH 8,87, koncentracija fosfatnega pufra pa 48,4 mM. Vzorec smo pustili stati na sobni temperaturi 3,5 ure in nato posneli TEM (slika 25). Na posnetku ne vidimo nobenih No-VPD, kar dokazuje, da so se razstavili, opaziti je bilo le nekaj linearно organiziranih beljakovinskih tvorb.

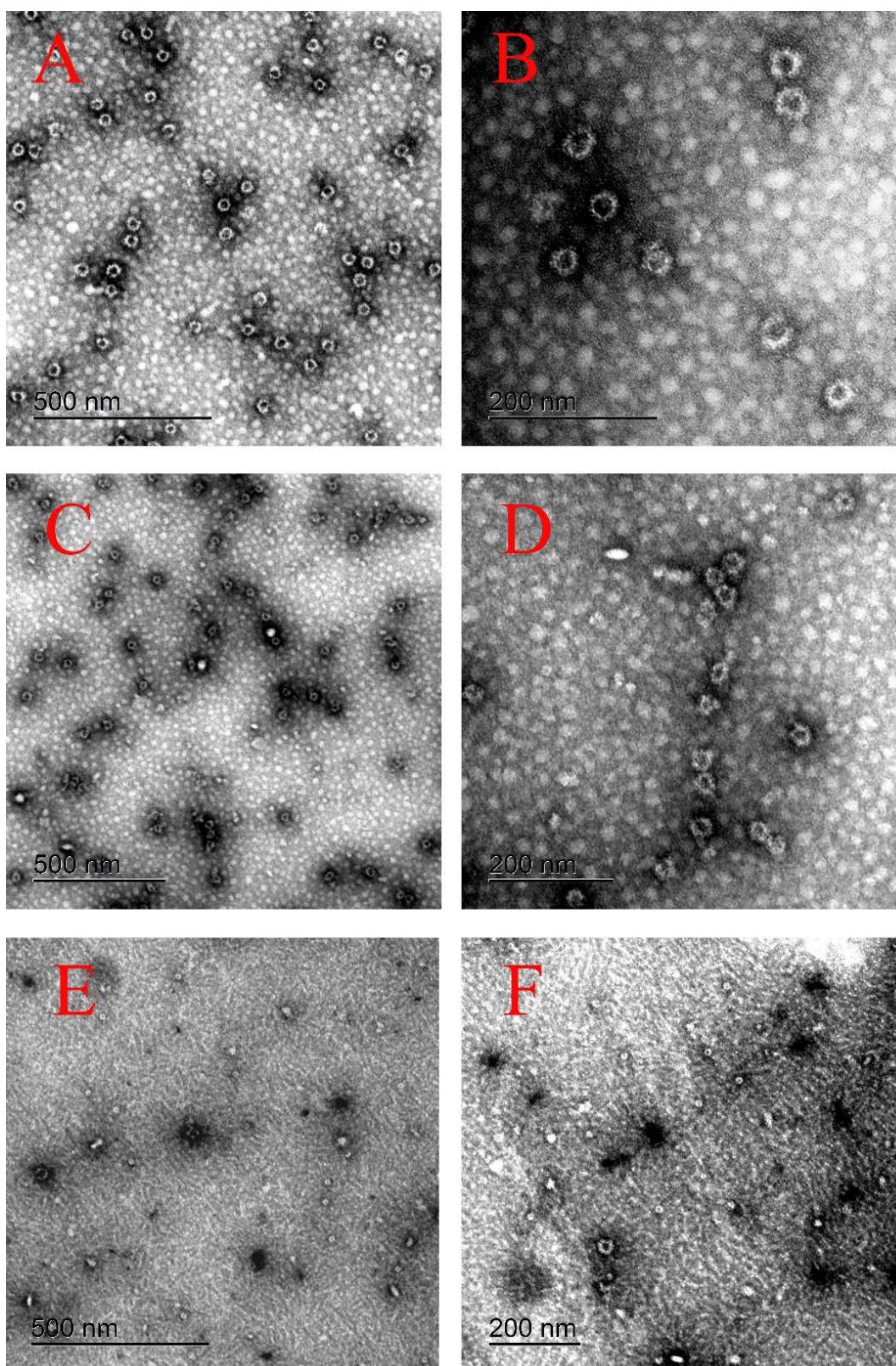


Slika 25: Vmesno stanje, razstavljeni No-VPD v 50 mM fosfatnem pufru pH 9; A – mala povečava, B – večja povečava

V zadnjem koraku je bil cilj vzpostaviti pogoje za ponovno sestavljanje No-VPD, ki smo jih predhodno razstavili z visoko pH-vrednostjo pufra. Da bi to dosegli, smo vzorec s pH-vrednostjo 8,87, v katerem nismo opazili No-VDP, razdelili v dele po 1.250 µl ter vsakega prenesli v svojo dializno kaseto (slide-A-Lyzer) z membrano, ki zadrži molekule z molsko maso, večjo od 10.000. Na ta način se znebimo tudi potencialnih nizkomolekularnih nečistoč v vzorcu. Dializne kasete smo nato za 20 ur potopili v pufre z različnimi pH-vrednostmi, za katere smo sklepali, da bodo omogočili ponovno sestavljanje No-VPD, in sicer:

- 250 mM fosfatni pufer pH 6,
- 250 mM fosfatni pufer pH 6,5,
- 250 mM fosfatni pufer pH 7.

Po končani dializi smo pripravili mrežice za TEM. Pri pregledovanju mrežic smo bili pozorni predvsem na prisotnost No-VPD ter na njihove morfološke karakteristike. Opazili smo, da smo najbolje rezultate dobili v 250 mM fosfatnem pufru pH 6 (slika 26 A in B), kjer pod TEM vidimo dokaj homogeno populacijo No-VPD, sestavljenih v pravilne 38 nm velike kapside. No-VPD dobimo tudi v ostalih dveh pufrih, 250 mM fosfatnem pufru pH 6,5 (slika 26 C in D), pri katerem pa pri večji povečavi opazimo tudi nepravilno sestavljenе No-VPD, ter 250 mM fosfatnem puferu pH 7 (slika 26 E in F), v katerem je populacija No-VPD zelo heterogena, saj poleg pravilno in nepravilno sestavljenih No-VPD vidimo tudi okoli 18 nm velike krogelne strukture, ki bi lahko predstavljale malo, T=1, različico No-VPD. Nekoliko manjši premer od pričakovanega (23 nm) je morda posledica dejstva, da lahko pri negativnem kontrastiraju strukture pod TEM dobimo nekoliko manjšo velikost, kot je v resnici (Olson in sod., 1989).



Slika 26: Končno stanje, ponovno sestavljeni No-VPD, A in B – 250 mM fosfatni pufer pH 6; B in C 250 mM fosfatni pufer pH 6,5; E in F 250 mM fosfatni pufer pH7. A, C, E – mala povečava; B, D, F – večja povečava

4.4.1.1 Ocena deleža pravilno sestavljenih No-VPD

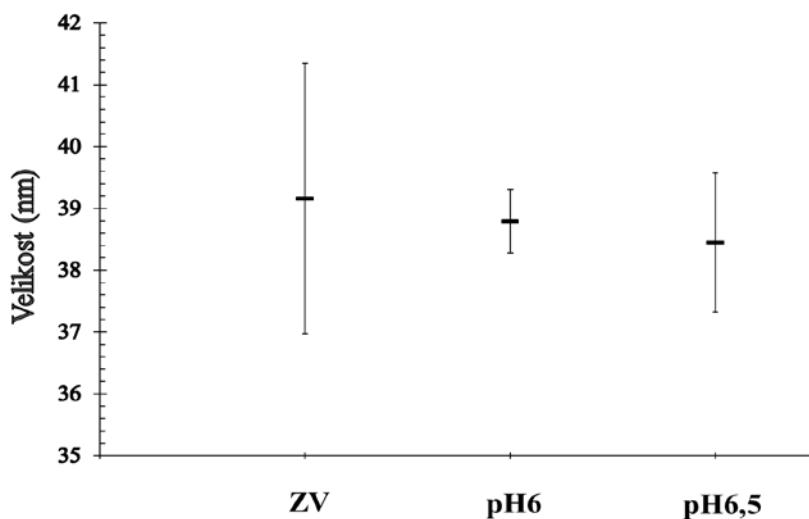
Za oceno deleža pravilno sestavljenih No-VPD v začetnem vzorcu in po procesu razstavljanja in ponovnega sestavljanja smo uporabili metode, opisane pod točko 3.2.2.4. Rezultati analize so povzeti v preglednici 8.

