

Latvian Biomedical Research and Study Centre

HCV prototype vaccine based on alphaviral recombinant replicons

Author: Ekaterina Alekseeva

Supervisor: Dr.habil.biol. Tatyana Kozlovska, LBMC, Riga, Latvia



Collected Publications

**Faculty of Biology
University of Latvia
Riga, 2008**

Abstract

Effective therapeutic and prophylactic anti-HCV vaccines do not exist until now due to the genetic variability of HCV and its ability to adapt to selective pressure, such as immunological recognition and antiviral treatment. Unfortunately, investigation of HCV biology has been hampered by the lack of efficient and reliable *in vitro* systems for virus propagation.

The alphaviruses, due to high level expression, broad host range, and cytoplasmic replication provide an opportunity to develop a model system for HCV investigation in cell cultures. Semliki Forest virus (SFV) (Liljestrom and Garoff, 1991) and Sindbis virus (Xiong et al., 1989) are alphavirus expression species that are most commonly used for developing of already existing genetic vaccines, which have greater efficacy than conventional genetic vaccines.

The aim of our research is the development of the newer types of HCV vaccine candidates, based on the general concept that one or several structural genes of the HCV are incorporated into the genome of a viral carrier (in our case, SFV and Sindbis) for amplification and expression of immunogenic proteins. For this purpose HCV core protein, E2 protein genes, and genome fragment coding poly P (combined core-E1-E2-p7) genes were inserted into expression vectors. Recombinant SFV particles were produced for each construct and used for infection of BHK-21. HCV polyP fragment encoding structural proteins and protein p7 was also cloned in pCytTS (Sindbis virus based) vector. The recombinant plasmid specified as pCyt/HCV polyP was used for transfection of BHK-21 cells in order to express HCV proteins. High levels of authentic, posttranslationally processed HCV core and E2 proteins have been provided in cell culture by using recombinant alphaviruses. Specificity of HCV core and E2 proteins were confirmed by immunocytochemical data, immunoprecipitation from cell lysates, and *Western* blot analysis with appropriate anti-core and anti-E2 polyclonal antibodies. Electron microscopy analysis revealed the formation of homogeneous HCV core-like particles of 35-37 nm in diameter and HCV-like particles of 60 nm in diameter. Besides the immunogenicity of HCV core and E2 structural proteins in mice were assessed using DNA immunization.

The model system described in this work can be used for further life cycle and biology of HCV study in cell culture using recombinant alphaviruses carrying HCV genes and allowed to develop recombinant viruses as a new type of efficacious vaccine.

Actuality of the Research

Viral hepatitis C, caused by HCV, is a major public health concern worldwide with more than 3% of the world's population infected with the virus (Thomson et al., 2005). Current therapy includes the use of pegylated interferon and ribavirin, but outcomes are unsatisfactory, since only 42% of patients infected with HCV genotype 1 respond positively to treatment (Saracco et al., 2003). Therefore, there is a compelling need to develop an effective anti-HCV vaccine. Unfortunately development has been severely hampered by the lack of appropriate experimental systems. The only animal that can be reliably infected with HCV is the chimpanzee but owing to ethical reasons, high costs, and technical difficulties in working with large animals restricts their use for such purposes. Moreover the greatest limitation for HCV research is the lack of a cell culture system that supports the efficient and reliable propagation of this virus. The model system for study of the HCV molecular mechanisms in cell culture would provide valuable information regarding the pathogenesis and therapy of hepatitis C.

A recent development in vaccinology is the use of nucleic acid encoding a vaccine antigen, generally termed genetic vaccination. Such genetic vaccination may offer a safer and more cost-effective alternative to conventional vaccines, or indeed may be used where conventional vaccine approaches have proven unsuccessful. Genetic vaccines are generally cheap and easy to manufacture, and have proved to be immunogenic and effective in a number of model systems. Some types of such vaccines are based on the genomes of these single-stranded RNA viruses and ensure high-level transient expression of cloned genes in transfected cells.

The alphaviruses Semliki Forest virus, Sindbis virus and Venezuelan equine encephalitis virus have been used for developing of same genetic vaccines, which have greater efficacy than conventional genetic vaccines (Xiong et al., 1989, Liljeström and Garoff, 1991, Pushko et al., 1997, Fleeton et al., 2000).

The aim of our research is the development of the newer types of an anti-HCV vaccine candidates, based on the general concept that one or several structural genes of the HCV are incorporated into the genome of a viral carrier (in our case, SFV and Sindbis) for amplification and expression of the immunogens. This system due to high level expression, broad host range, and cytoplasmic replication provides a unique opportunity to further study the life cycle and biology of HCV in cell culture using recombinant alphaviruses carrying HCV genes and allow use of recombinant viruses as a novel type of efficacious vaccine (Caley et al., 1997, Leitner et al., 1999).

Aims of the Thesis

The aims of this thesis were to develop new HCV-vaccines prototypes and an experimental model for HCV life cycle investigation. To achieve these goals the following tasks were formulated:

- to characterize the immunogenicity of HCV core protein gene in mice (using DNA vaccination);
- to characterize the immunogenicity of HCV E2 protein gene in mice (using DNA vaccination);
- to create recombinant alphaviruses (SFV based, Sindbis based) carrying HCV proteins genes;
- to develop a model virus system that supports the efficient and reliable expression of HCV genes in cell culture system;
- to obtain HCV-like particles using cells infection by recombinant alphaviruses;
- to assess the possibility of recombinant SFV-based viruses carrying HCV proteins genes to generate immunoresponses in mice.

Insight into HCV Investigation using Virus-based Expression Systems

Approximately 200 million chronic HCV infections have been estimated worldwide. Infections with hepatitis C virus (HCV) are marked by frequent viral persistence, chronic liver disease, and extraordinary viral genetic diversity. The understanding of the viral life cycle of HCV has been hampered by the lack of a satisfactory cell culture system, because HCV does not replicate efficiently in cultured cells. Only recently a significant breakthrough could be achieved with development of the infection-based cell culture systems and some replicon systems (Lohmann et al., 1999, Yi et al., 2006). Despite this development, similar systems with other HCV strains have been difficult to establish. But study of the molecular mechanisms would provide valuable information regarding the pathogenesis and therapy of hepatitis C. Detailed investigation of viral protein function and exact mechanisms of HCV replication is actually for antiviral treatment development.

A simplified outline of the HCV replication cycle can be summarized as follows:

- 1) attachment to the host cell and penetration;
- 2) release of the viral positive strand RNA;
- 3) translation of the ORF and processing of polyprotein;
- 4) assembly of a replicase complex;
- 5) production of positive strand RNA progeny via negative strand RNA intermediates;
- 6) formation of new virus particles that probably acquire their envelope via budding into the lumen of the endoplasmic reticulum;
- 7) release of virus progeny presumably via transport through the Golgi compartment.

All these steps take place in the cytoplasm where HCV proteins are found in close association with intracellular membranes (Pietschmann et al., 2001). In principle, each step of the HCV life cycle is a target for antiviral intervention.

The absence of a suitable cellular model for HCV propagation has led to the use of various heterologous expression systems. Among these, the baculovirus–insect cell system has proved useful for analysis of the production and maturation of HCV structural proteins (Matsuura et al., 1992, 1994, Lanford et al., 1993, Hsu et al., 1993, Hüsey et al., 1996a, 1997) and non-structural proteins (Hirowatari et al., 1993, Nishihara et al., 1993, Overton et al., 1995, Suzuki et al., 1995, Hwang et al., 1997). In addition, this system is a valuable tool (i) for the production of large amount of antigens for immunological studies (Chiba et al., 1991, Chien et al., 1992, Inoue et al., 1992, Basset et al., 1999) and (ii) for the investigation of viral protein interactions and assembly (Hüsey et al., 1996b, Wang et al., 1997). Using recombinant baculovirus Baumert et al. (1998) showed that pseudovirus particles could be generated.

As a surrogate virus system pseudotype and recombinant viruses carrying HCV envelope

proteins based on the Vesicular Stomatitis Virus (VSV) have been developed. Recombinant VSV expressed the incorporated HCV gene products which became fully processed and assembled to form HCV-like particles (Ezelle et al., 2002, Majid et al., 2006). Furthermore, recombinant VSV carrying unmodified HCV E1 and E2 proteins was able to infect Huh7 cells (Tani et al., 2007). Recently, the replication *in vitro* mammalian cell culture system was developed for HCV of the genotype 2a JFH1 strain (HCVcc) isolated from a fulminant HCV patient (Lindenbach et al., 2005, Zhong et al., 2005, Yi et al., 2006). However, a robust cell culture system for HCV of the 1a and 1b genotypes, the most prevalent genotypes in the world, has not yet been successfully developed, except for the cell culture system of H77 or H77-S strain (1a genotype) (Kanda et al., 2006, Yi et al., 2006) and the replicons derived from Con1, a genotype 1b strain (Lohmann et al., 1999). However, adaptive mutations in the NS3, NS5A, and/or NS5B proteins are required for efficient replication of these RNAs. Ikeda M. (Ikeda et al., 2002) demonstrated that a subgenomic replicon (NNeo/3-5B) derived from an infectious molecular clone of a genotype 1b virus HCV-N is also capable of efficient replication in Huh7 cells without any adaptive mutations. Since these HCV replicon RNAs lacked most of the sequence encoding the structural proteins (core and E1, E2, and p7), they were not capable of producing infectious particles, despite their robust replication in Huh7 cells.

Semliki Forest virus (SFV) (Liljestrom and Garoff, 1991) and Sindbis virus (SINV) (Xiong et al., 1989) are the most commonly used alphavirus expression vectors. These viruses have a wide host range and replicate in a variety of different species, ranging from mammals to insects. Since all alphaviruses have very similar biology, the principle structural elements of expression vectors are identical. The vectors are generated in such a way that the heterologous gene insert should be placed instead viral structural genes under 26S subgenomic promoter. In general, the vectors have the non-structural coding region, which is required for the production of the alphavirus replicase complex (nsP1-4), 26S subgenomic promoter, and a polylinker with several unique restriction sites for foreign gene insertion. An SP6 promoter is introduced upstream of the recombinant replicon for RNA transcription *in vitro*. The recombinant replicons could be packed inside viral envelopes provided *in trans* by co-transfected defective "helper" RNAs (Berglund et al., 1993, Smerdou et al. 1999). In the first generation of alphavirus expression vectors, the high-level gene expression is coupled with a shut down of the host proteins translation, followed by cell death within 12 to 24 h after infection (Frolov et al., 1996). The cytotoxicity of the vector caused by p53 independent apoptosis (Glasgow et al., 1998), which is induced by the non-structural region, is a major drawback for many applications, and the first generation of RNA-based vectors could only be used for transient gene expression.

SFV expression system as infection-based cell culture systems for HCV investigation was

developed. HCV structural proteins (genotype 1a) were expressed by using recombinant SFV replicon in mammalian cells. It was shown that this expression system to allow the visualization of HCV budding events *in situ*, but budding is abortive or slow in this system (Blanchard et al., 2002, 2003, Greive et al., 2002, Hourieux et al., 2007).

In vaccine development, the SFV system was employed first as a DNA- or an RNA-derived vaccine (Ying et al., 1999), where the SFV structural genes were replaced by a foreign gene. In contrast to this approach, the use of recombinant SFV particles should permit an enhanced transduction of cells compared with DNA- or RNA-based vaccines (Leitner et al., 1999). These rSFV particles infect host cells but do not replicate: only the foreign gene introduced is expressed at high levels. This approach has been shown to enhance humoral and cellular immune responses in mice and monkeys in different virus models, such as influenza virus, louping ill virus (LIV), human immunodeficiency virus (HIV) and human papillomavirus (HPV), bovine viral diarrhea (Berglund et al., 1999, Brand et al., 1998, Daemen et al., 2000, Fleton et al., 2000, Reddy et al., 1999). Remarkable enhancement of cellular immune responses has, nonetheless, been demonstrated recently in both mice and primates when DNA-based vaccines were used in combined regimens, either with recombinant antigens or recombinant viruses (Amara et al., 2001, Pancholi et al., 2000, Robinson et al., 1999).

In the Brinster's study have been investigated the capacity of SFV-derived particles to induce NS3-specific CD8⁺-mediated responses in comparison or in combination with a naked DNA-based vaccine. All DNA/rSFV vaccine combinations evaluated induced specific CTLs, which were detectable for up to 31 weeks after the first injection. Anti-NS3 antibodies could only be detected following a combined vaccine regimen in non-transgenic BALB/c mice. SFV replicon carrying HCV NS3/4A protein genes was used to enhance immunogenicity of NS3/4A by mRNA amplification (Frelin et al., 2004). However, in Vidalin's study replicating SFV-DNA vaccines and rSFVs expressing HCV core or E2 antigens were compared with classical CMV-driven plasmids (pCMV) in single or bimodal vaccine protocols, and comparison of different injection modes did not show an increased efficacy of the core-SFV and E2-SFV plasmids or rSFVs compared with the CMV-driven (Vidalin et al., 2000).

Infection of vertebrate cells with alphaviruses normally leads to prodigious expression of virus-encoded genes and a dramatic inhibition of host protein synthesis. An identification of mutations in the nsp2 gene of the viral replicase for both SIN virus and SFV (Dryga et al., 1997, Frolov et al., 1999, Perri et al., 2000) that render the alphaviral replicase non-cytopathic led to development of sophisticated non-cytopathic alphaviral-based expression vectors. Noncytopathic Sindbis vectors express reasonably high levels of protein in nearly every cell and can be initiated via either RNA or DNA transfection. These vectors should prove to be flexible tools for the rapid

expression of heterologous genes under conditions in which cellular metabolism is not perturbed and we have potential for long-term high-level heterologous gene expression. pCytTS expression vector, which is based on Sindbis virus, is created specially for routine production of difficult or toxic proteins (Boorsma et al., 2000).

We generated recombinant SFV variants for expression of structural HCV proteins by insertion of the contiguous core, E1, E2 and p7 coding region of HCV into the context of SFV replicon (pSFV1/HCVpolyP). An analogous construct was generated using SINV (pCytTS) expression vector. HCV core gene and HCV E2p7 genes were introduced also separately into SFV (pSFV1/HCVcore, pSFV1/HCVE2p7) expression vector and expressed in BHK-21 cells culture. These recombinant HCV genes containing viruses can be used as for *in vivo* applications (for the investigation of viral morphogenesis, self-assembly process, virus-host interaction, translation and processing of polyprotein), as are perspective for developing anti-HCV vaccines newer variants.

The possibility to obtain artificial HCV-like particles takes special significance in the HCV investigation. Little is known about the *in vivo* assembly pathway or structure of the HCV nucleocapsid and virion. Furthermore, it is currently not possible to obtain a sufficient amount of HCV particles for biological and physiochemical studies due to low viral load in the sera of hepatitis C patients and the low yield of HCV particles in cell cultures. Despite this fact, virus-like particles are attractive as a recombinant protein vaccine because they mimic closely the properties of native virion. The synthesis of HCV-like particles (HCV-LPs) by using a recombinant baculovirus that contains the cDNA of the HCV structural proteins (core/E1/E2) was described by Baumert (Baumert et al., 1998). Reassembly of the structural proteins to form HCV-like particles was described also by other authors (Blanchard et al. 2002a, 2002b, 2003, Heller et al., 2005). It was also reported that BALB/c mice immunized with HCV-LPs generated strong and broad humoral and cellular immune responses against HCV structural proteins (Lechmann et al., 2001). Murata's results suggest that HCV-LPs can induce humoral and cellular immune responses that are protective in a surrogate HCV challenge model and that a strong cellular immunity provided by both CD4 and CD8 effector lymphocytes may be important for protection from HCV infection (Murata et al., 2003). Immunization by HCV-like particles induces HCV-specific cellular immune response that can control HCV challenge in the chimpanzee model (Elmowalid et al., 2007). Thus, the obtaining of HCV-like particles is cell culture can help not only to study of HCV morphogenesis, HCV proteins interaction and budding but has also practical significance.

Mentioned above information indicates that the recombinant SFV carrying HCV structural protein genes developed in this study can be used to study HCV proteins with respect

to not only the biological functions in the virus life cycle but also development of an HCV vaccine.

A short description of the methods

General DNA techniques. DNA experiments were carried out using conventional procedures (Sambrook et al., 1989). Reaction conditions for polymerase chain reaction, DNA restriction and ligation were those recommended by the enzyme manufacturer (Fermentas). *Escherichia coli* (*E. coli*) strains DH-5 alpha and JM109 was used for cloning and propagation of plasmids. Detailed description of each plasmid can be found in the individual publications. pSFV1 and pCytTS based constructs carrying HCV proteins genes. Constructs used in this work are represented in Fig.14. The HCV isolate 274933RU (GeneBank accession no. AF176573) genome (Mokhonov et al., 2002) was used for target genes amplification with corresponding primers. These HCV cDNA fragments were cloned behind a SP6 promoter to construct a plasmid pSFV1/HCVpolyP containing core, E1, E2 and p7 genes, as well as pSFV1/HCVcore gene and pSFV1/HCVE2p7 gene separately. Recombinant plasmids were multiplied, linearized at the 3' end of the HCV cDNA by BcuI (*SpeI*) restriction endonuclease digestion. The linearized DNA was then purified and used as a template for in vitro RNA transcription.

Primers for HCV core gene amplification to create pSFV1/HCV core recombinant plasmid were: 5'-GTG AGA TCT GCA CCA TGA GCA CGA ATC CTA AAC-3' and 5'-GAT CGT TAA CTA AGC GGA AGC TGG AAT GG-3'. After amplification, PCR fragment was cut out with BglIII and HpaI restriction endonucleases and ligated into pSFV1 vector, which has been cleaved with SmaI and then with BamHI restriction endonucleases.

Primers used for HCV c-E1-E2-p7 genes amplification in order to create pSFV1/HCVpolyP recombinant plasmid were: 5'-GTG AGA TCT GCA CCA TGA GCA CGA ATC CTA AAC-3' and 5'-CTC TAG ATC TTT AGG CGT ATG CTC GTG GTG GTA G-3'. After amplification, PCR fragment was cut out with Bgl II restriction endonuclease and ligated into pSFV1 vector, which has been cleaved with BamHI restriction endonuclease and dephosphorylated with bacterial alkaline phosphatase (Fermentas).

In order to construct recombinant pSFV1/HCVE2p7, DNA fragment carrying E2 and p7 genes was cut out with Sall and HpaI restriction endonucleases from plasmid pGMV-E2p7.9.3 (obtained from Maria Isaguliant, Ivanovsky Institute, Moscow). DNA fragment was treated with Klenow fragment (Fermentas) to blunt the DNA end after Sall digestion and ligated into pSFV1 vector, which have been cleaved with SmaI restriction endonuclease.

In order to construct recombinant plasmid pCyt/HCVpolyP containing core, E1, E2, and p7 protein genes, vector pCytTS has been cleaved with XbaI and XhoI restriction endonucleases. HCV genome fragment was amplified with primers 5'-GCA TCT CTA GAC GTA GAC CGT GCA CCA TGA GCA CG-3' and 5'-GCA TCC TCG AGT TAG GCG TAT GCT CGT GGT GGT AGT G-3', cut out with XbaI and XhoI restriction endonucleases also and ligated into prepared

vector pCytTS.

Recombinant plasmid pSFV1/EGFP containing Enhancer Green Fluorescence protein (EGFP) gene was used as a control for infection of the BHK-21 cells. In order to generate this plasmid, DNA fragment carrying EGFP gene was cut out from pEGFP-C1 (Clontech) with *NheI* and *HpaI* restriction endonucleases and treated with T4 DNA polymerase (Fermentas) to blunt the DNA end after *NheI* digestion. DNA fragment was ligated into pSFV1 vector, which has been cleaved with *SmaI* restriction endonuclease.

Cell culture. Baby hamster kidney (BHK-21) cells (ATCC) were grown in BHK medium (Gibco-BRL) containing 5 % fetal calf serum, 10 % tryptose phosphate broth, 20 mM HEPES and 2 mM glutamine. Cells were incubated in a 5 % CO₂ atmosphere at 37 °C.

Generation of recombinant viruses and cell infection. For *in vivo* packaging of recombinant RNA into SFV particles, *in vitro*-transcribed RNA was electroporated into BHK-21 cells together with SFV helper RNA under above-mentioned conditions. After 24-48 h, SFV particles in the culture medium were collected and frozen rapidly to be stored as a virus stock. Titers of stocks were determined by infecting cells with serial dilutions of the stocks followed by indirect immunocytochemistry assay. The achieved titres were from 1x10⁷ to 5x10⁷ viral particles per ml. The infection of BHK-21 cells was carried out in serum-free medium with appropriate dilution of virus stocks, which infect 100 % of cells.

RNA transcription and transfection. RNA transcripts were produced *in vitro* from 3 mg of *SpeI*-linearized recombinant plasmids in reactions containing 7mG(5')ppp(5'G) (New England Biolabs) using SP6 RNA polymerase (Fermentas). RNA (3–5 mg) was transfected into BHK-21 cells by electroporation at 850 V, 25 mF, pulsed twice, using Bio-Rad Gene Pulser apparatus without the pulse controller unit. Electroporated cells were diluted in 15 ml complete BHK medium, transferred into tissue culture plates and incubated at 37 °C (5 % CO₂).

DNA transfection and selection of puromycin-resistant cell populations. Slightly sub-confluent monolayers (60-70%) of BHK-21 cells in 30-mm tissue culture plates were used for DNA transfection. DNA was transfected by using ExGene (Fermentas) according to the manufacturer's recommendations. After transfection, cells were incubated 18-48 h at 37 °C. For termoinduction of target gene expression, transfected cells were incubated at 29 °C. For selection of puromycin-resistant cell populations in 18-24 h cells were passaged, then at 24 h the media was changed to standard growth media containing 5 µg/ml puromycin (Sigma). Thereafter, cells were maintained in media with puromycin and were passaged or frozen as standard typical BHK-21 cells.

Cell lysis. Cell monolayers were lysed in buffer containing 1% Nonidet P-40 (NP-40), 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 µg/ml PMSF. After 10 min on ice, cell

nuclei were removed by centrifugation. Supernatants were analysed by immunoprecipitation or by *Western* blotting. For analysis of total cell lysates on SDS-PAGE Laemmli buffer was used for lysis of cells.

Metabolic labelling of infected cells. At 16–20 h after infection, cell monolayers (on 30 mm diameter plates) were washed with PBS, overlaid with starvation medium (methionine-free MEM, 2 mM glutamine, 20 mM HEPES) and incubated at 37 °C in 5 % CO₂ for 30 min. The starvation media was then replaced with the same media containing 100 µCi ml (3.7 MBq) of [³⁵S]methionine (Amersham Biosciences) and incubated at 37 °C (5 % CO₂) for 2 h. Cells were lysed with 300 µl lysis buffer (1 % Nonidet P-40 (NP-40), 50 mM Tris/HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 µg/ml PMSF) and left to stand on ice for 10 min. Lysates were transferred to microcentrifuge tubes for cell nuclei centrifugation at 3000 g for 5 min. Supernatants were used for specific protein immunoprecipitation (IP) or for direct protein analysis in 12% SDS- PAAG.

Immunoprecipitation (IP) of proteins from cell lysates. For IP of HCV core and HCV E2 proteins, rabbit polyclonal anti-HCV core or anti HCV E2 antibodies (gift from M.Isaguliant, Ivanovsky Institute, Moscow) were used. Cell lysates in amounts of 300 - 600 µl were incubated for 2 h with appropriate antibodies (1–2 µl) on ice. After incubation, 40 µl protein A Sepharose (Amersham) soaked in lysis buffer was added, and incubated with rotation overnight at 4 °C. Protein A Sepharose was washed twice with buffer containing 0.2 % NP-40, 10 mM Tris/HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA; twice with buffer containing 0.2 % NP-40, 10 mM Tris/HCl pH 7.5, 500 mM NaCl, 2 mM EDTA; and twice with 10 mM Tris/HCl pH 7.5. Protein A Sepharose pellet was resuspended in 30 µl Laemmli buffer (Laemmli, 1970) and analysed by 12 % SDS-PAGE. Gels were dried and exposed to autoradiography film (Amersham) at –70 °C for overnight or longer.

Anti-HCV antibodies. The polyclonal rabbit anti-core and anti-E2 antibodies were obtained from Maria Isaguliant (Ivanovsky Institute, Moscow) and used as described earlier (Sominska et al., 2005).

Western blot analysis of HCV proteins. The protein samples prepared from pSFV1/HCVcore- or pSFV1/HCVpolyP-infected and pCyt/HCVcore or pCyt/HCVpolyP-transfected BHK-21 cells were separated by SDS-15% PAGE. The Prestained Protein Molecular Weight Markers (Fermentas) were used as molecular mass markers. After electrophoresis, proteins were electrotransferred to Hybond-P membranes (Amersham Pharmacia Biotech) with a blotting apparatus. After transfer, membranes were incubated with blocking buffer (5% non-fat dry milk in PBS). Anti-HCV core polyclonal rabbit antibodies (or anti-HCV E2 polyclonal rabbit antibodies) diluted 1:1 000 in blocking buffer containing 2,5% of non-fat dry milk and 0.05%

Tween 20 were used as primary antibodies. Membranes were subsequently treated with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (Amersham Pharmacia Biotech) at 1:3 000 dilution for 60 min at room temperature. Protein binding was detected with the ECL Plus system (Amersham Pharmacia Biotech).

Indirect immunofluorescence microscopy. BHK-21 cells cultured on glass slides (Nagle Nunc International) were infected with pSFV1/HCVcore or pSFV1/HCVpoly P recombinant viruses and fixed after designated culture periods. The fixed cells were first incubated with antibody dilution buffer (1% bovine serum albumin (BSA), 2.5 mM EDTA, phosphate-buffered saline) for 10 min at room temperature. The cells were then incubated for 60 min at room temperature with one of the following anti-HCV core or E2 polyclonal antibodies as the primary antibodies at 1:1 000. After incubation, cells were washed three times with PBS. Anti-rabbit TRIC-labelled antibodies were used as secondary antibodies in dilution 1:100. The cells were then mounted with PermaFluor aqueous mounting medium (Immunon) and observed under a fluorescence microscope Leica DM 6000 (Leica Camera AG). DAPI was used for visualization of nucleus.

Purification of HCV-like particles. At 48 h postinfection or postelectroporation, cells were lysed in buffer containing 1% Nonidet P-40, 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA (pH 7.6) with 10 µg/ml of PMSF. The lysate was subjected to low-speed centrifugation (15 min at 4°C) to remove cell debris. The supernatant was layered over a 20% (wt/vol) sucrose (in TNE buffer: 50 mM Tris/HCl (pH 7.4), 100 mM NaCl, 0.5 mM EDTA) cushion and centrifugated for 18 h at 4°C and 30 000 rpm, rotor TLS-55 (TL-100 centrifuge, Beckman). Pellet containing HCV-like particles was resuspended in TNE buffer and analyzed by Western-blotting and electron microscopy.

Immunization of mice. Female Balb/c mice (aged 6 to 8 weeks; obtained from the Animal Breeding Centre of the Institute of Microbiology and Virology, Riga) were immunized intravenously (i.v.) or subcutaneously (i.s.) injection with purified SFV1/HCV core, SFV1/HCV E2, SFV/HCVpolyP or control virus (SFV/GFP) at 6×10^6 PFU in PBS. A 200-µl total volume of PBS-virus was administered in 5-week interval (at day 1, at day 35). For monitoring of humoral response, animals were bled at day 0, 35, 42 (1 weeks after the boost), 49 (2 weeks after the boost), 56 (3 weeks after the boost), 63 (3 weeks after the boost).

For details of immunization by DNA see corresponding papers.

ELISA assays. Blood samples were collected from retro-orbital sinus of mice after the primary and second immunization and the sera were analyzed for HCV core-specific antibody titers in ELISA test on the 96-well plates (MaxiSorp, Nunc) coated overnight at 4 °C with 100 µl of core derived peptide MS94-23 DVKFPGGGQIVGGGVYLLPRRGPRLGVRATRKTSER

corresponding to aa 23-43 of HCV core (10 µg/: ml in 50 mM carbonate buffer, pH 9.6) or on the 96-well plates (PolySorp, Nunc) coated with recombinant core proteins M220-25 or M273-2 (kind gift from M.Mihailova, BMC, Riga) at the same concentration and in the same coating buffer. After blocking with PBS containing 1% BSA for 1 h at 37 °C, serial dilutions of mouse sera were added to the plates and incubated for an additional 1 h at 37 °C. After washing 3 times with PBS containing 0,05% Tween-20, a horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse antibody (Sigma) was applied at a 1:7000 dilution. Following 1h incubation at 37 °C, plates were washed and substrate OPD (Sigma) was added for color development. Results were checked in an automatic reader (Multiscan) at 492 nm.

ELISA test from ORTHO also was used for analyses of immunized mice sera.

The overview of the results

The immunogenicity of HCV structural proteins core and E2 genes was assessed using DNA-vaccination before starting to construct recombinant plasmid on the base alphavirus vectors. Structural HCV proteins genes seem to be perspective as a source of the immunological antigens for the development of anti-HCV vaccine, especially when combination of two or more proteins with different immunological properties in one genetic construction is possible. HCV core and E2 structural proteins were chosen for our study. As known, HCV core protein is most highly conserved among several HCV strains isolated in different regions worldwide (for review see Alter, 1995, Krekulova, 2006). Antibodies to HCV core in the illness appears earlier than antibodies to others HCV proteins (Van der Poel et al., 1991). HCV E2 is a 70-kDa glycoprotein, which demonstrates large variation among HCV genotypes (Keck et al., 2004). HCV core protein and hypervariable region 1 (HVR1) of E2 protein have been shown to contain as B cells epitopes as T cell epitopes.

Design of chimeric E2/p7 containing plasmids. At first for the characterization of the immunogenicity of the E2/p7 gene plasmids containing the full-length HCV 1b E2/p7 gene and the modified version of E2/p7 were prepared. The E2/p7 cDNA of the Russian HCV 1b isolate 274933 RU (Mokhonov et al., 2002) with the engineered start and stop codons was cloned

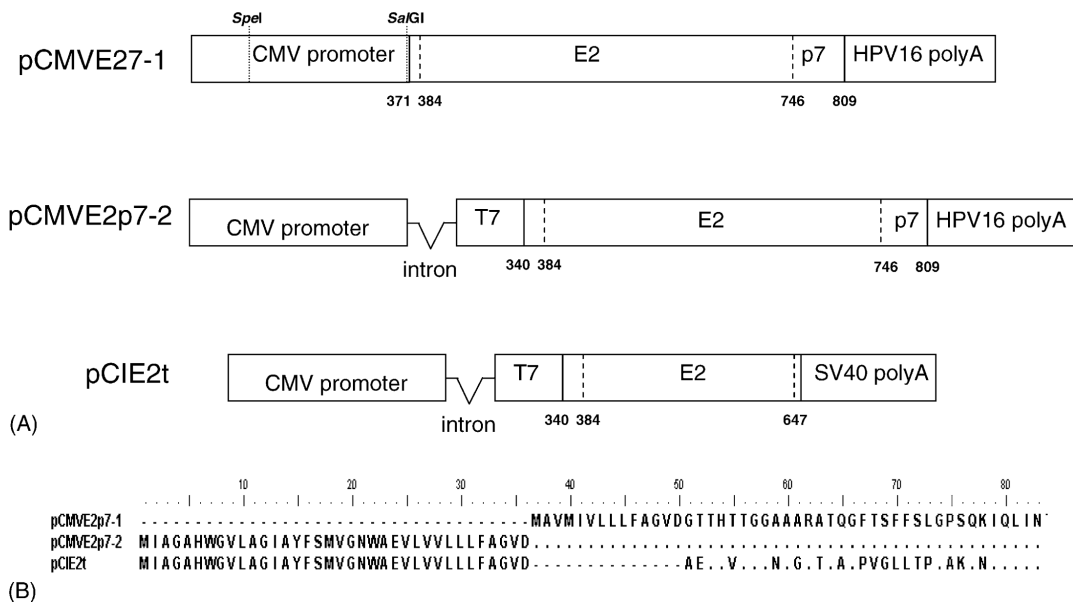


Fig.1. Schematic structure of E2 gene variants: E2/p7-1 encoding aa371–383 of E1, 384–745 of E2, and 746–809 of p7, all derived from 274933RU (pCMVE2/p7-1); E2/p7-2 encoding aa340–370 of E1 of HCV strain H followed by MAVM, and aa371–809 of 274933RU (pCMVE2/p7-2); a reference E2t gene encoding aa340–647 of HCV strain H (pCIE2t; Fournillier et al., 1999).

under the control of CMV IE promoter and HPV 16 polyadenylation signal to yield the E2/p7-1

gene. It encoded ATG, 13 C-terminal aa residues of E1 (aa 371–383), full length E2 and p7, and a stop codon (Fig. 1). To optimize E2/p7 expression, we exchanged a part of the CMV promoter, the 5-untranslated region and a part of the E1 sequence for the corresponding fragment of pCIE2t, an extensively characterized plasmid for HCV E2 gene immunization (Fournillier et al., 1999). The resulting E2/p7-2 gene encoded polyprotein constituted by the stop-transfer signal of E1 and two repeats of E2 signal sequence, one from pCIE2t (Fournillier et al., 1999) and the other from HCV 1b 274933 RU separated by a MAVM spacer, and followed by E2 and p7 of HCV 1b 274933 RU (Fig. 1).