Preglednica 9: Ocena deleža pravilno sestavljenih No-VPD s pomočjo opazovanja morfologije No-VPD z elektronskim mikroskopom

Stopnja v procesu	Delež pravilno sest. No-VPD
Začetno stanje	62,5 %
Razstavljeni No-VPD (fosf. pufer pH 8,87)	0 %
Ponovno sestavljeni No-VPD (fosf. pufer pH 6)	87,5 %
Ponovno sestavljeni No-VPD (fosf. pufer pH 6,5)	71,9 %
Ponovno sestavljeni No-VPD (fosf. pufer pH 7)	2 generaciji No-VPD

4.4.1.2 Ocena velikosti in homogenosti znotraj pravilno sestavljenih No-VPD

Za oceno homogenosti znotraj pravilno sestavljenih No-VPD pred procesom razstavljanja in sestavljanja in po njem smo s programom Gatan Digital Micrograph pomerili velikost 20 naključno izbranih pravilno sestavljenih delcev. Nato smo s programom Microsoft Excel izračunali povprečno velikost in standardni odklon. V začetnem vzorcu so bili No-VPD veliki $39,16 \pm 2,19$ nm, vzorec ponovno sestavljenih No-VPD v fosfatnem pufru pH 6 je vseboval $38,79 \pm 0,51$ nm velike delce, velikost ponovno sestavljenih No-VPD v fosfatnem pufru pH 6,5 pa je bila $38,45 \pm 1,12$ nm (slika 27). Ponovno sestavljeni No-VPD v fosfatnem pufru pH7 niso bili vključeni v analizo, saj je bilo na sliki premalo delcev za reprezentativno določitev, poleg tega pa so bili še različnih tipov ($T=3$ in $T=1$ No-VPD).



Slika 27: Povprečna velikost No-VPD s pripadajočim standardnim odklonom

4.4.2 Monitoring procesa razpada in ponovnega sestavljanja VPD z DLS

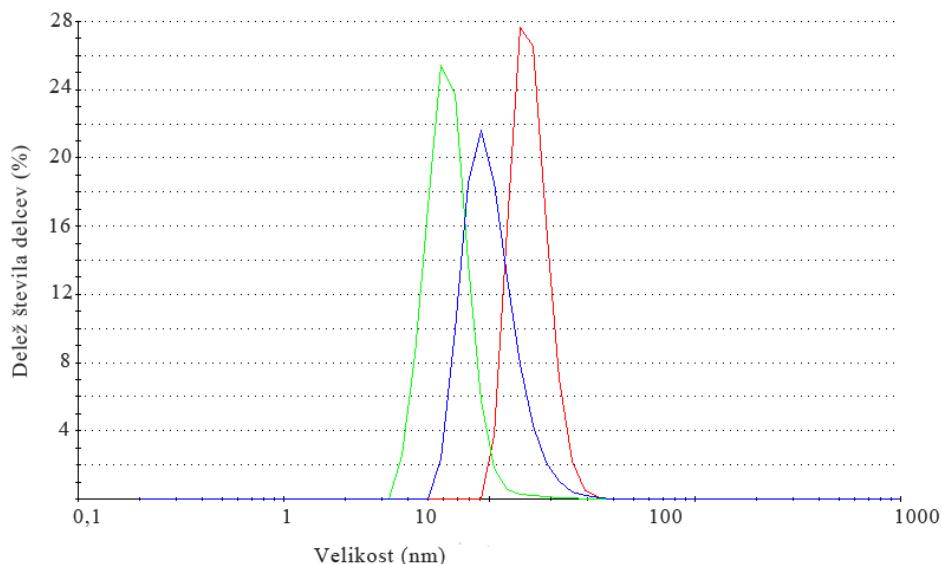
Nekatere vzorce, s katerimi smo v prejšnjem podpoglavlju z elektronskim mikroskopom spremljali proces razpada in ponovnega sestavljanja, smo analizirali tudi z metodo DLS:

- začetni vzorec, združene kromatografske frakcije, pridobljene s postopkom, opisanim v poglavju 4.2;
- vzorec v pufru pH 8,87 (razstavljeni No-VPD);
- vzorec v pufru pH 6 (predhodno razstavljeni No-VPD).

Pri vsakem vzorcu so bile opravljene tri meritve, rezultati, podani v preglednici 9 in na sliki 28, prikazujejo povprečje rezultatov.

Preglednica 10: Povprečne velikosti delcev v vzorcu, s podanim deležem polidisperznosti, rezultati, pridobljeni z metodo dinamičnega razprševanja svetlobe (DLS)

Ime vzorca	Povprečna velikost delca (nm)	Delež polidisperznosti (%Pd)
Začetni vzorec, koncentrirana kromatografska frakcija	$74,08 \pm 58,30$	78,7
Vzorec vmesnega stanja, pH 9	$16,57 \pm 3,99$	24,1
Vzorec končnega stanja, pH 6	$39,26 \pm 8,46$	21,6



Slika 28: Graf porazdelitve velikosti delcev v odvisnosti z deležem števila delcev, podatki, pridobljeni z metodo dinamičnega razprševanja svetlobe

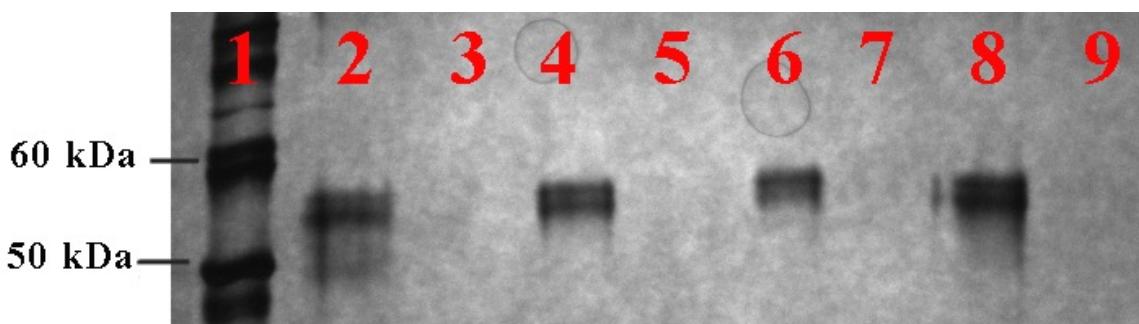
V praksi velja, da se vzorec smatra kot monodisperzen kadar je $\%Pd < \approx 20\%$ (Arzenšek, 2010) V primeru začetnega vzorca je $\%Pd = 78,7$. Na elektronskem posneteku istega vzorca (slika 24) vidimo No-VPD, ki so veliki okoli 40 nm, opazimo pa tudi visoko stopnjo agregacije, kar pojasni napačno meritev povprečne velikosti delcev z DLS ter visok $\%Pd$.

4.4.3 Razvoj hitre metode za optimizacijo razstavljanja in sestavljanja

Za potrebe obsežnejše študije optimizacije razstavljanja in sestavljanja No-VPD smo skušali razviti preprosto in ekonomično metodo za spremljanje omenjenega procesa, ki hkrati omogoča pregled več vzorcev. Metoda temelji na uporabi ultrafiltracijske membrane s 300 kDa bariero, s katero smo želeli ločiti 116 kDa velik dimer VP1-proteina (osnovni gradnik) od sestavljenih No-VPD. Pričakovali smo, da bodo sestavljeni No-VPD po centrifugiraju ostali v retentatu, na drugi strani pa bi pri pogojih, ki vodijo v razpad No-VPD dobili proste VP1-dimere v permeatu. Pri eksperimentu smo 1 ml posameznega vzorca odpipetirali v 2 ml Vivaspin koncentratorja, nato pa centrifugirali 10 minut pri 6.000 g in 20 °C. Po centrifugiraju je v retentatu ostalo okoli 100 µl vzorca, ki smo ga nato redčili z ustreznim pufrom, tako da sta se prostornini retentata in permeata izenačili. V naslednjem koraku smo z vzorci (retentati in permeati) izvedli SDS PAGE-analizo (slika 29). V preglednici 10 je prikazana shema nanosa na gel.

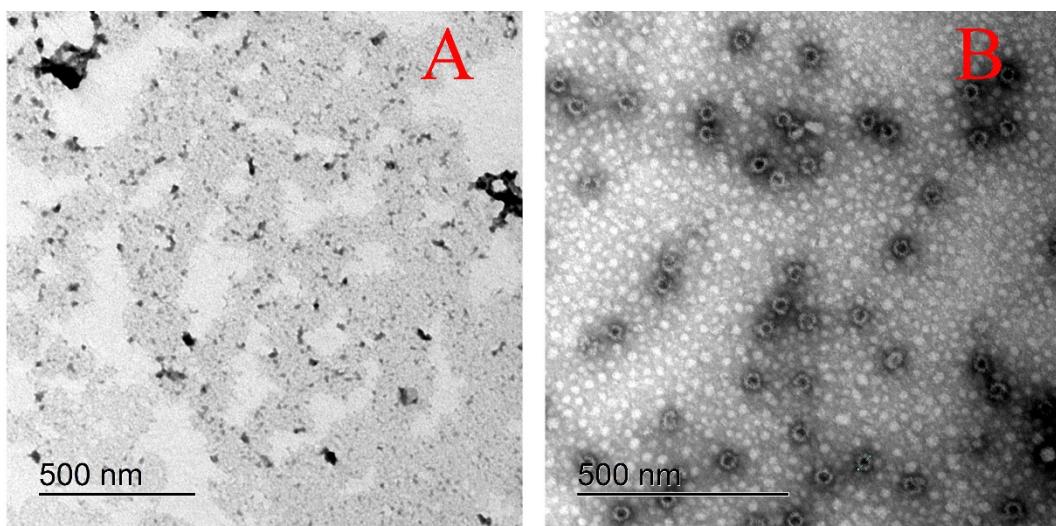
Preglednica 11: Shema naložitve na SDS PAGE (slika 29)

Št. vzorca na gelu	Vrsta vzorca
1	Markerski proteini
2	Permeat vzorca v pufru za razstavljanje, pH 9 (300 kDa filter)
3	Retentat vzorca v pufru za razstavljanje, pH 9 (300 kDa filter)
4	Permeat vzorca v pufru za sestavljanje, pH 6 (300 kDa filter)
5	Retentat vzorca v pufru za sestavljanje, pH 6 (300 kDa filter)
6	Permeat vzorca v pufru za sestavljanje, pH 6,5 (300 kDa filter)
7	Retentat vzorca v pufru za sestavljanje, pH 6,5 (300 kDa filter)
8	Permeat vzorca v pufru za sestavljanje, pH 7 (300 kDa filter)
9	Retentat vzorca v pufru za sestavljanje, pH 7 (300 kDa filter)



Slika 29: SDS PAGE, barvanje s srebrom: poskus razvoja hitre metode za spremljanje razstavljenosti, sestavljenosti No-VPD

Na podlagi nekoliko presenetljivih rezultatov (No-VPD v permeatu) smo se odločili še za pregled vzorcev z elektronskim mikroskopom (slika 30), s katerim smo potrdili rezultate, dobljene z SDS PAGE-analizo. No-VPD so res prešli v permeat.