Eukaryotic expression of HCV E2/p7. Expression of E2 variants was confirmed *in vitro* in rabbit reticulocytes (Fig.2) and *in vivo* in Cos-7 and HeLa cells (Figs.3 and 4). Several bands were observed after gel electrophoresis and *Western* blotting of cell lysates. Processing of the

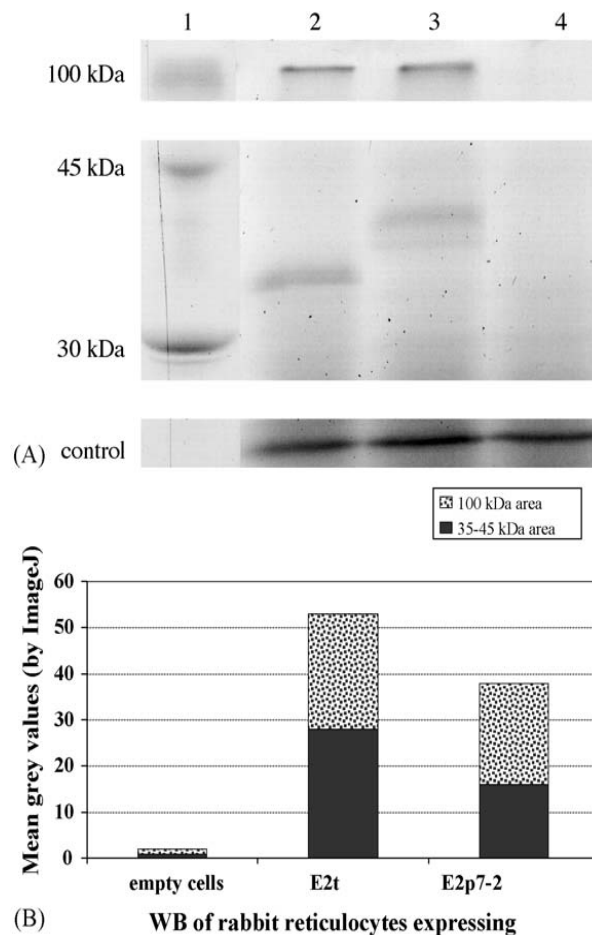


Fig.2. Analysis of *in vitro* expression of HCV E2. Autoradiography of 12% PAAG of cell lysates after transcription/translation of pCMVE2t (lane2); pCMVE2/p7-2 (lane3); mock transcription/translation (lane4); molecular mass marker (lane1) (A). Semi-quantification of E2 expression by autoradiogram scanning and image processing by Image J software (B). Areas scanned and compared are given on the top of the diagram.

translated E2/p7 polyprotein was observed *in vitro* that led to a cleavage between E2 and p7

generating 43.5 kDa protein (Fig.2, lane3).

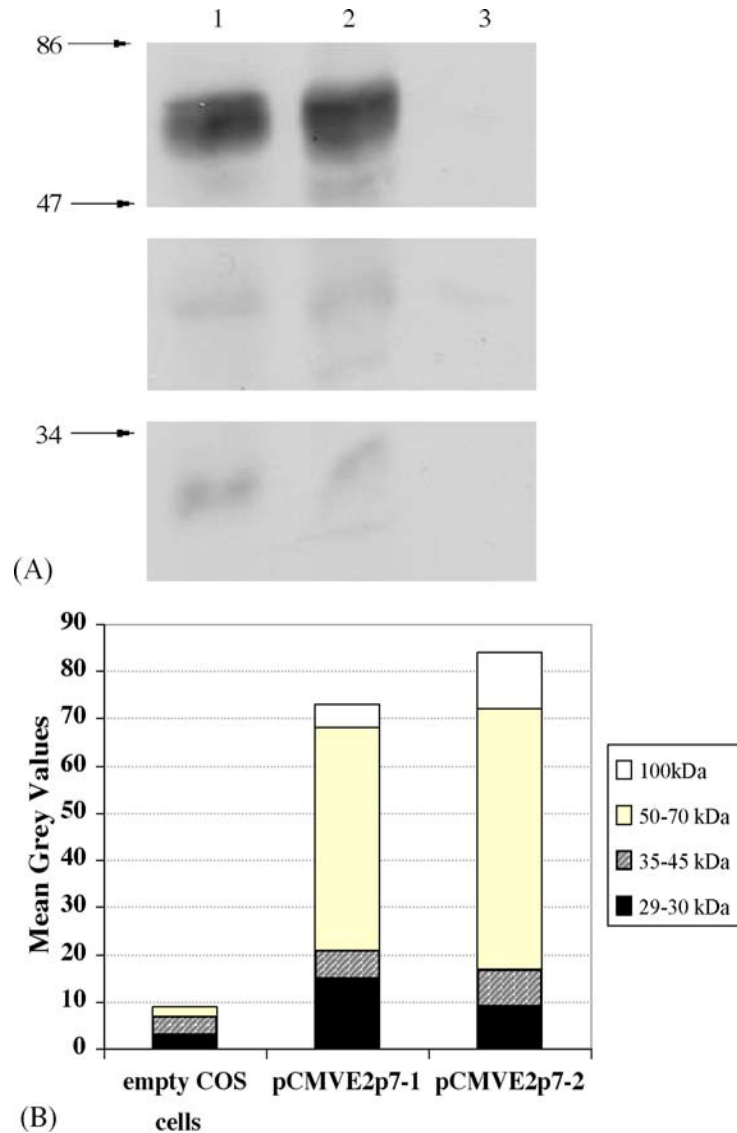


Fig.3. Analysis of expression of HCVE2 in Cos-7 cells. PAGE of cell lysates with subsequent and Western blotting using anti-E2 polyclonal rabbit antibodies and ECL detection of binding: transfection with plasmid pCMVE2/p7-1 (lane1), pCMVE2/p7-2 (lane2), untransfected cells (lane3) (A). Semi-quantification of E2 expression by X-ray film scanning and image processing using Image J software (B). Arrows to the left show position of molecular mass markers determining the selection of areas for scanning. Areas scanned and compared are given on the right side of the diagram.

Expression of E2t encoding C-terminus truncated E2 generated protein with expected molecular mass of 38.4 kDa (Fig.2, lane2). In transiently transfected Cos-7 cells, expression of E2/p7-1 and E2/p7-2 generated proteins with molecular mass of 50–70 kDa detected as diffuse bands specifically stained with anti-E2 rabbit polyclonal antibodies corresponding to different glycosylated forms of E2 (Fig.3, lanes 1 and 2). Additional minor band of 44 kDa could be attributed to non-glycosylated form of E2, and the shortest band of 30 kDa, to E2 degradation

products. Expression level of E2/p7-2 and E2t (Fournillier et al., 1999) genes was compared in the *in vitro* transcription–translation assay (as the respective plasmids carried the T7 promoter). Both directed similar levels of E2 expression (Fig.3B). The levels of E2 expression from E2/p7-1 and E2/p7-2 achieved in Cos-7 cells were also similar (Fig.3B). Immunofluorescence staining of HeLa cells expressing E2/p7 and the C-terminus truncated E2 (E2t using E2-specific polyclonal antibodies showed that E2 encoded by the E2/p7-1 variant was localized mostly in the rough ER (Fig.4A). E2 encoded by E2/p7-1 demonstrate defuse cytoplasmic staining similar to that of E2t (Fig.4B and C).

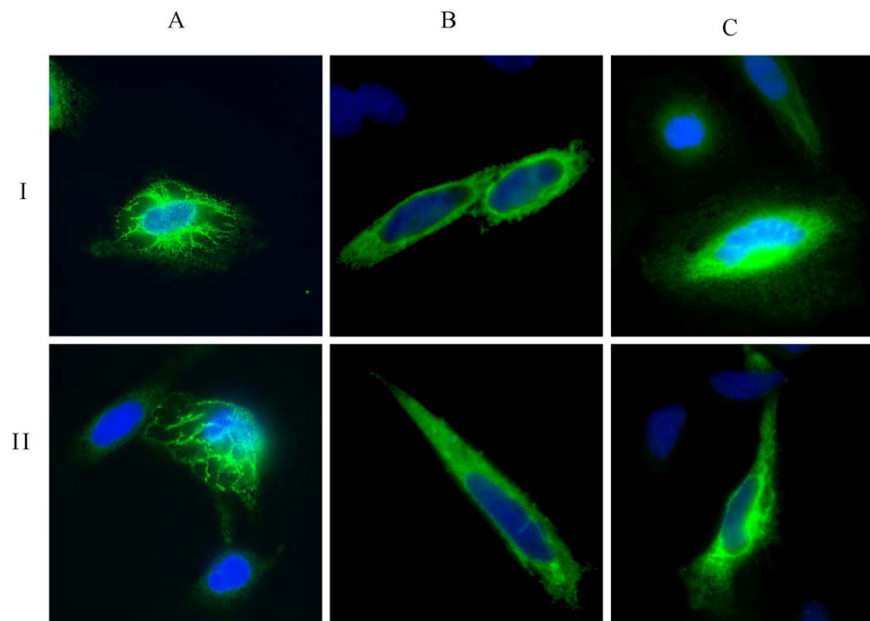


Fig.4. *Immunofluorescence staining of HeLa cells expressing E2 gene variants with E2-specific rabbit antibodies. HeLa cells transfected with pCMVE2/p7-1 (A, panels I and II); pCMVE2/p7-2 (B, panels I and II); pCMVE2t (C, panels I and II). Images are over lays of images captured for staining with secondary anti-rabbit FITC-conjugated antibodies, and for nuclear staining with DAPI.*

E2 gene immunization: antibody response. Balb/c mice were immunized intramuscularly with E2/p7-1, E2/p7-2, or E2t genes. Mouse sera collected 2 weeks post each plasmid injection was analyzed for the ability to recognize recombinant E2 and E2- and p7-derived synthetic peptides in indirect ELISA. Specificity and potency of antibody response are illustrated in Table1. Mice immunized with E2/p7-1 or E2t recognized peptides encompassing aa 492–526, and aa 512–546, but not the recombinant E2 protein. E2/p7-2 gene elicited antibodies reacting to peptides representing aa 399–411 (HVR1), 552–586 of E2, and 774–796 of p7, as well as the recombinant E2 (Table1). Immunization with full-length E2/p7 elicited antibodies against transmembrane domain 2 (TM2) at the C-terminus of p7, aa 774–796 represented by both linear and circular peptides (Table1). They occurred more of ten in mice immunized with E2/p7-

2 ($p < 0.05$; Table1). On the overall, mice immunized with E2/p7-2 demonstrated higher percent of seroconversion than mice receiving the genes for E2/p7-1 or E2t ($p < 0.05$).

Table 1. Antibody response against E2 and p7 proteins in the E2 gene-immunized H-2d mice

Mouse group immunized with	Specificity of antibody response against antigens ^a	Homology of antigen used for screening and the encoded E2/p7 sequence (%)		Average antibody titer in reactive mice	Responders, % (nn)	Overall % of sero-conversion in the group
		Identical aa	Homologous aa			
pCMVE2p7-1 (n=7)	492-526	80	92	8500	14 (1)	57 (4)
	512-546	72	92	4400±3300	28.5 (2)	
	774-796	100	100	7700	14 (1)	
	774-796c	91.7	91.7			
pCMVE2p7-2 (n=7)	E2	100	100	5500±3700	43 (3)	100 (7)
	399-411 (HVRC)	53.8	61.5	600±300	57 (4)	
	552-586	76	88	4000±3500	28.5 (2)	
	774-796	100	100	450±300	1000 (7)	
	774-796c	91.7	91.7			
pCIE2t (n=6)	381-394 (HVRN)	64	86	400	17 (1)	67 (4)
	399-411 (HVRC)	54	69	200	17 (1)	
	492-526	96	100	900	17 (1)	
	512-546	96	96	7000±1300	67 (4)	

E2 gene immunization: T-helper cell response. Splenocytes isolated from immunized mice were stimulated with E2-derived peptides. The highest stimulation indexes were reached at specific peptide concentration at approximately 10 mkg/ml (Fig. 5). The highest and broadest T-cell response in terms of proliferation was raised in mice immunized with E2p7-1 gene (Fig. 5).

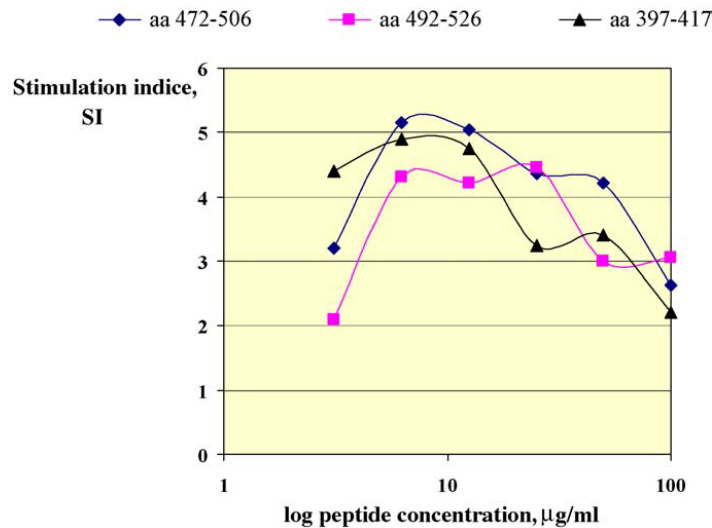


Fig.5. The degree of *in vitro* stimulation of pooled splenocytes of pCMVE2/p7-2-immunized mice by E2-derived peptides depends on the peptide dose. No stimulation/concentration dependence of stimulation is observed for the irrelevant control peptide (data not shown).

Responses in mice receiving the E2p7-2 gene were limited both in potency and number of recognized epitopes; and mice receiving E2t gene proliferated in response to a single epitope at

aa 472-506 of E2 (Fig.5).

T-cell proliferation was accompanied by secretion of IFN- γ , IL-2, and IL-4 (Fig.6). Immunization with the E2/p7-1 gene induced low levels of *in vitro* IL-2 and IL-4

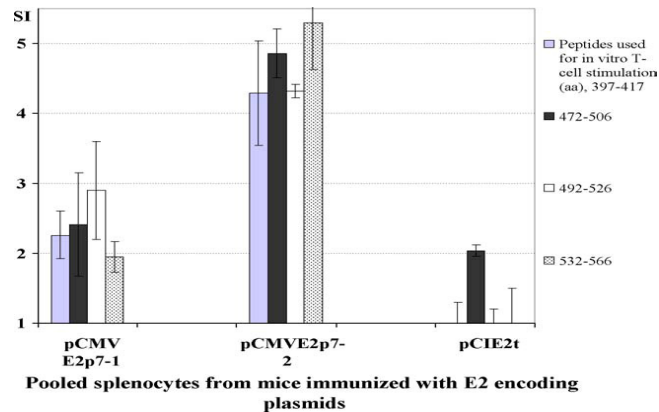


Fig.6. Mean stimulation indexes of pooled splenocytes of mice (three per group) 9 days after first injection of E2-encoding plasmids. Peptides identified at the bottom of the graph by first and last aa, were used for stimulation at 10 μ g/ml.

production, but almost no IFN- γ . Immunization with the E2/p7-2 gene induced T-cell response demonstrated by potent IFN- γ , IL-2 and IL-4 production that increased after the second plasmid injection (Fig.7). The E2t gene, on contrary, induced weak T-helper cell response, as indicated by a low-level IFN- γ production seen only after 2nd plasmid injection (Fig.7).

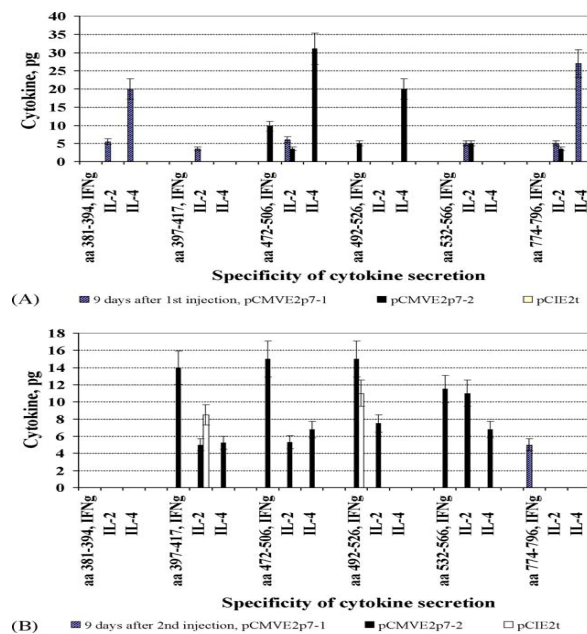


Fig.7. Specificity of *in vitro* cytokine secretion by the T-cells of E2 gene-immunized mice after stimulation with E2/p7-derived peptides 9 days after the 1st injection (A); 9 days after the 2nd injection (B). Peptides are identified at the bottom of the graph by first and last aa. Secreted cytokines: IFN- γ (1), IL-2 (2), and IL-4 (3).

Plasmids for expression of the HCV core gene. Several investigators have reported that

DNA immunization by HCV core can induce specific antibodies and specific CTL response against HCV core protein (Nakano et al., 1997). However, DNA vaccination in many cases is hampered by poor efficacy. Thus, various strategies are being developed to improve immune responses induced by DNA vaccines (Leitner et al., 1999). One of these approaches is optimization of antigens expressions. Increasing of antigens amount suggests evoking more vigorous immune response. In our study three plasmids constructed for expression of HCV core gene encoding aa 1-191 were used. The pCMVcore plasmid carried only HCV core gene. The pCMVcoreKozak plasmid contained HCV core gene with an adjacent Kozak consensus, in order to enhance translation of the appropriate mRNA. The pCMVcoreIRES plasmid carried HCV core with an adjacent 5'UTR sequence. The pcDNA3 plasmid encoding Hepatitis B surface antigen gene was used as a negative control. All plasmids were purified by standard protocols, in accordance with a GLP practice for preparation of DNA vaccines.

HCVcore protein translation *in vitro*. pCMVcore and pCMVcoreKozak recombinant plasmids were used as template for T7-driven mRNA transcription. Translation products of around 23 kDa and 21 kDa which corresponded to the expected molecular mass of the HCV core unprocessed and processed protein's forms, were obtained from both plasmid DNAs (Fig. 8). As expected, the translation level of the HCV core from pCMVcoreKozak mRNA was higher than the translation level from pCMVcore mRNA, because of Kozak sequence consensus insertion.

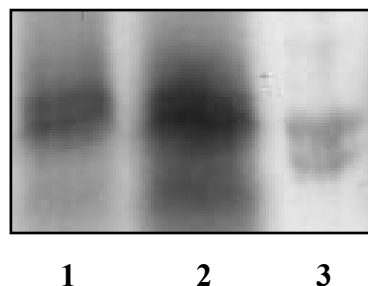


Fig.8. *In vitro* translation of HCV core mRNAs using the Rabbit reticulocyte Lysate System (Amersham Pharmacia Biotech). Core protein translation from RNA transcribed by T7 polymerase using plasmid pCMVcore as template (lane 1). Core protein translation from RNA transcribed by T7 polymerase using plasmid pCMVcoreKozak as template (lane 2). Protein translation from control RNA situated in the Rabbit reticulocyte Lysate System (lane 3).

HCV core protein gene expression *in vivo* in mammalian cells. Expression of core gene from plasmid pCMVcore, pCMVcoreKozak and pCMVcoreIRES was verified in Cos-7 and BHK-21 cells after transfection by purified plasmids. After 48-72 h of incubation, cells were lysated in Laemmli buffer. Cells lysates were analyzed using *Western*-blot. Syntheses of HCV core protein was shown in both cells cultures - as in BHK-21 cells as in Cos-7 cells, but the

effectiveness of core protein synthesis in the case of BHK-21 was higher (Fig.9, lane 2, 3). The considerable difference between levels of expression from pCMVcore and pCMVcoreKozak was obtained as in Cos-7 cells as in BHK-21 cells. Thus sufficient amount of core protein was

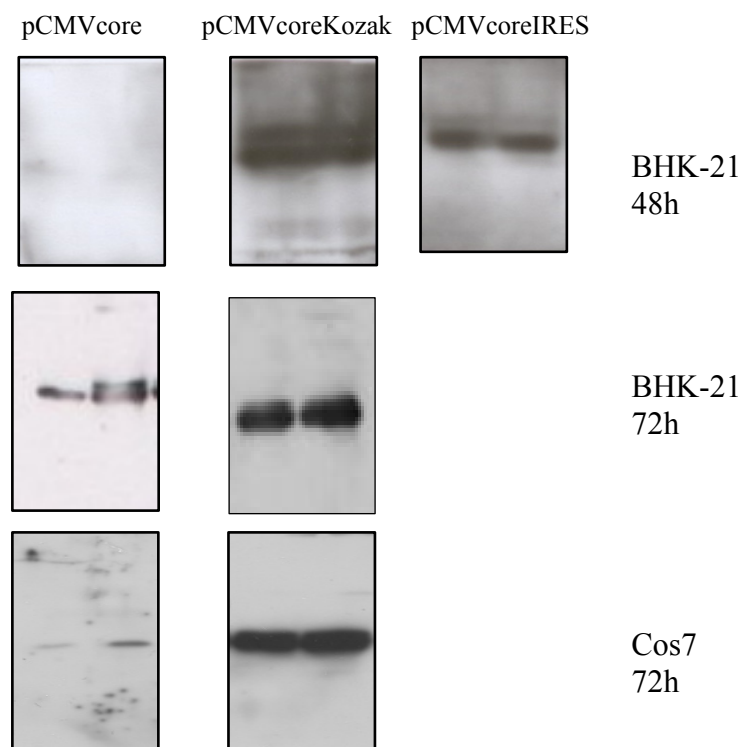


Fig.9. Expression of HCV core protein gene in BHK-21 cells at 48h and 72h after transfection and Cos-7 cells at 72h after transfection with 0,5 mkg plasmid DNA using different amount of lipofectamine in case of BHK-21 cells and ExGene 500 reagent in case of Cos-7 cells.

generated from pCMVcoreKozak and pCMVcoreIRES plasmids in BHK-21 cells already at 48 h post transfection, but in the case of transfection by plasmid pCMVcore the expression of core wasn't detected at 48 h post transfection (Fig.9, line 1). This difference can be explained by Kozak sequence presence in recombinant plasmid pCMVcoreKozak and 5'UTR sequence in plasmid pCMVcoreIRES. The role of Kozak sequence is critical for gene regulation. It is important component for efficient gene translation in eukaryotic cells.

Species of HCV core protein with molecular size 21 kDa and 23 kDa in the cells total lysate were identified. Both products can be observed only in the case of high expression level and major product was protein with molecular mass of 21 kDa. The C-terminal end of p23 amino acid 191 of the HCV polyprotein and p21 is produced as a result of processing between aminoacid 174 and 191. Matured form p21 of core protein was detected earlier and its quantity is considerable. Unmatured form p23 was appeared late and its amount can be different in different condition. Similar amounts of two HCV core protein's form were observed during expression of pCMVcoreKozak plasmid. In the same time in equivalent conditions from plasmid

containing polyprotein's core-E1-E2-p7 gene HCV core protein was synthesized mainly in form p21 and only insignificant amount of p23 form was detected (Fig.9, line1).

Immunocytochemical analysis of cells producing HCV core proteins from pCMVcoreKozak plasmid showed cytoplasmic, granular distribution of core protein in

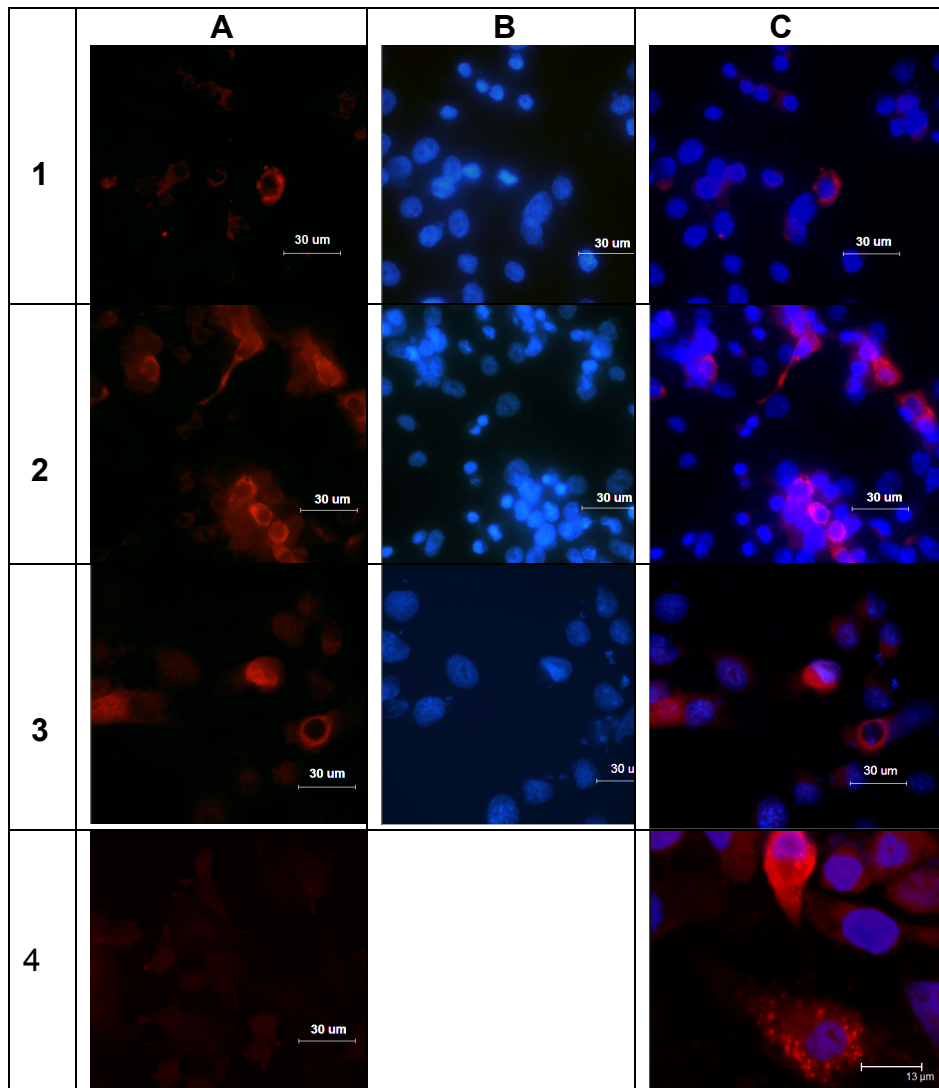


Fig. 2. Immunocytochemical detection of HCV core protein gene expressed in BHK-21 cells after transfection with pCMVcore (field 1), pCMVcoreKozak (fields 2, 4), pCMVcoreIRES (field 3). HCV core protein detected by rabbit polyclonal anti-HCVcore antibody 35-7 using TRITC-conjugated anti-rabbit immunoglobulin (IgG) as secondary antibody (A); nuclear staining by DAPI (B); merged of A and B (C); BHK-21 cells nonproduced HCV core protein after staining with polyclonal anti-HCV core rabbit antibody 34-7 and TRITC-conjugated anti-rabbit immunoglobulin (IgG) (A4). HCV core protein localizes in the cell cytoplasm. Fluorescent images with microscope Leica DM 6000 B and camera Leica DFC 480 (A1-4, B1-3, C1-3), confocal image with Leica TCS SP2 SE (C4).

the cells. Similar distribution was observed for HCV core protein produced from pCMVcore plasmid and from plasmid pCMVcoreIRES, but level of synthesis was lower and the amount of producing cells also was smaller (Fig.10).

HCV core gene immunization: antibody response. Fig. 11 shows humoral immune response in Balb/c mice immunized with pCMVcore, pCMVcoreKozak and pCMVcoreIRES plasmids, protein M220-25 or with plasmid pCMVcoreKozak for prime injection and M220-25 for boost. We bled animals on days 21 and 35. Specific antibody response was significantly higher at day 35. Response at day 21 was at the level given during immunization with empty vector, which we could consider as negative control. Highest anti-HCV core titers were demonstrated after DNA (pCMVcoreKozak) prime and protein M220-25 boost immunizations. Insertion of Kozak sequence had only slight influence on antibody response, whereas the positive influence had combination of Kozak sequence in a DNA vaccine against HCV with subsequent boost with analogous protein.

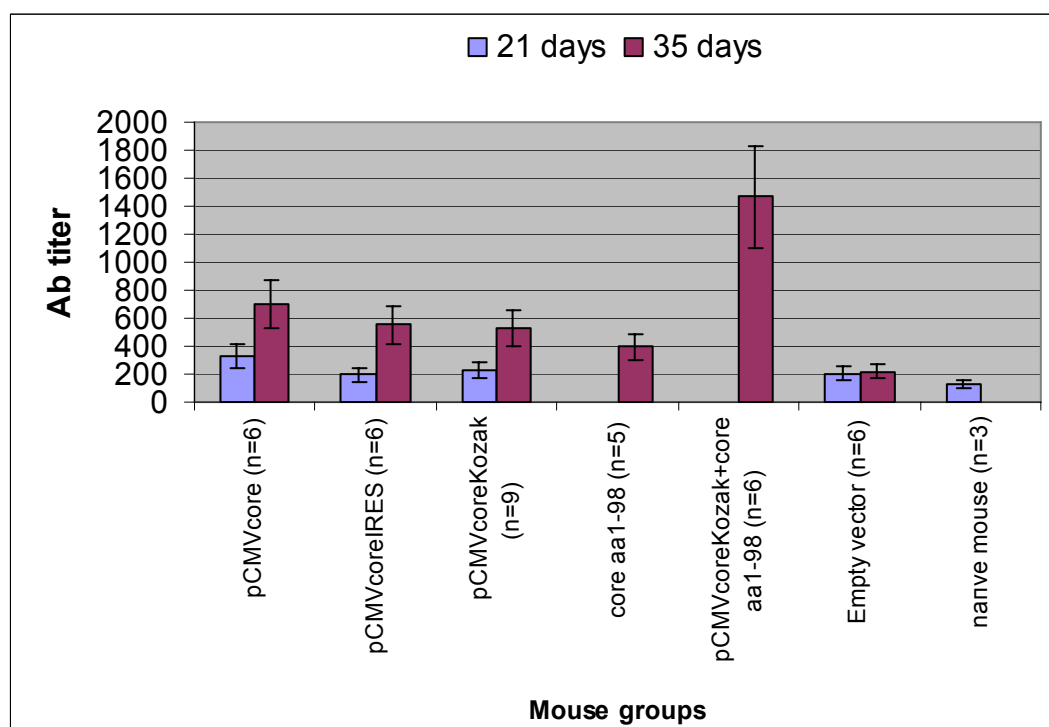


Fig.11. Anti-HCV core antibody titers at days 21 and 35 after Balb/C mice immunization. Serum antibodies were tested in ELISA for specific binding to protein M220-25 (HCV core aa 1-98).

HCV core gene immunization: T-cell proliferative responses. Stimulation was done with HCV proteins M220-25 (aa 1-98), M273-2 (aa 1-171) and HCV peptide MS94-44 (aa 133-142) (Fig.12). The level of proliferation was higher in all cases using as stimulator protein M273-2 and showed maximum for immunization with protein M220-25. If compare DNA immunizations the highest proliferation was achieved in case of immunization with pCMVcoreKozak prime and M220-25 boost, whereas plasmid pCMVcoreKozak alone gave the lowest proliferation.

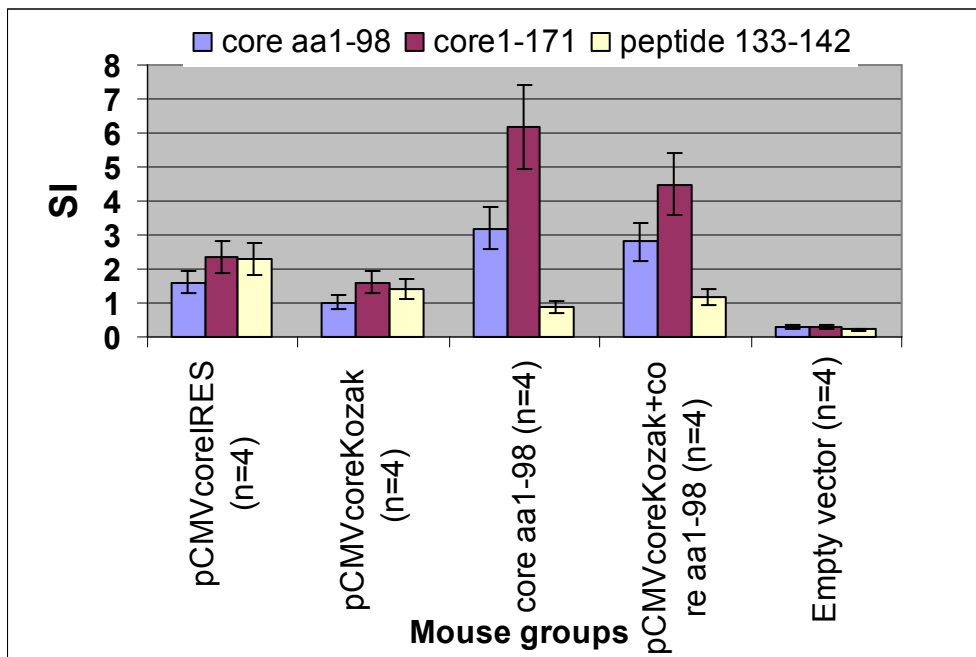
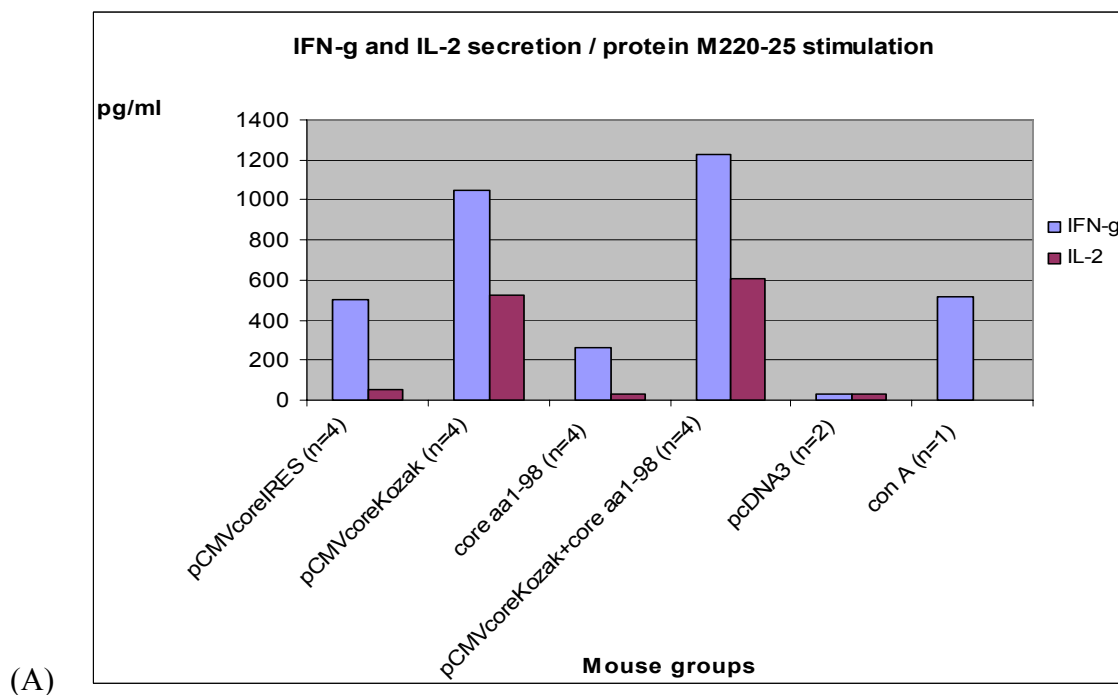


Fig.12. Stimulation indexes *in vitro* were calculated by use of recalling antigen (M220-25 and M273-2) or peptide MS94-44 with concentrations from 0.1 to 1.0 $\mu\text{g/ml}$.

Figures 13 A and B show direct measurements of the Th1 cell-derived cytokines IL-2 and IFN- γ . The most efficient production of IFN- γ and IL-2 was detected in case of immunization with pCMVcoreKozak prime and M220-25 boost, so these data follow to the proliferation response. All variants did not demonstrate IL-4 production.



(A)

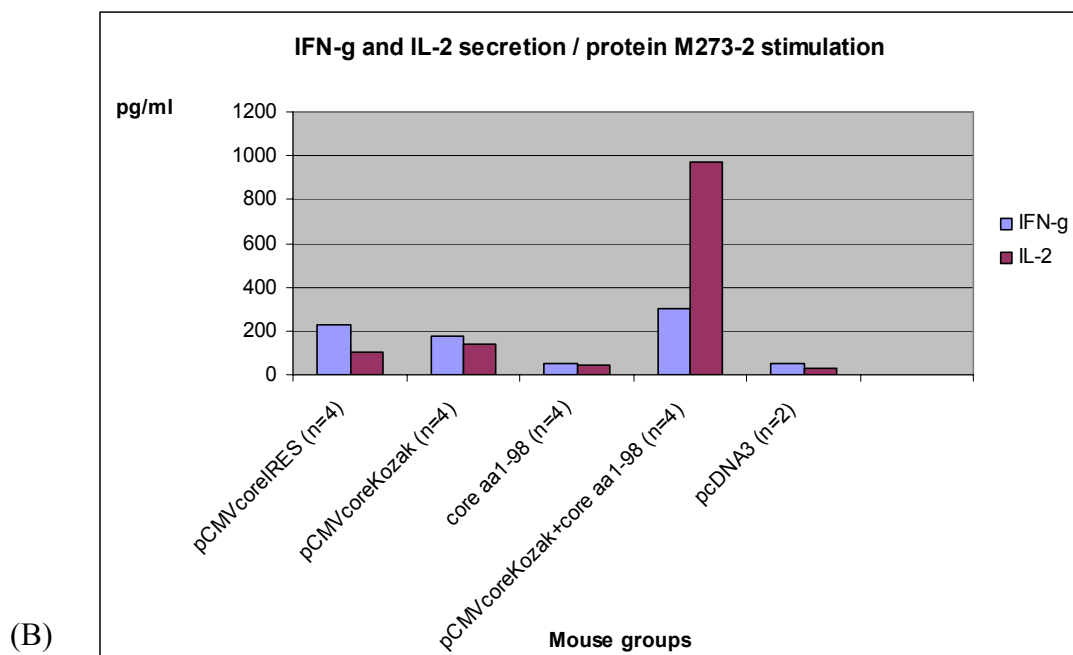


Fig.13. Cytokine production in Balb/C mice: against protein M220-25 (HCV core 1-98) (A); against protein M273-2 (HCV core 1-171) (B).

We investigated the role of intramuscular immunization Balb/C mice with recombinant plasmid DNA expressing HCV-core protein to induce potent HCV-core specific humoral and cellular immune responses. We have shown that better results might have been obtained if the Kozak sequence had been added to the gene, and we have shown that a boost injection of HCV core protein is capable to enhance the Th1-type immune response primed with this DNA vaccine. Antigen-specific IFN- γ and IL-2 production in spleen cell cultures was augmented one and a half- to fourfold by the protein boost compared to that for DNA vaccination, whereas immunization with HCV core protein alone only marginal levels of these Th1 cytokines, highlighting the power of heterologous prime-boost-regimen.

Generation of recombinant plasmids SFV and Sindbis virus based carrying HCV genes. In order to test ability of the SFV expression system for translation of HCV genes, we generated constructs expressing poly P (core-E1-E2-p7), HCV core and E2p7 genes (Fig. 14). DNA copies of poly P (core-E1-E2-p7), HCV core, and E2p7 genes were amplified and cloned in the pSFV1 expression vector under the control of the SFV subgenomic 26S promoter. Resulting plasmids pSFV1/HCVpolyP, pSFV1/HCV core, and pSFV1/HCV E2p7 were used as templates for *in vitro* transcription of the recombinant SFV region by SP6 RNA polymerase. Subgenomic RNAs carrying in our case different HCV sequences (depending on the construct) served as templates for translation of HCV genes.

Recombinant SFV particles were produced for each construct by simultaneous electroporation of cells with the subgenomic RNA of the appropriate constructs and helper SFV

RNA. BHK-21 cells, which were used in these experiments, are not natural host cells for HCV. However, they are optimal for infection with and production of recombinant SFV particles, allowing the highest yields of recombinant proteins.

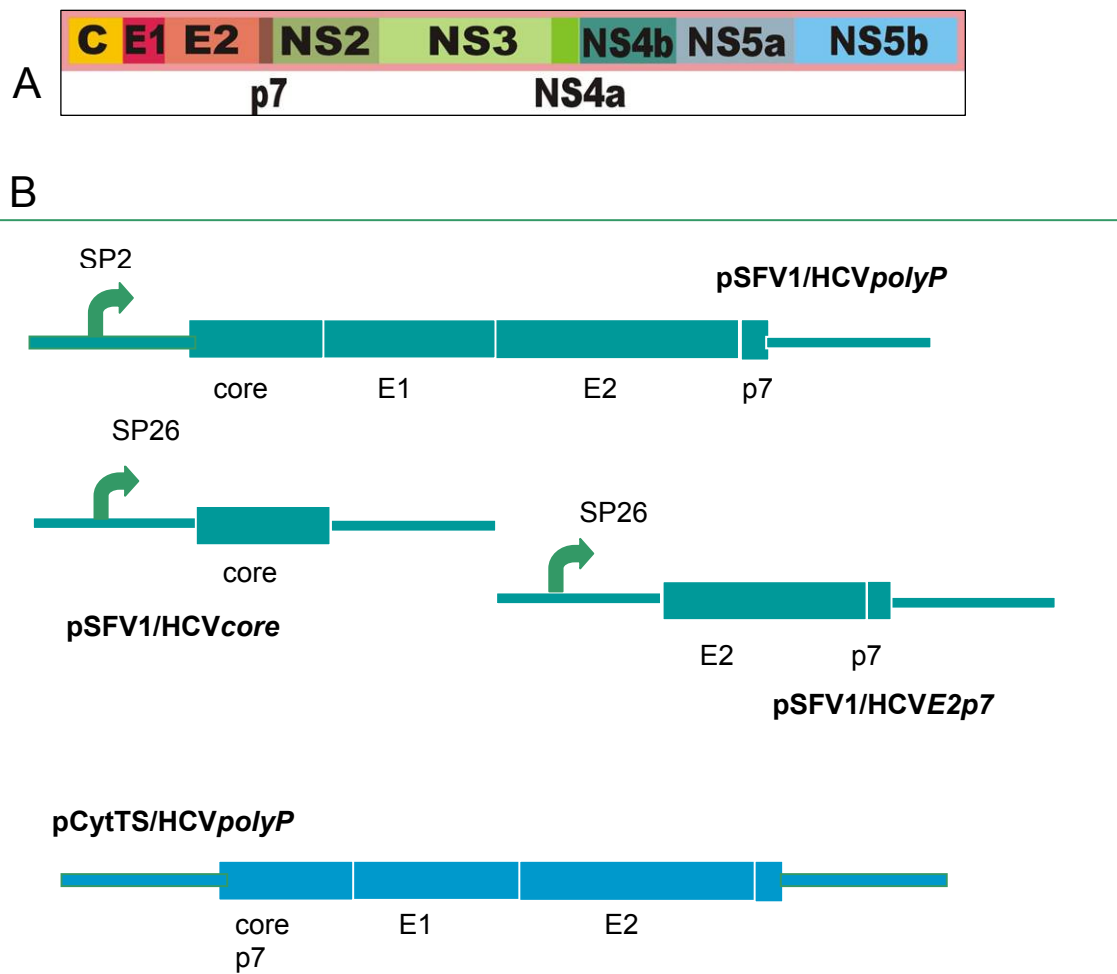


Fig.14. Schematic diagram of recombinant SFV-driven constructs for analysis of HCV proteins translation. HCV proteins: core, E1, E2 – structural proteins, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B -nonstructural proteins, p7 – small protein with unclear functions (A). HCV proteins genes used in this study for recombinant plasmids construction (B).

HCV polyP fragment encoding structural proteins and protein p7 was cloned also in pCytTS vector. The pCytTS is an expression vector based on Sindbis virus. The recombinant plasmid specified as pCyt/HCV polyP was used for transfection of BHK-21 cells in order to express HCV proteins using another alphavirus besides SFV (Fig.14).

We have used for our study the genotype 1b of HCV, because genotype 1 is widely distributed, and specifically genotype 1b predominates in Latvia and has been reported to be associated with higher HCV RNA levels, more advanced disease and a poor response to treatment (Tanaka et al., 1996; Kobayashi et al., 1996).

Expression of HCV genes in BHK-21 cells. HCV proteins presence were analyzed in BHK-21 cell lysate in 24h after transfection with recombinant RNA or infection with recombinant SFV viral particle. Pattern of proteins presented a band about 70 kDa corresponding to E2 protein, 33 and 35 kDa bands corresponding to major glycosylated forms of the E1 and bands corresponding to the HCV core (Fig.15, lane 3). The heaviest form of the HCV core was not detected in all experiments, probably because the level of protein production was not equivalent in different cases and minor forms of the HCV core protein remained undetectable. The molecular mass of proteins expressed from a construct that encoded the HCV core gene alone was identical to the molecular mass of the HCV core protein expressed from the construct, which encoded HCV structural proteins (Fig.15; Fig.16a).

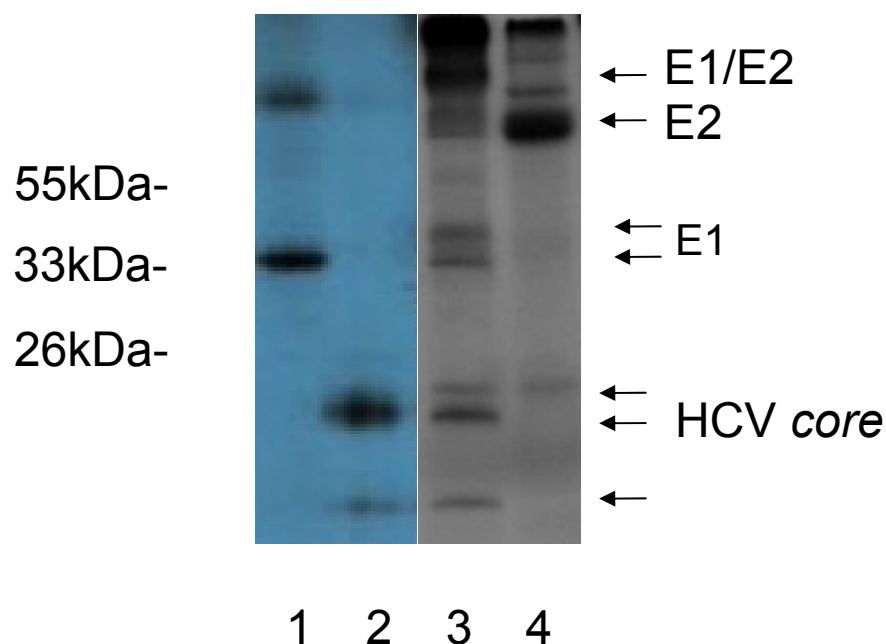


Fig.15. HCV structural proteins genes expression in BHK-21 cells after infection by recombinant viruses. BHK-21 cells lysate (NP-40 contained buffer) after infection by SFV1/EGFP as control (lane 1); BHK-21 cells lysate (NP-40 contained buffer) after infection by SFV1/HCVcore (lane 2); BHK-21 cells lysate (NP-40 contained buffer) after infection by SFV1/HCVpolyP (lane 3); BHK-21 cells lysate (NP-40 contained buffer) after infection by rSFV1/HCV E2p7 (lane 4). The Prestained Protein Molecular Weight Markers (Fermentas) was used as molecular mass markers.

Expression of HCV genes was analysed in BHK-21 cells also after transfection by pCyt/HCVpolyP plasmid. Cells were lysed at 72 h after termoinduction in lysis buffer containing NP-40 or in Laemmli buffer (Laemmli, 1970). Efficiency of expression of the HCV genes and immunological specificity of the corresponding proteins were demonstrated by Western blotting. Two species of HCV core protein with molecular mass 21 kDa and 23 kDa in the total cell lysate

were identified. Bands, which were observed under major p23 and p21 forms of HCV core protein, corresponded to HCV core form 16 kDa (Fig.16b).

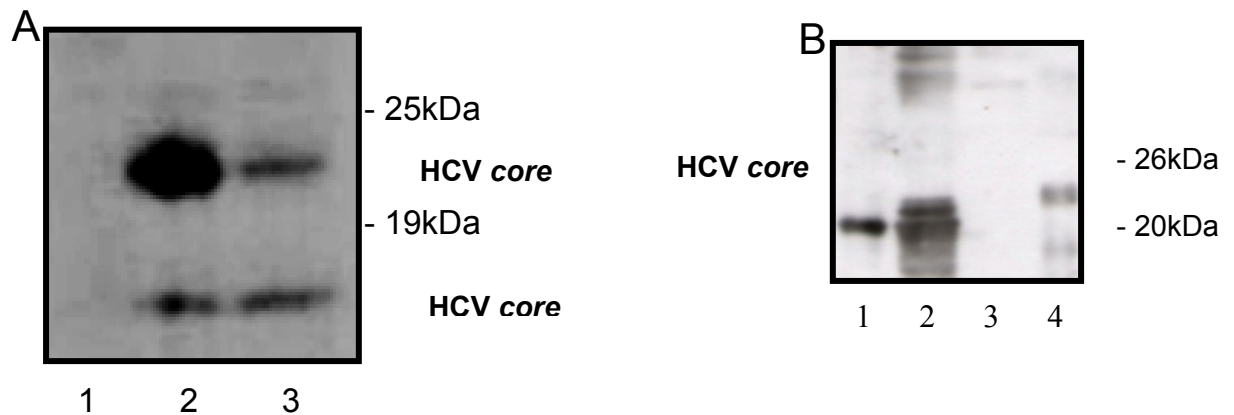


Fig.16. **HCV core protein gene expression in BHK-21 cells:** Western-blot with polyclonal anti-HCV core antibody from rabbit: (a) **HCV core protein gene expression in BHK-21 cells after infection by recombinant viruses rSFV1/HCVpolyP and rSFV1/HCVcore:** BHK-21 cells lysate (NP-40 contained buffer) after infection by SFV1/EGFP as control (lane1); BHK-21 cells lysate (NP-40 contained buffer) after infection by SFV1/HCVcore (lane 2); BHK-21 cells lysate (NP-40 contained buffer) after infection by rSFV1/HCVpolyP (lane 3). (b) **HCV core gene expression in BHK-21 cells after plasmid pCyt/HCVpolyP transfection by commercial kit (Fermentas):** Western-blot with polyclonal anti-HCV core antibody from rabbit. BHK-21 cells lysate (NP-40 contained buffer) after transfection by pCyt/HCVpolyP lysate (lane1); BHK-21 cells total lysate (Laemmli buffer) after transfection by pCyt/HCVpolyP (lane 2); negative control – noninfected BHK-21 cells lysate (Laemmli buffer) (lane3); purified recombinant HCVcore protein from *E.coli*-25 picomol (lane4). The Prestained Protein Molecular Weight Markers (Fermentas) was used as molecular mass markers.

E2 and E2p7 proteins presence was shown in BHK-21 cells lysates after infection by recombinant SFV1/HCV E2p7 and SFV1/HCVpolyP viruses (Fig. 17). Specificity of the E2 protein was confirmed by Western blotting, immunoprecipitation, and immunocytochemical analysis with corresponding anti-E2 antibodies. In our study, both protein patterns after infection with recombinant viruses were similar and E2 protein existed in glycosylated form of about 70 kDa (Fig. 17a). Different E2 proteins forms represented by glycosylated E2 (about 70kDa), ngE2p7 (41 kDa), and ngE2 (36 kDa) were concentrated from cells lysates after infection with recombinant SFV1/HCV E2p7 virus using immunoprecipitation with corresponding anti-E2 antibody (Fig.17b). Localization of the HCV E2 protein in the cytoplasm of infected cells was determined by immunocytochemical analysis (data not shown).

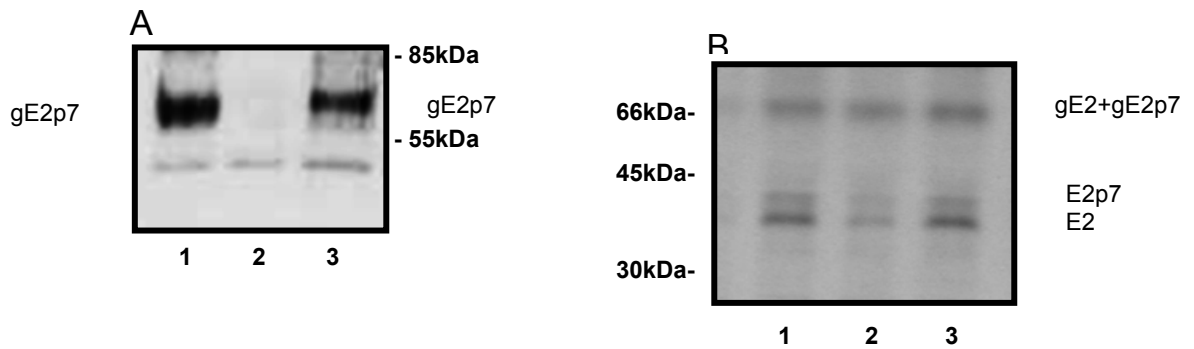


Fig.17. *HCV E2 protein gene expression in BHK-21 cells after infection by recombinant viruses SFV1/HCVpolyP and SFV1/HCVE2p7. (a)Western-blot with polyclonal anti-HCV E2 antibody from rabbit: BHK-21 cells total lysate (Laemmli buffer) after infection by SFV1/HCVpolyP (lane 1); negative control – noninfected BHK-21 cells lysate (Laemmli buffer) (lane 2); BHK-21 cells total lysate (Laemmli buffer) after infection by SFV1/HCV E2p7 (lane 3). (b)Immunoprecipitation of E2 and E2p7 proteins from cells lysates after infection by recombinant viruses SFV1/HCVpolyP and SFV1/HCVE2p7: Immunoprecipitation with different polyclonal rabbit anti-E2 antibodies (lanes 1,2,3). The Prestained Protein Molecular Weight Markers (Fermentas) was used as molecular mass markers.*

Imunocytochemistry data, imunoprecipitation from cell lysate and data of Western blot analysis with appropriate anti-core and anti-E2 polyclonal antibodies allowed us made such conclusions: recombinant viruses expressed high levels of HCV core and E2, which were authentically posttranslationally processed.

Localization of HCV core protein in the cells. Localization of the HCV core protein was monitored by immunocytochemical analysis using binding of polyclonal rabbit antibody to HCV antigens. Percentage of cells, which were stained positive, increased during the first 24 h post infection. In most cases, it reached a maximum in 24 h. For all constructs, the number of cells, which were stained positive, reached a value of up to 80%. HCV core protein was localized mainly in the cytoplasm, but its localization was different at different times post infection. In 4 h and 8 h after infection of cells with recombinant viruses, HCV core protein was found in cytoplasm only. In 16 h after infection, HCV core protein concentrated in perinuclear region. Only in 24 h after infection, about 15 % of the HCV core protein was found in the nucleus (Fig.18). However, correlation of each HCV core protein form with its localization was not established. At 4 h postinfection, only a p21 form was detectable in cell lysate. At 8 h postinfection, the p21 form and the same amount of a p23 form were detected in cell lysate.

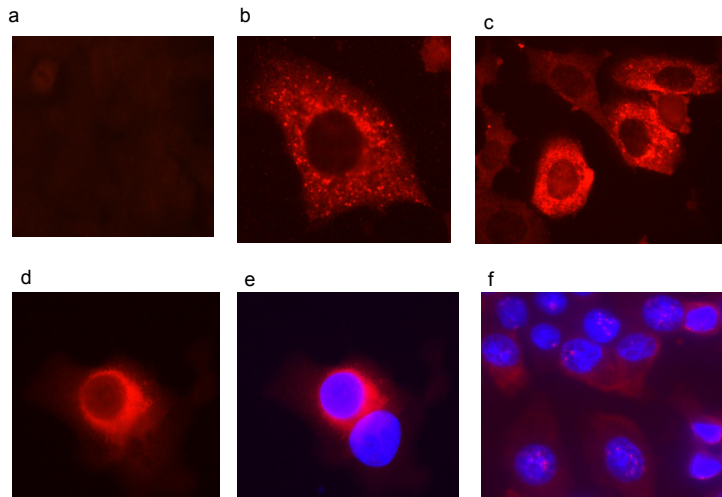


Fig.18. Immunocytochemical detection of HCV core protein gene expression. BHK-21 cells were infected with recombinant virus SFV1/HCVcore. Infected cells were stained with rabbit anti-HCV core antibodies (1:1000) and secondary anti-rabbit TRITC-antibodies (1:100). (a). Noninfected BHK-21 cells stained with rabbit anti-HCV core antibodies (1:1000) and secondary anti-rabbit TRITC-antibodies (1:100). (b). The core protein's distribution at 4 hours post infection; (c). The core protein's distribution at 8 hours postinfection; (d). The core protein's distribution at 16 hours postinfection; (e). The core protein's distribution at 16 hours postinfection. DAPI was used for nucleus's visualization; (f). The core protein's distribution at 24 hours postinfection. DAPI was used for nucleus's visualization. Microscopy at Leika DM 6000 B.

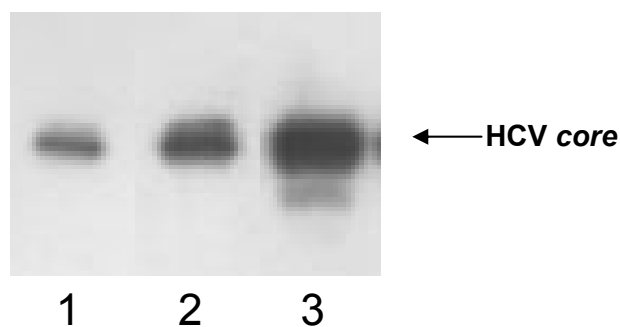


Fig.19. HCV core protein gene expression in BHK-21 cells after infection by recombinant virus SFV1/HCV core at different time postinfection: different forms of HCV core proteins detection by Western-blot with polyclonal anti-HCV core antibody from rabbit. HCV core protein p21 form in BHK-21 cells total lysate (Laemmli buffer) at 4 hours post infection (lane 1); HCV core protein p21 form and some amount of p23 form in BHK-21 cells total lysate (Laemmli buffer) at 8 hours post infection (lane 2); HCV core protein p21 form, p23 form and p16 in BHK-21 cells total lysate (Laemmli buffer) at 24 hours post infection (lane 3). The Prestained Protein Molecular Weight Markers (Fermentas) was used as molecular mass markers.

The smallest form of the HCV core protein of p16 kDa was detected at 24 h postinfection only (Fig.19).

Assembly of HCV structural proteins. To assess the ability of HCV structural proteins to be associated into virus-like particles, clarified cell lysates after infection with recombinant viruses pSFV1/HCVpolyP or pSFV1/HCVcore (or electroporation by the corresponding RNAs) were subjected to centrifugation through a sucrose cushion. The pellets were dissolved in TNE buffer and analyzed by Western blotting for two HCV structural proteins: core and E2. Both proteins were found in pellets (data not shown). Viral HCV particles were visualized by electron microscopy. First, HCV core particles of 35-37 nm in diameter were detected after infection with SFV1/HCVpolyP recombinant virus or SFV1/HCVcore (Fig. 20a, b). HCV-like particles with a diameter of 60 nm formed by HCV structural proteins were observed in the cells infected with SFV1/HCVpolyP recombinant virus (or electroporated with the corresponding RNAs), but the number of such particles in cell lysates was low (Fig. 20c).

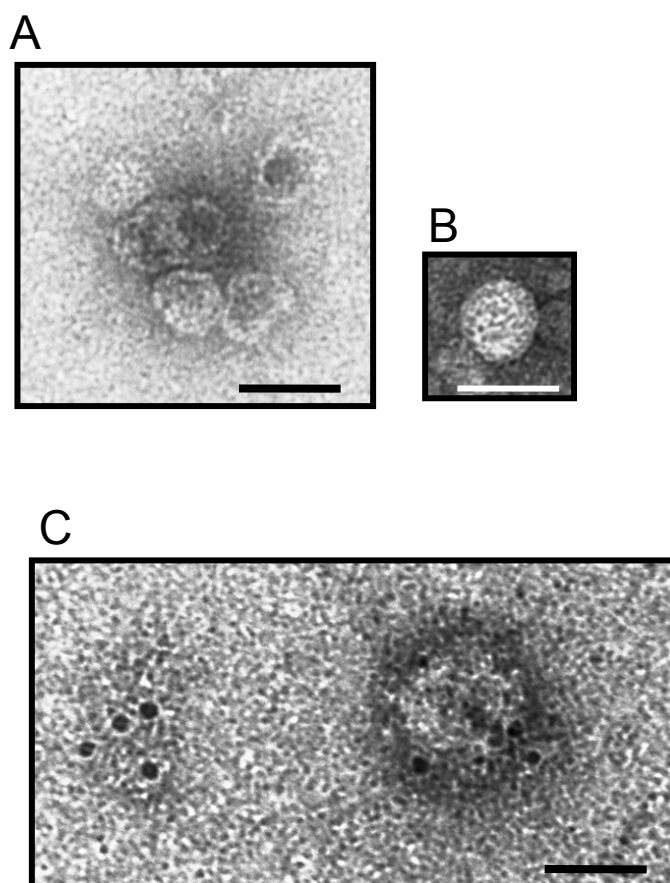


Fig.20. Electron microscopy of purified HCV-like particles. (a) HCV core particles in the NP-40 containing lysate of SFV1/HCVcore-transfected cells; (b) HCV core particle; (c) Immunogold labeling of HCV-like particles with anti-E2 polyclonal antibodies. The bar represents 50 nm.

Blanchard's EM observation in similar experiments also show that only a few particles were fully released from ER membrane of cells (Blanchard et al., 2002, 2003a, 2003b). Probably,

some host-cell factors are necessary for HCV-LP releasing and this SFV based model provides an opportunity to identify potential role in HCV-like particles morphogenesis of viral elements, such as the p7 or 5' NTR RNA and/or host-cell factors. Thus, HCV-like particles obtained in SFV expression system may serve, after optimization, as a useful tool for development of tissue culture model of HCV infection, for a better understanding of the mechanism of HCV assembly, and for the study of HCV morphogenesis. Moreover, the HCV proteins in HCV-like particles presumably are presented in a native, virion-like conformation and therefore represent excellent candidates for an HCV vaccine.