Slika 30: Elektronska mikroskopija: A – retentat vzorca v pufru za sestavljanje pH 6, B – permeat vzorca v pufru za sestavljanje pH 6

5 RAZPRAVA

Med praktičnim delom magistrske naloge smo poskušali optimizirati proces razstavljanja in ponovnega sestavljanja No-VPD. Za dosego zadane naloge smo morali predhodno določiti in izbrati najbolj smiselne in dostopne analitske metode ter jih preizkusiti za odkrivanje No-VPD in VP1-norovirusnega proteina v vzorcu. Dodatno pa je bilo treba razviti tudi metodo izolacije in koncentriranja No-VPD, da bi pridobili zadostno količino čistih No-VPD v koncentraciji, ki presega spodnje meje detekcije izbranih analitskih metod.

5.1 IZBIRA ANALITSKIH METOD

Izmed nabora analitskih metod, ki smo ga sestavili na osnovi pregleda literature na področju analitike VPD ter sorodnih področji, smo v prvem krogu izločili metode, ki nam niso bile dostopne, kot so AFFFF, analitsko ultracentrifugiranje, SLS in AFM. Prav tako smo se odločili, da pri eksperimentih ne bomo uporabljali izključitvene kromatografije, ker preliminarni rezultati niso bili spodbudni. Ostale metode smo eksperimentalno testirali, v spodnjih podpoglavljih so zbrani povzetki rezultatov testiranih metod.

5.1.1 Elektronski presevni mikroskop (TEM)

Kot je razvidno s slike 7, nam je z elektronskim mikroskopom uspelo detektirati delec, ki po velikosti in obliki ustreza No-VPD. Metodo smo uporabljali pri spremljanju uspešnosti izolacije, koncentracije kot tudi pri spremljanju procesa razstavljanja in ponovnega sestavljanja. Glavna pomanjkljivost metode je v tem, da z njo vidimo le sestavljene No-VPD, ne pa tudi razstavljenega stanja (116 kDa veliki VP1-dimeri), pa tudi, da je semi kvantitativna. Štetje je potrebno opraviti na velikem številu virusov, zato je zelo zamudna in ni primerna za veliko stevilo vzorcev.

5.1.2 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v pristnosti natrijevega dodecil sulfata (SDS PAGE)

SDS-PAGE je preprosta in relativno poceni metoda za sledenje prisotnosti 58 kDa velikega VP1-proteina v vzorcu, služi nam tudi pri oceni uspešnosti izolacije, saj nespecifično obarvanje s srebrom pokaže vse proteine v vzorcu. Zato lahko trdimo, da v primeru, ko po barvanju s srebrom na gelu ne opazimo drugih lis kot tisto, ki pripada VP1-norovirusnem proteinu, vzorec ne vsebuje proteinskih nečistoč oziroma, če smo bolj natančni, so te lahko prisotne v koncentracijah, manjših od 0,2 ng na elektroforetsko liso, kolikor znaša meja detekcije pri barvanju s srebrom. Kakor koli, ker metoda ni specifična, smo morali z neko neodvisno potrditveno metodo dokazati, da 58 kDa velika lisa res pripada VP1-norovirusnemu proteinu. Običajno se to izvede z Westrn prenosom na membrano in detekcijo s specifičnimi protitelesi. Pri našem delu smo uporabili dokazovanje z elektronskim mikroskopom. Vzorec, ki smo ga predhodno prečistili do te mere, da je bila na SDS-PAGE vidna samo ena elektroforetska lisa v velikosti 58 kDa, smo pregledali z elektronskim mikroskopom. Ker smo odkrili samo No-VPD, lahko sklepamo, da zgoraj omenjena elektroforetska lisa res pripada VP1-norovirusnem proteinu, s tem pa potrdimo uporabnost metode NaDS-PAGE pri sledenju prisotnosti norovirusnih VP1-proteinov v

vzorcu ter oceni uspešnost izolaciji le-teh.

Glavna omejitev metode je, da z njo ne moremo spremljati procesa razstavljanja in sestavljanja, saj metoda detektira le prisotnost VP1-norovirusnega proteina v vzorcu, ne poda pa informacije o kvartarni strukturi proteina v vzorcu (dimeri, oligomeri, T=1-kapside in T=3-kapside).

5.1.3 Encimsko imunski test (ELISA)

S testom smo želeli potrditi prisotnost norovirusnih antigenov v vzorcu, predvsem med izolacijskimi postopki, kjer smo po koncu neke stopnje in pred začetkom naslednje potrebovali hitro informacijo o prisotnosti oziroma odsotnosti No-VPD antigenov v vzorcu in s tem informacijo o uspešnosti izolacije. Vendar pa je imela v našem primeru omejeno uporabnost, saj smo dobili pozitivne rezultate tudi pri vzorcih, filtriranih skozi 100 kDa membrano, iz česar sklepamo, da smo zaznali morebitne proteinske monomere ali celo njihove dele, kjer bi njihova izpostavljenost dala močan signal.

Seveda zato tudi nismo mogli razlikovati med sestavljenimi ter razstavljenimi No-VPD (dimeri VP1-proteina), zato te metode pri nadalnjih eksperimentih nismo uporabljali.

5.2 IZOLACIJA IN KONCENTRACIJA NO-VPD

Za potrebe študije procesa razstavljanja in ponovnega sestavljanja No-VPD je bilo potrebno razviti postopek izolacije in koncentracije No-VPD. Pri izboru metod je bilo poleg izvedljivosti merilo tudi možnost prenosa v večje merilo ter ekonomičnost.

Kot produksijski organizem smo izbrali rastlino *Nicotiana benthamiana*. Gre za alternativno izbiro k mnogo bolj uveljavljeni produkciji No-VPD s heterolognim izražanjem v celicah insektov. Prednost pri proizvodnji v rastlinah je predvsem v poceni in preprosti proizvodnji, ne potrebujemo drage bioprocесne opreme (bioreaktorjev) in kompleksnih gojišč. Kot prednost tega sistema lahko omenimo še pravilno zvijanje proteinov ter odsotnost človeških patogenov. Na drugi strani je glavna omejitev relativno nizka izražanje VPD, včasih tudi glikozilacija ter znotrajcelično izražanje (Chen in Lai, 2013). V našem primeru je bilo tudi obilo ročnega dela pri agroinfiltracijskem postopku (agroinfiltracija z brizgo), kar predstavlja oviro pri prenosu v večje merilo. Slednje so nekatera biofarmacevtska podjetja rešila z vakuumsko infiltracijo, s katero je v eni uri možno infiltrirati tudi nekaj ton rastlinskega materiala (Chen in Lai, 2013).

Zaključni procesi se v našem primeru začnejo z žetvijo rastlin *Nicotiana benthamiana*. Po žetvi smo rastline zamrznili na -80 °C. Z zamrzovanjem smo nekoliko olajšali delo pri homogenizaciji rastlinskega materiala, kar je bil naš naslednji korak v procesu izolacije No-VPD iz *N. benthamiana*. Pri procesu homogenizacije smo povzeli postopek, kot so ga uporabili Santi in sod. (2008). Homogenizacija je potekala v rahlo kislem ekstrakcijskem pufru pH 5,5. Prednost omenjenega pufra je tudi prisotnost inhibitorjev rastlinskih proteaz, ki poleg nizkega pH dodatno zavirajo delovanje proteaz, saj ima večina rastlinskih proteaz optimum delovanja blizu nevtralnega pH (pH = 7) (Greenber in Winnick, 1940), hkrati pa je No-VPD pri tem pH-ju stabilen (Ausar in sod., 2006). Homogenizaciji sta sledili dve

seriji centrifugiranja, katerih namen je bil odstraniti ostanke rastlinskih celic, ki bi predstavljali moteč dejavnik pri nekaterih kasnejših postopkih čiščenja (filtriranje, kromatografija). Sprva smo načrtovali le eno 20-minutno centrifugiranje pri 6.000 g in 4 °C, vendar smo pri poskusih v manjšem merilu ugotovili, da so v supernatantu še vedno prisotni večji delci, kar se je odrazilo v hitrem mašenju membranskega filtra z 0,22 µm porami. Zato smo uvedli še drugi korak centrifugiranja, pri katerem smo supernatant iz prvega centrifugiranja centrifugirali še enkrat, tokrat 15 minut pri 15.000 g in 4 °C. Temu je sledil proces filtriranja skozi membranski filter z 0,22 µm porami, da bi odstranili mikroorganizme, ki bi z izločanjem proteaz lahko vplivali na stabilnost No-VPD. Uspešnost homogenizacije in izolacije smo preverjali z elektronskim mikroskopom. Po pregledu vzorcev (slika 11 A) lahko zaključimo, da smo iz agroinfiltriranih rastlin *Nicotiana benthamiana* uspešno izolirali No-VPD, pa tudi to, da nam je uspelo ločiti No-VPD od večjih nečistoč (ostanki rastlinskega materiala, mikroorganizmi), na način, ki ni ogrozil stabilnosti No-VPD.

Z aplikativnega vidika lahko rekombinantno izražene No-VPD uporabimo kot cepivo proti norovirusnim obolenjem ali pa kot vektorski sistem za vnos drugih farmacevtsko pomembnih molekul v telo (Koho in sod., 2012). Kakor koli, v obeh primerih se pojavi potreba po dobro očiščenih No-VPD, zastopanih v dovolj velikem številu. V literaturi lahko najdemo nekaj metod, ki temeljijo na ultracentrifugiranju v gradientu cezijevega klorida (Ausar in sod., 2006), saharoznem gradientu (Mason in sod., 1996) ter kombinaciji obeh (Jiang in sod., 1992). Glavne pomanjkljivosti metod, ki temeljijo na ultracentrifugiranju, so slaba ponovljivost, časovno potraten proces in zahteven prenos v večje merilo (Koho in sod., 2013). Tako smo se pri našem eksperimentalnem delu odločili zaobarjanje No-VPD s PEG, ki se je v preteklosti že izkazalo kot uporabna metoda za čiščenje in koncentriranje No-VPD (Koho in sod., 2012). Glede na rezultate pod točko 4.2.3 lahko rečemo, da nam je uspelo oboriti No-VPD (slika 11 C in D), hkrati pa v grobem ločiti No-VPD od ostalih (proteinskih) nečistoč, ki so po centrifugiranju ostale v supernatantu (slika 10).

V naslednjem koraku smo razmišljali o odstranitvi PEG. Korak je smiseln, saj se PEG pojmuje kot moteč kontaminat pri nekaterih postopkih. Tako lahko moti postopke pri zaključnih procesih, potencialno pa je pri večjih koncentracijah PEG ogrožena tudi stabilnost No-VPD (Huhti in sod., 2010). Odstranitve smo se lotili z ekstrakcijo s kloroformom, kjer smo No-VPD po centrifugiranju pričakovali v zgornji (vodni) fazi. Rezultati (slika 11 E) potrjujejo naša pričakovanja, saj smo pri pregledu vodne faze z elektronskim mikroskopom opazili No-VPD, ki so ostali pravilnih oblik.

5.3 DODATEN KROMATOGRAFSKI KORAK

Vpeljava kromatografskega koraka za koncentracijo in čiščenje No-VPD je potrebna, kadar potrebujemo izredno visoke stopnje čistosti, ki je ne moremo doseči s PEG-obarjanjem. Kromatografske tehnike omogočajo ločbo z visoko ločljivostjo (Morenweiser, 2005) in z njimi lahko odstranimo različne nečistoče (Kalbfuss in sod., 2007).

Pri poskusnem delu smo se odločili za uporabo CIM-disk monolitne kolone. No-VPD so v povprečju veliki 38 nm, in so za običajne kromatografske nosilce s poroznimi delci

preveliki, saj so pore pri teh nosilcih velike le 10–20 nm (Trilisky in sod., 2009). Zato No-VPD ne vstopajo v notranjost poroznih delcev, kar se odraža v slabšem delovanju. Pri CIM-monolitnih nosilcih pa so aktivne skupine na stenah kanalov, ki v povprečju merijo 1.500 nm (Kramberger, 2006), tako tudi večje molekule ali nanodelci zlahka prihajajo v stik z aktivnimi skupinami.

Glede na aktivne skupine v osnovi ločimo anionske in kationske izmenjevalce. Pri izbiri ustreznega izmenjevalca smo upoštevali, da so No-VPD stabilni v pH območju od 3–7 (Ausar in sod., 2006) ter da je njihova eksperimentalno določena izoelektrična točka 5,9 (pI = 5,9), teoretična pa 5,6 (Goodrich in sod., 2004). Uporabili smo CIM QA-monolitni nosilec, katerega aktivne skupine so kvartarni amini, ki so močni anionski izmenjevalci. Pri mobilni fazi smo zato izbrali pH, ki je višji od pI proteina oziroma No-VPD (negativen neto naboj), a hkrati ne previsok, saj bi to pomenilo slabšo stabilnost No-VPD. Tako smo se odločili za pH 7, s katerim zadovoljimo obe zahtevi.

Ob konstanti pH-vrednosti je vezava odvisna od ionske moči mobilne faze. Pri nizki ionski moči je pričakovati vezavo No-VPD na nosilec, z višanjem ionske moči pa lahko na neki točki pričakujemo sprostitev, elucijo No-VPD iz nosilca. Okvirne pogoje za vezavo oziroma elucijo No-VPD smo povzeli po Kohu in sod., 2012, ki jim je uspelo ustvariti pogoje za vezavo No-VPD na nosilec s 50 mM natrijevim fosfatnim pufrom pH 7, elucijo pa so izzvali pri koncentracijah 0,1–0,2 M NaCl oziroma ko je prevodnost mobilne faze narasla iz začetnih 5–6 mS/cm na 14,5–21,0 mS/cm.

V poglavju Rezultati je pod točko 4.3.1 prikazan primer vezave No-VPD na CIM QA-disk. Uspešnost vezave smo zasledovali z SDS PAGE-analizo. Zanjo smo se odločili, saj z njo lahko relativno hitro in poceni ocenimo, ali je pod danimi pogoji prišlo do vezave No-VPD na kromatografsko kolono. Slika 13 v poglavju 4.3.1 kaže, da se v nevezne frakcije ni izločil noben protein, velik 58 kDa, ki bi lahko bil protein No-VPD, na drugi strani pa smo tak protein detektirali pri kromatografski frakciji, pobrani od 4,4 do 5,4 ml. Ker z SDS PAGE-analizo ne moramo nedvoumno potrditi vezave No-VPD na CIM QA-disk oziroma izločanja v kromatografske frakcije, smo se odločili, da bomo v naslednjem koraku izvedli še monitoring izločanja in pristnost No-VPD preverili še z elektronskim presevnim mikroskopom. Da bi se izognili padcu pod mejo detekcije, smo na CIM QA-disk vzorec nanesli večkrat zapored. Slika 15 prikazuje kromatogram, pri katerem velja omeniti dva vrhova (prvi 0,9 ml–1,7 ml in drugi 1,9 ml–3,0 ml). Po pregledu obeh frakcij vzorca z elektronskim mikroskopom smo ugotovili, da so pri obeh frakcijah vzorca prisotni No-VPD. Tako smo potrdili rezultate, dobljene z SDS PAGE-analizo No-VPD so se vezali na CIM QA-disk ter se pri dvigu ionske moči z 0,2 M NaCl sprali iz njega. V frakcijah, pobranih po obeh vrhovih, No-VPD pod elektronskim mikroskopom ni bilo več moč detektirati, s čimer lahko zaključimo, da se pri tej koncentraciji soli No-VPD v celoti sperejo iz CIM QA-diska. Zanimalo nas je tudi, ali obstajajo kakšne razlike med obema frakcijema. Ker na TEM-slikah (slika 15) nismo opazili razlik, smo se odločili, da gremo korak dlje. Obe frakciji smo znova združili ter ju naložili na CIM QA 0,1 ml analitsko kolono. Za izločanje No-VPD iz kolone smo tokrat izbrali linearni gradient od 0 do 0,5 M NaCl (slika 16). Pobrali smo 5 različnih frakcij, katere smo analizirali z SDS PAGE in dobili zanimive rezultate (slika 16). V frakcijah, kjer smo pričakovali No-VPD (vrhova b in c), se je pri vrhu b pojavila zelo šibka kromatografska lisa ustrezne velikosti (58 kDa),

pri vrhu c pa se je poleg šibke lise pri 58 kDa pojavila močnejša lisa pri 52 kDa. Zanimiva je tudi frakcija, označena s črko d, v kateri smo z SDS PAGE-analizo odkrili samo šibko liso pri 52 kDa. Frakcije smo pregledali še z elektronskim mikroskopom, kjer pri frakcijah, ki smo jih pobrali pri vrhu b in vrhu d nismo opazili No-VPD, torej je njihovo število pod mejo detekcije, pri frakciji, ki smo jo pobrali pri vrhu c pa smo poleg 38 nm velik No-VPD opazili še večje število delcev s povprečno velikostjo 23,51 nm. Sklepamo, da gre za manjšo različico No-VPD, ki je bila predhodno že opisana (White in sod., 1997). White in sod. (1997) so spremljali tudi vpliv delovanja proteaz na obe različici No-VPD Ugotovili so, da je manjša (23 nm) različica dovetnejša na njihovo delovanje, saj so v primeru, ko med čiščenjem in shranjevanjem obeh različic niso dodali inhibitorjev proteaz, z SDS PAGE opazili pojav elektroforetske lise pri 52 kDa. Tako lahko v našem primeru sklepamo, da je med postopkom čiščenja in shranjevanja prišlo do kontaminacije vzorca s proteazami, kar pojasni nekoliko neobičajen SDS PAGE na sliki 16.