Mice immunization by recombinant viruses: antibody response. Balb/c mice were immunized with recombinant pSFV1/HCVcore, pSFV1/HCVpolyP, or pSFV1/EGFP viruses. Two groups were immunized with each virus (one – subcutaneous, second - intravenous). Mice sera collected each weeks post virus injection was analyzed for the ability to recognize

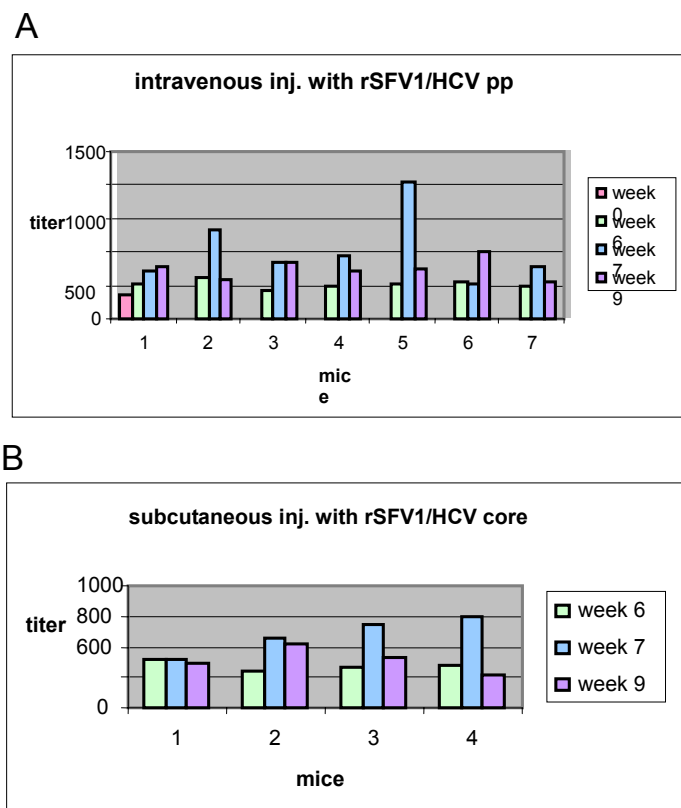


Fig.21. Anti-HCV core antibody titers at days 42 and 49 after Balb/c mice immunization. Serum antibodies were tested in ELISA for specific binding to protein M220-25 (HCV core aa1-98): A. Anti-HCV-antibody titers after mice immunization with recombinant SFV1/HCVpolyP virus in tail vein; B. Anti-HCV-antibody titers after mice immunization with recombinant SFV1/HCV core virus subcutaneous.

recombinant core and synthetic peptides in ELISA. Significant level of anti-HCV core antibodies was detected only for some mouse in each group. Obtained results indicate that maximal

response was shown at day 42 (1 weeks after the boost) and at day 49 (2 weeks after the boost). The antibodies titers were always higher in the case of intravenous immunization (Fig. 21 A, B).

Received data can solve as base ground for further study of recombinant alphaviruses carrying HCV structural protein genes as possible candidates for developing anti-HCV vaccine. It shows that necessary to optimize scheme of immunization. We supposed that using heterologous prime-boost regimens help to enhance of immune response after immunization and intend to combine immunization with recombinant SFV virus particles and DNA immunization, or immunization with HCV-like particles or chimeras HCV particles.

Concluding remarks

- We have chosen for our study HCV E2 and HCV core protein genes as more representative immunogens. First we assessed the immunogenicity of these HCV structural protein genes using DNA vaccination. Three variants of plasmids containing E2 protein gene were constructed for mouse immunization and immune response evaluation. Three plasmids containing HCV core protein genes in different context under CMV promoter were also synthesized for this propose.
- In its capacity to induce both B- and T-cell responses in Balb/c mice, full-length E2/p7 gene with extended E2 signal sequence (E2/p7-2) was superior to both E2/p7 with only the C-terminal part of the E2 signal sequence (E2/p7-1), and to the reference E2 gene encoding the truncated version of E2 with the C-terminal part of the E2 signal sequence but devoid of the p7 stop-transfer signal. Manipulation with the E2 signal sequence afforded increased immunogenicity through preservation of the full-length E2 and p7 sequences without the aid of external/heterologous signals, a feature important for achieving a multi-specific anti-HCV immune response.
- It was shown that introduction of the Kozak consensus sequence stimulated markedly the synthesis of the HCV core *in vitro* translation system and in cultivated cell lines, but no visible effect was detected in efficiency of immune humoral and cellular immune responses by DNA immunization. DNA prime with protein boost immunization regimen was found most efficient in induction of HCV core-specific immune responses.
- In order to test ability of the SFV expression system for translation of HCV proteins, we generated recombinant SFV-based constructs expressing poly P (core-E1-E2-p7), HCV core and E2p7 genes. Recombinant SFV particles were produced for each construct and used for infection of BHK-21 cells. HCV polyP fragment encoding structural proteins and protein p7 was also cloned into the pCytTS vector system. The recombinant plasmid herein referred to as pCyt/HCV polyP was used for transfection of BHK-21 cells in order to express HCV proteins.
- High level expression of authentic posttranslationally processed HCV core and E2 proteins have been provided in cell culture by using recombinant alphaviruses. Specificity of HCV core and E2 proteins were confirmed by immunocytochemical data, immunoprecipitation from cell lysates, and Western blot analysis with appropriate anti-core and anti-E2 polyclonal antibodies.
- Electron microscopy analysis revealed the formation of homogeneous HCV core-like particles of 35-37 nm in diameter (Fig.7a, b). Moreover, HCV-like particles with the diameter of 60 nm also were observed. This finding confirmed once again the ability of

correct processing of the HCV proteins in alphaviral expression systems and the results of the current study have demonstrated the principal possibility of using HCV-like particles on the basis of recombinant alphaviruses for creation of a new type of HCV immunogen. Further work is required before conclusions on the perspectives of this approach are to be made.

- Recombinant pSVF1/HCVcore, pSVF1/HCVpolyP viruses were used for mice immunization. The antibodies titers in sera of immunized mice were assessed. Data herein can serve as a foundation for further study of recombinant alphaviruses carrying HCV structural protein genes as candidates for an anti-HCV vaccine. These additional efforts should be directed toward optimization of the immunization.

Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrs

**Uz alfavīrusu rekombinanto replikonu pamata izveidotā HCV
prototipa vakcīna**

Autors: Jekaterina Aleksejeva

Darba vadītāja: Dr.habil.biol. Tatjana Kozlovska,
LBMC, Rīga, Latvija



Publikāciju kopa

**Bioloģijas fakultāte
Latvijas Universitāte
Rīga, 2008**

Kopsavilkums

Sakarā ar HCV ģenētisko mainīgumu un spēju pielāgoties atslāpēšanas spiedienam, kuru rada, piemēram, imunoloģiskā atpazīšana un pretvīrusu terapija, līdz šim brīdim neeksistē efektīvas terapeitiskās un profilaktiskās anti-HCV vakcīnas. Par nelaimi, HCV bioloģijas pētījumus apgrūtina efektīvas un uzticamas *in vitro* sistēmas trūkums vīrusa pavairošanai.

Alfavīrusi to augstā ekspresijas līmeņa, plašā saimniekšūnu spektra un citoplazmatiskās replikācijas dēļ nodrošina iespēju izveidot modeļa sistēmu HCV pētīšanai šūnu kultūrā. Semliki Forest vīruss (SFV) (Liljestrom & Garoff, 1991) un Sindbis vīruss (Xiong et al., 1989) ir alfavīrusu ekspresijas sistēmu piemēri, kas visplašāk izmantoti piedāvāto ģenētisko vakcīnu izstrādei, kurām ir augstāka efektivitāte par tradicionālajām ģenētiskajām vakcīnām.

Promocijas darba mērķis ir jauna tipa anti-HCV vakcīnu kandidātu izveidošana, pamatojoties uz vispārēju koncepciju, ka viens vai vairāki HCV strukturālie gēni tiek inkorporēti vīrusa – nesēja (mūsu gadījumā, SFV un Sindbis vīrusi) genomā, nodrošinot imunogēno struktūru amplifikāciju un ekspresēšanu. Lai sasniegtu šo mērķi, ievietošanai ekspresijas vektoros tika izvēlēti HCV kora proteīna, E2 proteīna gēni un poliP kodējošs genoma fragments (apvienoti core-E1-E2-p7 gēni). Katrai konstrukcijai tika izveidotas atbilstošas rekombinantas SFV daļiņas, kuras izmantoja BHK-21 šūnu inficēšanai. HCV polyP fragmentu, kas kodēja strukturālos proteīnus un proteīnu p7, ieklonēja arī pCytTS (izveidotā uz Sindbis vīrusa pamata) vektorā. Rekombinantā plazmīda pCyt/HCV polyP tika izmantota BHK-21 šūnu transficēšanai, lai ekspresētu HCV proteīnus. Izmantojot rekombinantos alfavīrusus, šūnu kultūrā bija paredzēts augstā līmenī ekspresēt autentiski posttranslacionāli procesētus HCV kora un E2 proteīnus. HCV kora un E2 proteīnu specifiskumu apstiprināja ar imunocitoķīmiskajiem datiem, imunoprecipitāciju no šūnu lizātiem un *Western blotu* ar atbilstošām anti-kora un anti-E2 poliklonālajām antivielām. Ar elektronu mikroskopijas palīdzību pierādīts, ka veidojas homogēnas HCV kora veidīgas 35-37 nm daļiņas un HCV līdzīgas daļiņas, kuru diametrs bija 60 nm. Rekombinantie pSFV1/HCVcore un pSFV1/HCVpolyP vīrusi tika izmantoti peļu imunizācijai, un, pamatojoties uz imunizācijas datiem, tika izstrādāta nākošo eksperimentu stratēģija. HCV kora un E2 strukturālo proteīnu imunogenitāte tika novērtēta arī pēc DNS imunizācijas datiem.

Šajā darbā aprakstītās modeļsistēmas var izmantot tālākajiem HCV dzīves cikla un bioloģijas pētījumiem, izmantojot rekombinantos alfavīrusus, kuros ievadīti HCV gēni, un izveidot rekombinantus vīrusus kā jauna tipa efektīvas vakcīnas.

Darba aktualitāte

Vīrusu hepatīts C, kuru izraisa HCV, ir nozīmīgākā vispasaules veselības problēma, jo vairāk par 3% no visiem pasaules iedzīvotājiem ir inficēti ar šo vīrusu (Thomson et al., 2005). Patlaban ārstēšanā izmanto pegilēto interferonu un ribavirīnu, bet iznākums ir neapmierinošs, jo tikai 42% pacientu, kas ir inficēti ar 1. genotipa HCV, pozitīvi reaģē uz ārstēšanu (Saracco et al., 2003). Tādēļ ir akūta vajadzība izstrādāt efektīvu anti-HCV vakcīnu. Par nelaimi, tās izstrādi nopietni apgrūtina atbilstošas eksperimentālas sistēmas trūkums. Vienīgais dzīvnieks, kuru droši var inficēt ar HCV, ir šimpanze, bet ētisku iemeslu, augsto izmaksu un grūtību strādāt ar lieliem dzīvniekiem dēļ to izmantošana šādiem mērķiem ir ierobežota. Tomēr, lielākās problēmas HCV pētījumos rada šūnu kultūras trūkums, kurā varētu veikt efektīvu un drošu vīrusa pavairošanu. HCV molekulāro mehānismu pētīšanas modeļsistēmai jānodrošina pilnvērtīga informācija par hepatīta C patoģenēzi un terapiju.

Nesenie atklājumi vakcinoloģijā ir saistīti ar vakcīnas antigēnu kodējošu nukleīnskābju izmantošanu, kuru vispārēji nosauc par ģenētisko vakcinēšanu. Šāda ģenētiskā vakcinēšana piedāvā drošāku un izmaksu ziņā efektīvāku alternatīvu tradicionālajām vakcīnām. Šādu vakcīnu varētu izmantot gadījumos, kad tradicionālās vakcīnas izmantošana izrādījusies neefektīva. Ģenētiskās vakcīnas visumā ir lētas, un tās ir viegli saražot. Vairākās modeļsistēmās ir pierādīts, ka tās ir imunogēnas un efektīvas. Daži šādu vakcīnu tipi izmanto šo vienpavedienu RNS vīrusu genomus un nodrošina efektīvu klonēto gēnu ekspresiju transficētajās šūnās.

Alfavīrusi – Semliki Forest vīruss, Sindbis vīruss un Venecuēlas zirgu encefalīta vīruss – ir izmantoti par tradicionālajām ģenētiskajām vakcīnām efektīvāku piedāvāto ģenētisko vakcīnu izstrādē (Xiong et al., 1989, Liljeström & Garoff, 1991, Pushko et al., 1997, Fleeton et al., 2000). Promocijas darba mērķis ir jauna tipa anti-HCV vakcīnu kandidātu izveidošana, pamatojoties uz vispārēju koncepciju, ka viens vai vairāki HCV strukturālie gēni tiek inkorporēti vīrusa – nesēja (mūsu gadījumā, SFV un Sindbis vīrusi) genomā, nodrošinot imunogēno struktūru amplifikāciju un ekspresēšanu. Šī sistēma tās augstā ekspresijas līmeņa, plašā saimniekšūnu spektra un citoplazmatiskās replikācijas dēļ nodrošina unikālu iespēju šūnu kultūrā, izmantojot rekombinantus alfavīrusus, kuros ievadīti HCV gēni, pētīt HCV dzīves ciklu un bioloģiju un izmantot rekombinantus vīrusus kā jauna tipa efektīvas vakcīnas (Caley et al., 1997, Leitner et al., 1999).

Promocijas darba mērķis

Promocijas darba mērķis ir izstrādāt jaunas HCV vakcīnas prototipu un eksperimentālo modeli HCV dzīves cikla pētījumiem. Lai sasniegtu šos mērķus, tika uzstādīti šādi uzdevumi:

- raksturot HCV kora proteīna gēna imunogenitāti pelēs (izmantojot DNS vakcināciju);
- raksturot HCV E2 proteīna gēna imunogenitāti pelēs (izmantojot DNS vakcināciju);
- radīt rekombinantus alfavīrusus (uz SFV vai Sindbis vīrusa pamata izstrādātus), kuros ievadīti HCV proteīnu gēni;
- izstrādāt modeļa vīrusa sistēmu, ar kuru šūnu kultūru sistēmā varētu veikt efektīvu un drošu HCV gēnu ekspresiju;
- iegūt HCV-veidīgās daļiņas, izmantojot šūnu inficēšanu ar rekombinantajiem alfavīrusiem;
- novērtēt HCV proteīnu gēnus saturošo rekombinanto SFV vīrusu spēju radīt imunoloģisko atbildi pelēs.

Ieskats HCV pētījumos, izmantojot uz vīrusu pamata izstrādātās ekspresijas sistēmas

Visā pasaulē ir apmēram 200 miljoni hronisku HCV gadījumu. Hepatīta C vīrusa (HCV) infekcijai ir raksturīga izteikta vīrusa izturība, hroniska aknu sasilšana un ārkārtēja vīrusa mainība. HCV dzīves cikla izpēte ir apgrūtināta apmierinošas šūnu kultūras sistēmas trūkuma dēļ, jo HCV kultivējamās šūnās efektīvi nereplicējas. Tikai nesen šai jomā tika sasniegts būtisks izrāviens, kas saistīts ar infekciju saistītu šūnu kultūru sistēmu un dažu replikonu sistēmu izstrādi (Lohmann et al., 1999, Yi et al., 2006). Tomēr, neskatoties uz šiem sasniegumiem, līdzīgas sistēmas ar citiem HCV celmiem ir grūti izveidot. Bet molekulāro mehānismu pētījumiem jānodrošina pilnvērtīga informācija par hepatīta C patogēnēzi un terapiju. Detalizēti pētījumi par vīrusa proteīnu funkcijām un precīzi HCV replikācijas mehānismi ir būtiski antivirālās ārstēšanas izstrādē.

Vienkāršotu HCV replikācijas ciklu var izklāstīt šādi:

- 1) piesaistīšanās pie saimniekšūnas un iekļūšana tajā;
- 2) vīrusa pozitīvā pavediena RNS atbrīvošana;
- 3) atklātās nolasīšanas fāzes translēšana un poliproteīna procesēšana;
- 4) replikāzes kompleksa izveidošanās;
- 5) nākošās paaudzes pozitīvā pavediena RNS sintēze caur negatīvā pavediena RNS starpproduktiem;
- 6) jaunu vīrusa daļiņu veidošanās, kuras, droši vien, iegūst savu apvalku endoplazmatiskā tīkla lūmenā;
- 7) nākošās paaudzes vīrusu atbrīvošanās caur Goldži kompleksu.

Visi šie procesi norit citoplazmā, kur HCV proteīnus atrod ciešā saistībā ar intracellulārajām membrānām (Pietschmann et al., 2001). Principā, katrs HCV dzīves cikla posms var būt par mērķi pretvīrusu iedarbībai.

Piemērota šūnu modeļa trūkums HCV pavairošanai noved pie tā, ka tiek izmantotas dažādas heterologās ekspresijas sistēmas. Kā piemērs ir minama bakulovīrusu – insektu šūnu sistēma, kas izrādījās piemērota HCV strukturālo proteīnu (Matsuura et al., 1992, 1994; Lanford et al., 1993, Hsu et al., 1993, Hüsey et al., 1996a, 1997) un nestructurālo proteīnu (Hirowatari et al., 1993, Nishihara et al., 1993, Overton et al., 1995, Suzuki et al., 1995, Hwang et al., 1997) producēšanas un nobriešanas pētījumiem. Bez tam šo sistēmu var izmantot (i) imunoloģiskiem pētījumiem nepieciešamā lielā daudzuma antigēnu saražošanai (Chiba et al., 1991, Chien et al., 1992, Inoue et al., 1992, Basset et al., 1999) un (ii) vīrusa proteīnu mijiedarbības un savākšanās pētījumiem (Hüsey et al., 1996b, Wang et al., 1997). Izmantojot rekombinanto bakulovīrusu, 1998. gadā Baumerts ar līdzautoriem parādīja, ka var radīt pseidovirālas daļiņas.

Kā aizstājējvīrusu sistēma tika izstrādāta sistēma ar vezikulārā stomatīta vīrusa izmantošanu, radot pseidotipa un rekombinantos vīrusus, kas saturēja HCV apvalka proteīnus. Rekombinantais VSV ekspresēja inkorporētos HCV gēnu produktus, kuriem noritēja pilnais procesings un kuri savācās HCV līdzīgās daļiņās (Ezelle et al., 2002, Majid et al., 2006). Turklāt, rekombinantais VSV, kurā ievadīti nemodificēti HCV E1 un E2 gēni, bija spējīgs inficēt Huh7 šūnas (Tani et al., 2007). Nesen parādījās informācija, ka no fulminantā HCV pacienta izolētam 2a genotipa JFH1 HCV (HCVcc) izstrādāta replikācijas sistēma, kas darbojas *in vitro* zīdītāju šūnu kultūrā (Lindenbach et al., 2005, Zhong et al., 2005, Yi et al., 2006). Tomēr vēl joprojām nav izstrādāta stabila šūnu kultūru sistēma HCV 1a un 1b genotipiem, kuri pasaulē ir visplašāk izplatītie. Kā izņēmumus var minēt šūnu kultūru sistēmu H77 vai H77-S (1a genotipam) (Kanda et al., 2006, Yi et al., 2006) un replikonus, kas iegūti no Con1, genotipa 1b celma (Lohmann et al., 1999). Tomēr, efektīvai atbilstošo RNS replikācijai nepieciešamas adaptīvās mutācijas NS3, NS5A un/vai NS5B proteīnos. M.Ikeda ar līdzautoriem (Ikeda et al., 2002) parādīja, ka subgenomiskais replikons (NNeo/3-5B), kas iegūts no HCV 1b genotipa infektīvā molekulārā klona, arī ir spējīgs efektīvi replicēties Huh7 šūnās bez jebkādas adaptīvās mutācijas. Tā kā šo HCV replikonu RNS nesaturēja lielāko daļu sekvenču, kura kodēja strukturālos proteīnus (koru, E1, E2 un p7), tās nebija spējīgas radīt infektīvas daļiņas, neskatoties uz to stabilo replikāciju Huh7 šūnās.

Semliki Forest vīruss (SFV) (Liljestrom & Garoff, 1991) un Sindbis vīruss (SINV) (Xiong et al., 1989) ir visplašāk izmantoti alfavīrusu ekspresijas vektori. Šiem vīrusiem ir plašs saimnieku spektrs, un tie var replicēties būtiski atšķirīgās dzimtās, sākot no insektiem un beidzot ar zīdītājiem. Tā kā visu alfavīrusu bioloģija ir līdzīga, to ekspresijas vektoru principiālie strukturālie elementi ir identiski. Vektori ir radīti tā, lai heterologo gēnu insertu zem 26S subgenomiskā promotora kontroles varētu ievietot kāda vīrusa strukturālā gēna vietā. Vispār, vektori satur nestrukturālu kodējošu rajonu, kas ir nepieciešams alfavīrusu replikāzes kompleksa (ns1-4) radīšanai, 26S subgenomisko promotoru un polilinkeri ar vairākiem unikāliem restrikcijas saitēm svešo gēnu insertēšanai. Pirms rekombinantā replikona esošais SP6 promotors paredzēts RNS transkripcijai *in vitro* apstākļos. Rekombinantie replikoni jāievieto vīrusa apvalka iekšpusē, ko nodrošina *in trans* ar ko-transficēto defektīvo "helpera" RNS (Berglund et al., 1993, Smerdou et al. 1999). Pirmās paaudzes alfavīrusu ekspresijas sistēmās augsta līmeņa gēnu ekspresiju sasaistīja ar saimniekšūnas proteīnu translācijas apturēšanu, kam sekoja šūnas nāve 12-24 stundas pēc inficēšanas (Frolov et al., 1996). Galvenais šķērslis daudzajiem praktiskajiem izmantošanas gadījumiem ir vektora citotoksicitāte ar p53 neatkarīgo apoptozi (Glasgow et al., 1998), kuru izsauc nestrukturālais rajons, un pirmās paaudzes RNS izmantojošos vektorus varēja izmantot tikai īslaicīgai gēnu ekspresijai.

HCV pētījumiem tika izstrādāta SFV ekspresijas sistēma kā ar infekciju saistīta šūnu kultūru sistēma. HCV strukturālie proteīni (1a genotips) tika ekspresēti zīdītāju šūnās, izmantojot rekombinanto SFV replikonu. Tika parādīts, ka šī ekspresijas sistēma, lai *in situ* nodrošinātu HCV savākšanās procesa vizualizāciju, ir neveiksmīga, vai arī process šai sistēmā pārāk lēns (Blanchard et al., 2002, 2003, Greive et al., 2002, Hourieux et al., 2007).

Vakcīnu izstrādei vispirms SFV sistēma tika izmantota kā DNS vai RNS atvasināta vakcīna (Ying et al., 1999), kur SFV strukturālie gēni bija aizvietoti ar svešo gēnu. Atšķirībā no šīs pieejas, rekombinanto SFV daļiņu izmantošanai ir raksturīga paaugstināta šūnu transdukcija salīdzinājumā ar DNS vai RNS izmantojošām vakcīnām (Leitner et al., 1999). Šīs rSFV daļiņas inficē saimniekšūnu, bet nereplicējas: tikai ievadītais svešais gēns ekspresējas augstā līmenī. Ir parādīts, ka šāda pieeja uzlabo humorālo un celulāro atbildi pelēs un pērtiķos, izmantojot dažādus vīrusu modeļus, piemēram, gripas vīrusu, aitu meningoencefalomielīta vīrusu (LIV), cilvēka imunodeficīta vīrusu (HIV) cilvēka papilomas vīrusu (HPV) un liellopu virālo caureju (Berglund et al., 1999, Brand et al., 1998, Daemen et al., 2000, Fleeton et al., 2000, Reddy et al., 1999). Nesen tomēr ievērojamu šūnas imūnās atbildes uzlabojumu parādīja pelēs un primātos pēc DNS vakcīnas izmantošanas kombinētā veidā vai nu ar rekombinantiem antigēniem vai arī ar rekombinantiem vīrusiem (Amara et al., 2001, Pancholi et al., 2000, Robinson et al., 1999). Brinstera pētījumā tika noskaidrota pārveidoto SFV daļiņu spēja inducēt NS3 specifisko CD8⁺ radīto atbildi salīdzinājumā ar vai kombinācijā ar tīru DNS vakcīnu. Visas DNS/rSFV vakcīnas kombinācijas pastiprināti inducēja specifiskos CTL, kurus varēja noteikt līdz pat 31. nedēļai pēc pirmās injekcijas. Netransgēnās Balb/c pelēs anti-NS3 antivielas varēja noteikt tikai kombinētās vakcīnas gadījumā. HCV NS3/4A proteīnu gēnus saturošs SFV replikons tika izmantots, lai uzlabotu NS3/4A imunogenitāti ar RNS amplifikāciju (Frelin et al., 2004). Tomēr Vidalina pētījumā replicējošās SFV-DNS vakcīnas un HCV kora vai E2 antigēnus ekspresējošs rSFV tika salīdzināts ar klasisko CMV tipa plazmīdu (pCMV) vienkāršas vai divkāršas vakcinēšanas protokolos, un atšķirīgi injicēšanas režīmi neuzrādīja paaugstinātu core-SFV un E2-SFV plazmīdu vai rSFV efektivitāti salīdzinājumā ar CMV (Vidalin et al., 2000).

Mugurkaulnieku šūnu inficēšana ar alfavīrusiem parasti noved pie ļoti spēcīgas vīrusa kodēto gēnu ekspresijas un dramatiskas saimniekproteīnu sintēzes inhibīcijas. Mutācijas vīrusa replikāzes nsp2 gēnā, kas abu alfavīrusu (SIN un SFV) replikāzes padarīja par necitopātiskām, identifikācija noveda pie necitopātisko alfavīrusu ekspresijas sistēmu vektoru izstrādes (Dryga et al., 1997, Frolov et al., 1999, Perri et al., 2000). Necitopātiskie Sindbis vektori ekspresē pietiekami augstus proteīnu līmeņus gandrīz katrā šūnā, un ekspresiju var iniciēt ar RNS vai DNS transfekciju. Šie vektori ir elastīgi līdzekļi ātrai heterologo gēnu ekspresijai apstākļos, kad šūnas metabolisms netiek sajaukts, un rada iespējas ilglaicīgai augsta līmeņa heterologo gēnu

ekspresijai. Uz Sindbis vīrusa pamata izveidotais pCytTS ekspresijas vektors ir radīts tieši vienkāršotai sarežģītu vai toksisku proteīnu ražošanai (Boorsma et al., 2000).

Mēs radījām rekombinantus SFV variantus strukturālo HCV gēnu ekspresēšanai, līdzās esošo HCV core, E1, E2 un p7 kodējošo rajonu ievietojot SFV replikonā (pSFV1/HCVpolyP). Analogas konstrukcijas tika radītas Sindbis vīrusa sistēmā, izmantojot SINV (pCytTS) ekspresijas vektoru. HCV core gēns un HCV E2p7 gēns atsevišķi tika ievadīti SFV (pSFV1/HCVcore, pSFV1/HCVE2p7) ekspresijas vektorā un ekspresēti BHK-21 šūnu kultūrā. Šie rekombinantus HCV gēnus saturošie vīrusi var tikt izmantoti *in vitro* (vīrusu morfoģenēzes, pašsavākšanās procesa, vīrusa-saimnieka mijiedarbības, translācijas un poliproteīna procesinga pētījumiem), jo būtībā ir perspektīvi jaunu anti-HCV vakcīnas variantu izstrādei.

Iespēja iegūt mākslīgas HCV-veidīgās daļiņas ir būtiska HCV izpētē. Maz kas ir zināms par *in vivo* savākšanās procesu vai HCV nukleokapsīda un viriona struktūru. Turklāt, patlaban nav iespējams iegūt pietiekamu HCV daļiņu daudzumu bioloģiskiem un fizikāli ķīmiskiem pētījumiem, jo hepatīta C pacientiem asins serumā ir ļoti zems vīrusu skaits. Tas pats attiecas uz HCV iznākumu šūnu kultūrās. Tomēr, vīrusveidīgās daļiņas ir interesantākas par rekombinanto proteīnu vakcīnu, jo tās tuvu imitē dabīgā viriona īpašības. Baumerta darbā (Baumert et al., 1998) aprakstīta HCV-veidīgo daļiņu (HCV-LPs) sintēze, izmantojot rekombinanto bakulovīrusu, kas satur HCV strukturālo proteīnu (core/E1/E2) cDNS. Strukturālo proteīnu savākšanos, veidojot HCV-veidīgās daļiņas, apraksta arī citi autori (Blanchard et al. 2002a, 2002b, 2003, Heller et al., 2005). Ir ziņots arī, ka ar HCV-LP imunizētas Balb/c peles rada spēcīgu un plaša spektra humorālo un šūnas imūno atbildi pret HCV strukturāliem proteīniem (Lechmann et al., 2001). Muratas rezultāti ierosina uz domu, ka HCV-LP var inducēt humorālo un šūnas imūno atbildi, kas ir protektīva HCV aizvietotājmodelī un ka spēcīgā šūnas imunitāte, ko nodrošina gan CD4, gan CD8 efektoru limfocīti, var būt izšķiroši aizsardzībai pret HCV infekciju (Murata et al., 2003). Imunizācija ar HCV-veidīgām daļiņām inducē HCV specifisko šūnas imūno atbildi, kas var kontrolēt HCV infekciju šimpanzes modelī (Elmowalid et al., 2007). Tādā veidā, HCV-veidīgo daļiņu iegūšana šūnu kultūrā var palīdzēt ne tikai HCV morfoģenēzes, HCV proteīnu mijiedarbības un savākšanās procesu pētījumos, bet tai var būt arī praktiska nozīme.

Iepriekšminētā informācija norāda, ka šajā pētījumā izstrādātie rekombinantie SFV, kas satur HCV strukturālos gēnus, var tikt izmantoti HCV proteīnu pētījumos, uzmanību pievēršot ne tikai bioloģiskajām funkcijām vīrusa dzīves ciklā, bet arī HCV vakcīnas izstrādei.

Īss metožu apraksts

Vispārējās DNS metodes. Eksperimenti ar DNS tika veikti, izmantojot standarta procedūras (Sambrook *et al.*, 1989). Polimerāzes ķēdes reakcijas, DNS restrikcijas un ligēšanas reakciju apstākļi tika izvēlēti saskaņā ar fermenta ražotāja (Fermentas) ieteikumiem. Klonēšanai un plazmīdu pavairošanai tika izmantoti *E.coli* celmi DH5 α un JM109. Katras plazmīdas detalizēts apraksts ir dots atbilstošajās publikācijās.

Uz pSFV1 un pCytTS izveidotās konstrukcijas satur HCV proteīnu gēnus. Šajā darbā izmantotās konstrukcijas ir parādītas 14. attēlā. Vajadzīgo (mērķa) gēnu amplifikācijai ar atbilstošajiem praimeriem tika izmantots HCV izolāta 274933RU (GeneBank pieejas Nr AF176573) genoms (Mokhonov *et al.*, 2002). Šie HCV cDNS fragmenti tika ieklonēti aiz SP6 promotora, izveidojot plazmīdu pSFV1/HCVpolyP, kas satur kora, E1, E2 un p7 gēnus, kā arī plazmīdas pSFV1/HCVcore un pSFV1/HCVE2p7, kuras satur atsevišķus gēnus. Rekombinantās plazmīdas tika pavairotas un ar BcuI (SpeI) restriktāzi linearizētas to HCV cDNS 3' galā. Pēc tam linearizētās DNS tika attīrītas un izmantotas kā matricas RNS *in vitro* transkripcijai.