Eden od ciljev našega eksperimentalnega dela je bil tudi koncentriranje No-VPD na CIM QA-monolitni koloni. Korak je pomemben, saj z njim omogočimo odkrivanje No-VPD tudi pri analitskih metodah, ki niso tako občutljive, še bolj pa so višje koncentracije pomembne v farmacevtski uporabi. Na podlagi kliničnih študij so namreč ugotovili, da je primerna doza, ki omogoči primeren imunski odgovor, okoli 50 µg No-VPD (Treanor in sod., 2014). Po uspešni določitvi veznih pogojev ter pogojev spiranja No-VPD iz kromatografske kolone se je ideja o kromatografskem koncentriranju No-VPD zdela povsem mogoča. Vendar pa smo pri nalaganju večjih količin vzorca na kolono (slika 18) naleteli na hitro naraščanje tlaka na koloni, verjetno kot posledico delnega mašenja. Sumili smo, da so daljše nitaste strukture (npr. polisaharidi) krive za dvig tlaka, saj so ob dejstvu, da so pore pri CIM-nosilcih v povprečju velike 1.500 nm, sami No-VPD vsaj 30-krat manjši. Zato smo poskusili z dodatno filtracijo vzorca skozi membranski filter s 100 nm porami, vendar omenjeni korak ni rešil težav (slika 19). Zato smo se odločili za drugačen pristop, in sicer za uvedbo dvostopenjskega koncentriranja na CIM QA-disku, ki je podrobneje opisan v točki 4.3.4. Z omenjenim postopkom nam je uspelo še 15-krat koncentrirati izhodni vzorec, ki je predstavljal ekstrakt s PEG-om oborjenih No-VPD. Uspešno koncentriranje potrjuje tudi SDS PAGE-analiza, kjer je bila intenziteta elektroforetske lise pri vzorcu, dobljenem po koncentriranju, veliko močnejša (sliki 20 in 23).

Končni rezultat procesa izolacije, opisanega pod točko 4.2, je bilo 2,4 ml koncentriranih, kromatografsko očiščenih No-VPD, izoliranih iz 263 g rastlinskega materiala oziroma 1.600 ml homogenizata.

5.4 OPTIMIZACIJA RAZSTAVLJANJA IN PONOVNEGA SESTAVLJANJA NO-VPD

Za uporabo No-VPD kot cepiva je za zadovoljitev strogih regulatornih kriterijev (med drugim) potrebno doseči visoko stopnjo homogenosti ter čistosti. Roldão in sod. (2010) ocenjujejo, da se pri heterolognem izražanju VPD 80 % proteinov ne sestavi v želeno VPD-obliko. Prav s procesom razstavljanja in ponovnega sestavljanja VPD lahko dosežemo večjo stopnjo homogenosti proti začetnemu stanju, kar je pomembno, saj se je na primeru HPV VPD izkazalo, da le pravilno sestavljeni VPD izkazujejo enake antigene kot nativni virus (Zhao in sod., 2012).

Drugi problem, ki nakazuje smiselnost uvedbe procesa razstavljanja in ponovnega sestavljanja VPD, je, da lahko VPD pri sestavljanju v organizmu za izražanje v svojo notranjost zajame nečistoče, ki jih brez razstavljanja VPD ni moč odstraniti (Rajander in sod., 2013).

V sklopu magistrske naloge smo izvedli eksperiment, pri katerem smo najprej popolnoma razstavili No-VPD v pufru z visokim pH in nizko ionsko močjo (50 mM natrijev fosfatni pufer pH9). Ponovno sestavljanje smo sprožili z dializo v pufru z visoko ionsko močjo (250 mM natrijev fosfatni pufer) pri treh različnih pH vrednostih (pH 6, pH 6,5 in pH 7). Pri izbiri pufrov smo upoštevali ugotovitve Shoemakerja in sod. (2010), ki so z nativno masno spektrometrijo spremljali razpadanje No-VPD in sestavljanje VP1-proteinov v kapside. Pokazali so, da nizka ionska moč v kombinaciji z alkalnim pH-območjem (pH 9) favorizira razpad kapsid na VP1-dimere, medtem ko pH-vrednosti, nižje od pH 7, ravnotežje pomaknejo v smer No-VPD. Med obema skrajnostma so v različnih deležih, odvisno od ionske moči in pH-vrednosti pufra, detektirali še manjše VP1-oligomere, sestavljene iz 4, 6, 8 in 10 VP1-proteinov ter večje VP1-oligomere, sestavljene iz 60, 80 VP1-proteinov.

Do podobnih ugotovitev kot Shoemaker in sod. (2010) smo z uporabo elektronskega presevnega mikroskopa prišli tudi mi. Ko smo kromatografsko očiščene No-VPD 4 ure inkubirali v 50 mM natrijevem fosfatnem pufru pH 9, z mikroskopom, kljub temeljitem pregledu vzorca nismo zasledili intaktnega No-VPD, kot tudi ne male oblike ali deformiranih No-VPD (slika 25). Kot podporno analitsko metodo smo pri tem eksperimentu uporabili DLS. Rezultati so pokazali, da so delci v povprečju veliki $16,57 \pm 3,99$ nm, s 24,1-odstotnim deležem polidisperznosti. V teoriji velja, da lahko vzorec, ki ima delež polidispernosti manjši od 20 %, štejemo za monodisperzen vzorec (Malvern Instruments Limited, 2011), ker ima 100 kDa velik globularen protein z gladko površino premer okoli 6 nm, v kolikor površina ni gladka, pa ima lahko še nekoliko večji premer (Erickson, 2009). VP1-dimer je velik 116 kDa in ima negladko površino, še posebno P-domena proteina (Chen in sod., 2013). Ko združimo rezultate anbalize TEM in DLS, lahko sklepamo, da smo uspeli razstaviti No-VPD, kljub temu pa proces razstavljanja verjetno ni potekel v celoti v smer VP1-dimerov. Sklepamo, da so nastali predvsem oligomeri, sestavljeni iz 4, 6, 8 in 10 VP1-proteinov, kot so jih pred tem že zasledili Shoemaker in sod. (2010).

Procesu razstavljanja je sledil proces ponovnega sestavljanja pri treh različnih pH-vrednostih (pH 6, pH 6,5 in pH 7). Enako kot pri procesu razstavljanja smo tudi tu proces spremljali z elektronskim mikroskopom ter DLS. Rezultati so v skladu z našimi pričakovanji. Pri vseh pH-vrednostih smo pod elektronskim mikroskopom videli No-VPD, smo pa med vzorci opazili nekaj pomembnih razlik. Z metodo ocenjevanja deleža pravilno sestavljenih delcev, ki je opisana pod točko 3.2.2.4, smo ocenili, da je delež pravilno sestavljenih No-VPD v vzorcu, pri katerem je proces ponovnega sestavljanja potekal v 250 mM natrijevem fosfatnem pufru pH 6 enak 87,2 %, povprečna velikost pravilno sestavljenega delca pa je bila $38,79 \pm 0,51$ nm. To je bolje kot pri ponovnem sestavljanju v fosfatnem pufru pH 6,5, pri katerem se je pravilno sestavilo 71,2 % No-VPD s povprečno velikostjo $38,45 \pm 1,12$. Pri ponovnem sestavljanju v 250 mM natrijevem fosfatnem pufru pH 7 je bilo stanje še zanimivejše, saj smo z mikroskopom opazili dve generaciji No-

VPD. Poleg normalno (38 nm) velikih No-VPD so se pojavili tudi delci, veliki okoli 20 nm, ki jih lahko označimo za malo ($T=1$) različico No-VPD. White in sod. (1997) so z elektronskim mikroskopom tudi detektirali 19 nm velike No-VPD. Jiang in sod. pa so odkrili No-VPD v velikostnem razponu od 15–20 nm. Z vidika smotrnosti oziroma prispevka procesa razstavljanja in ponovnega sestavljanja je zelo pomembna tudi razlika med začetnim stanjem ter končnim stanjem po sestavljanju v natrijevem fosfatnem pufru pH 6. Ocenili smo, da se je delež pravilno sestavljenih No-VPD dvignil z 61,1 % na 87,2 %. Tudi med pravilno sestavljenimi No-VPD se kaže večja homogenost po procesu razstavljanja in sestavljanja, saj se je standardni odklon, ki je statistična mera za razpršenost enot iz 2,19 nm pri začetnem vzorcu znižal na 0,51 nm.

Rezultate, pridobljene z opazovanjem morfologije No-VPD z elektronskim mikroskopom, potrjujejo tudi rezultati, pridobljeni z DLS. Pri analizi smo se osredotočili na vzorec, pri katerem je proces ponovnega sestavljanja potekal v 250 mM natrijevem fosfatnem pufru pH 6. Povprečna velikost delca omenjenega vzorca je bila 39,26 ($\pm 8,46$) nm, vzorec je imel 21,6-odstoten delež polidisperznosti. Omenimo še, da je imel začetni vzorec (kromatografske frakcije) kar 78,7-odstoten delež polidisperznosti. Podobno kot pri rezultatih, pridobljenih s pregledom vzorcev z elektronskim mikroskopom, se tudi tu kaže trend povečanja homogenosti vzorca po procesu razstavljanja in ponovnega sestavljanja v primerjavi s stanjem v začetnem vzorcu, povprečna velikost delcev pa tudi ustreza velikosti No-VPD. Sklepamo, da so za sorazmerno veliko razpršenost delcev pred procesom razstavljanja in sestavljanja krivi agregati, ki so jasno vidni tudi na elektronskem posnetku začetnega stanja (slika 24).

Z našim eksperimentalnim delom smo pokazali, da sta elektronski mikroskop v kombinaciji z DLS uporabni orodji za spremljanje procesa razstavljanja in ponovnega sestavljanja No-VPD. Vendar pa moramo pri optimizaciji procesa pogosto analizirati veliko število vzorcev, obe uporabljeni metodi pa sta relativno dolgotrajni, predvsem mikroskopija. Zahtevata tudi eksperta za pripravo vzorca in obdelavo podatkov. Zato smo se odločili za poskus razvoja zmogljive in hkrati preproste metode določanja No-VPD. Ideja temelji na uporabi SDS-PAGE-analize ob predhodni ločitvi dimerov (razstavljeni stanje) od No-VPD (sestavljeni stanje) z uporabo ultrafiltracije.

Vzorce smo ultrafiltrirali skozi filterno membrano z izključitveno molekulsko maso 300 kDa. Pričakovali smo, da bodo v retentatu sestavljeni 38 nm in 23 nm veliki No-VPD, v permeatu pa dimeri VP1-norovirusnega proteina. Ultrafiltracijo pri 300 kDa smo izvedli na razstavljenih in sestavljenih No-VPD, kar smo predhodno potrdili z elektronskim mikroskopom. Pri razstavljenem vzorcu (slika 29) smo dobili pričakovane rezultate, saj je elektroforetska lisa prisotna le pri permeatu omenjenega vzorca. Vendar pa smo enake rezultate dobili tudi pri vzorcih, kjer so bili prisotni No-VPD (sestavljeni pri pH6, pH6,5 in pH7). Vzorce smo ponovno pregledali z elektronskim mikroskopom in opazili sestavljeni No-VPD (slika 30) pri vseh treh vzorcih v permeatu, ni pa jih bilo v retentatu, kar kaže, da ima izbrani filter prevelike pore in bi bila potrebna nadaljnja optimizacija velikosti por, vendar drugih filtrov nismo imeli na voljo.

6 SKLEPI

- V rastlinah je možno namnožiti No-VPD v laboratorijskem merilu, vendar je potreben razvoj tehnologije za prenos v večje merilo.
- Poiskali smo fizikalno okolje, v katerem smo razstavili No-VPD do preprostejših dimerov in oligomerov. Za popoln razklop na osnovne gradnike (dimere) je potrebna nadaljnja optimizacija pogojev.

Ko so No-VPD razstavljeni na dimere, je le te mogoče očistiti ostalih nečistoč, s tem se znebimo nečistoč, ki so jih No-VPD zajeli v notranjost med spontanim sestavljanjem v organizmu za izražanje. V delu smo v ta namen izvedli dializo, s katero smo se znebili nizkomolekularnih nečistoč.

- Poiskali smo okolje, ki omogoča ponovno *in vitro* sestavljanje VP1-dimerov v No-VPD. Po tem procesu smo dobili bolj homogene No-VPD proti začetnemu vzorcu, kjer so se pojavljali nepravilno sestavljeni No-VPD in agregati.
- Ker gre v primeru No-VPD za preprost VPD brez ovoja, zgrajen iz 180 kopij proteina VP1, bi bilo pri izolaciji in koncentraciji moč postopati tudi tako, da že v začetku razstavimo No-VPD na dimere, nato le-te očistimo po bolj uveljavljenih postopkih za čiščenje proteinov ter jih na koncu *in vitro* sestavimo v No-VPD. Kljub temu obstajajo kompleksnejši VPD, pri katerih *in vitro* postopek razstavljanja in ponovnega sestavljanja ni tako trivialen kot v primeru No-VPD. Tako se nam je zdelo smiselno pokazati pot čiščenja sestavljenih VPD.

7 POVZETEK

Virusom podobni delci (VPD) predstavljajo alternativo drugim vrstam cepiv, kot so oslabljeni oziroma mrtvi virusi ali virusni kapsidni proteini (komponentna cepiva). Njihova prednost je predvsem v tem, da v celoti odražajo zunanjost strukturo virusa, kar omogoča ustrezni imunski odziv, po drugi strani pa ne vsebujejo dednega materiala, zaradi česar je onemogočeno njihovo razmnoževanje v telesu in s tem možnost okužbe. Do zdaj je na trgu prisotnih le nekaj tovrstnih cepiv, dodatno jih je še nekaj v fazi predkliničnih ali kliničnih študij, kar nakazuje, da je farmacevtska industrija prepoznala potencial cepiv, zasnovanih na VPD. Pri magistrskem delu smo uporabili v rastlini *Nicotiana benthamiana* izražene norovirusom podobne delce (No-VPD). Rastline smo poželi 8. dan po agroinfiltraciji, požete rastline smo najprej zamrznili pri -80 °C, nato pa jih mehansko homogenizirali v prisotnosti ekstrakcijskega pufra, čigar pH vrednost in prisotnost inhibitorjev proteaz pomagata pri boljši stabilnosti No-VPD. V vzorcu homogenizata, ki smo ga pregledali s TEM, smo našli No-VPD in tako potrdili uspešnost izražanja No-VPD v *N.benthamiana*. Rastlinski sistem sicer v industriji ni prav pogosto uporabljen, saj je na ta način teže zadostiti vsem kriterijem dobre proizvodne prakse. Pa vendarle so rastline zanimive, saj so proizvodni stroški relativno nizki, na drugi strani pa ponujajo možnost razvoja tako imenovanih jedljivih cepiv, z njimi pa bi se v prihodnosti teoretično lahko izognili dragim zaključnim procesom. Prav ti so eden od ovirajočih dejavnikov hitrejšega prodiranja VPD na trg, zato je razvoj v smeri optimizacije zaključnih procesov še kako potreben. Tako npr. v laboratorijskem merilu VPD standardno izolirajo z ultracentrifugiranjem, slabost te metode pa je, da ni prenosljiva v večje merilo. Kromatografija na drugi strani omogoča prenos v večje merilo. Tudi industrijski obrati, v katerih potekajo zaključni procesi terapevtskih proteinov v osnovi že imajo tehnologijo, ki za zaključne procese VPD potrebuje le nekaj manjših sprememb. V nalogi smo zaključne procese zasnovali tako, da so lahko prenosljivi v večje merilo ter so ekonomični. Po homogenizaciji rastlinskega materiala je tako sledil postopek odstranitve večjih delcev, ki smo ga izvedli z običajnim centrifugiranjem ter filtriranjem. Po postopku smo vzorec pregledali s TEM in ugotovili, da so bili No-VPD še vedno prisotni in zastopani v enakem številu kot takoj po homogenizaciji. Običajno bi naslednji korak predstavljal ultracentrifugiranje, mi pa smo se odločili za v industriji sprejemljivejšeobarjanje No-VPD s 7 % PEG-6.000 in 2 % NaCl. PEG smo nato odstranili z ekstrakcijo s kloroformom. Po omenjenenih korakih smo vzorce pregledali s TEM in opazili občutno večje število NO-VPD v primerjavi z začetnim materialom. Prav tako je SDS-PAGE-analiza pokazala odstranitev dobršnega dela nečistoč, povezanih z organizmom za izražanje. S kromatografskim korakom smo želeli dodatno očistiti in koncentrirati No-VPD in se s tem približati zahtevam farmacevtske industrije, obenem pa pokazati, da je umestitev kromatografije v zaključne procese VPD izvedljiva, čeprav so delci relativno veliki. Zato smo uporabili CIM QA-monolitni nosilec, katerega aktivne skupine so kvartarni amini, močni anionski izmenjevalci. Z 10 mM natrijim fosfatnim pufrom s pH 7 smo ustvarili pogoje za vezavo No-VPD na izbran kromatografski nosilec, saj pri SDS-PAGE-analizi neveznih frakcij nismo zasledili proteina, ki bi ga lahko povezali s kapsidnim proteinom VP1. Pogoje za izločitev No-VPD iz kromatografskega nosilca smo ustvarili z dvigom ionske moči z 0,2 M NaCl. Pri teh pogojih so se No-VPD v celoti izločili v kromatografske frakcije, kar smo pokazali tudi s TEM. Cilj je bil točna določitev ionske moči, pri kateri pride do elucije, kot tudi ločiti oba vrhova, ki smo ju opazili pri dvigu ionske moči z 0,2 M NaCl. Kakor koli,