Lai iegūtu rekombinanto plazmīdu pSFV1/HCV core, tika izmantoti šādi HCV gēna amplifikācijas praimeris: 5'-GTG AGA TCT GCA CCA TGA GCA CGA ATC CTA AAC-3' un 5'-GAT CGT TAA CTA AGC GGA AGC TGG AAT GG-3'. Pēc amplifikācijas PCR fragments tika sašķelts ar BglIII un HpaI restrikcijas endonukleāzēm un ligēts pSFV1 vektorā, kas pirms tam bija secīgi sašķelts ar SmaI un BamHI restrikcijas endonukleāzēm.

Lai radītu rekombinanto plazmīdu pSFV1/HCVpolyP, HCV c-E1-E2-p7 gēnu amplifikācijai tika izmantoti šādi praimeris: 5'-GTG AGA TCT GCA CCA TGA GCA CGA ATC CTA AAC-3' un 5'-CTC TAG ATC TTT AGG CGT ATG CTC GTG GTG GTA G-3'. Pēc amplifikācijas PCR fragments tika sašķelts ar Bgl II restrikcijas endonukleāzi un ligēts pSFV1 vektorā, kas pirms tam bija sašķelts ar BamHI restrikcijas endonukleāzi un defosforilēts ar bakteriālo sārmaino fosfatāzi (Fermentas).

Lai konstruētu rekombinanto plazmīdu pSFV1/HCVE2p7, ar SalI un HpaI restrikcijas endonukleāzēm no plazmīdas pGMV-E2p7.9.3 (iegūta no Dr. Marijas Isagulians, D.Ivanovska virusoloģijas institūts, Maskava, Krievija) izšķēla DNS fragmentu, kas saturēja E2 un p7 gēnus. Lai pēc SalI apstrādes apgrieztu "lipīgos" galus, DNS fragmentu apstrādāja ar Klenova fragmentu (Fermentas) un ligēja pSFV1 vektorā, kas pirms tam sašķelts ar SmaI restrikcijas endonukleāzi.

Lai konstruētu rekombinanto plazmīdu pCyt/HCVpolyP, kas satur kora, E1, E2, un p7 proteīniem atbilstošos gēnus, vektora pCytTS tika sašķelta ar XbaI un XhoI restrikcijas endonukleāzēm. HCV genoma fragments tika amplificēts ar praimeriem 5'-GCA TCT CTA GAC GTA GAC CGT GCA CCA TGA GCA CG-3' un 5'-GCA TCC TCG AGT TAG GCG TAT GCT

CGT GGT GGT AGT G-3', izšķelts ar XbaI un XhoI restrikcijas endonukleāzēm un ligēts sagatavotajā vektorā pCytTS.

BHK-21 šūnu infekcijas kontrolei tika izmantota rekombinantā plazmīda pSFV1/EGFP, kas saturēja EGFP proteīnu (*Enhancer Green Fluorescence protein*). Lai radītu šo plazmīdu, DNS fragmentu ar EGFP gēnu ar NheI un HpaI restrikcijas nukleāzēm izšķēla no pEGFP (Clontech) un apstrādāja ar T4 polimerāzi (Fermentas), lai pēc NheI šķelšanas apgrieztu „lipīgos” galus. DNS fragmentu ligēja pSFV1 vektorā, kas iepriekš tika sašķelts ar SmaI restrikcijas endonukleāzi.

Šūnu kultūra. Kāmju nierēs šūnu kultūras (BHK-21) šūnas (ATCC) tika audzētas BHK barotnē (Gibco-BRL), kas saturēja 5% fetālā teļa seruma, 10% triptozes fosfāta barotni, 20 mM HEPES un 2 mM glutamīnu. Šūnas inkubēja 5% CO₂ atmosfērā pie 37 °C.

Rekombinanto vīrusu radišana un šūnu inficēšana. Lai pēģinātu rekombinantās RNS *in vivo* iepakšanu SFV daļiņās, iepriekšminētos apstākļos *in vitro* transkribētu RNS elektroporēja BHK-21 šūnās kopā ar SFV „palīg” RNS. Pēc 24-48 stundām no kultivēšanas vides savāca SFV daļiņas un ātri iesaldēja. Šo materiālu vēlāk uzglabāja kā vīrusa izejmateriālu. Vīrusa izejmateriālu titrus noteica pēc inficēto šūnu skaita ar izejmateriālu sērijveida atšķaidījumu metodi un sekojošu netiešo imunocitoķīmisko pārbaudi. Sasniegtie titri bija no 1×10^7 līdz 5×10^7 vīrusu daļiņām mililitrā. BHK-21 šūnu inficēšanu veica no seruma brīvā vidē, izmantojot atšķaidījumu, kas inficēja 100% šūnu.

RNS transkripcija un transfekcija. RNS transkriptus *in vitro* ar SP6 polimerāzes palīdzību ieguva no 3 mg SpeI linearizētas rekombinantās plazmīdas reakcijās, kuras saturēja 7mG(5')ppp(5'G) (New England Biolabs). RNS (3-5 mg) transficēja BHK-21 šūnās ar elektroporācijas palīdzību (850 V, 25 mF, atkārtoti impulsi), izmantojot Bio-Rad Gene Pulser aparātu bez impulsu kontroles iekārtas. Elektroporētās šūnas atšķaidīja 15 ml-os kompleksās BHK barotnes, pārnesa audu kultūras planšetēs un inkubēja pie 37 °C (5 % CO₂).

DNS transfekcija un piromicīnrezistentās šūnu populācijas atlase. DNS transfekcijai tika izmantoti nedaudz neizauguši (70% no monoslāņa biezuma) BHK-21 šūnu monoslāņi 30 mm audu kultūru platēs. DNS transfekcija tika veikta saskaņā ar ražotāja rekomendācijām ar iekārtu ExGene (Fermentas). Pēc transfekcijas šūnas inkubēja 18-48 stundas pie 37 °C. Mērķa gēnu ekspresijas termoindukcijai transficētās šūnas inkubēja pie 29 °C. Piromicīnrezistentās šūnu populācijas atlasei šūnas tika pārsētas pēc 18-24 stundām, tad 24. stundā barotni nomainīja pret standarta barotni, kas saturēja 5 µg/ml piromicīna (Sigma). Pēc tam šūnas tika kultivētas barotnē ar piromicīnu un tālāk pārsētas vai iesaldētas kā standarta tipiskās BHK-21 šūnas.

Šūnu lizēšana. Šūnu monoslānis tika lizēts buferī, kas saturēja 1% Nonidet P-40 (NP-40), 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 µg/ml PMSF. Pēc 10 minūšu

inkubācijas ledus vannā šūnu kodolus atdalīja centrifugējot. Supernatantus analizēja ar imunoprecipitāciju vai *Western blot*ā. Lai summāros šūnu lizātus analizētu ar SDS-PAGE, šūnu lizēšanai izmantoja Laemmli buferi.

Inficēto šūnu metaboliskā iezīmēšana. 16-20 stundas pēc inficēšanas šūnu monoslāņus (uz 30 mm diametra plates) nomazgā ar PBS, pārsedz ar minimālo barotni (bezmationīna MEM, 2 mM glutamīns, 20 mM HEPES) un 30 minūtes inkubē pie 37 °C 5% CO₂ atmosfērā. Pēc tam minimālo barotni aizvieto ar to pašu barotni, kas satur 100 μCi/ml (3.7 MBq) [S³⁵]-metionīna (Amersham Biosciences) un inkubē 2 stundas pie 37 °C 5% CO₂ atmosfērā. Šūnas lizē ar 300 μl lizēšanas bufera (1 % Nonidet P-40 (NP-40), 50 mM Tris/HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 μg/ml PMSF) un 10 minūtes atstāj ledus vannā. Lizātus pārnes mikrocentrifūgas stobriņos, lai atdalītu šūnu kodolus centrifugējot 5 minūtes pie 3000g. Supernatantus izmanto specifiskajai proteīnu imunoprecipitācijai (IP) vai tiešajai proteīnu analīzei 12% SDS-PAGE.

Proteīnu imunoprecipitācija (IP) no šūnu lizātiem. HCV kora un E2 proteīnu imunoprecipitācijai izmanto trušu poliklonālās anti-HCV kora vai anti-HCV E2 antivielas (dāvana no M.Isagulians, D.Ivanovska Virusoloģijas institūts, Maskava, Krievija). 300-600 μl šūnu lizāta ledus vannā inkubē 2 stundas ar atbilstošām antivielām (1-2 μl). Pēc inkubācijas pievieno 40 μl proteīna A sefarozi (Amersham Pharmacia Biotech), kas nolīdzsvarota ar līzes buferi, un inkubē rotējot pa nakti pie 4 °C. Proteīna A sefarozi divas reizes mazgā ar buferi, kas satur 0.2 % NP-40, 10 mM Tris/HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, divas reizes ar buferi, kas satur 0.2 % NP-40, 10 mM Tris/HCl pH 7.5, 500 mM NaCl, 2 mM EDTA un divas reizes ar 10 mM Tris/HCl pH 7.5. Proteīna A sefarozes nogulsnes resuspendē 30 μl Laemmli bufera (Laemmli, 1970) un analizē ar 12% SDS-PAGE. Gēlus izžāvē un eksponē pa nakti vai ilgāk uz autoradiogrāfijas filmas (Amersham Pharmacia Biotech) pie – 70 °C.

Anti-HCV antivielas. Poliklonālās trušu anti-HCV kora un anti-HCV E2 antivielas tika iegūtas no Dr. Marijas Isagulians (D.Ivanovska Virusoloģijas institūts, Maskava, Krievija) un izmantotas saskaņā ar agrāk aprakstīto (Sominska et al., 2005).

HCV proteīnu analīze ar *Western blot*. Proteīnu paraugus, kas iegūti no BHK-21 šūnām, kuras inficētas ar pSFV1/HCVcore vai pSFV1/HCVpolyP un transficētas ar pCyt/HCVcore vai pCyt/HCVpolyP, sadalīja ar 15% SDS-PAGE. Kā molmasas marķierus izmantoja Prestained Molecular Weight Markers (Fermentas). Pēc elektroforētiskās sadalīšanas veica proteīnu elektropārnesi blotēšanas iekārtā uz Hybond-P membrānām (Amersham Pharmacia Biotech). Pēc pārneses membrānas inkubēja ar bloķēšanas buferi (5% attaukots sausais piens PBS buferī). Kā primārās antivielas tika izmantotas anti-HCV kora poliklonālās trušu antivielas (vai anti-HCV E2 poliklonālās trušu antivielas), kas tika atšķaidītas 1:1000 bloķēšanas buferī, kurš saturēja 2,5% attaukota sausā piena un 0,05% Tween 20. Membrānas pēc

tam istabas temperatūrā 60 minūtes tika apstrādātas ar anti-trušu IgG (Amersham Pharmacia Biotech), kas konjugēts ar mārrotku peroksidāzi, 1:3000 atšķaidījumā. Proteīnu piesaistīšanos noteica ar ECL Plus sistēmu (Amersham Pharmacia Biotech).

Netiešā imunofluorescences mikroskopija. BHK-21 šūnas tika kultivētas speciālā šūnu kultūras traukā ar segstikliņu (Nagle Nunc International), inficētas ar pSFV1/HCVcore vai pSFV1/HCVpolyP rekombinantajiem vīrusiem un nofiksētas pēc noteiktiem kultivēšanas periodiem. Nofiksētās šūnas vispirms 10 minūtes istabas temperatūrā inkubēja ar antivielu atšķaidīšanas buferi (PBS ar 1% liellopu seruma albumīnu (BSA) un 2.5 mM EDTA). Šūnas pēc tam 60 minūtes inkubēja istabas temperatūrā ar atbilstošajām anti-HCV kora vai E2 poliklonālajām antivielām atšķaidījumā 1:1000. Pēc inkubēšanas šūnas trīs reizes mazgāja ar PBS. Kā sekundārās antivielas izmantoja anti-trušu TRITC iezīmētas antivielas atšķaidījumā 1:100. Pēc tam šūnas tika nofiksētas ar PermaFluor ūdeni saturošu vidi (Immunon) un novērotas fluorescences mikroskopā Leica DM 600 (Leica Camera AG). Kodola vizualizēšanai izmantoja DAPI.

HCV-veidīgo daļiņu attīrīšana. 48 stundas pēc inficēšanas vai elektroporācijas šūnas lizēja buferī, kas saturēja 1% Nonidet P-40, 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA (pH 7.6) ar 10 µg/ml PMSF. Lai atdalītu šūnu membrānu atliekas, lizātu centrifugēja pie zemiem apgriezieniem (15 minūtes pie 4 °C). Supernatantu uzslāņoja virs 20% (svars/tilpums) saharozes (TNE buferī: 50 mM Tris/HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, 0,5 mM EDTA) „spilvena” un centrifugēja TLS-55 rotorā (TL-100 centrifūga, Beckman) pie 30 000 rpm 18 stundas pie 4 °C. HCV-veidīgo daļiņu saturošās nogulsnes resuspendēja TNE buferī un analizēja ar *Western blotu* un elektronu mikroskopiju.

Peļu imunizācija. Balb/c līnijas peļu mātītes (vecums 6-8 nedēļas, no Mikrobioloģijas un virusoloģijas institūta dzīvnieku audzēšanas centra, Rīga) tika imunizētas ar intravenozu (i.v.) vai zem ādas (i.s.) injekciju, izmantojot attīrītu SFV1/HCV core, SFV1/HCV E2, SFV/HCVpolyP vai kontroles vīrusu (SFV/GFP) ar titru 6×10^6 PFU PBS buferī. 5 nedēļu intervālā (1. dienā un 35. dienā) tika ievadīti 200 µl PBS-vīrusa preparāta. Humorālās atbildes novērošanai asins paraugi tika noņemti 0., 35., 42. (1 nedēļu pēc atkārtotās imunizēšanas), 49. (2 nedēļas pēc atkārtotās imunizēšanas), 56. (3 nedēļas pēc atkārtotās imunizēšanas) un 63. (4 nedēļas pēc atkārtotās imunizēšanas) dienā.

Detalizēta informācija par imunizēšanu ar DNS atrodama atbilstošajās publikācijās.

Imunofermentatīvās analīzes (ELISA). No peles retro-orbitālā sinusa pēc primārās un atkārtotās imunizācijas tika iegūti asins paraugi, un asins serumi, lai noteiktu antivielu titrus, tika analizēti HCV core specifiskā ELISA testā 96 bedrīšu platēs (MaxiSorp, Nunc), kas pa nakti pie 4 °C pārklātas ar 100 µl kora atvasinājuma peptīdu MS94-23

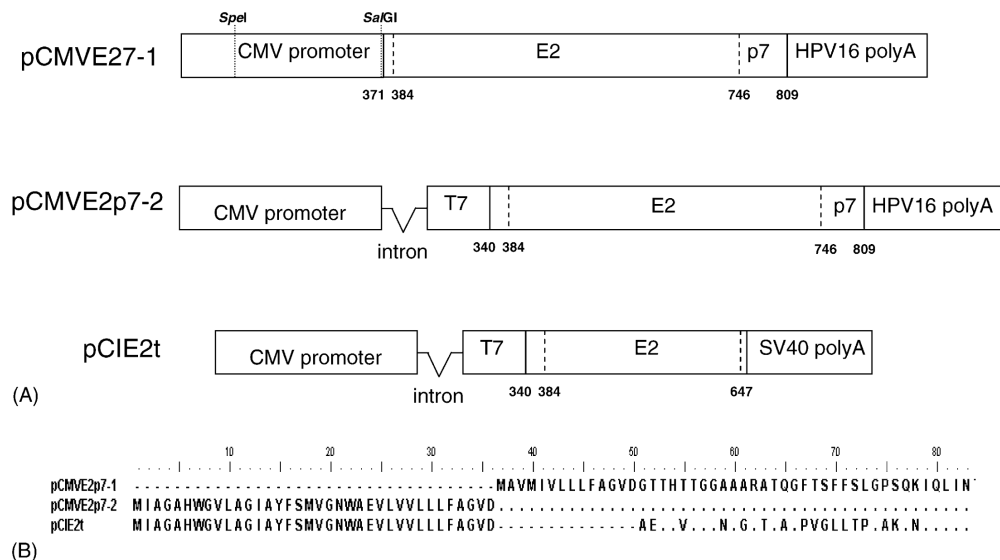
DVKFPGGGQIVGGGVYLLPRRGVRLGVRATRKTSER, kas atbilst HCV kora proteīna 23.-43. ask (10 µg/ml 50 mM karbonātu buferī, pH 9.6) vai 96 bedrīšu platēs (PoluSorp, Nunc), kas pārklātas ar rekombinantajiem HCV kora proteīniem M220-25 vai M273-2 (M.Mihailovas dāvana, BMC, Rīga) tajā pat koncentrācijā un tajā pat pārklāšanas buferī. Pēc 1 stundas bloķēšanas pie 37 °C ar PBS, kas satur 1% BSA, platēm pievienoja peļu asins seruma seriālos atšķaidījumus, un plates inkubēja vēl 1 stundu pie 37 °C. Pēc 3 kārtējas mazgāšanas ar PBS, kas satur 0.05% Tween-20, uznesa ar mērrutku peroksidāzi konjugētas anti-peļu antivielas (Sigma) atšķaidījumā 1:7000. Pēc 1 stundas inkubācijas pie 37 °C plates skaloja, un krāsas reakcijas attīstīšanai pievienoja substrātu OFD (Sigma). Rezultātus nolasīja ar automātisko nolasīšanas iekārtu (Multiscan) pie 492 nm.

Imunizēto peļu seruma analizēšanai tika izmantots arī ORTHO ELISA tests.

Rezultātu pārskats

Pirms uz alfavīrusu vektoru pamata veidoto rekombinanto plazmīdu konstruēšanas uzsākšanas HCV strukturālo proteīnu - kora un E2 gēnu imunogenitāte tika novērtēta ar DNS vakcinācijas palīdzību. Šķiet, ka HCV proteīnu gēni varētu būt perspektīvi kā imunoloģisko antigēnu avots anti-HCV vakcīnas izstrādei, sevišķi, ja iespējama divu vai vairāku atšķirīgu imunoloģisko īpašību proteīnu apvienošana vienā ģenētiskā konstrukcijā. Šim pētījumam tika izvēlēti HCV kora un E2 strukturālie proteīni. Zināms, ka HCV kora proteīns ir viskonservatīvākais starp individuāliem vīrusa celmiem, kuri izolēti dažādās pasaules daļās (apskatu skatīt Alter, 1995, Krekulova, 2006). Slimības laikā antivielas pret HCV koru parādās ātrāk par antivielām pret citiem HCV proteīniem (Van der Poel et al., 1991). HCV E2 ir 70 kDa glikoproteīns, kam ir raksturīgas izteiktas variācijas starp dažādiem HCV genotipiem (Keck et al., 2004). Ir parādīts, ka HCV kora proteīns un E2 proteīna hipervariablais rajons 1 (HVR1) satur gan B šūnu, gan T šūnu epitopus.

Himēro E2/p7 saturošo plazmīdu konstruēšana. Vispirms E2/p7 gēnu imunogenitātes raksturošanai tika izveidotas plazmīdas, kas saturēja pilna garuma HCV 1b subtipa E2/p7 gēnu un tā modificēto variantu. Krievijas HCV 1b subtipa izolāta 274933 RU (Mokhonov et al., 2002) E2/p7 cDNS ar mākslīgi radītiem sākuma un beigu kodoniem tika ieklonēta zem CMV IE

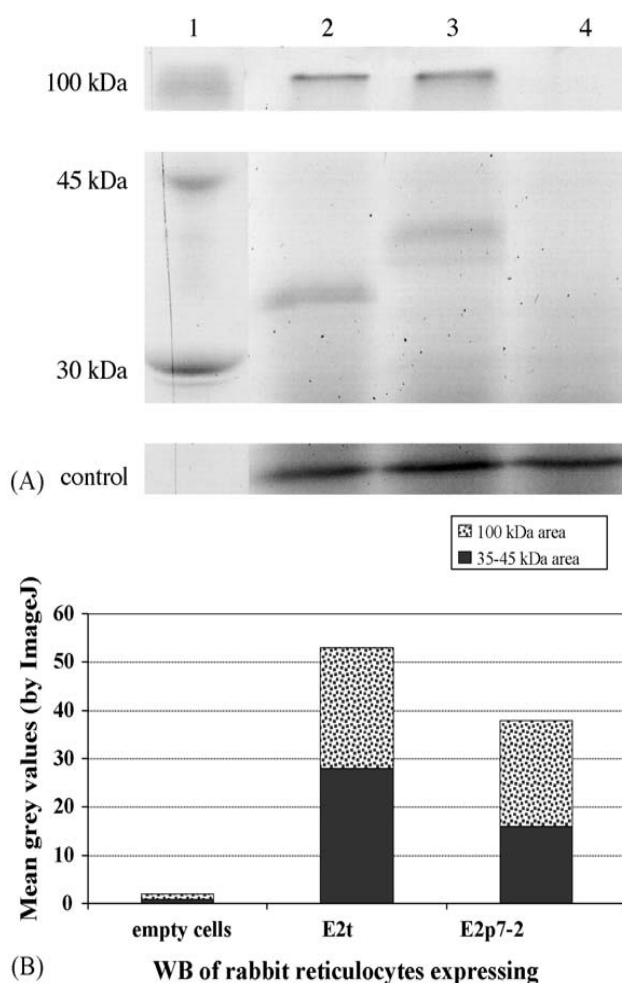


1. attēls. E2 gēna variantu (E2/p7-1, kas kodē E1 371.–383. ask, E2 384.–745. ask un p7 746.–809. ask (iegūts no 274933RU (pCMVE2/p7-1); E2/p7-2, kas kodē HCV celma H E1 340.–370. ask, kam seko MAVM un 371.–809. ask no 274933RU (pCMVE2/p7-2); references E2t gēns, kas kodē HCV celma H 340.–647. ask) shematiska struktūra.

promotora un HPV 16 poliadenilēšanas signāla kontroles, iegūstot E2/p7-1 gēnu. Tā kodēja E1 gēna 13 C gala aminoskābes (371.-383.ask), pilna garuma E2 un p7 proteīnus un stop kodonu (1. attēls). Lai optimizētu E2/p7 ekspresiju, mēs apmainījām daļu CMV promotora, 5'netranslēto

rajonu un daļu E1 sekvences ar atbilstošo fragmentu no pCIE2t, kas ir labi raksturota plazmīda HCV E2 gēna imunizēšanai (Fournillier et al., 1999). Iegūtais E2/p7-2 gēns kodēja poliproteīnu, kas saturēja E1 translokācijas apturēšanas signālu, divas atkārtotas E2 signālsekvences, vienu no pCIE2t (Fournillier et al., 1999), bet otru no HCV 1b subtipa 274933 RU, kuras atdalīja MAVM speisers, kurām sekoja HCV 1b 274933 RU E2 un p7 (1. attēls).

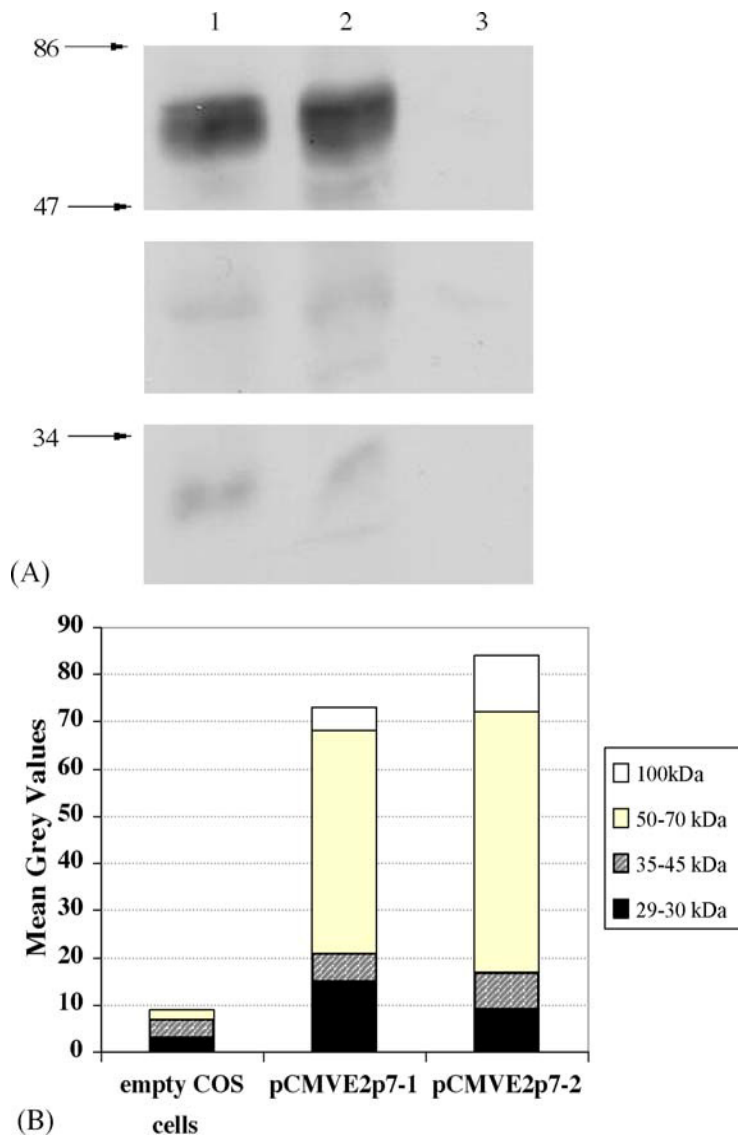
HCV E2/p7 ekspresija eikariotos. E2 variantu ekspresiju *in vitro* apstākļos apstiprināja trušu retikulocītos (2. attēls), bet *in vivo* apstākļos - Cos-7 un HeLa šūnās (3. un 4. attēli). Veicot šūnu lizātu elektroforētisko sadalīšanu un tai sekojošu *Western blot* tēšanu, novēroja vairākas zonas.



2. attēls. **HCV E2 *in vitro* ekspresijas analīze.** (A) Pēc pCMVE2t (2. līnija); pCMVE2/p7-2 (3. līnija); tukšā kontrole (4. līnija); transkripcijas/translācijas iegūtu šūnu lizātu 12% SDS-PAGE autoradiogrāfija; molekulārās masas markieris (1. līnija) (B) E2 ekspresijas puskvantitatīvā novērtēšana pēc autoradiogrāfa skenēšanas un attēlu apstrādes ar Image J programmatūru. Skenētie un salīdzinātie laukumi ir doti diagrammā augšajā daļā.

In vitro apstākļos novēroja translētā E2/p7 poliproteīna procesingu, kas noveda pie sašķelšanās starp E2 un p7, radot vizualizējamu 43,5 kDa proteīnu (2. attēls, 3. līnija). Ekspresējot no C-gala

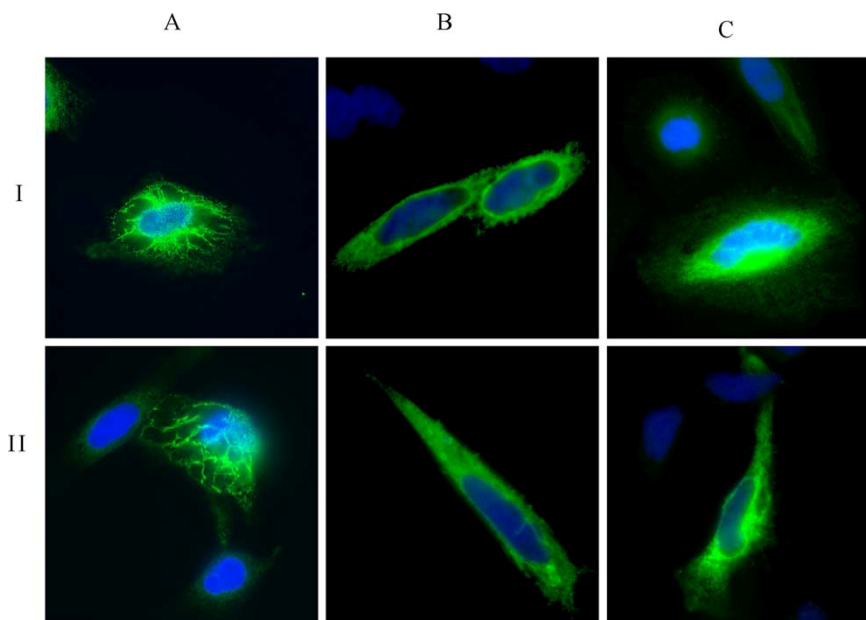
nošķeltu E2 proteīnu (E2t), ieguva paredzētās molmasas (38,4 kDa) proteīnu (2. attēls, 2. līnija). Īslaicīgi transficētās Cos-7 šūnās E2/p7-1 un E2/p7-2 ekspresija radīja proteīnus ar molmasu 50-70 kDa, kurus varēja detektēt kā difūzas joslas, kas specifiski krāsojās ar anti-E2 trušu poliklonālajām antivielām, tādā veidā atbilstot E2 atšķirīgām glikolizētajām formām (3. attēls, 1. un 2. līnijas). Papildus minorā 44 kad zona varētu būt E2 neglikolizētā forma, bet īsākā 30 kDa



3. attēls. **HCV E2 ekspresijas Cos-7 šūnās analīze.** (A) Šūnu lizātu SDS-PAGE ar sekojošu Western blotu, izmantojot anti-E2 poliklonālās trušu antivielas un ECL piesaistes detekciju: transfekcija ar plazmīdu pCMVE2/p7-1 (1. līnija), pCMVE2/p7-2 (2. līnija), netransficētas šūnas (3. līnija) (B) E2 ekspresijas puskvantitatīvā novērtēšana pēc rentgenfilmā skenēšanas un attēlu apstrādes ar Image J programmatūru. Bultas kreisajā pusē norāda atrašanās vietas molmasas marķieriem, pēc kuriem izvēlas laukumus skenēšanai. Skenētie un salīdzinātie laukumi ir doti diagrammas labajā pusē.

zona veidojas kā E2 degradācijas products. E2/p7-2 un E2t gēnu (Fournillier et al., 1999) ekspresijas līmeņi ir salīdzināti *in vitro* transkripcijas–translācijas testā (jo atbilstošās plazmīdas

satur T7 promotoru). Abos gadījumos E2 ekspresijas līmenis bija līdzīgs (3B. attēls). Cos-7 šūnās iegūtie E2/p7-1 un E2/p7-2 ekspresijas līmeņi arī bija līdzīgi (3B. attēls). E2/p7 un C-gala nošķelta E2t ekspresējošu HeLa šūnu imunofluorescentā krāsošana ar E2-specifiskām poliklonālām antivielām parādīja, ka E2/p7-1 variantā kodētais E2 bija lokalizēts lielākoties graudainajā endoplazmatiskajā retikulārajā tīklā (4A. attēls). E2/p7-1 kodētais E2 uzrādīja difūzu citoplazmatisku krāsošanos, kas bija līdzīga E2t ainai (4B. un 4C. attēli).



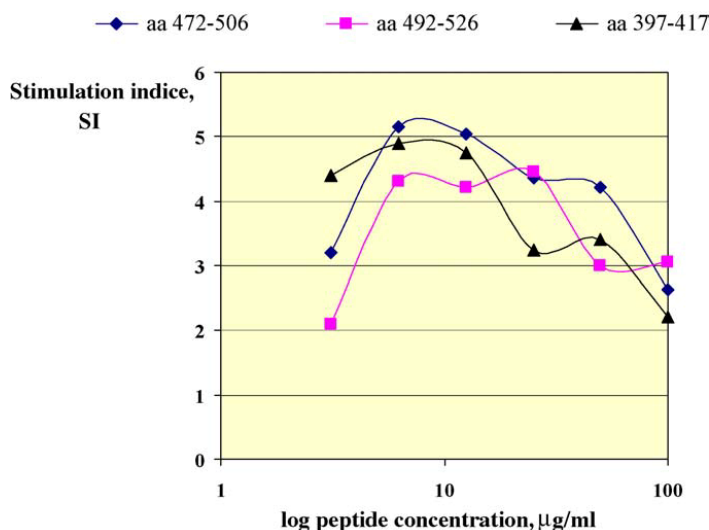
4. attēls. *E2 gēna variantus ekspresējošu HeLa šūnu imunofluorescentā krāsošana ar E2 specifiskajām antivielām.* HeLa šūnas transficētas ar pCMVE2/p7-1 (A, sīkattēli I un II); pCMVE2/p7-2 (B, sīkattēli I un II); pCMVE2t (C, sīkattēli I un II). Rezultējošos attēlus iegūst, attēlus, kas iegūti kodola krāsošanā ar DAPI, uzklājot virsū attēliem, kas nofiksēti krāsošanai ar sekundārajām anti-trušu FITC-konjugētām antivielām.