ciljev nismo dosegli, saj smo po pregledu vzorca po izvedbi kromatografije z linearnim gradientom pod TEM opazili večje število 23 nm velikih No-VPD. Neobičajen profil smo odkrili tudi z analizo SDS PAGE, in sicer smo poleg običajnega dvojčka pri 58 in 56 kDa opazili še dvojček 52 in 50 kDa. Po pregledu literature smo sklenili, da je med shranjevanjem vzorca prišlo do kontaminacije s proteazami. Pri spontanem sestavljanju znotraj organizma za izražanje obstaja nevarnost, da med sestavljanjem pride do zajetja nečistoč v notranjost VPD-jev, kar ima lahko neželene efekte v primeru njihove uporabe kot cepiva. Zaradi tega je v nekaterih primerih potrebno po izolaciji VPD-je razstaviti na kapsidne proteine, proteine očistiti in jih nato ponovno sestaviti v VPD-je, kar se zgodi spontano pod ustreznimi pogoji. Pogoje za razpad smo ustvarili s 4-urno inkubacijo v 50 mM natrijevem fosfatnem pufru pH 8,87. Po omenjeni inkubaciji s TEM nismo več detektirali No-VPD. Proces razpada smo spremljali tudi z metodo DLS. Rezultati so pokazali, da so delci v povprečju veliki $16,57 \pm 3,99$ nm, s 24,1 odstotnim deležem polidisperznosti. Zaključili smo, da smo No-VPD uspeli razstaviti, vendar ne popolnoma do osnovnih gradnikov (VP1-dimeri), pač pa so v vzorcu po vsej verjetnosti poleg dimerov prisotni še oligomeri. Spontano sestavljanje je potekalo z dializo v 250 mM natrijevem fosfatnem pufru pri treh različnih pH-vrednostih. Dializna membrana zadrži molekule z molsko maso, večjo od 10.000. Na ta način se znebimo tudi potencialnih nizkomolekularnih nečistoč v vzorcu. Med tremi različnimi pH-vrednostmi smo najboljši rezultat dobili pri pH 6, tu so bili No-VPD po obliku lepši kot v izhodnem vzorcu (kromatografske frakcije), prav tako nismo opazili agregatov. Rezultate smo potrdili še z metodo DLS, s katero smo ugotovili, da so bili vzorci po procesu razstavljanja in ponovnega sestavljanja v natrijevem fosfatnem pufru pH 6 v povprečju veliki $39,26 (\pm 8,46)$ nm, vzorec je imel 21,6-odstoten delež polidisperznosti. V 50 mM natrijevem fosfatnem pufru pH 8,87 pa je bila povprečna velikost delca $16,57 (\pm 3,99)$ nm s 24,1-odstotnim deležem polidisperznosti. Omenimo še, da je imel začetni vzorec (kromatografske frakcije) kar 78,7-odstoten delež polidisperznosti. S tem smo pokazali, da je proces razstavljanja in ponovnega sestavljanja smiseln, saj se z njim lahko znebimo nečistoč, zajetih v notranjost No-VPD, obenem pa zmanjšamo tudi prisotnost nečistoč, povezanih s produktom, kot so nepravilno sestavljeni VPD in agregati.

8 VIRI

Amanna I., Slifka M.K. 2005. Public fear of vaccination: separating fact from fiction. *Viral Immunology*, 18, 2: 307-315

Arzenšek D. 2010. Dynamic light scattering and application to proteins in solutions. Diplomsko delo. Ljubljana, Fakulteta za matematiko in fiziko, oddelek za fiziko: 18 str.

Atmar R.L., Estes M.K. 2006. The epidemiologic and clinical importance of norovirus infection. *Gastroenterology Clinics of North America*, 35, 2: 275-290

Ausar S.F. Foubert T.R. Hudson M.H. Vedvick T.S. Russell Middaugh C. 2006. Conformational stability and disassembly of Norwalk virus-like particles. *The Journal of Biological Chemistry*, 281, 28: 19478–19488

Balch, W.M. Aughn J., Novotny J., Drapeau D.T., Vaillancourt R., Lapierre J., Bancroft C.T., Parslow T.G. 2002. Evidence for segment-nonspecific packaging of the influenza a virus genome. *Journal of Virology*, 76, 14: 7133-7139

Bertolotti-Ciarlet A., Crawford S.E., Hutson A.M., Estes M.K. 2003. The 3' end of Norwalk virus mRNA contains determinants that regulate the expression and stability of the viral capsid protein VP1: a novel function for the VP2 protein. *Journal of Virology*, 77, 21: 11603-11615

Block O., Mitra A., Novotny L., Dykes C. 2012. A rapid label-free method for quantitation of human immunodeficiency virus type-1 particles by nanospectroscopy. *Journal of Virological Methods*, 182, 1: 70-75

Bull R.A., Tanaka M.M., White P.A. 2007. Norovirus recombination. *Journal of General Virology*, 88, 12: 3347-3359

Chen Q. 2011. Expression and manufacture of pharmaceutical proteins in genetically engineered horticultural plants. *Transgenic Horticultural Crops, Challenges and Opportunities*: 364 str.

Chen Q., Lai H. 2013. Plant-derived virus-like particles as vaccines. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 9, 1: 26-49

Ciringer M. 2012. Ugotavljanje koncentracije in velikosti virusnih delcev z metodo sledenja nanodelcem (NTA). Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 65 str.

Citkowicz A., Petry H., Harkins R.N., Ast O., Cashion L., Goldmann C., Larsen B.R. 2008. Characterization of virus-like particle assembly for DNA delivery using asymmetrical flow field-flow fractionation and light scattering. *Analytical Biochemistry*, 376, 2: 163-172

Cooper M.R., Stewart D.C., Kahl F.R., Brown W.M., Cordell A.R. 2002. Medicine at the medical center then and now: one hundred years of progress. *Southern Medical Journal*, 95, 10: 1113-1121

De Bruin E., Duizer E., Vennema H., Koopmans M.P. 2006. Diagnosis of Norovirus outbreaks by commercial ELISA or RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 137, 2: 259-264

Doultree J.C., Druce J.D., Birch C.J., Bowden D.S., Marshall J.A. 1999. Inactivation of feline calicivirus, a Norwalk virus surrogate. *Journal of Hospital Infection*, 41, 1: 51-57

Duizer E., Schwab K.J., Neill F.H., Atmar R.L., Koopmans M.P., Estes M.K. 2004. Laboratory efforts to cultivate noroviruses. *Journal of General Virology*, 85, 1: 79-87

Erickson H.P. 2009. Size and shape of protein molecules at the nanometer level determined by sedimentation, gel filtration, and electron microscopy. *Biological Procedures Online*, 11, 1: 32-51

Faye L., Gomord V. 2010. Success stories in molecular farming-a brief overview. *Plant Biotechnology Journal*, 8, 5: 525-528

Fenn J.B., Mann M., Meng C.K., Wong S.F., Whitehouse C.M. 1989. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, 246, 4926: 64-71

Gleba Y., Klimyuk V., Marillonnet S. 2005. Magnifection—a new platform for expressing recombinant vaccines in plants. *Vaccine*, 23, 17: 2042-2048

Goodridge L., Goodridge C., Wu J., Griffiths M., Pawliszyn J. 2004. Isoelectric point determination of norovirus virus-like particles by capillary isoelectric focusing with whole column imaging detection. *Analytical Chemistry*, 76, 1: 48-52

Green K.Y., Lew J., Jiang F.X., Kapikian A.Z., Estes M.K. 1993. A comparison of the reactivities of baculovirus-expressed recombinant Norwalk virus capsid antigen with those of the native Norwalk virus antigen in serologic assays and some epidemiologic observations. *Journal of Clinical Microbiology*, 31: 2185-2191

Greenberg D.M., Winnick T. 1940. Plant proteases. I. Activation-inhibition reactions. II. pH-activity curves. III. Kinetic properties. *Journal of Biological Chemistry*, 135: 761-787

Hames B.D., Rickwood D. 1990. Gel electrophoresis of proteins: a practical approach. 2nd ed. Oxford, IRL Press: 383 str.

Hjerten S. 1985. Adaptation of the equipment for high-performance electrophoresis to isoelectric focusing. *Journal of Chromatography A*, 346: 265-270

Huhti L., Tamminen K., Vesikari T., Blazevic V. 2013. Characterization and immunogenicity of norovirus capsid-derived virus-like particles purified by anion exchange chromatography. *Archives of Virology*, 158, 5: 933-942

Infrastrukturni center Mikroskopija bioloških vzorcev. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, oddelek za biologijo. <http://web.bf.uni-lj.si/bi/mikroskopija/index.php> (1. okt. 2015)

Jennings G.T., Bachmann M.F. 2008. The coming of age of virus-like particle vaccines. *Biological Chemistry*, 389, 5: 521-536

Jiang X.I., Matson D.O., Ruiz-Palacios G.M., Hu J., Treanor J., Pickering L.K. 1995. Expression, self-assembly, and antigenicity of a snow mountain agent-like calicivirus capsid protein. *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 6: 1452-1455

Jiang X.I., Wang M.I.N., Graham D.Y., Estes M.K. 1992. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *Journal of Virology*, 66, 11: 6527-6532

Kalbfuss B., Wolff M., Geisler L., Tappe A., Wickramasinghe R., Thom V., Reichl U. 2007. Direct capture of influenza A virus from cell culture supernatant with Sartobind anion-exchange membrane adsorbers. *Journal of Membrane Science*, 299, 1: 251-260

Kapikian A.Z., Wyatt R.G., Dolin R., Thornhill T.S., Kalica A.R., Chanock R.M. 1972. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Journal of Virology*, 10, 5: 1075-1081

Katayama K., Shirato-Horikoshi H., Kojima S., Kageyama T., Oka T., Hoshino F.B., Takeda N. 2002. Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk-like viruses. *Virology*, 299, 2: 225-239

Koho T., Mäntylä T., Laurinmäki P., Huhti L., Butcher S.J., Vesikari T., Hytönen V.P. 2012. Purification of norovirus-like particles (VPDs) by ion exchange chromatography. *Journal of Virological Methods*, 181, 1: 6-11

Kramberger P. 2006. Razvoj tehnologije za koncentriranje in čiščenje rastlinskih virusov z monolitnimi kromatografskimi nosilci. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 151 str.