E2 gēna imunizācija: antivielu atbilde. Balb/c peles intramuskulāri imunizēja ar E2/p7-1, E2/p7-2 vai E2t gēniem. 2 nedēļas pēc katras plazmīdas injicēšanas savāktajos peļu serumos ar netiešo ELISA metodi pārbaudīja spēju atpazīt rekombinanto E2 un E2- un p7- atvasinātos sintētiskos peptīdus. Antivielu atbildes specifiskums un aktivitāte parādīta 1. tabulā. Ar E2/p7-1 vai E2t imunizēto peļu serums atpazīna peptīdus, kas atbilst 492.-526. ask un 512.-546. ask, bet ne rekombinanto proteīnu. E2/p7-2 gēns radīja antivielas, kas reaģēja ar peptīdiem, kuri atbilst 399.-411. ask (HVR1), 552.-586. ask (E2) un 774.-796. ask (p7) kā arī ar rekombinanto E2 (1. tabula). Imunizācija ar pilna garuma E2/p7 radīja antivielas pret transmembrānu domēnu 2 (TM2), kas atrodas p7 C-galā (774.-796. ask), ko pārstāvēja gan lineārie, gan cirkulārie peptīdi (1. tabula). Pelēs, kas imunizētas ar E2/p7-2, to izrādījās vairāk par desmit ($p < 0.05$, 1. tabula). Kopumā, ar E2/p7-2 imunizētās peles uzrādīja augstāku serokonversijas procentu nekā peles, kas saņēma E2/p7-1 vai E2t gēnus ($p < 0,05$).

1. tabula: Ar E2 imunizētu H-2d peļu antivielu atbilde pret E2 un p7 proteīniem

Peļu grupa, imunizēta ar	Antivielu atbildes specifiskums pret antigēniem	Homoloģija starp skrīningam izmantoto antigēna un kodēto E2p7 sekvenci, (%)		Vidējais antivielu titrs reaģējošā pelē	Reaģējošo peļu skaits, %	Vidējā serokonversija grupā, %
		identiskās ask.	homoloģās ask.			
pCMVE2p7-1 n=7	492-526	80	92	8500 4400±3300	14 (1) 28.5(2) 14(1)	57 (4)
	512-546	72	92			
	774-796	100	100			
	774-796c	91.7				
pCMVE2p7-2 n=7	E2	100	100	5500±3700	43(3)	100(7)
	339-411 (HVRC)	53.8	61.5	600±300	57(4)	
	552-586	76	88	4000±3500	28.5(2)	
	774-796	100	100	450±300	100(7)	
	774-796c	91.7	91.7			
pCIE2t n=6	381-394 (HVRN)	64	86	400	17(1)	67(4)
	399-411 (HVRC)	54	69	200	17(1)	
	492-526	96	100	900	17(1)	
	612-546	96	96	7000±1300	67(4)	

E2 gēna imunizācija: T-helperu šūnu atbilde. No imunizētas peles izdalīti splenocīti tika stimulēti ar E2 atvasinātiem peptīdiem. Augstākais stimulācijas indekss tika sasniegts pie specifiskās peptīda koncentrācijas apmēram 10 µg/ml (5. attēls). Augstākā un plašākā T-šūnu atbilde proliferācijas jomā tika stimulēta pelēs, kas bija imunizētas ar E2/p7-1 gēnu (5. attēls).

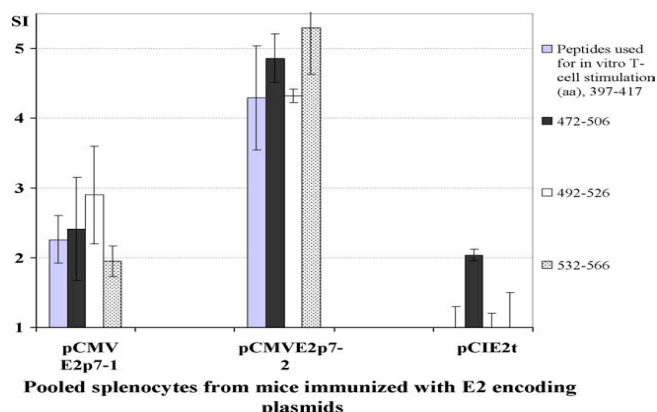


5. attēls. Ar pCMVE2/p7-2 imunizēto peļu apvienoto splenocītu *in vitro* stimulācijas ar E2-atvasinātiem peptīdiem pakāpe ir atkarīga no peptīdu devas. Neatbilstoša kontroles peptīda gadījumā netiek novērota stimulācijas/koncentrācijas atkarība (rezultāti nav parādīti).

Atbilde pelēs, kuras bija saņēmušas E2/p7-2 gēnu, bija ierobežota gan pēc lieluma, gan pēc atpazīstamo epitopu skaita; pelēm, kas bija saņēmušas E2t gēnu, proliferācija bija novērojama pret lineāru E2 472.-506. ask epitopu. (5. attēls).

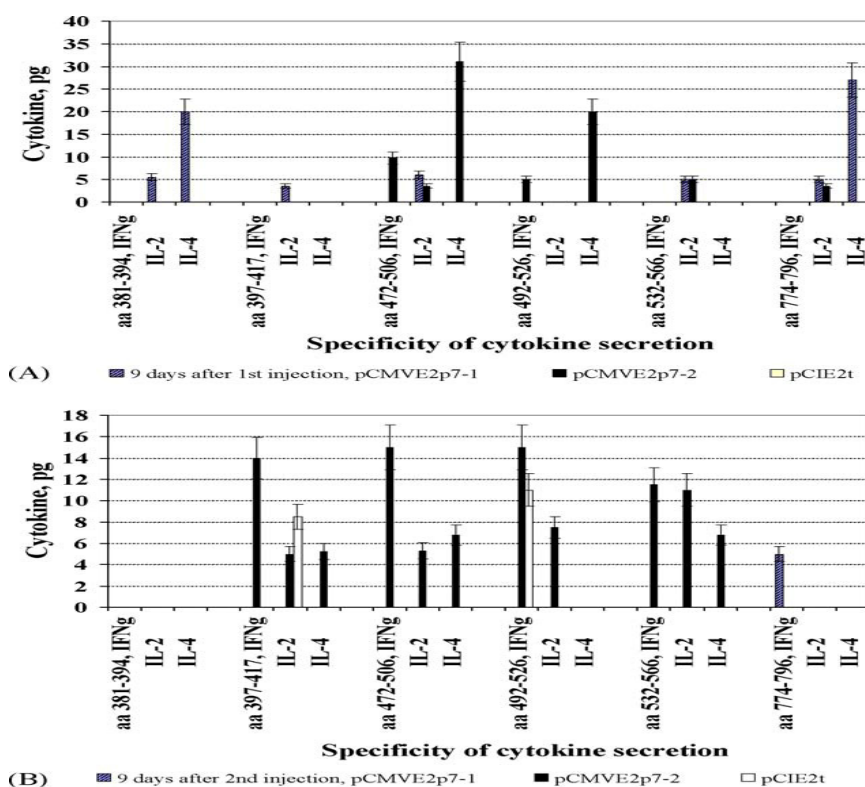
T-šūnu proliferāciju pavadīja IFN-γ, IL-2, un IL-4 sekrēcija (6. attēls). Imunizācija ar

E2/p7-1 gēnu inducēja zemas *in vitro* IL-2 un IL-4 produkcijas līmeņus, bet gandrīz nekādu



6. attēls. *Peļu (grupā trīs dzīvnieki) apvienoto splenocītu vidējie stimulācijas indeksi 9 dienas pēc pirmās E2 kodējošās plazmīdas injekcijas. Grafika apakšējā daļā ar pirmo un pēdējo aminoskābi norādītie peptīdi stimulācijai tika izmantoti koncentrācijā 10 µg/ml.*

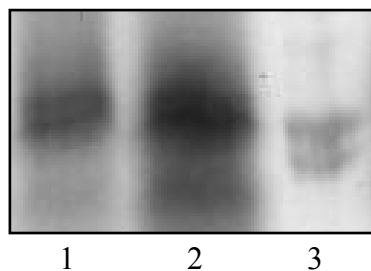
IFN- γ līmeni. Imunizācija ar E2/p7-2 gēnu inducēja T-šūnu atbildi, ko pierādīja izteikta IFN- γ , IL-2 un IL-4 produkcija, kas pieauga pēc atkārtotās plazmīdas injicēšanas (7. attēls). Gluži otrādi, E2t gēns inducēja vāju T-helperšūnu atbildi, ko pierādīja zema līmeņa IFN- γ producēšana, kas redzama tikai pēc atkārtotās plazmīdas injicēšanas (7. attēls).



7. attēls. *Ar E2 gēnu imunizēto peļu in vitro T-šūnu sekretēto citokīnu specifiskums pēc stimulācijas ar E2/p7 atvasinātiem peptīdiem 9 dienas pēc pirmās injicēšanas (A), 9 dienas pēc otrās injicēšanas (B). Grafika apakšējā daļā ar pirmo un pēdējo aminoskābi norādīti izmantotie peptīdi. Sekretētie citokīni: IFN- γ (1), IL-2 (2), un IL-4 (3).*

HCV kora gēna ekspresijai paredzētās plazmīdas. Vairāki pētnieki ir ziņojuši, ka DNS imunizācija ar HCV core var inducēt specifiskās antivielas un specifisko CTL atbildi pret HCV kora proteīnu (Nakano et al., 1997). Tomēr daudzos gadījumos DNS vakcinācija tās zemās efektivitātes dēļ ir apgrūtināta. Lai uzlabotu ģenētisko modificēto vakcīnu imūno atbildi, ir izstrādātas dažādas stratēģiskās pieejas (Leitner et al., 1999). Viena no šādām pieejām ir saistīta ar antigēnu ekspresijas optimizāciju. Antigēna daudzuma palielināšanās varētu izsaukt intensīvāku imūno atbildi. Mūsu pētījumā tika izmantotas trīs plazmīdas, kas tika konstruētas HCV core gēna (1.-191. ask) ekspresijai. Plazmīda pCMVcore satur tikai HCV core gēnu. Lai uzlabotu atbilstošās mRNS translāciju, plazmīda pCMVcoreKozak satur HCV core gēnu ar *Kozak* konsensus sekvenci. Plazmīda pCMVcoreIRES satur HCV core gēnu ar 5'UTR sekvenci. Kā negatīvā kontrole tika izmantota pcDNA3, kas kodē hepatīta B vīrusa virsmas antigēnu. Visas plazmīdas tika attīrītas saskaņā ar standarta procedūru atbilstoši DNS vakcīnu ražošanas GLP prasībām.

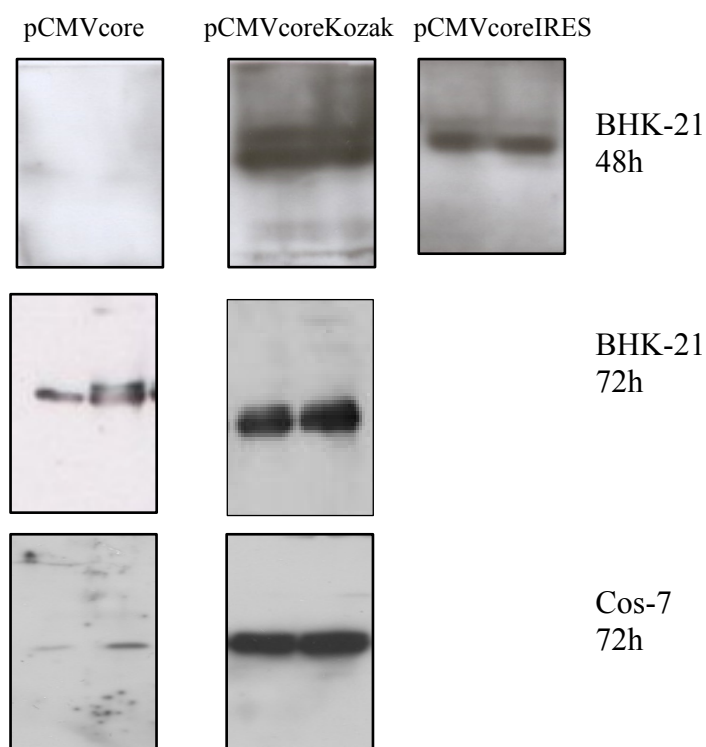
HCV kora proteīna translācija *in vitro*. Rekombinantās plazmīdas pCMVcore un pCMVcoreKozak tika izmantotas par matricām T7 regulējamai mRNS transkripcijai. No abu plazmīdu DNS tika iegūti 23 kDa un 21 kDa translācijas produkti, kuri atbilst paredzētajiem HCV procesētās un neprocesētās proteīnu formas produktiem (8. attēls). Kā jau bija sagaidāms, HCV kora translācijas līmenis no pCMVcoreKozak mRNS bija augstāks nekā translācijas līmenis no pCMVcore mRNS, jo to ietekmēja konsensus *Kozak* sekvences insercija.



8. attēls. ***HCV core mRNS in vitro translācija, izmantojot trušu retikulocītu lizāta sistēmu (Amersham Pharmacia Biotech).*** Kora proteīna translācija no RNS, kas transkribēta ar T7 polimerāzi, izmantojot plazmīdu pCMVcore par matricu (1. līnija); kora proteīna translācija no RNS, kas transkribēta ar T7 polimerāzi, izmantojot plazmīdu pCMVcoreKozak par matricu (2. līnija); proteīnu translācija no kontroles RNS trušu retikulocītu lizāta sistēmā (3. līnija).

HCV kora proteīna gēna ekspresija zīdītāju šūnās *in vivo*. Core gēna ekspresija no plazmīdām pCMVcore, pCMVcoreKozak un pCMVcoreIRES tika pārbaudīta Cos-7 un BHK-21 šūnās pēc to transfekcijas ar attīrītām plazmīdām. Pēc 48-72 stundu inkubācijas šūnas tika lizētas Laemmli buferī. Šūnu lizāti tika analizēti *Western blotā*. HCV kora proteīna sintēze tika parādīta

abās šūnu kultūrās – BHK-21 un Cos-7 šūnās, bet efektivitāte BHK-21 šūnās bija augstāka (9. attēls, 2. un 3. līnija). Abās šūnās tika novērotas ievērojamas pCMVcore un pCMVcoreKozak ekspresijas līmeņa atšķirības. Tā, jau 48 stundas pēc transfekcijas ar plazmīdām



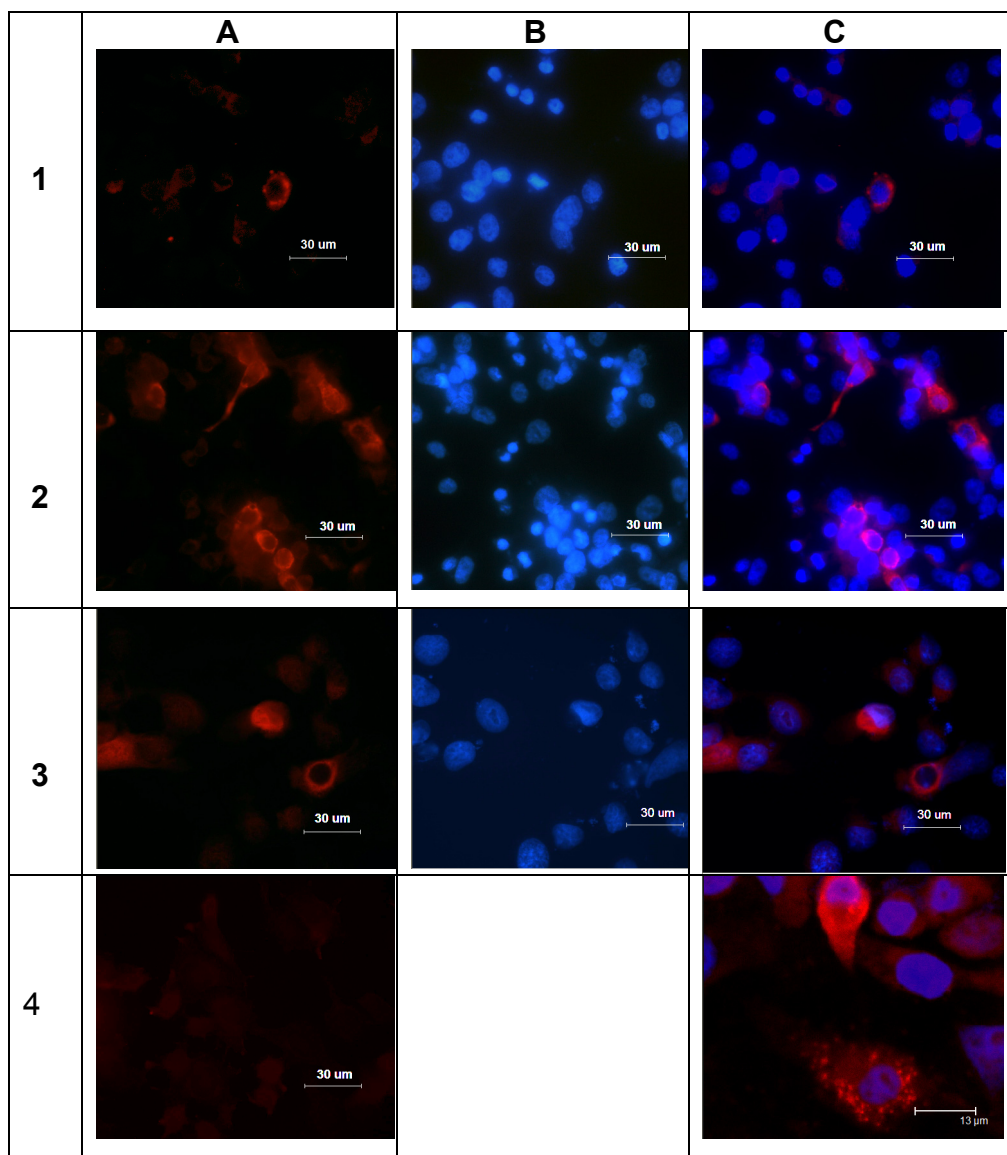
9. attēls. *HCV kora proteīna gēna ekspresija BHK-21 šūnās 48 un 72 stundas pēc transfekcijas un Cos-7 šūnās 72 stundas pēc transfekcijas ar 0,5 μg plazmīdas DNS, izmantojot atšķirīgus daudzumus lipofektamīna BHK-21 šūnu gadījumā un ExGene reaģenta Cos-7 šūnu gadījumā.*

pCMVcoreKozak un pCMVcoreIRES BHK-21 šūnās radās ievērojams daudzums kora proteīna, bet tajā pat laikā pēc transfekcijas ar plazmīdu pCMVcore kora proteīna ekspresija nebija nosakāma (9. attēls, 1. līnija). Šo atšķirību var izskaidrot ar Kozak sekvences klātbūtni rekombinantajā plazmīdā pCMVcoreKozak un 5'UTR sekvences atrašanos plazmīdā pCMVcoreIRES. Kozak sekvence ir būtiska gēna regulācijā. Eikariotiskajās šūnās tā ir svarīga sastāvdaļa efektīvai gēnu translācijai.

Kopējā šūnu lizātā tika identificēti HCV kora proteīna varianti ar atšķirīgu molsvaru - 21 kDa un 23 kDa. Abus produktus novēroja tikai augstas ekspresijas gadījumā, un galvenais sintēzes produkts bija 21 kDa proteīns. Vispirms sintezējās p23 jeb 191 aminoskābi garais HCV poliproteīns, bet p21 (ar atšķeltu C-galu) rodas procesinga rezultātā starp HCV 174. un 191. aminoskābi. Kora proteīna nobriedušā forma p21 tika noteikta ātrāk, un tās daudzums ir ievērojams. Nenobriedusī forma p23 parādās vēlāk, un tās daudzums dažādos apstākļos var būt atšķirīgs. pCMVcoreKozak plazmīdas ekspresijas gadījumā novēroja līdzīgus abu HCV kora proteīnu daudzumus. Tai pat laikā ekvivalentos apstākļos no plazmīdas, kas kodēja poliproteīnu

– kora-E1-E2-p7 gēnus, HCV kora proteīns tika sintezēts galvenokārt p21 formā, un detektēt varēja tikai nelielu p23 formas daudzumu (9. attēls, 1. līnija).

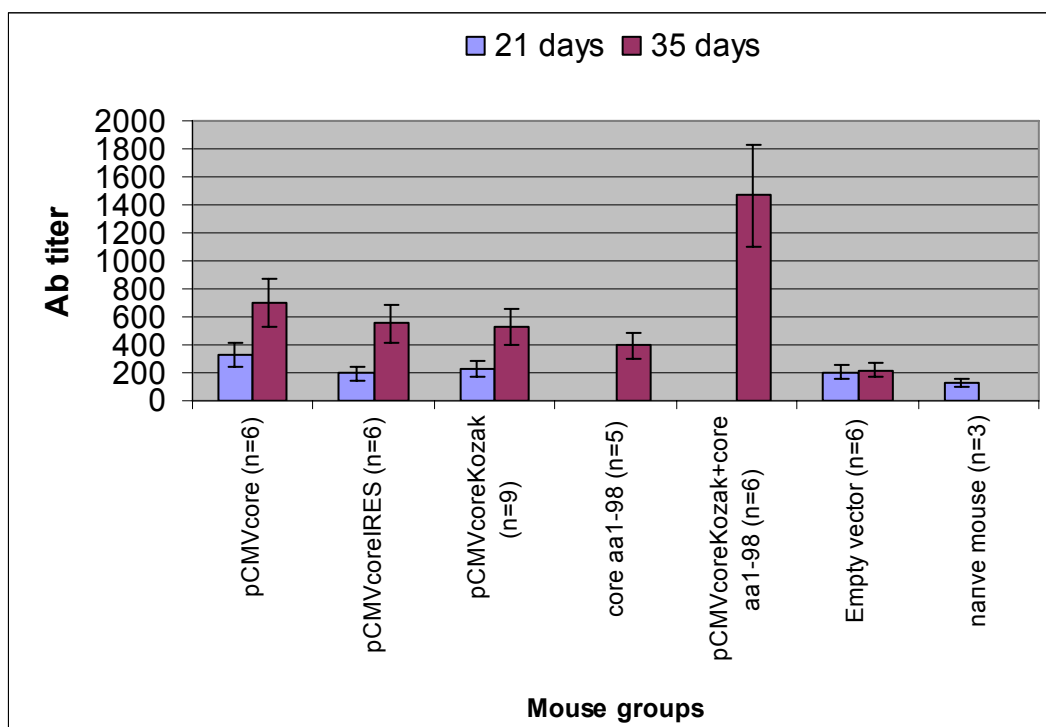
No pCMVcoreKozak plazmīdas HCV kora proteīnu sintezējošo šūnu imunocitoķīmiskā analīze parādīja citoplazmatisku, granulāru kora proteīna novietojumu šūnās. Līdzīgu



10. attēls. *BHK-21* šūnās pēc transfekcijas ar plazmīdām pCMVcore (1. rinda), pCMVcoreKozak (2. un 4. rindas) un pCMVcoreIRES (3. rinda). HCV kora proteīns tika detektēts, izmantojot trušu poliklonālo anti-HCV core antivielu 34-7 un TRITC-konjugētu anti-trušu imunoglobulīnu G (IgG) (A kolonna); kodola krāsošanai tika izmantots DAPI (B kolonna); A un B pārklājums (C kolonna); *BHK-21* šūnas, kas neproducē HCV kora proteīnu pēc krāsošanas ar poliklonālām anti-HCV kora antivielām 34-7 un TRITC-konjugētu anti-trušu imunoglobulīnu G (IgG) iegūtās HCV kora proteīna gēna ekspresijas imunocitoķīmiskā detekcija (4. rinda, A kolonna). Mikroskopija veikta uz iekārtas Leika DM 6000 B.

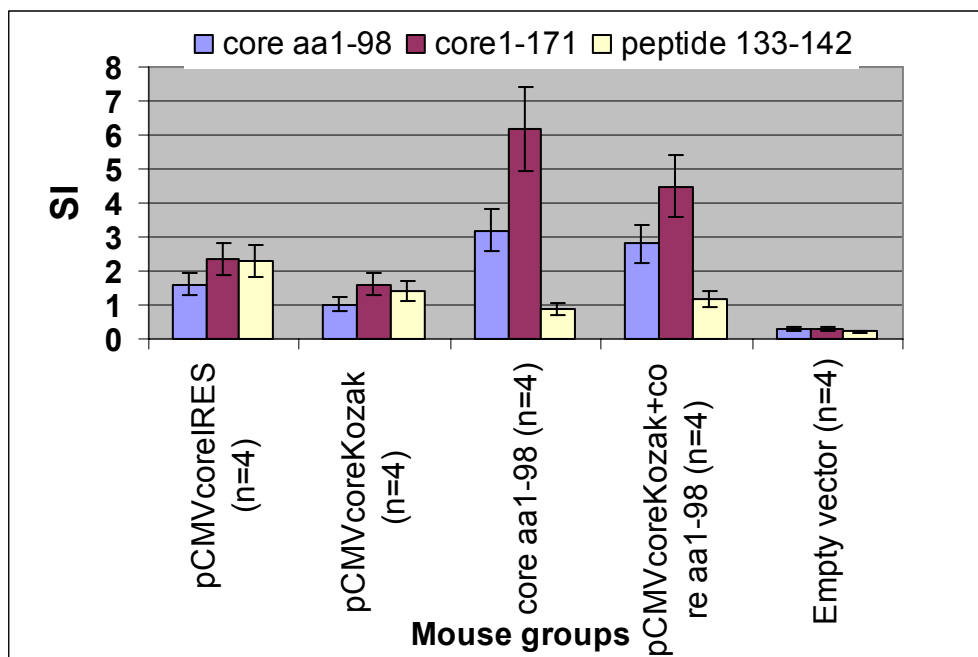
sadalījumu novēroja no pCMVcore un pCMVcoreIRES plazmīdām sintezētā HCV kora proteīna gadījumā, bet sintēzes līmenis bija zemāks, un producējošo šūnu skaits arī bija mazāks (10. attēls).

HCV kora gēna imunizācija: antivielu atbilde. 11. attēlā parādīta humorālā imūnā atbilde Balb/c pelēs, kuras imunizētas ar plazmīdām pCMVcore, pCMVcoreIRES un pCMVcoreKozak, proteīnu M220-25 vai plazmīdu pCMVcoreKozak sākotnējai imunizācijai un M220-25 atkārtotai imunizācijai. Asinis dzīvniekiem tika noņemtas 21. un 35. dienā. Specifiskā antivielu atbilde 35. dienā bija būtiski augstāka. Atbilde 21. dienā bija tādā pat līmenī, kādu nodrošināja tikai pats vektors, kuru eksperimentā uzskatīja par negatīvo kontroli. Augstākie anti-HCV core titri tika novēroti pēc DNS (pCMVcoreKozak) izmantošanas sākotnējai imunizācijai un proteīna M220-25 izmantošanas atkārtotajai imunizācijai. *Kozak* sekvences insertēšana tikai nedaudz ietekmēja antivielu atbildi, kamēr DNS vakcinācijā pret HCV *Kozak* sekvencei kombinācijā ar sekojošo atkārtoto imunizāciju ar līdzīgu proteīnu bija pozitīva ietekme.



11. attēls. *Anti-HCV kora antivielu titri 42. un 56. dienā pēc Balb/c pelu imunizācijas. Seruma antivielas tika pārbaudītas ELISA testā pret specifisko proteīnu M220-25 (HCV core 1.-98. ask).*

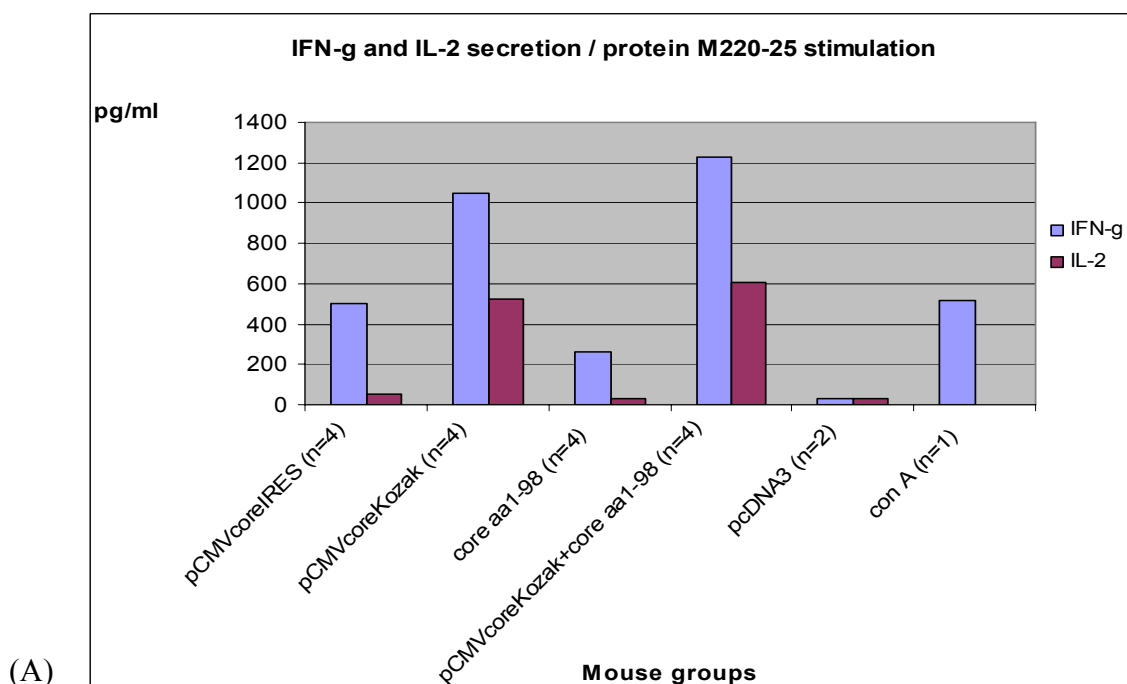
HCV core gēna imunizācija: T-šūnu proliferatīvā atbilde. Stimulēšana tika veikta ar HCV proteīniem M220-25 (1.-98. ask), M273-2 (1.-171. ask) un HCV peptīdu MS94-44 (133.-142. ask) (6. attēls). Visos gadījumos proliferācijas līmenis bija augstāks, ja par stimulējošo proteīnu izmantoja M273-2, bet maksimālo līmeni sasniedza, ja imunizācijā izmantoja proteīnu M220-25. Ja salīdzina DNS imunizācijas rezultātus, visaugstāko proliferāciju sasniedza



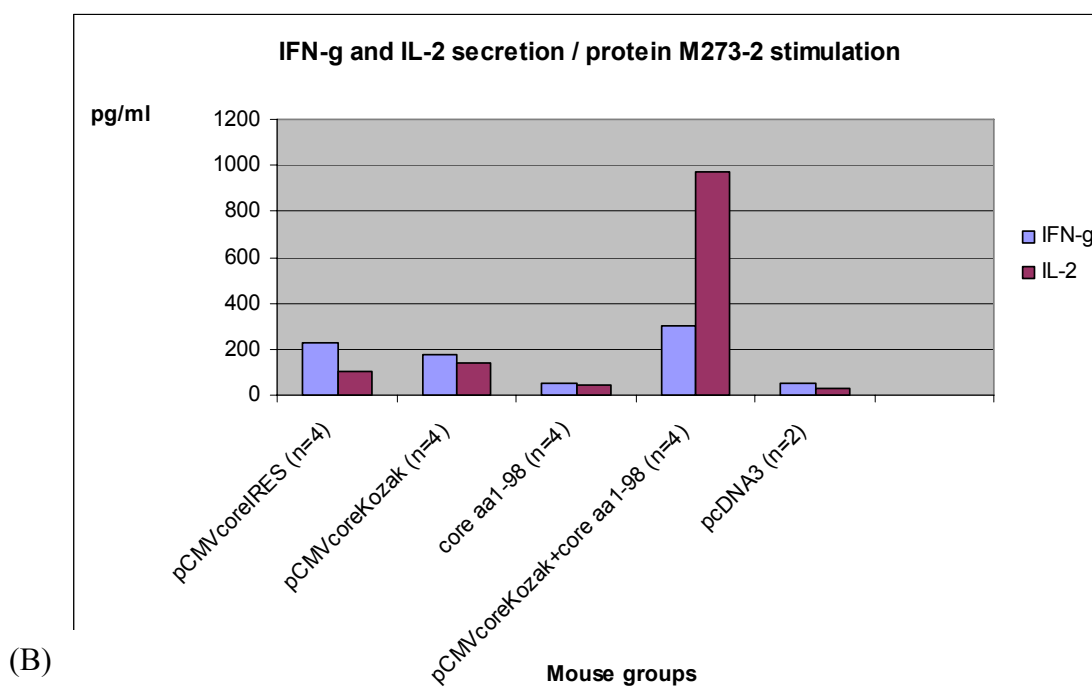
12. attēls. *Stimulācijas indeksi in vitro tika aprēķināti, izmantojot antigēnus (M220-25 un M273-2) vai peptīdu MS94-44 koncentrācijās no 0,1 līdz 1,0 µg/ml.*

gadījumā, kad sākotnējai imunizācijai izmantoja pCMVcoreKozak, bet atkārtotajai imunizācijai – proteīnu M220-25, kamēr viena pati plazmīda pCMVcoreKozak deva viszemāko proliferāciju.