Kushnir N., Streatfield S.J., Yusibov V. 2012. Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: diversity of targets and production systems and advances in clinical development. *Vaccine*, 31, 1: 58-83

Lamarre B., Ryadnov M.G. 2011. Self-Assembling Viral Mimetics: One Long Journey with Short Steps. *Macromolecular Bioscience*, 11, 4: 503-513

Lee L.A., Niu Z., Wang Q. 2009. Viruses and virus-like protein assemblies–Chemically programmable nanoscale building blocks. *Nano Research*, 2, 5: 349-364

Mach H., Volkin D.B., Troutman R.D., Wang B.E.I., Luo Z., Jansen K.U., Shi L. 2006. Disassembly and reassembly of yeast-derived recombinant human papillomavirus virus-like particles (HPV VPDs). *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 95, 10: 2195-2206

Malvern Instruments Limited. 2011. Dynamic light scattering common terms defined: 6 str. http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/wpcontent/uploads/2011/02/DLSTermsdefined_Malvern.pdf (junij 2015)

Mason H.S., Ball J.M., Shi J.J., Jiang X., Estes M.K., Arntzen C.J. 1996. Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 9, 11: 5335-5340

McCarthy M.P., Suzich J. 1999. In vitro method for disassembly/reassembly of papillomavirus virus-like particles (vlps). U.S. Patent and Trademark Office WO 1999013056 A1: 84 str.

Messaud F.A., Sanderson R.D., Runyon J.R., Otte T., Pasch H., Williams S.K.R. 2009. An overview on field-flow fractionation techniques and their applications in the separation and characterization of polymers. *Progress in Polymer Science*, 34, 4: 351-368

Morenweiser R. 2005. Downstream processing of viral vectors and vaccines. *Gene Therapy*, 12: S103-S110

Murphy R.M. 1997. Static and dynamic light scattering of biological macromolecules: what we can learn. *Current Opinion in Biotechnology*, 8: 25-30

Noad R., Roy P. 2003. Virus-like particles as immunogens. *Trends Microbiology*, 11, 9: 438-44

Olson N.H., Baker T.S. 1989. Magnification calibration and the determination of spherical virus diameters using cryo-microscopy. *Ultramicroscopy*, 30, 3: 281-298

Patel M.M., Widdowson M.A., Glass R.I., Akazawa K., Vinjé J., Parashar U.D. 2008. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerging infectious diseases*, 14, 8: 1224-1231

Peixoto C., Sousa M.F.Q., Silva A.C., Carrondo M.J.T., Alves P.M. 2007. Downstream processing of triple layered rotavirus like particles. *Journal of Biotechnology*, 127, 3: 452-461

Pirtle E.C., Beran G.W. 1991. Virus survival in the environment. *Scientific and Technical Review*, 10, 3: 733-748

Plotkin S.A. 2005. Vaccines: past, present and future. *Nature Medicine*, 11, 4: S5-S11

Prasad B.V., Rothnagel R., Jiang X.I., Estes M.K. 1994. Three-dimensional structure of baculovirus-expressed Norwalk virus capsids. *Journal of Virology*, 68, 8: 5117-5125

Rajendar B., Sivakumar V., Sriraman R., Raheem M., Lingala R., Matur R.V. 2013. A simple and rapid method to monitor the disassembly and reassembly of virus-like particles. *Analytical Biochemistry*, 440, 1: 15-17

Roldão A., Mellado M.C.M., Castilho L.R., Carrondo M.J., Alves P.M. 2010. Virus-like particles in vaccine development. *Expert Review of Vaccines*: 1149–1176

Seow Y., Wood M.J. 2009. Biological gene delivery vehicles: beyond viral vectors. *Molecular Therapy*, 17, 5: 767-777

Shoemaker G.K., van Duijn E., Crawford S.E., Utrecht C., Baclayon M., Roos W.H., Heck A.J. 2010. Norwalk virus assembly and stability monitored by mass spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics*, 9, 8: 1742-1751

Tacket C.O. 2005. Plant-derived vaccines against diarrheal diseases. *Vaccine*, 23, 15: 1866-1869

Thompson C.M., Petiot E., Lennaert A., Henry O., Kamen A.A. 2013. Analytical technologies for influenza virus-like particle candidate vaccines: challenges and emerging approaches. *Virology Journal*, 10, 141: 10-41

Tomé-Amat J., Fleischer L., Parker S.A., Bardliving C., Batt C. 2014. Secreted production of assembled Norovirus virus-like particles from *Pichia pastoris*. *Microbial cell factories*, 13, 1: 134, doi:10.1186/s12934-014-0134-z: 9 str.

Treanor J.J., Atmar R.L., Frey S.E., Gormley R., Chen W.H., Ferreira J., Goodwin R., Borkowski A., Clemens R., Mendelman P.M., 2014. A novel intramuscular bivalent norovirus virus-like particle vaccine candidate-reactogenicity, safety, and immunogenicity in a phase 1 trial in healthy adults. *Journal of Infectious Diseases*, 210, 11: 1763-1771

Trilisky E.I., Koku H., Czymbek K.J., Lenhoff A.M. 2009. Relation of structure to performance characteristics of monolithic and perfusive stationary phases. *Journal of Chromatography A*, 1216, 36: 6365-6376

Van Tricht E. 2013. Virus Particle Characterization - Techniques to Quantify Virus Particle Aggregation and Integrity. Diplomsko delo. Amsterdam, Universiteit van Amsterdam, Analytical Chemistry: 51 str.

Vicente T., Roldão A., Peixoto C., Carrondo M.J., Alves P.M. 2011. Large-scale production and purification of VPD-based vaccines. *Journal of Invertebrate Pathology*, 107: S42-S48

Vicente T., Sousa M.F., Peixoto C., Mota J.P., Alves P.M., Carrondo M.J. 2008. Anion-exchange membrane chromatography for purification of rotavirus-like particles. *Journal of Membrane Science*, 311, 1: 270-283

- White L.J., Ball J.M., Hardy M.E., Tanaka T.N., Kitamoto N., Estes M.K. 1996. Attachment and entry of recombinant Norwalk virus capsids to cultured human and animal cell lines. *Journal of Virology*, 70, 10: 6589-6597
- White L.J., Hardy M.E., Estes M.K. 1997. Biochemical characterization of a smaller form of recombinant Norwalk virus capsids assembled in insect cells. *Journal of Virology*, 71, 10: 8066-8072
- Wu C., Soh K.Y., Wang S. 2007. Ion-exchange membrane chromatography method for rapid and efficient purification of recombinant baculovirus and baculovirus gp64 protein. *Human Gene Therapy*, 18, 7: 665-672
- Yohannes G., Jussila M., Hartonen K., Riekkola M.L. 2011. Asymmetrical flow field-flow fractionation technique for separation and characterization of biopolymers and bioparticles. *Journal of Chromatography A*, 1218, 27: 4104-4116
- Zeltins A. 2013. Construction and characterization of virus-like particles: a review. *Molecular Biotechnology*, 53, 1: 92-107
- Zhao Q., Allen M.J., Wang Y., Wang B., Wang N., Shi L., Sitrin R.D. 2012. Disassembly and reassembly improves morphology and thermal stability of human papillomavirus type 16 virus-like particles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 8, 7: 1182-1189
- Zhao Q., Modis Y., High K., Towne V., Meng Y., Wang Y., Sitrin R.D. 2012. Disassembly and reassembly of human papillomavirus virus-like particles produces more virion-like antibody reactivity. *Virology Journal*, 9, 1: 52, doi:10.1186/1743-422X-9-52: 13 str.
- Zheng D.P., Ando T., Fankhauser R.L., Beard R.S., Glass R.I., Monroe S.S. 2006. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology*, 346, 2: 312-323

ZAHVALA

Ta naloga, za zdaj, predstavlja zaključek moje udeležbe v formalnem izobraževanju. Ob tej priliki bi se rad zahvalil vsem profesorjem in asistentom Biotehniške fakultete, ki so mi predali nekaj svojega bogatega znanja. Zahvalil bi se državi in njenim davkoplačevcem za financiranje študija. Posebna zahvala pa gre staršem ter sorodnikom, ki so v tem času verjeli vame in me na vsakem koraku podpirali.

Res velika zahvala gre mentorju dr. Aleš Podgorniku, ki mi je bil tekom eksperimentalnega dela vedno na razpolago, me naučil dela v laboratorjum, dela s HPLC., načrtovanja eksperimentov, razmišljanja.

Zahvaljujem se še Niki za pomoč in nasvete v laboratoriju, prav tako Matjažu Peterki ter celotnemu kolektivu COBIK-a. Zahvala gre Ion Gutierrez za pripravo tobakov, pomoč pri agroinfiltraciji. Hvala ga. Magdi Tušek Žnidarič za učenje elektronskega mikroskopiranja, pa za pomoč pri tolmačenju elektronskih posnetkov, bila je zanimiva izkušnja. Hvala ga. Maji Ravnikar in g. Gorazdu Avguštinu za predgled in popravke mojega dela. Hvala ga. Karmen Stoper za pomoč pri oblikovanju naloge.

Hvala tudi vsem mojim prijateljem, z vami sem se pa v prostem času najbolj sprostil pa napolnil baterije za nove študijske podvige. Pa hvala mojim sošolkam za zapiske iz predavanj tekom študija, brez vas bi bilo vse skupaj mnogo teže.