13A. un 13B. attēlos parādīti Th1 šūnu izcelsmes citokīnu IL-2 un IFN-γ tiešie mērījumi (ELISA). Visefektīvākā IFN-γ un IL-2 produkcija tika konstatēta gadījumā, kad pCMVcoreKozak tika izmantota sākotnējai imunizācijai, bet M220-25 – atkārtotai, kas norāda uz proliferatīvo atbildi. Nevienā variantā netika konstatēta IL-4 producēšana.



(A)



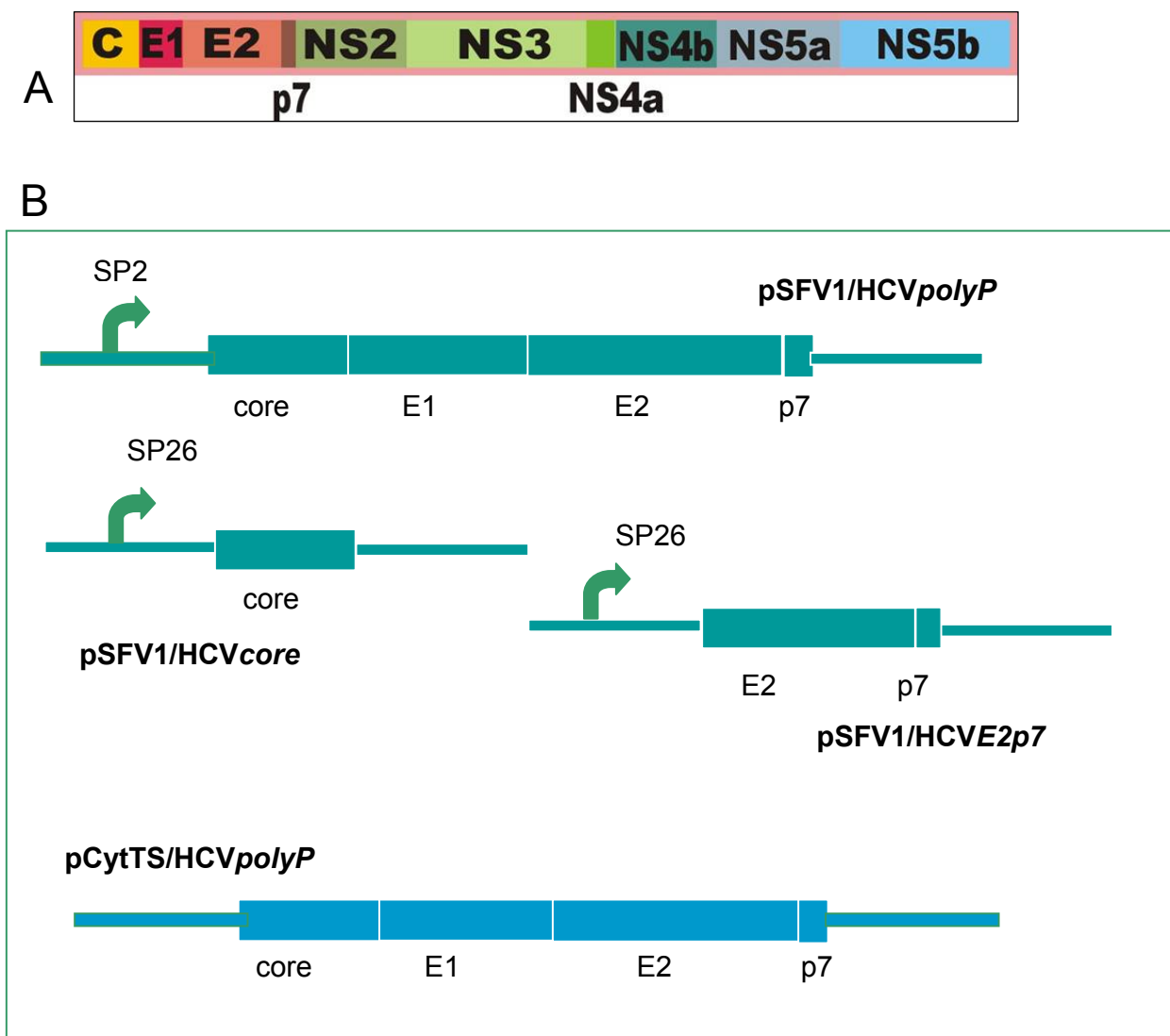
13. attēls. *Citokīna producēšana Balb/c pelēs: pret proteīnu M220-25 (HCV core 1-98) (A); pret proteīnu M273-2 (HCV core 1-171) (B).*

Darbā tika pētīta Balb/c peļu intramuskulārās imunizācijas ar rekombinanto HCV kora proteīnu saturošas DNS ietekme uz spēju inducēt HCV-core specifisko humorālo un cellulāro imūno atbildi. Tika parādīts, ka, iespējams, labākus rezultātus varētu sasniegt, ja *Kozak* sekvenca tiktu pievienota gēnam, un ka atkārtotā HCV kora proteīna injicēšana var paaugstināt Th1 tipa imūno atbildi, kas sākotnēji iegūta ar šo DNS vakcīnu. Antigēnspecifiskā IFN- γ un IL-2 producēšana liesas šūnu kultūrās pieauga 1,5-4 reizes pēc atkārtotas imunizēšanas ar proteīnu salīdzinājumā ar DNS vakcinēšanu, kamēr pēc imunizēšanas tikai ar HCV kora proteīnu novēroja tikai marginālus šo Th1 citokīnu līmeņus, uzsverot heterologās sākotnējās-atkārtotās imunizācijas priekšrocības.

Rekombinanto HCV gēnu insertus saturošo SFV un Sindbis vīrusu plazmīdu ar radīšana. Lai pārbaudītu SFV ekspresijas sistēmas spēju translēt HCV gēnus, tika radītas plazmīdas, kas ekspresēja poly P (core-E1-E2-p7), HCV core un E2p7 gēnus (14. attēls). Poly P (core-E1-E2-p7), HCV core un E2p7 gēnu DNS kopijas tika amplificētas un ieklonētas pSFV1 ekspresijas vektorā zem SFV subgenomiskā 26S promotora kontroles. Iegūtās plazmīdas pSFV1/HCVpolyP, pSFV1/HCV core un pSFV1/HCV E2p7 tika izmantotas kā matricas SFV rajona *in vitro* transkripcijai ar SP6 RNS polimerāzi. Subgenomiskās RNS, kas kodēja dažādas HCV sekvences (atkarībā no konstruētās plazmīdas), kalpoja par matricām HCV gēnu translācijai.

Katras konstrukcijas gadījumā rekombinantās SFV daļiņas tika iegūtas ar vienlaicīgu

šūnu elektroporāciju ar atbilstošās konstrukcijas subgenomisko RNS un palīg SFV RNS. Šiem eksperimentiem izmantotās BHK-21 šūnas nav dabīgās HCV saimniekšūnas. Tomēr, tās ir optimālas inficēšanai un rekombinanto SFV daļiņu radīšanai, dodot iespēju sasniegt augstus rekombinanto proteīnu iznākumus.



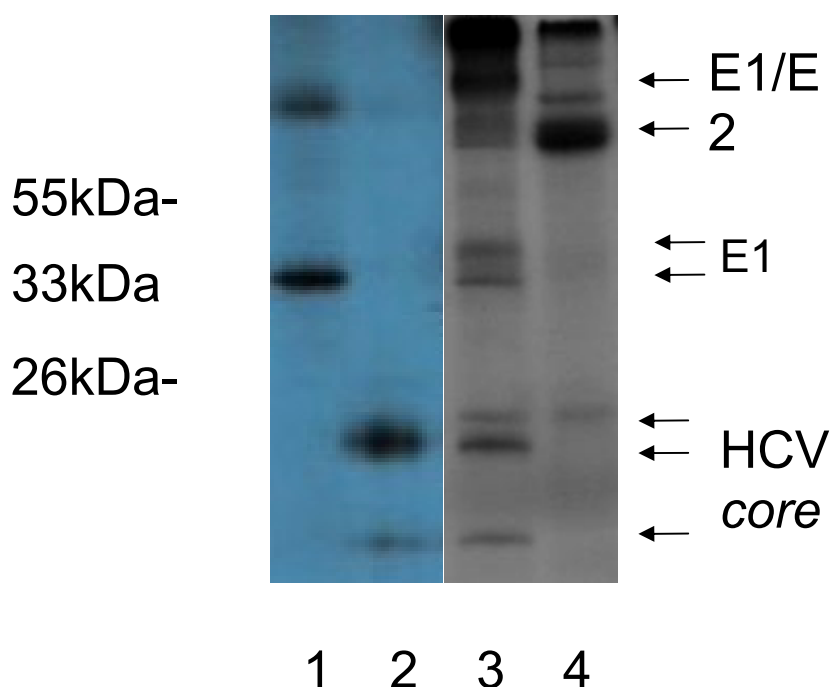
14. attēls. *HCV proteīnu translācijas pētījumiem paredzēto rekombinanto SFV konstrukciju shematisks attēlojums. HCV proteīni: kora, E1, E2 – strukturālie proteīni, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A un NS5B – nestrukturālie proteīni, p7 – mazs proteīns ar nezināmām funkcijām (A). HCV proteīnu gēni, kas šajā pētījumā izmantoti rekombinanto plazmīdu konstruēšanai (B).*

HCV polyP fragmentu, kas kodēja strukturālos proteīnus un proteīnu p7, ieklonēja arī pCytTS vektorā. pCytTS ir ekspresijas vektors, kas atvasināts no Sindbis vīrusa. Rekombinantā plazmīda pCyt/HCV polyP tika izmantota BHK-21 šūnu transficēšanai, lai ekspresētu HCV proteīnus arī citos alfavīrusos (ne tikai SFV) (14. attēls).

Pētījumā tika izvēlēts HCV genotips 1b, jo tas ir plaši izplatīts, un tieši 1b genotips

dominē Latvijā, kā arī ir zināms, ka tas ir saistīts ar augstāku HCV RNS līmeni, smagāku slimības gaitu un sliktāku reakciju uz ārstēšanu (Tanaka et al., 1996; Kobayashi et al., 1996).

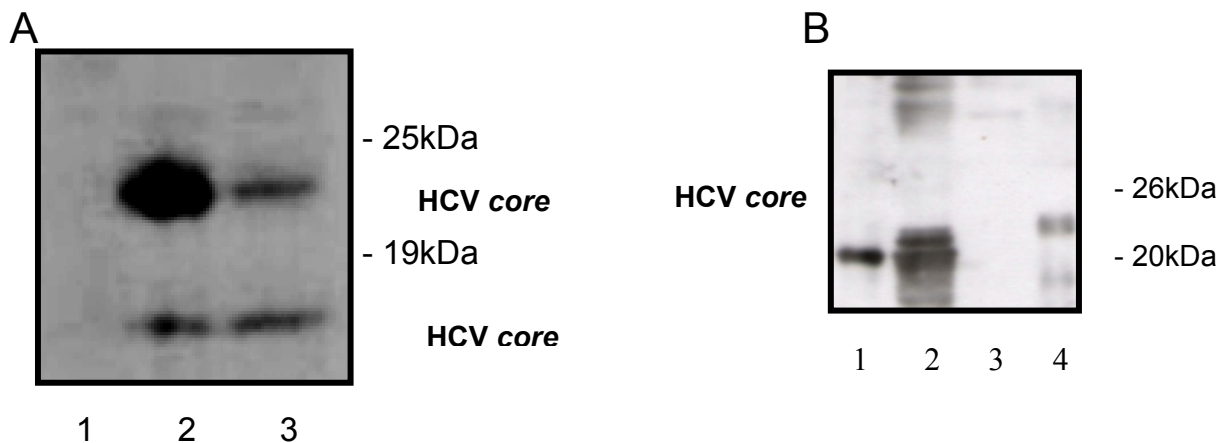
HCV gēnu ekspresija BHK-21 šūnās. HCV proteīni tika analizēti BHK-21 šūnu lizātā 24 stundas pēc transfekcijas ar rekombinanto RNS vai inficēšanas ar rekombinanto SFV virālo daļiņu. Proteīnu elektroforētiskajā sadalījumā 70 kDa zona atbilst E2 proteīnam, 33 un 35 kDa zonas atbilst galvenajām glikozilētajām E1 formām un atlikušās zonas atbilst HCV core (15. attēls, 3. līnija). Nevienā eksperimentā netika detektēta smagākā HCV kora proteīna forma, iespējamais cēlonis varētu būt atšķirīgais sintezētā proteīna līmenis, un mazākās HCV kora proteīna formas palika nedetektējamas. No tikai HCV core gēnu ekspresējošās konstrukcijas iegūtās proteīnu molmasas bija identiskas HCV kora proteīna molmasai, kura tika iegūta no konstrukcijas, kas kodēja HCV strukturālos proteīnus (15. un 16A. attēli).



15. attēls. *HCV strukturālo proteīnu gēnu ekspresija BHK-21 šūnās pēc inficēšanas ar rekombinantajiem vīrusiem.* BHK-21 šūnu lizāts (buferis ar NP-40) pēc inficēšanas ar SFV1/EGFP kā kontrole (1. līnija); BHK-21 šūnu lizāts (buferis ar NP-40) pēc inficēšanas ar SFV1/HCVcore (2. līnija); BHK-21 šūnu lizāts (buferis ar NP-40) pēc inficēšanas ar SFV1/HCVpolyP (3. līnija); BHK-21 šūnu lizāts (buferis ar NP-40) pēc inficēšanas ar rSFV1/HCV E2p7 (4. līnija). Kā molmasas marķierus izmantoja Prestained Protein Molecular Weight Markers (Fermentas).

HCV gēnu ekspresija tika analizēta BHK-21 šūnās arī pēc transficēšanas ar pCyt/HCVpolyP plazmīdu. Šūnas tika lizētas 72 stundas pēc termoindukcijas lizēšanas buferī,

kas saturēja NP-40, vai Laemmli buferī (Laemmli, 1970). HCV gēnu ekspresijas efektivitāte un atbilstošo proteīnu imunoloģiskais specifiskums tika pierādīts ar *Western blotu*. Kopējā šūnu lizātā tika identificēti HCV kora proteīna varianti ar atšķirīgu molmasu - 21 kDa un 23 kDa. Zem galvenajām p23 un p21 HCV kora proteīna zonām novērojamas zonas atbilst 16 kDa HCV kora

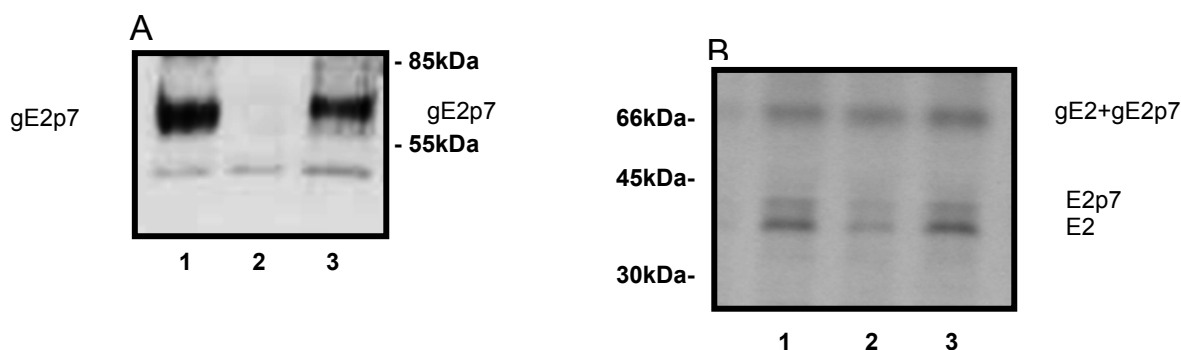


proteīna formai (16B. attēls).

16. attēls. **HCV kora proteīna gēnu ekspresija BHK-21 šūnās:** *Western blots ar trušu poliklonālajām anti-HCV kora antivielām. (a) HCV kora proteīna gēna ekspresija BHK-21 šūnās pēc inficēšanas ar rekombinantajiem vīrusiem rSFV1/HCVpolyP un rSFV1/HCVcore: BHK-21 šūnu lizāts (buferis ar NP-40) pēc inficēšanas ar SFV1/EGFP kā kontrole (1. līnija); BHK-21 šūnu lizāts (buferis ar NP-40) pēc inficēšanas ar SFV1/HCV core (2. līnija); BHK-21 šūnu lizāts (buferis ar NP-40) pēc inficēšanas ar rSFV1/HCVpolyP (līnija 3). (b) HCV core gēna ekspresija BHK-21 šūnās pēc plazmīdas pCyt/HCVpolyP transfekcijas ar komerciālā komplekta (Fermentas) palīdzību: Western blots ar trušu poliklonālajām anti-HCV kora antivielām. BHK-21 šūnu lizāts (buferis ar NP-40) pēc transfekcijas ar pCyt/HCVpolyP lizātu (1. līnija); BHK-21 šūnu kopējais lizāts (buferis ar NP-40) pēc transfekcijas ar pCyt/HCVpolyP (līnija 2); negatīvā kontrole – neinficētu BHK-21 šūnu lizāts (Laemmli buferis) (3. līnija); attīrīts rekombinantais HCV kora proteīns no E.coli, 25 pikomoli (4. līnija). Kā molmasas marķierus izmantoja Prestained Protein Molecular Weight Markers (Fermentas).*

E2 un E2p7 proteīnu klātbūtne tika pierādīta BHK-21 šūnu lizātos pēc inficēšanas ar rekombinantajiem SFV1/HCV E2p7 un SFV1/HCVpolyP vīrusiem (17. attēls). E2 proteīna specifiskumu pierādīja ar *Western blotu*, imunoprecipitāciju un imunocitoķīmisko analīzi ar attiecīgajām anti-E2 antivielām. Pētījumā abi proteīnu spektri pēc inficēšanas ar rekombinantajiem vīrusiem bija vienādi, un E2 proteīns eksistēja glikozilētā formā ar molmasu ap 70 kDa (17A. attēls). Atšķirīgās E2 proteīna formas, kas attiecās uz glikozilētu E2 (apmēram 70 kDa), ngE2p7 (41 kDa) un ngE2 (36 kDa), tika sakoncentrētas no šūnu lizātiem pēc

inficēšanas ar rekombinanto SFV1/HCVE2p7 vīrusu, izmantojot imunoprecipitāciju ar atbilstošu anti-E2 antivielu (17B. attēls). HCV E2 proteīna lokalizācija inficēto šūnu citoplazmā tika noteikta ar imunocitoķīmisko analīzi (rezultāti nav parādīti).

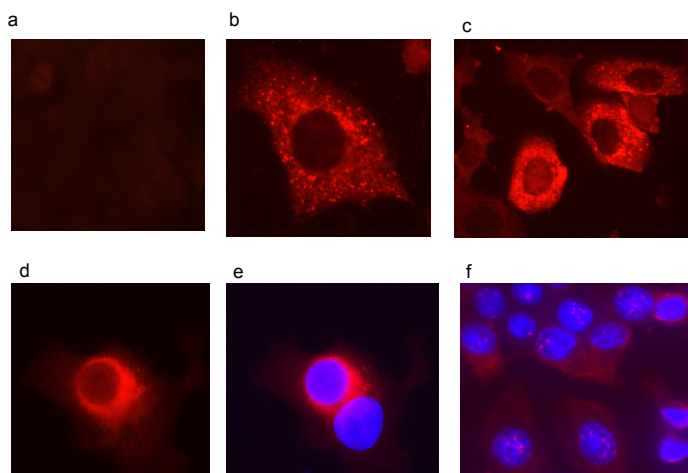


17. attēls. *HCV E2 proteīna gēna ekspresija BHK-21 šūnās pēc inficēšanas ar rekombinantajiem vīrusiem SFV1/HCVpolyP un SFV1/HCVE2p7. (a) Western blots ar trušu poliklonālajām anti-HCV E2 antivielām: BHK-21 šūnu lizāts (Laemmlī buferis) pēc inficēšanas ar SFV1/HCVpolyP (1. līnija); negatīvā kontrole – neinficētu BHK-21 šūnu lizāts (Laemmlī buferis) (2. līnija); BHK-21 šūnu lizāts (Laemmlī buferis) pēc inficēšanas ar SFV1/HCV E2p7 (3. līnija). (b) E2 un E2p7 proteīna imunoprecipitācija no šūnu lizātiem pēc inficēšanas ar rekombinantajiem vīrusiem SFV1/HCVpolyP un SFV1/HCVE2p7: imunoprecipitācija ar dažādām trušu poliklonālajām anti-E2 antivielām (1., 2. un 3. līnijas). Kā molmasas marķierus izmantoja Prestained Protein Molecular Weight Markers (Fermentas).*

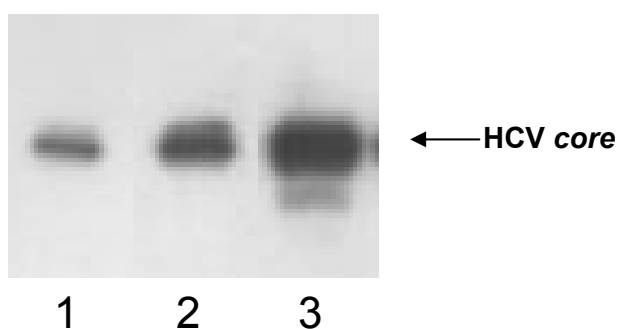
Imunocitoķīmijas dati, imunoprecipitācija no šūnu lizāta un Western blota dati ar atbilstošām anti-kora un anti-E2 poliklonālajām antivielām deva iespēju izdarīt šādus secinājumus: rekombinantie vīrusi augstā līmenī ekspresē HCV kora un E2, kas pēc tam tiek autentiski posttranslacionāli procesēti.

HCV kora proteīna lokalizācija šūnās. HCV kora proteīna lokalizācijai sekoja ar imunocitoķīmiskās analīzes metodēm, izmantojot poliklonālo truša antivielu saistīšanos pie HCV antigēniem. Pozitīvi krāsojošos šūnu procentuālais skaits pieauga pirmo 24 stundu laikā pēc inficēšanas. Vairumā gadījumu maksimums tika sasniegts pēc 24 stundas. Visu konstrukciju gadījumā pozitīvi krāsojošos šūnu skaits sasniedza līdz pat 80%. HCV kora proteīns atradās galvenokārt citoplazmā, bet tā atrašanās vieta dažādos laikos pēc inficēšanas bija atšķirīga. Ceturtajā un astotajā stundā pēc šūnas inficēšanas ar rekombinanto vīrusu HCV kora proteīns tika atrasts tikai citoplazmā. 16 stundas pēc inficēšanas HCV kora proteīns koncentrējās perinukleārajā rajonā. Tikai 24 stundas pēc inficēšanas apmēram 15% HCV kora proteīna tika atrasti kodolā (18. attēls). Tomēr korelāciju starp dažādajām HCV kora proteīna formām un to

lokalizāciju neizdevās atrast.



18. attēls. *HCV kora proteīna gēna ekspresijas imunocitoķīmiska detektēšana BHK-21 šūnas tika inficētas ar rekombinanto vīrusu SFV1/HCVcore. Inficētās šūnas krāsoja ar trušu anti-HCV kora antivielām (1:1000) un sekundārajām anti-trušu TRITC antivielām (1:100). (a). Neinficētās BHK-21 šūnas krāsoja ar trušu anti-HCV core antivielām (1:1000) un sekundārajām anti-trušu TRITC antivielām (1:100). (b). Kora proteīna sadalījums 4 stundas pēc inficēšanas; (c). Kora proteīna sadalījums 8 stundas pēc inficēšanas; (d). Kora proteīna sadalījums 16 stundas pēc inficēšanas; (e) Kora proteīna sadalījums 16 stundas pēc inficēšanas. Kodola vizualizēšanai izmantoja DAPI; (f). Kora proteīna sadalījums 24 stundas pēc inficēšanas. Kodola vizualizēšanai izmantoja DAPI. Mikroskopija veikta uz iekārtas Leika DM 6000 B.*

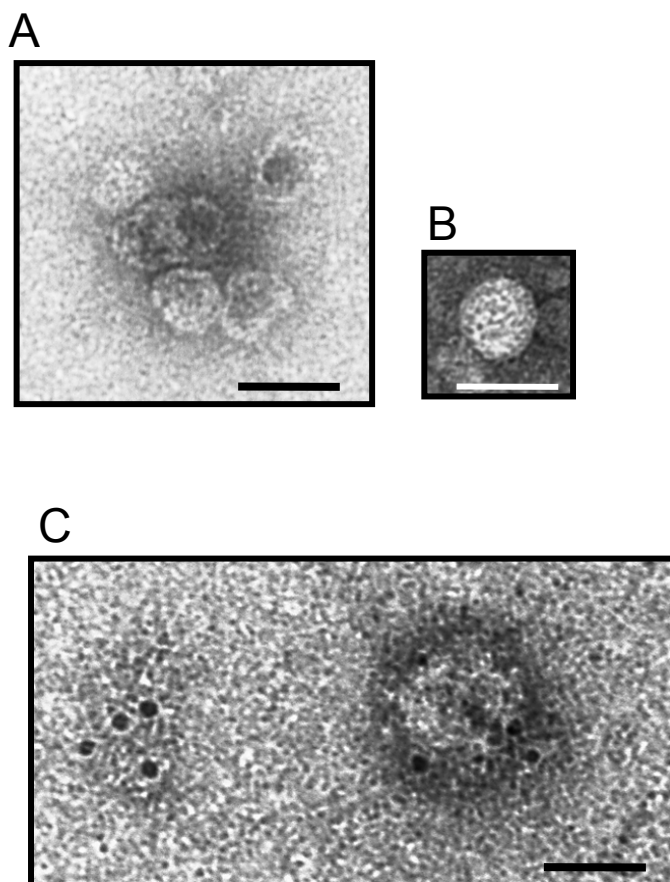


19. attēls. *HCV kora proteīna gēna ekspresija BHK-21 šūnās pēc inficēšanas ar rekombinanto vīrusu SFV1/HCVcore dažādos laika periodos pēc inficēšanas: atšķirīgu HCV kora proteīna formu noteikšana ar Western blotu ar trušu poliklonālajām anti-HCV kora antivielām. HCV kora proteīns no BHK-21 šūnu kopējā lizāta (Laemmlī buferis) 4 stundas pēc inficēšanas (1. līnija); HCV kora proteīna p21 forma un neliels daudzums p23 formas BHK-21 šūnu kopējā lizātā (Laemmlī buferis) 8 stundas pēc infekcijas (2. līnija); HCV kora proteīna p21, p23 un p16 formas BHK-21 šūnu kopējā lizātā (Laemmlī buferis) 24 stundas pēc infekcijas (3. līnija). Kā*

molmasas marķierus izmantoja Prestained Protein Molecular Weight Markers (Fermentas).

Četras stundas pēc inficēšanas tikai p21 formu varēja detektēt šūnu lizātā. Astoņas stundas pēc inficēšanas p21 formu un tādu pašu daudzumu p23 formas varēja detektēt šūnu lizātā. Īsākā HCV kora proteīna forma (16 kDa) tika detektēta tikai 24 stundas pēc inficēšanas (19. attēls).

HCV strukturālo proteīnu savākšanās. Lai novērtētu HCV strukturālo proteīnu spēju savākties vīrusveidīgās daļiņās, dzirdinātus šūnu lizātus pēc inficēšanas ar rekombinantajiem vīrusiem pSFV1/HCVpolyP vai pSFV1/HCVcore (vai atbilstošās RNS elektroporācijas) centrifugēja caur saharozes “spilvenu”. Nogulsnes izšķīdināja TNE buferī, un divu HCV strukturālo proteīnu – kora un E2 klātbūtni analizēja ar *Western blotu*. Abus proteīnus atrada nogulsnēs (rezultāti nav parādīti). Virālās HCV daļiņas tika vizualizētas ar elektronu mikroskopiju. Vispirms, pēc inficēšanas ar SFV1/HCVpolyP rekombinanto vīrusu vai SFV1/HCVcore tika detektētas 35-37 nm HCV kora daļiņas (20A. un 20B. attēli) HCV strukturālo proteīnu veidotās 60 nm diametra HCV līdzīgās daļiņas tika novērotas šūnās, kas inficētas ar SFV1/HCVpolyP rekombinanto vīrusu (vai elektroporētas ar atbilstošo RNS), bet šūnu lizātos šādu daļiņu skaits bija mazs (20C. attēls).

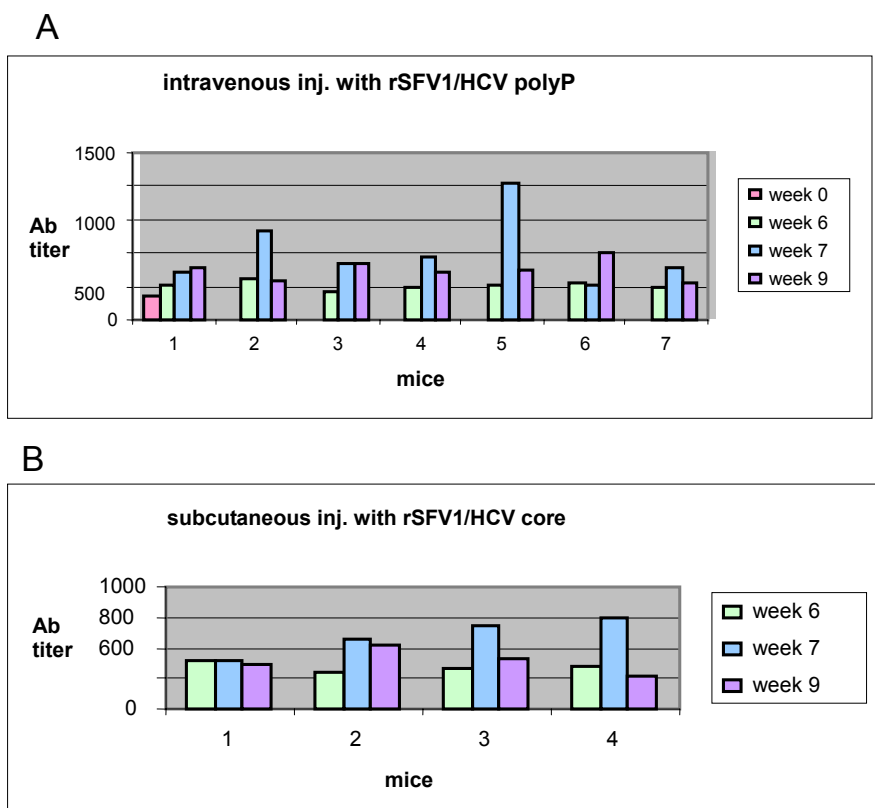


20. attēls. *Attīrīto HCV-veidīgo daļiņu elektronu mikroskopija. (a) HCV kora daļiņas SFV1/HCVcore transficētu šūnu lizātā ar NP-40; (b) HCV kora daļiņa; (c) HCV līdzīgo daļiņu*

imunozelta iezīmēšana ar anti-E2 poliklonālajām antivielām. Svītra atbilst 50 nm.

Blančarda elektronmikroskopiskie novērojumi līdzīgos eksperimentos arī parādīja, ka tikai dažas daļiņas bija pilnībā atdalījušās no šūnu membrānu endoplazmatiskā tīkla (Blanchard et al., 2002, 2003a, 2003b). Iespējams, HCV līdzīgo daļiņu atbrīvošanai nepieciešami kādi saimniekšūnas faktori, un darbā piedāvātais SFV modelis dod iespēju identificēt virālo elementu, tādu kā p7 vai 5'NTR RNS un/vai saimniekšūnas faktoru, potenciālo lomu HCV līdzīgo daļiņu morfoģenēzē. Tādā veidā SFV ekspresijas sistēmā iegūtās HCV līdzīgās daļiņas pēc optimizācijas var tikt izmantotas par audu kultūras modeli HCV infekcijai, pilnīgākai HCV savākšanās procesu izpratnei un HCV morfoģenēzes pētījumiem. Turklāt, HCV proteīni HCV līdzīgās daļiņās, iespējams, eksistē natīvā, virionveidīgā konformācijā, un, tādejādi, var kalpot par lielisku HCV vakcīnas kandidātu .

Peļu imunizācija ar rekombinantajiem vīrusiem: antivielu atbilde. Balb/c līnijas peles tika imunizētas ar rekombinantajiem pSFV1/HCVcore, pSFV1/HCVpolyP, vai pSFV1/EGFP vīrusiem. Divas grupas tika imunizētas ar katru vīrusu (viena – zem ādas, otra –



21. attēls. *Anti-HCV kora antivielu titri 42. un 49. dienā pēc Balb/c peļu imunizācijas. Seruma antivielas tika pārbaudītas ELISA testā pret specifisko proteīnu M220-25 (HCV core 1.-98. ask):*
A. *Anti-HCV antivielu titri pēc peļu imunizēšanas ar rekombinanto SFV1/HCVpolyP vīrusu peles*

astes vēnā; B. Anti-HCV antivielu titri pēc peļu imunizācijas ar rekombinanto SFV1/HCVpolyP vīrusu zem ādas.

intravenozi). Peļu serumos, kurus savāca katru nedēļu pēc vīrusa injicēšanas, ar ELISA metodi tika noteikta spēja atpazīt rekombinanto kora proteīnu un sintētiskos peptīdus. Katrā grupā tikai dažām pelēm novēroja būtiskus anti-HCV kora antivielu līmeņus. Iegūtie rezultāti norāda, ka maksimālo atbildi novēro 42. dienā (1 nedēļu pēc atkārtotās imunizācijas) un 49. dienā (2 nedēļas pēc atkārtotās imunizācijas). Antivielu titri vienmēr bija augstāki intravenozās imunizācijas gadījumā (21A. un 21B. attēls).

Iegūtie dati var kalpot par pamatu tālākiem HCV strukturālo proteīnu gēnus nesošiem rekombinanto alfavīrusu pētījumiem, jo šādi rekombinantie alfavīrusi varētu tikt izmantoti kā iespējamie kandidāti anti-HCV vakcīnas izstrādei. Acīmredzams, ka nepieciešams optimizēt imunizācijas shēmu. Mēs uzskatām, ka heterologā sākotnējās-atkārtotās imunizācijas shēmas izmantošana palīdz uzlabot imunoloģisko atbildi pēc imunizācijas un vēlams kombinēt imunizāciju ar rekombinantajām SFV vīrusa daļiņām un DNS imunizāciju vai imunizāciju ar HCV veidīgām daļiņām vai himerām HCV daļiņām.

Secinājumi

1. Savam pētījumam kā visperspektīvākos imunogēnus mēs izvēlējāmies HCV E2 un kora proteīna gēnus. Vispirms, izmantojot DNS vakcinēšanu, mēs novērtējām šo HCV strukturālo proteīnu gēnu imunogenitāti. Peļu imunizācijai un imūnās atbildes izvērtēšanai tika konstruēti trīs E2 proteīna gēnu saturošu plazmīdu varianti. Šim mērķim tika izveidotas arī trīs plazmīdas, kas atšķirīgā kontekstā zem CMV regulācijas saturēja HCV kora proteīna gēnu.
2. Pēc savas spējas inducēt B un T šūnu atbildi Balb/c pelēs pilna garuma E2/p7 gēns ar pagarinātu E2 signālsekvenci (E2/p7-2) bija pārāks par E2/p7, kas saturēja tikai E2 signālsekvences C-galu (E2/p7-1), un par atskaites E2 gēnu (E2/p7), kas kodēja E2 saīsināto variantu ar E2 signālsekvences C-galu, bet nesaturēja p7 translokācijas apturēšanas signālu. E2 signālsekvences izmaiņas deva iespēju pastiprināt imunogenitāti, saglabājot pilna garuma E2 un p7 sekvenču un, attiecīgi ārējos/heterologos signālus, īpašību, kas ir svarīga multispecifiskas anti-HCV imūnās atbildes sasniegšanā.
3. Tika parādīts, ka *Kozak* konsensus sekvenču iekļaušana ievērojami stimulē HCV kora sintēzi *in vitro* translācijas sistēmā un kultivējamo šūnu līnijās, bet tai nebija novērojama efekta uz humorālo un šūnu imūno atbildi pēc DNS imunizācijas. Sākotnējā imunizācija ar DNS ar sekojošo atkārtoto imunizāciju ar proteīnu tika atzīta par visefektīvāko imunizācijas shēmu HCV kora specifiskās imūnās atbildes inducēšanai.
4. Lai pārbaudītu SFV ekspresijas sistēmas spēju translēt HCV proteīnus, tika radītas rekombinantās SFV konstrukcijas, kas ekspresēja poly P (core-E1-E2-p7), HCV core un E2p7 gēnus. Katrai konstrukcijai tika izveidotas atbilstošas rekombinantas SFV daļiņas, kuras izmantoja BHK-21 šūnu inficēšanai. HCV polyP fragmentu, kas kodēja strukturālos proteīnus un proteīnu p7, ieklonēja arī pCytTS vektorā. Rekombinantā plazmīda pCyt/HCV polyP tika izmantota BHK-21 šūnu transficēšanai, lai ekspresētu HCV proteīnus.
5. Izmantojot rekombinantus alfavīrusus, šūnu kultūrā bija paredzēts augstā līmenī ekspresēt autentiski posttranslacionāli procesētus HCV kora un E2 proteīnus. HCV kora un E2 proteīnu specifiskumu apstiprināja ar imunocitoķīmiskajiem datiem,

imunoprecipitāciju no šūnu lizātiem un *Western blotu* ar atbilstošām anti-kora un anti-E2 poliklonālajām antivielām.

6. Ar elektronu mikroskopijas palīdzību pierādīts, ka veidojas homogēnas HCV kora veidīgas 35-37 nm daļiņas (7A un 7B. attēls). Bez tam tika novērotas HCV-veidīgas daļiņas, kuru diametrs bija 60 nm. Šis atklājums vēlreiz apstiprināja HCV proteīnu spēju alfavīrusu ekspresijas sistēmā pareizi procesēties, un aplūkotā pētījuma rezultāti ir parādījuši principiālu iespēju izmantot alfavīrusu sistēmu HCV-veidīgo daļiņu kā jauna veida HCV imunogēnu radīšanai Tomēr pirms šādu secinājumu izdarīšanas par šās pieejas perspektīvām nepieciešams turpināt pētījumus.
7. Rekombinantie pSVF1/HCVcore un pSVF1/HCVpolyP vīrusi tika izmantoti peļu imunizācijai. Tika novērtēti antivielu titri imunizēto peļu asins serumā. Iegūtie dati var kalpot par pamatu tālākiem HCV strukturālo proteīnu gēnus nesošiem rekombinanto alfavīrusu pētījumiem, jo šādi rekombinantie alfavīrusi varētu tikt izmantoti kā iespējamie kandidāti anti-HCV vakcīnas izstrādei. Papildus pūles būtu jāvelta imunizācijas shēmas tālākai optimizācijai: saskaņā ar atskaites datiem visperspektīvākā ir heterologā sākotnējās-atkārtotās imunizācijas shēma.

Literatūras saraksts / References

- Alter H.J., 1995. To C or not to C: these are the questions. *Blood*. 85:1681-1695.
- Amara R.R., Villinger F., Altman J.D., Lydy S.L., O'Neil S.P., Staprans S.I., Montefiori D.C., Xu Y., Herndon J.G., Wyatt L.S., Candido M.A., Kozyr N.L., Earl P.L., Smith J.M., Ma H.L., Grimm B.D., Hulseley M.L., Miller J., McClure H.M., McNicholl J.M., Moss B., Robinson H.L. 2001. Control of mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine. *Science*. 292:69-74.
- Bassett S.E., Thomas D.L., Brasky K.M., Lanford R.E.. 1999. Viral persistence, antibody to E1 and E2, and hypervariable region 1 sequence stability in hepatitis C virus-inoculated chimpanzees. *J. Virol*. 73:1118-26.
- Baumert T. F., Ito S., Wong D. T., Liang, T. J. 1998. Hepatitis C virus structural proteins assemble into virus like particles in insect cells. *J. Virol*. 72:3827-3836.
- Bartenshlager R., Lohmann V. 2001. Novel cell culture systems for the hepatitis C virus. *Antiviral Research*. 52:1-17.
- Blanchard E., Brand D., Trassard S., Goudeau A., Roingeard P. 2002. Hepatitis C Virus-Like Particle Morphogenesis. *J.Virol*. 76:4073-4079.
- Blanchard E., Brand D., Roingeard P. 2003a. Endogenous virus and hepatitis C virus-like particle budding in BHK-21 cells. *J. Virol*. 77:3888-3889.
- Blanchard E., Houriox C., Brand D., Ait-Gouhoulte M., Moreau A., Trassard S., Sizaret P.-Y., Dubois F., Roingeard P. 2003b. Hepatitis C virus-like particle budding: role of core protein and importance of its Asp111. *J.Virol*. 77:10131-10138.
- Berglund P., Sjöberg M., Garoff H., Atkins G. J., Sheahan B. J., Liljeström P. 1993. Semliki Forest virus expression system: production of conditionally infectious recombinant particles. *BioTechnology*. 11:916-920.
- Berglund P., Fleeton M.N., Smerdou C., Liljeström P. 1999. Immunization with recombinant Semliki

- Forest virus induces protection against influenza challenge in mice. *Vaccine*. 17:497-507.
- Boorsma M., Nieba L., Koller D., Bachmann M., Bailey J.E., Renner W.A. 2000. A temperature-regulated replicon-based DNA expression system. *Nat Biotechnol*. 18:429-432.
- Brand D., Lemiale F., Turbica I., Buzelay L., Brunet S., Barin F. 1998. Comparative analysis of humoral immune responses to HIV type 1 envelope glycoproteins in mice immunized with a DNA vaccine, recombinant Semliki Forest virus RNA, or recombinant Semliki Forest virus particles. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 14:1369-1377.
- Brinster C., Chen M., Boucreux D., Paranhos-Baccala G., Liljeström P., Lemmonier F., Inchauspé G. 2002. Hepatitis C virus non-structural protein 3-specific cellular immune responses following single or combined immunization with DNA or recombinant Semliki Forest virus particles. *J. Gen. Virol*. 83:369-381.
- Caley I.J., Betts M.R., Irlbeck D.M., Davis N.L., Swanstrom R., Frelinger J.A., Johnston R.E. 1997. Humoral, mucosal, and cellular immunity in response to a human immunodeficiency virus type 1 immunogen expressed by a Venezuelan equine encephalitis virus vaccine vector. *J. Virol*. 71:3031-3038.
- Chiba J., Ohba H., Matsuura Y., Watanabe Y., Katayama T., Kikuchi S., Saito I., Miyamura T. 1991. Serodiagnosis of hepatitis C virus (HCV) infection with an HCV core protein molecularly expressed by a recombinant baculovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88:4641-4645.
- Chien D.Y., Choo Q.L., Tabrizi A., Kuo C., McFarland J., Berger K., Lee C., Shuster J.R., Nguyen T., Moyer D.L. 1992. Diagnosis of hepatitis C virus (HCV) infection using an immunodominant chimeric polyprotein to capture circulating antibodies: reevaluation of the role of HCV in liver disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89:10011-10015.
- Daemen T., Pries F., Bungener L., Kraak M., Regts J., Wilschut J. 2000. Genetic immunization against cervical carcinoma: induction of cytotoxic T lymphocyte activity with a recombinant alphavirus vector expressing human papillomavirus type 16 E6 and E7. *Gene Ther*. 7:1859-1866.
- Dryga S.A., Dryga O.A., Schlesinger S. 1997. Identification of mutations in a Sindbis virus variant able to establish persistent infection in BHK cells: the importance of a mutation in the nsP2 gene. *Virology*. 228:74-83.
- Elmowalid G., Qiao M., Jeong S., Borg B.B., Baumert T.F., Sapp R.K., Hu Z., Murthy K., Liang T.J. 2007.

Immunization with hepatitis C virus-like particles results in control of hepatitis C virus infection in chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:8427-8432.

Ezelle H., Markovic D., Barber G. 2002. Generation of Hepatitis C Virus-Like Particles by Use of a Recombinant Vesicular Stomatitis Virus Vector. *J. Virol.* Dec. 76:12325-12334.

Fleeton M.N., P. Liljeström, B.J. Sheahan and G.J. Atkins. 2000. Recombinant Semliki Forest virus particles expressing louping ill virus antigens induce a better protective response than plasmid-based DNA vaccines or an inactivated whole particle vaccine. *J. Gen. Virol.* 81: 749–758.

Fournillier A., Depla E., Karayiannis P., Vidalin O., Maertens G, Trépo C., Inchauspé G. 1999. Expression of noncovalent hepatitis C virus envelope E1-E2 complexes is not required for the induction of antibodies with neutralizing properties following DNA immunization. *J Virol.* 73:7497-7504.

Frelin L., Ahlén G., Alheim M., Weiland O., Barnfield C., Liljeström P., Sällberg M. 2004. Codon optimization and mRNA amplification effectively enhances the immunogenicity of the hepatitis C virus nonstructural 3/4A gene. *Gene Ther.* 11:522-33.

Frolov I., Hoffman T.A., Prágai B.M., Dryga S.A., Huang H.V., Schlesinger S., Rice C.M. 1996. Alphavirus-based expression vectors: strategies and applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:11371-11377.

Frolov I., Agapov E., Hoffman T.A. Jr, Prágai B.M., Lippa M., Schlesinger S., Rice C.M. 1999. Selection of RNA replicons capable of persistent noncytopathic replication in mammalian cells. *J. Virol.* 73:3854-3865.

Glasgow G.M., McGee M.M., Tarbatt C.J., Mooney D.A., Sheahan B.J., Atkins G.J. 1998. The Semliki Forest virus vector induces p53-independent apoptosis. *J. Gen Virol.* 79:2405-2410.

Greive S.J., Webb R.I., Mackenzie J.M., Gowans E.J. 2002. Expression of the hepatitis C virus structural proteins in mammalian cells induces morphology similar to that in natural infection. *J Viral Hepat.* 9:9-17.

Heller T., Saito S., Williams J.A.T., Moreen T. R., Jazwinski A., Cruz B., Jeurkar N., Sapp R., Luo G., Liang T.J. 2005. An in vitro model of hepatitis C virion production. *PNAS*. 102:2579-2583.

- Hirowatari Y., Hijikata M., Tanji Y., Nyunoya H., Mizushima H., Kimura K., Tanaka T., Kato N., Shimotohno K. 1993. Two proteinase activities in HCV polypeptide expressed in insect cells using baculovirus vector. *Arch Virol.* 133:349-356.
- Hourieux C., Ait-Goughoulte M., Patient R., Fouquenot D., Arcanger-Doudet F., Brand D., Martin A., Roingeard P. 2007. Core protein domains involved in hepatitis C virus-like particle assembly and budding at the endoplasmic reticulum membrane. *Cell Microbiol.* 9:1014-1027.
- Hüssy P., Schmid G., Mous J., Jacobsen H. 1996a. Purification and in vitro-phospholabeling of secretory envelope proteins E1 and E2 of hepatitis C virus expressed in insect cells. *Virus Res.* 45:45-57.
- Hüssy P., Langen H., Mous J., Jacobsen H. 1996b. Hepatitis C virus core protein: carboxy-terminal boundaries of two processed species suggest cleavage by a signal peptide peptidase. *Virology.* 224:93-104.
- Hüssy P., Faust H., Wagner J.C., Schmid G., Mous J., Jacobsen H. 1997. Evaluation of hepatitis C virus envelope proteins expressed in *E. coli* and insect cells for use as tools for antibody screening. *J. Hepatol.* 26:1179-1186.
- Hsu H.H., Donets M., Greenberg H.B., Feinstone S.M. 1993. Characterization of hepatitis C virus structural proteins with a recombinant baculovirus expression system. *Hepatology.* 17:763-771.
- Hwang S.B., Park K.J., Kim Y.S., Sung Y.C., Lai M.M. 1997. Hepatitis C virus NS5B protein is a membrane-associated phosphoprotein with a predominantly perinuclear localization. *Virology.* 227:439-446.
- Ikeda M., Yi M., Li K., Lemon S.M. 2002. Selectable subgenomic and genome-length dicistronic RNAs derived from an infectious molecular clone of the HCV-N strain of hepatitis C virus replicate efficiently in cultured Huh7 cells. *J. Virol.* 76:2997-3006.
- Inoue Y., Suzuki R., Matsuura Y., Harada S., Chiba J., Watanabe Y., Saito I., Miyamura T. 1992. Expression of the amino-terminal half of the NS1 region of the hepatitis C virus genome and detection of an antibody to the expressed protein in patients with liver diseases. *J. Gen Virol.* 73:2151-2154.
- Kanda T., Basu A., Steele R., Wakita T., Ryerse J.S., Ray R., Ray R.B. 2006. Generation of infectious hepatitis C virus in immortalized human hepatocytes. *J. Virol.* 80:4633-4639.

- Kobayashi M., Tanaka E., Sodeyama T., Urushihara A., Matsumoto A., Kiyosawa K. 1996. The natural course of chronic hepatitis C: a comparison between patients with genotypes 1 and 2 hepatitis C viruses. *Hepatology*. 23:695-699.
- Krekulova L., Lehak V., Riley L.W. 2006. Structure and functions of hepatitis C virus proteins: 15 years after.Review. *Folia Microbiol (Praha)*. 51:665-680.
- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.
- Lanford R.E., Notvall L., Chavez D., White R., Frenzel G., Simonsen C., Kim J. 1993. Analysis of hepatitis C virus capsid, E1, and E2/NS1 proteins expressed in insect cells. *Virology*. 197:225-235.
- Lechmann M., Satoi J., Vergalla J., Murata K., Baumert T.F., Liang, T.J. 2001. Hepatitis C virus-like particles induce virus-specific humoral and cellular immune responses in mice. *Hepatology*. 34:417-423.
- Leitner W.W., Ying H., Restifo N.P. 1999. DNA and RNA-based vaccines: principles, progress and prospects. Review. *Vaccine*.18:765-777.
- Liljeström P. and H. Garoff. 1991. A new generation of animal cell expression vectors based on Semliki Forest virus replicon. *Bio/technology*. 9: 1356–1361.
- Lindenbach B.D., Evans M.J, Syder A.J., Wolk B., Tellinghuisen T.L., Liu C.C.,Maruyama T. , Hynes R.O., Burton D.R., McKeating J.A., Rice C.M. 2005. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science*. 309:623-626.
- Lohmann V., Korner F., Koch J., Herian U., Theilmann L., Bartenschlager R. 1999. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science*. 285:110-113.
- Majid A.M., Ezelle H., Shah S., Barber G.N. 2006. Evaluating Replication-Defective Vesicular Stomatitis Virus as a Vaccine Vehicle. *J. Virol*. 80:6993-7008.
- Matsuura Y., Harada S., Suzuki R., Watanabe Y., Inoue Y., Saito I., Miyamura T. 1992. Expression of processed envelope protein of hepatitis C virus in mammalian and insect cells. *J Virol*. 66:1425-1431.

- Matsuura Y., Suzuki T., Suzuki R., Sato M., Aizaki H., Saito I., Miyamura T. 1994. Processing of E1 and E2 glycoproteins of hepatitis C virus expressed in mammalian and insect cells. *Virology*. 205:141-150.
- Mokhonov V.V., Novikov D.V., Samokhvalov E.I., Shatalov A.G., Selivanov N.A., Prilipov A.G., L'vov D.K. 2002. Genome analysis of hepatitis C virus strain 274933RU isolated in Russian Federation. *Vopr. Virusol.* 47: 9-12.
- Murata K., Lechmann M., Qiao M., Gunji T., Alter H.J., Liang T.J. 2003. Immunization with hepatitis C virus-like particles protects mice from recombinant hepatitis C virus-vaccinia infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:6753-6758.
- Nakano I., Maertens G., Major M.E., Vitvitski L., Dubuisson J., Fournillier A., De Martynoff G., Trepo C., Inchauspe G. 1997. Immunization with plasmid DNA encoding hepatitis C virus envelope E2 antigenic domains induces antibodies whose immune reactivity is linked to the injection mode. *J. Virol.* 71:7101-7109.
- Nishihara T., Nozaki C., Nakatake H., Hoshiko K., Esumi M., Hayashi N., Hino K., Hamada F., Mizuno K., Shikata T. 1993. Secretion and purification of hepatitis C virus NS1 glycoprotein produced by recombinant baculovirus-infected insect cells. *Gene*. 129:207-214.
- Overton H., McMillan D., Gillespie F., Mills J. 1995. Recombinant baculovirus-expressed NS3 proteinase of hepatitis C virus shows activity in cell-based and in vitro assays. *J Gen Virol.* 76:3009-3019.
- Pancholi P., Liu Q., Tricoche N., Zhang P., Perkus M.E., Prince A.M. 2000. DNA prime-canarypox boost with polycistronic hepatitis C virus (HCV) genes generates potent immune responses to HCV structural and nonstructural proteins. *J Infect Dis.* 182:18-27.
- Perri S., Driver D.A., Gardner J.P., Sherrill S., Belli B.A., Dubensky T.W. Jr., Polo J.M. 2000. Replicon vectors derived from Sindbis virus and Semliki forest virus that establish persistent replication in host cells. *J. Virol.* 74:9802-9807.
- Pietschmann T., Lohmann V., Rutter G., Kurpanek K., Bartenschlager R. 2001. Characterization of cell lines carrying self replicating hepatitis C virus RNAs. *J.Virol.* 75:1252-1264.
- Pushko P., Parker M., Ludwig G.V., Davis N.L., Johnston R.E., Smith J.F.. 1997. Replicon-helper systems from attenuated Venezuelan equine encephalitis virus — expression of heterologous genes in vitro and immunization against heterologous pathogens in vivo. *Virology*. 239: 389–401.

Reddy J.R., Kwang J., Varthakavi V., Lechtenberg K.F., Minocha H.C. 1999. Semliki forest virus vector carrying the bovine viral diarrhoea virus NS3 (p80) cDNA induced immune responses in mice and expressed BVDV protein in mammalian cells. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 22:231-246.

Robinson H.L., Montefiori D.C., Johnson R.P., Manson K.H., Kalish M.L., Lifson J.D., Rizvi T.A., Lu S., Hu S.L., Mazzara G.P., Panicali D.L., Herndon J.G., Glickman R., Candido M.A., Lydy S.L., Wyand M.S., McClure H.M. 1999. Neutralizing antibody-independent containment of immunodeficiency virus challenges by DNA priming and recombinant pox virus booster immunizations. *Nat Med.* 5:526-534.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning. Laboratory Manual*, 2nd Edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.

Saracco G., Olivero A., Ciancio A., Carezzi S., Rizzetto M. 2003. Therapy of chronic hepatitis C: a critical review. *Curr Drug Targets Infect Disord.* 3:25-32.

Smerdou C., Liljeström P. 1999. Two-helper RNA system for production of recombinant Semliki forest virus particles. *J Virol.* 73:1092-1098.

Sominskaya I., Alekseeva E., Skrastina D., Mokhonov V., Starodubova E., Jansons J., Levi M., Prilipov A., Kozlovskaya T., Smirnov V., Pumpens P., Isaguliantz M.G. 2006. Signal sequences modulate the immunogenic performance of human hepatitis C virus E2 gene. *Mol Immunol.* 43:1941-1952.

Suzuki T., Ishii K., Aizaki H., Wakita T. 2007. Hepatitis C viral life cycle. Review. *Adv. Drug Deliv Rev.* 59:1200-1212.

Tanaka K., Ikematsu H., Hirohata T., Kashiwagi S. 1996. Hepatitis C virus infection and risk of hepatocellular carcinoma among Japanese: possible role of type 1b (II) infection. *J Natl Cancer Inst.* Jun 88:742-746.

Tani H., Komoda Y., Matsuo E., Suzuki K., Hamamoto I., Yamashita T., Moriishi K., Fujiyama K., Kanto T., Hayashi N., Owsianka A., Patel A.H., Whitt M.A., Matsuura Y. 2007. Replication-Competent Recombinant Vesicular Stomatitis Virus Encoding Hepatitis C Virus Envelope Proteins. *J. Virol.* 81:8601-8612.

Thomson B.J., Finch R.G. 2005. Hepatitis C virus infection. *Clinical Microbiology and Infection.* 11:86-

Vidalin O., Fournillier A., Renard N., Chen M., Depla E., Boucreux D., Brinster C., Baumert T., Nakano I., Fukuda Y., Liljeström P., Trépo C., Inchauspé G. 2000. Use of Conventional or Replicating Nucleic Acid-Based Vaccines and Recombinant Semliki Forest Virus-Derived Particles for the Induction of Immune Responses Against Hepatitis C Virus Core and E2 Antigens. *Virology*. 276:259-270.

Wang Y.H., Trowbridge R., Gowans E.J. 1997. Expression and interaction of the hepatitis C virus structural proteins and the 5' untranslated region in baculovirus infected cells. *Arch Virol*. 142:2211-2223.

Xiong C., Levis R., Shen P., Schlesinger S., Rice C.M., Huang H.V. 1989. Sindbis virus: an efficient, broad host range vector for gene expression in animal cells. *Science*. 243: 1188–1191.

Yi M., Villanueva R.A., Thomas D.L., Wakita T., Lemon S.M. 2006. Production of infectious genotype 1a hepatitis C virus (Hutchinson strain) in cultured human hepatoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 103:2310-2315.

Ying H., Zaks T.Z., Wang R.F., Irvine K.R., Kammula U.S., Marincola F.M., Leitner W.W., Restifo N.P. 1999. Cancer therapy using a self-replicating RNA vaccine. *Nat Med*. 5:823-827.

Zhong J., Gastaminza P., Cheng G., Kapadia S., Kato T., Burton D.R., Wieland S.F., Uprichard S.L., Wakita T., Chisari F.V. 2005. Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 102:9294-9299.

Publikāciju saraksts/List of publications

This thesis is based on the following publications:

Alekseeva E., Sominskaya I., Skrastina D., Egorova I., Starodubova E., Kushners E., Mihailova M., Petrakova N., Bruvere R., Kozlovskaya T., Isaguliants M., Pumpens P. 2008. **Enhancement of the expression of HCV core gene gives no enhancement to core-specific immune response in gene immunization: advantages of the heterologous gene prime, protein boost immunization regiment.** *Genetic Vaccines and Therapy*. (Accepted, in press)

Alekseeva E., Sominskaya I., Bruvere R., Ose V., Zajakina A., Kozlovska T. 2008. **Expression of Hepatitis C virus structural genes controlled by alphaviral recombinant replicons.** *Acta Universitatis Latviensis, Biology* :115–130.

Sominskaya I., Alekseeva E., Skrastina D., Mokhonov V., Starodubova E., Jansons J., Levi M., Prilipov A., Kozlovska T., Smirnov V., Pumpens P., Isaguliants M.G. 2006. **Signal sequences modulate the immunogenic performance of human hepatitis C virus E2 gene.** *Mol Immunol.* 43:1941-1952.

Konferenču tēzes/Conference theses

E.Alekseeva, A.Zajakina, T.Kozlovskā. **Hepatitis B virus (HBV) X gene expression and protein characterization.** The 61th conference of University of Latvia, January-March 2003, Riga, Latvia.

E.Alekseeva, A.Zajakina, T.Kozlovskā. **Hepatitis B virus (HBV) X gene expression and protein characterization.** Internacional Meeting of the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, 7–10.09.2003, Bergamo, Italia.

E.Alekseeva, A.Zajakina, T.Kozlovskā. **Expression of HCV genome fragments by Alphavirus replicon vektors.** The 63th conference of University of Latvia, January-March 2005, Riga, Latvia.

E.Alekseeva, I.Sominskaya, R.Bruvere, A.Zajakina, T.Kozlovskā. **Alphavirus replicon strategy for HCV vaccine design.** New Visby Workshop on Clinical and Experimental Virology of Human Hepatitis C Virus, 3-15.02.2005, Riga, Latvia.

E.Alekseeva, I.Sominskaya, R.Bruvere, J.Jansons and T.Kozlovskā. **Alphavirus replicon strategy for HCV vaccine design.** Conference „New Approaches to Vaccine Development: From the bench to the field”, 8-10.09.2005, Berlin, Germany.

E.Alekseeva, I.Sominskaya, R.Bruvere, J.Jansons, T.Kozlovskā. **Expression of HCV Genes by Alphavirus Replicon Vectors – Implications for HCV Vaccine Design.** Workshop on Bioinformatics for Viral Infections, 21-23.09.2005, Bonn, Germany.

E.Alekseeva, I.Sominskaya, A.Zajakina, R.Bruvere, V.Ose, T.Kozlovskā. **Expression of HCV genome fragments by Alphavirus replicon vektors.** New Visby Workshop on Clinical and Experimental Virology of Human Hepatitis C Virus, 12-14.02.2006, Malmo, Sweden.

E.Alekseeva, I.Sominskaya, R.Bruvere, V.Ose, T.Kozlovskā. **Production of Hepatitis C virus-like particles by recombinant Semliki Forest Virus.** Conference “Early Steps of the Virus Life Cycle: Molecular and Cellular Insights”, 04-05.10.2007, Paris, France.

E.Alekseeva, I.Sominskaya, R.Bruvere, V.Ose, T.Kozlovskā. **HCV core protein and its localization in the cell.** *FIFTH ANNUAL MEETING OF THE NEW VISBY UNIVERSITY NETWORK ON HEPATITIS C*, 31.01-04.02.2008, Moskow, Russia.

Satura rādītājs/Contents

Abstract	2
Actuality of the Research	3
Aims of the Thesis	4
Insight into HCV Investigation using Virus-based Expression Systems	5
A short description of the methods	10
The overview of the results	15
Concluding remarks	35
Kopsavilkums	38
Darba aktualitāte	39
Promocijas darba mērķis	40
Ieskats HCV pētījumos, izmantojot uz vīrusu pamata izstrādātās ekspresijas sistēmas	41
Īss metožu apraksts	45
Rezultātu pārskats	50
Secinājumi	70
Literatūras saraksts /References	72
Publikāciju saraksts/List of publications	80
Konferenču tēzes/Conference theses	81